

准教授  
楠部 真崇

共同研究者  
岐阜大学工学部  
教授 岩橋 均  
岐阜大学応用生物科学部  
教授 中川 智行  
和歌山工業高等専門学校  
エコシステム工学専攻  
奥浜 真乃助

2005年 3月 徳島大学大学院工学研究科  
博士後期課程 修了  
2005年 4月 徳島大学工学部先端工学  
教育研究プロジェクト助手  
2005年 10月 和歌山工業高等専門学校  
物質工学科 助手  
2011年 4月 和歌山工業高等専門学校  
物質工学科 准教授  
2017年 4月 和歌山工業高等専門学校  
生物応用化学科 准教授（現職）

---

## 杜氏が伝承する伝統純米酒「水酛」における 「安全とおいしさ」の見える化

---

### 1. 目的と背景

日本酒の起源は口嚙み酒に遡り、700年代頃には腐敗醗酵による濁酒の存在が「延喜式（702年）」に記載され、室町時代の書籍「御酒之日記(1566年)」には日本酒の醸造方法が初めて記述された。この中には、奈良県などで盛んに醸造されていた「水酛造り」の記載がある[1]。「水酛造り」の特徴は、地域固有の微生物叢によって醗酵を進める醸造を用い、複数の微生物によって醗酵を制御する点にある。「水酛造り」は日本酒の歴史を遡る上で欠かせない存在であり、1600年以上も以前から地域固有の微生物を酒樽の中で制御する杜氏の技術力は日本が誇るべき職人技である。

一方で現在の日本酒の消費量は、国税庁の調査によると国内出荷量が17年前の半分以下にまで落ち込んでいる。しかしこれとは逆に、海外では近年の和食ブームにより8年間連続で最高輸出量を更新している。古来から伝承されてきた日本文化の醗酵食品離れが現代の問題の一つとしても危惧されており、拡大する海外市場と若者の醗酵離れの改善に向け、「水酛造り」の最中で行われている作業と複雑な醗酵の因果関係を明確にし、「安全とおいしさの証明」を「見える化」させることで、日本の醗酵技術の奥深さを世界中にアピールする大きな武器となると考える。自然醗酵をベースとするため、火落ち菌や人体に影響を及ぼす病原菌などの確認によって安全性を可視化し、

さらには乳酸菌や酪酸菌などを含む純米酒の整腸機能改善についてのブランド化もしくは新しい機能性純米酒の商品カテゴリ構築にも期待できると考えている。

本研究では、「水酏造り」の「安全とおいしさの証明」を「見える化」するため、古来より杜氏が受け継いだ日本が誇る複雑な醗酵の制御力を科学的解析により明確にすることを目的とする。

## 2. 方法

### 2.1 微生物叢解析

水酏造りの醸造過程に応じて、そやし水: 4 サンプル、酒母もろみ: 13 サンプル、もろみ: 1 サンプルの計 18 種類の酒サンプルを奈良の酒蔵から提供していただいた。各サンプルに含まれるバクテリアと酵母の細胞に着目し、SYBER green(Takara)を用いて蛍光顕微鏡下菌体数を測定し、微生物総数の推移を確認した。

次に、ISOIL for Beans Beating(Nippon gene)を用いて全 DNA を抽出し、16SrRNA と 18SrRNA の V4 領域をそれぞれコードするユニバーサルプライマーを用いて伸長させ、Miseq (illumina, CA, USA)にてメタゲノムシーケンシングした。出力された結果は、mothur(ver. 1.35.1)と SILVA database (ver.128)を用いて、属レベルでの分類や  $\alpha$  多様性、 $\beta$  多様性について解析を行った。[2,3]

### 2.2 香気成分分析

Mono Trap (ジーエルサイエンス株式会社)を用い、GC/MS(島津製作所)にて香気成分について測定した。GC/MS(GC:Agilent Technologies 7890A MS:JOEL JMS-QI050GC)の GC 制御条件を初期温度 40℃、保持時間 10 分、昇温速度 10℃/分。終了温度 200℃、保持時間 2 分とし、MS 条件を開始質量 30.00、終了質量 500.00 として測定した。

