

# 酒母製造を目的とした乳酸菌に関する研究

バイオ系チーム 和田 潤, 泊 直宏, 高阪 千尋,  
清野 珠美, 廣岡 青央, 山本 佳宏

## 要 旨

京都では古くから微生物の力を借りてつくられた多くの発酵食品（飲料を含む）が市場に出回っており、その発酵過程の多くを乳酸菌が担っている。当研究所では製品の高付加価値化や品質の安定化に貢献するべく京都独自の乳酸菌ライブラリーの構築を行ってきた。一方、京都は発酵食品のなかでも清酒に関して全国でも有数の酒どころである。そこで、本研究では生酏系酒母に適性を有する乳酸菌を選抜する目的で、本乳酸菌ライブラリーを用いて生育性試験や代謝成分の分析を行ったところ、適性が示唆される菌株を選抜することができた。また、細菌の指紋領域である16S rRNA遺伝子の配列情報を決定することによって選抜した菌株の簡易同定を行った。

## 1. はじめに

乳酸菌は古くから多くの発酵食品、例えば、漬物、キムチ、味噌、醤油、酢、馴れ寿司、チーズ、ヨーグルト、乳酸菌飲料、パン、ワイン、清酒に用いられ、我々にとって非常に安心で馴染みのある微生物である<sup>1)</sup>。近年は、乳酸菌はプロバイオティクス（ヒトの健康に好影響を与える生細菌）として注目を集めている<sup>2)</sup>。その効能も多岐にわたり<sup>3)-6)</sup>、日本健康・栄養食品協会の調べによると、特定保健用食品の2014年度の市場規模は6000億円以上であるが、そのうちのおよそ半分に及ぶ2800億円以上を乳酸菌関連が占めている。従って、効能を有した乳酸菌を用いた機能性食品製造も盛んに行われており、多様な乳酸菌を用いて多様な機能性を謳った多様な形態の乳酸菌関連商品が市場を賑わしている。

発酵食品の品質は発酵過程を担う発酵微生物に大きく左右される。優れた機能性を有した乳酸菌を用いて、特徴ある発酵食品製造や商品化のコンセプトに合致しつつ、安定した製品製造を可能にするためには、適した性能を有した乳酸菌を用いる必要がある。優れた最適な乳酸菌を選抜するためには多様で充実した乳酸菌のコレクションを保有する必要がある。そこで、当研究所では将来的に食品製造に利用され、人の口に入る可能性があることを鑑みて、既に食経験があり、安全が担保された発酵食品等から乳酸菌を単離及び採取し、これまでに350株以上の乳酸菌から構成される乳酸菌ライブラリーを構築した<sup>7)-8)</sup>。

乳酸菌は先述のとおり多くの発酵食品に用いられ、その一つに清酒がある。清酒製造における酒母は生酏

や山麩酏と呼ばれる乳酸発酵を用いる生酏系とあらかじめ醸造用乳酸を添加する速醸系の二つに分けられる。生酏系の酒母造りには、酵母によるエタノール発酵の工程の前段に乳酸菌による乳酸発酵の工程が存在する。乳酸菌が乳酸を生産することによって酸性条件となり、酒母中の雑菌の発生が妨げられ、雑菌が淘汰される<sup>1)</sup>。生酏系酒母は微生物遷移を利用する開放条件下で造られることもあり、微生物管理が難しいことや製造期間が長いことなどから、現在の酒母造りは生酏系酒母ではなくて、速醸系酒母が主流である。しかしながら、生酏系酒母を用いた仕込みを行った清酒は速醸系酒母での清酒とは異なり、独特の香りとうま味を有する。従って、近年、自社製品の独自性を獲得するために、個性的な純米酒造りを目指して昔ながらの生酏系酒母造りがあらためて注目されている。

