異常発酵焼酎もろみから分離した *Lactobacillus fermentum* LT23 の特性

高山清子・水谷政美・山田和史・山本英樹・越智 洋・工藤哲三

(宮崎県食品開発センター)

平成 24 年 3 月 23 日受理

Characteristics of *Lactobacillus fermentum* LT23 isolated from putrefactive *shochu* mash

Kiyoko TAKAYAMA, Masami MIZUTANI, Kazufumi YAMADA, Hideki YAMAMOTO, Hiroshi OCHI, and Tetuzo KUDO

(Miyazaki Prefecture Food Research and Development Center, 16500-2 Higashikaminaka, Sadowaracho, Miyazaki city, Miyazaki 880-0303)

Lactic acid bacteria (LAB) were isolated from putrefactive *shochu* mash their characteristics were investigated. In putrefactive *shochu* mash, the citrate concentration was too low. On the other hand, lactate and acetate concentrations were greatly higher than for normal fermented *shochu* mash. We carried out a 16S rDNA analysis of LAB isolated from putrefactive *shochu* mash, and *Lactobacillus fermentum* (*Lb. fermentum*) was identified from a large portion. Results of the investigation of physiological characteristics showed that *Lb. fermentum* LT23 isolated from putrefactive *shochu* mash exhibited lower ethanol tolerability than *Lb. paracasei* DG1 isolated from normal fermented main *shochu* mash. We also confirmed that *Lb. fermentum* LT23 was able to grow in the conditions such as in acid media (pH 3.2) and at high temperatures (45 °C). With respect to citrate metabolism, glucose and citrate were co-metabolised by *Lb. fermentum* LT23. Acetate concentration produced by *Lb. fermentum* LT23 was proportional to the citrate concentration assimilated. Compared with glucose fermentation, cell growth was faster by the co-metabolism of glucose and citrate.

Key words : 焼酎もろみ, 異常発酵, *Lactobacillus fermentum*, クエン酸, 酢酸

緒 言

焼酎もろみは白麹および黒麹菌の生成するクエン酸によって高酸度に保たれるため, 温暖な気候の下でも安定なアルコールの発酵が可能である。しかし, 夏期の高温時期や出麹酸度が低い条件下では異常発酵がしばしば起こることが知られており, その原因は一般的に乳酸菌の増殖によるものと考えられ, 補酸等による汚染防止対策が提唱されている¹⁾。玉城ら²⁻⁵⁾, 百瀬ら⁶⁾, Watanabe ら⁷⁾は泡盛製造時に混在する乳酸菌について, 高宮⁸⁾, 田邊ら⁹⁻¹³⁾, 岩田ら¹⁴⁾は焼酎製造時に混在する乳酸菌の分布調査とその特性について報

告している。その中で, 玉城らは泡盛の腐造へのホモ型乳酸菌の関与²⁾, 異常発酵もろみの成分特性³⁾について報告している。前報¹⁵⁾では, 焼酎二次もろみに広く分布していた *Lb. paracasei* のクエン酸資化による酢酸, ジアセチル生成, 焼酎への影響について確認した。本稿では, 異常発酵もろみ中の乳酸菌について調べたところ, ヘテロ型乳酸菌 *Lb. fermentum* が増殖していたこと, 前報の *Lb. paracasei* DG1 と異なるクエン酸資化性を示したこと, 焼酎もろみのクエン酸酸性という過酷な環境に高度に適応した特性を有することを確認したので報告する。

実験方法

1. 試料

異常発酵焼酎もろみ 2 点はいずれも 7 月から 9 月の高温時期に製造したものであり、もろみは酸臭が強く、顕微鏡観察において酵母以外のバクテリアの増殖が観察された。異常発酵した焼酎もろみは、一次もろみ 7 日目（米麹）、二次もろみ 10 日目（芋）であった。

