

## 高酸度焼酎醪における乳酸菌の蛍光抗体法による検出について

田邊幾之助・有川順子・金丸 芳・丸山智之\*\*・佐藤平二\*\*

(応用微生物学研究室, \*\*家畜微生物学研究室)

昭和57年8月10日 受理

### Detection of Lactic Acid Bacteria in Shôchû-Moromi of High Acidity by the Fluorescent Antibody Technique

Ikunosuke TANABE, Junko ARIKAWA, Kaori KANEMARU,  
Tomoyuki MARUYAMA\*\* and Heiji SATO\*\*

(Laboratory of Applied Microbiology, Laboratory of Veterinary Microbiology\*\*)

#### 緒 言

前報<sup>6)</sup>では甘藷焼酎醸造において酒母, 醪中に広く乳酸菌が分布することを示した. また, 甘藷焼酎の端境期に米, 麦, 白糠などを原料とする焼酎醸造がしばしば行われているが, とくに白糠の場合, 生のまま用いる仕込法が採用されている<sup>4)</sup>. ところが, これらは醸造時期が品温の上昇する春から夏にかけて行われるので雑菌汚染の危険性が高く, 適切な微生物管理が必要とされる. このためわれわれは仕込過程の微生物相, とくに乳酸菌の存在について研究し, すでに報告もした<sup>5)</sup>.

これらの研究で高酸度醪中のグラム陽性細菌数は直接検鏡では醪中の酵母数  $10^9$ /ml に近い数値であるにもかかわらず, 常法による生菌数は  $10^3$ /ml のオーダーであった. この直接検鏡と生菌数の差は微生物生態学的には, 重要である. すなわち, 生菌も死菌も同一種で培養令その他の条件の差のみで生死が分かれた場合は問題ないが, 多数の死菌がその直前までの微生物学的環境を支配し, 醪の経過にもっとも重要な影響を与えていたのかも知れない. また, 逆に生菌数として現れた微生物種はたまたまアルコール存在下の環境に他の種より耐性が高いため生き残ったもので, 醪経過や高酸度にはあまり関係がないのかも知れないといった位置づけも可能であろう.

この問題を現在解決できるのは直接顕微鏡下でそれ

をそれと確かめる方法, すなわち蛍光抗体法<sup>1)</sup>が最も有効で有意の結果が得られるように思われる.

本研究は米麴生白糠仕込焼酎中多数観察することのできるグラム陽性細菌が乳酸菌かどうかを確かめるため, 蛍光抗体法を導入し, 焼酎醪中での乳酸菌の動態の究明にアプローチした.

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 試料

小正醸造有限会社日置工場にて醸造中の酒母および醪を採取し, 実験に供した. なお, 試料の分析などは前報<sup>6,7)</sup>と同じように行った.

##### 2. 微生物の分離, 同定

微生物の計数, 分離, 同定などは前報<sup>6,7)</sup>と同じ方法によった. 培地は Table 1 に示した. ただし, 工場て試料採取後直ちに分離する場合は次のように行った. あらかじめ Table 1 に示した2倍濃度培地 (pH 5.4) を径 20mm の試験管に 5ml づつ加えたものと Kbicidin  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  アルコール溶液を 10% に加えた 1%寒天溶液を準備した. 工場て2倍濃度培地 5ml に Kbicidin 加 1%寒天溶液を 4ml 加え, 寒天が固らないよう  $37^\circ\text{C}$  湯煎中においた. 試料採取後直ちにその 1ml を準備した 9ml の培地に加えよく攪拌後, さらに, その 1ml を次の培地に移し, 順次この要領で希釈を行った. 寒天が固まったのち, 試験管のまま培養した.

##### 3. 免疫血清の調製<sup>1)</sup>

前報<sup>5)</sup>で分離した焼酎醪の乳酸菌の代表株 *Lactobacillus sake* A-2-2, 同 F-a-1, *L. brevis* B-2a-2, および同 E-a-1 を抗原として使用した. まず, Table 1 の乳酸菌用培地で前培養 (7ml) 2日, 主培養 (700ml) 7

\* この研究は昭和55年日農化大会 (福岡大学, 福岡市, 昭和55年4月1日) で講演した. 講演要旨集 p. 158. また, 乳酸菌・酸化酵素合同研究会 (京都大学学友会館, 京都市, 昭和56年11月18日) で「焼酎と微生物」の一部として講演した.

Table 1. The media, used in a series of bacterial examination of Shôchû-brewing

- a) The medium for isolation of lactic acid-bacteria in the Shôchû-brewing and preservation of the stock cultures.

Beef extract	3 g
Polypepton	10 g
Yeast extract	2 g
Glucose	10 g
Tween 80	1 g
Ascorbic acid	1 g
Tomato juice*	300 ml
Distilled water	700 ml

pH: not adjusted in addition of calcium carbonate, adjusted to 6.8 usually in no addition, and the isolation, in which test-tubes are used, is carried out at pH 5.4 (1%-agar medium).

Agar: 2% for plate cultures, and 1% for stab cultures.

Kabicidin: 50  $\mu$ g suspended in one ml of alcohol is added to 20 ml of the medium for isolation.

- b) The medium for cultivation and physiological tests of lactic acid bacteria, especially of heterofermentative bacteria.

Beef extract	15 g
Polypepton	10 g
Yeast extract	5 g
Glucose	30 g
Distilled water	1 l

pH 6.8

日で集菌, 1/4濃度 Ringer 溶液 (NaCl, 0.9 g; KCl, 0.042 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.048 g; NaHCO<sub>3</sub>, 0.02 g; 蒸溜水, 400 ml) に乾燥重 10 mg/ml の割合に懸濁, 60°C 30分殺菌したものを抗原懸濁液として使用した. 免疫血清の調製は, 各抗原につき兎 2羽を用意し, ほぼ1週間おきに4回 (5月7日, 5 mg; 5月11日, 10 mg; 5月17日, 15 mg; 5月25日, 20 mg) 耳静脈に抗原懸濁液を注射したのち心臓採血した. 血液は一昼夜, 室温に静置し凝固させたのち, 血漿をとり, これを 10,000 rpm 15分間遠沈して免疫血清を得た.

