

酒母製造に利用可能な乳酸菌の選抜

藤原朋子・藤井一嘉*・外菌寛郎**

Selection of lactic acid bacteria suitable for producing *shubo* or sake starter

Tomoko Fujiwara, Kazuyoshi Fujii* and Hiroo Hokazono**

To select lactic acid bacteria strains that can be substituted for lactic acid to be added in the process of producing *shubo* or sake starter in the *sokujo-moto* method, a modern procedure for *sake* brewing, we cultivated 103 strains of lactic acid bacteria possessed by our Research Center on four different culture media. After the selection, *shubo* preparation and pilot-scale *sake* brewing were performed, using selected strains. The ingredients of the prepared *shubo* and brewed *sake* were then evaluated.

Fifteen strains were selected that met the following four criteria: viable in *koji* extract, not viable in 10% alcohol, viable in 20% glucose and can be cultured with *koji* extract alone.

In *shubo* producing method in which lactic acid bacteria strains were added before yeast inoculation at 20°C, five *Lactobacillus* strains (*L. sakei* NBRC3541, *L. curvatus* B1, *L. brevis* 021101A, *L. manihotivorans* LMG18011 and *L. plantarum* 011029A) were selected. One more strain (*Leuconostoc mesenteroides* A2) was selected in the method in which lactic acid bacteria and yeast were added simultaneously. With these strains, we were able to produce *shubo* and *sake* of the same quality to those produced with the *sokujo-moto* method.

清酒醸造では、醪の雑菌や野生酵母汚染を防止し、健全な発酵を行なうために酒母が製造される。酒母は、優良清酒酵母を高密度に含むこと、多量の乳酸を含むことが備えるべき重要な条件となる。酒母製造法は二つに区分される。蒸米、米麴を仕込み水に仕込み、微生物叢の遷移の中で、乳酸菌により乳酸を生成させる、伝統的製法である生酏系酒母と、仕込み時に乳酸と酵母を同時に添加して酒母を速成する、現在主流の速醸酏系酒母である。

生酏系酒母製造では、自然由来の硝酸還元菌や乳酸菌の増殖を促し、雑菌のいない良好な環境を作り出す。しかし、使用する麴、水の菌叢や菌数が大きく影響するため、安定性に乏しい。このため、微生物の遷移を不確定な自然増殖の制御によらず、人為的に硝酸還元菌や乳酸菌を添加することにより、生酏系酒母製造を安定化させようとの試みがなされてきた^{1)~5)}。これらの試みは、生酏系酒母製造を行っている酒造場においては、硝酸還元菌や乳酸菌が順調に増殖しない場合に有効な手段と考えられる。しかし、伝統的な生酏系酒母の製造方法は、時間と手間がかかることには変わりがない。

生酏系酒母における乳酸菌の役割は、乳酸を生成することが第一であるが、それ以外の効果についても研究が進んでいる。例えば、乳酸菌が死滅する過程で溶出する、細胞壁成分のテイコ酸が、蒸米溶解を促進すると報告されている⁶⁾⁷⁾。また、乳酸を直接添加する速醸酏系酒母に対して、生酏系酒母では、乳酸菌の増殖に伴う乳酸生成がおこるため、酒母のpH経過が異なり、アミノ酸含量が高いと報告されている⁸⁾⁹⁾。このため、生酏系酒母による製成酒では、酒母由来の高含有アミノ酸により、酵母によるペプチド取込が抑えられ、ペプチド含量が高いと報告されている¹⁰⁾。さらに、生酏系酒母中の酵母は、アルコール耐性が強いいため、醪末期までよく発酵し、細胞死滅に伴う細胞成分の漏出が少ないとされている。このアルコール耐性の強さは、酵母の細胞膜の特徴的なリン脂質組成によるもので、これは生酏由来の乳酸菌の増殖に起因することが報告されている^{11)~13)}。このように、生酏系酒母の特徴は、乳酸菌が増殖して生成する乳酸だけによるものではないことが示されてきた。

そこで、本研究では、速醸酏系酒母製造方法で、従来の乳酸添加の代わりに、乳酸菌により乳酸を生成させ、併せて乳酸菌の乳酸生成以外の効果を発現させる利用の仕方を検討することとした。すなわち、生酏系酒母製造における、低温仕込みや硝酸還元菌の増殖は省いて、乳酸菌の増殖により酒母製造を行うものである。添加する乳酸菌に求められる培養特性は、酒母成分に近いと考えられる麴汁成

* 広島県立総合技術研究所農業技術センター

* Hiroshima Prefectural Technology Research Institute
Agricultural Technology Research Center