2. 異常発酵焼酎もろみの分析及び乳酸菌の分離、同定

異常発酵したもろみの酸度¹⁶⁾及びアルコール分¹⁷⁾は国税庁所定分析法に従い測定した。有機酸はもろみを 20 倍に希釈し固液分離後、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフ LC-10A（島津製作所製、有機酸分析システム）により測定した。乳酸菌数の計測及び分離には、炭酸カルシウムを 0.5%、シクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを 10 ppm となるように添加した MRS 培地（Difco 製）を使用した。分離した菌株についてグラム反応試験、カタラーゼ試験を実施し、16S rDNA 解析による分類を試みた。InstaGene Matrix（Bio-Rad 製）を用いて DNA を抽出した。MicroSeq 500 16S rDNA PCR Kit（Applied Biosystems 製）を用いて 16S rDNA の 5'-末端側の約 500 bp を増幅し、精製した PCR 産物は MicroSeq 500 16S rDNA Sequencing Kit（Applied Biosystems 製）を用いてサイクルシーケンシングを行った。PCR、サイクルシーケンシングには GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems, U.S.）を用いた。塩基配列の決定には Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems, U.S.）を、相同性検索には、MicroSEQ 微生物同定ソフトウェア v3.0（Applied Biosystems, U.S.）を用いた。

3. 供試菌株

生化学試験は、異常発酵焼酎もろみから分離し、*Lb. fermentum* と分類された 7 株のうちの 1 株 *Lb. fermentum* LT23 及び前報¹⁵⁾で正常な焼酎もろみから分離した乳酸菌 8 株（*Lb. plantarum* DM1, *Lb. brevis* DM3, *Lb. paracasei* DG1, *Lb. buchneri* BM1, *Lb. parabuchneri* BM2, *Lb. hilgardii* IM2, *Pediococcus acidilactici* L M2, *Pd. Parvulus* LM2）の計 9 株でおこなった。クエン酸資化性、増殖性試験は、*Lb. fermentum* LT23 について行った。

4. 生化学試験

①生育温度試験¹⁸⁾、②耐アルコール試験¹⁹⁾、③耐酸性試験²⁰⁾は、定法に従い試験した。

① 生育温度試験

MRS 培地にて前培養した培養液を同培地 2 ml に接種後、5, 10, 15, 30, 40, 45℃の 6 区で静置培養した。72 時間後に乳酸菌の増殖を確認した。

② 耐アルコール性試験

滅菌した GYP 培地（グルコース 2%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, 酢酸ナトリウム 1%, salts solution 0.5% ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, NaCl 1 mg), Tween 80 0.05%) にアルコール濃度が 0, 5, 7.5, 10, 12.5, 15% となるようにエタノールを添加した。前培養液を上記培地 5 ml に接種し、30℃で 48 時間静置培養後、乳酸菌の増殖を確認した。

③ 耐酸性試験

GYP 培地に塩酸を添加し、滅菌後の pH が 3.9, 3.6, 3.2, 3.0 となる培地を調製した。同様に、GYP 培地にクエン酸を添加し、クエン酸濃度が 20 g/l (pH 3.6), 25 g/l (pH 3.4), 30 g/l (pH 3.2), 35 g/l (pH 3.1) となる培地を調製した。前培養液を上記培地 5 ml に接種し、30℃で 48 時間静置培養後乳酸菌の増殖を確認した。

各試験の増殖性の評価は、吸光度 (660 nm) が 0.7 以上を増殖性有り と判断した。

5. *Lb. fermentum* LT23 のグルコースとクエン酸の資化性試験

Gobbetti ら²¹⁾は、*Lb. brevis* subsp. *lindneri* CB1 のクエン酸とマルトースの同時代謝について検討し、マルトースの単独発酵に比べ、同時代謝では菌の成長が速く、酢酸が増加したことを報告している。そこで、異常発酵焼酎もろみから分離した *Lb. fermentum* LT23 のグルコースとクエン酸資化性について経時的に調べた。クエン酸 1% を含む GYP 培地を 10% 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 5.6 に調製した。前培養液を接種後、37℃で静置培養し、2 時間毎に有機酸とグルコース濃度（グルコース CII-テスト、和光純薬工業製）を測定した。

