

## 清酒製造工程における汚染微生物生育抑制技術

半明桂子\*

Suppression Technology of Bacterial Contaminant for Sake Brewing  
Keiko Hammyo

## 1. 緒 言

アルコールを含有する清酒は、腐敗しにくい印象を持たれる食品である。しかし、変質に関する相談が年間10~20件程度あり、そのほとんどが「火落ち菌」と呼ばれるアルコール耐性を持つ乳酸菌が関与した腐敗である。この「火落ち菌」対策として、熱湯や薬剤などによる器具類の殺菌が行われているが、隙間の多い木質器具を十分に殺菌することは難しく、かつ、多くの作業を床の水が跳ね返る低位置で行うため新たな汚染が起こり、結果として、十分な効果が得られていない現場が多い。また、発酵に30日程度要する清酒の製造は、複数の仕込みを時間差で行うため、製造所内で「火落ち菌」による汚染が発生すると、共用する器具などを媒介して複数の清酒へ拡大され、収束に時間がかかることが多い。

このように対策の難しい「火落ち菌」であるが、乳酸菌が生産するペプチドである「バクテリオシン」によって殺菌されることが知られている<sup>1)</sup>。バクテリオシンには多くの種類があり、いずれも人の腸管の消化酵素で分解されるため、安全性の高い天然の保存料として期待されている。しかし、製剤として使用するためには、乳酸などの代謝物を除いて精製する必要があるため、食品添加物として販売されている精製品は1種類のみである<sup>2)</sup>。また、バクテリオシンを清酒製造所内に散布しても、影響を受けない微生物により分解されてしまうと予想されるため、抗菌性の薬剤として使用することは難しい。

そこで、バクテリオシンを生産する乳酸菌を清酒製造所内に存在させ、環境中でバクテリオシンを生産させながら「火落ち菌」を抑制することを考えた。乳酸菌を生育させれば、バクテリオシンを供給し続けることができるため、バクテリオシンの影響を受けない微生物により分解されるとしても、静菌効果が期待できる。また、乳酸菌を生育させることは、熱殺菌よりも火傷といった作業への負担が少なく、更に薬剤殺菌のように清酒への薬品臭の移行や排水設備への負担を考慮しなくてもよいから、清酒製造所には適すると考えられる。これらの背景に基づき、「火落ち菌」のようなアルコール耐性を持たず、かつ、静菌効果を有する乳酸菌の選抜と効果を検討したので報告する。

## 2. 実験方法と結果

## 2・1 火落ち菌に対して静菌性を示す乳酸菌の1次スクリーニング

MRS 寒天培地(ペプトン 10g, 肉エキス 10g, 酵母エキス 5g,  $K_2HPO_4$  2g, クエン酸二アンモニウム 2g, グルコース 20g, tween80 1g, 酢酸ナトリウム 5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.58g,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.28g, 寒天 15g, 水 1000ml)にMRS培地で28℃, 24時間培養した火落ち菌を100μl/100mlの濃度で添加したMRS寒天培地を重層し、火落ち菌含有プレートを作成した。作成したプレートの火落ち菌含有層にパスツールピペットで穴をあけ、MRS培地で28℃, 24時間培養した乳酸菌培養液200μlを満たした後、28℃で72時間培養した。培養後、乳酸菌培養液を満たした穴の周囲で火落ち菌の生育が抑制されたことにより発生するクリアゾーンの有無を、目視で確認した。火落ち菌は、市販清酒から分離した火落ち-4と酒類総合研究所から分譲された7菌株(SY-1~3, SY-7, SY-8, SY-12, SY-13)を使用した。乳酸菌は当所保有の16菌株(AN-14~18, AN-20, K-13, J-16~18, A-12, C-1, C-3, C-5, G-2, H-25)と市販の山麴仕込み用株(*L. sakei* 以下, L)を使用した。この市販菌L株は、清酒製造現場で既に使用されていることから、スクリーニングした乳酸菌の各性質を比較する対照として、後述の試験においても使用した。

結果は図1および表1に示すとおり。試験に供した火落ち菌に対して、クリアゾーンを形成する乳酸菌が多数あった。一方、火落ち菌SY-13に静菌性を示す乳酸菌は少なかった。検討に使用した乳酸菌の記号は「分離源-番号」となっており、いくつかの静菌性のパターンと分離源が同じ菌株は同一の菌である可能性が高いと考えられた。そこで、分離源・クリアゾーンの形成パターン・菌株の外観が異なり、かつ、多くの火落ち菌に静菌性を示したAN-14, AN-15, K-13, J-16, J-18, C-1の6菌株を選抜した。



