

## 焼酎もろみ中の乳酸菌（第2報）

高山 清子\*<sup>1</sup>・工藤 哲三\*<sup>1</sup>・水谷 政美\*<sup>1</sup>・山本 英樹\*<sup>1</sup>・柏田 雅徳\*<sup>2</sup>

Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Shochu Mash

Kiyoko TAKAYAMA, Tetsuzo KUDO, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO  
and Masanori KASHIWADA

焼酎もろみから分離・保存している乳酸菌<sup>1,2)</sup>について、プライマーを変えて遺伝子解析の追加試験を行った（16S-23S rDNA解析）。また、焼酎もろみ中に生育する乳酸菌の性質の調査を目的として、それらの乳酸菌の耐アルコール試験、初発pH試験を行った。その結果、焼酎もろみ中に生育する乳酸菌は、幅広いpH、高いアルコール濃度で増殖した。

キーワード：焼酎もろみ、乳酸菌、16S-23S rDNA解析、耐アルコール、初発pH

### 1 はじめに

焼酎は南九州の特産品として注目されている。焼酎の製造工程で使用される白麹および黒麹菌により生成されるクエン酸は、もろみのpHを下げる働きがある。その結果として温暖な気候の下でも雑菌の汚染を防ぎ、安定なアルコールの発酵を可能にする。今回は、高酸度、高アルコール濃度の焼酎もろみに生育している乳酸菌の特性調査を行った。

### 2 実験方法

#### 2-1 供試菌株

供試菌株は県内焼酎もろみより分離、培養した乳酸菌（菌株No.25, 10, 11, 23, 15, 24, 41, 48, 102）を用いた。比較として用いたType strainは、(独)理化学研究所（JCM）から入手した（表1）。

#### 2-2 16S-23S rDNA解析

乳酸菌の遺伝子解析においては、16S rDNAとその直後にある23S rDNAとの遺伝子間領域（intergenic spacer region）の塩基配列で多くの菌群が分類可能であるという報告がある<sup>3)</sup>。抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCRにより

表1 Type strain

JCM 8130	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
JCM 1171	<i>L. paracasei ssp. tolerans</i>
JCM 1115	<i>L. buchneri</i>
JCM 1162	<i>L. parabuchneri</i>
JCM 1149	<i>L. plantarum</i>
JCM 1558	<i>L. pentosus</i>
JCM 1173	<i>L. fermentum</i>
JCM 1059	<i>L. brevis</i>
JCM 1155	<i>L. hilgardii</i>
JCM 8797	<i>P. acidilactici</i>
JCM 5889	<i>P. parvulus</i>

16S-23S間のrDNAを増幅した後（primer16-1A, 5'-GAATCGCTAGTAATCG-3', 23-1B, 5'-GGGTTCCCCCATTCGGA-3'）塩基配列を解析した。PCR、サイクルシーケンスにはGene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, U.S.), DNAシーケンスにはABI PRISM 310TM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.)を使用した。

#### 2-3 耐アルコール試験

アルコール濃度（%）：0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5となる10種類のGYP液体培地

\*1 応用微生物部

\*2 現 食品開発センター所長兼食品開発部長

を調製し、十分に生育した前培養液を1滴接種後、30°Cで3日間培養した。増殖の程度は、肉眼および濁度 (OD<sub>660</sub>) 測定により判定した<sup>4)</sup>。

### 2-4 初発pH試験

各種pH条件 (pH 3.3, 3.5, 3.9, 4.4, 5.8, 7.5, 8.1, 8.6, 9.4, 9.8) の10種のGYP液体培地を調製し、十分に生育した前培養液を10倍希釈したものうち1滴を接種後、30°Cで3日間培養した。増殖の程度は、肉眼での判定および濁度 (OD<sub>700</sub>) 測定により判定した<sup>4)</sup>。また、分離株で最も多く見られた *L. paracasei* ssp. *tolerans*/*L. paracasei* ssp. *paracasei* についてはBIO-PHOTORECORDER (ADVANTEC TN-2612) を用いて増殖度を調べた。

