

乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の高温糖化酒母への利用性とその健康機能性評価

飛田 啓輔* 小田木 美保* 岩佐 悟* 平間 毅** 武田 文宣* 飯村 修志**

1. はじめに

日本酒は、海外からの関心も高く、関東で1、2位の酒蔵数を有する茨城県においても、日本酒産業の発展のために県産日本酒の輸出促進の取り組みが期待されている。しかし、急激な温度の変化や長時間の振動に晒す輸送工程は、日本酒の品質を低下させることにつながる。そこで、著者らが注目したのが生酏系酒母造りである。近代の酒造りでは、酒母において雑菌の増殖を抑え、速やかに清酒酵母の増殖を図るために乳酸を事前に添加する速醸酒母が大半を占めている。対して、環境中の乳酸菌を繁殖させて仕込む生酏系酒母造りは、乳酸菌の産生する成分によって雑菌汚染を防ぎ、味わい豊かな酒質を奏でるとともに、その酒質が劣化しづらくなるとされる¹⁾。したがって、生酏系酒母造りによる日本酒は輸出に適していると言える。しかし、野生の乳酸菌で酒母を立てる生酏造りでは品質の安定化が課題である。

一方、日本酒の製造過程で産出される酒粕は、醪を圧搾して得られる残渣であり、原料白米重量に対して純米酒では30～40%、吟醸酒では50%以上に達する場合もある。酒粕は、麹菌や酵母が資化できなかった米の成分、酵母や麹菌、あるいは生酏系酒母造りであれば乳酸菌の菌体成分、これらの微生物の代謝産物から構成される。従来、酒粕は甘酒、粕汁、粕漬けなどに利用されてきたが、食の多様化や欧米化に伴い、このような用途が減少している。したがって、日本酒の副産物である酒粕には新たな利用性や機能が求められている。

2. 目的

本研究の目的は、生酏系酒母造りによる日本酒の安定化製造技術の研究開発と、その技術を活用した新たな健康志向食品を研究開発することである。本報告では、乳酸菌の一種である *Lactobacillus sakei* の高温糖化酒母への利用性およびその健康機能性評価を行ったので、以下に述べる。なお、本研究は令和元年度から令和5年度まで文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「次世代型生酏系酒母を利用した日本酒とその他の食品への応用に関する研究開発」の一環として実施しているものである。

3. 研究内容

3.1 乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の高温糖化酒母への利用性

生酏系酒母から分離される乳酸菌としては、乳酸球菌である *Leuconostoc mesenteroides* や乳酸桿菌である *Lactobacillus sakei* が知られている。生酏系酒母の初期では、低温で生育しやすく、かつ栄養分が少なくても生育する乳酸球菌が出現し、次第に乳酸生成能

が高い乳酸桿菌に遷移すると言われている。

高温糖化酒母は、蒸米、麹、水を混合し、50～60℃に保って甘酒を作製後、清酒酵母と乳酸を添加して清酒酵母を培養するというものである。長時間の高温環境で糖化することから、雑菌による酒母全体の汚染リスクを低減できるだけでなく、使用までの時間短縮といった利点がある。

そこで、生酏系酒母造りによる日本酒醸造の安定化を図るために、乳酸の代わりに純粋培養した乳酸菌 *Lactobacillus sakei* を高温糖化酒母に添加して、その酒造適性について検証を行った。

3.1.1 乳酸菌の培養

乳酸菌は、当センターにおいて継代培養されている *Lactobacillus sakei* HS-1株を試験に用いた。乳酸菌は、ボーメ (Bé) 5に調整した麹エキスイ培地に接種し、30℃で24時間静置培養した。次いで、図1に示した1 L容量ジャーファーマンター (BMJ 01NP4, エイブル, 東京) を用いて培養試験を行った。まず、Bé 8.7の麹エキスイ培地500 mLを培養槽に加えて121℃で15分間加熱滅菌した。その後、乳酸菌培養液3 mLを加え、回転速度150 rpm、温度30℃で制御し、自然通気条件で培養した。サンプルの日本酒度および酸度は国税庁所定分析法²⁾に従って分析した。乳酸菌数は、0.5%炭酸カルシウム添加 DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) 寒天培地 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) を用いて嫌氣的に培養することで測定した。

