

[生物工学会誌 第82巻 第5号 183-190, 2004]

米麴からの低温発酵性 *Leuconostoc citreum* の分離と諸性質

黒瀬 直孝*・浅野 忠男・川北 貞夫・垂水 彰二

宝酒造株式会社
〒520-2193 滋賀県大津市瀬田 3-4-1

(平成16年2月4日受付 平成16年3月10日受理)

Isolation and Characterization of Psychotrophic *Leuconostoc citreum*
Isolated from Rice KojiNAOTAKA KUROSE,* TADAO ASANO, SADA O KAWAKITA, and SHOJI TARUMI (*Takara Shuzo Co., Ltd., Seta 3-4-1, Otsu, Shiga 520-2193*) *Seibutsu-kogaku* **82**: 183-190, 2004.

Three strains of lactic acid bacteria able to cause fermentation at a low temperature were isolated from rice koji for sake brewing. The one producing the most lactic acid at 4°C, NL7-3, was identified as *Leuconostoc citreum* by means of ribopatterns and the homology of 16S rDNA. This strain produced D(+)-lactic acid from citric acid as well as glucose, and showed alcohol sensitivity as well as antibacterial activity, inhibiting the growth of similar lactic acid bacteria. In sake mash brewed with viable cells of the strain instead of lactic acid, it produced lactic acid in the early period, and all bacteria cells died in the middle period. The sake thus brewed contained lactic acid, a reduced amount of citric acid, and slight amounts of malic acid in proportion to the amount of cells added. From these results, it was clear that there are *L. citreum* strains which, like *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc mesenteroides*, are capable of growing at 4°C, and which can produce bacteriocins and convert the citric acid produced by koji to D(+)-lactic acid in the seed mash of sake.

[Key words: *Leuconostoc citreum*, low-temperature, antibacterial activity, citric acid]

清酒醸造に関与する有用乳酸菌として、古典的な生もと系酒母で自然発生する球菌の *Leuconostoc mesenteroides* や桿菌の *Lactobacillus sakei* が知られている。¹⁾ 生もと系酒母では、醪に乳酸を添加せず、自然発生する乳酸菌によって生成される乳酸で雑菌の抑制を行い、酵母の純粋培養を導くものである。生もと系酒母中での乳酸菌の挙動については古くから多くの研究が成されており、定説として低温環境下での生育が速い *L. mesenteroides* が先に生育し、少し遅れて *L. sakei* が生育するといわれている。^{2,3)} 生もと系酒母で生育することができる乳酸菌は、これら2種のみとされているが、これは4°Cという低温

においても生育可能であるという特徴を有しているためであると考えられている。⁴⁾ このような生もと系乳酸菌は、生もとや山廃もとから分離されている⁵⁻⁹⁾ が、百瀬ら⁶⁾ は最近の生もと系酒母からは *L. sakei* が検出されない場合もしばしばあることを報告している。また、生もと系酒母にこれら2種以外の乳酸菌が存在することも示唆されているが、生もと系乳酸菌に匹敵するような低温発酵性乳酸菌の分離については報告がない。

本報では、清酒用の米麴から、4°Cで良好に生育し、かつ乳酸を著量生成する乳酸菌を分離し、その分離株の同定および生もと系乳酸菌の標準株との諸性質の比較検討を行ったので報告する。

実験方法

分離源および分離方法 当社清酒工場 (N工場およ

*連絡先, Corresponding author.
TEL. 077-543-7211 FAX. 077-543-7286
E-mail: kurosen@takara.co.jp

Table 1. List of rice koji as resources for isolating lactic acid bacteria.

Sample no.	Factory	Polished rate (%)	After 7-d incubation at 15°C ^a		
			pH	Total acid (ml)	Amino acid (ml)
1	N	45	3.60	3.4	1.8
2	N	60	3.56	4.4	1.7
3	N	60	3.49	4.9	1.7
4	F	60	3.68	4.3	2.7
5	F	60	3.68	4.2	2.3
6	F	60	3.64	4.1	2.1
7	N	65	3.66	3.9	2.3
8	F	70	5.12	0.6	2.9

^a Five grams of rice koji was incubated after addition of 15 ml of water.