** 広島県東部農業技術指導所

** Hiroshima Prefecture Eastern Center for Agricultural Technology Guidance

表1 供試した乳酸球菌株および麹汁調整培地における生育性

菌株	属種	分離源	形態	発酵形式	麹汁調整培地生育性			選抜
					10℃	20℃	30℃	
NBRC102481	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>sake</i>	酒母	球	hetero	+	+	-	※
* A1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	山廃もと	球	hetero	+	+	+	※
* A2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	山廃もと	球	hetero	+	+	+	※
* A3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	山廃もと	球	hetero	+	+	+	※
* 23G-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	ナシ皮	球	hetero	+	+	++	※
JCM6124	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	fermenting olives	球	hetero	-	+	-	
b10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	タイ発酵食品	球	hetero	+	-	-	
b41	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	タイ発酵食品	球	hetero	+	+	-	
NBRC12007	<i>Lactococcus lactis</i>		球	homo	-	-	-	
k1-1	<i>Lactococcus lactis</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	+	+	※
Sa-13	<i>Lactococcus lactis</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	+	-	
68	<i>Enterococcus faecalis</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	-	-	
b8	<i>Enterococcus gallinarum</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	-	-	
Sa-6	<i>Enterococcus gallinarum</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	-	-	
JCM8729	<i>Enterococcus hirae</i>		球	homo	-	-	-	
Sa-5	<i>Enterococcus hirae</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	-	-	
JCM20119	<i>Pediococcus acidilactici</i>		球	homo	-	-	-	
Sa-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	-	+	
Sa-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	タイ発酵食品	球	homo	-	-	+	
JCM20109	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Dairy products	球	homo	-	+	-	
* 4G-1		稲わら積上げ	球	hetero	-	+	-	
* 17G-1		埋土カリン	球		-	-	-	
* 18G-5		埋土カリン	球		-	-	-	
* 19G-6		埋土ハッサク	球		-	-	-	
* 20G-21		イチジク皮	球	hetero	-	-	+	
* 25G-1		ミニトマト	球		-	-	-	
* 29G-1		比治山土	球		-	-	-	
* 30G-1		ドングリ	球		-	-	-	
* 34G-1		米白ぬか	球		-	-	-	
* 35G-1		精米	球		-	-	-	
* 42G-1		埋土果皮	球		-	-	-	
* 48G-1		ブドウ葉	球		-	-	-	
* 67G-1		稲わら	球		-	-	-	
* 73G-1		稲刈り後青葉	球		-	-	-	
乳技510			球		-	-	-	
* 54122			球		-	-	-	
* 54123			球		-	-	-	

*は、当センター分離株を示す。他は微生物資源保存施設から入手あるいは分譲にて入手した株を示す。
 生育性は、30℃で1日、20℃で2日、10℃で7日以内で増殖がみられた場合に++、30℃で2日、20℃で3日、10℃で14日以内で増殖がみられた場合に+、増殖にそれ以上の日数を要した、または増殖しなかった場合に-と判定した。
 ※は、選抜株（生育性および分離源、属種から選抜）を示す。

分中での生育が可能で、火落ちの原因菌となり得ないようアルコール感受性を有し、酒母の濃糖環境で増殖できる特徴を有することと考えられる。さらに、酒母へ添加する際に望ましい麴汁での培養可能性を調査することとした。以上の条件を満たす乳酸菌株を、当センターが保有している様々な分離源由来の乳酸菌株の中から選抜し、酒母作製試験および清酒小仕込試験での適性について検討した結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

様々な分離源から当センターにて分離した乳酸菌株、あるいは微生物資源保存施設から入手した株（NBRC株、JCM株）および他所からの分譲株を含む、乳酸菌103株を供試した（表1, 2）。乳酸菌株は、10%グリセロールに懸濁し凍結保存したものを随時復元し、以下の培養試験に供した。

2. 培地および培養法

培地は、M.R.S.broth培地（関東化学）を1/2濃度で調製した培地（以下、1/2MRS培地とする）および次に示す麴汁培地あるいは麴汁調整培地を用いた。麴汁培地は、乾燥麴（徳島製麴）3500gに水15L、酵素剤グルコアミラーゼ・アマノ4gを加え、55℃で1晩おき、ろ過により固形分を除去した麴汁（Brix16.1%, グルコース濃度12.9%, pH4.8）をそのまま培地とした。麴汁調整培地は、麴汁を2倍希釈し、リン酸水素二カリウムでpH7.2に調整した培地とした。

麴汁成分中での生育性試験には、麴汁調整培地を試験培地として用いた。アルコール感受性試験には、エタノール0, 2.5, 5, 7.5および10%を添加した1/2MRS培地を用いた。濃糖耐性試験には、グルコース濃度を2, 10, 20, 25, 30および35%とした1/2MRS培地を試験培地として用いた。麴汁での培養可能性をみるための麴汁のみでの生育性試験には、麴汁培地を用いた。

以上の各生育性試験は、各試験培地10mlに、各菌株の前培養液0.1mlを接種して、30℃にて3~14日間静置培養した。前培養は、10%グリセロール凍結保存菌株を滅菌つまようじを用い、1/2MRS培地2mlに接種して、30℃で3日間静置培養した。なお、麴汁成分中での生育性試験（麴汁調整培地における生育性試験）は、30℃に加えて、10℃および20℃の各温度でも培養した。生育性の判定は、培地の濁度により増殖量を判断し、生育に要した日数と合わせて行った。すなわち、麴汁調整培地における生育性試験では、30℃, 20℃および10℃それぞれで、1日, 2日, 7日で増殖がみられた場合に++, 2日, 3日, 14日で増殖がみられた場合に+, それ以上の日数を要する場合を-と判定した。アルコール感受性試験、濃糖耐性試験および麴汁のみでの生育性試験（麴汁生育性試験）では、30℃, 3日間培

養で、1/2MRS培地（エタノール0%, グルコース2%）と同程度の増殖がみられた場合に+, 増殖の抑制あるいは遅延がみられた場合に±, 増殖がみられなかった場合を-と判定した。麴汁生育性試験における酸生成は、培養液の0.1mol/L水酸化ナトリウムによる中和滴定量（ml）で示した。

3. 酒母作製および清酒小仕込試験

前記の麴汁調整培地における生育性、アルコール感受性、濃糖耐性、および麴汁生育性の各試験により選抜した乳酸菌株を用いて、酒母作製と、これによる清酒小仕込試験を行い、酒母製造への利用可能性について検討した。