次に、*Lb. fermentum* LT23 について、資化したクエン酸と生成した酢酸濃度の相関性について検討した。クエン酸濃度 11, 23, 46, 91 mmol/l とした GYP 培地に前培養液を接種し、30℃で 48 時間静置培養後の

有機酸濃度を測定した。

6. クエン酸存在下における *Lb. fermentum* LT23

の増殖曲線

異常発酵焼酎もろみから分離した *Lb. fermentum* LT23 は、グルコースとクエン酸を同時に資化したことから、クエン酸による乳酸菌の増殖への影響について確認した。GYP 培地の炭素源を以下に置換し、10%水酸化ナトリウム水溶液で pH を 5.5 に調製した培地を使用した。

- ①グルコース 20 g/l
- ②グルコース 20 g/l, クエン酸 5g/l
- ③グルコース 20 g/l, クエン酸 10g/l
- ④クエン酸 10g/l
- ⑤グルコース及びクエン酸を含まない

各培地に前培養液を接種後、30℃で静置培養し、1 時間毎に培養液の吸光度 (660 nm) を測定した (BIO-PHOTORECORDER TN-2612, ADVANTEC 製)。

実験結果

1. 異常発酵焼酎もろみの分析及び乳酸菌の同定

異常発酵焼酎もろみの乳酸菌数は 10^7 CFU/ml 以上であり、クエン酸濃度は正常発酵焼酎もろみに比べ低く、対照的に乳酸及び酢酸濃度が高かった (Table 1)。

異常発酵焼酎もろみから 8 株の乳酸菌を分離した。分離した全ての菌株は、グラム陽性、カタラーゼ陰性であった。16S rDNA 解析の結果 99%以上の相同性で 7 株が *Lactobacillus fermentum*, 1 株が *Lactobacillus parabuchneri* と分類された。

2. 生化学特性

各乳酸菌の生育温度、耐アルコール性、耐酸性について Table 2 に示した。異常発酵焼酎もろみから分離した *Lb. fermentum* LT23 は 45℃の高温領域において高い増殖を示した。このことは、BERGEY'S MANUAL の *Lb. fermentum* の特性と一致した²²⁾。

Table 1 Components of putrefactive and normal *shochu* mash

<i>Shochu</i> mash	Acidity (mL 0.1N NaOH)	Alcohol (% v/v)	Citrate (mg/l)	Lactate (mg/l)	Acetate (mg/l)	LAB (CFU/ml)	Isolated LAB (number of strain)
Putrefactive seed mash (rice <i>koji</i> , 7 days)	21.0	7	1700	8300	5100	1.6×10^7	<i>Lb. fermentum</i> (3)
Putrefactive main mash (sweet potato, 10 days)	7.8	14	2200	3800	1400	8.9×10^7	<i>Lb. fermentum</i> (4), <i>Lb. parabuchneri</i> (1)
Normal seed mash (rice <i>koji</i> , 6 days)	30.0	16	11000	180	680	ND	
Normal main mash (sweet potato, 9 days)	7.0	14	1900	180	120	1.3×10^3	<i>Lb. paracasei</i> was mainly detected.

LAB, Lactic acid bacteria

ND, not detected.

Table 2 Characteristics of LAB isolated from *shochu* mash

Strain	Growth temperature (℃)	Ethanol tolerability (%)	pH tolerability	Citrate tolerability (g/l)
<i>Lb. fermentum</i> LT23	30 - 45	7.5	3.2	30
<i>Lb. plantarum</i> DM1	15 - 40	7.5	3.6	25
<i>Lb. brevis</i> DM3	15 - 40	7.5	3.9	15
<i>Lb. paracasei</i> DG1	15 - 40	12.5	3.6	20
<i>Lb. buchneri</i> BM1	30	10.0	3.9	10
<i>Lb. parabuchneri</i> BM2	30 - 40	10.0	3.9	15
<i>Lb. hilgardii</i> IM2	30	7.5	3.9	10
<i>Pd. acidilactici</i> L' M2	15 - 40	7.5	3.9	15
<i>Pd. parvulus</i> LM2	30 - 45	10.0	3.9	18

Growth was determined as $OD_{660} \geq 0.7$.

