生醱系酒母より分離した球状乳酸菌

百瀬 洋夫・鎌尾 敦子

(実践女子大学)

平成4年8月21日受理

Lactic Acid Cocci Isolated from *Moto* (Sake Starter) Prepared by Traditional Method

Hiroo MOMOSE and Atsuko KAMAO

(Jissen Women's University, 1-1, Ohsakaue 4-Chome, Hino-Shi, Tokyo 191)

The flora of lactic acid bacteria was examined in *moto* (sake starter) prepared by the traditional method and collected from 10 breweries in Akita, Kyoto and Hyogo prefectures. Lactic acid bacteria dominant in number were cocci in all the samples.

Seventeen strains of lactic acid cocci were isolated from the samples, and several characteristics of the isolates were compared with those of *Leuconostoc mesenteroides* var. *sake* IAM 1647. The isolates were estimated as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* on the basis of the description of Bergey's Manual except 1 strain, which was estimated as *Leuconostoc paramesenteroides*. Several characteristics of 14 strains out of 16 strains estimated as *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* were similar to those of IAM 1647.

Key words : 生醱系酒母・球状乳酸菌

緒 言

生醱系酒母の微生物群の動向については古くから多くの研究がなされており、まず硝酸還元菌が生育し、次いで乳酸菌が生育して乳酸を蓄積し、乳酸菌以外の微生物が死滅した後、清酒酵母が生育して、最終的には乳酸菌も姿を消し、清酒酵母のみが存在するようになることが知られている。

生醱系酒母の乳酸菌は片桐・北原¹⁾によって研究され、球菌は *Leuconostoc mesenteroides* var. *sake*、桿菌は *Lactobacillus sake* と命名された。これら2種の乳酸菌のみが生醱系酒母で生育できるのは、これらの菌が低温(4℃)でも生育可能であることが最大の要因であると大林ら²⁾によって指摘されている。生醱系酒母ではまず球状乳酸菌が生育し、約3日後に桿状乳酸菌が生育してくることは斎藤³⁾が報告しており、芦沢⁴⁾は *Leuc. mesenteroides* var. *sake* は *L. sake* より低温下での生育が速いため先に生育するが、蓄積された亜硝酸と自分で蓄積した乳酸との相乗作用で次第に生菌数を減少し、正常な経過を取った生醱系酒母では乳酸菌は球菌から桿菌への遷移がみられると報告している。また北原⁵⁾も球菌は、酸

生成が少ないことを指摘しており、一般に生醱系酒母で乳酸生成に働く主要な乳酸菌は *L. sake* である⁶⁾というのが定説となっている。

著者は以前から生醱系酒母における球状乳酸菌の役割に興味を持ち、機会あるごとに酵母添加直前の生醱系酒母について球状乳酸菌と桿状乳酸菌の出現状況を調べてきたが、近年次第に桿状乳酸菌より球状乳酸菌が優位を占めて生育している酒母が多くなってきていることに注目し、生醱系酒母より球状乳酸菌を分離して諸性質を調べ、*Leuc. mesenteroides* var. *sake* IAM 1647 と比較検討したので報告する。

実 験 方 法

秋田県7場、京都府2場、兵庫県1場より、仕込み後6～8日目(暖気2～4本目)及び12～15日目(酵母添加直前)の山廃醱を採取し、適宜稀釈してGYP-寒天-炭酸カルシウム培地(Eurocidin 10 ppm, NaN₃ 30 ppmを含む)で30℃5日間平面培養した。出現した乳酸菌様コロニーのすべて(20～40個)を釣菌して形態を調べ、菌の分離とともに球菌と桿菌の出現状況を調べた。

分離した球菌について主として GYP 培地を用いて常法により諸性質を調べ、試料別に菌株を整理して 17 株を残した。菌株番号の最初の数字は酒造場を示す。

デキストランの生成は蔗糖-ポリペプトン-酵母エキス培地で 30°C 3 日間培養し、粘質物の生成の有無から判定した。

生成乳酸の立体異性体は、GYP 培地で 30°C 3 日間培養後に酵素法によって D-及び L-乳酸を測定して判定した。

糖類の発酵性は、ポリペプトン溶液に各種糖類及び指示薬として BCP を添加した培地で 30°C で培養し、培地の変色状況を観察するとともに、5 日後の滴定酸度を測定して判定した。

菌体脂肪酸組成は、GYP 培地で 30°C 3 日間培養後洗浄して凍結乾燥した菌体について、塩酸メタノール法⁷⁾で脂肪酸をメチル化し、ガスクロマトグラフィーにより測定した。