京都は国内有数の酒どころである。本研究では特徴ある生酏系の清酒を製造することの一助となるべく、当研究所の保有する乳酸菌ライブラリーの代表的な乳酸菌を用いて、生酏系酒母に適性を持つ乳酸菌を選抜するために種々の乳酸菌の生育性試験や代謝成分の分析を行ったので報告する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 使用菌株

比較対照として属種の同定された独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）の乳酸菌（表1）と研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から代表的な菌株を用いた（表2）。

表1 使用菌株 (NBRC株)

番号(試料)	番号(菌株)	菌株(属種)	分離源
1	NBRC107147	<i>Lactobacillus brevis</i>	Human feces
2	NBRC15883	<i>Lactobacillus casei</i>	Cheese
3	NBRC106101	<i>Lactobacillus concavus</i>	Walls of a distilled spirit fermenting cellar
4	NBRC107129	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Pickled Chinese cabbage
5	NBRC13953	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Bulgarian yogurt
6	NBRC15885	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Fermented beets
7	NBRC107160	<i>Lactobacillus nodensis</i>	Japanese pickles
8	NBRC107152	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	Sourdough
9	NBRC101973	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Mash of manju-dough for Japanese traditional cake
10	NBRC101974	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Mash of manju-dough for Japanese traditional cake
11	NBRC101975	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sunki-zuke, non-salted fermented vegetable (green leaves)
12	NBRC109604	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Wine
13	NBRC15891	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled cabbage
14	NBRC109618	<i>Lactobacillus rapi</i>	Sunki, traditional Japanese pickles
15	NBRC15892	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Intestine of adult
16	NBRC3425	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
17	NBRC3541	<i>Lactobacillus sakei</i>	
18	NBRC107130	<i>Lactobacillus sakei</i>	Pickled Chinese cabbage
19	NBRC15893	<i>Lactobacillus sakei</i>	"Moto" starter of sake
20	NBRC103853	<i>Lactobacillus senmaizukei</i>	Pickles

表2 使用菌株 (研究所分離株)

