

学 位 論 文 題 名

Studies on Microflora in *Brem* Fermentation using
a Dry-starter, *Ragi Tape*

(ラギ・タペをスターターとする
ブレム [インドネシア米酒] 発酵における微生物叢の研究)

学位論文内容の要旨

ブレムは、主としてバリ島（インドネシア）で作られるアルコール飲料である。乾燥スターターのラギ・タペを用いて白と黒の餅米を混合して作る。ブレムの発酵は、2つの段階的なプロセスで進行する。第一段階は、固体発酵で、蒸米にラギ・タペを接種して、含まれる微生物によって米澱粉を液化・糖化してタペ・ジュースができる。第2の段階は、タペ・ジュースの発酵で、容器の中で約6ヶ月間行われ、清澄なブレム(甘ずっぱいアルコール飲料)ができあがる。バリ島のデンパサールの市場で売られている酒「ブレム・バリ」は、アルコール10%、グルコース27.8%と非常に甘い。

乾燥スターターのラギ・タペは、糸状菌、酵母及び細菌を含んでいる。これらの微生物は、米デンプンの液化・糖化、アルコールの発酵および乳酸生成に関与しており、これらは同時に進行する。しかし、伝統的製法によって作られる乾燥スターターのラギ・タペが、微生物の混合状態であること、さらに、ブレムの発酵は、温度制御をしない熱帯環境の室温での発酵プロセスなので、発酵の精密なコントロール難しく、一定した酒質を保ちにくい。

ブレムの酒質は、ラギ・タペの品質に密接に関係している。以前の研究から良いラギ・タペは、*Saccharomycopsis burtonii* もしくは *S. fibuligera* そして *Amylomyces rouxii* が含まれていると言われていた。しかし、我々の発酵試験では、これらのうちの2種の微生物を用いても良い酒はできなかった。

酒以外にもタペをスターターとした食品がある。米粒（あるいはペースト）を発酵させたタペ・ケタン、キャッサバの固まりを発酵させたタペ・ケテラであり、いずれも甘酸っぱくアルコールの香りが少しあるスナックである。共通する性質は、澱粉を液化と酵母によるアルコール発酵である。アルコール飲料であるブレムでは、酵母によるアルコール発酵が重要であることはもちろん、乳酸菌の役割も重要と考えた。ラギ・タペに含まれる乳酸菌が、ブレムのフレーバーを高める可能性もあると考えた。

本研究は、ラギ・タペに含まれる乳酸菌に焦点をあて、種類や役割を解明した。これは、ブレムの品質を改良する際の重要な知見を提供するものである。バリ島で使われている5種の異なったタイプのラギ・タペから乳酸菌を分離し、生理学的、遺伝学的に同定した。その結果、*Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus curvatus*、*Enterococcus faecium*、*Weissella confusa*、及び、*W. paramesenteroides* が、ラギ・タペの主要な乳酸菌であることを示した。*E. faecium*、

W. confusa および *W. paramesenteroides* の存在は、この研究で初めて明らかにされた。また、既報のようにラギ・タペの最も主要な乳酸菌が、*P. pentosaceus* であることも遺伝学的同定によって確認した。これらの乳酸菌の存在は、ラギ・タペ生産の際の乾燥化において、桿菌よりも球菌の細胞が更に抵抗力があるという事実と符合する。また、より古いラギ・タペでは、桿菌より更に多くの球菌が存在した。

ラギ・タペでの乳酸菌の分布を明らかにするために、*P. pentosaceus* の 16S rDNA をターゲットにした特異的プローブ (Rpt) を開発した。このプローブをドットプロットおよびコロニーハイブリダイゼーションに用いた。他の乳酸菌のプローブ (*Weissella* spp.、*L. curvatus* および *E. faecium*) は、既報のものを用いた。インドネシアで入手した 5 種類のラギ・タペは、乳酸菌の種類から見ると 3 種類の異なるタイプからなることがわかった。ラギ・タペにおける乳酸菌の相違は、製造された地方のそれぞれ異なった環境の影響を受けているのだろう。収集した 5 種類のラギ・タペを使って伝統的な方法によって米のお酒ブレムを作った。できたブレムの官能評価の結果、Gelatik ラギ・タペを用いて作られたブレムが、最も良い品質であった。ブレムは、高い濃度の有機酸、特に乳酸を含んでいる。この乳酸は、乳酸菌と糸状菌の活動が原因であると考えられた。