(1) 小規模酒母作製試験

総米90g（蒸米60g, 乾燥麴27g, 汲水110ml）で酒母の小仕込製造を行った。醸造用乳酸0.75ml添加区を対照区とし、乳酸を入れないで乳酸菌培養菌体を添加する試験区（乳酸菌添加区）を設けた。なお、乳酸菌は、麴汁培地で2日間30℃静置培養したものを、汲水として10ml添加した。すなわち、乳酸菌添加区の汲水110mlは、水100mlと乳酸菌培養液10mlとを合わせたものである。また、酵母はきょうかい酵母701号（日本醸造協会）を次のように培養して添加した。すなわち、麴汁をBrix10%に希釈し、これにグルコース13g/L, 乳酸0.7ml/L, パントテン酸カルシウム0.017g/Lを添加した酵母用麴汁培地で、30℃, 3日間振とう培養したものを2ml添加した。

試験区は、表3に示すように、仕込み後20℃で、2日間乳酸菌を増殖後、3日目に酵母を添加するⅠ区乳酸菌添加区（乳酸菌増殖後酵母添加：20℃区）、仕込み時に乳酸菌と酵母を同時に添加し20℃で培養するⅡ区乳酸菌添加区（乳酸菌・酵母同時添加：20℃区）、および速醸醗製造と同じように12℃で仕込みを開始する速醸モデルのⅢ区乳酸菌添加区（乳酸菌・酵母同時添加：速醸モデル区）を設けた。Ⅲ区乳酸菌添加区は、Ⅱ区と同様に乳酸菌と酵母を仕込み時に同時に添加した。ⅡおよびⅢ区には、対照区として、乳酸菌の代わりに、酵母添加と同時に醸造用乳酸を添加するⅡ区対照区およびⅢ区対照区を設定した。各試験区とも7℃においた後に、次の清酒小仕込試験に供した。

なお、作製した酒母については、遠心分離（5000rpm, 10分間）上清について次の項目を分析した。アルコール度はアルコメイト（理研計器）を用いて、また、酸度およびアミノ酸度は国税庁所定分析法に準じて測定した。酵母数はYPD寒天培地（1%酵母抽出物, 2%ペプトン, 2%グルコース, 1.5%寒天）を用い、平板塗抹法により計測した。細菌数は標準寒天培地に真菌抑制剤シクロヘキシミドを10ppm添加した培地を用いて、混濁法により計測した。

(2) 清酒小仕込試験

表4に示す仕込み配合で、清酒小仕込試験を行った。掛米は50%精白米を用い、麴は徳島製麴製70%精米の乾燥麴を使用した。酒母は、7℃においていた前記小規模酒母作

表2 供試した乳酸桿菌株および麹汁調整培地における生育性

菌株	属種	分離源	形態	発酵形式	麹汁調整培地生育性			選抜
					10℃	20℃	30℃	
NBRC15893 ^T	<i>Lactobacillus sakei</i>	酒母	桿	homo	-	-	-	
NBRC3541	<i>Lactobacillus sakei</i>	酒母	桿	homo	+	+	+	※
* B1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	山麩もと	桿	homo	+	+	+	※
* B2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	山麩もと	桿	homo	+	+	+	※
JCM1125 ^T	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	sweet waste-corn fermentation	桿	homo	-	-	-	
JCM1126 ^T	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	cattle waste-corn fermentation	桿	homo	-	-	-	
JCM1559	<i>Lactobacillus brevis</i>	green, fermenting Sevillano variety olives	桿	hetero	+	++	++	※
NBRC3345	<i>Lactobacillus brevis</i>	green, fermenting Sevillano variety olives	桿	hetero	-	+	+	
* 010925A	<i>Lactobacillus brevis</i>	キムチ	桿	hetero	-	+	-	
* 020823A	<i>Lactobacillus brevis</i>	イカキムチ	桿	hetero	+	+	-	
* 021101A	<i>Lactobacillus brevis</i>	海鮮キムチ	桿	hetero	+	+	+	※
* 021101B	<i>Lactobacillus brevis</i>	海鮮キムチ	桿	hetero	+	+	+	
* 021202A	<i>Lactobacillus brevis</i>	キュウリ漬け	桿	hetero	+	+	-	
* 021202B	<i>Lactobacillus brevis</i>	キムチ	桿	hetero	-	+	-	
* 103	<i>Lactobacillus brevis</i>		桿	hetero	+	++	++	※
JCM1134	<i>Lactobacillus casei</i>	cheese	桿	homo	-	-	-	
JCM1560	<i>Lactobacillus fermentum</i>		桿	hetero	-	-	-	
LMG18011	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	cassava fermentation	桿	homo	-	+	+	※
JCM1149	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled cabbage	桿	homo	+	+	++	※
* A305	<i>Lactobacillus plantarum</i>	赤フスマ	桿	homo	+	++	++	※
* SHI3032	<i>Lactobacillus plantarum</i>	白フスマ	桿	homo	-	+	++	※
* A3051	<i>Lactobacillus plantarum</i>	赤フスマ	桿	homo	+	++	++	※
* 1730・3	<i>Lactobacillus plantarum</i>		桿	homo	+	++	++	※
* 1830・28	<i>Lactobacillus plantarum</i>		桿	homo	+	++	++	※
* 1823	<i>Lactobacillus plantarum</i>	白菜キムチ	桿	homo	+	++	++	※
* 3802	<i>Lactobacillus plantarum</i>	キムチ	桿	homo	-	+	+	※
* 3902	<i>Lactobacillus plantarum</i>	キムチ	桿	homo	+	++	++	※
* 3930	<i>Lactobacillus plantarum</i>	キムチ	桿	homo	+	++	++	※
* 6110	<i>Lactobacillus plantarum</i>	広島菜漬け	桿	homo	+	++	++	※
* 6113	<i>Lactobacillus plantarum</i>	広島菜漬け	桿	homo	+	++	++	※
* 011002A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	広島菜漬け	桿	homo	+	+	++	※
* 011009A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	広島菜漬け	桿	homo	+	++	++	※
* 011029A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	広島菜漬け	桿	homo	-	+	++	※
あ1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	タイ発酵食品	桿	homo	+	++	++	※
b46	<i>Lactobacillus plantarum</i>	タイ発酵食品	桿	homo	+	++	++	※
* 36I -1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	市販キムチ漬汁	桿	homo	+	++	++	※
JCM1136	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		桿	homo	-	+	-	※
k5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ケフィア	桿	homo	-	-	+	
JCM6014	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	Chicken feed	桿		-	+	++	※
* II -2		家ぬか床	桿		+	+	-	
* 11G -11		市販ぬか漬液	桿		+	++	++	※
* 11I -1		市販ぬか漬液	桿		+	++	++	※
* 34I -10		米白ぬか	桿		+	++	++	※
* 36G -1		キムチ漬汁	桿		+	++	++	※
* 46G -1		酒粕自然発酵	桿		+	++	++	※
* 70G-1		ヒガンバナ花	桿		+	+	+	※
* 74G-1		埋土果皮	桿		+	++	++	※
* 75G-2		埋土果皮	桿		+	++	++	※
* 81I-1		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* 82I-1		市販サバナれずし	桿		+	+	-	