#### 4. 凝集反応<sup>1)</sup>

免疫血清を 0.8% にホルマリンを含む 0.01 M PBS, pH 7.0 (Phosphate buffer solution. Soln. A: NaH<sub>2</sub>·PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 31.20 g/l, を 16.5 ml と Soln. B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 71.63 g/l, を 33.5 ml とを蒸溜水に加え, さらに NaCl 8.5 g を加えたのち全量を 1 l とする) で稀釈し, タイターソフトトレー上に稀釈免疫血清 2 滴を

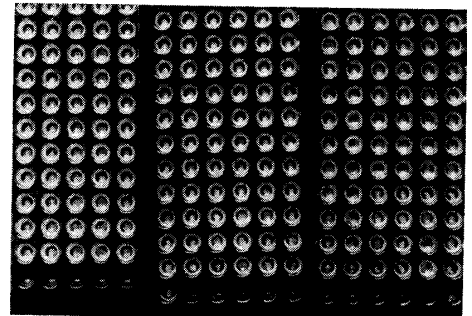


Photo 1. Agglutination test on soft trays.

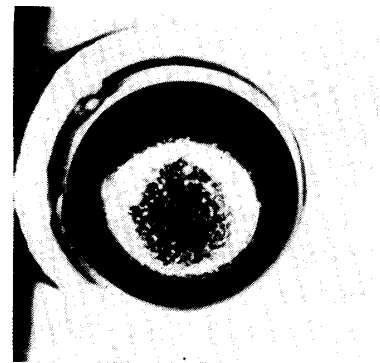


Photo 2a. Positive agglutination.

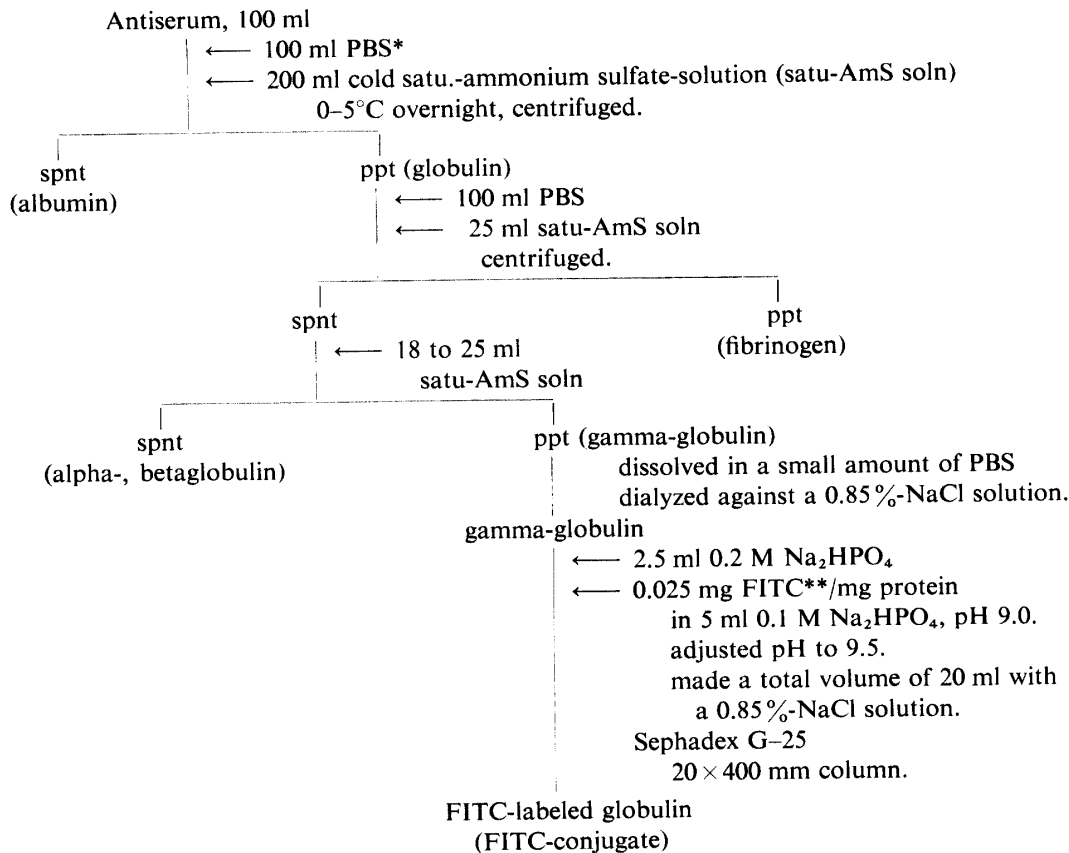


Photo 2b. Negative agglutination.

加える. これに熱処理 (60°C 30分) した微生物の懸濁液を 2 滴加えて室温で3~4時間ゆっくり振盪しながら反応させて, 凝集を実体顕微鏡で確認した (Photos 1, 2a, 2b).

#### 5. 螢光抗体

免疫血清の一部を用いて Fig. 1 に示したように, まず, 硫酸塩析により  $\gamma$ -グロブリン分画を得, 透析脱塩後, 螢光色素 Fluorescein-isothiocyanate (FITC) で標識し, Sephadex G-25 を通して螢光抗体を調製した (Photo 3). 螢光抗体による染色は, まず, スライドガラスに試料を塗布し, 軽く火炎固定後, 螢光抗体 0.5 ml をのせ30分間染色した. 染色終了後, 0.01 M



\* PBS: phosphate-buffered saline.  
 \*\* FITC: fluorescein isothiocyanate.