ブレム発酵中の乳酸菌の挙動を詳しく調べた。乳酸菌は、発酵初期に急速に増殖した。米もろみは、発酵の 24 時間後には、pH 3.6 の最小値に下降した。乳酸菌種の変化を見ると、発酵初期は、*Weissella* spp. が主要な乳酸菌で、その後は交代して *P. pentosaceus* が、主要な乳酸菌となった。発酵の 30 時間後で、乳酸菌の細胞数は減少していった。この時期は、アルコール発酵も始まり、エタノール濃度が、5-6% に達する時でもある。5 種類のラギ・タペの中でも Gelatik ラギ・タペは、エタノールに最も感受性の高い乳酸菌を含んでいた。このためエタノール生成と共に乳酸菌から酵母への微生物交代が起こった。一方、もろみ中のグルコース濃度は、約 86 時間で最高に達した。その濃度は、ラギ・タペの種類によって異なりさまざまであった。その後は、エタノールへと分解され減少していった。

発酵の初期の pH の急速な低下は、乳酸菌が重要な役割を果たしていることを示している。ラギ・タペより分離した酵母を用いたモデル発酵系の実験を行った。すなわち、*A. rouxii* SD23 および *S. fibuligera* SY20-7 を含む発酵モデルを構築した。これに乳酸菌を加えると米デンプンの液化・糖化は促進された。乳酸菌の代謝物が、酵母 *A. rouxii* SD23 の液化活性を高めた可能性もあると考えている。乳酸菌の種類によって効果も異なった。*P. pentosaceus* および *W. confusa* は、より活発に液化活性を高めた。*E. faecium* および *L. curvatus* では、生育も液化の活性化も劣っていた。

これらの結果を基にラギ・タペから分離した微生物の中で優良な株だけを集め発酵試験を行った。すなわち優良な糸状菌、酵母、乳酸菌を混合してブレム発酵を行った。その結果、乳酸菌の存在は、ブレムの香りを高めることがわかった。GC によって揮発性物質の相違も検出できた。

以上、本研究によって、ラギ・タペ中の乳酸菌のブレム発酵への役割として、(1) 糸状菌および酵母のデンプン液化活性を高める。(2) 発酵初期の急速な pH 低下を引き起こし酵母と糸状菌が活躍しやすい環境を作る。(3) ブレムの香りを複雑にしてより品質の高いアルコール飲料とすることが、わかった。

本研究は、伝統的アルコール飲料であるバリ島のブレムの製造における微生物の種類と役割を明らかにした。特に乳酸菌が重要な役割を果たしていることを明らかにし、ブレム発酵に必

須の微生物種を特定することができた。ブレム発酵の仕組みを理と品質向上に大きな貢献をするものである。今後、これらの知見を活用して、ブレムをより良い品質の酒にするための製造方法の改良を行うことが可能となった。インドネシアの産業の活性化に貢献するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 助 教 授 浅 野 行 蔵

学 位 論 文 題 名

Studies on Microflora in *Brem* Fermentation using a Dry-starter, *Ragi Tape*

(ラギ・タペをスターターとする
ブレム [インドネシア米酒] 発酵における微生物叢の研究)

本論文は、6章からなり、図 22、表 13、文献 92 を含む総頁数 101 の英語論文である。別に参考論文 1 編が付されている。

ブレムは、主としてバリ島（インドネシア）で乾燥スターターのラギ・タペを用いて白と黒の餅米を混合し、発酵して作られるアルコール飲料である。乾燥スターターのラギ・タペは、糸状菌、酵母及び細菌を含んでいる。これらの微生物は、米デンプンの液化・糖化、アルコールの発酵および乳酸生成に関与していると考えられている。しかし、伝統的製法によって作られるブレムの発酵は、その精密なコントロールが難しく、一定した酒質を保ちにくい。

