

県内酒造場の山麴から分離した乳酸菌とその性質

藤原朋子

Lactic acid bacteria isolated from *Yamahai-moto* of the sake brewer
in Hiroshima Prefecture and their characteristics

Tomoko Fujiwara

We isolated and identified lactic acid bacteria that may serve as candidates for addition to *shubo* or sake starter in the traditional *kimoto* method, which will permit stable *shubo* production with maintaining *sake* quality. Lactic acid bacteria were isolated from *yamahai-moto* (*shubo* of the one type of the *kimoto* method) of the sake brewer in Hiroshima Prefecture. We investigated the characteristics of the identified lactic acid bacteria. Phenotypic analysis (size and shape of bacteria, sugar assimilation, optical activity of the lactic acid produced etc.) and 16S rDNA sequence analysis revealed that the isolated coccal strain was *Leuconostoc mesenteroides* and the isolated rod-shaped strain was *Lactobacillus curvatus*. Both strains showed growth ability at low temperatures and low pH levels, and sensitivity to alcohol. These characteristics are also the same exhibited by *L. mesenteroides* and *Lactobacillus sakei*, which reportedly increase in the *shubo* produced by the *kimoto* method.

清酒醸造における酒母は、雑菌の生育を防止するために多量の乳酸を含むことが必要である。酒母は、乳酸菌によって乳酸を生成させる生麴系酒母（生麴、山麴）と、既製の乳酸を添加する速醸系酒母とに区分される。伝統的製法である生麴系酒母では、自然に発生してくる微生物を利用する。生麴系酒母が主流であった時代から、生麴系酒母に生育する乳酸菌については、多くの研究がされている。伝統的製法では、まず乳酸球菌の *Leuconostoc mesenteroides* が増殖し、少し遅れて乳酸桿菌の *Lactobacillus sakei* が増殖するとされている¹⁾²⁾。しかし、乳酸桿菌、乳酸球菌のどちらかだけが出現し、乳酸菌種の変遷がみられない酒母も報告されている³⁾⁴⁾。速醸系酒母が主流となった近年においても、生麴系酒母の乳酸菌叢が調査され、過去の報告と同様に、乳酸桿菌と乳酸球菌両方が認められるもの^{5)~7)} や、乳酸桿菌が認められないものも多くある⁸⁾ と報告されている。

生麴系酒母製造では、自然由来の硝酸還元菌や乳酸菌を利用するため、使用する麴、水の菌叢や菌数が大きく影響し、安定性に乏しい。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、生麴系酒母製造を安定化させようとの試みがなされてきた^{3)9)~12)}。

今回、広島県で製造されている清酒の酒質を変えることなく、生麴系酒母製造安定化の一助とするべく、添加乳酸菌として活用できる菌株探査のため、県内酒造場の山麴から、乳酸菌を分離し、諸性質を調べた。分離した乳酸菌（以下、分離乳酸菌とする）の性質と、伝統的生麴系酒母

で発生するとされている乳酸球菌の *L. mesenteroides* および乳酸桿菌の *L. sakei* の性質を比較検討したので報告する。

1. 実験方法

(1) 分離源および分離方法

広島県内酒造場（山岡酒造株式会社）において、山麴を、2008年2月、3月の2回採取し、分離源とした。どちらのサンプルも、採取時は湧付休みであった。酒母を生理食塩水（0.85%塩化ナトリウム）で10倍希釈したもの0.1mlを、真菌抑制剤シクロヘキシミドを10ppm添加したGYP培地¹³⁾ 10mlに添加し、30℃で3日間静置培養した。酸度の上昇を確認した培養液をGYP白亜寒天培地¹³⁾に混釈し、30℃で3日間培養した。生酸による明確なクリアゾーンを形成したコロニーを各分離源につき3株ずつ鈎菌、純化し、分離生酸菌株とした。