Fig. 1. Fractionation of serum, and preparation of FITC-labeled globulin.

PBS に10分間浸漬洗浄したのち、さらに蒸留水で洗浄、風乾させた。観察には蛍光顕微鏡装置（日本光学工業、FT型）を使用した。

6. 酵母と細菌の計数

滅菌水 9 ml に酒母または醪を 1 ml 加え10倍稀釈としたものについて、Thoma の血球計算盤で計数し、酵母数  $y$  を計算した。細菌数はこの方法では計算しにくいので、酒母または醪をグラム染色し、視野中のグラム陽性細菌数 ( $b'$ ) と酵母数 ( $y'$ ) とをそれぞれ全て計数とする。つぎに視野をかえて同様に計算、これをくり返したのち、視野内のグラム陽性菌数の平均値  $\bar{b}'$  と酵母数の平均値  $\bar{y}'$  を求める。これらからグラム陽性細菌の絶対数  $b$  は  $b = (y/\bar{y}') \times \bar{b}'$  より求めることができる。乳酸菌数を求める場合も同様にできる。まず、上のグラム染色のかわりに酒母または醪を蛍光染色し乳酸菌数 ( $\bar{b}'$ ) と酵母数 ( $\bar{y}'$ ) を蛍光顕微鏡下計数し、同様にして乳酸菌の絶対数  $b$  を求める。

結果と考察

1. 醪中の酵母・細菌の計数と滴定酸度

Table 2 は醪中の酵母および細菌の計数を行うと同時に滴定酸度を測定したものである。ただ滴定酸度は試料が少量のため約10%の誤差は見込まないといけなと思われるが、これを割引いても、グラム陽性細菌数が醪令とともに増加し、さらに滴定酸度の増加をもなっている。このことは前報<sup>5)</sup>までに認められた結果で生菌数は少ないが高酸度である醪の究明に手がかりを与えるものである。

ここで、醪のグラム染色で見出されるグラム陽性細菌が醪のどの時点で  $10^8$ /ml 程度に達するのかを確かめるため、日置工場の酒母、醪の全てのタンクについて細菌数を調べた。Table 3 と Table 4 に示したように、三次醪 7 日以降のほとんど全てのタンクにグラム陽性細菌が認められた。このことは特定の醪にグラム陽性細菌が多いのではなく、醪令とともに必然的に増加

Table 2. Total counts of yeasts and bacteria in the Shôchû-Moromi, and Moromi's acidities

Date	Sample No.	Yeasts × 10 <sup>8</sup> /ml	Rate of b'/y'*		Bacteria × 10 <sup>8</sup> /ml	Acidity ml
			Yeasts	Bacteria		
2-1	54	57	10	0.25	1	5.9
3-1	48	67	7	0.3	3	9.2
3-3	25	58	11	0.5	3	9.7
3-5	22	51	19	9	24	10.6
3-8	62	42	15	59	165	18.7

\* y': Counts of yeasts under a microscope. b': Counts of bacteria under a microscope.

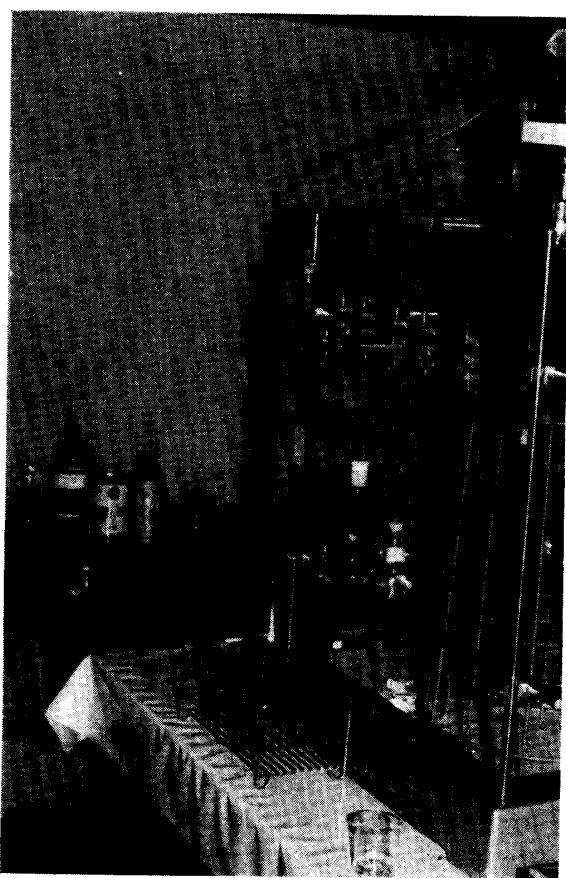


Photo 3. Separation of conjugate (labeled globulin) from unconjugated fluorescent material (FITC) through Sephadex-packed column.

Table 3. Detection of gram-positive bacteria in the Shôchû-Moromi

Date	Totaling to:	Sample No.	Detection of gram-positive bacteria
1st Moromi-	2	43	—
	4	42	—
	5	38	—
	6	37	—
2nd Moromi-	1	29	—
3rd Moromi-	1	28	—
		27	—
	2	26	—
		25	—
	3	24	—
		23	—
	4	22	—
		21	—
	5	67	—
		66	—
6	65	—	
	64	—	
7	63	—	
	62	+	
9	61	+	
	60	+	
10	59	+	
	58	+	

Table 4. Total counts of yeasts and bacteria in the Shôchû-Moromi and Moromi's acidities

Date	Totaling to:	Yeasts × 10 <sup>8</sup> /ml	Rate of b'/y'		Bacteria × 10 <sup>8</sup> /ml	Acidity ml
			Yeasts	Bacteria		
3rd- 7	14	49	37	4	5	7.0
	9	54	11	15	74	8.5
10		40	33	9	11	11.2
	17	42	16	6	16	9.9
		34	21	38	62	10.3

