

真菌混在下での細菌数測定系の確立

柳澤昌臣・渡部貴志・増淵 隆*

Construction of bacteria-counting media for fungal intermingled samples
Masaomi YANAGISAWA, Takashi WATANABE and Takashi MASUBUCHI

清酒造りにおいて、麴米の雑菌汚染はオフフレーバー物質である4-ビニルグアイアコール(4-VG)の生成の要因となっている。また、生酏系酒母造りにおいては、乳酸菌が醪中に残存すると多酸の要因になってしまう。これらのことから、酒造業界から酵母や麴菌などの真菌が混在する条件下で、安価に細菌数を測定する方法の確立が求められている。そこで本研究では、抗真菌性の抗生物質カビサイジンを用い、細菌の生育は阻害せずに真菌の生育だけを抑制する培地条件を検討したので報告する。

キーワード：清酒、麴米、4-ビニルグアイアコール、抗真菌性の抗生物質、培地

In the Japanese sake brewing, microbial contamination of *koji*-rice causes the generation of 4-vinyl guaiacol as an off-flavor. On the other hand, survival lactic acid bacteria in *kimoto* yeast mash causes lots of organic acids *moromi*. Thus, it is needed to construct a low cost bacteria-counting media for fungal intermingled samples. In the present study, we selected Kabicidine, as an antibiotic for fungi, and constructed media condition which did not repress bacterial growth but did fungal growth.

Keywords : Japanese sake, koji-rice, 4-vinyl guaiacol, antibiotic for fungi, media

1 はじめに

清酒や味噌、醤油、納豆、ヨーグルトなどの発酵食品は、様々な微生物の働きにより造られている。したがって、各発酵段階での微生物叢の管理が非常に重要であるが、これまでは職人の長年の経験と勘に依存することが多かった。近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、発酵途中の微生物叢は遺伝子レベルで解析され、微生物が造り出す酵素や代謝産物の生産動態なども少しずつ解明されてきた。

例えば、清酒の煙臭、薬品臭、香辛料臭の原因物質の4-ビニルグアイアコール(4VG)は、原料米由来のフェルラ酸を微生物が出すフェルラ酸脱炭酸酵素により、生成することが知られている¹⁾。また、清酒酵母にはフェルラ酸脱炭酸酵素生産能が無く、麴米の雑菌汚染が4-VG生成の要因になっていることが分かってきた²⁾。また、酒造環境下の乳酸菌を利用する生酏系酒母

造りでは、清酒酵母を添加する前までは乳酸菌を増殖させる必要がある。しかしながら、醪中に乳酸菌が存在していると、多酸性醪になってしまうため、乳酸菌が造り出す乳酸や、清酒酵母が造り出すエタノールにより、醪添加時に乳酸菌を死滅させておく必要がある。

これらのことから、麴米中の細菌数や生酏系酒母の乳酸菌数を計測し、現状を把握することが、各酒造会社の酒質向上に重要な指標となる。一方で、麴米や酒母の中には、細菌だけでなく、酵母や麴菌などの真菌も存在するため、通常的一般生菌数を計測する標準寒天培地などで生育してくる微生物コロニーは、細菌か真菌かを区別することができない。そこで、従来真菌用の抗生物質と言われていたシクロヘキシミドを用い、麴米中の麴菌の増殖を抑制できるか予備試験的に調べてみた。しかしながら、毒物であるアジ化ナトリウムを添加しないものでは全く効果が無く、むしろシクロヘ

キシミドの添加量を増やすと細菌の生育を抑制してしまうことが分かった。

そこで本研究では、近年単離・同定・市販化された抗生物質のカビサイジンに着目し、麴米中の麴菌や生醗系酒母中の酵母の生育を抑制できるか確認し、依頼試験等の技術支援でも扱えるようにコストダウンする手法を検討したので報告する。