番号	試料	菌株	分離源	番号	試料	菌株	分離源	番号	試料	菌株	分離源
21	F101	F101	漬物(スグキ)	63	F508	F508	漬物(ナス)	105	F1005	F1005	漬物(スグキ)
22	F102	F102	漬物(スグキ)	64	F509	F509	漬物(ナス)	106	F1006	F1006	漬物(スグキ)
23	F103	F103	漬物(スグキ)	65	F510	F510	漬物(ナス)	107	F1007	F1007	漬物(スグキ)
24	F104	F104	漬物(スグキ)	66	F601	F601	チーズ	108	F1008	F1008	漬物(スグキ)
25	F105	F105	漬物(スグキ)	67	F602	F602	チーズ	109	F1009	F1009	漬物(スグキ)
26	F106	F106	漬物(スグキ)	68	F603	F603	チーズ	110	F1010	F1010	漬物(スグキ)
27	F107	F107	漬物(スグキ)	69	F604	F604	チーズ	111	F1101	F1101	清酒醪
28	F108	F108	漬物(スグキ)	70	F605	F605	チーズ	112	F1102	F1102	清酒醪
29	F109	F109	漬物(スグキ)	71	F606	F606	チーズ	113	F1103	F1103	清酒醪
30	F110	F110	漬物(スグキ)	72	F607	F607	チーズ	114	F1104	F1104	清酒醪
31	F201	F201	ケフィア	73	F608	F608	チーズ	115	F1105	F1105	清酒醪
32	F202	F202	ケフィア	74	F609	F609	チーズ	116	F1201	F1201	漬物(スグキ)
33	F203	F203	ケフィア	75	F610	F610	チーズ	117	F1202	F1202	漬物(スグキ)
34	F204	F204	ケフィア	76	F701	F701	漬物(ミズナス)	118	F1203	F1203	漬物(スグキ)
35	F205	F205	ケフィア	77	F703	F703	漬物(ミズナス)	119	F1204	F1204	漬物(スグキ)
36	F206	F206	ケフィア	78	F705	F705	漬物(ミズナス)	120	F1205	F1205	漬物(スグキ)
37	F207	F207	ケフィア	79	F706	F706	漬物(ミズナス)	121	F1206	F1206	漬物(スグキ)
38	F208	F208	ケフィア	80	F708	F708	漬物(ミズナス)	122	F1207	F1207	漬物(スグキ)
39	F209	F209	ケフィア	81	F801	F801	漬物(ミズナス)	123	F1208	F1208	漬物(スグキ)
40	F210	F210	ケフィア	82	F802	F802	漬物(ミズナス)	124	F1209	F1209	漬物(スグキ)
41	F301	F301	漬物(キャベツ)	83	F805	F805	漬物(ミズナス)	125	F1210	F1210	漬物(スグキ)
42	F302	F302	漬物(キャベツ)	84	F806	F806	漬物(ミズナス)	126	F1301	F1301	キムチ(キュウリ)
43	F303	F303	漬物(キャベツ)	85	F807	F807	漬物(ミズナス)	127	F1302	F1302	キムチ(キュウリ)
44	F304	F304	漬物(キャベツ)	86	F808	F808	漬物(ミズナス)	128	F1303	F1303	キムチ(キュウリ)
45	F305	F305	漬物(キャベツ)	87	F809	F809	漬物(ミズナス)	129	F1304	F1304	キムチ(キュウリ)
46	F306	F306	漬物(キャベツ)	88	F812	F812	漬物(ミズナス)	130	F1305	F1305	キムチ(キュウリ)
47	F307	F307	漬物(キャベツ)	89	F813	F813	漬物(ミズナス)	131	F1306	F1306	キムチ(キュウリ)
48	F308	F308	漬物(キャベツ)	90	F814	F814	漬物(ミズナス)	132	F1307	F1307	キムチ(キュウリ)
49	F309	F309	漬物(キャベツ)	91	F901	F901	漬物(キュウリ)	133	F1308	F1308	キムチ(キュウリ)
50	F310	F310	漬物(キャベツ)	92	F902	F902	漬物(キュウリ)	134	F1309	F1309	キムチ(キュウリ)
51	F401	F401	キムチ(ハクサイ)	93	F903	F903	漬物(キュウリ)	135	F1310	F1310	キムチ(キュウリ)
52	F402	F402	キムチ(ハクサイ)	94	F904	F904	漬物(キュウリ)	136	F1401	F1401	清酒(酒母)
53	F403	F403	キムチ(ハクサイ)	95	F905	F905	漬物(キュウリ)	137	F1402	F1402	清酒(酒母)
54	F404	F404	キムチ(ハクサイ)	96	F906	F906	漬物(キュウリ)	138	F1403	F1403	清酒(酒母)
55	F405	F405	キムチ(ハクサイ)	97	F907	F907	漬物(キュウリ)	139	F1404	F1404	清酒(酒母)
56	F501	F501	漬物(ナス)	98	F908	F908	漬物(キュウリ)	140	F1405	F1405	清酒(酒母)
57	F502	F502	漬物(ナス)	99	F909	F909	漬物(キュウリ)	141	F1406	F1406	清酒(酒母)
58	F503	F503	漬物(ナス)	100	F910	F910	漬物(キュウリ)	142	F1407	F1407	清酒(酒母)
59	F504	F504	漬物(ナス)	101	F1001	F1001	漬物(スグキ)	143	F1408	F1408	清酒(酒母)
60	F505	F505	漬物(ナス)	102	F1002	F1002	漬物(スグキ)	144	F1409	F1409	清酒(酒母)
61	F506	F506	漬物(ナス)	103	F1003	F1003	漬物(スグキ)	145	F1410	F1410	清酒(酒母)
62	F507	F507	漬物(ナス)	104	F1004	F1004	漬物(スグキ)	146	F1501	F1501	桜