し、蒸溜直前には  $10^8$ /ml を越える。すなわち増殖していることを示している。したがって、前報までの分離は分離方法に問題があるものと考えられる。クエン酸酸度下増加するアルコールのため瀕死状態ではあるが、ゆっくりと増殖出来る微生物の分離はできるだけおだやかな分離方法が要求されるということであろう。このため、まず、分離培地を変えて常法により再分離したところ Table 5 のとうりであった。Tj 培地については従来の結果と全く同じで  $10^3$ /ml 程度の生菌数であった。ただ微生物の麴汁への依存性が生菌数を左右したとは考えられない結果である。

Table 5. Viable counts of lactic acid bacteria in Moromi in various kinds of culture medium

Dilution Culture media	Colonies of lactic acid bacteria		
	10	$10^2$	$10^3$
Tj-medium (Table 1a)	73	4	2
Malt-bouillon*	79	7	0
Koji-extract medium**	12	1	1

\* Mb: malt extract (Difco), 25 g; beef extract, 4 g; polypepton, 5g; NaCl, 3 g; agar, 20 g; dist. water, 1 l; pH 7.0.

\*\* Kb: Koji-extract, made from Koji with white-Koji-mold (Bé=7.9), 1 l; beef extract, 3 g; yeast extract, 2 g; polypepton, 10 g; agar, 20 g; pH 6.8.

ここで、分離条件をおだやかにするため分離の際炭酸カルシウムを使用せず、なるべく醪の pH に近い pH 5.4 の培地でしかも寒天温度はなるべく低くするため0.5%寒天とし試験管で分離する方法を採用した。

また醪を大学に持ち帰る場合約 30 km の道のりを車でゆられるが、工場で分離することでこのマイナス要素も消去できる。結果は Table 6 に示したとうり生菌数は  $10^8 \sim 10^9$ /ml であることが確かめられ、常法による生菌数の低下は上のマイナス要素が関係していることと判断した。

2. 乳酸菌の同定

以上の手段で分離された微生物が乳酸菌であるかどうか、常法にしたがって同定した。代表株の生理的性質と乳酸発酵をそれぞれ Table 7 と Table 8 に示した。ホモ型乳酸菌は B-7-m'-b を除く 8 株はいずれも乳糖発酵能がなく、前報<sup>6)</sup>で「わが国の酒類の醪に広く分布する乳酸菌で、lactose -, 多くは xylose -, arabinose - で生成乳酸は L~DL」の乳酸菌群を *L. sake* 群として取扱って来た。これら 8 株は五炭糖の利用能で 3 分されるがいずれもこの範囲に入る。第 1 のグループは北原<sup>2,3)</sup>が定義した *L. sake* にほぼ一致すると思われる。また、A-6-1-a 以下の 3 株は焼酎醪からよく分離される lactose -, xylose -, arabinose - の *L. sake* 型でこれら 2 つのグループは *L. sake* 群としてよい。ところが、第 3 の C-5-1 と C-5-m' の取扱いだ、乳糖発酵性がない以外は *L. xylosus* に類似の性質をもつが、また *L. sake* 群の 2 つのグループとも近い関係にあるのでここではこの範囲で扱いたい。

つぎに、ヘテロ型乳酸菌は 3 株とも非常によく似た性質を示し、この実験では D(-) 乳酸を生成し、乳糖発酵性がない。このグループは生育が不十分で残糖が多いような培地では生成乳酸はほとんど D(-) に傾くが、良好な培地では DL+D(-)~DL となるので、*L. brevis* とみなしても間違いでない。

Table 6. Relationships between the fluorescent antibody technique and usual microbiological techniques

Date	Sam- ple no.	Yeasts $\times 10^8$ / ml	Gram stain- ing		Gram- positive bacteria* $\times 10^8$ /ml	Fluorescent antibody staining, b'/y'				Lactic acid** bacteria, calcu- lated $\times 10^8$ /ml	Viable counts of lactic acid bacteria $\times 10^5$ /ml		Lactic acid. bacterial isolate*** $\times 10^8$ /ml
			y'	b'		A-2-2	F-a-1	B-2a-2	E-a-1		large medi- um	small	
3-5	66	28	35	43	34	10/20				18		36000	36
	67	42	23	21	310	8/23		6/4		63		62000	62
3-6	64	21	12	175	310	11/20		83/18		97	15	76	0.091
	65	47	23	25	51	5/20				12	3	9	0.012
3-7	62	18	22	148	120	137/22				110			
	63	75	50	39	58	24/32				56	120	1030	1.2

\* & \*\* Calculated from a rate of b'/y' in the Gram-staining\*, or the fluorescent antibody staining\*\*, of Moromi.

\*\*\* Isolated by a mild treatment.

Table 7. Physiological properties of the lactic acid-bacteria-isolates

No.	Gram staining	Shape	Fermentation	Optical activity	Sugar fermentation													Temperature °C							
					raffinose	xylose	lactose	arabinose	galactose	gluconic acid	maltose	mannitol	mannose	rhamnose	ribose	salicin	sorbitol	sucrose	trehalose	Litmus milk					
																					30	37	45	50	
A-6-m-a	+	rod	Ho	L	±	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				
D-5-m'	+	rod	Ho	L	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				
D-5-l-a	+	rod	Ho	L	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				<i>L. sake</i>
A-6-l-a	+	rod	Ho	L	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				<i>L. sake</i> - group
B-7-l-a	+	rod	Ho	L	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				
D-5-m-a	+	rod	Ho	L	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				
C-5-l	+	rod	Ho	L	±	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				
C-5-m'	+	rod	Ho	L	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				
B-7-m'-b	+	rod	Ho	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±				<i>L. casei</i>
B-7-m'-a	+	rod	He	D	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	±	±				<i>L. fermentum</i>
E-9-s-a	+	rod	He	D	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	±	±				
F-9-s-a	+	rod	He	D	±	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	±	±				<i>L. brevis</i>