ガスクロマトグラフィーはキャピラリーカラム (J & W 社 DB-23, 0.25 mm×30 m) を装填した島津 GC-14 A を用い、カラム温度: 140~240°C (3°C/min で昇温)、検出器: FID で行った。

7°C における増殖速度は、18 mm 試験管を用いて GYP 培地で培養し、経時的に培養試験管のまま 660 nm の吸光度を測定して、その値より増殖曲線を描き、比増殖速度を求めた。

実験結果

1. 山麩酐の乳酸菌相

採取した山麩酐の試料を適当に稀釈して GYP-炭酸カルシウム-寒天培地で 30°C で平面培養した場合、桿状乳酸菌に比べて球状乳酸菌の生育が若干速く、そのため 5 日間培養後の炭酸カルシウムの溶解径は球状乳酸菌で大きくなる。したがって、この炭酸カルシウムの溶解径のみからでも、出現したコロニーを球状乳酸菌と桿状乳酸菌に識別することがほぼ可能であった。1 枚のシャーレに 20~40 コ出現させたコロニーのすべてを釣菌し、形態を調べた結果は Table 1 に示すように、すべての試料について優位を占めて生育しているのは球状乳酸菌であり、酵母添加直前の試料についても、桿状乳酸菌の認められないものが半数以上あった。

2. 球状乳酸菌の諸性質

分離した球状乳酸菌の諸性質を *Leuc. mesenteroides* var. *sake* IAM 1647 と比較した結果を Table 2 に示す。

いずれの球菌も連鎖状で、カタラーゼを欠き、ブドウ糖から著量の二酸化炭素を生成した。生成乳酸は D-

Table 1 Flora of lactic acid bacteria in traditionally prepared *moto*.

Sake-Breweries	6~8 th days		12~15 th days*	
	Cocci	Rods	Cocci	Rods
1 (Akita prefecture)	○	△	○	△
2 (Same as above)	○	△	○	×
3 (Same as above)	○	△	○	△
4 (Same as above)	○	△	○	△
5 (Same as above)	○	△	—	—
6 (Kyōto prefecture)	—	—	○	△
7 (Same as above)	—	—	○	×
8 (Hyōgo prefecture)	○	×	○	×
9 (Akita prefecture)	○	×	○	×
10 (Same as above)	○	×	○	×

○: dominant in number, △: inferiority in number, ×: not detect

*: just before the inoculation of yeasts

Table 2 Some characteristics of type strain and isolates.

Strains	1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2, 4-1, 4-2, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 9-1, 9-2, 10-1, 10-2			5-1
	IAM 1647			
Shape	Cocci, Chains	Cocci, Chains	Cocci, Chains	Cocci, Chains
Size (μ)	0.6~0.8	0.6~0.8	0.6~0.8	1.0~1.2
Motility	—	—	—	—
Gram strain	Positive	Positive	Positive	Positive
Catalase	—	—	—	—
CO ₂ from glucose	+	+	+	+
Dextran formation	+	+	+	—
Lactic acid isomer	D(—)	D(—)	D(—)	D(—)
Growth at	5°C	+	+	—
	10°C	+	+	+
	37°C	+	+	+
	45°C	—	—	—
Growth at pH 4.8	+	+	+	+
Growth in 3% NaCl	+	+	+	+

Symbols: same as that of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 (1986).

(-) で、45°C で生育できなかった。5-1 を除く 16 株はその他の性質も IAM 1647 と一致していた。すなわち、菌体は径 0.6~0.8 μ で、蔗糖からデキストランを生成し、5°C で生育可能であった。5-1 は他の菌株よりやや大形 (1.0~1.2 μ) で、蔗糖からのデキストラン生成は認められず、5°C 5 日間の培養で生育が認められなかった。

3. 糖類の発酵性

分離した球状乳酸菌の糖類の発酵性を *Leuc. mesenteroides* var. *sake* IAM 1647 と比較して Table 3 に示す。

1-2, 2-2, 6-1, 9-2, 10-2 の 5 株は糖類の発酵性が

IAM 1647 と一致していた。すなわち、トレハロースについては発酵性は弱い、アラビノースをはじめ他の供試糖類についてはいずれも強い発酵性を示した。1-1、

Table 3 Fermentation of sugars by type strain and isolates.

