

乳酸菌と酵母の共存と共生

古川 壮一¹・片倉 啓雄²

世界各地の伝統的発酵において、乳酸菌と酵母が共存する例は数多く知られている¹⁻⁹⁾。乳酸菌と酵母の生態や生育環境は類似しているため相性は良く、共に協力しながら適応・進化してきたものと思われる。そしてそれが私たちにとても都合の良いものであったため、今に至るまで受け継がれてきたのであろう。

我が国の伝統的発酵においても、日本酒や醤油などに乳酸菌が存在することは1908年の江田らの報告をはじめとする多数の研究があり¹⁰⁻¹⁹⁾、酵母を主体とするような発酵であっても、乳酸菌がその結果に重大な影響を与えていることは古くから推察されていた。

そこで本講座では、本邦における関連の古典研究から最近の研究までを概観し、特に醸造や伝統的発酵における酵母と共存する乳酸菌の役割を解説した上で、より一般的な観点から乳酸菌と酵母の相互作用について論じたい。

伝統的発酵における乳酸菌と酵母の共存

日本酒の伝統的な生酛造りについては、古くから研究がなされ、そこにはさまざまな微生物が関与していることが知られている^{7,19-24)}。近代の日本酒醸造は、乳酸を添加して酵母を培養した速酛酛を用いて行われることが多い。これに対して生酛造りにおいては、低温で酒母を培養することにより、まず硝酸還元菌の生育を促して亜硝酸を生成させ、次いで *Leuconostoc mesenteroides* や *Lactobacillus sake* などの乳酸菌を優占させることにより乳酸を生成させる。これにより、乳酸と亜硝酸との相乗作用によって野生酵母を含む雑菌を死滅させ、清酒酵母が優占できる環境を整える。このように、伝統的な生酛造りにおいては、乳酸菌が酵母の生育を助ける役割を果たしている。

微生物の共培養に関しては、Woodsが1953年にその研究の重要性を指摘して以来多くの関心を集め²⁵⁾、1954年にはChallinorらにより乳酸菌と酵母の共培養に関する先駆的な研究成果が発表された²⁶⁾。そこでは、ニコチン酸やチアミンを欠く培地では生育できない乳酸菌が、酵母との共培養で生育するなど、当時としては画期的な成果が報告されている。

わが国では、1956年に伊藤らにより日本酒酵母同士の混合培養実験が報告された²⁷⁾。次いで、日本酒由来の乳

酸菌と酵母の共培養に関する先駆的な研究が為され^{28,29)}、ここでも清酒酵母が清酒乳酸菌の要求するニコチン酸を分泌することなどが明らかにされている。1961年にはNakamuraらが、乳酸菌と酵母の共培養では互いの存在がそれぞれの菌数に影響を及ぼし、その傾向は培地成分にも影響を受けることを示している³⁰⁾。

その後、百瀬や角野らにより、日本酒もろみ由来の乳酸菌と清酒酵母を共培養すると、酵母の生育や呼吸能が低下することなどが報告されている³¹⁻³⁷⁾。また、百瀬らは、腐造日本酒もろみ由来の乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* と清酒酵母を共培養した際に、それらが顕著に共凝集することを偶然に発見した³⁸⁻⁴²⁾。

ところで、日本酒酒母の発酵過程では、多量の泡が発生し、これは高泡と呼ばれる。高泡はもろみの実容量の1.5倍にも達することがあるため、もろみの仕込み量は容器の半分以下にせざるを得ず、その昔は泡を消すための不寝番までつけていた⁴³⁻⁴⁵⁾。1963年に秋山らにより、島根県の醸造所のもろみから高泡をつくらない酵母菌株が初めて分離された。高泡のないもろみについては、すでに1916年に高橋により報告されていたが⁴⁶⁾、当該酵母の分離は画期的な業績であった。ただ、その酵母でつくられた酒は酸が多く、香りも立たないなどの理由から、実際の清酒醸造に用いられることはなかった⁴³⁻⁴⁵⁾。