びF工場)から採取した精米歩合の異なる米麹8点を乳酸菌の分離源とした(Table 1). 米麹5.0 gに15 mlの蒸留水を添加して, 15°Cで7日間培養した後, 酸度が上昇した培養液をGYP(2%グルコース, 1%酵母エキス, 1%ポリペプトン)-炭酸カルシウム(1%)寒天培地に接種し, 30°Cで3日間培養した. 出現したコロニーを米麹ごとに5株ずつ釣菌し, 新しい同培地に接種して4°Cで14日間培養し, 生育してかつ大きなクリアゾーンを形成したコロニーを低温発酵性乳酸菌として選択した.

生理的試験 分離した乳酸菌について, GYP液体培地(10 ml)を用いてpH耐性, アルコール耐性, 低温生育性を調べた. また, GYP-炭酸カルシウム寒天培地をベースに, グルコースを他の糖(1%)に変えた寒天培地を作製し, 乳酸菌の前培養菌体を滅菌生理食塩水で洗浄した後, 種々の糖を含む寒天培地に接種して, 30°Cで3日間培養し, クリアゾーンの形成を指標に糖類の発酵性を調べた.

菌株の同定 乳酸菌の同定は遺伝子フィンガープリント解析(リボプリントパターン解析)と16S rDNAの相同性解析によって行った. リボプリントパターン解析は, リボプリンター™システム(Qualicon社製, 米国)を用い, デュポン・アイデンティフィケーション・データベース(DuPont ID)に対してリボパターンの相同性が高い菌株を検索した. 16S rDNA解析は, PCR法により増幅した16S上流の約500 bpの部分塩基配列をMicroSeq™ Microbial Identification System(Applied Biosystems社製, 英国)を用いて解析し, MicroSeq™ Bacterial 500 Libraryに対して塩基配列の相同性の高い菌株を検索した.

クエン酸の発酵試験 GYP液体培地のグルコース

(1%)をクエン酸(500 ppm)に代えたCYP培地を用いて15°Cにおける乳酸菌のクエン酸資化と乳酸生成を調べた. 培地中のクエン酸と乳酸はF-キット(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて定量した.

抗菌活性 乳酸菌の他の細菌に対する抗菌活性は, Kawaiら¹⁰⁾の方法に準じて行った. すなわち, 乳酸菌のGYP液体培地での培養上清を1N NaOHで中和した後, 滅菌済メンブランフィルター(0.45 μm)を通して除菌し, 24穴マイクロプレートのウェルに1 mlとり, これに他の細菌のGYP液体培養液を10 μl(1%容量)添加して, 30°Cで3日間培養した. 接種した細菌が生育しない場合に, 抗菌活性があると判定した.

清酒小仕込試験 清酒はTable 2に示す仕込配合で三段仕込を行った. 掛米と麴米は65%精白米を使用した. 酵母はきょうかい酵母701号(日本醸造協会)の培養酵母を使用した. 初添の水麴時に醸造用乳酸を入れたものを対照とし, 乳酸を入れないで乳酸菌の培養菌体を種々の菌数で添加する試験区を設けた. 品温は最高で13°Cに設定した. 上槽は遠心分離法で行い, 上槽酒の成分分析は国税庁所定分析法¹¹⁾に従って行った. 有機酸の定量は高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製)を用いて行い, L-乳酸およびD-乳酸の分析にはF-キットを用いた.

結 果

低温発酵性乳酸菌の分離 8種の米麹の15°Cにおける培養液のpHおよび酸度を測定した結果, 7種の米麹の培養液で酸度が上昇しており, 乳酸菌が増殖していることが予想された(Table 1). これら7種の米麹培養液をGYP-炭酸カルシウム寒天培地に接種して30°Cで培養し, クリアゾーンを形成したコロニーを5株ずつ分離し

Table 2. Amounts of materials used for sake brewing.

	Addition			
	Initial	Intermediate	Final	Total
Total rice (g)	184	314	502	1000
Additional rice (g)	124	248	428	800
Koji rice (g)	60	66	74	200
Water (ml)	268	358	648	1274
Lactic acid (g)	1.14			1.14

The additional and koji rice were polished to 65% of original weight.

The yeast cells were cultured in 50 ml of YPD medium at 30°C for 24 h with shaking, collected by centrifugation, and used in the sake brewing test.