### 2.3 有機酸の分析

Prominence 有機酸分析装置 (理研計器株式会社) を用い有機酸を測定した。カラム Shim-pack SCR-102H (300 mmL.×8.0 mmi.d.)、ガードカラム SCR-102H50 mmL.×6.0 mmi.d)、カラム温度 40℃、注入量 10  $\mu$ L、流量 0.8 mL/min で移動相 5 mmol/Lp-トルエンスルホン酸水溶液で分離した。検出条件は緩衝液 (5 mmol/Lp-トルエンスルホン酸、20 mmol/L Bis-Tris、0.1 mmol/L EDTA · 4H)0.1 mmol/L EDTA · 4H 水溶液) を流量 0.8 mL/min で流し、導度検出器 (ポラリティ+, セル温度 43℃) で検出した。

## 3. 結果と考察

まず「水酏造り」は、最も重要な過程である乳酸菌によるそやし水の醗酵に始まる。次に酒母もろみ過程では、野生酵母の増殖を促す、“あなか”と呼ばれる手入れが杜氏により行われる。この手入れは水酏造りにおいて唯一の操作であり、醸造温度の加温

がされる。その後、もろみへとスケールアップを行い清酒が醸造されている(図 1)[4]。

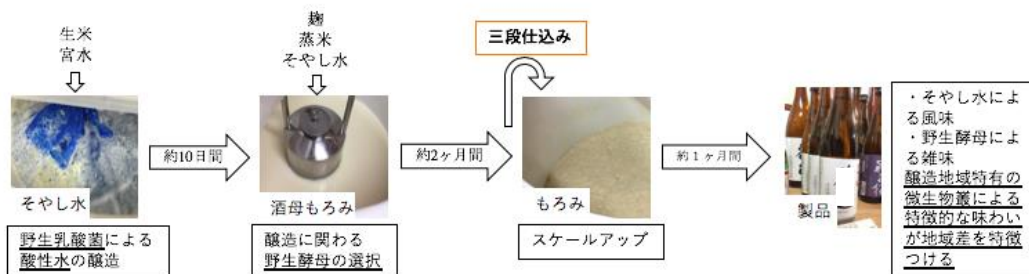


図 1. 水酏造りのワークフロー

16SrRNA のメタゲノム解析より、16SrRNA と 18SrRNA の総リード数は 115,597、241,008 であった。SILVA データベースを用いた mothur での解析の結果、総 OTUs 数は 16SrRNA が 767、18SrRNA が 4,286 であり、また、good coverage は一貫して 95%以上を示していた。(図 2) 硝酸還元菌である *Enterobacteriaceae* 科や *Pseudomonas* 科が醸造初期であるそばし水に検出され、その後乳酸球菌である *Lactococcus* 属と *Leuconostoc* 属が複数の OUT で検出された。硝酸還元菌により醸造バッチ中の硝酸が亜硝酸に分解される[5]と同時に、乳酸菌により乳酸生成が行われている。更には、*Acetobacter* 属や *Acinetbacter* 属といった酢酸菌も醸造初期に混生しており、酢酸は乳酸に続いて生成率が高い。これらの複合微生物叢によって多種の酸性物質が物質生産され、醸造バッチの pH は 3 前後まで落ち込んだ。(図 3)硝酸還元菌や酢酸菌、乳酸球菌は pH 耐性が低く、自身の合成した亜硝酸、酢酸、乳酸によって淘汰されたと考えられる。その後、酒母もろみに移行した段階で、pH 耐性の高い乳酸桿菌である *Lactobacillus* 属が優勢菌種に遷移し、醸造終期まで 90%以上の存在率を示した。(図 2)

その中で、病原菌として知見のあり、下痢や嘔吐など食中毒の原因として年間 30 件ほどの事例が挙げられる *Clostridium perfringens* が属する可能性のある *Clostridium* 属はオープンバッチ醸造を行う水酏造りで約 300OTUs 検知された。醸造初期のそばし水ではその存在率は 16.5%以上であったが、醸造終期のもろみでは約 0.5%まで存在率が低下した。また、*Campylobacter jejuni* や *C. coli* などが属する *Campylobacteriales* 科、同様に下痢や血便などが発生する病原菌である *Vibrio parahaemolyticus* が属する *Vibrio* 属がそれぞれ 1OTU ずつ醸造中期に検出されたが、最終製品では検出されなかった。このように、醸造期間中の多段階の複合発酵過程において病原菌や雑菌などの増殖を抑えるまた、淘汰するような微生物叢のスクリーンシフトが今回確認できた。