ブレムの酒質は、ラギ・タペの品質に密接に関係している。以前の研究から良いラギ・タペは、数種の酵母が含まれていると言われていたが、乳酸菌の役割も重要であると考えた。なぜなら、ラギ・タペに含まれる乳酸菌が、ブレムのフレーバーを高める可能性もあるからである。そこで、本研究は、ラギ・タペに含まれる乳酸菌に焦点をあて、種類や役割を解明するとともに、ブレムの品質を改良する際の重要な知見を提供することを目的として行った。

バリ島で使われている 5 種の異なったタイプのラギ・タペから乳酸菌を分離し、生理学的、遺伝学的に同定した。その結果、*Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus curvatus*、*Enterococcus faecium*、*Weissella confusa*、及び、*W. paramesenteroides* が、ラギ・タペの主要な乳酸菌であることを示した。*E. faecium*、*W. confusa* および *W. paramesenteroides* の存在は、この研究で初めて明らかにされた。また、既報のようにラギ・タペの最も主要な乳酸菌が、*P. pentosaceus* であることも遺伝学的同定によっ

て確認した。

ラギ・タペでの乳酸菌の分布を明らかにするために、*P. pentosaceus* の 16S rDNA をターゲットにした特異的プローブ (Rpt) を開発した。このプローブをドットプロットおよびコロニーハイブリダイゼーションに用いた。他の乳酸菌のプローブ (*Weissella* spp.、*L. curvatus* および *E. faecium*) は、既報のものを用いた。インドネシアで入手した 5 種類のラギ・タペは、乳酸菌の種類から見ると 3 種類の異なるタイプからなることがわかった。これら 5 種類のラギ・タペを使って伝統的な方法によって米よりブレムの発酵を行った。官能評価の結果、Gelatik ラギ・タペを用いて作られたブレムが、最も良い品質であった。

ブレム発酵中の乳酸菌の挙動を詳しく調べた。乳酸菌は、発酵初期に急速に増殖し、米もろみの pH は、発酵の 24 時間後には 3.6 の最小値に下降した。乳酸菌種の変化を見ると、発酵初期は、*Weissella* spp. が主要な乳酸菌で、その後は交代して *P. pentosaceus* が、主要な乳酸菌となった。発酵の 30 時間後では、アルコール発酵も始まり、エタノール濃度が 5-6% に達し、乳酸菌の細胞数は減少していった。一方、もろみ中のグルコース濃度は、約 86 時間で最高に達し、その後はエタノールへと分解され減少していった。

ラギ・タペより分離した酵母を用いたモデル発酵系の実験を行った。すなわち、*A. rouxii* SD23 および *S. fibuligera* SY20-7 を含む発酵モデルを構築した。これに乳酸菌を加えると米デンプンの液化・糖化は促進された。また乳酸菌の種類によって効果も異なった。またこれらの結果を基にラギ・タペから分離した微生物の中で優良な糸状菌、酵母、乳酸菌を混合してブレム発酵を行った。その結果、乳酸菌の存在は、ブレムの香りを高めることがわかった。GC によって揮発性物質の相違も検出できた。

以上、本研究によって、ラギ・タペ中の乳酸菌のブレム発酵への役割として、(1) 糸状菌および酵母のデンプン液化活性の向上、(2) 発酵初期の急速な pH 低下を引き起こし酵母と糸状菌が活躍しやすい環境の導入、(3) ブレムの香りを複雑にすることによる品質の向上 の 3 点が示された。

本研究は、伝統的アルコール飲料であるバリ島のブレムの製造において乳酸菌が重要な役割を果たしていることを明らかにし、またブレム発酵に必須の微生物種を特定することができた。ブレム発酵のプロセスの理解と品質向上に大きな貢献をするものである。今後、これらの知見を活用して、ブレムをより良い品質の酒にするための製造方法の改良を行うことが可能となった。インドネシアの産業の活性化に貢献するものと考えられる。

よって審査員一同は、イヌガ スジャーヤが博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。