た. 分離した35株の乳酸菌を新しい同培地に接種し、4°Cで14日間培養した. 良好にコロニーを形成し、かつ清酒の酒母から分離されたことが記載されている2種の乳酸菌の標準株 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM1564 および *Lactobacillus sakei* JCM1157^T) よりも大きなクリアゾーンを形成した3株, NL1-3 (米麴 No.1 由来), NL2-2 (米麴 No.2 由来), およびNL7-3 (米麴 No.3 由来) を選択した.

この3株の中で4°CにおけるGYP-炭酸カルシウム寒天培地でのクリアゾーンの面積が最も大きかったNL7-3株について、GYP 液体培地で培養してグルコースの消費量を調べた. その結果、NL7-3 株は4°C から15°Cの低温域においても、*L. sakei* の標準株よりもグルコースの消費が速いことがわかった (Fig. 1).

分離株の諸性質 4°C で生育可能なNL7-3 株について、生もと系乳酸菌の標準株と諸性質を比較した結果を Table 3 にまとめた. NL7-3 株は短桿菌に近い長円状

の形態をしており、キシロース、マンニトールおよびメリビオースの発酵性がない点や pH 4.0 で生育する点は *L. sakei* に類似していた. しかしながら、グルコース培地

Table 3. Characteristics of strain NL7-3 isolated.

Characteristics	NL7-3	JCM1157 ^a	JCM1564 ^b
Cell shape	Oval cocci	Rods	Cocci
Gram stain	+ ^c	+	+
Catalase production	—	—	—
CO ₂ from glucose	w	—	w
Growth at 4°C	+	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	—
Growth in 7.5% ethanol	—	—	—
Fermentation of sugars			
Glucose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
D-Ribose	—	+	—
D-Xylose	—	—	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	—	—	—
Sucrose	+	+	+
Treharose	+	—	+
Raffinose	—	—	—
Melibiose	—	—	+
Mannitol	—	—	+
Sorbitol	—	—	—
Utilization of citrate	+	—	—
Optical form of lactic acid	D(—)	DL	D(—)

^a *Lactobacillus sakei*.

^b *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

^c +, Positive; w, weakly positive; —, negative.

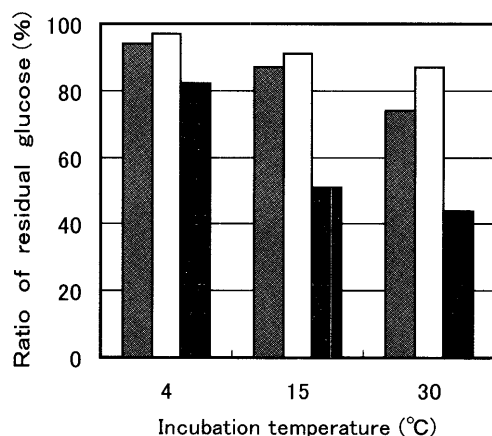


Fig. 1. Glucose consumption in GYP medium. *Lactobacillus sakei* IFO12456 (▨), JCM1157^T (□), and strain NL7-3 (■) were incubated in GYP medium at 4, 15, and 30°C for 25, 7, and 5 d, respectively.

で炭酸ガスを発生させる点, D-リボースを発酵せず, トレハロースを発酵する点, およびD-乳酸を生成する点などでは, *L. mesenteroides* に類似していた. また, エタノールに対する耐性は生もと系乳酸菌の標準株2種と同レベルで低かった. 一方, NL7-3株はクエンを資化する点で, いずれの標準株とも異なった. このように, 糖発酵性やその他の生理的試験の結果からは, NL7-3株は *L. mesenteroides*, *L. sakei* のいずれとも同定できなかった.

分離株の分子系統解析での同定 生もと系乳酸菌の標準株のいずれとも合致しない NL7-3 株について, 遺伝子レベルでの解析によって属種を決定した. リボパターンの相同性がライブラリーの中で最も高い 0.97 を示した菌株は, *Leuconostoc citreum* DUP-9513 であった (Fig. 2). また, NL7-3 株の 16S rDNA の 535 bp の塩基配列の相同性が最も高い相同性を示したのも *Leuconostoc* 属であった (相同性, *L. citreum* [99.81%]; *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* [97.38%]; *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* [97.38%]; *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* [97.20%]; *L. pseudomesenteroides* [97.20%]). これらの結果から, NL7-3 株は *L. citreum* であると同定した.