一方、興味深いことに、百瀬らが発見した腐造日本酒もろみ由来の乳酸菌との共凝集は、この泡なし酵母では起きなかった³⁸⁻⁴²⁾。そこで、上述の乳酸菌と共凝集して沈降しない株を選択することにより、協会7号酵母を用いて泡なし自然変異株を分離できることが示された³⁸⁻⁴²⁾。さらに、清酒酵母の気泡への付着性やセライトなどとの凝集を利用した泡なし変異株の分離法が開発され、他の幾つかの協会酵母についても泡なし変異株が分離され、実用に供されている^{44,47,48)}。

他の醸造酒では、ワイン醸造におけるマロラクティック発酵への乳酸菌の寄与はよく知られるところである^{7,21,49)}。またビールでは、ベルギーのランビックなど、乳酸菌が関与するものも知られているが、一般のビール醸造においては、乳酸菌は雑菌とされている^{7,21)}。なお、Whiteらはビール醸造の雑菌汚染を調査する過程で、ビール酵母と共凝集する乳酸菌を見だし、その性質に関して詳細な報告を行っている⁵⁰⁾。

著者紹介 ¹ 日本大学生物資源科学部食品生命学科（准教授） E-mail: furukawa@brs.nihon-u.ac.jp

² 関西大学化学生命工学部生命・生物工学科（教授） E-mail: katakura@kansai-u.ac.jp

焼酎に関しても、そのもろみ中に乳酸菌が存在することが知られている^{23,51-54}。また、泡盛に関しても、もろみ中の乳酸菌に関する報告があり^{49,55,56}、塚原らは、泡盛の特徴的な香り成分であるバニリンの生合成に乳酸菌が関わっていると報告している^{49,56}。バニリンは原料由来のフェルラ酸から4-ビニルグアヤコール (4-VG) を経て生成されるが、上記乳酸菌は当該活性を有している^{49,56}。なお、泡盛酵母による正常発酵を確立する目的から、泡盛酵母と腐造乳酸菌を混合培養した、玉城らの興味深い報告もあり、そこでは腐造乳酸菌の共存は、泡盛の発酵や成分に種々の悪影響を及ぼすことが示されている⁵⁷。さらに、モルトウイスキー製造に関しても、乳酸菌の汚染によりアクロレインやジアセチルなどが生成されオフフレーバーの原因になる場合もあるが、鰐川らは、乳酸菌が原料中のオレイン酸やパルミトオレイン酸をそれぞれ10-ヒドロキシステアリン酸と10-ヒドロキシパルミチン酸に変換し、それらを酵母がウイスキー特有の香氣成分である γ -ドデカラクトンと γ -デカラクトンに変換するという、乳酸菌と酵母の共同作業よりなる重要なプロセスを明らかにしている^{7,58-60}。

醤油も乳酸菌と酵母の共存によって造られる発酵食品である。もろみ中の乳酸菌の分離法やその性質に関する研究が古くから見受けられ^{18,61}、醤油もろみにおいては耐塩性の乳酸菌である *Tetragenococcus halophilus* が優占し、他の細菌はほぼ存在しないとされている^{7,62}。醤油醸造では、麴の糖化酵素によって小麦から生じた糖を利用して、まず、*T. halophilus* が先行して生育し、その後、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* が生育することが知られている^{7,62}。しかし、これらの乳酸菌と酵母の共同作業には微妙なバランスが必要であり、乳酸菌はもろみpHを調整し、酵母によるアルコール発酵を助ける場合もあれば、条件によっては基質を奪い合うなどして互いの生育が拮抗する場合もあることが示されている⁶³⁻⁶⁵。なお、味噌の醸造にも同様に乳酸菌と酵母が共に関与することが知られており^{7,66}、それらの共培養についてもいくつか報告されている⁶⁷⁻⁶⁹。