Table 8. Determination of the fermentation patterns and the isomers of lactic acid, produced from glucose by use of the enzyme kits

No.	Remaining glucose g/l	Lactic acid		Consumed sugar g/l	Production of lactic acid %	Fermentation	Optical activity
		L g/l	D g/l				
A-6-m-a	0.660	13.338	4.848	23.947	75.9	Ho	L
A-6-l-a	0.792	15.334	3.342	23.815	78.4	Ho	L
B-7-m'-b	1.233	12.880	5.228	23.375	77.5	Ho	L
B-7-l-a	0.528	15.394	3.541	24.079	78.6	Ho	L
C-5-l	0.572	14.072	5.112	24.035	79.8	Ho	L
C-5-m'	0.616	14.823	4.054	24.001	78.9	Ho	L
D-5-m'	9.156	8.620	2.600	15.045	74.5	Ho	L
D-5-m-a	1.233	14.268	3.805	23.378	77.3	Ho	L
D-5-l-a	5.062	10.268	3.723	19.545	71.6	Ho	L
B-7-m-a	17.212	0.000	2.250	7.389	30.5	He	D
E-9-s-a	21.438	0.000	2.101	6.215	33.6	He	D
F-9-s-a	9.156	0.000	1.092	3.170	34.5	He	D
Blank	24.607	1.535	0.0000	0.000	0.0	-	-

### 3. 凝集反応

まず、抗原として用いた乳酸菌と米麹生白糠仕込醪から分離した乳酸菌代表株および有孢子細菌との抗原抗体反応を凝集反応で確かめた。結果は Table 9 に示したが、表中の数字は免疫血清の稀釈率を示し、斜線は60倍稀釈以上でも明瞭な凝集反応がおきたことを示している。ここで、凝集反応の種的な関係を見ると、*L. sake* 群が2群以上の凝集反応のパターンを有することで必ずしもこのグループが免疫学的には均一でないことを示している。一方、*L. brevis* は糖利用能・適温などの差による  $\alpha$  型と  $\beta$  型とがあるが、B-2a-2 お

よび E-a-1 の免疫血清に対してはほぼ均一とみられる。ただ A-2-2 および F-a-1 の免疫血清との凝集反応をこまかく見ると、A-2-2 と凝集するもの、F-a-1 と凝集するもの、および両者と目立った凝集は示さないものの3群を区別出来る。しかし、適当な稀釈の蛍光抗体を使用すれば醪中の細菌のなかから *L. brevis* のみを蛍光顕微鏡で検出することができる可能性を示している。また、醪から分離される有孢子細菌はこれら免疫血清で凝集反応を示さないことから、これら乳酸菌を抗原として調製した蛍光抗体で染色した時に蛍光を発する細菌は乳酸菌に限られることが確かめられ

Table 9. Agglutination tests of the lactic acid-bacteria-isolates from the Shôchû-moromi with the antisera produced against some typical lactic acid-bacteria-isolates

Antiserum	Antigen																		
	<i>L. sake</i>			<i>L. plantarum</i>			<i>L. brevis</i>						<i>L. sake</i>		<i>L. acidophilus</i>		<i>L. sake</i>		<i>Bacillus</i>
	D-a-2	F-a-1	I-3a-3	G-3a-1	B-2a-2	B-3a-1	E-a-1	A-2-3	I-3e-1	G-3e-1	G-3b-1	I-3a-1	A-2-2	C-2-1	A	B			
A-2-2①	0	0	0	5	60	5	0	30	0	0	15	60	240	15	0	0			
A-2-2②	0	15	0	30	15	5	15	30	0	5	5	60	240	0	0	0			
F-a-1①	240	240	240	15	15	30	5	30	30	15	60	30	0	30	0	0			
F-a-1②	120	240	120	15	15	30	5	5	60	30	60	15	0	30	0	0			
B-2a-2①	5	0	15	240	120	120	120	120	120	120	30	0	0	5	0	0			
B-2a-2②	5	0	5	240	240	120	120	120	120	120	5	5	0	5	0	0			
E-a-1①	5	0	15	240	60	120	120	120	120	120	15	15	0	60	0	0			
E-a-1②	5	0	5	240	120	120	120	120	120	120	30	30	0	120	0	0			

\* Numbers in the table are ones of the minimal dilution of antisera with PBS, at which agglutination between antigen and antisera is observed. Number "0" shows that agglutination is not observed at the above combination.

Table 10. Agglutination tests of the isolates from the Shôchû-moromi with the antisera produced against some typical lactic acid-bacteria-isolates

Strain's No.	Antiserum	A-2-2			F-a-1			B-2a-2			E-a-1		
		Kitahara's system	×8	×16	×32	×8	×16	×32	×8	×16	×32	×8	×16
A-6-m-a	<i>L. sake</i>	—	—	—	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—
D-5-m'		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-5-l-a		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A-6-l-a	<i>L. sake</i> group	—	—	—	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—
B-7-l-a		—	—	—	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—
D-5-m-a		≡	≡	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B-7-m'-b	<i>L. plantarum</i>	—	—	—	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—
C-5-l	<i>L. sake</i> group	—	—	—	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—
C-5-m'		—	—	—	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—
B-7-m'-a	<i>L. fermentum</i>	≡	≡	≡	≡	+	+	≡	≡	≡	+	+	—
E-9-s-a	<i>L. brevis</i>	≡	≡	≡	≡	+	—	≡	≡	—	≡	≡	—
F-9-s-a		≡	≡	≡	≡	+	—	+	+	+	+	+	+

Table 11. Relationships between the fluorescent antibody technique and usual microbiological techniques