クエン酸発酵性 NL7-3 株と *L. sakei* の標準株2菌

株についてクエン酸を炭素源とする CYP 液体培地に接種して 15°C で培養し, クエン酸濃度と乳酸濃度の経時変化を調べた (Fig. 3). その結果, *L. sakei* の培養液ではクエン酸がほとんど減少しなかったのに対し, NL7-3 株の培養液では急速にクエン酸が減少して乳酸が増加した. このように, NL7-3 株はクエン酸を乳酸に変換できるクエン酸発酵性を有していることがわかった.

抗菌活性 NL7-3 株の GYP 培養液を中和し, メンブランフィルターで除菌して作製した培地に, 乳酸桿菌 9 株, 乳酸球菌 6 株の標準株の GYP 培養液を 1% 量接種して 30°C で培養した. Table 4 に使用した標準株とその生育結果を示したが, 桿菌 9 株中で 8 株が生育しなかつ

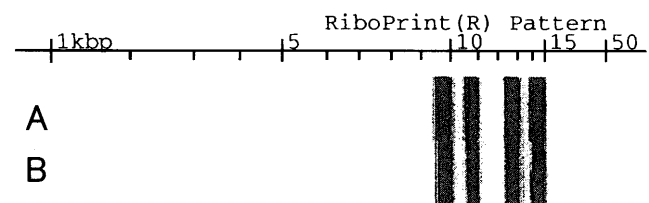


Fig. 2. Grayscale RiboPrint patterns of *Leuconostoc citreum*. RiboPrint patterns of *L. citreum* DUP-9513 (A) and strain NL7-3 (B) were analysed with the RiboPrinter system.

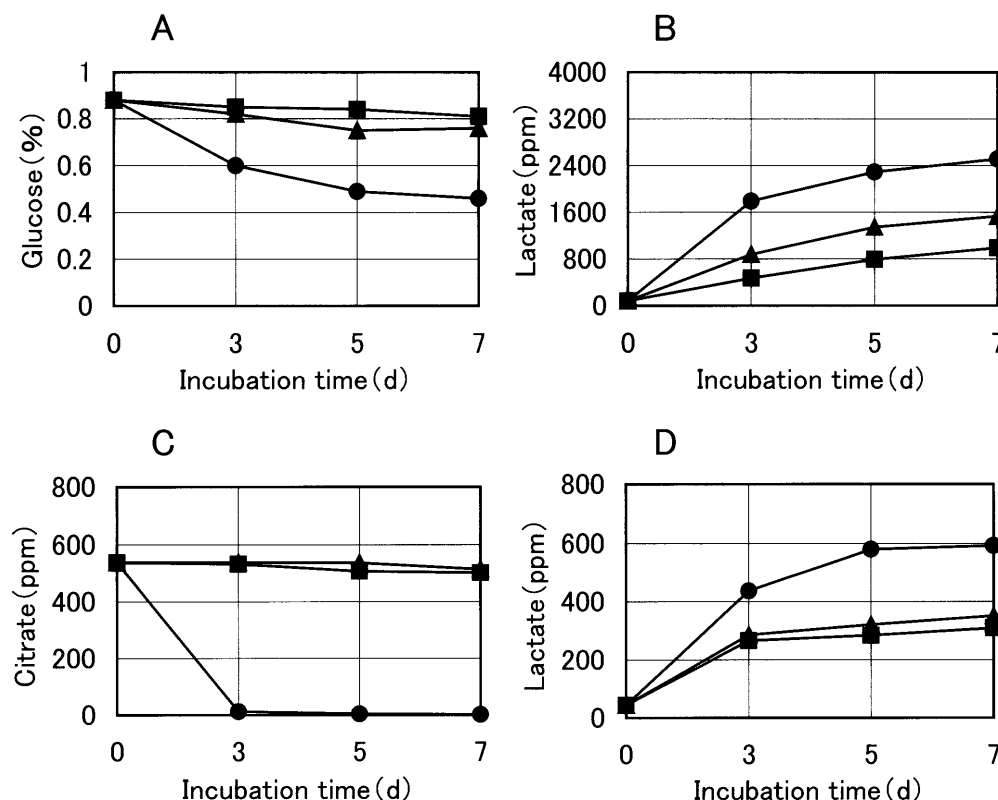


Fig. 3. Lactate production from glucose and citric acid. *Lactobacillus sakei* IFO12456 (▲), JCM1157T (■), and strain NL7-3 (●) were incubated in GYP (A and B) and CYP (C and D) medium at 15°C for 7 d.

