[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 55, No. 9, pp. 805~809, 1981]

麴汚染細菌の生産する抗菌性物質 F 16-2 の 乳酸菌に及ぼす影響†

塚本桂子, 稲永茂信*, **, 林田晋策*

(筑紫女学園短期大学, *九州大学農学部農芸化学科,

**現在: ハウス食品工業)

昭和 56 年 4 月 9 日 受 理

Effects of Antibiotic F 16-2 on Growth of Lactic Acid Bacteria in Sake Mash

Keiko TSUKAMOTO, Shigenobu INENAGA* and Shinsaku HAYASHIDA*

Chikushi Jogakuen Junior College, Fukuoka, 818-01

*Department of Agricultural Chemistry,
Kyushu University, Fukuoka 812

F 16-2, an antibiotic substance, produced by *Bacillus subtilis* 16-2 isolated from rice koji, inhibited the growth of *Saccharomyces sake* Kyokai No.7 and *Lactobacillus sake*. F 16-2 did not inhibit the growth of *Leuconostoc mesenteroides* and putrefied lactic acid bacteria *L. casei* B 83 and *L. plantarum* B 74. In mixed culture of *L. sake* and *S. sake* Kyokai No.7 in koji-extract medium supplemented with F 16-2, acid formation was not observed, and growth of *S. sake* Kyokai No.7 was suppressed. In mixed culture of *L. casei* B 83 and *S. sake* Kyokai No.7 in koji-extract medium supplemented with F 16-2, acid formation increased, and growth of *S. sake* Kyokai No.7 was suppressed. The contamination of harmful wild microorganisms in moto of original type and the putrid fermentation in sake mash were accelerated by F 16-2.

(Received April 9, 1981)

緒 言

清酒麴から分離した *Bacillus subtilis* 16-2 は醸造関連の各種微生物に対して増殖を阻止する抗菌性物質 F 16-2 を産生した⁽¹⁾。この F 16-2 により協会 7 号酵母の増殖は阻害され、細胞の形態は異常となって、もろみの発酵が緩慢となった。麴菌も増殖を阻害され、麴の酵素力が低下した。

本報では、乳酸菌に及ぼす F 16-2 の影響を検討し、*Lactobacillus sake* は F 16-2 に感受性であるが、腐造乳酸菌 *L. casei* B 83, *L. plantarum* B 74 は非感受性であることを認めた。次いで F 16-2 存在下で腐造乳酸菌と協会 7 号酵母の混合培養を行い、清酒もろみの酸敗に関して考察した。

実験材料と実験方法

1. 使用菌株 既報⁽¹⁾の抗菌性物質 F 16-2 産生菌 *B. subtilis* 16-2 を使用した。酵母には協会 7 号酵母を使用し、乳酸菌には研究室保存の外池らの分離した腐造乳酸菌⁽²⁾ *L. casei* B 83 および *L. plantarum* B 74 のほか、*L. brevis* IFO 3960, *L. casei* IFO 3914, *L. plantarum* IFO 3074, *L. sake* IFO 3541 および *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *sake* IFO 3832 を使用した。

2. 抗菌性物質 F 16-2 の調製 前報⁽³⁾に従って F 16-2 を調製した。

3. 乳酸菌の生菌数 炭酸カルシウムを加えた麴汁寒天培地を用いて、30°C, 48 時間平面培養を行い、コロニー数を計測した。

4. 乳酸菌に対する F 16-2 の最小阻止濃度 (MIC)

† 麴の抗真菌性汚染細菌に関する研究 (第 4 報)。

麴汁培地の使用により寒天培地希釈法によった。

5. 酸度 国税庁所定分析法⁽⁴⁾に従って試料 10 ml の中和に要する 1/10N 水酸化ナトリウム溶液の ml 数で示した。ブロムチモール・ブルー(BTB) とニュートラル・レッド(NR) 混合指示薬を用いた。

6. 酵母と乳酸菌の混合培養 F 16-2 20 U/ml を添加した麴汁培地で協会 7 号酵母と F 16-2 感受性の *L. sake* IFO 3541 をいずれも菌数が 1×10^5 /ml となるように接種し, 30°C で混合培養を行った。経時的に菌数と培養液の酸度を測定した。F 16-2 を添加しない麴汁培地における混合培養を対照とした。協会 7 号酵母と F 16-2 非感受性の腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 の混合培養についても検した。