Sample	Date	Yeasts × 10 <sup>8</sup> /ml	Gram-staining rate of y'/b'		Gram-positive bacteria, calculated × 10 <sup>8</sup> /ml	Fluorescent antibody staining rate of yeasts/bacteria				Lactic acid bacteria calculated × 10 <sup>8</sup> /ml
			yeasts	bacteria		A-2-2	F-a-1	B-2a-2	E-a-1	
66	3-5	28	35	43	35	40/20				18
	3-6	37	20	66	120	33/13				15
	3-7	33	2	28	460	12/20				55
67	3-5	42	23	21	38	36/16				63
	3-6	46	10	32	150	61/141				110
	3-7	35	16	68	150	31/60				68
21	3-5	46	23	33	66	45/21				21
	3-6	43	7	88	540	28/33				84
	3-7	38	11	86	300	12/1				3
22	3-5	56	14	36	140	7/8				64
	3-6	48	25	117	230	74/9				6
	3-7	54	43	251	310	28/21				41

た。一方、前項で分離同定した乳酸菌と各免疫血清との凝集反応は Table 10 に示したが、ここでの *L. brevis* はいずれの血清ともよく反応した。一方、A-2-2 と F-a-1 の血清は凝集反応のバラツキが大きい。両方の蛍光抗体で染色すると乳酸菌を全てカバーすることができると思われるので、両方の蛍光抗体で染色される菌数はここでは全乳酸菌数とみてよいことが明らかになった。また B-2a-2 と E-a-1 の蛍光抗体で

染色され、しかも A-2-2 でも染色されるものは Table 6 から *L. brevis* であると判断してもよいと考えられた。

#### 4. 蛍光抗体法による醗中乳酸菌の確認

醗の蛍光抗体による染色は良好で黄緑色の蛍光を発した。とくに純粋培養した乳酸菌の染色では細胞全体が一様に蛍光を発するもの (Photo 4) と細胞表層部がとくによく蛍光を発するもの (Photo 5) の 2 通りが



Photo 4a. Cells of *Lactobacillus brevis* E-a-1, stained with anti-*L. sake*-group A-2-2 Conjugate.

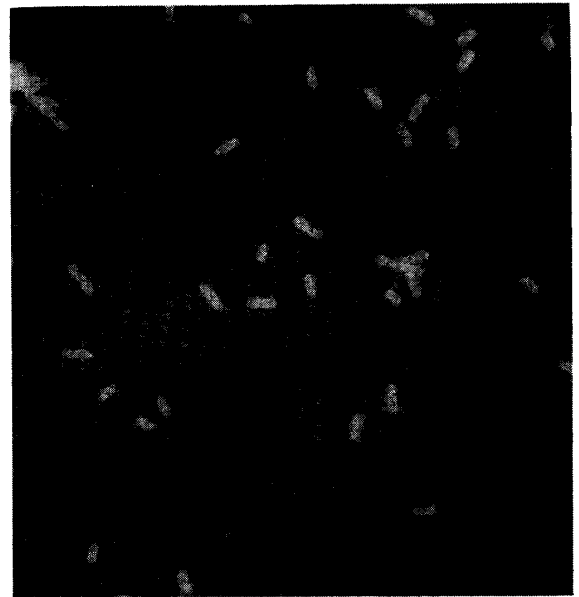


Photo 5a. Cells of *L. acidophilus* I-3-1, stained with anti-*L. sake*-group A-2-2 Conjugate.

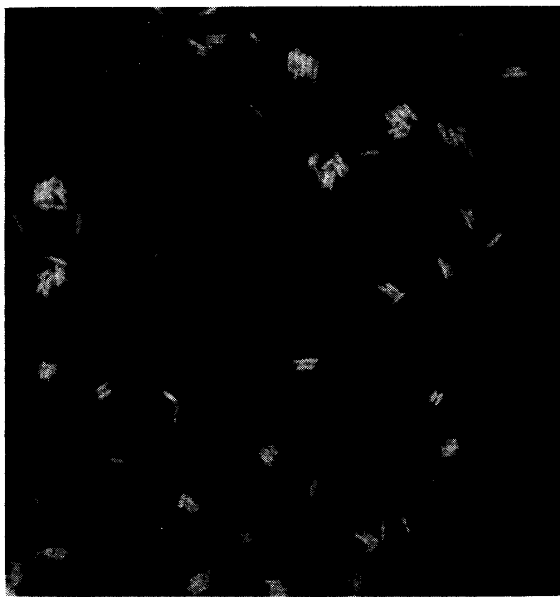


Photo 4b. Cells of *L. sake*-group F-a-1, stained with anti-*L. sake*-group A-2-2 Conjugate.



Photo 5b. Cells of *L. sake*-group F-a-1, stained with anti-*L. sake*-group F-a-1 Conjugate.



あったが、醪を染色した場合は菌体が一様に蛍光を発することが多かった (Photo 6). Table 6 では醪のグラム染色 (Photo 7) での b/y 比, 蛍光抗体染色での b/y 比, および 0.5% 寒天培地での稀釈分離の場合の乳酸菌の絶対数の関係を示してある. 蛍光抗体染色での b/y 比は前項の結果から A-2-2 および F-a-1 の蛍光抗体でのデータを用いる. しかし, *L. brevis* で B-2a-2 または E-a-1 の抗体で凝集するが, A-2-2 または F-a-1 の抗体では凝集しないものがないという証明は

ないので, B-2a-2 または E-a-1 の蛍光抗体染色による b/y 比が A-2-2 および F-a-1 の蛍光抗体染色によるものより大きい時は前者を試料の b/y 比とした. Table 6 および Table 11 に示してあるが, これをみると生菌数とグラム染色および蛍光抗体染色での b/y 比から計算したそれぞれの細菌数との間には必ずしも一致は見られない. これは先にも述べたように醪の状態および分離条件などによって生菌数が大きく変動する要素をもっていることによるものであろう. しかし,