Strains	IAM 1647	1-2, 2-3, 6-1, 9, 2, 10-2	1, 1, 2-1, 3-2, 4-1, 4-2, 7-1, 8-1, 8-2, 10, 1	9-1	3-1	5-1
Sugars						
Ribose	##	##	##	##	##	##
Arabinose	##	##	##~++	##	##	++
Xylose	##	##	##	+	##	+
Glucose	##	##	##	##	##	##
Fructose	##	##	##	##	##	##
Galactose	##	##~++	##~++	##	+	++
Mannose	##	##	##	##	##	##
Maltose	++	##~++	##~++	##	##	##
Lactose	##	##~++	##~++	##	##	+
Sucrose	##	##	##~++	##	##	##
Melibiose	##	##~++	##~++	##	++	++
Trehalose	+	+	##~++	##	##	+

: ferment strongly, ++ : ferment moderately, + : ferment weakly

Fig. 1 Gas-liquid chromatogram of cellular fatty acids from *L. mesenteroides* var. *sake* IAM 1647.

Similar chromatograms were obtained from isolated strains, 1-1, 1-2, 2-1, 2-2 and 3-1.

Chromatographic conditions, Apparatus : Shimadzu GC-14 A, detector : FID, Column : J & W Co. Ltd. DB-23 0.25 mm×30 m, temperature : 140~240°C programmed at 3°C/min. Numbers beside the peak are the number of carbon atoms and the number of double bonds. The peak 17:0 is an internal standard added.

2-1, 3-2, 4-1, 4-2, 7-1, 8-1, 8-2, 10-1 の 9 株は、供試糖類のいずれに対しても強い発酵性を示した。9-1 はキシロースの発酵性が弱く、3-1 はガラクトースの発酵性が弱い菌株であった。5-1 はキシロース、ラクトース、トレハロースの発酵性が弱い菌株であった。

4. 菌体脂肪酸スペクトル

菌体脂肪酸のガスクロマトグラムを Fig. 1 及び Fig. 2 に示す。

Fig. 1 は *Leuc. mesenteroides* var. *sake* IAM 1647 の菌体脂肪酸のガスクロマトグラムであるが、その他 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1 の 5 株も同様のクロマトグラムを示した。Fig. 2 は 3-2 の菌体脂肪酸のガスクロマトグラムであるが、Fig. 1 と比較して C_{18:3} のピークが著しく低い点が特徴となっている。4-1, 4-2, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 9-1, 9-2, 10-1, 10-2 の 11 株も同様のクロマトグラムを示した。

5. 7°C における生育

7°C で培養して測定した比増殖速度を Table 4 に示す。

菌株を Table 3 に示した糖類の発酵性の類似した群ごとに区切って示したが、5-1 の比増殖速度が他より著しく小さく、9-1 の比増殖速度が比較的大きかった他は、

Fig. 2 Gas-liquid chromatogram of cellular fatty acids from the isolated strain 3-2.

Similar chromatograms were obtained from isolated strains, 4-1, 4-2, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 9-1, 9-2, 10-1 and 10-2.

Chromatographic conditions and designation of peaks are the same as those in Fig. 1.

Table 4 Growth of type strain and isolates at 7°C in GYP broth.

Strains	Specific growth rate (day ⁻¹)	Strains	Specific growth rate (day ⁻¹)
IAM 1647	1.471	1-1	1.615
		2-1	2.081
1-2	1.986	3-2	1.781
2-2	2.398	4-1	1.426
6-1	1.191	4-2	1.828
9-2	1.638	7-1	2.032
10-2	1.513	8-1	1.459
		8-2	1.561
9-1	2.696	10-1	1.220
3-1	1.658	5-1	0.172

菌群別の特徴はみられなかった。

考 察

生醗系酒母中では球状乳酸菌から桿状乳酸菌への遷移がみられ、乳酸の蓄積に働く主要な菌は桿状乳酸菌であるというのが定説となっているが、最近の山麩醗では球状乳酸菌が主乳酸生成菌となっていて、桿状乳酸菌が認められないものが多くなっていることは Table 1 に示したとおりである。

山麩醗で球状乳酸菌から桿状乳酸菌への遷移が必ずしもみられず、球状乳酸菌あるいは桿状乳酸菌のみで乳酸が蓄積されるものがあることは芦沢^{8,9)}によって報告されている。芦沢⁹⁾はまた、山麩醗の乳酸菌相は主として使用する麴の乳酸菌相によって決定されること、*Pseudomonas* 属が主硝酸還元菌となって強い亜硝酸反応が持続する山麩醗では、酸性下で亜硝酸耐性が小さい *Leuc. mesenteroides* は次第に生菌数を減少し、*L. sake* が主要な乳酸生成菌になることを指摘している。