図1 形成されたクリアゾーン

\* 企業支援部食品技術グループ

表1 乳酸菌によるクリアゾーンの形成

火落ち菌	乳酸菌																
	AN-14	AN-15	AN-16	AN-17	AN-18	AN-20	K-13	J-16	J-17	J-18	A-12	C-1	C-3	C-5	G-2	H-25	L
火落ち-4 <i>Lb. paracasei ssp paracasei</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
SY-1 <i>Lb. casei</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
SY-2 <i>Lb. hilgardii</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-
SY-3 <i>Lb. casei</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	±	-	-	±
SY-7 <i>Lb. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	±	-	-	±
SY-8 <i>Lb. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+	±	+	-	-
SY-12 <i>Lb. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
SY-13 <i>Lb. hilgardii</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: 幅1mm以上の明瞭なクリアゾーンを形成 ±: 幅1mm以下のクリアゾーンを形成 -: クリアゾーンを形成しない

表2 静菌性を示す乳酸菌のアルコール耐性

培地のアルコール濃度(%)	0					3					5					10					15				
	1	2	3	4	6	1	2	3	4	6	1	2	3	4	6	1	2	3	4	6	1	2	3	4	6
AN-14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-
AN-15	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-
K-13	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	±	±	±	±	-	-	-	-	-
J-16	+	+	+	+	+	-	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-18	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-	-	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-1	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-
L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-

+: 生育 ±: わずかに生育 -: 生育しない

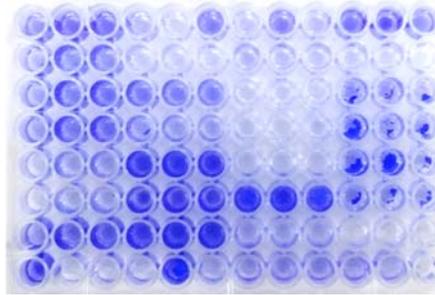
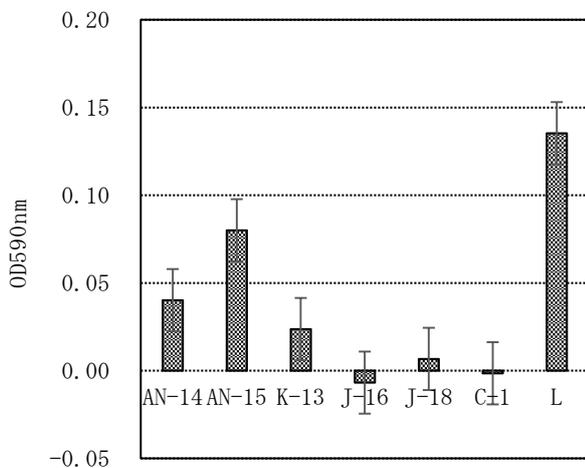
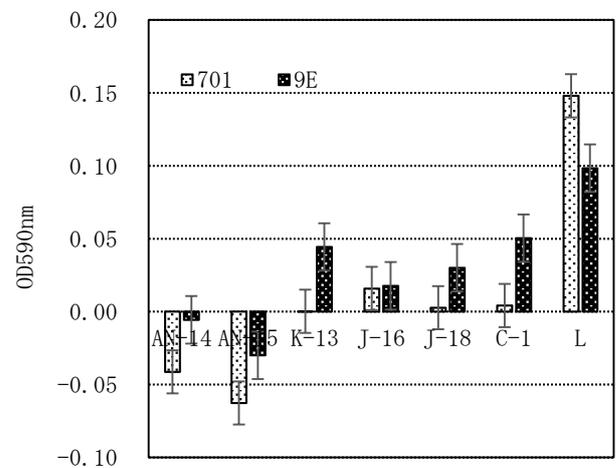


図2 染色されたバイオフィーム



静菌性を示す乳酸菌



静菌性を示す乳酸菌

図3 乳酸菌を単独で培養した場合のバイオフィーム量

図4 乳酸菌を酵母と共培養した場合のバイオフィーム量

## 2・2 火落ち菌に対して静菌性を示す乳酸菌の2次スクリーニング

火落ち菌に静菌性を示す乳酸菌を清酒製造所に存在させると、清酒製造タンク内に混入する可能性が高くなる。さらに、混入した乳酸菌がアルコール耐性を有すると、新たな火落ち菌となる。また、乳酸菌は、単独もしくは酵母と共培養することにより、洗浄が難しいバイオフィームを形成することが知られている<sup>3, 4)</sup>。これらの理由から、清酒製造所に存在する乳酸菌は、アルコールに弱く、バイオフィームを形成しない性質であることが重要である。そこで、火落ち菌に静菌性を示す乳酸菌のアルコール耐性およびバイオフィーム形成量を指標としたスクリーニングを行った。