市販の酢の多くは、酢酸菌によるエタノールの酸化発酵により製造されるが⁷、鹿児島県福山町で約200年前から製造されている福山酢では、乳酸菌と酵母を含むさまざまな微生物の働きによって米から製造される。まず、壺の中に水と蒸米と米麴を入れ、さらに乾燥させた振り麴をその上に撒き、その後数カ月間、特に人工的な管理を行うことなく静置することにより製造される^{7,70}。福山酢では糖化、アルコール発酵および酢酸発酵が一部並行しながら進行するため^{7,70}、そのもろみからは乳酸菌、酵母及び酢酸菌が同時に分離される場合がある⁷¹⁻⁷⁴。福山酢のもろみからは *Lb. plantarum* および *S. cerevisiae* をはじめとするさまざまな乳酸菌と酵母が単離されてい

るが、古川らは、これらの中には共培養するとバイオフィルムを顕著に形成する組み合わせが存在し、それらは高い共凝集活性を有することを明らかにしている⁷⁵⁻⁷⁸。なお、酵母と乳酸菌の共培養バイオフィルム形成に関しては、先行する Kawarai らの報告がある⁷⁹。

世界各地の発酵乳には、乳酸菌と酵母が共に関与している例は多い²⁻⁵。たとえばロシアのコカサス地方の伝統的な発酵乳ケフィアにおいては、乳酸菌 *Lactobacillus kefiranofasiens* がケフィランと呼ばれる多糖を生産し、酵母と共にケフィアグレインと呼ばれる共生体を形成することが知られている^{2,4,5,7,80}。ケフィランは免疫賦活活性や保湿性など有用な性質をもつため、その生産性の向上が検討されてきた⁸¹⁻⁸⁶。その中で Cheirsilp らは、*Lb. kefiranofasiens* を酵母 (*S. cerevisiae*) と共培養するとケフィランの生産が向上すること、そしてその効果は、酵母による乳酸の除去に加えて、乳酸菌の酵母との物理的な接触に起因することを報告している⁸⁵。その後の研究で、乳酸菌は DnaK, GroEL, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) など、本来は細胞質に局在するタンパク質を何らかの機構で細胞表層に輸送し、これらのタンパク質の働きによって酵母に接着することが明らかにされている⁸⁷。

また、欧米のパン種、サワードウの発酵にも乳酸菌と酵母が共に関与していることが知られている²⁻⁵。さらに、洋の東西を問わず多くの漬物においても乳酸菌と酵母が共に関与している^{5,7}。加えて、カカオ豆の発酵や発酵ソーセージの製造プロセス、それに馴れ鮓の発酵にも、乳酸菌と酵母が共に関与することが知られている⁷。

乳酸菌と酵母の共存の意義

上述のように、非常に多様な原料を用いた発酵において、乳酸菌と酵母は共存している。これは単なる偶然ではなく、そこには何らかの必然があるはずである。ここでは、どのような「必然」があるのかを考えてみたい。

一般に発酵に用いる酵母、特に *S. cerevisiae* は、多糖やタンパク質、それに脂質などの分解酵素を菌体外に分泌できない⁴³。一方、グラム陽性菌である乳酸菌は菌体外に多様な酵素を分泌する場合が多い^{2,3}。このことは、酵母がブドウなどの果物をベースにした環境で生育する場合には大きな問題はないが、穀物をベースにした環境で生育する場合には重要な要素になっていたものと推察される。

また、乳酸菌は一般に栄養要求性が高く、たとえば、アミノ酸、不飽和脂肪酸、ビタミンなどを要求する。このため、乳酸菌は貧栄養環境下でも酵母と共存すれば生育が可能となる場合があるものと推察される。このことは、先に述べた乳酸菌と酵母の各種共培養研究からも裏づけられる。

さらに、乳酸菌はカタラーゼを持っておらず、酸化ストレスに対する感受性が高いが、酵母はカタラーゼを持っており、それを補う。これは、乳酸菌が好気的な環境で生育する上で重要な要素となり得る。

加えて、酵母は酸素存在下では乳酸をはじめとする有機酸を資化することができる。乳酸菌は自ら生産した乳酸により死滅する場合があるが、酵母と共存することにより、この作用が緩和され得る。

