

乳酸菌バクテリオシンを用いた清酒の火落ち防止に関する研究

石 山 洋 平*

Studies on Prevention of Hiochi in Sake Brewing Process Using Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria

by Yohei ISHIYAMA

抗菌ペプチドは動物、植物、昆虫、微生物などの防御機構において重要な役割を担っている。これらのペプチドは既存の抗生物質に抵抗性を示す病原菌に対する新奇な抗菌物質として注目されている。このような抗菌ペプチドの1つとして、主に乳酸菌が生産する『バクテリオシン』が挙げられる。バクテリオシンの多くは高温や低pH環境下においても安定であり、プロテアーゼによって分解され、近縁の細菌だけに対して抗菌効果を示す。このような性質から、バクテリオシンは食品保存料としての利用が期待されている。

一方、清酒製造工程において、アルコール耐性乳酸菌（火落菌）による腐敗現象（火落ち）が問題となっている。火落ちは、酸味の増加、混濁、オフフレーバーの発生により、清酒の品質や風味に深刻な影響を及ぼす。この火落ちを防ぐ手段として、火入れと呼ばれる低温での加熱殺菌や、無菌ろ過などが行われている。しかし、現在でも火落ちを完全には防止できていないのが現状である。

本論文では、清酒の火落ちを防止することを目的に、複数の乳酸菌によるバクテリオシンの生産と、それらのバクテリオシンの火落菌に対する抗菌効果について研究を行った。具体的には麴汁培地を用いたバクテリオシンの生産、火落菌に有効なバクテリオシンを生産する乳酸菌の有用性、清酒製

造の概略について解説した。

また本研究の目的および本論文の構成を述べた。菌の選抜、および清酒製造工程へのバクテリオシンの応用について検討した。

第一章は緒言であり、本研究の背景ならびに既往の研究を概観し、抗菌ペプチドの構造と機能、乳酸菌とバクテリオシンの有用性、清酒製造の概略について解説した。また本研究の目的および本論文の構成を述べた。

第二章「米タンパク質加水分解物を添加した麴汁培地を用いた *Staphylococcus* sp. NPSI 38 (NPSI 38) によるバクテリオシンの生産およびそのバクテリオシンの火落菌に対する増殖阻害効果」では、バクテリオシン生産菌 NPSI 38を用いて、麴汁培地中でバクテリオシンを生産するために必要な窒素源について検討した。また、生産されたバクテリオシンの火落菌に対する増殖阻害効果について評価した。

麴汁培地を用いたバクテリオシン生産において、ポリペプトンや肉エキスの添加が有効であることを明らかにした。また、ポリペプトンや肉エキスの代替として、米タンパク質加水分解物 (RPH) 用いることによって、NPSI 38が高活性なバクテリオシン (160 U/ml) を生産することを明らかにした。得られたバクテリオシン含有培養上清液は、対数増殖期あるいは定常期の火落菌 *Lactobacillus hilgardii*

*新潟大学大学院自然科学研究科

現在 ミヤトウ野草研究所株式会社 研究部
〔新潟大学博士（工学）平成21年3月23日授与〕

NBRC 15886^Tの増殖を静菌的に阻害することを明らかにした。

第3章「複数の乳酸菌によるバクテリオシン生産およびそれらの火落菌の増殖阻害への応用」では、火落ちした清酒から単離した火落菌を分類・同定し、火落菌に対する複数のバクテリオシンの増殖阻害効果について検討した。

単離した火落菌を16S rDNAの部分配列に基づいて同定した結果、火落菌がそれぞれ *Lactobacillus fructivorans*, *L. hilgardii* および *Lactobacillus paracasei* の3グループに属することを明らかにした。次に、RPHを添加した麴汁培地を用いて、いくつかの乳酸菌によるバクテリオシン生産を試みた。その結果、*Enterococcus durans* C102901 (C102901), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C101910 (C101910) および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 (NBRC 12007) が高活性なバクテリオシンを生産することが明らかになった。これらのバクテリオシンを含む培養上清液(バクテリオシン溶液)を添加したときの、火落菌の増殖阻害効果について評価した。その結果、C101910とNBRC 12007のバクテリオシンを10% (v/v)の割合で添加したとき、*L. fructivorans* NBRC 13954^Tの生菌数が検出限界(1.0×10² CFU/ml)以下まで減少することを示した。また、C102901, C101910およびNBRC 12007のバクテリオシンを1% (v/v)の割合で添加することによって、*L. hilgardii* NBRC 15886^TとH130の増殖を殺菌的に阻害できることを明らかにした。

第4章「乳酸菌バクテリオシンによる水麴中での火落菌 *L. hilgardii* の増殖阻害」では、酒母工程におけるバクテリオシンの利用を検討するために、バクテリオシンの抗菌活性に対する麴プロテアーゼの影響について検討した。さらに、麴抽出液と水麴中でのバクテリオシンによる火落菌の増殖阻害効果について評価した。

pH3, 10°Cの麴抽出液中において、第3章において調製したC101910とNBRC 12007のバクテリオシン溶液は、混合後12時間目にそれぞれ約50%, 約70%

の活性を維持することを明らかにした。またpH3, 10°Cの麴抽出液にC101910とNBRC 12007のバクテリオシン溶液をそれぞれ5% (v/v)と1% (v/v)の割合で添加したとき、*L. hilgardii*の生菌数を検出限界(1.0×10² CFU/ml)以下にまで減少できることを明らかにした。一方、乳酸と米麴を含む水麴(pH 3, 10°C)にバクテリオシン溶液を添加した場合、麴抽出液の場合と比較して、*L. hilgardii*に対するバクテリオシンの増殖阻害効果の低下が観察された。しかし、各バクテリオシン溶液を水麴に10% (v/v)の割合で添加したとき、*L. hilgardii*の生菌数は2オーダー以上減少することを明らかにした。

第5章「乳酸菌バクテリオシンによる生酒中での火落菌の増殖阻害」では、C101910とNBRC 12007の生産したバクテリオシンを用いた、生酒中における火落菌の増殖阻害について検討した。

C101910とNBRC 12007のバクテリオシンは生酒中において非常に安定であることを示した。生酒中において、*L. hilgardii*, *L. fructivorans* および *L. paracasei*の生菌数はそれぞれ18, 35および350 U/mlのC101910のバクテリオシンが存在するとき、あるいはそれぞれ5.6, 5.6および140 U/mlのNBRC 12007のバクテリオシンが存在するとき、検出限界以下(1.0×10² CFU/ml)まで減少することを明らかにした。また、膜電位感受性色素を用いた膜脱分極アッセイにおいて、バクテリオシンによって誘導される火落菌細胞膜の脱分極がエタノールによって促進されることを明らかにした。さらに、15%のエタノールを含むMcIlvaine緩衝液にバクテリオシンを添加した場合、生酒の場合と比較して、火落菌に対する増殖阻害効果が低下することを示した。以上のことから、エタノールとエタノール以外の清酒成分が火落菌に対するバクテリオシンの増殖阻害効果を高めていることが示唆された。

第6章は総括であり、本研究で得られた結果をまとめた。

終わりに、指導を賜った谷口 正之教授に謝意を表します。