

乳酸菌由来のバクテリオシンを用いた水麴工程
における日本酒の火落ち（腐敗）に関連する
Lactobacillus hilgardii の増殖阻害

石山 洋平, 高田 剛臣, 中西 利公, 渡辺 直美, 金桶 光起,
柳田 藤寿, 陳 奕伸, 高屋 朋彰, 田中 孝明, 谷口 正之

**Growth-Inhibition of *Lactobacillus hilgardii*,
a Bacterium Related to Hiochi, in the
Mizu-koji Process by Bacteriocins
from Lactic Acid Bacteria.**

by Y. ISHIYAMA, T. TAKATA, T. NAKANISHI, N. WATANABE,
M. KANEKO, K. WATANABE, F. YANAGIDA, Y. CHEN, T. KOUYA,
T. TANAKA and M. TANIGUCHI

清酒は原料処理, 酒母, もろみ, 製成, 火入れおよび貯蔵工程を経て製造されている。この工程において, いわゆる「火落ち」と呼ばれる清酒の腐敗現象が深刻な問題となっている。火落ちを引き起こす微生物として, 火落菌と呼ばれる *Lactobacillus* 属のエタノール耐性乳酸菌が知られている。火落菌による清酒の腐敗は, pH の低下, 混濁, ジアセチルなどのオフフレーバーの発生を引き起こし, 清酒の商品価値を著しく低下させる。この火落ちを防ぐために, ミクロフィルターによる濾過や「火入れ」とよばれる低温での加熱殺菌処理が行われている。しかし, それらの方法は清酒の風味の劣化を伴うばかりでなく, 火落ちを完全に防ぐ手段とはなっていない。近年, 微生物の管理技術が向上し, 以前に比べて少な

くなってきているとはいえ, 現在でも火落ちは清酒の品質や風味を劣化させる深刻な問題となっている。したがって, 火落菌による清酒腐敗を防止する新技術の開発は, 清酒業界の重要な課題となっている。

一方, バクテリオシンは, 乳酸菌が生産するタンパク質性の抗菌物質であり, ①近縁細菌に対して抗菌作用を示す, ②プロテアーゼによって分解される, ③耐熱性を有するなどの優れた性質を有しており, 天然型の抗菌剤・保存料として食品に利用することが期待されている。例えば, 代表的なバクテリオシンであるナイシンAは, チーズ, マヨネーズ, 缶詰などの保存料として世界50カ国以上で利用されている。

そこで、バクテリオシンを利用して清酒の火落ちを防止することに着目した。本論文では、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。

麴菌由来のプロテアーゼのバクテリオシンに及ぼす影響を確認するために、酢酸緩衝液に麴を一晩浸漬し、プロテアーゼを溶出させた麴抽出液を調製した。得られた麴抽出液の酸性プロテアーゼ活性を測定した結果、約1,400 U/g-kojiの活性が得られた。次に、この麴抽出液にバクテリオシン溶液を添加し、バクテリオシンの残存活性を測定した。

pH を3, 4および5に、温度を10, 20および30°Cに設定し、麴抽出液に1%(v/v)の割合でバクテリオシン溶液(培養上清液)を添加した。このときの2種類のバクテリオシンの残存活性の変化を検討した。*L. lactis* subsp. *lactis* C101901と*L. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007のどちらのバクテリオシンも、pHと温度が高くなるにつれてプロテアーゼによって失活した。しかし、酒母工程の環境条件に相当するpH 3, 10°Cの条件では、両バクテリオシンとも12時間後においても60%以上の活性が残存していることがわかった。

pH 3, 10°Cの条件においてバクテリオシンの活性が維持されることから、次に麴抽出液にバクテリオシン溶液と*L. hilgardii*を添加し、この火落菌の生菌数の変化を測定した。pH 3, 10°Cの条件で*L. lactis* subsp. *lactis* C101910株と*L. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007株のバクテリオシン溶液を添加した。バクテリオシンの添加量に依存して増殖阻害効果が観察され、1%(v/v)すなわち35 U/mLのバクテリオシン溶液の添加によって生菌数は培養開始時に添加した濃度と比べて、約1/150まで減少した。また*L. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007株のバクテリオシンを添加した場合も同様の傾向が観察され、1%(v/v)すなわち38 U/mLのバクテリオシン溶液の添加によって、生菌数は短時間のうちに低下し、検出限界の102 CFU/mL以下まで減少した。したがって、バクテリオシンは、麴のプロテアーゼによって徐々に分解されるが、バクテリオシンの殺菌作用は短時間

のうちに発揮されるため、麴抽出液中で火落菌の生菌数を低下させることができたと考えられる。

実用的な観点からバクテリオシンの殺菌効果を評価するために、酒母工程を想定した条件(pH 3, 10°C)で実験を行った。清酒製造工程のうち、酒母工程は、米麴に水と乳酸を加えて「水麴」を調製した後、酵母と蒸米を加えて発酵を開始する工程である。本研究では、バクテリオシン溶液を含む水麴に火落菌を添加して一定条件でインキュベートした。その後、火落菌を回収するために、麴を含む懸濁液を徹底的にホモジナイズしてから火落菌の生菌数を測定した。水麴中でのバクテリオシンの増殖阻害効果を検討した。*L. lactis* subsp. *lactis* C101910株と*L. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007株のバクテリオシン溶液を1%(v/v)の割合で添加した場合、麴抽出液中の場合と比較して、バクテリオシンによる増殖阻害効果が低下した。しかし、バクテリオシン溶液を10%(v/v)の割合で添加することによって、*L. hilgardii*の生菌数を培養開始時に添加した濃度と比べて、約1/100まで減少させることができた。

水麴中においてバクテリオシンによる増殖阻害効果が低下した原因を解明するために、バクテリオシンと火落菌の米麴への吸着の程度について検討した。生の麴とプロテアーゼを失活させるために加熱処理した麴への吸着を検討した。混合した後、1時間目に固液分離して吸着の程度を測定した。水麴の液相には、麴抽出液の場合と比較して約70%のバクテリオシン活性が存在し、約30%のバクテリオシンが米麴に吸着したことが明らかになった。また、生の麴を用いた場合に、液相に存在するバクテリオシン活性が、加熱した麴を用いた場合よりも低下した。これは、麴のプロテアーゼによってバクテリオシンの活性がわずかに低下したためと考えられる。バクテリオシンの場合と同様に、火落菌の米麴への吸着の程度を検討した結果、約75%の火落菌が米麴に吸着した。したがって、バクテリオシンの増殖阻害効果が水麴中において低下した原因は、バクテリオシンと火落菌が米麴に吸着し、バクテリオシンの作用を火落菌が受けにくくなったためと考えられる。このような現象は、缶詰やレトルト食品などの固形分を含む系での有害菌に対するバクテリオシンの殺菌効果についても報告されている。