(2) 生理・生化学的試験

分離生酸菌株について、乳酸菌実験マニュアル¹³⁾に従い、次の項目について試験を実施した。すなわち、グラム染色、顕微鏡による細胞の形態観察、カタラーゼ試験、運動性試験、グルコースからのガス発生、発酵形式、スクロースからのデキストラン生成、糖類発酵性試験、初発pH試験、生育温度試験、生成乳酸光学活性の各試験を実施した。また、生成乳酸の光学活性はF-kit L-乳酸/D-乳酸測定キット（J.K.インターナショナル）を用いて測定した。さらに、耐アルコール試験も実施した。

比較対照とした乳酸菌株は、微生物資源保存施設NBRCから入手した。すなわち、乳酸球菌として、

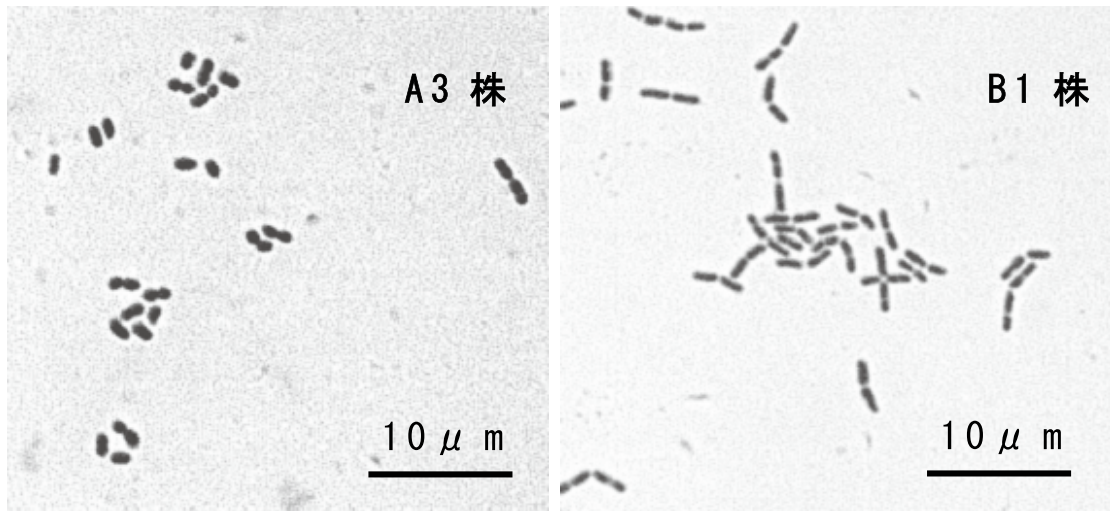


図1 分離乳酸球菌 (A3株) および分離乳酸桿菌 (B1株) の顕微鏡写真

Leuconostoc mesenteroides subsp. *sakei* NBRC102481株 (以下, NBRC102481株と示す), 乳酸桿菌として, *Lactobacillus sakei* NBRC15893^T株 (以下, NBRC15893^T株と示す) および *L. sakei* NBRC3541株 (以下, NBRC3541株と示す) を用いた. なお, NBRC102481株, NBRC15893^T株, NBRC3541株とも, 清酒の酒母から分離された乳酸菌株である.

(3) 16S rDNA 配列解析

乳酸菌からのゲノムDNAの抽出は, FastDNA Kit (Qbiogene) を使用して行った. 16S rDNA 領域は, プライマーとして341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') と 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') を用い, TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) で, サーマルサイクラー (タカラバイオ, TP3000) を使用してPCR増幅した. PCR産物は, ABI PRISM310システム (Applied Biosystems) によりその配列を決定した. 得られたDNA配列は, 日本DNAデータベースで公開されているBLASTサーチによる同源性検索により解析した.

2. 実験結果および考察

(1) 酒母からの乳酸菌分離

採取1回目の酒母から分離した生酸菌株A1株, A2株, A3株は, 全てグラム陽性の球菌, カタラーゼ陰性であり, 3株とも乳酸球菌であった. 採取2回目の酒母からの分離では, 純化の過程で1株生育しなくなったため2株B1株, B2株の生酸菌株取得となった. B1株, B2株とも, グラム陽性の桿菌, カタラーゼ陰性であり, 乳酸桿菌であった. 分離乳酸球菌, 分離乳酸桿菌の顕微鏡写真を図1に示す.