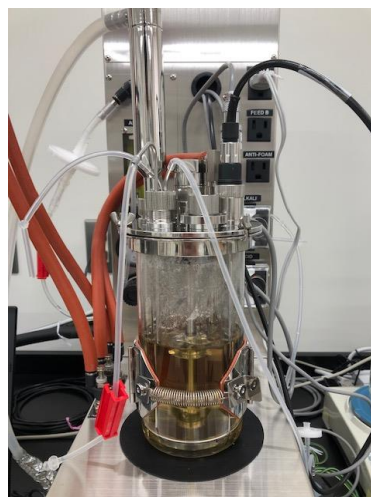


図1 ジャーファーマンターによる乳酸菌培養

3.1.2 清酒酵母の培養

清酒酵母である固形タイプの泡なし明利小川酵母は明利酒類から購入し、Bé 5に調整した麹エキスイ寒天培地上に生育したコロニーから再分離を行ったものを小

*フード・ケミカルグループ **研究推進グループ

川酵母として試験に供した。小川酵母は、麴エキス培地 (Bé 5) において 30℃で 24 時間静置培養を 2 回継代したものを試験に供した。

3.1.3 小仕込み試験

小仕込み試験は、表1に示した配合で行った。まず、高温糖化乳酸菌添加酒母 (乳酸菌添加区) は乾燥 α 化米、乾燥麴、精製水を1 L容量ポリプロピレン容器内で混合して55℃で8時間糖化させた。糖化後、ただちに30℃まで冷却した。乳酸菌培養液を添加して30℃で3日間発酵させた後、さらに清酒酵母培養液を添加して25℃で10日間発酵させた。一方、対照区となる高温糖化乳酸菌添加酒母 (速醸区) は、同様に糖化させた後、乳酸と清酒酵母培養液を添加して25℃で10日間発酵させた。発酵終了後、酒母中の乳酸菌数は0.5%炭酸カルシウム添加MRS寒天培地を用いて嫌氣的に、酵母数はポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬、東京) で培養することで測定した。また、遠心分離 (7,000 rpm, 10分間) によって得られた上清液を分析サンプルとした。サンプルの日本酒度、酸度、およびアミノ酸度は、国税庁所定分析法²⁾に従って分析した。

表 1 小仕込み試験の配合

材料	乳酸菌添加区	速醸区 (対照区)
総米	60 g	60 g
乾燥麴	20 g	20 g
乾燥 α 化米	40 g	40 g
精製水	98 g	98 g
乳酸菌培養液	0.48 mL	
乳酸 (食品添加物)		0.48 mL
清酒酵母培養液	1 mL	1 mL

3.1.4 香気成分分析

香気成分分析は、国税庁所定分析法²⁾を改変して行った。ヘッドスペース法によるガスクロマトグラフィー分析は以下の条件で行った。香気成分の捕集および導入は、バイアル瓶に試料 2 mL および内部標準として 2,000 mg/L の n-アミルアルコールおよび 200 mg/L のカプロン酸メチルの混合液を 0.2 mL 加え、密栓し、HS-20A (島津製作所、京都) により 50℃で 30 分間保温後、1.0 mL 注入した。検出は FID 検出器付きガスクロマトグラフ GC-2030 (島津製作所) を用い、検出器温度は 230℃とした。カラムは DB-WAX (0.25 mm I.D. $\times$ 60 m, 膜厚 0.50 μ m; アジレントテクノロジー, CA, USA) を用い、カラム温度は 60℃で 1 分間保持させた後、130℃まで 10℃/分で昇温した。キャリアーガスはヘリウムを使用し、スプリット比 1/10 とした。

3.1.5 エタノール、グルコース、およびピルビン酸の定量

エタノール、グルコースおよびピルビン酸の定量は、高速液体クロマトグラフにより以下の条件で行った。送液ポンプは LC-20AD (島津製作所) を用いた。エタノールおよびグルコースの検出には RID-10A (島津製

作所) を用いた。ピルビン酸の検出には SPD-M20A (島津製作所) を用い、検出波長は 210 nm とした。カラムは、Shodex SH1821 (8.0 I.D. $\times$ 300 mm; 昭和電工、東京) を用い、カラム温度は 50℃とした。試料は、メンブレンフィルター (島津ジーエルシー, PTFE フィルター, ポアサイズ 0.22 μ m, 13 mm ϕ) で濾過した後、10 μ L を注入した。移動相は、5 mM 硫酸を毎分 1.0 mL で 20 分間送液した。

