

焼酎もろみ中の乳酸菌分布

竹下 淳子*¹・工藤 哲三*²・山本 英樹*²・水谷 政美*²・柏田 雅徳*²

Distribution of Lactic Acid Bacteria in Shochu Mash

Junko TAKESHITA, Tetsuzo KUDO, Hideki YAMAMOTO,
Masami MIZUTANI and Masanori KASHIWADA

焼酎もろみ中の乳酸菌は、もろみ、果ては製品にまで影響を与えていると考えられる。その影響を調べるため、宮崎県内の焼酎もろみから乳酸菌を分離し、また、もろみの成分分析を行い、焼酎もろみ中の乳酸菌分布ともろみ成分との関係を検討した。焼酎もろみからの乳酸菌分離培地にはMRS、GYP培地が適しており、多数の分離株の中から65株を選定した。酸度が高い一次もろみ、アルコール濃度が高い蒸留前二次もろみでは乳酸菌数が少ないという傾向が見られた。

キーワード：焼酎もろみ、乳酸菌、酸度、有機酸

1 はじめに

乳酸菌は古来より発酵乳、漬物、味噌、醤油などの発酵食品製造に利用されてきた。最近、食生活の欧米化などにより、腸内環境悪化が原因の生活習慣病が急増している。そのため腸内細菌の改善作用を持つといわれる乳酸菌がより注目されている。

乳酸菌は、本県特産の焼酎もろみ中にも生育していることが知られており、これまで、その性質についてのいくつかの報告がある。^{1)~6)}

焼酎もろみ中の乳酸菌分布は、焼酎もろみ成分と何らかの関係がある、また、乳酸菌が焼酎もろみに何らかの影響を与えていると考え、焼酎もろみから乳酸菌を分離し、その分布と焼酎もろみ成分との関係を検討した。

2 実験方法

2-1 焼酎もろみの採取

県内焼酎製造メーカーから焼酎もろみ（芋、麦、米、一次、二次）をオートクレーブ済みの容器に採取し、冷蔵しつつ持ち帰った。（13社、24もろみ）

* 1 非常勤職員
* 2 応用微生物部

2-2 乳酸菌分離培地の選定

採取した焼酎もろみを、オートクレーブ済みの0.05%トリトンX-100で適宜希釈し、YAS（日本醸造協会、YAS4.0%、Bacto Agar1.5%）+CaCO₃、BCG（日本醸造協会、BCG4.0%、Bacto Agar1.5%）、MRS（Difco、MRS 5.5%、Bacto Agar 2.0%、シクロヘキサミドとアジ化ナトリウムを10ppmになるように添加）、GYP（表1、シクロヘキサミドとアジ化ナトリウムを10ppmになるように添加）の4種の寒天平板培地に100μlずつ塗抹し、嫌気ジャー（三菱ガス化学株式会社、Anaero Pack・ケンキ、Anaero Pack・角型ジャー）を

表1 GYP培地の組成

D-glucose	1.0%
yeast extract	1.0%
poly peptone	0.5%
meat extract	0.2%
Na-acetate・3 H ₂ O	0.2%
Salts solution* ¹	0.5ml
Tween80 solution* ²	1.0ml
Bacto Agar	1.2%

*¹ Salts solution 1 ml中
MgSO₄・7 H₂O 40mg
MnSO₄・4 H₂O 2 mg
FeSO₄・7 H₂O 2 mg
NaCl 2 mg

*² Tween80 solution
= 50mg/ml水溶液

用いて、28℃で2、3日培養を行った。培養後、出現コロニー数計測、コロニー出現の様子を観察することで分離に適する培地を選定した。

2-3 焼酎もろみからの乳酸菌分離、菌数計測

2-2で選定したMRS、GYP寒天平板培地を用いた。0.05%トリトンX-100で適宜希釈した焼酎もろみを寒天平板培地に100 μ lずつ塗抹し、嫌気ジャーを用いて、28℃で2、3日培養を行った。培養後、出現コロニー数を計測して乳酸菌数を求めた。

得られたコロニーを再度0.05%トリトンX-100で希釈した後、寒天平板培地に塗抹し、同様に嫌気培養して純化した。

2-4 焼酎もろみ中の酵母数計測

2-3で希釈した焼酎もろみを、YPD寒天平板培地 (yeast extract 1.0%、poly peptone 2.0%、D-glucose 2.0%、Bacto Agar 2.0%) に100 μ l塗抹し、28℃で2、3日培養を行った。培養後、出現コロニー数を計測して酵母数を求めた。