表2 供試した乳酸桿菌株および麹汁調整培地における生育性

菌株	属種	分離源	形態	発酵形式	麹汁調整培地生育性			選抜
					10℃	20℃	30℃	
* 83I-1		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* 84I-1		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* 84IK-1		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* 84K-11		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* 85I-1		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* 85IK-1		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* 85K-11		市販サバナれずし	桿		+	+	-	
* NA-1		ナシ果汁自然発酵	桿		+	++	++	※
* NB2		ナシ果汁自然発酵	桿		+	+	-	
* NB-3		ナシ果汁自然発酵	桿		-	++	++	※
* 1830・25			桿		-	-	-	
* ③1830			桿		-	-	-	
* ト30・6L			桿		+	++	++	※
KE04			桿?		-	-	-	
FG-1			桿?		+	++	++	※
減効			桿?		-	-	-	

*は、当センター分離株を示す。他は微生物資源保存施設から入手あるいは分譲にて入手した株を示す。生育性は、30℃で1日、20℃で2日、10℃で7日以内で増殖がみられた場合に++、30℃で2日、20℃で3日、10℃で14日以内で増殖がみられた場合に+、増殖にそれ以上の日数を要した、または増殖しなかった場合に-と判定した。
※は、選抜株（生育性および分離源、属種から選択）を示す。

表3 小規模酒母作製試験における試験区設定

試験区名	温度管理 添加時期	日 数														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Ⅰ区乳酸菌 添加区	20℃一定	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	使用*
	乳酸菌増殖 後酵母添加	乳酸菌		酵母												
Ⅱ区乳酸菌 添加区	20℃一定	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	使用*
	乳酸菌・酵 母同時添加	乳酸菌 ・酵母														
Ⅲ区乳酸菌 添加区	速醸モデル	12℃	12℃	14℃	16℃	18℃	20℃	20℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	使用*	
	乳酸菌・酵 母同時添加	乳酸菌 ・酵母														
Ⅱ区対照区	20℃一定	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	20℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	使用*
	乳酸・酵 母同時添加	乳酸 ・酵母														
Ⅲ区対照区	速醸モデル	12℃	12℃	14℃	16℃	18℃	20℃	20℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	7℃	使用*	
	乳酸・酵 母同時添加	乳酸 ・酵母														

*清酒小仕込試験に供したことを示す。

表4 清酒小仕込試験における仕込み配合

	酒母 ^{※3}	初添	仲添	留添	合計
総米(g)	16	27	61	96	200
蒸米(g) ^{※1}	11	18	49	82	160
乾燥麹(g) ^{※2}	5	8	10	13	36
汲水(ml)	20	37	91	143	291

^{※1} 掛米は50%精白千本錦を使用した。

^{※2} 乾燥麹は精米歩合70%、徳島製麹社製を使用した。

^{※3} 小規模酒母作製試験により作製した酒母36gを使用した。

製試験で作製した酒母のうち36gを本試験に用いた。本試験における試験区は、小規模酒母作製試験で選抜した区に対応して設定した。添仕込温度を15℃、踊15℃、仲仕込温度10℃、留仕込温度8℃とし、留後1日1℃昇温、最高品温15℃で5日間、12日目以降1日0.5℃下降し19日以降11℃とした。醪重量が、留仕込み時から、60g減量時に発酵終了とした。上槽は遠心分離法で行い、製成酒について、日本酒度は密度比重計 DA-520（京都電子工業）を用いて、アルコール度はアルコメイト（理研計器）を用いて測定し、酸度およびアミノ酸度は国税庁所定分析法に従って測定した。また、製成酒の香味の優劣について、当センター職員