2. 2 乳酸菌の培養方法

乳酸菌の培養にはMRS培地 (DIFCO) と清酒製造の栄養状態に準じたものとして麴汁培地 (乾燥麴に水と酵素を加えて1晩55℃で静置した後ろ過) を用いた。アルコールに対する耐性を調べるためには10%エタノールを含んだMRS培地を用いた。また、培養は30℃, 静置で行った。

2. 3 乳酸菌の生育性試験

生育性試験は乳酸菌を培養後、培養液を 96 穴マイクロプレートに分注し、 xMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて濁度 (吸光度 600nm) を測定し、菌の生育の指標とした。

## 2. 4 代謝物分析 (有機酸)

乳酸菌培養液中の有機酸は装置にICS-1100 (Thermo SCIENTIFIC), カラムにIonPacICE-AS6 (Thermo SCIENTIFIC), 移動相に0.4mM オクタンスルホン酸, 検出器に電気伝導度検出器を用いてカラム温度10℃, 流速1.0ml/min にて分析を行った。有機酸の定量はあらかじめ標準物質を測定して検量線を作成し, 本検量線を基にサンプル中の有機酸量を算出した。

## 2. 5 代謝物分析 (ジアセチル)

乳酸菌培養液中のジアセチルの分析にはカラムにCOSMOSIL C18-MS-II (4.6mm I.D.×150mm) (ナカライテスク), 移動相にメタノール/10mM 酢酸アンモニウム (80/20) を用いて, カラム温度40℃, 流速0.5ml/min で検出は3200QTRAP LC/MS/MSシステム (エービー・サイエックス) を用いた。また, ジアセチルはあらかじめオルト-フェニレンジアミン (OPD) で誘導体化し, ジアセチルのOPD誘導体である2,3-ジメチルキノキサリンを測定した。ジアセチルの定量はあらかじめ標準物質を測定して検量線を作成し, 本検量線を基にサンプル中のジアセチル量を算出した。

## 2. 6 乳酸菌の簡易同定

乳酸菌の属種は指紋領域である16S rRNA遺伝子の高度可変領域の一部の配列を決定し, データベースと照合することにより推定することとした。目的領域の増幅はPCR法を用いた。ポリメラーゼはKOD FX neo (TOYOBO), プライマーは7Fプライマー (5'-agagtttgat(c/t)(a/c)tggtcag-3') と1510Rプライマー (5'-acgg(c/t)tacctgttacgact-3') を用いてPCR条件は付属の説明書に従った。PCR産物のシークエンス解析は株式会社FASMACに委託した。シークエンスには10Fプライマー (5'-gtttgatcctggctca-3') を用いた。得られた配列をNCBIのBLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) を用いて照合し, 相同性の高い菌株を調べた。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 乳酸菌の生育性試験

乳酸菌はNBRCから購入した菌株と当研究所が保有する乳酸菌ライブラリーの中から代表的な菌株を合わせて187株 (表1, 2) を用いてMRS培地にて前培養を

行った。本培養には前培養液を本培養用の培地容量の1%接種し, 麴汁培地と10%エタノールを含んだMRS培地を用いた。麴汁培地は30℃で3日, 10%エタノールを含んだMRS培地は30℃で7日培養した後に培養液を96穴マイクロプレートリーダーに分注して, マイクロプレートリーダーを用いて濁度 (吸光度 600nm) を測定した (図1, 2)。結果, MRS培地での前培養はどの菌株も良好に生育した。麴汁培地では菌株ごとで生育度合いに大きな違いが出た。NBRCから購入した菌株では*Lactobacillus sakei* (NBRC15893) が高い濁度を示し, 属種に関しては*Lactobacillus plantarum*の5種 (NBRC101973, NBRC101974, NBRC101975, NBRC109604, NBRC15891) がどの菌株も高い濁度を示した。当研究所のライブラリーの菌株の中ではF1201株やF1304株などが良好な生育を示した。