2-5 焼酎もろみの分析

採取した焼酎もろみを4℃、3000rpmで15分間遠心分離し、その上澄みを試料とした。アルコール濃度 (理研計器、アルコメイト・AL-2型使用)、酸度 (N/10 NaOHによる滴定)⁷⁾、pH (pHメーター使用)、有機酸 (島津製作所、高速液体クロマトグラフ・有機酸分析システム使用) 分析を行った。

3 実験結果

3-1 採取した焼酎もろみの種類

表2に今回採取した焼酎もろみの種類を示す。芋の一次もろみはすべて米を使用していた。

表2 採取した焼酎もろみの種類

	一次	二次	計
芋	3	11	14
麦	1	5	6
米	2	2	4
計	6	18	24

米の二次もろみのうち、一つは酒粕を添加したかすとり焼酎もろみのもろぶた部分である。

二次もろみはできるだけ蒸留前のもろみを採取

した。

3-2 乳酸菌分離培地の選定

図1に4種の培地での出現コロニー数を示す。MRS、GYP培地では、乳酸菌と思われる乳白

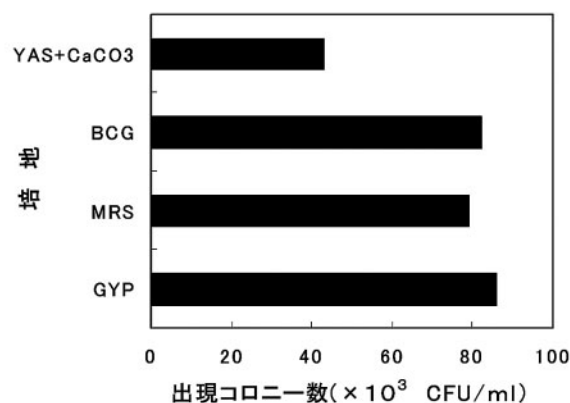


図1 各種培地での出現コロニー数

色のコロニーが出現した。YAS+CaCO₃培地は、特に日本酒麴の生酸菌数測定に用いられる⁸⁾が、他の培地に比べて出現コロニー数が少なかった。BCG培地では、乳白色のコロニーの他に酵母とみられる小さなコロニーが多数出現した。BCG培地には酵母の生育を抑制するアクチジオン、アジ化ナトリウムが含まれているが、今回はその効果がみられなかったようだ。

これらの結果より、焼酎もろみからの乳酸菌分離にはMRS、GYP培地が適していると判断した。

3-3 乳酸菌数、酵母数、焼酎もろみ分析値

図2に、乳酸菌数と酵母数との関係、図3に乳酸菌数と芋蒸留前二次もろみのアルコール濃度との関係、図4に乳酸菌数と酸度との関係、図5に乳酸菌数と乳酸量との関係を示す。