Table 4. Antibacterial activity of antibacterial substance produced by strain NL7-3.

Strain		Growth ^a in GYP medium	Growth ^a in supernatant of neutralized NL7-3 culture
None		— ^b	—
<i>Lactobacillus sakei</i>	IFO 12456	+	—
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	JCM 1157 ^T	+	—
<i>Lactobacillus sake</i> subsp. <i>sake</i>	IAM 1900	+	+
<i>Lactobacillus sake</i> subsp. <i>sake</i>	IAM 10077	+	—
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	IAM 10062	+	—
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	IAM 12473	+	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IAM 10074	+	—
<i>Lactobacillus plantarum</i>	IAM 1041	+	—
<i>Lactobacillus plantarum</i>	IAM 12477	+	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	IFO 3832	+	w
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	IFO 12060	+	w
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	JCM 1564	+	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> var. <i>sake</i>	IAM 10060	+	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> var. <i>sake</i>	IAM 10069	+	—
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	IFO 12007	+	+

^a Strains were incubated with 1% inoculum at 30°C for 3 d.^b +, Positive; w, weakly positive; —, negative.

Table 5. Antibacterial activity against strain NL7-3 of antibacterial substances produced by various lactic acid bacteria.

Strain		pH of neutralized culture supernatant	Growth ^a of strain NL7-3 in supernatant of respective strain
None (GYP medium)		5.86	+ ^b
NL7-3		6.95	+
<i>Lactobacillus sakei</i>	IFO 12456	6.74	—
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	JCM 1157 ^T	6.81	—
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	IAM 10062	6.98	—
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	IAM 12473	6.88	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	JCM 1564	6.83	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> var. <i>sake</i>	IAM 10060	6.78	—
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	IFO 12007	6.77	+

^a Strains were incubated with 1% inoculum at 30°C for 3 d.^b +, Positive; —, negative.

た。また、球菌 6 株中で 3 株が生育しなかった。*L. sakei* の 5 株の中では、1 株のみ生育したが、4 株は生育が抑えられた。*L. mesenteroides* 5 株の中では、3 株の生育が抑えられ、また残りの 2 株についても生育が悪かった。

一方、種々の乳酸菌の GYP 培養液を中和し、メンブランフィルターで除菌して作製した培地に NL7-3 株の GYP 培養液を 1% 量接種して 30°C で培養した。その結果、

試験した *L. sakei*, *L. casei* および *L. mesenteroides* (各 2 株) の培養液の中和後除菌液では NL7-3 株は生育しなかった (Table 5)。

NL7-3 株の清酒醪中での挙動 NL7-3 株には低温での乳酸発酵性や他の乳酸菌に対する抗菌活性があること、およびアルコール耐性が低いことがわかったので、清酒醸造の初添工程で醸造用乳酸を添加する代わりに

NL7-3 株の培養菌体を汲水 1 ml あたりに 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 および 1×10^6 個になるように添加し、清酒醪中で乳酸菌がどのような挙動をとるか、また製成酒の成分がどのように変化するのかを検討した。初添で乳酸菌を汲水 1 ml あたり 10^4 個以上添加した試験区では、留添時に酸度が醸造用乳酸を添加した対照とほぼ同等になった。また、いずれの乳酸菌添加区においても、留後 4 日付近で乳酸菌数が最高になり、留後 10 日にはほぼ死滅していた (Fig. 4)。

留後 19 日での上槽酒を分析すると、乳酸あるいは乳酸菌の添加に関わらず、日本酒度、アルコール、アミノ酸度はほぼ同等の値を示した。pH と酸度は乳酸菌の添加量に応じて変化し、乳酸菌の添加菌数が多いほど pH は低下し、酸度は上昇した。対照と最も近い酸度を示したのは、乳酸菌を 10^4 個添加した試験区であった。また、乳酸菌を 10^5 個以上添加した試験区では、酵母が生成する低沸点香気成分の中で、特に酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルなどのエステル生成濃度が低下した (Table 6)。上槽酒の有機酸組成を測定した結果、乳酸菌添加区ではクエン酸が消失し、リンゴ酸がやや減少した。また、乳酸菌の添加量に応じてピルビン酸、乳酸および酢酸が増加した (Fig. 5)。乳酸の旋光度は、乳酸菌の添加に従って D 型が増加した (Fig. 6)。乳酸を添加した対照と酸度が近い 10^4 個添加試験区の上槽酒は、対照に比べて酸味がソフトで味のふくらみがあり、官能的

