

# マロラクティック発酵用乳酸菌からの新規山廃酒母乳酸菌の選抜

## Search for new YAMAHAI SHUBO lactic acid bacteria from lactic acid bacteria for Malolactic fermentation

会津若松技術支援センター 醸造・食品科 齋藤嵩典 猪俣有唯 鈴木賢二  
応募企業 合名会社大木代吉本店

新たな風味を付与した清酒製造のため、ワイン醸造用として市販されているマロラクティック発酵用乳酸菌 1 1 株から、酒母製造に適した乳酸菌の選抜を行った。その結果、濃糖状態の酒母においても生育可能で、アルコール耐性が低く、独特の風味を付与する乳酸菌 1 株を選抜した。

**Key words:** マロラクティック発酵、山廃酒母、火落ち菌、乳酸菌

## 1. 緒言

近年、高温糖化山廃酒母を用いた酒造りが行われている<sup>1)</sup>。清酒製造過程における酒母には、清酒製造に必要な酵母を大量に純粋培養することに加え、醪の初期の雑菌汚染を防止するために多量の乳酸を生産することが求められる。現在は、醸造用乳酸を添加することで酒母を酸性状態にし、雑菌の増殖を抑制する速醸系酒母が主流となっている。一方、生酏系山廃酒母は、昔ながらに行われてきた酒母の製造方法で、乳酸菌が乳酸を生産することによって酸性状態を作り上げる。

応募企業の(名)大木代吉本店は、清酒用の乳酸菌を添加し、乳酸を生産させる生酏系山廃酒母による清酒醸造を行っている。今回、清酒用の乳酸菌ではなくワイン製造で用いられているマロラクティック発酵用乳酸菌スターターを添加することで、これまでの清酒にない独特の風味を付与できないかと相談があった。マロラクティック発酵とは、乳酸菌が保持するマロラクティック酵素の作用により、醪中のリンゴ酸が脱炭酸され、乳酸に変換される現象のことである。甘味が少なく酸味が目立ちやすいワインにおいて、その酸味を和らげ味をまろやかにするという役割を果たす。加えて、乳酸菌が造る香味が加わることでワインの香りに複雑さが付与されることも期待される。一方、清酒においては、火落菌のようにアルコール耐性が強く清酒を白濁させ風味を損ねる乳酸菌は嫌われるが、ワイン用に市販されているマロラクティック発酵の乳酸菌は、清酒の酒母や醪における生育性やアルコール耐性について検討されていない。そこで、我々はマロラクティック発酵特有の風味が付与され、かつ清酒酒母製造に適した乳酸菌の選抜を行った。

## 2. 実験方法

### 2. 1. 使用菌株

供試乳酸菌スターターとして、1 1 種の市販製品；  
MBR 0-MEGA、MBR PN4、MBR VP41、MBR ML PRIME、

MBR 31、MBR ALPHA、MBR BETA (以上 7 株は Lallemand 社製)、LACTOENOS B7 DIRECT、LACTOENOS B16、LACTOENOS 450 PreAc (以上 3 株は Laffort 社製)、Viniflora NoVA (以上 1 株は Chr. Hansen 社製)を用いた。本稿では、それぞれ 0-MEGA、B7 DIRECT、NoVA のように略称する。乳酸菌株は、市販のフリーズドライ粉末状の乳酸菌を BD Difco™ Lactobacilli MRS Broth 培地 (和光純薬工業 (株)) (以下、MRS 培地とする) にて静置培養し、以下の培養試験に供した。また、対照として (名) 大木代吉本店にて使用している清酒用乳酸菌の *Lactobacillus sakei* を用いた。

### 2. 2. 培地及び生育性試験

#### ・麴汁生育性試験

麴汁調製培地：麴 4.5[kg] に水 20[L]、酵素剤グルコチーム #20000 (ナガセケムテックス株式会社) 70[g]、リン酸二水素カリウム 10[g] を加え、55[°C] で 7 時間糖化後、ろ過により固形分を除去した麴汁を、蒸留水にて各 Brix に希釈し培地とした。

#### ・アルコール感受性試験

MRS 培地を 1/2 濃度で調製した培地<sup>2)</sup> (以下、1/2MRS 培地とする) に、エタノールを 0、5、7.5、10[%] になるように添加した。

#### ・濃糖耐性試験

1/2MRS 培地にグルコースを 2、10、20、25、30[%] になるように添加した。

乳酸菌株は、市販のフリーズドライ製品を MRS 培地にて 35[°C] 3 日間静置培養したものを乳酸菌培養液とした。各試験は、乳酸菌培養液 0.1[ml] を各試験培地 10[ml] に接種し、35[°C] にて 3 日間静置培養後、生育性の判定を行った。