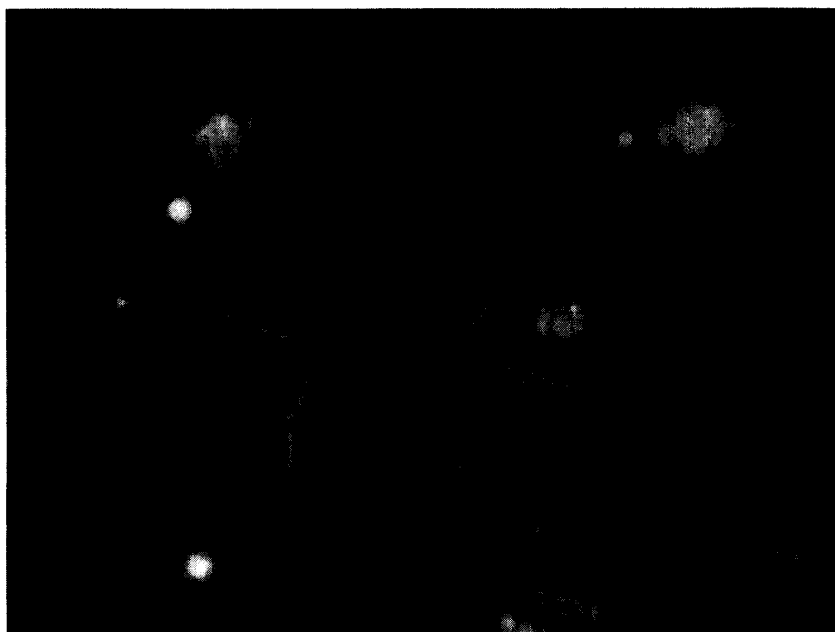


Photo 6a. Moromi sample No. 62 (3-7), stained with anti-*L. sake*-group A-2-2 Conjugate.

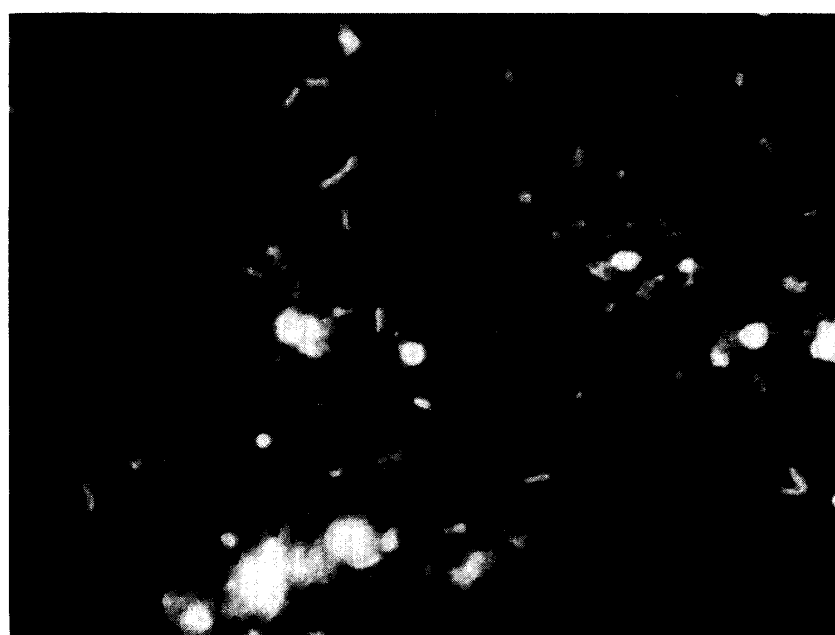


Photo 6b. Moromi sample No. 66 (3-6), stained with anti-*L. sake*-group A-2-2 Conjugate.

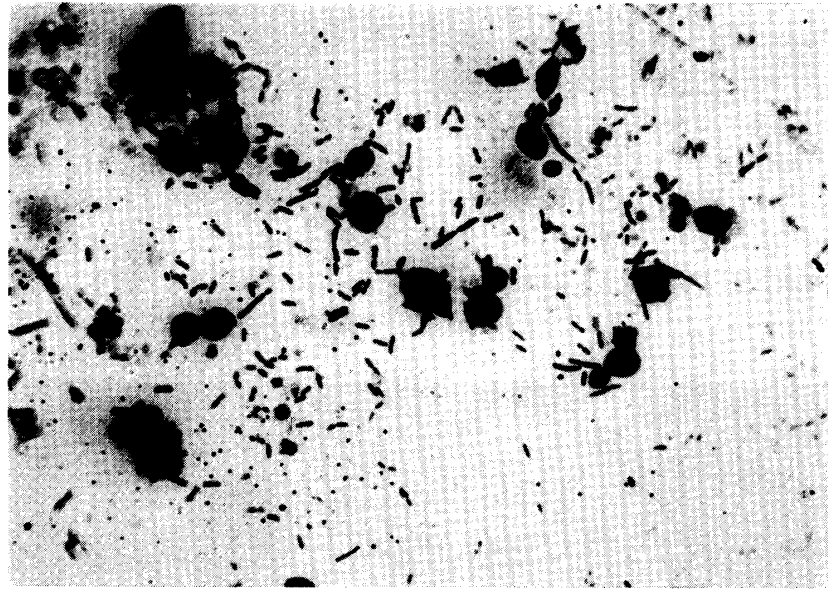


Photo 7. Moromi sample No. 22-1 (3-5), gram-stained.