さて、自然界で乳酸菌と酵母が共存する環境は、糖分が多い環境、たとえば、熟して落ちた果実などである。強い加水分解酵素をもつ糸状菌の助けがあれば、倒れた稲穂などの穀類も彼らに好適な環境になるだろう。このような環境で乳酸菌が乳酸を生産してpHが低下し、さらに酵母がエタノールを生産すれば、他の雑菌の繁殖は抑制されるだろう。グルコースよりもエタノールや乳酸を好む酢酸菌が表面に菌膜を形成すれば、更に嫌気的な環境が形成され、酸素を必要とする糸状菌はもはや増殖できなくなり、結果として、酵母と乳酸菌が炭水化物を独占できる環境が整うことになる。このような糸状菌、酵母、乳酸菌、酢酸菌の関係は、福山酢の発酵に実際に見られる⁷⁶⁾。

以上のように、乳酸菌と酵母は、植物がもたらす炭水化物を栄養源に、時には糸状菌や酢酸菌の助けを借り、互いに協力しながら進化してきたと考えられ、彼らが共存しているのは偶然ではなく、必然であると言えるだろう。

乳酸菌と酵母の共凝集・接着の意義

古くは1926年にHennebergは乳酸菌と酵母が共凝集することを報告しており⁸⁸⁾、先に述べたものも含め、その後も乳酸菌と酵母の共凝集に関する報告はいくつか見受けられる⁸⁹⁻⁹¹⁾。ここでは、乳酸菌と酵母の共凝集（接着）の意義について考えてみたい。

上述のように乳酸菌と酵母は相互に基質を依存している場合が多く、一方に対して阻害的に働く物質を他方が分解・消去していることもある。たとえば、酵母の代謝産物を乳酸菌が基質として受け取る場合、乳酸菌にとっての基質濃度は酵母に近づくほど高い（図1左）。すなわち、乳酸菌が酵母に接着すれば、基質の濃度はもっとも高く、取り込み速度ももっとも高くなるという直接的なメリットがある。さらに、他の微生物に基質を横取りされにくくなるという間接的なメリットも生じる。一方、乳酸菌が自身で生産する乳酸や過酸化水素などの阻害物質の濃度は、自身の細胞の直近でもっとも高く、拡散によって低下していく。しかし、自然界で乳酸菌が存在しているような半固体状で粘度が高く対流も少ない環境では分子の拡散は非常に遅く、阻害物質は自身の周囲に高濃度に蓄積することになる。これらの阻害物質の濃度は酵母細胞の周囲では低い（図1右）。すなわち、酵母に接

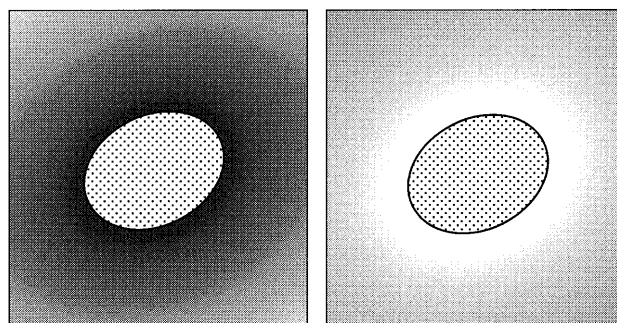


図1. 酵母が生産する物質（左）と資化する物質（右）の濃度分布のイメージ

着していれば乳酸菌の周囲の阻害物濃度は低く保たれるのである。

このように、2種の細胞が物質の授受を行う場合、パートナーと離ればなれに存在するよりも、接着していた方が明らかに有利であり、積極的に接着する機構が存在してもおかしくはない。その機構の一つは、先に述べた乳酸菌が細胞表層に提示するDnaK、GroELやGAPDHなどのタンパク質によるものである。微生物がこのような細胞質タンパク質を細胞表層に局在させる例は以前から知られており、*Lactobacillus plantarum*や*Lb. johnsonii*などの乳酸菌のヒトの腸管への定着や、大腸菌や*Helicobacter pylori*などの病原性細菌のヒト消化管細胞への定着に、これらの接着タンパク質が関与することが知られている⁸¹⁾。