表5 麴汁調整培地での生育性により選抜した乳酸菌45株のアルコール感受性

	菌株	エタノール生育性			選抜
		5%	7.5%	10%	
球 菌	NBRC102481	+	-	-	※
	A1	+	±	-	※
	A2	+	-	-	※
	A3	+	-	-	※
	23G-3	+	-	-	※
	k1-1	+	+	+	
	NBRC3541	+	±	-	※
	B1	+	+	-	※
	B2	+	+	-	※
	JCM1559	+	+	-	※
	021101A	+	+	-	※
	103	+	+	±	
	LMG18011	+	±	-	※
	JCM1149	+	+	+	
	A305	+	+	±	
桿 菌	SHI3032	+	+	+	
	A3051	+	+	±	
	1730・3	+	+	+	
	1830・28	+	+	+	
	1823	+	+	+	
	3802	+	+	+	
	3902	+	+	+	
	3930	+	+	+	
	6110	+	+	+	
	6113	+	+	+	
	011002A	+	+	-	※
	011009A	+	+	±	
	011029A	+	±	-	※
	あ1	+	+	+	
	b46	+	+	+	
	36I-1	+	+	-	※
	JCM1136	+	+	±	
	JCM6014	+	-	-	※
	11G-11	+	+	+	
	11I-1	+	+	±	
34I-10	+	+	±		
36G-1	+	+	+		
46G-1	+	+	+		
70G-1	+	+	+		
74G-1	+	+	+		
75G-2	+	+	+		
NA-1	+	+	+		
NB-3	+	+	+		
ト30・6L	+	+	±		
FG-1	+	+	+		

生育性は、30℃で3日間静置培養後に、1/2MRS培地（エタノール0%）と同様な生育がみられた場合に+、生育抑制がみられた場合に±、生育がみられなかった場合に-と判定した。※は、選抜株（エタノール10%で非生育）を示す。

3名で官能評価した。

実験結果および考察

1. 培養特性による乳酸菌の選抜

(1) 麴汁成分中での生育性

麴汁調整培地は、麴汁成分中での各菌株の生育を試験するために、pHを調整した培地である。供試103株の麴汁調整培地生育性の結果を表1、2に示した。乳酸球菌は本培地で生育可能な株が少なく、乳酸桿菌は生育できる株が多かった。生育良好な株として、生育判定が++である株全てを選抜した。さらに、生育判定が+であっても、分離源が酒母である株、および生育判定++選抜株と属種が異なる株などから追加で数株を選択し、乳酸球菌37株から6株を、乳酸桿菌66株から39株の、表1、2中※で示した計45株を選抜した。

(2) アルコール感受性

麴汁調整培地で選抜した45株について、アルコール感受性を評価した結果を表5に示した。エタノール5%では供試した全ての株が生育し、7.5%では球菌の4株と桿菌の1株が生育しなかったが、他の菌株は生育可能であった。エタノール10%で生育しない乳酸菌株は、清酒醸造の火落菌、腐造乳酸菌となり得ないと期待されるため、エタノール10%で生育しない球菌5株と桿菌10株、計15株を選抜した。

(3) 濃糖耐性

アルコール感受性で選抜した15株の濃糖耐性を評価した結果を表6に示した。グルコース25%以上では、生育遅延を示す株が多かったが、20%ではNBRC102481株以外の14株は全て生育遅延することなく、1/2MRS培地と同様に生育した。酒母は濃糖環境であり、グルコース濃度が高いときには20%程度になるとされている。そのため、グルコース20%で生育可能な供試15株は全て、酒母製造中に生育可能と考えられる。

(4) 麴汁生育性

酒母製造時に乳酸菌を添加する場合、添加乳酸菌を培養する培地は、人工培地ではなく、米あるいは麴から作製したものが望ましい。添加酵母用の培養にも用いられる麴汁で培養可能であれば、麴汁を添加乳酸菌用の培地としても利用できることから、アルコール感受性で選抜した15株について、麴汁生育性を評価した結果を表6に示した。使用した麴汁はpH4.8で、酸性からの培養開始であった。生育に差はみられたが、15株とも麴汁による培養が可能であった。酸生成量は、生育に遅れがみられた株で1~2ml、生育良好な株で2~8mlであり、菌株によりかなりの差がみられた。

以上の結果、麴汁成分で生育可能、アルコール10%で生育不能、濃糖グルコース20%で生育可能および麴汁のみで生育可能な4条件から、酒母の製造に利用可能性のある乳酸菌として、乳酸球菌では供試37株中5株、乳酸桿菌では

表6 アルコール感受性で選抜した乳酸菌15株の濃糖耐性および麹汁生育性

菌株	属種	濃糖 (グルコース) 生育性					麹汁生育性*		選抜	
		10%	20%	25%	30%	35%	生育	酸生成**		
球菌	NBRC102481	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>sake</i>	+	±	±	±	-	±	1	※
	A1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	+	+	±	±	-	+	2	※
	A2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	+	+	±	±	-	+	2	※
	A3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	+	+	±	±	-	+	2	※
	23G-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	+	+	±	±	-	+	4	※
桿菌	NBRC3541	<i>Lactobacillus sakei</i>	+	+	±	±	-	±	2	※
	B1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+	±	±	-	+	3	※
	B2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+	±	±	-	+	3	※
	JCM1559	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+	+	+	±	+	8	※
	021101A	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+	±	±	±	+	5	※
	LMG18011	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	+	+	±	±	-	±	2	※
	011002A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	±	+	6	※
	011029A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	±	+	6	※
	36I-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	±	±	±	+	6	※
	JCM6014	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	+	+	±	±	±	+	3	※