## 3 結果および考察

### 3-1 16S-23S rDNA解析

前報<sup>1)</sup>に示したように、ほとんどの株は16S rDNA解析で同定できたが、2株については同定できなかった。この2株について16S-23S rDNA解析をおこなった結果、Type strain (JCM1171 *L. paracasei* ssp. *tolerans*, JCM8130 *L. paracasei* ssp. *paracasei*) の塩基配列と一致したことから、*L. paracasei* ssp. *tolerans*/*L. paracasei* ssp. *paracasei*と同定した。

### 3-2 耐アルコール試験

耐アルコール試験の結果、増殖が確認された試験区までを矢印で示す (図1)。

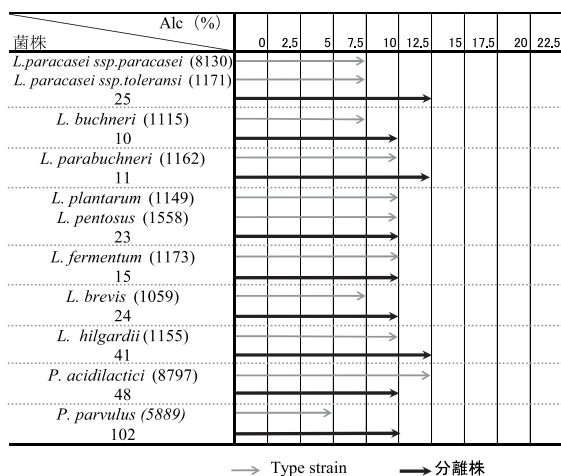


図1 耐アルコール試験結果

下段の数字のみのものは、焼耐もろみから分離した菌株であり、上段には比較としてType strainを示した。その結果、分離株No.25, 10, 11, 24, 41, 102はそのType strainに比べて高いアルコール濃度でも増殖した。焼耐もろみに生育する乳酸菌は、アルコール濃度の高い焼耐もろみで生育することにより、アルコール耐性を獲得したものと考えられた。

### 3-3 初発pH試験

初発pH試験の結果、増殖が確認された試験区を矢印で示す (図2)。下段の数字のみのものは、焼耐もろみから分離した菌株であり、上段には比較としてType strainを示した。その結果、分離株No.25, 15, 24, 41, 102はそのType strainに比べ、低いpH下で増殖した。焼耐もろみは、麴菌の生産するクエン酸によりpHが低く保たれている。したがって、このような生育環境で生育する乳酸菌は、耐酸性を獲得したと考えられた。

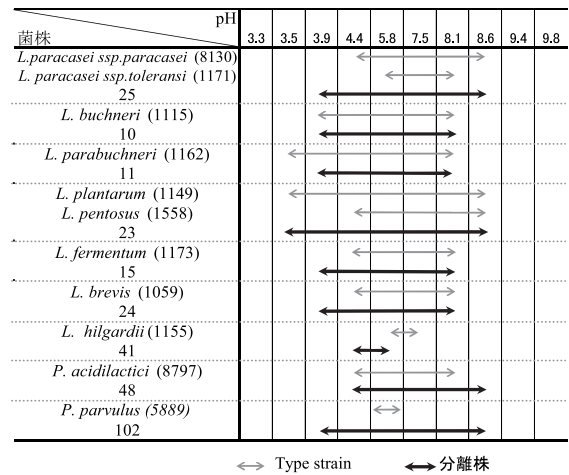


図2 初発pH試験結果

また、焼耐もろみから分離した乳酸菌65株中30株が*L. paracasei* ssp. *tolerans*/*L. paracasei* ssp. *paracasei*であった<sup>1)</sup>。そこで、分離株No.25 (*L. paracasei* ssp. *tolerans*/*L. paracasei* ssp. *paracasei*) についてBIO-PHOTORECORDER (ADVANTEC TN-2612) を用いて増殖度を調べた。各種pH条件 (pH 3.9, 4.3, 5.6, 7.6, 8.1, 8.5) のGYP液体培地を用意した。十分に生育した前培養液を10倍希釈したものうち1滴を接種後、