生育性の判定は、培地の濁度 (OD 600[nm]) により増殖量を判断<sup>3)</sup> し、生育に要した日数と合わせて行った。

麴汁調製培地における麴汁成分中での生育性試験では、3 日間で増殖が著しいもの (濁度 3.000 以上) を

++、3日間で増殖がみられたもの(濁度 3.000 未満)を+、増殖がみられなかったものを-と判定した。アルコール感受性試験では、35[°C]にて3日間静置培養後、エタノール 0[%]の 1/2MRS 培地と同程度の増殖がみられたものを++、増殖の抑制あるいは増殖に3日間以上要したものを+、増殖がみられなかったものを-、エタノール 0[%]においても増殖がみられなかったものを×と判定した。濃糖耐性試験では、35[°C]にて3日間静置培養後、グルコース 2[%]の 1/2MRS 培地と同程度の増殖がみられたものを++、増殖の抑制あるいは増殖に3日間以上要したものを+、増殖がみられなかったものを-、グルコース 2[%]においても増殖がみられなかったものを×と判定した。

### 2. 3. 酒母小仕込み試験

表1に示す配合で、小仕込み試験を行った。添加酵母は福島県オリジナル清酒酵母 TM-1 を用いた。また、酒母の操作は表2に従って行った。

表1 小仕込み仕込配合

総米	122.8[g]
麴米	52.8[g] (夢の香 精米歩合 60[%])
掛米	70[g] (五百万石 精米歩合 50[%])
汲み水	290[ml]
乳酸菌	1.0[ml]
酵母	1.0[ml] (TM-1)

表2 酒母経過

日数	操作	時間[h]	品温[°C]
1日目	糖化	5	55
	乳酸菌添加	48	35
2日目			35
3日目	酵母添加	72	28
4日目			28
5日目			28
6日目	枯らし		8
7日目			8
8日目			8

### 2. 4. 酒母中仕込み試験

表3に示す配合で、中仕込み試験を行った。また、酒母の操作は表2に従って行った。

乳酸菌はMRS 培地にて35[°C] 3日間静置培養後、濁度を1.000 に合わせた培養液 6.0[ml]を遠心分離し、上清を生理食塩水に置換したものを添加した。

表3 中仕込み仕込配合

総米	245.6[g]
麴米	105.6[g] (夢の香 精米歩合 60[%])
掛米	140[g] (五百万石 精米歩合 50[%])
汲み水	580[ml]
乳酸菌	6.0[ml]
酵母	2.4[ml] (TM-1)

### 2. 5. 製成酒母評価方法

製成した酒母は遠心分離にて上清を採取し、以下の項目について評価を行った。乳酸菌数及び酵母数は遠心分離前の酒母を用いた。

分析項目：アルコール分、日本酒度、酸度、アミノ酸度、乳酸菌数、酵母数

官能評価：当センター酒造担当職員4名と共同研究企業1名の計5名。1：良-2：普通-3：難ありの3段階による評点方式。

アルコール分及び日本酒度はSD 式迅速アルコール測定システム DA-155 (京都電子工業 (株))、酸度及びアミノ酸度は総酸・アミノ酸滴定システム AT-710 (京都電子工業 (株))、を用い、国税庁所定分析法<sup>4)</sup>の諸法に基づいて測定した。

乳酸菌数は、BCP 加プレートカウントアガール (日本製薬 (株)) に 0.5[%]炭酸カルシウムを加えた培地にて試料 1.0[ml]を混釈し、固化後さらに BCP 加プレートカウントアガールを重層した。35[°C]にて3日間培養後、周囲が黄変し透明になったコロニー数を計数した。

酵母数は、麴汁培地 (Brix 11) に 1.5[%]寒天、0.2[%]プロピオン酸ナトリウム、100[μg/ml]クロラムフェニコールを加えた麴汁寒天培地に平板塗抹し、30[°C] 2日間培養後、TTC 上層培地<sup>5)</sup>を重層し、30[°C] 2時間培養後、赤色を呈したコロニーを清酒酵母として計数した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3. 1. 培養条件及び酒母小仕込み試験における乳酸菌の選抜

表4に各試験培地における増殖性の結果を示した。また、酒母小仕込み試験における分析値を表5及びその様子を図1に、官能評価結果を表6及びその様子を図2に示した。

麴汁成分中での生育は、いずれの菌株も増殖可能であることがわかった。特に、酒母の濃糖状態においても生育可能であると期待される Brix 15 の麴汁培地でも増殖が旺盛な4株 (No. 2、4、8、11) を選抜候補と