* 麹汁培地は、Brix16.1%，グルコース12.9%，pH4.8であった。

** 酸生成は、30℃で2日間培養した培養液10mlに対して中和に必要な0.1mol/L水酸化ナトリウムの量 (ml) で示した。

生育性は、30℃3日間静置培養後に、1/2MRS培地 (グルコース2%)と同様な生育がみられた場合に+，生育遅延がみられた場合に±，生育がみられなかった場合に-と判定した。

※は、選抜株 (グルコース20%および麹汁のみで生育可能) を示す。

表7 小規模酒母作製試験における添加乳酸菌数および作製した酒母の成分

試験区	酒母		作製した酒母					選抜
	乳酸菌添加区で添加した菌株および乳酸添加	酒母作製時に添加した乳酸菌数* (logCFU/ml)	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	アルコール (%)	酵母数 (logCFU/g)	細菌数** (logCFU/g)	
I	NBRC102481	5.7	<u>5.3</u> ***	2.8	15.7	8.3	0	
	A2	8.3	11.8	2.5	<u>8.2</u>	<u>7.4</u>	0	
	23G-3	8.7	10.8	2.1	10.9	<u>7.5</u>	0	
	NBRC3541	5.1	8.3	2.5	14.9	8.1	0	※
	B1	7.7	10.7	2.4	14.4	8.0	0	※
	JCM1559	8.0	<u>15.7</u>	1.9	12.0	7.9	0	
	021101A	7.5	12.7	1.6	14.7	8.0	0	※
	LMG18011	6.9	8.6	1.4	13.7	8.1	0	※
	011002A	8.3	<u>16.4</u>	2.7	<u>7.2</u>	<u>7.3</u>	6.7	
	011029A	8.0	12.5	2.0	13.8	8.0	0	※
II	36I-1	7.6	13.4	2.6	12.9	7.9	0	※
	JCM6014	8.0	<u>15.2</u>	3.8	10.2	7.7	0	
	A2	8.3	9.7	1.9	12.7	7.7	0	※
	NBRC3541	5.1	<u>2.7</u>	1.8	17.3	8.2	0	
III	乳酸添加 (対照)	-	6.9	1.6	15.7	8.2	0	
	A2	8.3	8.3	2.1	11.4	7.9	0	※
	NBRC3541	5.1	<u>2.8</u>	1.8	13.8	8.1	0	
	乳酸添加 (対照)	-	7.3	1.2	14.3	8.1	0	

* -は乳酸菌を添加していないことを示す (対照区として乳酸添加)。

** 菌が不検出の場合、菌数を10⁰とした。

*** 下線の数値は、酸不足・過多、アルコール不足、酵母生育不良を示し、酒母として不適格性を示す。

※は、選抜株 (酸不足・過多、アルコール不足、酵母生育不良、および細菌検出に該当しない株) を示す。

供試66株中10株の計15株を選抜した。選抜した乳酸球菌は、清酒酒母から分離されたNBRC102481株、A1株、A2株、A3株、およびナシ皮から分離された23G-3株で、いずれも *Leuconostoc mesenteroides* であった。選抜した乳酸桿菌は、清酒酒母から分離された *Lactobacillus sakei* NBRC3541株、*L. curvatus* B1株、B2株と、キムチなどの発酵物から分離された *L. brevis* JCM1559株、021101A株、*L. manihotivorans* LMG18011株、*L. plantarum* 011002A株、011029A株、36I-1株および鶏飼料から分離された *Sporolactobacillus inulinus* JCM6014株であった。

2. 選抜乳酸菌を利用した酒母作製および清酒小仕込試験

(1) 小規模酒母作製試験

前項において選抜した乳酸菌15株のうち、分離源が同一で、同様の性質を示した(研究ノート「県内酒造場の山廃醗から分離した乳酸菌とその性質」参照) A1株、A2株、A3株から A2株を、また B1株、B2株から B1株の各1株ずつを使用することとし、12株について、I区乳酸菌添加区の酒母を作製した。また、II区およびIII区については、対照区(乳酸添加区)のほかに、乳酸菌添加区として乳酸球菌の A2株と乳酸桿菌の NBRC3541株を供試した。

これら供試菌株について、酒母作製時に添加した麹汁培地培養液中の乳酸菌数と、作製した酒母の成分を表7に示した。添加した麹汁培地培養液中の乳酸菌数は、NBRC102481株、NBRC3541株および LMG18011株で $10^5 \sim 10^6$ CFU/mlと、他の菌株に比べて少なかったが、菌数の調整は行わずに、いずれも培養液10mlをそのまま仕込んだ。すなわち、添加した麹汁培地培養液の乳酸菌数が 10^5 CFU/mlの場合でも、添加後の乳酸菌数は 10^4 CFU/g程度となる。生醗系酒母製造時に乳酸菌を添加する場合には、添加後の乳酸菌数は 10^3 CFU/gが最低限確保されているとよいであろうとされている²⁾。今回は製造法が異なるが、添加後の乳酸菌数としては、十分な数が確保されていたと考えられたため、菌数の調整は行わなかった。

作製した酒母についてみると、I区乳酸菌添加区の NBRC102481株とII区およびIII区の NBRC3541株で、酒母の酸度が、II区およびIII区の対照区(乳酸添加区)よりも低く、酒母として必要な酸度に達していないと考えられた。NBRC102481株は麹汁培地で培養時の酸生成も少なく(表6)、酸生成能が低いと考えられた。また、NBRC3541株は、I区では対照区の酸度に達しているが、II区およびIII区では酸度不足となった。更に、A2株においても、II、III区で対照区以上の酸度であったが、I区よりII区、III区のほうが酸度は低い傾向がみられた。乳酸菌添加による酒母製造においては、乳酸菌株により、酵母添加時期の調整の必要性が示唆された。また、JCM1559株、011002A株、JCM6014株では、酸度15以上であり、生醗系酒母でも酸度10~12程度であること¹⁴⁾から、酸生成過多と考えられ