28℃で静置培養し、30分間隔で経時的に培養液の濁度を測定した。その増殖曲線を図3に、誘導期、比増殖速度、および定常期の濁度 (OD<sub>max</sub>) を表2に示す。その結果、pHの違いにより、誘導期、増殖速度、定常期の濁度に差がみられた。pH5.6、7.6の試験区では、他の試験区に比べ誘導期の値が小さく、比増殖速度が大きいという結果が得られた。このことから、短時間で急激に増殖したpH5.6～7.6が増殖に適していると示唆された。

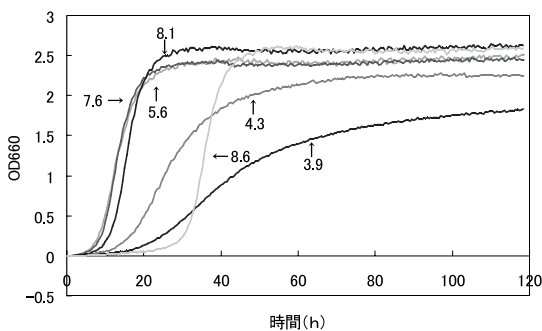


図3 pHの違いによる増殖曲線  
(菌株No.25; *L. paracasei* ssp. *tolerans*/*L. paracasei* ssp. *paracasei*)

表2 誘導期 (L), 比増殖速度 ( $\mu$ ), 定常期の濁度 (OD<sub>max</sub>)

pH	L/h <sup>a</sup>	$\mu$ <sup>b</sup>	OD <sub>max</sub> <sup>c</sup>
3.9	19.0	0.083	1.8
4.3	14.8	0.126	2.2
5.6	6.9	0.262	2.5
7.6	8.1	0.240	2.4
8.1	10.6	0.186	2.6
8.5	30.4	0.155	2.6

<sup>a</sup>誘導期 (lag phase; L) は、誘導期の直線を時間軸に平行に延長したものと、対数的増殖期の直線を逆向きに外挿した直線との交点をもって、便宜上誘導期の長さとした。

<sup>b</sup>比増殖速度 ( $\mu$ ) は、縦軸に濁度の対数を、横軸に培養時間を取り、得られた直線の傾斜を計算により求めた。

$$\mu = \ln(A_2/A_1) / (t_2 - t_1)$$

A : 濁度

t : 時間

<sup>c</sup>定常期の濁度

#### 4 まとめ

16S rDNA塩基配列解析で解析できなかった2株について、16S-23S rDNA解析の結果、*L. paracasei* ssp. *tolerans*/*L. paracasei* ssp. *paracasei*と同一した。耐アルコール試験の結果、焼耐もろみ中の乳酸菌はType strainと比べると高いアルコール濃度で増殖し、Alc10～12.5%まで増殖した。初発pH試験においてもType strainに比べ、幅広いpHで増殖する菌株があり、焼耐もろみから分離した乳酸菌はpH3.5～8.6で増殖した。誘導期 (L), 比増殖速度 ( $\mu$ ), 定常期の濁度 (OD<sub>max</sub>) の結果より、pH5.6～7.6が増殖に適していた。

#### 5 参考文献

- 1) 竹下淳子他, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, 119(2004)
- 2) 竹下淳子他, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, 127(2004)
- 3) G.W.TANNOCK *et al*, *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 65, 4264 (1992)
- 4) 小崎道雄, 内村泰, 岡田早苗: "乳酸菌実験マニュアルー分離から同定までー", 朝倉書店