### 2・2・1 アルコール耐性試験

アルコール濃度を0, 3, 5, 10, 15%に調製したMRS培地に乳酸菌前培養液を2%の濃度で添加し、28℃で6日間培養した。

結果は表2に示すとおり、アルコール濃度3および5%ではいずれの菌株も2~4日でアルコール濃度0%の培地と同程度に増殖した。アルコール濃度10%ではJ-16およびJ-18は増殖しなかった。AN-14, AN-15, K-13は1~2日でわずかに増殖し、それ以降、増殖しなかった。C-1は6日目に増殖した。アルコール濃度15%ではいずれの菌株も増殖しなかった。

### 2・2・2 乳酸菌のバイオフィーム形成試験

乳酸菌の前培養液を0.1%添加したMRS培地を96穴プレートに200 $\mu$ l分注し、28℃で72時間培養した後、培地を除去し、各穴をイオン交換水300 $\mu$ lで2回洗浄した。次に、形成されたバイオフィームを0.1%ゲンチアナバイオレット100 $\mu$ lで20分間染色した。染色されたバイオフィームは図2のとおり。更に各穴の染色液の除去とイオン交換水300 $\mu$ lによる洗浄を2回行った後、ジメチルスルホキシド350 $\mu$ lで20分間、バイオフィームに吸着された色素を抽出、抽出液の吸光度(590nm)をバイオフィーム量とした<sup>5)</sup>。

結果は図3に示すとおり、AN-14, AN-15, K-13, J-18がバイオフィームを形成したものの、清酒製造現場で使用されているLの形成量より少なかった。

### 2・2・3 酵母と共培養した場合のバイオフィーム形成試験

2・2・2で示した方法の最初の培養の際に酵母の前培養液を5%添加し、共培養した場合のバイオフィーム形成試験を行った。バイオフィーム量は、共培養した場合の吸光度から各菌株を単独培養した吸光度を引くことで、共培養により増加した量を評価した。酵母は山口県内で広く使用されるきょうかい701号と山口県独自酵母9Eを使用した。

結果は図4に示すとおり、701号との共培養によりJ-16のバイオフィーム量がわずかに増加した。一方、9Eとの共培養において、K-13, J-16, J-18, C-1のバイオフィーム量が増加したものの、Lの増加量よりは少なかった。

### 2・2・4 2次スクリーニングの結果

火落ち菌に静菌性を示す6菌株のうち、アルコール耐性がLと同程度であり、かつ、バイオフィームの形成量が少なかったK-13, J-16, J-18の3菌株が清酒製造現場へ存在させることに適すると考えられた。なお、酵母と共培養することによって形成されるバイオフィーム量については、酵母による差が興味深かったため、きょうかい7, 9, 901, 11, 14, 1401号を使用した試験も行った。バイオフィーム形成の差には酵母の性質(泡の有無, K7グループなど)が関与していると推測していたが、傾向を見出すことはできなかった。

### 2・3 火落ち菌に対して静菌性を示す乳酸菌のアルコール耐性

2次スクリーニングでは、乳酸菌前培養液を各アルコール濃度のMRS培地に添加してアルコール耐性を評価した。しかしながらこの方法では、発酵によりアルコール濃度が徐々に高くなる清酒タンク内におけるアルコール耐性を評価できていない。そこで、より実際の生育条件に近くなるよう、培地のアルコール濃度を段階的に上げた場合の増殖