た。アミノ酸度は、乳酸菌添加区は各菌株とも、対照区(乳酸添加区)に比べて、同等かそれ以上であった。

アルコールおよび酵母数についてみると、対照区と同等のものがほとんどであったが、I区乳酸菌添加区の A2株と011002A株ではアルコールが10%より低く、酵母数も少なかった。011002A株では、作製した酒母中に細菌が 10^6 CFU/gと多く存在し、酸度が16.4と高いことから、検出された細菌は、添加した乳酸菌011002株が生残したものと考えられた。すなわち、011002A株の生育に伴う酸生成量過多により、酵母の生育が抑えられたと考えられる。

以上の結果から、本試験で作製した酒母について、次のものは酒母として適さないと考えられた。酸度が15以上と高いI区の JCM1559株、011002A株、JCM6014株および酸度が対照区(乳酸添加区)よりも低いI区の NBRC102481株とII区およびIII区の NBRC3541株である。さらに、アルコールが10%よりも低いI区の A2株と011002A株、酵母数が 5×10^7 CFU/gよりも少ないI区の A2株、23G-3株、011002A株および細菌が検出されたI区の011002A株である。したがって、酒母製造に適している乳酸菌は、乳酸菌を先に増殖させておく方法(I区乳酸菌添加区)では、NBRC3541株、B1株、021101A株、LMG18011株、011029A株および36I-1株の6株、乳酸菌と酵母を同時添加する方法(II区およびIII区の乳酸菌添加区)では、A2株の計7株と考えられた。

(2) 清酒小仕込試験

前記の小規模酒母作製試験で選抜した7株および乳酸添加により作製した酒母を用いて、総米200gの小仕込試験を行った結果を表8に示した。醗日数は、I区乳酸菌添加区の36I-1株使用の酒母を除き、対照区(乳酸添加区)の29日より短かった。製成酒の成分は、酸度、アミノ酸度およびアルコールについて、対照区とほぼ同等であった。日本酒度は、醗日数が短かったI区NBRC3541株およびB1株とII区A2株では、少し低めの傾向であった。I区の36I-1株以外は、醗日数で対照区よりも優れていた。製成酒の官能評価では、各区とも対照と同等であり、乳酸菌添加による際立った違いはなかった。

麹菌の α -アミラーゼによる蒸米の溶解促進が、乳酸菌の細胞壁成分に起因する⁶⁾⁷⁾との報告があり、本試験でも蒸米溶解促進効果が同様に働いている可能性が考えられる。

本試験で作製した酒母のアミノ酸量は、対照区(乳酸添加区)に比べ、乳酸菌添加区で少し多いものもあった(表7)が、生醗系酒母での増加⁸⁾⁹⁾¹⁴⁾ほど多くなかった。生醗系酒母でのアミノ酸の増加要因は高濃度のグルコースの存在と、pH4.5前後の限られたpH条件にさらされること⁸⁾⁹⁾であり、また、アミノ酸度の増加は酸度の増加と並行し、その最高量は酸度の増加の緩慢な方が多い¹⁾とされている。本試験の乳酸菌添加区で製造された酒母では、添加乳

表8 清酒小仕込試験における醸日数および製成酒の成分

試験区	酒母		製成酒				選抜
	乳酸菌添加区で添加した菌株および乳酸添加	醸日数	酸度 (ml)	アミノ酸 (ml)	アルコール (%)	日本酒度	
I	NBRC3541	25	3.3	1.2	18.8	7.0	※
	B1	27	3.2	1.3	19.0	6.3	※
	021101A	28	3.6	1.2	19.0	8.8	※
	LMG18011	27	3.3	1.1	18.9	10.0	※
	011029A	26	3.3	1.1	18.8	9.4	※
	36I-1	31	3.6	1.3	19.2	12.0	
II	A2	24	3.6	1.1	18.8	6.2	※
	乳酸添加 (対照)	29	2.8	1.2	19.2	10.0	
III	A2	26	2.5	1.2	18.8	7.9	※
	乳酸添加 (対照)	29	3.5	1.2	19.1	9.2	

※は、選抜株（醸日数および製成酒の成分が対照区と同等以上）を示す。

酸菌により速やかに乳酸が生成しており、報告されている生醱系酒母でのアミノ酸増加条件とは異なった。清酒小仕込試験での製成酒のアミノ酸量は、酒母作製において、乳酸菌添加区と対照区（乳酸添加区）に差がなかった。この点は、速醸系と生醱系で製成酒のアミノ酸量に差がないこと¹⁰⁾と一致した。

本試験において、既述のようにI区乳酸菌添加区36I-1株を除き乳酸菌添加区では、対照区（乳酸添加区）よりも醸日数が短くなった。乳酸菌が増殖する際に、原料から溶出するリノール酸を取込み、パルミチン酸が多く残っている。これが後に増殖する生醱酵母の膜脂質構造ひいてはアルコール耐性を特徴づける要因とされている^{11)~13)}。本試験での醸日数短縮の結果は、乳酸菌によるリノール酸の取込みが良好に行われ、アルコール耐性の高い酵母が、順調にアルコール発酵をした可能性が考えられる。