2 実験材料と方法

2.1 供試試料

カビサイジンの濃度検討には、平成27年度兵庫県産山田錦40%精米の原料米に、種麴ハイG（樋口松之助商店）を用い、当センターで製麴した麴米を用いた。麴米の細菌数と酵素活性値の関係性の評価には、群馬県内酒造会社に所属する技術者の団体である群馬県醸衆会から集めた麴米24点を用いた。生醗系酒母中の乳酸菌数の測定方法の検討には、群馬県内のA社から山麩醗を採取して用いた。

2.2 使用培地

カビサイジン配合の抗黴培地「ダイゴ」（富士フィルム和光純薬）（50 g/L）をカビサイジンの麴菌抑制効果確認試験に用いた。カビサイジン添加量の検討には、標準寒天培地（栄研化学）（23.5 g/L）を用いた。生醗系酒母の乳酸菌の測定には、BCP加プレートカウント培地（栄研化学）（24.6 g/L）を加温加圧滅菌後、カビサイジンを20 mg力価/1L添加したものをを用いた。

2.3 微生物試験

麴米約10 gに対し、0.9%滅菌生理食塩水90 mLを加え、ストマッカー（エルメックス社）で1分間混合した。得られた混合液をストマッカー袋の不織布を通して濾液を回収し、0.9%滅菌生理食塩水で適宜希釈した後、培地に混釈あるいは塗布した。37℃で24時間培養後に生育してきた細菌のコロニーを計測した。生醗系酒母については、0.9%滅菌生理食塩水で適宜希釈した後、培地に混釈した。37℃で24時間培養後に生育してきた細菌のコロニーの中で、培地が紫色から黄色に変化したハコを形成するものを生酸菌として計測した。

2.4 酵素活性測定

麴米からの粗酵素液抽出は、キッコーマンの酵素力価分析キットに準拠して以下のように行った。麴米5 gを50 mL容ディスポチューブに量り取り、酵素抽出用酢酸buffer 25 mLを加え、20℃、75 rpmで3時間振盪処理を行った。処理液を8000 rpm×5 min遠心分離を行い、0.45 μmのセルロースメンブレンでシリンジ濾過したものを粗酵素液とした。α-アミラーゼ、糖化力（グルコアミラーゼとα-グルコシダーゼの合計値）、および酸性カルボキシペプチダーゼは、キッコーマンの酵素力価分析キットを用いて分析を行った。酸性ホスファターゼは、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質とした方法³⁾で分析を行った。

3 結果と考察

3.1 抗真菌の抗生物質の選定

従来の抗真菌の抗生物質としては、シクロヘキシミドとアジ化ナトリウムの併用であるとされてきた。しかしながら、アジ化ナトリウムは毒物であり、廃棄方法が厳格に規制されているが、微生物試験では膨大な量の培地を使用する。このため、まず予備試験として当センターのパイロットスケール試験醸造で作成した麴米を用い、シクロヘキシミドのみを標準寒天培地に加えて、麴菌生育抑制効果確認試験を行った。その結果、従来のシクロヘキシミド添加量である10 μg/Lの三倍量を加えても、麴菌生育抑制は認められず、むしろ添加量を増やすことによって細菌の生育抑制が引き起こされることが分かった（データ省略）。この結果より、シクロヘキシミドとは別の抗生物質を探索することにした。

金桶は²⁾、麴米の雑菌汚染が清酒の4-VG生成の要因であること明らかにしているが、その際に抗黴培地「ダイゴ」を用いて麴米の細菌数を計測している。そこで、抗黴培地「ダイゴ」の麴菌生育抑制効果確認試験を行ったところ、混釈培養でも麴菌のコロニーは検出されず、抗生物質のカビサイジンの抗真菌効果があり、細菌数を計測することができた（データ省略）。しかしながら、抗黴培地「ダイゴ」を用いた1

つの麴米の分析では、約2,000円もかかるため酒造支援の依頼試験に用いるのが難しいことも明らかとなった。

続いて、一般生菌数の分析に用いられる標準寒天培地にカビサイジンを添加することにより、分析にかかる費用を低減できないか検討することにした。まず、説明書に準拠してカビサイジンにエタノールを加えたものを、加温加圧滅菌後の標準寒天培地に100 mg力価/Lで添加してみたところ、抗黴培地「ダイゴ」と同様の麴菌生育抑制効果と細菌数の生育を抑制しないことを確認した（データ省略）。