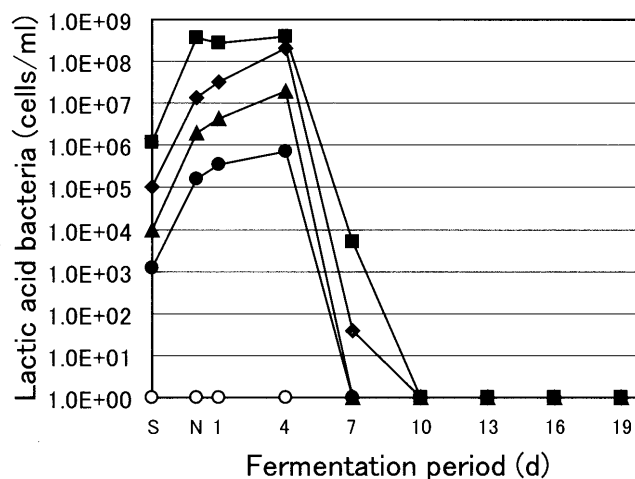


Fig. 4. Viable cells of lactic acid bacteria in sake mash with strain NL7-3 added. In the initial addition, lactic acid (○) as control, 1×10^3 (●), 1×10^4 (▲), 1×10^5 (◆), and 1×10^6 (■) cells of strain NL7-3 per ml of water were added. Lactic acid bacteria were measured by colony formation on GYP medium with calcium carbonate. The day of final addition is shown as day 1, the initial addition as S, and the intermediate addition as N.

な評価は高かった。

考 察

乳酸球菌 *L. citreum* は 10°C 以下の低温での生育に関する報告はなく、その標準株 JCM9698^T は 4°C での生育がきわめて緩慢であった。今回、この種に属する乳酸菌

Table 6. Analysis of sake brewed with lactic acid bacteria.

	Control	Strain NL7-3 added (cells/ml of water)			
		1.0E+03	1.0E+04	1.0E+05	1.0E+06
Sake meter	+8.0	+9.5	+7.0	+7.0	+6.5
Alcohol (%)	19.4	19.6	19.0	19.1	19.2
pH	4.34	4.40	4.24	4.09	4.02
Total acidity (ml)	2.5	2.1	2.7	3.6	4.2
Amino acidity (ml)	2.1	2.0	2.2	2.1	2.1
Aromatic component					
Ethyl acetate (ppm)	82.6	95.4	73.5	44.3	43.0
<i>n</i> -Propyl alcohol (ppm)	51.1	49.2	42.3	39.5	39.8
Isoamyl acetate (ppm)	5.9	6.9	4.8	2.6	2.2
Isobutyl alcohol (ppm)	77.2	91.2	79.9	66.1	60.9
Ethyl caproate (ppm)	0.7	0.8	0.6	0.4	0.4
Isoamyl alcohol (ppm)	185.8	196.1	182.4	158.9	150.2

In the initial addition for the small-scale sake brewing test, cells of strain NL7-3 were added without addition of lactic acid as control.