培養特性で選抜した乳酸菌15株の中から、小規模酒母作製試験に12株供試し、さらに、清酒小仕込試験に12株中7株を供試した。NBRC3541株、B1株、021101A株、LMG18011株および011029A株の5株については、乳酸菌を先に増殖させた後に、酵母を添加し20℃で酒母を作製する製造法（乳酸菌増殖後酵母添加区；表3）で、速醸系酒母作製方法に近い対照区（乳酸添加区）と同等の酒母および製成酒を製造することが可能であった（表7、表8）。5株とも乳酸桿菌 *Lactobacillus* 属であった。乳酸菌と酵母を同時に添加して酒母を作製する製造法（乳酸菌・酵母同時添加区；表3）では、乳酸球菌のA2株の使用が可能であった。

本研究により、乳酸菌を利用し、簡易な製造法により、速醸系酒母と同程度の酒母が製造できることが示された。乳酸菌による乳酸生成以外の付加機能について、今後検討すべき課題であるが、乳酸菌を利用した簡易な酒母製造方法は、速醸系酒母製造並の簡便さで、生醱系酒母における乳酸菌生育に伴う効果が期待できる可能性がある。

要 約

速醸系酒母製造における乳酸菌添加の代わりに利用可能な乳酸菌株を選抜する目的で、当センター保有の乳酸菌103株について、4種類の培地での生育性による選抜と、選抜した乳酸菌株を用いた酒母作製試験および清酒小仕込試験により、酒母としての適格性と製成酒の成分を評価した。

麹汁成分で生育可能、アルコール10%で生育不能、濃糖グルコース20%で生育可能、麹汁のみで培養可能な4条件を満たす株として15株を選抜した。

乳酸菌を先に増殖させた後に酵母を添加する20℃での酒母製造法で、*Lactobacillus* 属5株、すなわち、*L. sakei* NBRC3541株、*L. curvatus* B1株、*L. brevis* 021101A株、*L. manihotivorans* LMG18011株および *L. plantarum* 011029A株を選抜した。乳酸菌と酵母を同時に添加する方法で、1株、*Leuconostoc mesenteroides* A2株を選抜し、速醸系酒母製造方法と同等の酒母およびこれによる製成酒の製造が可能であった。

文 献

- 1) 芦沢長，山麴酒母における微生物学的研究（第3報）乳酸菌添加の影響について，醸協，58（6），543-548（1963）。
- 2) 芦沢長，山麴酒母における微生物学的研究（第6報）育成日数の短縮について，醸協，59（3），265-267（1964）。
- 3) 鈴木賢二，高橋幹雄，根本彩，佐藤寿昭，根本秀夫，佐藤正，福島県産ブランド清酒の開発－山麴用微生物の検索と山麴および純米大吟醸酒の試験醸造－，福島県ハイテクプラザ試験研究報告，平成15年度，63-66（2003）。
- 4) 鈴木賢二，鈴木英二，高橋亮，櫛田長子，佐藤正，福島県産ブランド清酒の開発－山麴用微生物の検索と山麴および純米大吟醸酒の試験醸造－，福島県ハイテクプラザ試験研究報告，平成16年度，75-77（2004）。
- 5) 西尾昭，茂一孝，乳酸菌と硝酸還元菌の添加による生もと系酒母製造の安定化，鳥取県産業技術センター研究報告，11，55-58（2009）。
- 6) 溝口晴彦，鶴本真人，古川彰久，川崎恒，生醱中より分離

- された乳酸菌による蒸米溶解促進と作用因子の分画, 醸工誌, **69** (4), 211-217 (1991).
- 7) 溝口晴彦, 鶴本真人, 古川彰久, 川崎恒, 生酛中の乳酸菌に由来するテイコ酸の α 化米溶解促進作用機作, 醸工誌, **69** (4), 219-224 (1991).
- 8) Iemura,Y., Yamada,T., Takahashi,T., Furukawa,K. and Hara,S., Properties of the Peptides Liberated from Rice Protein in *Sokujiyo-moto*, *J. Biosci. Bioeng.*, **88** (3), 276-280 (1999).
- 9) Iemura,Y., Takahashi,T., Yamada,T., Furukawa,K. and Hara,S., Properties of TCA-Insoluble Peptides in *Kimoto* (Traditional Seed Mash for Sake Brewing) and Conditions for Liberation of the Peptides from Rice Protein, *J. Biosci. Bioeng.*, **88** (5), 531-535 (1999).
- 10) Iemura,Y., Yamada,T., Takahashi,T., Furukawa,K. and Hara,S., Influence of Amino Acid Content in Seed Mash on Peptide Uptake by Yeast Cells in Main Mash in Sake Brewing Process, *J. Biosci. Bioeng.*, **88** (6), 679-681 (1999).
- 11) 溝口晴彦, 池田朋, 原昌道, 生酛における枯らし中の酵母生存率に及ぼす酵母の生理的性質, 生工誌, **72** (5), 355-361 (1994).
- 12) 溝口晴彦, 原昌道, 生酛で育成された酵母のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす乳酸菌の影響, 生工誌, **72** (5), 167-173 (1994).
- 13) Mizoguchi,H. and Hara,S., Effect of Fatty Acid Saturation in Membrane Lipid Bilayers on Simple Diffusion in the Presence of Ethanol at High Concentrations, *J. Ferment. Bioeng.*, **81** (5), 406-411 (1996).
- 14) 梅田紀彦, 酒母, 「増補改訂酒造講本」, 増補改訂新版, 佐藤信, 川嶋宏監修, (財団法人日本醸造協会, 東京), pp.105-133 (2007).