一方, 10%エタノールを含んだMRS培地では麴汁培地での培養と同様に菌株ごとで生育度合いに大きな違いが出た。NBRCから購入した菌株では *Lactobacillus plantarum* の5種 (NBRC101973, NBRC101974, NBRC101975, NBRC109604, NBRC15891) は麴汁培地での培養と同様に良好に生育したのに対して, *Lactobacillus sakei* は生育を示さなかった。当研究所のライブラリーの菌株においてもF1201株は良好に生育したのに対してF1304株は生育しなかった。

清酒製造の酒母適性という観点では清酒製造に準じた栄養状態において良好に生育する乳酸菌を選ばなくてはならない。また, 一方で, 生醗系酒母では乳酸菌が生育して乳酸発酵を行い, 乳酸を生成して酸性状態になる。続いて優良清酒酵母が増殖してアルコール発酵によりアルコールを生成した後は, 乳酸菌の代謝物によって清酒の風味を損なわないように酵母が生成したアルコールによって乳酸菌の生育が阻害される必要がある。即ち, 乳酸菌はアルコール感受性である必要がある。従って麴汁培地で良好に生育し, エタノール含有MRS培地で生育が阻害される菌株を酒母製造において適性が高いと評価することになるので, *Lactobacillus plantarum*の5種は不適と評価することになる。乳酸菌ライブラリーの菌株で生育性試験を行った菌株の中からはF301株, F302株, F506株, F1304株, F1308株, F1401株, F1403株, F1708株を選抜した。

### 3. 2 代謝物分析 (有機酸)

生育性試験において選抜した菌株について, 乳酸菌

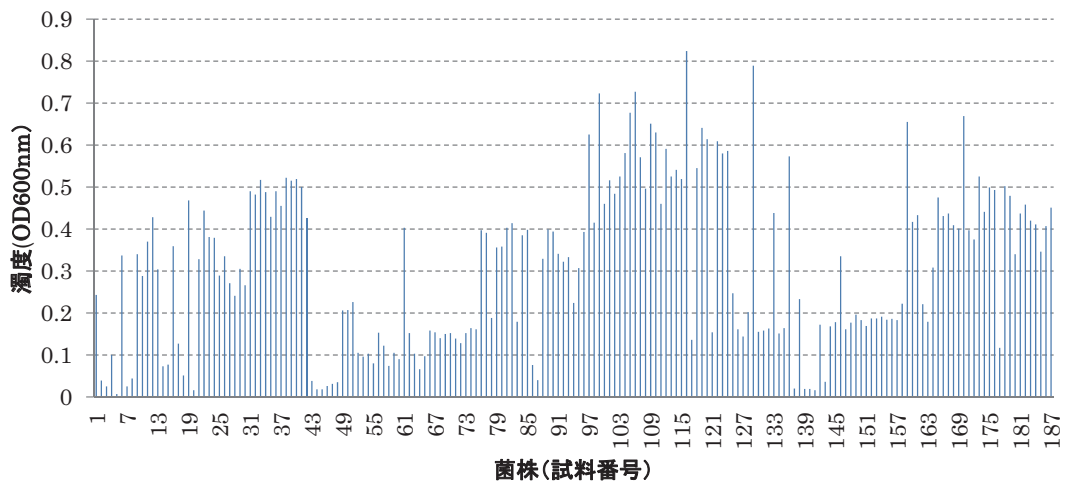


図1 乳酸菌の生育性試験（麴汁培地）  
 乳酸菌を麴汁培地を用いて30℃で静置培養した後、濁度（OD 600nm）を測定した。試料番号には表1、表2の試料番号を用いた。

