

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

Control of Moto (Sake Starter) Prepared by Traditional Method
by Addition of Lactic Acid Bacteria and Nitrate Reducing Bacteria

西尾 昭・茂 一孝

Akira Nishio and Kazutaka Shigeru

生もと系酒母製造の安定化のため、乳酸菌等を分離し、それらを培養・添加する方法について検討した。微生物として、仕込水から硝酸還元菌を、酒母から乳酸菌を分離し、それぞれ *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus sakei* と推定した。これらを添加して山廃もと小仕込試験を行ったところ、成分のおよび微生物的にも順調な経過をたどり、この方法により生もと系酒母が安定して製造できることが示唆された。

1. はじめに

現在の酒母造りはあらかじめ乳酸を添加する「速醸系酒母」が主流であるが、近年、個性的な純米酒造りを目指して昔ながらの「生もと系酒母」取り組みへの要望がある。生もと系酒母とは、天然の2種類の微生物（乳酸菌と硝酸還元菌）を活用して雑菌を淘汰し酵母を純粋に育成する方法であるが、従来は微生物が自然に混入してくることに頼っていたため安定性に乏しく、新たに取り組むには敷居が高かった。

そこで、自然界から乳酸菌と硝酸還元菌をスクリーニングし、それらを培養して添加することにより、安定した「生もと系酒母」の製造が可能かどうか検討を加えたので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用培地

乳酸菌の培養には MRSbroth 培地 (Difco)、検出には MRSagar 培地 (Difco) (0.5% CaCO₃ 添加) を使用した。

硝酸還元菌の培養には PN 培地 (0.1% Peptone, 0.1% KNO₃) を用い、検出には標準寒天培地 (ニッスイ) に亜硝酸発色培地 (0.05% KNO₃, 0.01% -Naphthylamine, 0.1% Sulfanilic acid, 0.89% Tartaric acid, 1.5% Agar) を重層することにより行った。

酵母の検出には YPD 培地 (1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Glucose, 100 unit/ml Penicillin, 10 /ml Streptomycin, 5% EtOH, 1.5% Agar) を使用した。

2.2 硝酸還元菌の分離

硝酸還元菌の分離源として仕込水と麹を用いた。

麹汁 (ホメ3, pH 6, 0.1% KNO₃) 10 ml に仕込水 1 ml または麹 10 ~ 20 粒加え、7 で 1 週間培養後、亜硝酸反応試薬 (1% -Naphthylamine, 10% Sulfanilic acid, 89% Tartaric acid) を 0.05 g/10 ml 添加し、70 ~ 80 で 2 分間反応させ濃赤色を呈した培養液を希釈して PN プレートに塗布し、15 で培養して出現したコロニーから硝酸還元菌を単離した。(1 次選抜)

次に、それらを PN 液体培地で培養し、10 µl を PNG25 培地 (0.1% Peptone, 0.1% KNO₃, 25% Glucose, pH5.5) に添加して 15 で培養し、増殖が見られなかったものを選抜した。(2 次選抜)

それらを使用して総米 100 g の小仕込試験 (仕込配合: 米 70 g, 乾燥麹 30 g, 蒸留水 130 ml (KNO₃ 100 ppm 含む)) を行い、対照の *Pseudomonas* (黄桜酒造 (株) 若井氏より譲渡) と同程度の亜硝酸反応が観察されたものを選抜し (3 次選抜) 同定試験に供した。

菌株の同定は、ID32GN アピ (日本バイオメリュー) を使用して行った。

2.3 乳酸菌の分離

乳酸菌の分離源として麹と生もと系酒母を用いた。

細菌酸度測定用培地（日本醸造協会、以下 YAS 培地）10 ml に麹 10 ~ 20 粒または滅菌水で希釈した酒母を添加し 28 ℃ で一週間培養した後、酸度が 2 ml 以上のものを生酸菌が存在しているとして選抜した。（1次選抜）

それらを MRS 培地（MRSagar, 10 ppm Cycloheximide, 10 ppm Sodium Azide, 0.5%CaCO₃）で混釈培養し、30 ℃ で 2 日後にハローを形成したものを選抜した。（2次選抜）

再度 YAS 培地で生酸性を確認した後、顕微鏡観察、火落菌検出培地（SI 培地）を用いた培養試験を行った。その後、アルコール感受性試験に供した。即ち、エタノール 10%を含む麹汁培地（pH 5）に供試菌の MRS 培養液を 10 μl 添加し、0、2、4 日目に MRS プレート（0.5%CaCO₃）に混釈培養し、菌数の変化を観察した。一連の試験により、桿菌で火落菌ではないアルコール感受性の菌株を選抜した。（3次選抜）