Initial pH for citrate tolerability test : 10 g/l (pH 4.2), 15 g/l (pH 3.9), 18 g/l (pH 3.8), 20 g/l (pH 3.6), 25 g/l (pH 3.4), 30 g/l (pH 3.2), 35 g/l (pH 3.1)

Lb. fermentum LT23 の耐アルコール性は低く、アルコール濃度 7.5% までの増殖にとどまった。一方、正常発酵二次もろみに多く分布していた *Lb. paracasei* DG1 はアルコール濃度 12.5% まで増殖し、高い耐アルコール性を示した。*Lb. fermentum* LT23 は pH3.2 及びクエン酸濃度 30 g/l (pH 3.2) の培地において増殖性が高く、他の乳酸菌に比べ高い耐酸性を示した。なお、*Lb. fermentum* LT23 は、pH3.0 及びクエン酸濃

度 35 g/l (pH 3.1) の培地では増殖しなかった。

3. *Lb. fermentum* LT23 のグルコースとクエン酸の同時代謝

クエン酸はグルコースとともに急速に資化され、6 時間後には全てのクエン酸が資化された。一方、乳酸と酢酸は経時的に増加し、酢酸濃度は 6 時間後にほぼ一定になった (Fig. 1)。

クエン酸資化濃度と酢酸生成濃度を比較したところ、

Fig. 1 Consumption rate of glucose(●) and citrate(▲), production rate of lactate (○) and acetate(△) by *Lb. fermentum* LT23.

Fig. 2 Citrate consumption and acetate production by *Lb. fermentum* LT23.

資化されたクエン酸濃度と生成した酢酸濃度は直線的な相関関係があった (Fig. 2)。

4. クエン酸存在下における *Lb. fermentum* LT23 の増殖曲線

グルコースのみを炭素源とした GYP 培地に比べ、グルコースとクエン酸を添加した培地で *Lb. fermentum* LT23 菌体の成長が促進された (Fig. 3)。また、クエン酸濃度は 10 g/l に比べ 5 g/l の培地で増殖速度が高かった。

考 察

前報¹⁵⁾において、焼酎二次もろみには *Lb. paracasei* が多く分布することを報告し、玉城ら²⁾は、泡盛の腐造にはホモ型乳酸菌が関与していると考えしているが、今回、乳酸菌が増殖した異常発酵焼酎もろみを調査した結果、正常発酵もろみには少なかったヘテロ型乳酸菌 *Lb. fermentum* が増殖していた。百瀬らにより、清酒酵母と乳酸菌の凝集現象について詳細に研究され²³⁾、腐造清酒もろみより分離した *Lb. plantarum* と清酒酵母が凝集すること²⁴⁾、凝集には細胞表面の静電的力が関与していること²⁵⁾について報告されている。本県の多くの焼酎製造場で使用されている

宮崎酵母 (MK021) と異常発酵焼酎もろみより分離した *Lb. fermentum* LT23 及び前報にて正常発酵焼酎もろみより分離した *Lb. paracasei* DG1 の凝集性について試験を行ったが、凝集性は確認されなかった。

一般的に、正常発酵焼酎もろみでは白麹菌、黒麹菌によりクエン酸が十分に生成されているため、焼酎もろみのクエン酸濃度は高いが、異常発酵した焼酎もろみのクエン酸濃度は、正常発酵した焼酎もろみに比べ低く、対照的に乳酸及び酢酸濃度が高かった。これらの傾向は玉城ら⁴⁾の報告と一致した。実際に、異常発酵焼酎もろみから分離した *Lb. fermentum* LT23 は、クエン酸を資化して酢酸を生成したことから、異常発酵もろみにおける有機酸組成の変化は、乳酸菌のクエン酸資化が原因であると考えられた。