表3に焼酎もろみ中の酵母数、乳酸菌数、分離株名を、表4に焼酎もろみの成分分析値を示す。

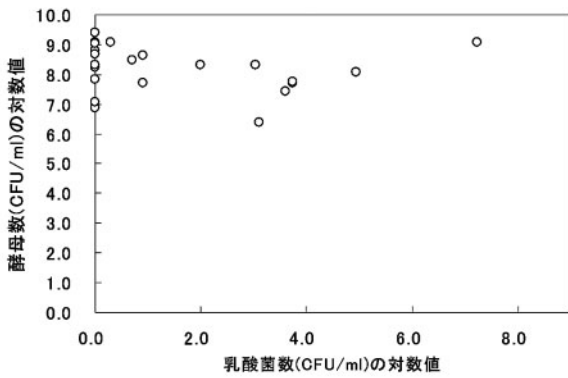


図2 乳酸菌数と酵母数との関係

酵母数が多いと乳酸菌数が少ないのではないかと考えたが、その傾向は見られなかった。

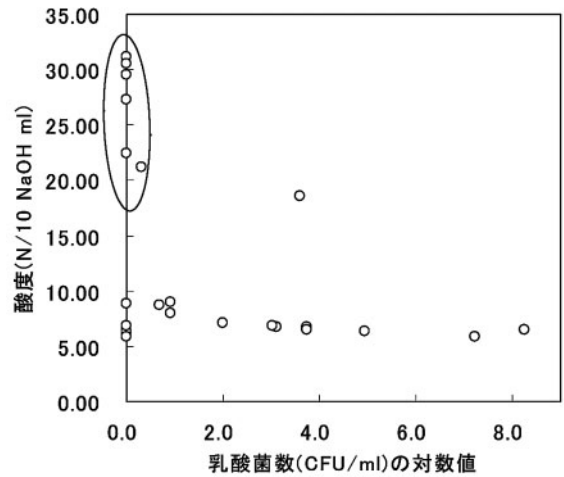


図4 乳酸菌数と酸度との関係

図4でまるで囲んであるのはいずれも一次もろみである。酸度が高いもろみでは乳酸菌数は少なかった。もろみ酸度が10より低いもろみでは乳酸菌が多く検出された。

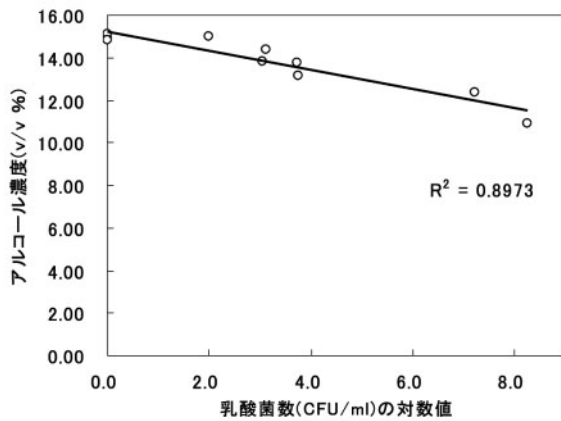


図3 乳酸菌数と芋・蒸留前二次もろみのアルコール濃度との関係

芋の蒸留前二次もろみでは、アルコール濃度が高いと乳酸菌数が少ない傾向にあった。

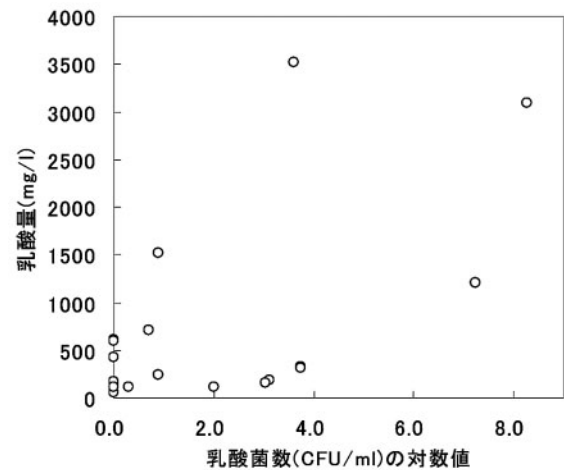


図5 乳酸菌数と乳酸量との関係

焼酎もろみ中の主要な有機酸であるクエン酸、乳酸、リンゴ酸量と乳酸菌数との関係を検討したが、今回、目立った関係は見られなかった。

乳酸菌数が多いとその生成物である乳酸量も多いが、その逆、つまり乳酸量が多いからといって乳酸菌数が多いわけではなかった。

表3 焼酎もろみ中の酵母数、乳酸菌数、分離株名

No.	事業所	採取日	もろみの種類			酵母数 (CFU/ml)	乳酸菌数 (CFU/ml)	分離株名	
3	C	2004/8/25	米	一次	4日目	1.1×10^9	nd		
4	C	2004/8/25	米	一次	5日目	1.2×10^9	100以下		
6	D	2004/9/9	麦	一次	4日目	2.4×10^9	nd		
11	F	2004/9/30	米	一次	5日目	1.7×10^8	nd		
12	F	2004/9/30	米	一次	6日目	7.0×10^7	nd		
20	K	2004/10/26	米	一次	4日目	1.1×10^9	nd		
①	K	2004/6/9	米	一次	2日目	未測定	3.5×10^6	LM-1,2,3,4,5	LG-1,2,3,4,5
7	D	2004/9/9	麦	二次	1日目	6.0×10^8	100以下	DM-1	
8	D	2004/9/9	麦	二次	3日目	3.0×10^8	100以下	DM-3	DG-1,2,3,4,5
21	L	2004/10/26	麦	二次	9日目	2.8×10^7	4.0×10^3		L'G-1
2	B	2004/8/10	麦	二次	10日目	4.2×10^8	100以下	BM-1,2,3,4	BG-1~8
1	A	2004/7/8	麦	二次	蒸留前	1.2×10^8	8.6×10^4	AM-1,2,3,4,4'	AG-1,2,3,4
22	L	2004/10/26	米	二次	10日目	5.0×10^7	100以下	L'M-2	L'G-3
15	H	2004/10/12	米	二次	蒸留3日前	4.6×10^8	nd		
5	C	2004/8/25	芋	二次	3日目	1.2×10^9	nd		
13	G	2004/10/3	芋	二次	8日目	5.0×10^7	5.4×10^3	GM-1,2	GG-1,2,3,4
14	G	2004/10/3	芋	二次	9日目	2.5×10^6	1.3×10^3	GM-3,4	GG-5,6
16	I	2004/10/13	芋	二次	9日目	5.6×10^7	5.6×10^3	IM-1,2	IG-1,2
17	I	2004/10/13	芋	二次	9日目	2.1×10^8	1.1×10^3	IM-3,4	IG-4
18	J	2004/10/13	芋	二次	9日目	2.1×10^8	nd		
19	J	2004/10/13	芋	二次	9日目	2.0×10^8	100以下	JM-1	
23	M	2004/11/1	芋	二次	9日目	1.2×10^9	1.7×10^7	MM-1	MG-1
24	M	2004/11/1	芋	二次	10日目	1.2×10^9	1.8×10^8	MM-2	MG-2
9	E	2004/9/11	芋	二次	11日目	7.2×10^6	nd		
10	E	2004/9/11	芋	二次	12日目	1.2×10^7	nd		