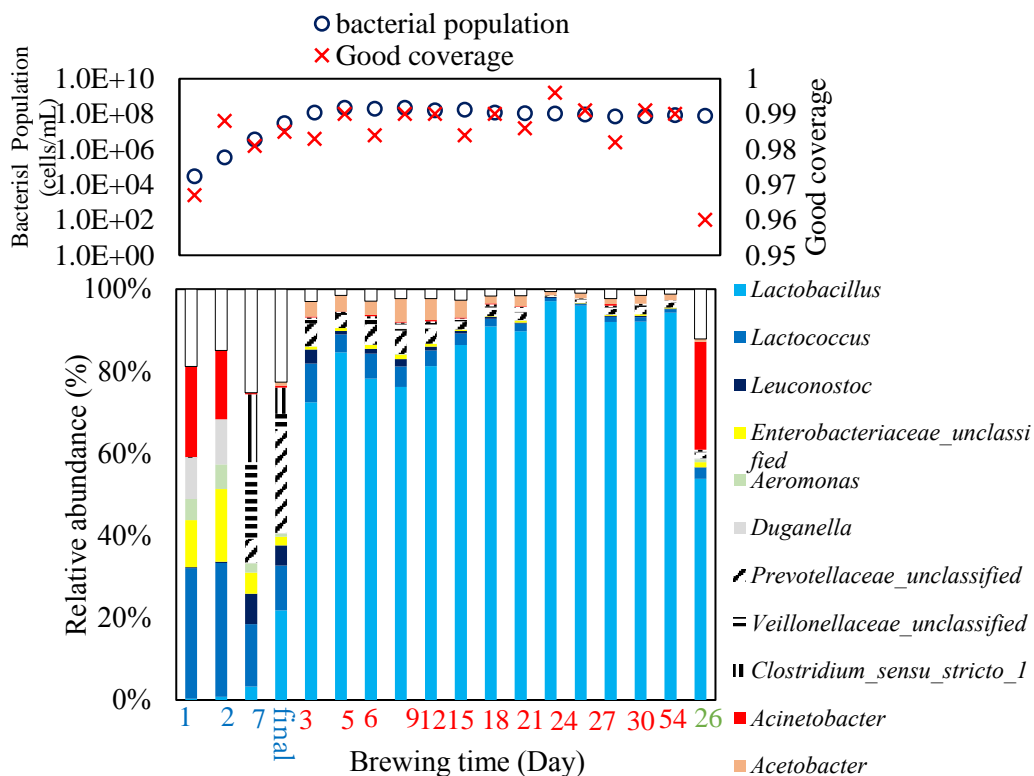


図 2. 16SrRNA のメタゲノム結果 (横軸 = 青文字:そやし水, 赤文字:酒母もろみ, 緑文字:もろみ の醸造日数を示す)

次に、酵母によるアルコール醗酵過程では、*Pichia* 属と *Saccharomyces* 属の 2 属が優勢的に醗酵に関与していた。*Pichia* 属から *Saccharomyces* 属へと 2 度目の入れ替わりがある醸造中期の酒母もろみ 9 日目~15 日目では、杜氏唯一の手入れである「あんか」と呼ばれる加温操作が行われており、微生物叢のスクリーンシフトと杜氏の手入れの相関性が見出された。なぜなら、あんかのタイミングで *Saccharomyces* 属が優勢菌種に遷移し、同時に糖質量の指標である **Brix** が減少し、エタノールが生成されているからである。これは、杜氏が感覚的に操作していた温度管理は酵母の活動を活発化させ、日本酒醸造に欠かせないアルコール醗酵を促進していたことを示唆される。これまで永く口伝えで伝承されてきた経験や五感による伝統技術の体現が科学的に裏付けられた。(図 4) また、アルコール濃度 15%以上の耐性を持たない *Lactobacillus* 属は醸造終期に存在率が減少した。更に、醸造終期においてバクテリアの細胞数が減少し、真菌が増殖していることからバッチ内は酵母に適した酸性・アルコール環境下に自然的に