採取1, 2回目の酒母とも, 湧付休み時に採取したサンプルであった. 湧付休み時は, 酵母の生成するアルコールにより, 乳酸菌は減少, 死滅していく時期である. 今回の実験では, 酒母を生理食塩水で希釈し, 生残している乳酸

菌を液体培地で増殖させた後, 分離した.

生醗系酒母では, 初期段階に, 低温で生育しやすく, かつ栄養分が少なくても生育する乳酸球菌の *Leuconostoc* 属が出現し, 次第に, 亜硝酸耐性が高く, 乳酸生成能の強い乳酸桿菌である *Lactobacillus* 属に移移すると言われている¹⁴⁾. 最近の報告では, 両方の菌種がみられるという報告とともに, 乳酸球菌のみしか認められないとの報告もある^{6)~8)}. 今回, 山麩醗採取1回目サンプルからは乳酸球菌が, 採取2回目サンプルからは乳酸桿菌が分離された.

(2) 分離乳酸菌の同定

分離乳酸球菌, 分離乳酸桿菌それぞれと, その比較対照株の諸性質をまとめた結果を表1, 表2に示す.

分離乳酸球菌A1株, A2株およびA3株の3株は, 16S rDNA 配列解析の結果, 解析した約500bpの配列で *L. mesenteroides* と100%の同源性を示した. 3株とも, ヘテロ発酵連鎖 (双) 球菌で, 生成乳酸の光学活性はD-型, スクロース資化性は陽性, スクロースからのデキストラン生成は陰性, アラビノース資化性は陽性であった. これらのことから, 分離乳酸球菌3株は, *L. mesenteroides* と同定した.

分離乳酸桿菌B1株およびB2株は, 16S rDNA 配列解析から, 解析した約500bpの配列で, *L. sakei* および *Lactobacillus curvatus* と100%の同源性を示し, いずれかの菌種であると推定された. 分離乳酸桿菌は, ホモ発酵型で, 高温45℃での生育は陰性, アラビノース資化性は陰性, 生成乳酸の光学活性はDL-型, リボース資化性は陽性, マンニトール, ソルビトールおよびメリビオース資化性はいずれも陰性であった. また, *L. sakei* の近縁種の解析から, *L. sakei* は, 酢酸ナトリウム存在下では, 生成乳酸がDL-型からL-型に変わることが, 種特異的な特徴として示されている¹⁵⁾. 分離乳酸桿菌2株は, 酢酸ナトリウム存在下でも生成乳酸はDL-型であった. これらのこ

表1 分離乳酸球菌の性質

	分離乳酸球菌			<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	A1株	A2株	A3株	NBRC102481株
グラム染色	+	+	+	+
細胞の形態	球	球	球	球
細胞の大きさ (μm)	0.5~0.7	0.5~0.7	0.7~1.0	0.5~0.7
カタラーゼ反応	-	-	-	-
運動性	-	-	-	-
グルコースからのガス発生	+	+	+	+
発酵形式	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
スクロースからのデキストラン生成	-	-	-	-
生成乳酸の光学活性	D	D	D	D
糖類発酵性	スクロース	++	++	++
	L-アラビノース	++	++	++
	D-リボース	++	++	++
	D-キシロース	++	++	++
	D-グルコース	++	++	++
	D-フルクトース	++	++	w
	D-ガラクトース	++	++	w
	D-マンノース	++	++	w
	マルトース	++	++	w
	メリビオース	++	++	-
	D-トレハロース	++	++	++
生育温度 (°C)	5	+	+	w
	10	++	++	+
	15	++	++	+
	20	++	++	++
	30	++	++	++
	35	++	++	++
	40	w	w	w
45	-	-	-	
生育pH	3.5	-	-	-
	4.0	w	w	-
	4.5	++	++	+
	5.0	++	++	++
	6.0	++	++	++
	7.0	++	++	++
コールド生育 (%)	5	++	++	++
	7.5	w	w	-
	10	-	-	-