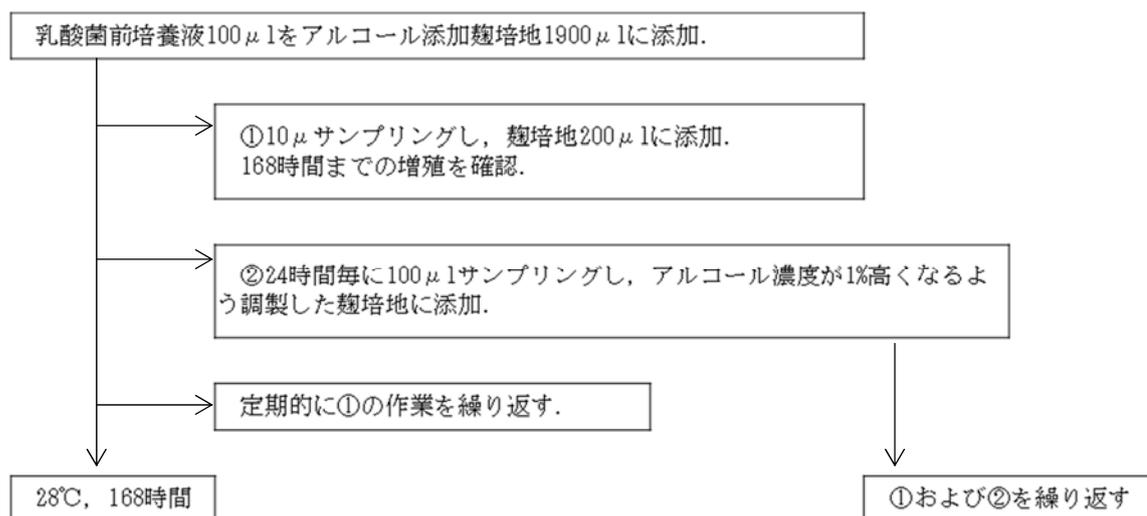


図5 培地中のアルコール濃度を段階的に高くする試験方法

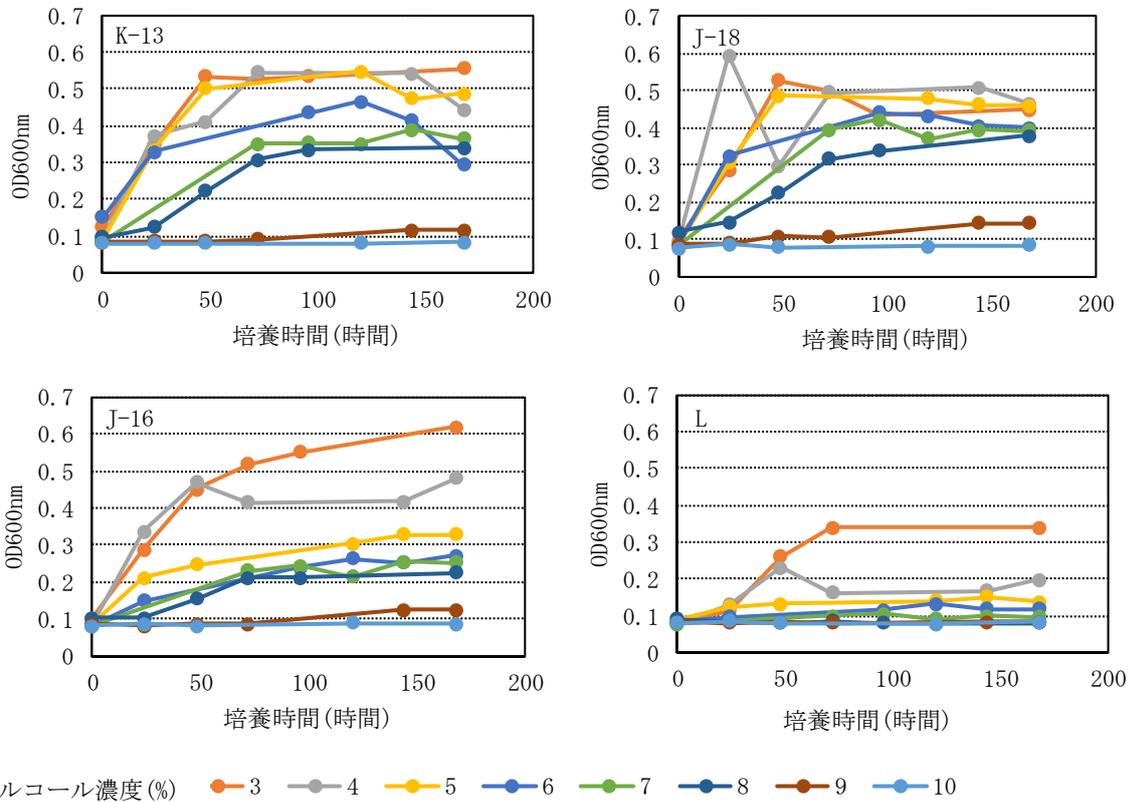


図6 各アルコール濃度における乳酸菌の増殖

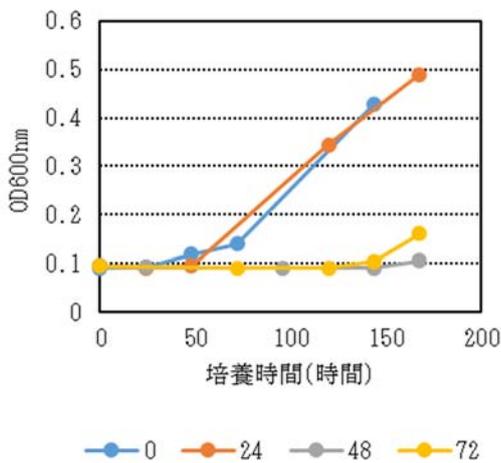


図7 アルコール濃度 9%の麴培地で各時間培養した L の麴培地における増殖

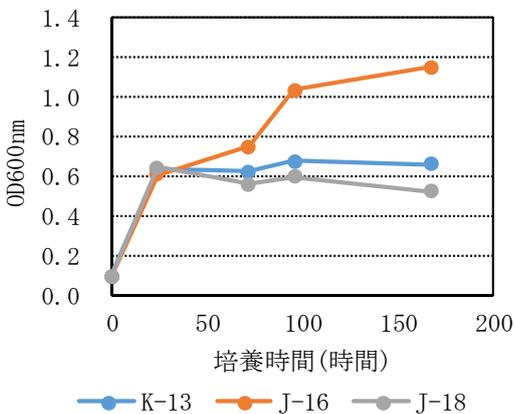


図8 アルコール濃度 10%の麴培地で 120 時間培養した K-13, J-16 および J-18 の麴培地における増殖

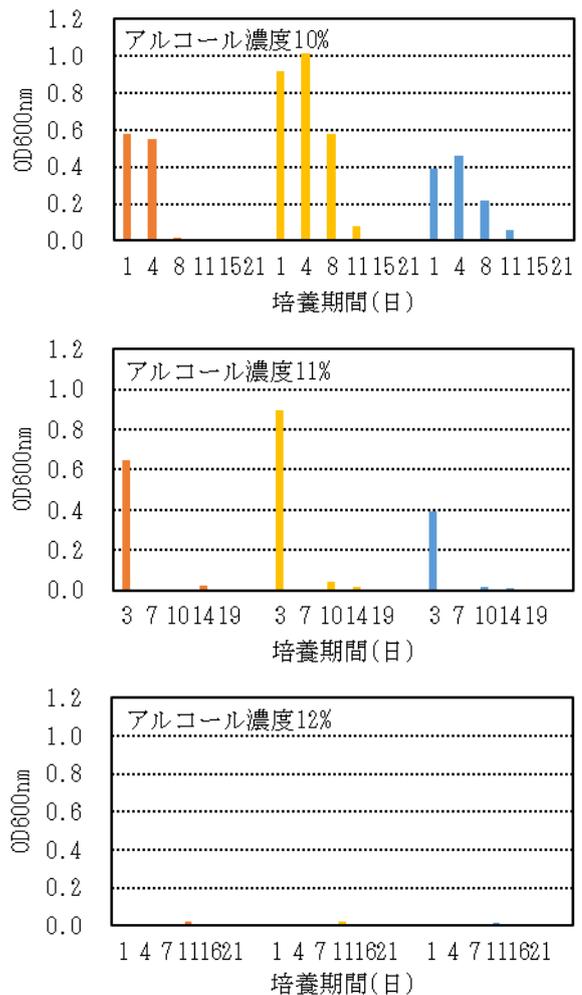


図9 各アルコール濃度における乳酸菌の生存

を確認した。また微生物には、生育に適さない環境下では増殖を中止し、適する環境に変化することにより再度増殖を開始する性質がある。清酒タンク内に混入した乳酸菌が生存し続けると、同じタンクを使用して行う次回の製造に影響を及ぼす可能性があることから、増殖しなかったアルコール濃度における乳酸菌の生存も確認した。

2・3・1 アルコール濃度を3~10%に変化させた場合の増殖と生存

図5に示すとおり、低アルコール濃度の麹培地(乾燥麹360gに1500mlの水を加え55℃、5時間糖化させたろ液を、ポーメ6.0に合わせる)を用いて乳酸菌を28℃、24時間培養し、アルコール濃度を1%高くした麹培地に植え継ぐこと

により、段階的にアルコール濃度が高くなる環境の試験とした。アルコール濃度は2・2・1において全ての乳酸菌が生存することを確認している3%より開始し、10%まで高めた。菌体量の変化はOD660nmの吸光度で確認した。生存は各アルコール濃度で培養した菌体をアルコール濃度0%の麹培地に添加・培養し、増殖の回復により確認した。増殖が回復しない場合は死滅したと判断した。

増殖の結果は図6に示すとおり、K-13、J-16、J-18はアルコールの濃度が9%以上、Lは4%以上になると増殖しなかった。Lの生存の結果は図7に示すとおり、アルコールの濃度が9%の麹培地で48時間培養すると死滅した。K-13、J-16、J-18の生存は図8に示すとおり、いずれもアルコー