3.2 乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の健康機能性評価

わが国において、2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患を抱えており、深刻な社会問題となっている。アレルギーは、その発症のメカニズムの違いにより I 型～IV 型の 4 つに大別される。とりわけ、花粉症などアレルギー疾患の大半を占める I 型アレルギーは、ヘルパー T (Th) 細胞の Th1 細胞や Th2 細胞への選択的な分化、すなわち Th1/Th2 バランスが Th2 優位であることに起因する³⁾。近年、発酵食品などから分離された I 型アレルギーを軽減する乳酸菌が次々に発見されている。乳酸菌の抗アレルギー作用は、マクロファージによるインターロイキン (IL)-12 の産生を刺激することにより、Th1 細胞が誘導され、Th1/Th2 バランスが是正されるというものである⁴⁾。

一方、生醗系酒母造りによって得られる酒粕には、酒母から持ち込まれる乳酸菌体が含まれることが容易に想像される。これらの乳酸菌による健康機能性を見出すことは酒粕の付加価値を高め、新たな利用性の拡大に貢献できると考えられる。

そこで、乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の健康機能性評価として、抗アレルギー作用を明らかにするために、マウス由来マクロファージ株化細胞 J774.1 の IL-12 産生に及ぼす影響を検討した。

3.2.1 乳酸菌試料の調製

乳酸菌 *Lactobacillus sakei* には、当センターにおいて継代培養されている HS-1 株を試験に用いた。乳酸菌は、MRS 液体培地において、30℃で 24 時間静置培養した。次いで、1L 容量ジャーファーメンター (BMJ 01NP4) を用いて培養試験を行った。まず、MRS 液体培地 500 mL を培養槽に加えて 121℃で 15 分間加熱滅菌した。その後、乳酸菌培養液 3 mL を加え、pH6.3、回転速度 150 rpm、培養温度 30℃制御、自然通気条件で培養した。得られた培養液は、精製水で 3 回遠心洗浄し、沈殿した菌体を回収した。回収した菌体は、無処理 (生菌) または 110℃で 15 分間加熱処理をした後、凍結乾燥したものを乳酸菌試料とした。乳酸菌試料は、0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (PBS, pH7.2) に懸濁し、実験に供した。

3.2.2 培地成分のモニタリング

培地中のグルコース濃度および L-乳酸濃度は、OLBIS BASIC PLUS (王子計測機器、兵庫) によるオンラインシステムによってジャーファーメンターから培養液を自動サンプリング後、バイオセンサ (BF-7D) に

よって測定した。培地の濁度は、600 nm による吸光度を Ultrospec 2100pro (Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, England) によって測定した。

3.2.3 マクロファージ細胞の培養

マウス由来マクロファージ様株化細胞である J774.1 細胞は、理化学研究所バイオリソース研究センター（茨城）より購入した。細胞は、1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を含む 10% ウシ胎児血清添加 RPMI-1640 培地に懸濁し、細胞浮遊液を得た。得られた細胞浮遊液は、0.4%トリパンブルーによる色素排除法によって、ビルケルチュルク血球計算盤を用いて生細胞数を計測し、生存率が 95%以上であることを確認した。48 ウェル平底マイクロプレートに細胞浮遊液（最終濃度 1×10^6 個/mL）と、乳酸菌試料（最終濃度 100 μ g/mL）を播種し、37℃、5% CO₂ 条件下で 48 時間培養した。

3.2.4 サイトカイン IL-12 濃度の測定

細胞培養上清中の IL-12 濃度は、マウス IL-12/IL-23 測定用 ELISA キットを用いて、キットの定める方法に準じて 96 ウェルプレート上で反応を行った。反応後、450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー iMARK (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) によって測定した。なお、IL-12 濃度は合計 3 回測定し、結果を平均値と標準偏差で示した。2 群間の比較はステューデントの t 検定により、危険率 5%未満を統計的有意差ありと判定した。統計解析はエクセル統計 2018 (株式会社社会情報サービス, 東京) により行った。

4. 研究結果と考察

4. 1 乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の高温糖化酒母への利用性

乳酸菌は、細胞形態が桿菌もしくは球菌、グラム陽性、カタラーゼ陰性、内生孢子非形成、非運動性、消費したブドウ糖から 50%以上の乳酸を生成するといった特徴を持つ細菌群の総称である。その種類は 20 属 200 種以上にもおよび、非常に多様な細菌群である。また、乳酸菌は種類によって栄養要求性や増殖が可能な環境が大きく異なることから、酒造適性の評価において濃糖状態の麴エキスを培地における増殖の確認は必要不可欠である。