+, 陽性 (++, 強; w, 弱); -, 陰性

とから、分離乳酸桿菌2株は、*L. sakei*ではなく、*L. curvatus*と同定した。

(3) 分離乳酸菌の諸性質

低温で仕込みを開始する生酛系酒母で生育する乳酸菌のほとんどが、*L. mesenteroides*と*L. sakei*の2種であるのは、両種が4°C程度の低温においても生育可能という特徴を有しているためと考えられている²⁾。近年、この2種以外に、低温発酵性の乳酸菌として、米麴から乳酸球菌 *Leuconostoc citreum* が分離されている¹⁶⁾。今回、山廃酛から分離した乳酸桿菌2株は、いずれも *L. curvatus* と同定され、5°Cでの低温生育性は良好であった。*L. curvatus*

は、*L. sakei*と同様4°C程度の低温生育性を示す株もあることが知られている¹⁷⁾。

生育pH域については、分離乳酸球菌3株はpH4.0ではごく弱い生育を示したが、分離乳酸桿菌2株はpH3.5でも生育可能であった(表1, 2)。分離乳酸球菌、分離乳酸桿菌は、それぞれ比較対照のNBRC102481株およびNBRC3541株と同程度以上の低pH生育性を示した。

GYP培地で30°C、2日間培養後の酸生成量は、分離乳酸球菌A2株と比較対照のNBRC102481株は、乳酸換算で0.8%程度の酸を生成し、また、分離乳酸桿菌B1株と比較対照のNBRC3541株は1.0%程度の酸を生成し、いずれも

表2 分離乳酸桿菌の性質

	分離乳酸桿菌		<i>Lactobacillus sakei</i>		
	B1株	B2株	NBRC15893 ^T 株	NBRC3541株	
グラム染色	+	+	+	+	
細胞の形態	桿	桿	桿	桿	
カタラーゼ反応	-	-	-	-	
運動性	-	-	-	-	
グルコースからのガス発生	-	-	-	-	
発酵形式	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	
光合成 活性 性	GYP 培地	DL	DL	DL	
	GYP 培地 + Ac (50mM 酢酸ナトリウム)	DL	DL	L	
糖類発酵性	L-アラビノース	-	-	++	++
	D-リボース	++	++	++	++
	D-マンニトール	-	-	-	-
	D-ソルビトール	-	-	-	-
	メリビオース	-	-	++	++
	D-グルコース	++	++	++	++
	マルトース	++	+	++	++
	D-マンノース	++	++	++	++
	スクロース	-	-	++	++
	D-トレハロース	++	++	++	++
生育温度 (°C)	5	+	+	w	+
	10	++	++	+	++
	15	++	++	++	++
	20	++	++	++	++
	30	++	++	++	++
	35	++	++	++	++
	40	++	++	w	++
45	-	-	-	-	
生育pH	3.5	+	+	-	+
	4.0	++	++	-	+
	4.5	++	++	+	++
	5.0	++	++	++	++
	5.5	++	++	++	++
	6.0	++	++	++	++
	7.0	++	++	++	++
コールド 生育アル (%)	5	++	++	++	++
	7.5	++	++	w	++
	10	-	-	-	-

+, 陽性 (++, 強; w, 弱); -, 陰性

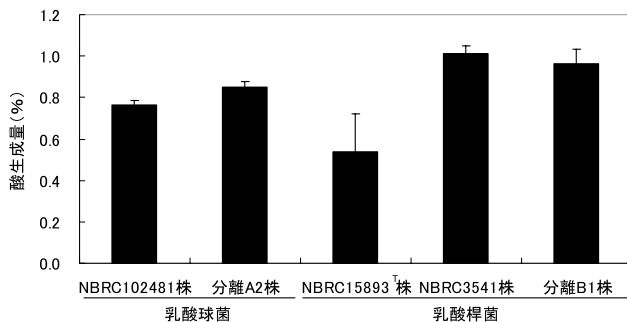


図2 分離乳酸球菌, 分離乳酸桿菌および比較対照株の GYP 培地における30°C, 2日間培養後の酸生成量(乳酸換算)n=4

比較対照株と同程度の酸生成を示した(図2)。乳酸桿菌の比較対照株の1つとした NBRC15893^T株は生育があまりよくなかったが, 今回分離した乳酸桿菌 *L. curvatus* は, *L. sakei* と同程度の低 pH 生育性および酸生成能を持つと考えられる。