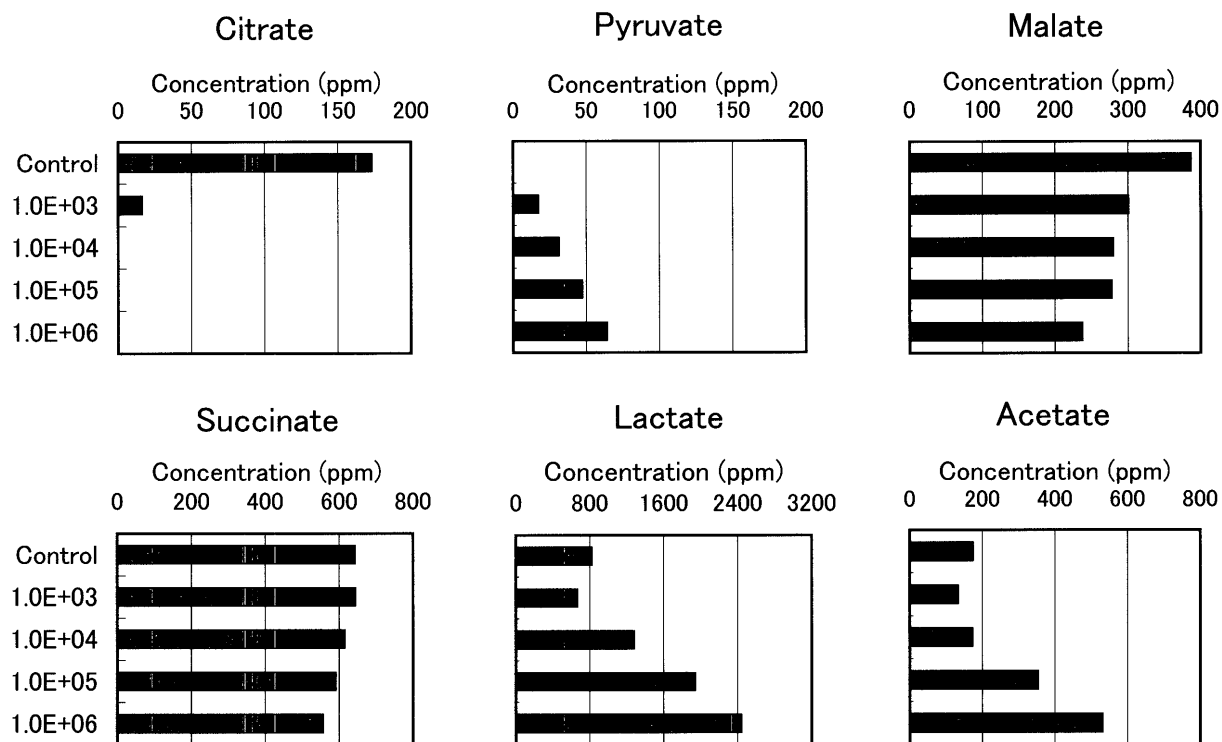


Fig. 5. Concentration of organic acid components in sake brewed. In the initial addition for the sake brewing test, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , and 1×10^6 cells of strain NL7-3 per ml of water were added without addition of lactic acid as control. The concentration of organic acids in sake was determined by HPLC.

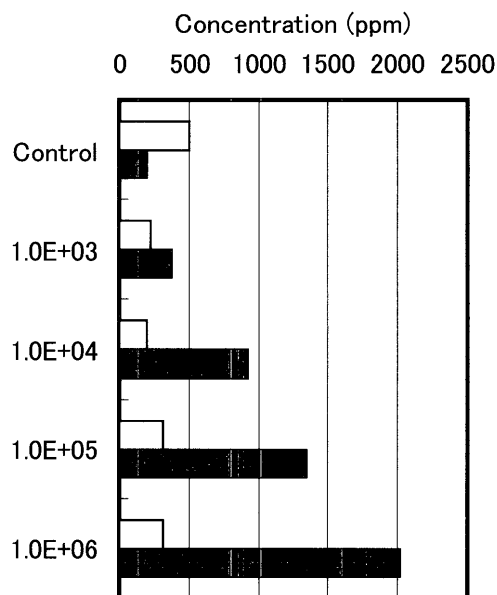


Fig. 6. Optical form of lactic acid in sake brewed. In the initial addition for the sake brewing test, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , and 1×10^6 cells of strain NL7-3 per ml of water were added without addition of lactic acid as control. The optical form (L(+), □; D(-), ■) of lactic acid was analyzed using an F-kit.

であって低温 (4°C) で良好に生育し, 生もと系乳酸菌の標準株よりも乳酸を高生成する分離株 (NL7-3) を取得した. Bergey's Manual 第9版¹²⁾ では, *L. citreum* の形態について「sometimes short rods with rounded ends」と記載され, 球菌でありながら短桿菌様の楕円状をしているという特徴がある. また, Takahashiら¹³⁾ は, *L. citreum* は *Leuconostoc amelibiosum* ときわめて近縁で, いずれの種も pH 4.8 で生育し, また 15°C で生育することを報告している. NL7-3 株が *L. sakei* と同程度の低温発酵性, アルコール耐性および pH 耐性を有していたことは, 生もとや山廃もと中で生育する乳酸菌は *L. mesenteroides* と *L. sakei* の2種に限られず, *L. citreum* も増殖する可能性があることを示唆している. これらの菌株はお互いに抗菌活性を有しており, 菌株の組合せによっては酒母中で先に生育した菌株が優位にたち, 酒母中の菌叢に影響を与えるものと考えられる. その結果, 乳酸桿菌が増殖しない生もと系酒母が製造される可能性も考えられる.