7. 酵母と腐造乳酸菌の混合培養による発酵試験 F 16-2 20 U/ml 添加麴汁(Bllg. 10°) 100 ml に協会 7 号酵母の接種菌数を 4×10^6 /ml とし, 腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 を 4×10^4 /ml および 4×10^2 /ml 接種して 15°C で発酵試験を行った。また, 蒸米 99 g, 麴 32 g および水 169 g を用いて調製したもろみに F 16-2 20 U/ml 添加し, 協会 7 号酵母を菌数 4×10^6 /ml, *L. casei* B 83 を 4×10^4 /ml および 4×10^2 /ml となるように接種して 15°C で発酵試験を行った。F 16-2 無添加の麴汁およびもろみについても検討した。F 16-2 無添加培地に酵母のみを 4×10^6 /ml 接種した発酵試験を対照とした。酵母と腐造乳酸菌の接種菌数は外池らの方法⁽⁵⁾に準じた。発酵びんの総重量を経時的に測定し, その減量を炭酸ガス量として表示し発酵力の指標とした。発酵終了後, 国税庁所定分析法⁽⁴⁾に従って最終アルコール濃度と酸度を測定した。

実験結果

1. 乳酸菌に対する F 16-2 の最小阻止濃度

乳酸菌に対する F 16-2 の最小阻止濃度(MIC)を求め Table I に示した。*L. brevis* IFO 3960, *L. sake* IFO 3541 に対する F 16-2 の最小阻止濃度は 10 µg/ml であった。しかし, 腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 と *L. plantarum* B 74 は F 16-2 に対して耐性を示した。もろみにおいて乳酸菌に対して F 16-2 は複雑な影響を与えると考えられる。

2. *L. sake* と協会 7 号酵母の混合培養に及ぼす F 16-2 の影響

L. sake IFO 3541 は F 16-2 に対して強い感受性を示

Table I. Antimicrobial Spectra of F 16-2 by Agar Dilution Method

Test organisms	MIC (µg/ml)
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO 3960	10
<i>Lactobacillus casei</i> IFO 3914	50
<i>Lactobacillus casei</i> B 83	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> IFO 3074	50
<i>Lactobacillus plantarum</i> B 74	100
<i>Lactobacillus sake</i> IFO 3541	10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>sake</i> IFO 3832	100

Medium : koji extract medium(at 30°C for 48hr).

Fig. 1. Growth of *S. sake* Kyokai No. 7 and *L. sake* in Mixed Culture Supplemented with F 16-2. The respective inoculum sizes of *S. sake* Kyokai No. 7 and *L. sake* were 1×10^5 cell/ml and incubation carried out in koji ext. medium at 30°C. Acid formation was shown as titration value of 1/10N NaOH soln. —●—, cell number of *S. sake* Kyokai No. 7; —▲—, cell number of *L. sake*; —■—, acid formation in medium; —, incubation in koji ext. medium; ----, incubation in koji ext. medium supplemented with F 16-2 20 U/ml.

した。生もと系酵母の *L. sake* IFO 3541 と協会 7 号酵母に対する F 16-2 の影響を検討するため両者の混合培養を行った。F 16-2 20 U/ml を添加した麴汁培地に, *L. sake* IFO 3541 と協会 7 号酵母をそれぞれ 5×10^5 /ml となるように接種し, 30°C で培養して経時的に酵母と乳酸菌の菌数と培地の酸度を測定した。F 16-2 無添加麴汁培地の培養を対照とし結果を Fig. 1 に示した。対照では, *L. sake* IFO 3541 は増殖して酸を産生し, 酵母も増殖したが, F 16-2 添加培地では *L. sake* IFO 3541 の増殖は阻害され生酸は認められず, 酵母の増殖も抑制された。

3. 腐造乳酸菌と協会7号酵母の混合培養に及ぼす F 16-2 の影響

腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 および *L. plantarum* B 74 は F 16-2 に対して非感受性で、F 16-2 添加培地でも増殖した。F 16-2 20 U/ml 添加麴汁培地に *L. casei* B 83 と協会7号酵母をそれぞれ 5×10^5 /ml となるように接種し 30°C で培養した。経時的に両者の菌数と培地の酸度を測定し Fig. 2 に示した。F 16-2 無添加培地の培養を対照とした。F 16-2 存在下で腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 は増殖して酸を産生したが、酵母の増殖は抑制された。