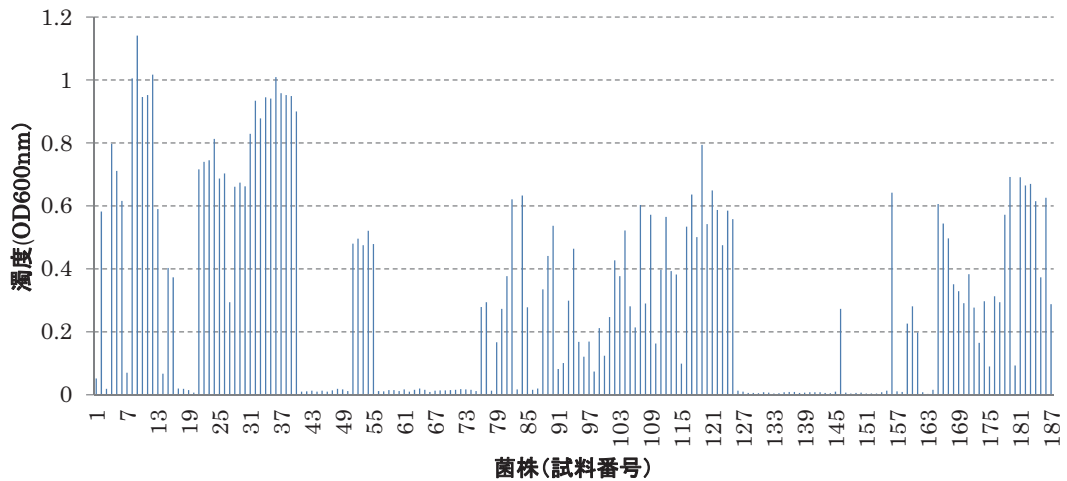


図2 乳酸菌の生育性試験（エタノール含有MRS培地）  
 乳酸菌を10%エタノール含有MRS培地を用いて30℃で静置培養した後、濁度（OD 600nm）を測定した。試料番号には表1、表2の試料番号を用いた。

の代謝物である有機酸の生成量を調べた。あらかじめ濁度（吸光度 600nm）を測定した麴汁培地での培養液上清をサンプルとし、植菌していない培地を対照サンプルとして用いた。結果、菌株ごとに異なった有機酸の生成もしくは利用パターンを示した(表3)。それぞれの菌株の濁度の値から菌株の生育に差はあるがF1304株は乳酸を多く生成し、比べてF506株やF1403株は乳酸の生成量が少なかった。特にF506株は濁度の値に比しても乳酸の生成量が少なかった。また、F1304株は濁度も高く、酢酸の生成量も多い一方で、クエン酸は他の菌株と比べて一番減少していた。菌株ごとに資化能力や代謝系が異なっている、もしくは能力に差

があることが示唆された。

表3 培養液中の有機酸

菌株番号	濁度	クエン酸	リンゴ酸	ギ酸	乳酸	酢酸	ピログルタミン酸	コハク酸
F301	0.500	10.4	1.36	0.01	690	9.41	4.89	1.10
F302	0.426	8.37	0.50	0.08	522	18.1	2.07	1.44
F506	0.403	11.6	0.64	0.16	381	5.27	5.77	0.77
F1304	0.789	0.71	1.04	0.01>	826	25.5	1.56	4.73
F1308	0.438	1.27	1.07	0.08	601	19.7	1.99	1.50
F1401	0.573	1.42	1.51	0.07	634	15.7	2.39	2.50
F1403	0.233	1.09	1.19	0.26	291	16.8	2.20	1.40
F1708	0.308	1.59	0.84	0.10	567	20.1	1.93	1.34
培地のみ		12.0	1.16	0.52	3.13	5.48	3.95	0.82

mg/100 ml



### 3. 3 代謝物分析（ジアセチル）

清酒製造においてジアセチルは清酒の風味を害するもの、即ち、オフフレーバーの代表的な物質である。有機酸と同様に生育性試験において選抜した菌株について、乳酸菌の代謝物であるジアセチルの生成量を調べた。あらかじめ濁度（吸光度 600nm）を測定した麴汁培地とMRS培地での培養液上清をサンプルとし、植菌していない培地を対照サンプルとして用いた。結果、多くの菌株がMRS培地でも麴汁培地でもジアセチルの生成量はコントロールの値を差し引いて1 ppm 程度であった。しかし、F506株はMRS培地でも麴汁培地でも他の菌株と比べて際立ってジアセチルを生成し、濁度が同程度の菌株と比較しても高い数値を示した（表4）。