また、乳酸菌は酵母と接着すると細胞外多糖を生産する場合が少なくない。先に述べたバイオフィーム⁷⁵⁻⁷⁸⁾やケフィール粒^{2,4,5,7,80)}は、パートナーから受け取る基質が拡散したり他の微生物に横取りされないよう、細胞外多糖によって自分とパートナーを周囲から隔離しようとしていると考えることもできる。

おわりに

以上のように、乳酸菌と酵母は共存することによりお互いに利益を得て、凝集・接着することによりその利益を互いに最大限に享受し、さらに、互いを認識してより自分たちに更に有利な環境をつくり出そうとしているようにも思われる。であるとすれば、乳酸菌と酵母はどのようにして互いを認識し、どのように応答しているのだろうか。乳酸菌と酵母の相互作用は、異種微生物細胞間の相互作用研究という枠組みを超え、原核生物と真核生物間の相互作用、ひいては生命進化までもを包含する大変興味深いものであり、今後の研究の展開に期待したい。

文 献

- 1) Wood, B. J. B.: The yeast/Lactobacillus interaction; A study in stability (In Mixed culture fermentation), p. 137, Academic Press (1981).
- 2) 森地敏樹ら：乳酸菌の化学と技術, 学会出版センター (1996).
- 3) 山本憲二ら：乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会 (2010).
- 4) 岡田早苗：酵母からのチャレンジ, p. 66, 技報堂出版 (1997).
- 5) 小崎道雄：乳酸菌の新しい系譜, p.184, 中央法規 (2004).
- 6) 谷村和八郎：アジアの発酵食品事典, 樹村房 (2001).
- 7) 山崎眞狩ら：発酵ハンドブック, 共立出版 (2001).
- 8) Wood, B. J. B.: Microbiology of fermented foods, Blackie Academic & Professional (1998).
- 9) 小崎道雄：醸協, **94**, 261 (1999).
- 10) 吉田義寧：醸造學雑誌, **10**, 1025 (1932).
- 11) 佐藤喜吉：醸造學雑誌, **11**, 798 (1933).
- 12) 佐藤喜吉ら：醸造學雑誌, **16**, 677 (1938).
- 13) 宮路憲二ら：醸造學雑誌, **16**, 975 (1938).
- 14) 江田鎌治郎：醸協, **3**, 34 (1908).
- 15) 江田鎌治郎：醸協, **4**, 20 (1909).
- 16) 高橋偵造：醸協, **17**, 16 (1922).
- 17) 金井春吉ら：醸協, **27**, 23 (1932).
- 18) 石丸義夫：農化, **9**, 1143 (1933).
- 19) 片桐英郎ら：農化, **10**, 942 (1934).
- 20) 秋山裕一：日本酒, 岩波書店 (1994).
- 21) 吉沢 淑：酒の科学, 朝倉書店 (1995).
- 22) 大林 晃ら：農化, **10**, 839 (1964).
- 23) 北垣浩志ら：醸協, **99**, 767 (2004).
- 24) 芹沢 長：醸協, **60**, 69 (1965).
- 25) Woods D. D.: *J. Gen. Microbiol.*, **9**, 151 (1953).
- 26) Challinor, S. W. *et al.*: *Nature*, **174**, 877 (1954).
- 27) 伊藤雄太郎ら：醸酵工学, **34**, 18 (1956).
- 28) 伊藤雄太郎ら：農化, **31**, 779 (1957).
- 29) 伊藤雄太郎ら：農化, **31**, 783 (1957).
- 30) Nakamura, L. K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **81**, 519 (1961).
- 31) 百瀬洋夫ら：醸協, **63**, 871 (1968).
- 32) 百瀬洋夫ら：醸酵工学, **46**, 765 (1968).
- 33) 角野一成ら：醸酵工学, **48**, 587 (1970).
- 34) 角野一成ら：醸酵工学, **48**, 594 (1970).
- 35) 角野一成ら：醸酵工学, **49**, 319 (1971).
- 36) 角野一成ら：醸酵工学, **49**, 326 (1971).
- 37) 百瀬洋夫ら：醸協, **61**, 1037 (1966).
- 38) 百瀬洋夫ら：酵母と乳酸菌の相互関係 (微生物の生態2), p. 21, 東京大学出版会 (1975).
- 39) Momose, H. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 19 (1969).
- 40) 百瀬洋夫ら：醸協, **63**, 682 (1969).
- 41) 百瀬洋夫ら：醸協, **63**, 686 (1969).
- 42) 百瀬洋夫ら：農化, **43**, 119 (1969).
- 43) 大内弘造：酒と酵母の話, 技報堂出版 (1997).
- 44) 布川弥太郎：化学と生物, **11**, 216 (1973).