クエン酸資化性については前報で、正常発酵焼酎もろみから分離した *Lb. paracasei* DG1 は、炭素源がクエン酸のみの培地において 60 時間以降にクエン酸を資化し、ジアセチルを高生産したことを報告した¹⁵⁾。クエン酸資化性乳酸菌におけるクエン酸代謝経路を Fig. 4 に示した^{26,27)}。*Lb. paracasei* DG1 はホモ型乳酸菌 *Lb. casei* のクエン酸代謝系²⁷⁾に類似し、酸性条件下ではピルビン酸からアセト乳酸の生成が進行し、ジ

Fig. 3 Growth of *Lb. fermentum* LT23 in the presence of glucose at 20 g/l (●), glucose at 20 g/l plus citrate at 5 g/l (○), glucose at 20 g/l plus citrate at 10 g/l (▲), citrate at 10 g/l (△), and absence of glucose and citrate (■) in the medium.

アセチルリダクターゼ活性が低いため、ジアセチルからアセトインへは還元されず、ジアセチルが蓄積したと考えられた。

一方、異常発酵焼耐もろみから分離した *Lb. fermentum* LT23 はクエン酸とグルコースを約 10 時間以内に同時に資化した。Marty-Teyssset らが提唱する *Leuconostoc* spp. におけるグルコースとクエン酸の同時代謝では、2 モルのクエン酸と 1 モルのグルコースから 3 モルの乳酸と酢酸が生成し、2 モルの ATP を生成する²⁸⁾(Fig. 5)。 *Lb. fermentum* LT23 では、菌を接種後 4 時間までに、クエン酸 40 mmol/l、グルコース 25 mmol/l が資化され、酢酸 60 mmol/l、乳酸 60 mmol/l が生成した (Fig. 1) ことから、*Leuconostoc* spp. と類似の代謝であると考えられた。また、*Lb. fermentum* LT23 のジアセチル生産性については、クエン酸とグルコースを炭素源とした培地で 24 時間

培養後の培養液を、ガスクロマトグラフ質量分析計にて測定したが、ジアセチル、アセトイン、2,3-ブタンジオールは検出されなかった。

グルコースとクエン酸の同時代謝ではクエン酸のみの代謝に比べ、生成した乳酸によりクエン酸トランスポーター (CitP) が活性化されるとともに、膜電位差、プロトン濃度勾配が生じ、エネルギー的に効率よくクエン酸を代謝していると考えられている²⁹⁾。したがって、*Lb. fermentum* LT23 は、ピルビン酸からジアセチルを生成するアセト乳酸への代謝ではなく、ピルビン酸から乳酸への代謝が進行すると推察された。

生化学試験の結果、異常発酵焼耐もろみから分離した *Lb. fermentum* LT23 の耐アルコール性は低かったが、耐酸性を示すとともに高温領域において高い増殖性を示した。このことから、出麹酸度が十分な焼耐もろみにおいては、高酸度、高アルコール濃度により

Fig. 4 Scheme of the citrate metabolism pathway in citrate fermentation LAB^{26, 27)}.

① ; citrate lyase, ② ; oxaloacetate decarboxylase, ③ ; acetohydroxy acid synthetase, ④ ; diacetyl reductase, ⑤ ; acetoin reductase

Fig. 5 Scheme of glucose metabolism(A) and glucose/citrate cometabolism(B) in *Leuconostoc* spp. This was obtained by modifying a part of the quoted figure²⁸⁾.

Lb. fermentum LT23 のような特性を有する乳酸菌の増殖は抑制されているが、出麹酸度不足、もろみ温度上昇時に増殖しやすい環境となり、焼酎もろみの異常発酵が引き起こされると考えられた。さらに、*Lb. fermentum* LT23 は、焼酎もろみ中のクエン酸をグルコースとともに急速に代謝し、酢酸を生成した。酢酸は蒸留によって製品の焼酎に移行するため、酸臭の強い製品になると考えられた。