シフトしていたと言える。

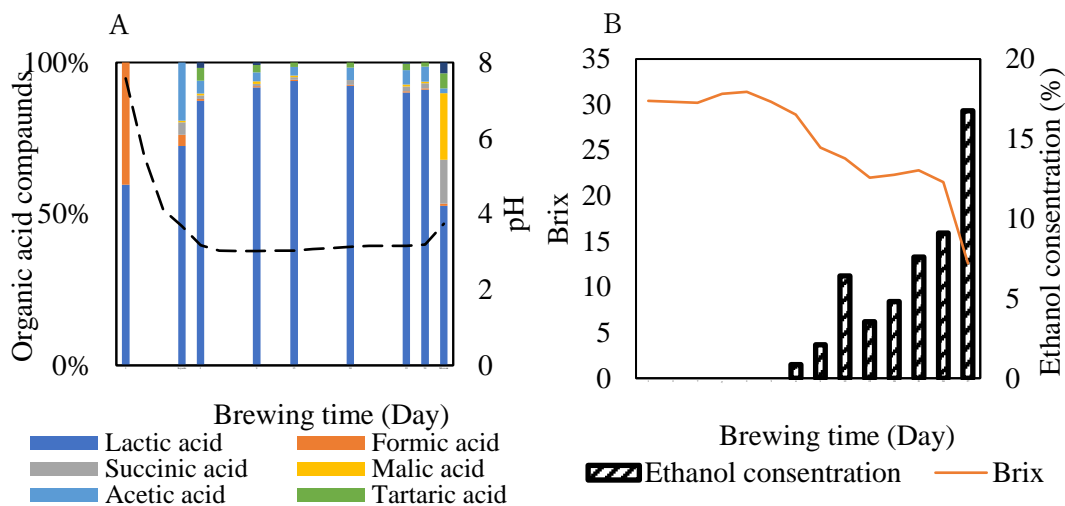


図 3. (A)有機酸と pH の推移と(B)アルコール濃度と Brix の推移 (横軸=赤文字:酒母もろみ, 緑文字:もろみ の醸造日数を示す)

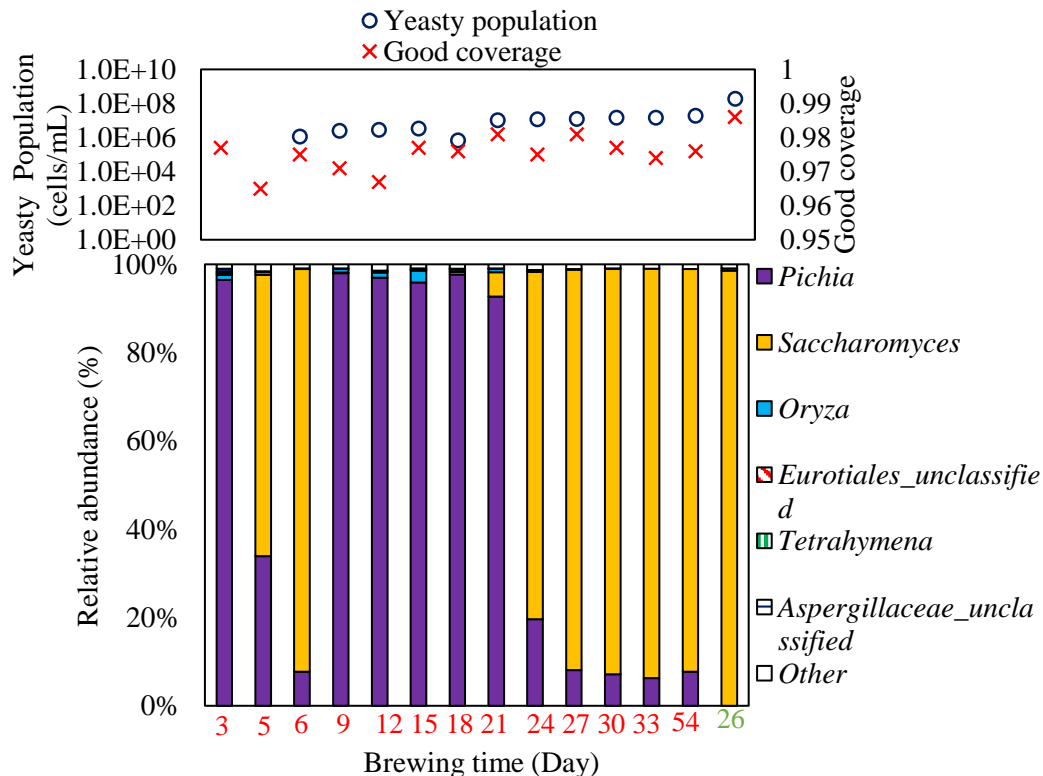


図 4. 18SrRNA によるメタゲノム解析と細胞増殖数の推移 (横軸=赤文字:酒母もろみ, 緑文字:もろみ の醸造日数を示す)