4. F 16-2 とろみ腐造との関連性

酵母の接種菌数を 4×10^6 /ml にして、腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 の接種菌数を 4×10^4 /ml および 4×10^2 /ml とし、すなわち酵母数の 1/100 および 1/10000 の割合で接種して、15°C で発酵試験を行った。培地は F 16-2 添加麴汁培地と F 16-2 無添加麴汁培地を用いた。実験条件は外池らの方法⁽⁵⁾に従い、発酵試験の結果を Fig. 3 に示した。麴汁培地を使用した場合、腐造乳酸菌の接種菌

Fig. 2. Growth of *S. sake* Kyokai No. 7 and *L. casei* B 83 in Mixed Culture Supplemented with F 16-2. The respective inoculum sizes of *S. sake* Kyokai No. 7 and *L. casei* B 83 were 1×10^6 cell/ml and incubation carried out in koji ext. medium at 30°C. Acid formation was shown as titration value of N/10 NaOH soln. —●—, cell number of *S. sake* Kyokai No. 7; —▲—, cell number of *L. casei* B 83; —■—, acid formation in medium; —, incubation in koji ext. medium; —, incubation in koji ext. medium supplemented with F 16-2 20 U/ml.

Fig. 3. Effect of F 16-2 on Fermentation Test in Koji Extract Medium.

Inoculum size	yeast/ml	<i>L. casei</i> B 83/ml
1	4×10^6	4×10^4
2	4×10^6	4×10^2
3	4×10^6	4×10^4
4	4×10^6	4×10^2
cont.	4×10^6	—

—, in koji ext. medium; —, in koji ext. medium supplemented with F 16-2.

数が少ないと酸の生成も少なく、対照とほぼ同様の発酵経過と生成アルコール量を示した。外池らの報告⁽⁵⁾に示されたと同様に腐造乳酸菌の菌数が少ないと発酵異常は認められなかった。一方、F 16-2 添加麴汁培地使用の場合には酵母の増殖は抑制され、乳酸菌の接種菌数が少量であっても、腐造乳酸菌はすみやかに増殖して酸を生成蓄積し、発酵は緩慢となり生成アルコール量は対照に比して減少した。いわゆる酸敗の現象を示した。次に清酒もろみの小発酵試験により酸敗の再現を試みた。F 16-2 を添加したもろみと無添加のもろみについて酵母と腐造乳酸菌の接種菌数を麴汁の場合と同じにして発酵試験を行い、結果を Fig. 4 に示した。発酵経過は麴汁培地の場合と同様の傾向を示した。F 16-2 無添加もろみでは腐造乳酸菌の接種が少ないと発酵経過、生酸量および生成アルコール量はほぼ対照と同じであった。F 16-2 添加もろみでは腐造乳酸菌がすみやかに増殖して酸を生成蓄積し、酵母の増殖は抑制されて生成アルコール量は著しく低下し、酸敗の状態となった。

考 察

本報では、清酒醸造に關与する微生物のうちとくに乳酸菌に対する F 16-2 の影響を検討した。最小阻止濃度の結果から、*L. brevis* IFO 3960 および *L. sake* IFO

Fig. 4. Effect of F 16-2 on Fermentation Test in Sake Mash. Fermentation test using steamed rice 99g, rice koji 32g and water 169g in same proportion as sake mash was done at 15°C.

Inoculum size	yeast/ml	<i>L. casei</i> B 83/ml
1	4×10^6	4×10^4
2	4×10^6	4×10^2
3	4×10^6	4×10^4
4	4×10^6	4×10^2
cont.	4×10^6	—

—, in sake mash ; ----, in sake mash supplemented with F 16-2.