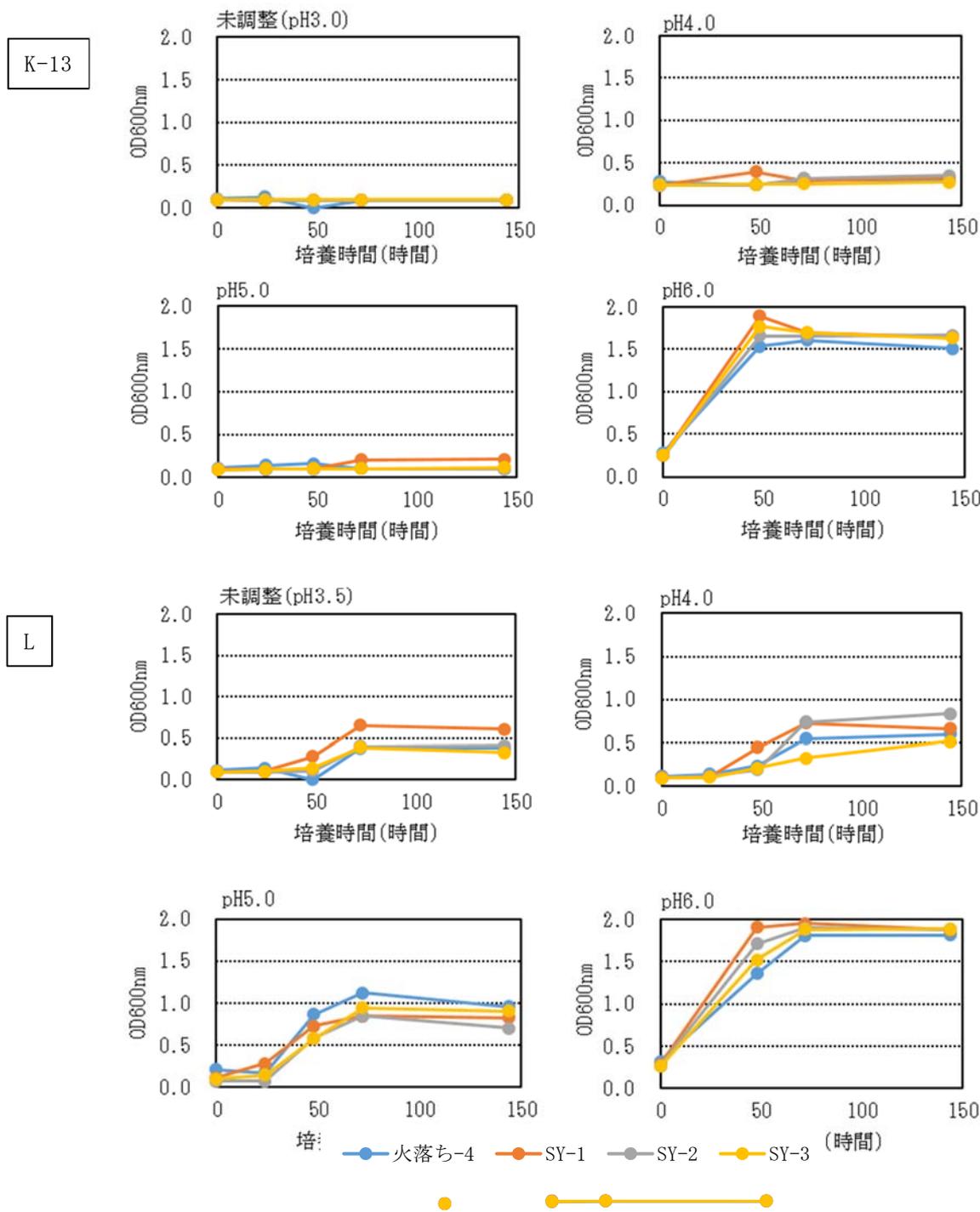


図10 乳酸菌培養上清における火落ち菌の増殖

表3 小仕込み試験の配合

	酒母・初添	仲添	留添	合計
総米(g)	230	320	450	1,000
$\alpha$ 化米(g)	170	260	370	800
乾燥麴(g)	60	60	80	200
汲み水(ml)	250	450	600	1,300