表4 培養液中のジアセチル

菌株番号	麴汁培地		MRS培地	
	濁度	ジアセチル (ppm)	濁度	ジアセチル (ppm)
F301	0.500	2.46	0.406	1.45
F302	0.426	0.53	0.441	1.45
F506	0.403	14.6	0.716	3.44
F1304	0.789	0.76	0.597	1.33
F1308	0.438	1.89	0.679	2.25
F1401	0.573	1.80	0.705	2.69
F1403	0.233	0.51	0.721	1.22
F1708	0.308	1.01	0.781	2.25
培地のみ		0.68		1.99

### 3. 4 乳酸菌の簡易同定

酒母製造における適性を生育性試験においてアルコール感受性を示しながら、麴汁培地において良好に生育する菌株で乳酸を十分に生成しつつ、ジアセチルの生成の少ない菌株という観点で選抜すると、生育性試験で選んだ8株においては代謝物分析ではF506株やF1403株を除けば適性が低いと評価する菌株はなかった。そこで、麴汁培地における増殖の上位2株を適性が高い菌株としてF1304株とF1401株について簡易同定を行った。両株の16S rRNA遺伝子をPCR法にて増幅して、前半部分の配列500塩基を決定した。インターネットで相同性検索を行ったところ、F1304株は既に登録されている*Leuconostoc mesenteroides* に属する乳酸菌らの16S rRNA遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した。一方、F1401株は*Lactobacillus sakei*もしくは*Lactobacillus carvatus*に属する乳酸菌らの16S rRNA遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した。*Leuconostoc mesenteroides* や*Lactobacillus sakei*は生醗

系酒母からよく単離される乳酸菌としてどちらも有名である。栄養要求性や代謝能によって研究所の乳酸菌ライブラリーからも*Leuconostoc mesenteroides* や*Lactobacillus sakei*に属する菌株が選抜されてきたことが考えられ、同時に生醗系酒母製造に利用できる可能性が示唆された。

### 4. まとめ

当研究所の乳酸菌ライブラリーの中から代表的な菌株150株以上を用いて生育性試験及び代謝物分析を行い、生醗系酒母に用いることができる菌株を探索したところ、適性を示唆する乳酸菌を選抜することができた。これらの菌株は16S rRNA遺伝子の塩基配列を用いた同定試験によって結果として生醗系酒母において代表的な属種の近縁種であることが示唆された。今後、他側面からも更に試験を重ねて、より簡便な選抜方法を検討するとともに、当研究所の乳酸菌ライブラリーを活用しながら、より優秀な乳酸菌の選抜を行うことを目指す。また、先述の通り、乳酸菌は多くの発酵食品に用いられるとともに、様々な機能性を有している。従って、有用乳酸菌を選抜する手法を確立することによって、清酒だけでなく、本乳酸菌を様々な用途に用いることができ、独自性を有した特徴的なものづくりに貢献できると期待している。

### 参考文献

- 1) 乳酸菌研究集談会 編, "乳酸菌の科学と技術", p. 229, 学会出版センター (1996)
- 2) G. Reid et al.: Clinical Microbiology Reviews, 16, 658 (2003)
- 3) Y. Kikuchi et al.: PLoS ONE, 9, e86416 (2014)
- 4) K. Shida et al.: Int. Arch. Allergy Immunol., 115, 278 (1998)
- 5) J. E. Kim et al.: J. Microbiol. Biotechnol., 17, 1227 (2007)
- 6) N. Yamamoto et al.: Biosci. Biotech. Biochem., 58, 776 (1994)
- 7) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.5, p.87 (2015)
- 8) 和田潤 他: 酒研会報, No.55, p.9 (2016)