3541 は F 16-2 に感受性であるが, *Leu. mesenteroides* subsp. *sake* IFO 3832 および腐造乳酸菌 *L. casei* B 83, *L. plantarum* B 74 は F 16-2 に耐性であった. 生もと系酒母に重要な乳酸菌 *L. sake* IFO 3541 と協会 7 号酵母を F 16-2 存在下で混合培養を行うと, *L. sake* と酵母はともに増殖阻害を受けるため, 培養初期に酸度および酵母数が低下した. つまり, 生もと系酒母が F 16-2 で汚染されると, F 16-2 耐性の *Leu. mesenteroides* の増殖がない限り, 生酸が起きず酵母の増殖も抑制されて雑菌汚染の危険性が推察された. 北原⁽⁶⁾によると生もとでは, *Leu. mesenteroides* の出現は早いが生酸量が低く, これに対して *L. sake* は 1~2 日遅れて出現し生酸量が多く生もとでの主要乳酸菌であるとされている. したがって生もとが F 16-2 に汚染されると, 十分量の生酸が得られないと考察された. 一方, 腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 と協会 7 号酵母の F 16-2 存在下での混合培養では, 腐造乳酸菌 *L. casei* B 83 は増殖し酸を生成したが, 酵母の増殖は抑制された. 外池ら^(5,7,8)はもろみにおける異常生酸の条件は, もろみに腐造乳酸菌が 10^7 /ml 以上存在し, そのためには仕込み時に少なくとも 10^5 /ml の腐造乳酸菌の混入が必要と指摘している. F 16-2 無添加培地での混合培養は, 外池らの報告のとおり腐造乳酸菌数が低い場合には酸敗は生起しないことを示した. しかし, F 16-2 存在下では酵母の増殖が抑制されて *L.*

casei B 83 の接種菌数が 10^4 /ml, 10^2 /ml と少ない場合でも, *L. casei* B 83 が増殖して生酸し, もろみは酸敗の状態を示すに至った. 清酒もろみによる小発酵試験においても F 16-2 存在下では酸敗した. これらの結果は F 16-2 存在下では少量の腐造乳酸菌の汚染によって, もろみの酸敗が起りうることを示唆した. 麹菌⁽⁹⁾, 酵母⁽⁹⁾および乳酸菌に及ぼす F 16-2 の影響について検討し, F 16-2 の生成が麹の酵素力の低下, 生もと系酒母の雑菌汚染, もろみにおける酸敗, 腐造の原因になりうることを示した.

要 約

(1) 各種乳酸菌に対する F 16-2 の最小阻止濃度を求めた. *L. brevis* IFO 3960 および *L. sake* IFO 3541 に対する最小阻止濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ であった. *Leu. mesenteroides* subsp. *sake* IFO 3832 および腐造乳酸菌 *L. casei* B 83, *L. plantarum* B 74 は F 16-2 に耐性を示した.

(2) 生もと系酒母で生酸を行う F 16-2 感受性乳酸菌 *L. sake* IFO 3541 と協会 7 号酵母の混合培養を F 16-2 添加麹汁培地で行うと, 両者とも増殖が阻害された. 生もと系酒母において F 16-2 が存在したときの危険性を考察した.

(3) F 16-2 存在下で協会 7 号酵母と F 16-2 非感受

性の *L. casei* B 83 の混合培養を行った。また、F 16-2 添加麴汁培地で協会7号酵母と *L. casei* B 83 の接種菌数を酵母の 1/100, 1/10000 となるように接種し発酵試験を行ったところ、酵母の増殖は抑制され生成アルコール濃度は低下したが、*L. casei* は増殖し生酸した。小仕込みの清酒もろみでも同様の結果となり、もろみは酸敗した。F 16-2 が存在すると腐造乳酸菌の汚染が少量であっても酸敗を生じうることを示した。

- (1) 塚本桂子, 林田晋策: 農化, **54**, 1021 (1980).
- (2) 外池良三, 百瀬洋夫, 久富鉄也, 阿久津富郎:

醸協, **58**, 647 (1963).

- (3) 塚本桂子, 林田晋策: 農化, **55**, 231 (1981).
- (4) 国税庁所定分析法注解, 1974.
- (5) 外池良三, 百瀬洋夫, 飯田俊夫: 醸協, **56**, 892 (1961).
- (6) 北原覚雄: 乳酸菌の研究, 北原覚雄編著, 東大出版会, 1966, p. 30.
- (7) 百瀬洋夫, 前川季義, 久富鉄也, 外池良三: 醸協, **59**, 1006 (1964).
- (8) 百瀬洋夫, 小林信也, 小泉隆司, 外池良三: 醸協, **60**, 539 (1965).
- (9) 塚本桂子, 早川 洋, 林田晋策: 農化, **55**, 799 (1981).