した。アルコール感受性試験では、火落ち性や腐造性の可能性が低いと期待されるアルコール耐性の低い乳酸菌を選抜する目的で、エタノール 10[%]で生育しない6株 (No. 1、2、3、5、7、10) を選抜候補とした。濃糖耐性試験では、酒母の濃糖環境でも生育可能であると期待されるグルコース濃度 25[%]でも増殖可能な5株 (No. 2、3、4、8、11) を選抜候補とした。

加えて、酒母小仕込み試験 (図1) において、酵母添加前の酒母の pH が 5 以上もしくは酸生成過多で酵母の増殖が抑えられアルコール不足となっているもの以外の3株 (No. 3、7、9) を選抜候補とした。さらに、これらの結果と官能評価による結果を合わせて、特徴的な香味を持ち合わせた VP41 (No. 3)、B16 (No. 9)、450 PreAc (No. 10) の3株を選抜した。

表4 各種試験結果

No.	菌株	麹汁生育性※1			アルコール感受性※2			濃糖耐性※3			
		Brix			EtOH			Glc			
		5	10	15	5[%]	7.5[%]	10[%]	10[%]	20[%]	25[%]	30[%]
1	O-MEGA	+	+	+	++	+	-	++	+	-	-
2	PN4	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++
3	VP41	+	+	+	++	++	-	++	++	++	++
4	ML PRIME	+	+	++	++	++	+	++	++	++	++
5	31	-	+	+	++	++	-	++	-	-	-
6	ALPHA	+	+	+	×	×	×	++	-	-	-
7	BETA	+	+	+	+	-	-	++	+	-	-
8	B7 DIRECT	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++
9	B16	+	+	+	++	++	+	++	++	+	-
10	450 PreAc	+	+	+	-	-	-	++	-	-	-
11	NoVA	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+
12	対照	+	+	+	-	-	-	++	++	+	-

35[°C]で3日間静置培養後、濁度を測定した。

※1 ++…3日間で増殖 (濁度 3.000 以上)、+…3日間で増殖 (濁度 3.000 未満)、-…増殖がみられなかった

※2 ++…EtOH 0[%]と同程度の増殖、+…増殖の抑制あるいは遅延、-…増殖がみられなかった、×…EtOH 0[%]で増殖がみられなかった

※3 ++…Glc 2[%]と同程度の増殖、+…生育遅延、-…増殖がみられなかった、×…Glc 2[%]で増殖がみられなかった

表5 製成酒母の一般分析結果

No.	菌株	Alc. [%]	日本酒度	酸度 [ml]	アミノ酸度 [ml]
1	O-MEGA	8.38	-44.02	3.40	1.53
2	PN4	5.37	-71.37	10.84	1.94
3	VP41	6.47	-61.17	8.43	1.72
4	ML PRIME	5.80	-67.96	9.48	1.76
5	31	8.30	-44.63	3.38	1.53
6	ALPHA	10.12	-21.96	3.59	1.41
7	BETA	9.19	-34.97	9.41	1.69
8	B7 DIRECT	5.59	-66.77	13.71	1.76
9	B16	7.86	-44.87	4.97	1.89
10	450 PreAc	8.90	-36.05	3.32	1.42
11	NoVA	5.26	-70.58	12.45	1.75
12	対照	6.82	-59.58	5.95	1.85
13	ブランク	8.33	-42.38	3.33	1.46



図1 小仕込み試験



図2 官能評価

表6 製成酒母の官能評価結果

No.	菌株	平均点	寸評
1	O-MEGA	1.8	特徴香強い、青臭い、酸味さわやか、軽い、後味えぐい
2	PN4	2.2	4MMP、酸臭強い、酸ハル、後味くどい
3	VP41	1.8	香り特徴的、やや4-VG、酸味強い、甘旨味
4	ML PRIME	2.2	酸味強くインパクトあり、特徴香穏やか
5	31	2.0	4-VG、香り難あり、香味バランス悪い、味丸い
6	ALPHA	2.2	特徴香穏やか、苦みあり、酸味穏やか
7	BETA	2.2	香り穏やか、酸臭、酸味強くインパクトあり
8	B7 DIRECT	2.2	酸臭、香りゆたか、酸味多くバランス欠く
9	B16	1.2	香味上品、さわやか、マスカット系、酸穏やか、まとまり
10	450 PreAc	1.6	香りゆたか、甘味強い、バランス良好、上品
11	NoVA	2.4	酸臭、ジアセチル、酸味強く粗い
12	対照	1.4	特徴香穏やか、酸カドなくまとまり、無難

※3点法（1：良-2：普通-3：難あり）

### 3. 2. 酒母中仕込み試験

3.1.で選抜した3株と対照の合わせて4株について中仕込み試験を行った。酒母作製3日目の酵母添加前における乳酸菌数は  $2.1 \times 10^7 \sim 1.8 \times 10^8$  [CFU/g] であり、マロラクティック発酵が生起される菌濃度に達していることを確認した<sup>6)</sup>。