菌株の同定は、16 S r R N A の配列解析により行った。乳酸菌からのゲノム D N A の抽出は、ISOPLANT（ニッポンジーン）を使用して行った。16 S r R N A 領域の D N A は、篠田らの方法¹⁾に従い、サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems 社製）を用いて増幅させた後、D N A シーケンサ（CEQ 2000XL, Beckman coulter 社製）によりその配列を決定した。得られた遺伝子配列は、D D B J のデータベースを活用して解析した。

2.4 山麩もと小仕込み試験

分離した硝酸還元菌及び乳酸菌を用い、総米 1,000 g（米 650 g, 乾燥麹 350 g, 汲水 1,250 ml（100ppmKNO₃含有））の小仕込み試験を行った。硝酸還元菌は 10⁵/ml、乳酸菌は 10⁴/ml となるようにそれぞれ仕込時に添加した。

対照として速醸もとの小仕込み試験を行った。

酵母は、協会 7号を使用した。

成分分析は、遠心分離（8,000 rpm, 20分）後の上清を試料とし、ボームは重ボーム度浮ひよう、Brix は Brix 計（ATC-1E, アタゴ）を使用し、酸度、アミノ酸度およびアルコールは国税庁所定分析法注解²⁾に従って分析した。

3. 結果と考察

3.1 硝酸還元菌の分離

1次選抜において、仕込水 9 点から 7 点、麹 38 点から 3 点に亜硝酸反応が見られ、PN プレートに出現したコロニーからそれぞれ 25 株と 11 株の計 36 株の硝酸還元菌を単離した。

それらを PNG25 培地で培養したところ、33 株で生育が観察されなかった。硝酸還元菌のうち、高濃度の糖分（直糖 16%以上）でも良く生育する *Enterobacter* は、亜硝酸をさらに還元して消失させ早湧きの危険性があるため望ましくない菌とされ、高濃度の糖分では生育が阻害される *Pseudomonas* が望ましい菌とされている³⁾。従って、この生育が阻害された 33 株を望ましい菌である *Pseudomonas* として選抜した。（2次選抜）

最後に、総米 100 g の小仕込試験を行い、7 ℃ で 1 週間後（Brix23%, ボーム 12.7）、12 日後（Brix25%, ボーム 13.8）の亜硝酸反応が対照株（黄桜）と同程度のものを選抜したが、得られたのは 1 株のみであった。（3次選抜）

同定試験の結果、選抜した株は対照株と同じ資化性を示し、そのパターンより *Pseudomonas* sp. と推定された。

3.2 乳酸菌の分離

YAS 培地で培養を行った結果、酸度 2 ml 以上を示したのは、麹 38 点から 7 点、県内酒造メーカーの生もと系酒母 2 点で、それらには生産菌が生息するとして選抜した。（1次選抜）

次に、それらを MRS 混釈培養したところ、麹 5 点、酒母 2 点にハローの形成が観察され、それぞれ

表1 乳酸菌および硝酸還元菌を添加した山廃もとの経過

日順	操作	品温(°C)	ボーム	Brix(%)	酸度(ml)	アミノ酸度(ml)	亜硝酸 ^{a)}	アルコール(%)
1	水麴・仕込	7						
2		7						
3		7		20.8	0.2		+	
4		7						
5		7	12.2	22.0	0.3		+++	
6		8						
7		9	12.6	23.4	1.7	1.7	+++	
8		10						
9		11	13.8	25.4	3.2	3.1	+++	
10		11						
11	酵母添加	14	14.3	26.6	4.3	3.9	++	
12		14						
13		15	14.7		5.4	4.4	++	
14		15						
15	酵母添加	15	15.0		6.1	4.8	+	0.6
16		15						
17		15	13.6		7.6	4.2	±	2.6
18		15						
19		15	9.3		9.1	2.9	-	7.9
20	分け	15	6.9		9.3	2.7		10.5

a) 亜硝酸： +++ 濃赤色 ++ 赤色 + ピンク色 ± 淡いピンク色 - 無色

表2 速醸もとの経過

日順	操作	品温(°C)	ボーム	Brix(%)	酸度(ml)	アミノ酸度(ml)	亜硝酸	アルコール(%)
1	水麴・仕込	14						
2		8						
3		12		27.3	5.6		-	
4		12						
5		13	13.7		6.1		-	
6		13						
7		14	11.2		6.6	0.5	-	
8		14						
9		15	9.0		7.1	0.7	-	
10		15						
11	分け	8	6.4		7.4	0.9	-	11.4