グラム染色から計算したグラム陽性細菌数と蛍光抗体染色から求められた乳酸菌数とがほぼ一致すると見なしてもさしつかえないので、焼酎醪中のグラム陽性細菌はほぼ全て乳酸菌であると見なしてよいだろう。

#### 要 約

旧式焼酎醸造でとくに米麴生白糠仕込、米麴米仕込などでは滴定酸度が上昇する高酸度醪が時折出現する。この高酸度醪は醪後半でよく出現し、しかも醪のグラム染色によるグラム陽性細菌数の増加と滴定酸度の増加が並行することがわかった。常法による乳酸菌の分離では生菌数が低いのでおだやかな分離方法を採用したところ、試料によってはグラム陽性細菌数とほぼ同じ生菌数が得られた。これらの乳酸菌は同定の結果、ホモ型発酵を行う *Lactobacillus sake* および *L. sake* 型のもの2型を含む *L. sake* 群と、ヘテロ型乳酸菌の *L. brevis* であった。ただ、醪中の乳酸菌生菌数と総菌数との関連を一層よく証明するため、米麴生白糠仕込醪の乳酸菌代表株を用い免疫血清を作製し、これに蛍光色素を標識して蛍光抗体を調製した。まず、米麴生白糠仕込醪の乳酸菌および今回の分離乳酸菌の免疫学的な関係を明らかにするため凝集反応を行った。*L. sake* は少なくとも2群以上の凝集反応のパターンを有し、*L. brevis* は *L. brevis* の免疫血清に対しては均一であるが、*L. sake* の免疫血清に対しては少なくとも3群を区別できた。有孢子細菌はいずれの免疫血清をも凝

集はおこらず、蛍光抗体で染まらないことが証明された。以上から2種の *L. sake* の蛍光抗体で染色されるものはほぼ乳酸菌の全菌数にあたと判断してよく、ただ *L. brevis* の蛍光抗体で染色される菌数が多い時はこの菌数を乳酸菌数とするのがよいと判断できた。2種の *L. sake* の蛍光抗体と2種の *L. brevis* の蛍光抗体とで焼酎醪を染色したところ、醪のグラム染色によるグラム陽性細菌数と蛍光抗体染色による乳酸菌とがほぼ一致したので、高酸度醪の高酸度が乳酸菌によるものであるとの証明が確実となった。

#### 文 献

- 1) 医科学研究所学会：細菌学実習提要。改訂5版，丸善(1981)
- 2) 北原覚雄：乳酸菌と乳酸発酵。灘酒研究会例会講演，1-16 (1948)
- 3) 北原覚雄：乳酸菌の研究，東京大学出版会，東京(1966)
- 4) 玉岡 寿・田邊幾之助・小林武一・大林 晃・松村悦男：旧式焼酎醸造の微生物学的研究(第二報)米麴生白糠仕込過程の微生物相の変遷。醸協，**66**，816-818 (1971)
- 5) 田邊幾之助・二石真智子・迫間敬子・有川順子：旧式焼酎(米麴生白糠仕込)醸造における酒母・醪中の乳酸菌について。鹿大農学術報告，**No. 33**，投稿中。
- 6) 田邊幾之助・菅地龍夫・二石真智子・迫間敬子・志々日義紀：甘藷焼酎醸造における酒母・醪中の乳酸菌について。鹿大農学術報告，**No. 32**，69-77 (1982)
- 7) 田邊幾之助・坂田太吉・迫間敬子：旧式焼酎過程におけるジアチルの生成について。鹿大農学術報告，**No. 31**，47-52 (1981)

### Summary

In the process of Shôchû-brewing, especially in the cases of rice-koji-raw Shironuka-Shikomi and of rice-koji-rice-Shikomi, Moromi in possession of high acidity appears sometimes. It was ascertained that the appearance of Moromi of high acidity occurs often in the latter term of Shôchû-brewing-time-cycle, and that the increase in the gram-positive bacterial counts in Moromi is accompanied with an increase in titration of Moromi.

An isolation of lactic acid bacteria by the usual plating-method was resulted in the low viable counts of lactic acid bacteria in Moromi, but under the employment of a mild method for isolation, viable counts of lactic acid bacteria would agree approximately with the counts of gram-positive bacteria in many samples of Moromi. Each of the lactic acid bacterial isolates was identified with homo-fermenter, namely *Lactobacillus sake*-group, including typical *L. sake* and *L. sake*-like forms, and hetero-fermenter, *L. brevis* respectively.

In order to ascertain more accurately the relationship between the viable counts of lactic acid bacteria and the total bacterial counts, a fluorescent antibody technique was employed. Using representatives of lactic acid bacteria from Moromi of rice-koji-raw-Shironuka-Shikomi, antisera were prepared, on the other hand fluorescent antibodies were prepared by conjugating antisera with fluorescein-isothiocyanate (FITC). Agglutination-tests of the lactic acid bacteria and of the various antisera were carried out for the purpose of ascertaining an immunological relationship among the lactic acid bacterial isolates. No less than two patterns of agglutination-test were found in *L. sake*-group. It was ascertained that the strains of *L. brevis* were homogeneous to the agglutination with antisera of *L. brevis*, and that they were differentiated into at least three groups in comparison with the antisera of *L. sake*-group. In case of the spore-forming bacterial isolates no agglutination with any used antisera was observed, accordingly they were ascertained to have had no reaction to a fluorescent antibody. This fact indicates that the bacterial counts positively stained with two fluorescent antibodies of *L. sake* are to be equivalent to the total counts of lactic acid bacteria in Moromi. Only in the case when bacterial counts which were positively stained with two fluorescent antibodies of *L. brevis* were noted to be larger than those with the antibodies of *L. sake*, it may reasonably be judged that the former counts might be equivalent to the total counts of lactic acid bacteria in Moromi.

Many samples of Shôchû-Moromi were stained with each of the two fluorescent antibodies of *L. sake* and of the two antibodies of *L. brevis*, respectively. As counts of gram-positive bacteria in Shôchû-Moromi were approximately equivalent to the lactic acid bacterial counts stained with fluorescent antibodies, almost all the gram-positive bacteria, multiplied in Moromi, were considered to be lactic acid bacteria. Therefore, many cases of high-acidity-Moromi in Shôchû-brewing were ascertained to have caused by the Shôchû-lactic acid bacteria.