製成酒母の成分分析の結果を表7に示した。酸度は、VP41 (No. 3) が6.88[m1]、B16 (No. 9) が2.93[m1]、450 PreAc (No. 10) が2.79[m1]と差がみられた。今回の試験では乳酸菌添加48時間後に酵母を添加したが、乳酸菌株によって酸生成量をみながら酵母添加のタイミングを計ることや、乳酸菌培養期間の温度を変更する必要性が示唆された。また、枯らし後8日目の酒母における酵母数は  $4.1 \sim 5.2 \times 10^7$  [CFU/g] と対照区とほぼ同程度であることが分かった。しかし、アルコール分をみると対照区に比べどの菌株においても1[%]以上低い値だった。酵母添加後、アルコール分の生成量によって酒母の経過を長く取る必要性が示唆された。

製成した酒母を遠心分離し、上清を官能評価した結果を表8に示した。450 PreAc (No. 10) の香味が、他

の乳酸菌株に比べバランスが良好で上品であったため、最終的に450 PreAcを選抜した。

### 3. 3. 考察

選抜した450 PreAc (No. 10) を用いて製成した酒母は、酸度が低く、アルコール生成量も十分ではなく、最適な酒母操作を検討する必要がある。今後、450 PreAc の最適な前培養条件を検討し、酒母への添加量を検討するとともに、清酒の酒母として適した酒母経過になるよう乳酸菌培養温度及び期間の検討を行うこととする。

表7 中仕込み酒母の一般分析結果

No.	菌株	Alc. [%]	日本酒度	酸度 [ml]	アミノ酸度 [ml]	乳酸菌数 [CFU/g]	酵母数 [CFU/g]	選抜
3	VP41	3.26	-97.84	6.88	2.16	$1.2 \times 10^8$	$4.7 \times 10^7$	
9	B16	3.69	-81.13	2.93	2.25	$6.2 \times 10^4$	$4.6 \times 10^7$	
10	450 PreAc	3.58	-98.43	2.79	2.32	$2.8 \times 10^4$	$5.2 \times 10^7$	*
12	対照	4.82	-85.27	5.24	2.20	$1.0 \times 10^3$	$4.1 \times 10^7$	

表8 製成酒母の官能評価結果

No.	菌株	平均点	寸評
3	VP41	2.4	ジアセチル、やや4-VG、味噌くさい、4MMP、酸ハル、えぐみ
9	B16	1.8	ややカス臭、糖化臭、甘重い、コクあり
10	450 PreAc	1.7	香り厚みあり、糖化臭、香味バランス良好、甘味きれい、上品、味重
12	対照	1.6	ヨーグルト様香、特徴香穏やか、インパクト、酸高い、味わい軽快

#### 4. 結言

新たな風味を付与した清酒製造のため、ワイン醸造のために市販されているマロラクティック発酵用の乳酸菌スターター1株から、酒母製造に可能な乳酸菌の選抜を行った。濃糖状態の酒母においても生育可能で、アルコール耐性が強くなく、かつ酒母において独特の風味を有する1株の乳酸菌450 PreAc (No. 10)を選抜した。今後は、応募企業が求める酒母経過になるよう乳酸菌添加量や温度を検討し、再現性試験を行うことで、安定的な酒母製造を可能とする。

#### 参考文献

- 1) 佐々木隆浩, 國府加奈子, 星佳宏. 県内醸造食品から分離した乳酸菌の生酏系清酒への利用に向けた特性把握. 栃木県産業技術センター研究報告, 2017, no.14, p.99-101.
- 2) 藤原朋子, 藤井一嘉, 外菌寛郎. 酒母製造に利用可能な乳酸菌の選抜. 広島県立総合技術研究所食品工業技術センター研究報告, 2011, no.26, p.7-16.
- 3) 稲橋正明. 清酒製造工程及び清酒から分離された乳酸菌(火落菌、腐造性乳酸菌)のマロラクティック発酵(MLF)としての性質. 日本醸造協会誌, 2016, vol.111, no.1, p.14-21.
- 4) 財団法人日本醸造協会注解編集委員会編. 第四回改正 国税庁所定分析法注解. 第四版, 財団法人日本醸造協会, 2006, 307p.
- 5) 古川敏郎, 秋山裕一. 清酒醸造の微生物学的管理(第4報) TTC重層法による酵母の分別について(1). 日本農芸化学会誌, 1963, vol.67, no.7, p.398-402.
- 6) 横塚弘毅. ワイン製造(その3), 2000, vol.95, no.1, p.17-22.