18 株、12 株のコロニーを選抜した。(2 次選抜)

選抜した株を再度 YAS 培地で培養したところ、30 株中 27 株が酸度 2 ml 以上の生酸性株であった。それらを顕微鏡観察したところ、球菌 10 株、桿菌 17 株であった。

生もと系酒母に關与する乳酸菌のうち、球菌は *Leuconostoc* と考えられ、低温で生育しやすく、栄養分が少なくても生育できることから、主に初期段階で出現する菌とされている。しかし、乳酸酸性下で亜硝酸耐性が低いことから、次第に亜硝酸耐性が高く、乳酸生成能の強い桿菌である *Lactobacillus* に遷移すると言われている⁴⁾。従って、選抜は桿菌を

中心に行った。

次に、火落菌検出培地 (SI 培地) での培養試験に供したところ、全ての株において増殖は見られず、火落菌、腐造性乳酸菌ではないと思われたが、アルコール感受性試験においては、2 株を除く 25 株は菌数の減少が見られず、アルコール耐性株と思われた。従って、アルコール感受性である桿菌 2 株を選抜し、同定試験に供した。(3 次選抜)

16 S rRNA 配列を用いた同定試験の結果、選抜された 2 株は *Lactobacillus sakei* であると推定された。

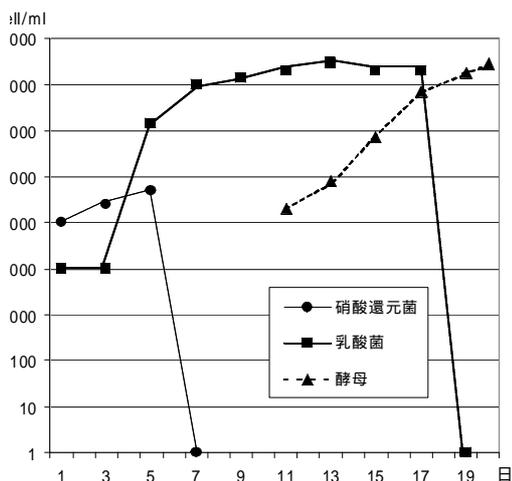


図1 微生物の変遷

3.3 山麩もと小仕込み試験

山麩もとおよび速醸もとの小仕込み試験の温度経過と成分値を表1、2に示す。

米、乾燥麹という条件のためか蒸米の溶解が良くなかったが、山麩もとは予定どおりの経過で推移し、速醸もとに比べ酸度、アミノ酸度が高く、特徴が良く現れていた。亜硝酸反応は9日目くらいまで強く見られ、11日目くらいから弱まっていき、19日目には消失した。それに伴って酵母のアルコール発酵も進み、アルコール分も予定どおり生成した。

次に微生物の変遷を図1に示す。

硝酸還元菌の菌数は5日目に最大となったが、既報どおり糖度が増加し、酸度が1 mlを越えた7日目には死滅した。その後は乳酸菌が順調に増殖していき、それにつれて酸度も上昇した。今回は野生酵母が観察されなかったが、既報によると、亜硝酸と乳酸の相乗効果により野生酵母が淘汰される。

11日目に酵母を添加したが、まだ亜硝酸が残存していたため生育が阻害され、15日目に再度添加したところ、順調に増殖・発酵し、アルコールも順調に生成した。そのアルコールによって乳酸菌が淘汰され、既報どおりアルコール分が5%を越えた19日目頃に乳酸菌の死滅が確認された。

以上の結果、山麩もとの最終段階では、硝酸還元菌、乳酸菌が淘汰され、酵母のみが純粋に生育することが確認された。成分的にも微生物的にもほぼ予

定どおりの経過となり、この方法により生もと系酒母が安定して製造できることが示された。

4. おわりに

- (1)硝酸還元菌を仕込水から、乳酸菌を酒母から分離し、それぞれ *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus sakei* と推定した。
- (2)それらを添加して小仕込み試験を行ったところ、成分のおよび微生物的にも順調な経過をたどった。
- (3)以上の結果、乳酸菌および硝酸還元菌を添加することにより、安定した「生もと系酒母」製造が可能であることが分かった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重な菌株を御譲渡いただきました黄桜酒造(株)若井芳則氏に深謝いたします。

文 献

- 1)篠田吉史他;鳥津評論,57,p.121-132(2000)
- 2)第四回改正国税庁所定分析法注解(1993)
- 3)原昌道;温故知新,37,p.1-16(2000)
- 4)芦沢長他;醸協,61(11),p.1033-1036(1966)