しかしながら、エタノールではカビサイジンの不溶性成分が残存し、少量の培地作成には向かないことが分かった。そこで、

溶媒の検討をしたところ、10 mLのジメチルスルホキシド（DMSO）に100 mg力価のカビサイジンが溶解することを確認した。このことより、培地中へのカビサイジンの添加量を検討することが容易となり、従来の5分の1量の20 mg力価/mLまで減らしても、麴菌の生育抑制が可能であることを確認した（図1）。これらの検討結果により、1つの麴米の分析にかかる培地の費用は約300円まで低減できた。

さらに、生酸菌数計測用のBCP加プレート寒天培地にカビサイジンを添加することにより、山麴配中に存在する酵母の生育を抑制し、乳酸菌等の生酸細菌を計測できることが確認できた（図1）。

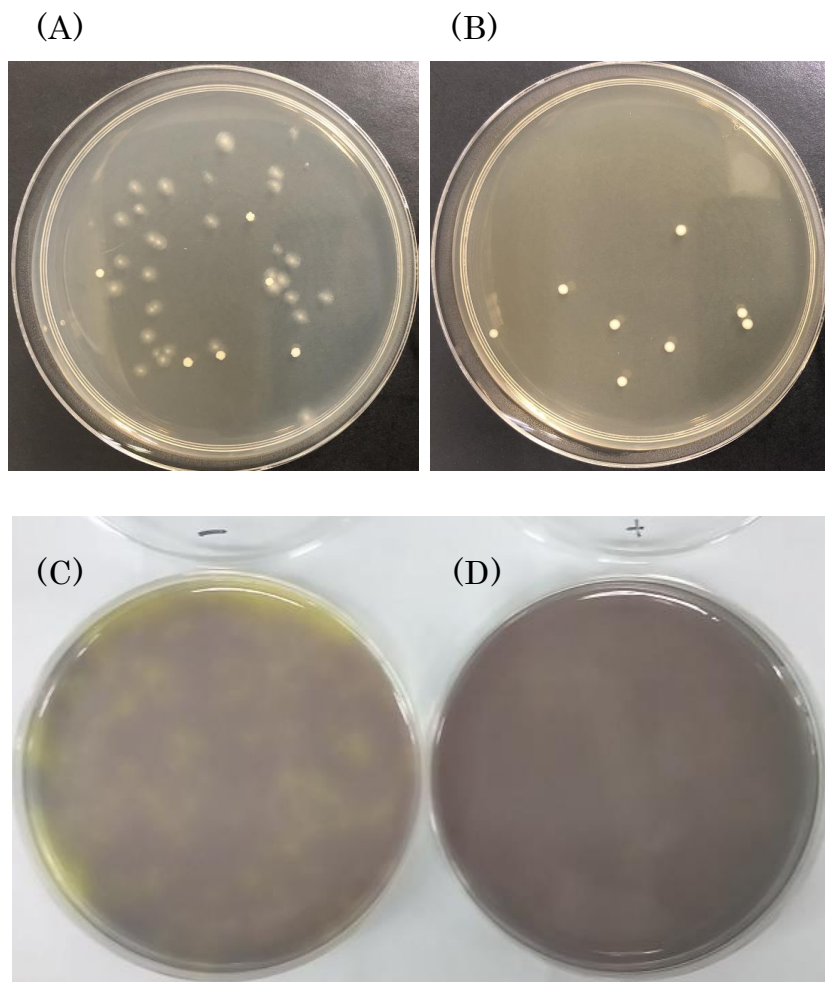


図1 カビサイジン添加の有無による真菌の抑制効果

(A) カビサイジン無添加での麴米の分析、(B) カビサイジン添加での麴米の分析、(C) カビサイジン無添加での山麴配の分析（黄色のハロが酵母）、(D) カビサイジン添加での山麴配の分析