本研究では、撹拌速度と品温を一定に制御した状態で Bé 8.7 の麴エキスを培地で乳酸菌 *Lactobacillus*

表 2 麴エキスを培地における酸度、Bé、および乳酸菌数の変化

培養時間 (hr)	0	24	48
酸度	0.6	0.9	2.8
Bé	8.7	8.6	8.3
乳酸菌 (CFU/mL)	4.4×10^3	2.9×10^7	4.0×10^7

sakei を培養した。0, 24, および 48 時間培養した時、培地の酸度、Bé、乳酸菌数、および pH の変化を表 2 および図 2 に示した。培養開始から 48 時間において、酸度は 0.6 から 2.8 に上昇し、乳酸菌数は 4.4×10^3 CFU/mL から 4.0×10^7 CFU/mL に増加した。また、pH は 5.1 から 3.5 に低下した。これらの結果から、乳酸菌 *Lactobacillus sakei* は麴エキスを培地中で増殖することは明らかであり、高温糖化酒母への利用が期待できると考えられる。

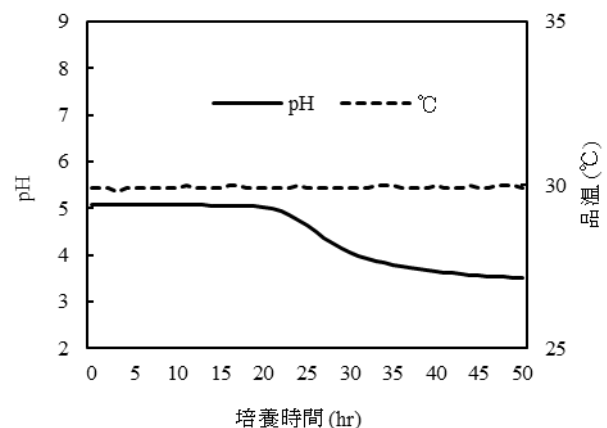


図 2 麴エキスを培地における pH の変化

次いで、乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の高温糖化酒母への添加による小仕込み試験を行った。高温糖化酒母の成分を表 3 に示した。乳酸菌添加区では、1 日目と比較して 4 日目において乳酸菌数は増加し、pH は低下した。酸度は 5.2 であった。また、13 日目において酸度は 8.7 に上昇し、酵母数は 8.8×10^4 CFU/g から 4.2×10^7 CFU/g に増加したが、エタノール濃度は 11.9%であり、乳酸菌は消失した。一方、速醸区と比較した場合、乳酸菌添加区では Bé、グルコース、ピルビン酸、アミノ酸度は高くなる傾向であった。これらの結果から、乳酸菌添加区は速醸区と比較して酵母による発酵が遅くなることは明らかである。また、乳酸菌

表 3 高温糖化酒母の成分

日数	品温 (°C)	エタノール (%)	Bé	酸度	アミノ酸度	pH	酵母数 (CFU/g)	乳酸菌数 (CFU/g)	グルコース (%)	ピルビン酸 (ppm)
1 日目	30	—	12.8	—	—	5.5	—	9.1×10^4	—	—
乳酸菌添加区										
4 日目	—	—	17.0	5.2	1.7	3.5	8.8×10^4	6.7×10^7	17.0	31.8
酵母添加区										
13 日目	25	11.9	6.6	8.7	1.8	3.2	4.2×10^7	300 >	8.6	849.3
速醸区										
10 日目	25	13.5	4.5	6.8	1.0	3.2	5.8×10^7	—	3.7	565.0

Lactobacillus sakei は、高温糖化酒母に添加することで速やかに酸を産出し、酒母を酸性域に導くことで雑菌の汚染を防ぐとともに、旨味成分であるアミノ酸を増加させることが示唆される。さらに、酵母の増殖に伴うエタノール濃度の上昇によって乳酸菌は消失したことから、乳酸菌 *Lactobacillus sakei* はアルコール感受性を有しており、貯蔵中の酒質劣化や醗の腐造原因となる火落性は無いことが示唆される。

高温糖化酒母の香气成分を表4に示した。乳酸菌添加区では、吟醸香である酢酸イソアミルやカプロン酸エチルの香气成分が検出されたが、速醸区と比較してこれらの香气成分は低かった。これらの結果は、先に示した酵母による発酵の遅れが原因と考えられる。

表4 香气成分 (ppm)

	酢酸エチル	酢酸イソアミル	イソアミル アルコール	カプロン酸エチル
乳酸菌 添加区	37.9	2.5	164.1	1.7
速醸区	72.1	8.3	232.5	2.2

4.2 乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の健康機能性評価

乳酸菌の IL-12 産生促進作用は、乳酸菌の培養条件や加熱処理の有無によって影響を受ける。我々は、乳酸菌 *Lactobacillus sakei* がマウスマクロファージ株化細胞による IL-12 産生を促進するとともに、塩化ナトリウムを添加した MRS 培地で培養するとその作用は高まることを報告している⁴⁾。そこで、本研究では培養時間や加熱処理の有無が乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の IL-12 産生促進作用に及ぼす影響を調べた。