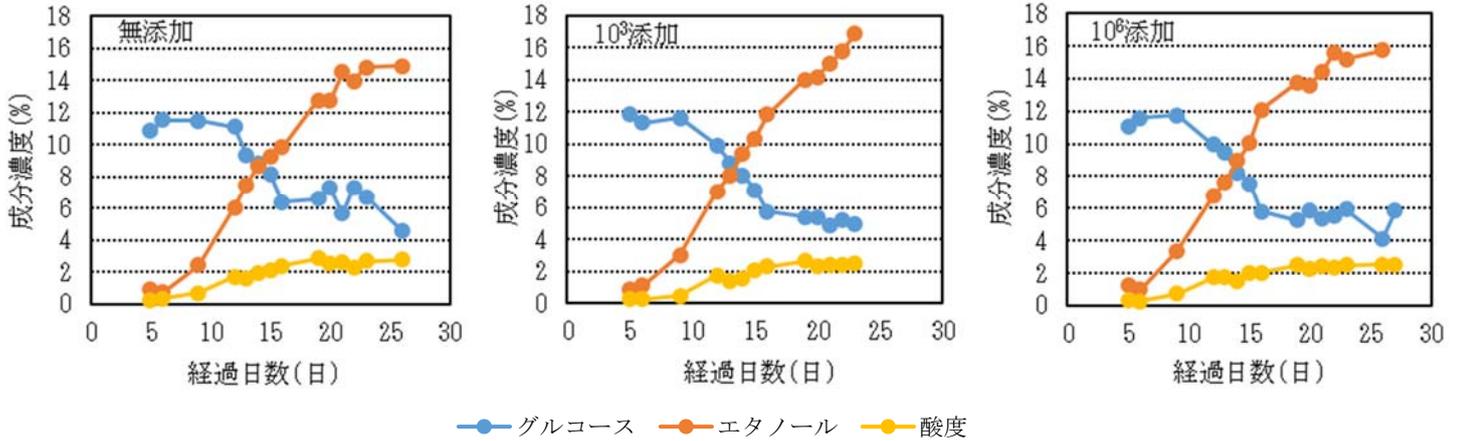


図 11 乳酸菌 J-16 株の添加量が異なる小仕込み

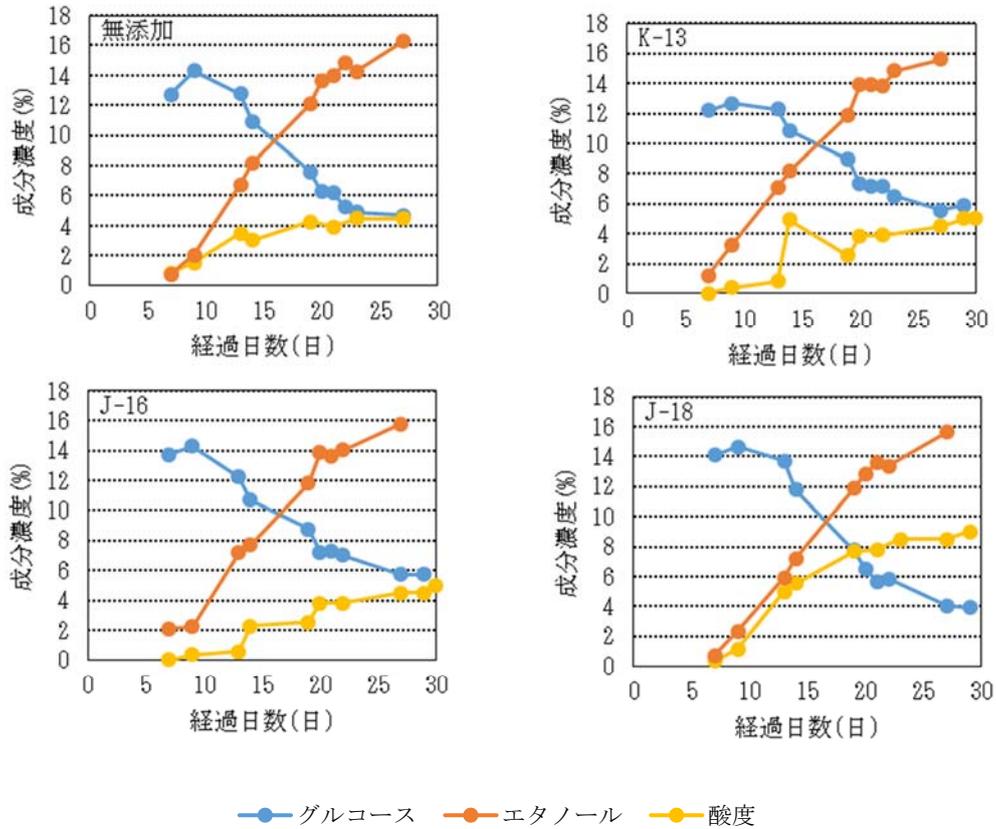


図 12 小仕込みにおける各成分濃度の変化

表4 生成酒の官能評価結果

	菌株	評価	コメント
上槽後1か月	-	2.6	4VG, 酸浮く, 苦味, 麴臭
	K-13	2.3	酸味, 苦味, 4VG, きれい, 渋い, 酸臭, 汗臭
	J-16	2.0	酸, 苦味, 生老, アセトアルデヒド, 4VG, 酢エチ
	J-18	3.0	酸味強い, 麴臭, 4VG, 酸臭, ジアセチル, 汗臭
上槽後9か月	-	2.3	麴臭, 4VG, カビ, 苦味, 酸臭, 生老, アルデヒド, 味丸い
	K-13	2.3	紙臭, アルデヒド, 酸味強い, 甘い, 渋味
	J-16	2.5	酸味強い, 苦味強い, アルデヒド, 酸臭, 酢エチ
	J-18	2.8	酸味, 酸臭, 苦味, アルデヒド

ル濃度 10%・120 時間の培養では死滅しなかった。

#### 2・3・2 アルコール濃度 10~15%環境下での生存

2・3・1 の補足として、アルコール濃度 10%以上の麴培地で生存していた乳酸菌が何日目まで死滅するかを確認した。

結果は図 9 に示すとおり、K-13 はアルコール濃度 10%で 11 日以上、アルコール濃度 11%で 7 日以上、アルコール濃度 12%以上で 1 日以上培養すると死滅することが分かった。J-16 および J-18 はアルコール濃度 10%で 15 日以上、アルコール濃度 11%で 7 日以上、12%以上で 1 日以上培養すると死滅することが分かった。