3. 2 麴米の雑菌汚染と酵素力価

麴菌が生産する各種酵素は、掛米を溶解させて清酒酵母にグルコース、窒素源、ビタミン、微量金属等を供給する重要な役割がある。従って、品質の良い麴米を造ることは、清酒造りに重要な技術であり、酵素力価が評価基準の1つである。つまり、各種審査会の出品酒対策としても、麴米の酵素力価を把握し、目標の酒質になるように醗経過を管理することが重要となっている。

一方、麴米の雑菌汚染と4-VG生成の関連性は報告されているが²⁾、雑菌汚染と酵素力価との関連性を評価した報告例はない。そこで、群馬県醸衆会から出品酒用の麴米を集め、細菌数と各種酵素の分析を行なうことにした。

α -アミラーゼは、原料米のデンプンの α -グルコシド結合をランダムに加水分解し、マルトースを切り出してくるエンド型酵素で、液化酵素ともいわれている。また、糖化力はデンプンの α -グルコシド結合を端から加水分解し、グルコースを切り出してくるエキソ型酵素のグルコアミラーゼと、マルトースの α -グルコシド結合を加水分解し、グルコースを切り出す α -グルコシダーゼからなるものである。これらのアミラーゼ系酵素は、清酒酵母にグルコースを供給する働きがあるが、今回用いた麴米の分析では、細菌数との関連は認められなかった（データ省略）。

一方、酸性カルボキシペプチダーゼは、ペプチド鎖のカルボキシル末端からアミノ酸を切り出してくる酵素であり、酸性プロテアーゼとともに掛米から酵母に窒素源を供給する働きがある。今回用いた24点の麴米分析では、信頼性が低いが、酸性カルボキシペプチダーゼ活性と細菌数と弱い正の相関があった（図2）。なお、プロテアーゼ系の酵素は、細菌の至適増殖温度の35℃付近で生産されると言われており、何らかの影響があるのかも知れない。

また、酸性ホスファターゼは、原料米のリン化合物から無機リン酸を加水分解し、清酒酵母にリンを供給する働きがあるが、麴米分析で調べられることはほとんど無い。今回の分析でも、酸性ホスファターゼ活性と細菌数の関連性は認められなかったが、

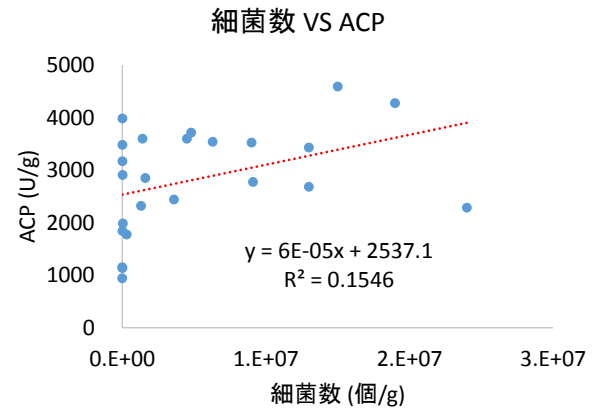


図2 細菌数と酸性カルボキシペプチダーゼ（ACP）の関係性

他の酵素活性とは正の相関性があったため（データ省略）、麴菌の増殖の目安になると考えられた。

4 まとめ

本研究では、清酒造りに重要な麴米の雑菌汚染と生醗系酒母の乳酸菌の消息を把握するため、抗真菌性の抗生物質を用いた細菌数の測定系を確立した。カビサイジンがDMSOに溶解することを見出し、1つの麴米の分析にかかる費用を、抗黴培地「ダイゴ」の約7分の1まで低減でき、依頼試験等の技術支援でも扱えるようになった。

謝 辞

群馬県醸衆会会員の皆様には、出品用の麴米を提供して頂いた。

文 献

- 1) 向井伸彦ら：日本醸造協会誌、967-975（1998）
- 2) 金桶光起：日本醸造協会誌、320-326（2014）
- 3) Takashi Watanabe et al.,: Journal of Bioscience and Biotechnology. 225-230（2009）