- 45) 秋山裕一：醸協, **79**, 190 (1984).
- 46) 高橋源治郎：醸協, **11**, 15 (1916).
- 47) Ouchi, K. *et al.*: *Agr. Biol. Chem.*, **7**, 1024 (1971).
- 48) 大内弘造ら：醸協, **67**, 54 (1972).
- 49) 浅野忠男：生物工学, **86**, 123 (2008).
- 50) White, F. H.: Yeast-bacteria interaction in the brewing industry (In Mixed culture fermentation), p. 121, Academic Press (1981).
- 51) 高宮義治：醸協, **77**, 907 (1982).
- 52) 玉岡 寿ら：醸協, **66**, 810 (1971).
- 53) 遠藤明仁ら：乳酸菌学会誌, **14**, 84 (2003).
- 54) 角田潔和ら：醸協, **93**, 897 (1998).
- 55) 百瀬洋夫ら：醸協, **92**, 452 (1997).
- 56) 塚原正俊ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p.123 (2007).
- 57) 玉城 武ら：醸酵工学, **65**, 9 (1987).
- 58) 辻 謙次ら：醸協, **89**, 530 (1994).
- 59) 鰐川 彰ら：醸協, **98**, 241 (2003).
- 60) 前村 久：生物工学, **72**, 325 (1994).
- 61) 坂口健二：農化, **28**, 758 (1954).
- 62) 田中昭光：生物工学, **85**, 196 (2007).
- 63) 稲森和夫ら：農化, **58**, 771 (1984).
- 64) 長谷川要ら：醸協, **77**, 157 (1982).
- 65) 長谷川要ら：醸協, **80**, 707 (1985).
- 66) 好井久雄：醸協, **61**, 776 (1966).
- 67) 松山正宣ら：醸酵工学, **43**, 807 (1965).
- 68) 小泉幸道ら：醸協, **76**, 206 (1981).
- 69) 山本 泰ら：醸協, **80**, 411 (1985).
- 70) 柳田藤治：化学と生物, **28**, 271 (1990).
- 71) 円谷悦造ら：醸協, **80**, 200 (1985).
- 72) 小泉幸道ら：日食工会誌, **43**, 347 (1987).
- 73) Haruta, S. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **109**, 79 (2006).
- 74) Okazaki, S. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **56**, 205 (2010).
- 75) 古川壮一ら：化学と生物, **48**, 8 (2010).
- 76) 古川壮一ら：生物工学, **89**, 478 (2011).
- 77) Furukawa, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2316 (2010).
- 78) Furukawa, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1430 (2011).
- 79) Kawai, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4673 (2007).
- 80) 辨野義己ら：醸協, **93**, 176 (1998).
- 81) 片倉啓雄：生物工学, **89**, 465 (2011).
- 82) 塩谷捨明ら：生物工学, **82**, 438 (2004).
- 83) 三枝隆裕ら：生物工学, **77**, 99 (1999).
- 84) 三枝隆裕ら：生物工学, **76**, 447 (1998).
- 85) Cheirsilp, B. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **100**, 43 (2003).
- 86) Tada, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 557 (2007).
- 87) Katakura, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 319 (2009).
- 88) Henneberg, W.: Handbuch der Gärungsbakteriologie (1926).
- 89) Petrez, G. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **187**, 6128 (2005).
- 90) Peng, X. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 777 (2001).
- 91) Golowczyc, M. A. *et al.*: *J. Dairy Res.*, **76**, 111 (2009).