#### 2・4 静菌性を示す乳酸菌の特性

乳酸菌が示す静菌性は、乳酸などによる pH の低下と静菌性ペプチドであるバクテリオシンによるものが知られている。そこで、K-13, J-16, J-18 の示す静菌性がいずれによるものかを確認するために、0.20 μm のフィルターでろ過した各乳酸菌株の麴培地培養上清に火落ち菌を添加し、増殖を確認した。乳酸菌株の培養上清は pH が 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 になるよう調製した。火落ち菌は属と被静菌効果が異なる 4 菌株(火落ち-4, SY-1, SY-2, SY-3)を使用した。

結果、K-13, J-16 および J-18 の培養上清は同様の傾向を示したため、図 10 のとおり K-13 のみを示す。いずれも pH 未調整(pH3.0)~5.0 で増殖せず、pH6.0 で増殖した。L の培養上清については、pH 未調整(pH3.5)~4.0 で弱い増殖、pH5.0 以上で増殖が見られた。これらのことから、K-13, J-16, J-18 の静菌性は pH のみによるものではなく、バクテリオシンが関与していると推測された。

#### 2・5 小仕込み試験

K-13, J-16, J-18 が清酒製造タンクに混入することを想定し、小仕込み試験を行った。配合は表 3 のとおり。酵母はきょうかい 701 号を使用した。

##### 2・5・1 火落ち菌に対して静菌性を示す乳酸菌の添加量の検討

清酒の製造において、麴などから混入する乳酸菌数は  $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$  個と言われている。そこで、J-16 の添加量  $1.0 \times 10^3$  および  $1.0 \times 10^6$  個小仕込みを行い、添加する乳酸菌の量を検討した。

結果は図 11 に示すとおり、乳酸菌を無添加と比べ、いず

れの仕込みもグルコースおよびエタノールの濃度、酸度の変化には差がなかった。

#### 2・5・2 小仕込み試験

2・5・1 の結果を踏まえ、より過酷な条件となるよう、 $1.0 \times 10^7$  個の乳酸菌を添加して試験を行った。

結果は図 12 に示すとおり、グルコースの減少とアルコールの増加から、いずれの仕込みにおいても、アルコール発酵における差はみられなかった。一方、酸度の上昇については J-18 を添加した仕込みの上昇が早く、無添加区、K-13 および J-16 の生成酒の酸度が 4~5 であったのに対し、9 であった。また、これら生成酒の官能評価を 4 名で行った結果を表 4 に示す。乳酸菌に起因するオフフレーバー(ジアセチルなど)について、上槽後 1 か月では J-18 を使用した酒に指摘があったが、9 か月では指摘されなかった。味について K-13 および J-16 は、無添加と同様に酸味を指摘され、J-18 は強い酸味を指摘された。

### 3. 結 言

火落ち菌に静菌性を示す乳酸菌をスクリーニングし、アルコール耐性およびバイオフィーム形成量を確認した。その結果、アルコール濃度 9%以上では増殖せず、きょうかい 701 号酵母との共培養でバイオフィームが増加しない K-13, J-16, J-18 が選抜された。これらの乳酸菌は乳酸による pH 低下とバクテリオシンの生産により、火落ち菌を静菌していると考えられた。

また K-13, J-16, J-18 は清酒製造時に麴などから混入する乳酸菌数以上の量を小仕込み試験に添加しても、アルコール発酵への影響はなかった。生成酒について、K-13, J-16 を使用したものについては乳酸菌に起因するオフフレーバーの指摘がなく、コントロールと同程度の酸度であった。一方、J-18 を使用したものについては上槽後 1 か月でジアセチルを指摘され、また、酸度 9 であったため、清酒製造現場での使用には適さないと考えられた。

以上の検討により、火落ち菌に静菌性を示し、かつ、清酒の製造に影響を与えない乳酸菌 K-13 および J-16 を分離した。この乳酸菌を殺菌の難しい清酒製造所内の床や排水溝に存在させることにより、製品、作業員および排水施設に負担をかけることなく火落ち菌のリスクを下げるこ

可能になると期待される。

#### 参考文献

- 1) 吉田和司：乳酸菌抗菌性ペプチド「バクテリオシン」の清酒醸造への利用，醸協，**88**(7)，p. 512-516(1993)．
- 2) 指原紀宏，菌元謙二，石崎文彬：乳酸菌の生産するバクテリオシン，科学と生物，**38**(7)，p. 439-446(2000)．
- 3) 野白喜久雄，百瀬洋夫：火落ちに関する研究(第1報)火落菌の分離，醸協，**65**(8)，p. 715-719(1970)．
- 4) 森永康，平山悟，古川壮一：伝統発酵にみる微生物の共生と進化，*Jpn. J. Lactic Acid Bact*，**26**(2)，p. 101-108(2015)．
- 5) 森川正章：バイオフィルムを調べてみよう，生物工学，**90**(5)，p. 246-250(2012)．