低温発酵性の *L. citreum* NL7-3 を, 固形酵母仕込の初添水麴で添加した清酒は, 留添時には乳酸を添加した対照とほぼ同等の酸度となった. これは, 7~8°C の品温に制御する仲添, 留添の間に NL7-3 株が良好に生育し, 乳酸を生成したことを示している. NL7-3 株に抗菌活性が

ある点や留添時にすでに対照と同じ酸度になっていることから、醪の雑菌汚染の可能性は低いと考えられた。醪中の乳酸菌の菌数は留後10日でほぼ死滅していたが、これはNL7-3株のアルコール耐性から判断して、酵母による生成アルコールによるものであると考えられる。製成酒の有機酸分析の結果、乳酸菌添加清酒ではクエン酸が顕著に低下し、リンゴ酸もやや減少した。この現象はワインにおけるマロラクティック発酵に似ている。また、製成酒の乳酸はD型の生成比率が極端に増加したが、乳酸に関しては旋光度の違いによる官能的な差は認められていない。NL7-3株添加清酒は、有機酸組成の著しい変化によるためか、対照に比べて官能的には酸味がソフトで、味にふくらみが感じられた。これらの結果から、低温発酵性 *L. citreum* が生もと系酒母において増殖した場合は、D-乳酸の比率が高くなることに加えて、クエン酸の含有量が低くなることが推察できる。そのため、生もと系酒母中で優先的に増殖する乳酸球菌が *L. mesenteroides*, *L. citreum* かによって、生もと系酒母の酸味成分が多様化する可能性が考えられた。

要 約

清酒工場で製造した米麹から、生もと系乳酸菌の標準株と同等以上の低温発酵性を有する乳酸菌を3株分離した。そのうちの1株(NL7-3)は、リボプリントパターン解析および16S rDNA解析の結果から、*Leuconostoc citreum* であると同定した。分離株NL7-3は低温でのD-乳酸の生成能が高く、またクエン酸を資化して乳酸を生成した。類似の乳酸菌に対する抗菌活性も有していた。固形酵母仕込の初添で乳酸の代わりにNL7-3株を添加

した清酒は、留添で酸度が乳酸添加の対照と同等になり、正常な発酵を示した。製成酒の有機酸分析の結果、クエン酸が顕著に低下し、リンゴ酸もやや減少した特徴的な有機酸組成を呈し、官能的には対照の乳酸添加清酒に比べて酸味がソフトで味にふくらみが感じられた。これらの結果から、生もと系乳酸菌と同様に4°Cという低温で生育できる *L. citreum* が存在し、これが優先的に生もと系酒母で増殖した場合には、D-乳酸の比率が高くなることに加えて、クエン酸が減少した酒質になると考えられた。

文 献

- 1) 片桐英郎, 北原覚雄: 農化, **10**, 965-969 (1934).
- 2) 芦沢 長, 斎藤孔男: 醸協, **61**, 638-642 (1966).
- 3) 芦沢 長, 斎藤孔男: 醸協, **61**, 1033-1037 (1966).
- 4) 大林 晃, 北原覚雄: 農化, **33**, 839-843 (1959).
- 5) 豊田 泰, 岡田早苗, 小崎道雄, 北原覚雄: 農化, **53**, 247-254 (1979).
- 6) 百瀬洋夫, 鎌尾敦子: 醸協, **88**, 76-80 (1993).
- 7) 吉沢 淑, 服部一成, 進藤 斉, 角田潔和, 小泉武夫: 醸協, **90**, 953-958 (1995).
- 8) 百瀬洋夫, 藤倉寛子: 醸協, **91**, 834-837 (1996).
- 9) 恩田 匠: 醸協, **98**, 148-151 (2003).
- 10) Kawai, Y., Saito, T., Uemura, J., and Itoh, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 179-182 (1997).
- 11) 注解編集委員会編: 第四回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, 東京 (1993).
- 12) Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., and Bergey, D.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, p.529, Williams and Wilkins, Baltimore (1994).
- 13) Takahashi, M., Okada, S., Uchimura, T., and Kozaki, M.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 649-651 (1992).