要 約

1. 異常発酵焼酎もろみは *Lb. fermentum* が増殖しており、もろみのクエン酸濃度は、正常発酵焼酎もろみに比べ低く、対照的に乳酸及び酢酸濃度が高かった。
2. 異常発酵焼酎もろみから分離した *Lb. fermentum* LT23 の耐アルコール性は低かった。一方、耐酸性は高く、高温領域で高い増殖を示した。
3. *Lb. fermentum* LT23 はクエン酸をグルコースとともに急速に資化した。資化したクエン酸濃度と生成した酢酸濃度は直線的な相関関係があった。
4. グルコースとクエン酸の同時資化により *Lb. fermentum* LT23 菌体の成長が促進した。

参考文献

- 1) 本格焼酎製造技術（公益財団法人日本醸造協会，東京），229-235（2001）
- 2) 玉城 武，高宮義治，高江州朝清，下地陸子：醸協，**81**, 130-132（1986）
- 3) 玉城 武，佐無田隆，西谷尚道：日本農芸化学会誌，**60**, 997-1001（1986）
- 4) 玉城 武，佐無田隆，西谷尚道：日本農芸化学会誌，**60**, 1003-1008（1986）
- 5) 玉城 武，佐無田隆，下地陸子，照喜名重智：醱酵工学，**65**, 9-17（1987）
- 6) 百瀬洋夫，内山奈々，藤倉寛子：醸協，**92**, 452-457（1997）
- 7) Watanabe, S., Kanauchi, M., Kakuta, T., Koizumi, T.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **65**, 197-201（2007）
- 8) 高宮義治：醸協，**77**, 907-910（1982）
- 9) 田邊幾之助，坂田太吉，迫間敬子：鹿大農学術報告，**31**, 47-52（1981）
- 10) 田邊幾之助，音地龍夫，二石真智子，迫間敬子，志々目義紀：鹿大農学術報告，**32**, 69-77（1982）
- 11) 田邊幾之助，二石真智子，迫間敬子，有川順子：鹿大農学術報告，**33**, 47-52（1983）
- 12) 田邊幾之助，二石大介，金丸芳：鹿大農学術報告，**34**, 45-57（1984）
- 13) 田邊幾之助，金丸芳：鹿大農学術報告，**36**, 99-109（1986）
- 14) 岩田 博，中嶋則行，水野昭博，高原康生，黒須猛行，里見弘司，石井徹，伊藤康，菅間誠之助：醸協，**79**, 51-55（1984）
- 15) 高山清子，竹下淳子，水谷政美，山本英樹，越智 洋，工藤哲三：醸協，**103**, 393-400（2008）
- 16) 注解編集委員会編，第四回改正国税庁所定分析法注解（公益財団法人日本醸造協会，東京），20-23（2003）
- 17) 注解編集委員会編，第四回改正国税庁所定分析法注解（公益財団法人日本醸造協会，東京），230（2003）
- 18) 小崎道雄：乳酸菌実験マニュアル（朝倉書店，東京），56-57（1992）
- 19) 小崎道雄：乳酸菌実験マニュアル（朝倉書店，東京），104-105（1992）
- 20) 小崎道雄：乳酸菌実験マニュアル（朝倉書店，東京），52-55（1992）
- 21) M. Gobbetti, A. Corsetti: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **203**, 82-87（1996）
- 22) Peter H. A. Sneath: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology Volume 2* (Williams & Wilkins Co., U. S. A.), 1232（1986）
- 23) 微生物生態研究会編：微生物の生態（2）（東京大学出版会，東京），21-34（1977）
- 24) 百瀬洋夫，岡崎直人，外池良三：醸協，**63**, 686-688（1968）
- 25) 百瀬洋夫，三宅正太郎，外池良三：醸協，**64**, 749-750（1969）
- 26) 乳酸菌研究集談会編：乳酸菌の科学と技術（学会出版センター，東京），200-205（2003）
- 27) 井上 喬：ジアセチル（幸書房，東京），39-48（2001）
- 28) Marty-Teyssset, C., Posthuma, C., Lolkema, J., Schmitt, P., Divies, C., Konongs, W.: *J. Bacteriol.*, **178**, 2178-2185（1996）
- 29) 日本乳酸菌学会編：乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス（京都大学学術出版会，京都），158-160（2010）