エタノールに対する耐性は, 分離乳酸球菌, 分離乳酸桿菌とも, 比較対照株と同程度に低かった(表1, 2)。いずれの株もエタノール10% (v/v) 下での生育能力はなく, アルコール感受性を持ち, 火落ちの原因菌にはなり得ないことが確認された。

分離乳酸球菌は, 既述のように *L. mesenteroides* であ

り、比較対照のNBRC102481株と同様の性質を有していた。また、分離乳酸桿菌は、既述のように *L. curvatus* であったが、*L. sakei* と同程度の低温生育性、アルコール感受性および低 pH 生育性を有していた。

以上の結果から、分離乳酸球菌 *L. mesenteroides* と分離乳酸桿菌 *L. curvatus* は、生醗系酒母中で増殖することを示唆しており、生醗系酒母製造安定化のための添加乳酸菌としての活用が期待できる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、酒母の採取に協力いただいた山岡酒造株式会社および現愛媛大学教育学部准教授谷本昌太氏に感謝します。

文 献

- 1) 片桐英郎, 北原覚雄, 酒母より分離せる乳酸菌の研究, 農化誌, **10** (9), 942-969 (1934).
- 2) 大林晃, 北原覚雄, 生醗系酒母中の乳酸菌菌相を決定する因子, 農化誌, **33** (10), 839-843 (1959).
- 3) 芦沢長, 山麩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).
- 4) 芦沢長, 山麩酒母における微生物学的研究 (第10報) 球状乳酸菌と桿状乳酸菌について, 醸協, **60** (10), 70-73 (1965).
- 5) 豊田泰, 岡田早苗, 小崎道雄, 北原覚雄, 生醗より *Lactobacillus sakei* の再分離とその検討, 農化誌, **53** (8), 247-254 (1979).
- 6) 百瀬洋夫, 藤倉寛子, 生醗系酒母より分離した桿状乳酸菌, 醸協, **91** (11), 834-837 (1996).
- 7) 恩田匠, 生もと清酒モロミから分離した乳酸菌の同定とその性状, 醸協, **98** (2), 148-151 (2003).
- 8) 百瀬洋夫, 鎌尾敦子, 生醗系酒母より分離した球状乳酸菌, 醸協, **88** (1), p76-80 (1993).
- 9) 芦沢長, 山麩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).
- 10) 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-山麩配用微生物の検索と山麩配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).
- 11) 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-山麩配用微生物の検索と山麩配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).
- 12) 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, No.11, 54-57 (2008).
- 13) 内村泰, 岡田早苗, 乳酸菌実験マニュアル-分離から同定まで-, 小崎道雄監修, 朝倉書店 (1992).
- 14) 芦沢長, 斎藤孔男, 山麩酒母における微生物学的研究 (第13報) 乳酸菌群の遷移に対する *Pseudomonas* 属菌の役割 (その2), 醸協, **61** (11), 1033-1037 (1966).
- 15) Iino, T., Uchimura, T. and Komagata, K., Characterization of *Lactobacillus sakei* by the type of stereoisomers of lactic acid produced. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49**, 111-121 (2003).
- 16) 黒瀬直孝, 浅野忠男, 川北貞夫, 垂水彰二, 米麴からの低温発酵性 *Leuconostoc citreum* の分離と諸性質, 生工誌, **82** (5), 183-190 (2004).
- 17) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2, p.1228, Williams & Wilkins (1986).