今回試料を採取した山麩醗について、硝酸還元菌及び亜硝酸の消長については調べていないので不明であるが、芦沢の説を適用すれば、最近の生醗系酒母では強い亜硝酸反応を持続するものは少ないのではないかと推定される。

L. sake は豊田⁶⁾が指摘するように、生醗系酒母中のみ特異的にみられる乳酸菌である。そのため長期間生醗系酒母の製造をしていない酒造場では、新たに造った生醗系酒母中で *L. sake* 認められないことがあっても不思議なことではない。一方、*Leuc. mesenteroides* は自然界に広くみられる乳酸菌であり、新たに生醗系酒母を造った場合、低温下で生育の速い *Leuc. mesenteroides* が生育してくるのは極めて自然である。

今回分離した球状乳酸菌は、ここで調べた諸性質を *Bergey's Manual*¹⁰⁾ の記載と照合すれば 5-1 1 株を除い

て *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* と推定される。5-1 は *Leuconostoc paramesenteroides* と推定し得るが、デキストラン生成能を欠く *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* の可能性もあり、菌種の同定には DNA レベルでの詳細な検討が必要である。

Leuc. mesenteroides subsp. *mesenteroides* と推定した 16 株中、この実験で取り上げた諸性質が *Leuc. mesenteroides* var. *sake* IAM 1647 と完全に一致していたものは 1-1 と 2-2 の 2 株のみであった。

他の菌株を IAM 1647 と比較すると、6-1、9-2、10-2 の 3 株は菌体脂肪酸でリノレン酸 (C_{18:3}) が少ない点が異なり、1-1 と 2-1 の 2 株はトレハロースを強く発酵する点が異なり、3-2、4-1、4-2、7-1、8-1、8-2、10-1 の 7 株はトレハロースを強く発酵する点とリノレン酸が少ない点が異なる。菌体脂肪酸組成が乳酸菌の分類学上のような重要性を持つものか定説がなく、トレハロース発酵性の強弱は乳酸菌の分類学上あまり重要視されるものではないから、以上にあげた 14 株は *Leuc. mesenteroides* var. *sake* と一致するものとしてよいと思う。9-1 はキシロースの発酵性が弱く、3-1 はガラクトースの発酵性が弱い菌株である。

キシロースやガラクトースの発酵性は乳酸菌の分類学上比較的重視されるものであり、この 2 株を *Leuc. mesenteroides* var. *sake* と一致するものとして良いか否かはこの実験からは不明である。

5-1 は 7°C での比増殖速度が他より著しく小さいので、生醗系酒母の乳酸菌としては不適当といえる。他の菌株の中では 2-2 及び 9-1 は 7°C での比増殖速度が大きく、生醗系酒母の乳酸菌としてのみならず、他への利用も考えられ興味深い菌株である。

要 約

秋田県、京都府、兵庫県 の 10 酒造場から山麩醗む試料を採取して、乳酸菌相を調べた。すべての試料について、優位を占めて生育しているのは球状乳酸菌であった。

これらの試料から 17 株の球状乳酸菌を分離し、諸性質を *Leuconostoc mesenteroides* var. *sake* IAM 1647 と比較した。分離菌は 1 株を除いて *Bergey's Manual* の記載に基づいて *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* と推定した。1 株は *Leuconostoc paramesenteroides* と推定した。*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* と推定した 16 株中 14 株は諸性質が IAM 1647 と類似していた。

終わりに試料採取にご協力いただきました石川雄章氏、岩野君夫氏、大阪国税局鑑定官室の皆様にご感謝致し

ます。

文 献

- 1) 片桐英郎, 北原覚雄: 農化, 10, 942, 952, 959, 965 (1934)
 - 2) 大林 晃, 北原覚雄: 農化, 33, 839 (1959)
 - 3) 斎藤賢道: 醸造学, 13, 503 (1935)
 - 4) 芦沢 長: 醸協, 61, (7) 638, (11) 1033 (1966)
 - 5) 北原覚雄: 乳酸菌の研究, p. 6 (1966)
 - 6) 豊田 泰, 岡田早苗, 小崎道雄, 北原覚雄: 農化, 53, 247 (1979)
 - 7) 駒形和男: 微生物の化学分類実験法, p. 157 (1982)
 - 8) 芦沢 長: 醸協, 58, (5) 543 (1963)
 - 9) 芦沢 長: 醸協, 60, (10) 900 (1965)
 - 10) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, p. 1071 (1986)
-