もろみNo.15 : かすとり焼酎もろみのもろぶた。酵母数は、CFU/g。

焼酎もろみから $1.0 \times 10^0 \sim 1.8 \times 10^8$ (CFU/ml)の乳酸菌を分離した。コロニーの色、形態から65株を選定した。

選定した65株は、純化後、CaCO₃添加（糖濃度の1/2重量%添加）のMRS、GYP高層培地へ穿刺して冷蔵保存（3ヶ月ごとに継代培養している）、また、10%グリセリンに懸濁して-80℃にて保存している。

表4 焼酎もろみの成分分析値

No.(原料)	事業所	alc v/v %	pH	有機酸 (mg/l)					
				酸度	クエン酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸
2(麦)	B	17.0	3.97	8.92	2166	435	938	1146	87
21(麦)	L	14.0	3.94	8.61	3455	613	1872	3707	501
7(麦)	D	6.1	3.4	8.82	5071	125	365	0	120
8(麦)	D	13.3	3.77	8.73	3330	501	547	165	120
22(米)	L	16.5	4.34	7.96	3115	245	357	259	188
5(芋)	C	14.9	4.01	6.28	2896	850	480	119	203
9(芋)	E	15.0	4.27	6.35	2426	572	410	82	361
10(芋)	E	15.1	4.32	5.81	2496	654	410	165	361
13(芋)	G	13.8	4.18	6.78	3394	858	593	330	181
14(芋)	G	14.4	4.18	6.67	2396	531	319	165	120
16(芋)	I	13.2	4.25	6.45	3394	818	410	247	241
17(芋)	I	13.8	4.22	6.88	2296	491	228	165	120
18(芋)	J	14.8	4.11	6.88	1995	388	223	43	125
19(芋)	J	15.0	4.1	7.09	3991	777	446	86	188
23(芋)	M	12.4	4.2	5.81	3309	82	624	1293	250
24(芋)	M	10.9	4.01	6.45	1947	82	446	3535	438

4 まとめ

焼酎もろみからの乳酸菌分離を行い、乳酸菌分布と焼酎もろみ成分との関係を検討した。

- 1) 焼酎もろみからの乳酸菌分離にはMRS、GYP培地が適していた。
- 2) 酸度が高い一次もろみでは乳酸菌数は少なかった。
- 3) アルコール濃度が高い蒸留前二次もろみでは乳酸菌数は少なかった。
- 4) 焼酎もろみから $1.0 \times 10^0 \sim 1.8 \times 10^8$ (CFU/ml) の乳酸菌を分離し、65株を選定した。

5 参考文献

- 1) 田邊幾之助他, 鹿大農学術報告, 第32号, p69-77(1982)
- 2) 田邊幾之助他, 鹿大農学術報告, 第33号, p47-52(1983)
- 3) 田邊幾之助他, 鹿大農学術報告, 第34号, p45-57(1984)
- 4) 高宮義治, 醸協, 第77巻, 第12号, p907-910(1982)

5) 百瀬洋夫, 内山奈々, 藤原寛子, 醸協, 第92巻, 第6号, p452-457(1997)

6) AKIHITO E., SANAE O., *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, Vol.99, No.3, p216-221(2005)

7) 注解編集委員会; 第四回改正 国税庁所定分析法注解, 財団法人日本醸造協会, p230

8) 注解編集委員会; 第三回改正 国税庁所定分析法注解, 財団法人日本醸造協会, p308

9) 小崎道雄, 内村泰, 岡田早苗; 乳酸菌実験マニュアル-分離から同定まで-, 朝倉書店(1992)

10) 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(1996)

謝辞

本研究を行うに際して、もろみ採取にご協力いただいた焼酎製造メーカーの皆様に、深く感謝いたします。