まず、乳酸菌 *Lactobacillus sakei* を 30℃、回転速度 150 rpm、pH6.3 の一定条件下において MRS 液体培地で 10 時間培養した時の L-乳酸、グルコース、および濁度 (OD600) の変化を図3に示した。グルコースは、経時的に減少し、10 時間では消失した。L-乳酸および濁度は、経時的に増加した。

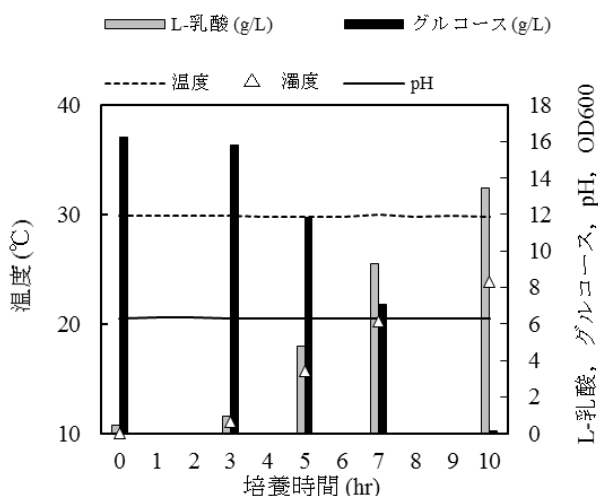


図3 乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の MRS 液体培地における増殖性

培養時間および加熱処理を施した乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の IL-12 産生促進作用を図4に示した。まず、無添加と比較して乳酸菌 *Lactobacillus sakei* 添加では IL-12 濃度は顕著に高まった。また、培養時間が長くなると IL-12 濃度は減少する傾向だった。さらに、生菌と比べて加熱処理を施すことで乳酸菌 *Lactobacillus sakei* による IL-12 産生促進作用は有意に高まることになった (* $p < 0.05$)。これらの結果から、増殖初期の乳酸菌ではより高い IL-12 産生促進作用を示すとともに、加熱処理によりその作用は高まることが示唆される。

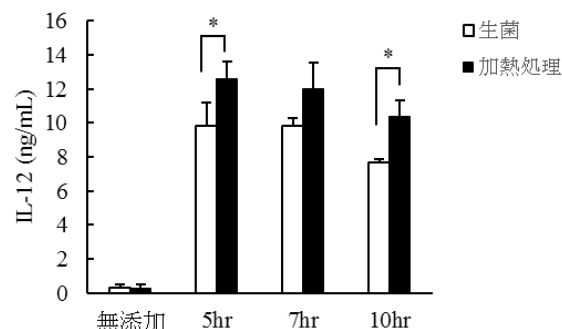


図4 培養時間と加熱処理が乳酸菌の IL-12 産生促進作用に及ぼす影響

5. まとめ

①生醗系酒母造りによる日本酒醸造の安定化を図るために、乳酸の代わりに純粋培養した乳酸菌 *Lactobacillus sakei* を高温糖化酒母に添加して、その酒造適性について検証を行った。その結果、濃糖状態の高温糖化酒母において乳酸菌の増殖と酸度の上昇が観察された。速醸と比べて酵母の発酵は遅れる傾向にあったが、乳酸菌は火落性が無かったことから高温糖化乳酸菌添加酒母として利用が可能であった。

②乳酸菌 *Lactobacillus sakei* の健康機能性評価として、抗アレルギー作用を明らかにするために、マクロファージ細胞からの IL-12 産生に及ぼす影響を検討した。その結果、増殖初期の乳酸菌ほど高い IL-12 産生促進作用を示すとともに、加熱処理によりその作用は高まることが明らかになった。

6. 今後の課題

今後は、米麴、酒母、酒粕などから新たな乳酸菌を分離し、高温糖化酒母への適性を検討するとともに、それら乳酸菌の健康機能性評価を継続して検討していく予定である。

7. 参考文献等

- 岡本竹己, 渡遺英憲, 薪藤高弘: 日本醸造協会誌 1068, 506-514 (2011)
- 国税庁編: 国税庁所定分析法 (昭和36年1月11日 国税庁訓令第1号, 最終改正平19国税庁訓令第6号)
- Strachan DP: Thorax, 55, S2-S10 (2000)
- 飛田啓輔, 岩佐悟, 小田木美保, 武田文宣: ミルクサイエンス, 68, 37-43 (2019)