#### 4. 結論

本研究では、乳酸醗酵やアルコール醗酵などの自然複合醗酵をモニタリングすることができた。微生物の相互関係や代謝産物などのクオラムセンシング的な能動により食中毒菌などの雑菌の制御や淘汰などのスクリーンシフトが行われていたことも示唆された。水酏造り日本酒では、pH 耐性の高い乳酸桿菌の *Lactobacillus* 属が優勢種となり醸造バッチを支配し、微生物叢のスクリーンシフトを指揮していた。更には、杜氏が行う「あんか」は、*Saccharomyces* 属へと微生物叢をシフトさせ、アルコール醗酵を促進しており微生物叢のスクリーンシフトへの人的な寄与も垣間見られた。また、このような複合醗酵では、単純な純粋培養菌体のみで行うモダンな発酵に比べて、複数種の微生物の共存により複合的な代謝産物の合成により多種多様な香気成分が検出され(図 5)、日本人特有の官能的な奥深さや感覚的な奥ゆかしさをも感じられた。

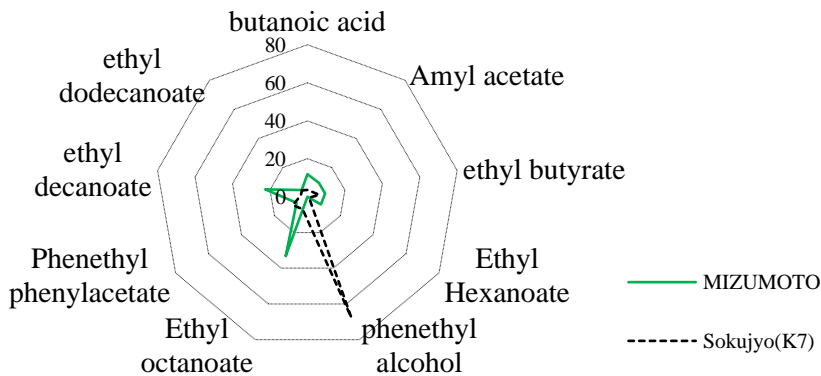


図 5. 水酏造りと協会 7 号酵母(K7)による香気成分の比較

洗礼されたモダンな速醸酏造り日本酒では絶対につくり出せない、野生気のある芳醇な香りや奥深く雑味のある水酏造り日本酒味わいは、複合的な微生物叢による雑菌のスクリーンシフトや共存により生み出された貴重な産物であり、飲む人々を直接的に魅了するだろう。我々日本人の伝統的文化である醗酵制御技術についてより多くの方々に関心を持ってもらい、来たる 2021 年東京オリンピックや 2025 年大阪万博などのメガイイベントを中心に地球規模で日本酒の歴史や将来について考えていきたい。

#### 参考文献

[1] 醸造技術のあゆみと醸造試験所の方途, 西谷尚道, 醸協, 88(7), P.543-549 (1993)

[2] Kyohei Kuroda et al., Community Composition of Known and Uncultured Archaeal Lineages in Anaerobic or Anoxic Wastewater Treatment Sludge, *Springer*, DOI:10.1007/s00248-014-0525-z (2014)

[3] Nicholas A. Bokulich et al., Indigenous Bacteria and Fungi Drive Traditional Kimoto Sake Fermentations, *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5522-5529 (2014)

[4] Kazuyuki MATSUZAWA et al., Changes in compositions and microorganisms in Dakusyu-sake brewing using the Bodaimoto method, *Journal of the Japanese Society of Taste Technology*, 97(10), 734-740 (2002)

[5] Takashi Koyanagi et al., Tracing microbiota changes in yamahai-moto, the traditional Japanese sake starter, *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 80(2), 399-406 (2016)