

日本酒造りにおいて見過ごされてきたバクテリアの存在と機能

西田 洋巳

(工学部生物工学科)

日本酒は自然との調和の中で造られている。その歴史は古く、微生物の存在や発酵の仕組みがわかっていない時から造られていた。日本酒は、麹菌による酒米の糖化と酵母によるエタノール発酵によって造られている。これらは真核微生物であるが、バクテリアと日本酒とのかかわりに関する研究は少ない。ただ、乳酸菌については研究報告があるが、乳酸菌以外についてはほとんど研究されていない。私たちは、日本酒造りの過程から放線菌に属するバクテリアを単離した。私の知る限りにおいて、日本酒造りにかかわる放線菌の報告はない。そのバクテリアが日本酒に与える影響について明らかにし、日本の伝統文化である日本酒および日本酒造りの維持、継承に貢献する。

キーワード：バクテリア，日本酒造り，蔵付き，コクリア，ゲノム

1. 日本の伝統文化としての日本酒とその造り

日本酒造りは、酒米のデンプンを麹菌（アスペルギルス・オリゼ）が分解して糖に変換し、その糖を酵母（サッカロミセス・セレビシエ）が分解してエタノールを造る。酵母は日本酒造りの過程における嫌気的な条件下においてエタノール発酵し、最終的には20%程度のエタノール濃度に達する。蒸留を行わず、ここまで高いエタノール濃度を得ることは、ワインやビールではできず、日本酒造りの技術力がとても高いことを意味している。この酒米からエタノールを造る過程は、並行複発酵と呼ばれている。ワインは糖を酵母がエタノールにするだけなので、単発酵と呼ばれ、ビールでは麦芽が糖化するので、単行複発酵と呼ばれている。よって、麹菌と酵母の2つの異なる真核微生物を使ったアルコール発酵飲料としての日本酒は世界的に見てユニークである。

この日本の伝統文化を維持、継承することは、日本の国益という観点からも重要である。日本酒の定義としては、酒税法第3条第7号に「清酒」についての記載がある。基本的には、米、米こうじ、水を原料として発酵させ、こしたのものとなる。なお、アルコールが22度未満とされる。個人的には、どのように発酵をさせるかが重要であるように思うが、発酵については示されていない。また、「こしたのもの」とあるため、例えば遠心によって上清を取っただけのものは、清酒ではないように解釈できる。個人的には、酒税法の解釈よりも、日本酒はそれぞれの酒蔵が維持し、継承してきた方法で造られたものとして認識する方が分かりやすい。そもそも「酒税法」で定義されたものではなく、飲食品としての日本酒の定義があつてよいように感

じる。上原浩さんの次のことばが印象的である。「日本酒とは本来、米と水だけでつくるべき酒だ。……しかし、醸造用アルコールや糖類等を添加した酒は、酒税法の「清酒」であっても「日本酒」と呼ぶべきではないと私は思っている[1]。」

日本酒の文化的価値は高く、国際的に認められている。日本酒を継承、維持するためにも、日本の文化が間違つて伝わらないためにも、日本酒の偽物が世界で流通することを防止する必要があるのではないか。そのためにも、日本酒を科学的に解明することは重要なことであると考えている。さらに、それを日本語ではなく、英語で世界へ向けて発信する必要がある。

2. 日本酒は世界最高の発酵技術で造られる

さて、ビールにしてもワインにしても、日本酒にしても、その起源は、微生物の発見のはるか前に遡る。レーウエンフックが顕微鏡を用いて微生物を観察したのは1674年であり、パスツールが白鳥の首フラスコを用いて生物の自然発生説を否定したのは1861年のことである。よって、発酵の仕組みなど理解せずに、人間はこれらのアルコール飲料を造っていた。なかでも、日本酒は、その貯蔵の段階において、「火入れ」と呼ばれる低温殺菌を行っており、パスツールが低温殺菌法を発表する30年も前にそれが行われていたことを示す記録が残っている[2]。すなわち、日本酒造りに関する生産技術は世界でも類を見ない最高のものである。これは私が誇張して言っているのではない。

極めて奥が深い日本酒とその造りから学ぶことはまだまだあるはずだ。日本酒には人間が自然と向き合い、自然と

の調和を目指した方向性を感じ、それは、今後最も必要とされるものの考え方の1つであろう。日本酒を造っているのは微生物であるが、自然の中にひっそりとたたずむ酒蔵を目にし、その中に入ったとき、微生物を利活用した人間の英知を思い知る。

3. 蔵付き酵母

「蔵付き」とは、その酒蔵に住み着いているという意味であり、蔵付き酵母ということばを耳にしたことがあるかもしれない。一般的に耳にする蔵付きはほぼすべて酵母にかかることばである。微生物を理解せずに、日本酒は造られていたことを考えると、日本酒造りで最も重要な役割を担っていたのは、蔵付き酵母であると考えてよい。

ただ、酒蔵に住み着いている微生物が酵母だけであるはずがない。様々な微生物が住み着いているのは明白であるが、それらのメンバーが決まっているのか、変化しているのかわからない。酒蔵のタンクには歴史を感じるが、それにも数多くの微生物が付着している。酒蔵を大々的に改造したり、引っ越ししたりして、それまでに造っていた日本酒の味や風味などが変わったとすると、蔵付きの微生物が日本酒の品質に影響を与えていたと考えられる。

微生物の存在さえわかっていない時代から日本酒が造られていたということは、これら蔵付き酵母は、毎回の日本酒の仕込みの際に確実に混入していたことを意味している。

現在では、多くの酒蔵において、日本醸造協会から購入した協会酵母を使って日本酒は造られている。ただ、その多くはもともと特定の酒蔵に特有の（おそらくは住み着いていた）酵母であり、例えば、協会1号は櫻政宗（兵庫、灘）、2号は月桂冠（京都、伏見）、3号は酔心（広島、三原）、5号は賀茂鶴（広島、西条）、6号は新政（秋田）、7号は真澄（長野）、9号は香露（熊本）、12号は浦霞（宮城）において分離された。

4. 酒母と乳酸

日本酒造りには、麴を造るプロセスと酒母（酛、もと）を造るプロセスがある。麴造りは、蒸米に麴菌をつけて、デンプンを糖化させる。エタノール発酵のスターターである酒母造りは、使用する酵母の発酵力を最大限に高め、雑菌などの混入をさける目的で行われる前培養と呼べるものである。酒母には、生酛と速醸酛の2つのタイプがある[3]。山廃仕込みは生酛を使って行われる。生酛は環境に生育している乳酸菌が混入し、その増殖を待ち、乳酸菌が生産する乳酸によって雑菌（乳酸菌そのものも含め）が減少したところに使用する酵母を入れて造られる。それに対し

て、速醸酛では、乳酸菌の生育を待たず、乳酸を入れて雑菌を減らし、そこに使用する酵母を入れる。よって、速醸酛の方が生酛よりも約半分の期間で酒母を造ることができる。現在の日本酒の約9割は速醸酛を使用している。いずれにしても、日本酒酵母は乳酸濃度が高いところに入れられるため、酸性条件下で生育するものでなければならない。

もちろん、微生物の存在を知らないときから使用されてきた発酵スターターは生酛である[3]。現在市販されている日本酒の大半が速醸酛で造られているが、生酛造りの日本酒は味に深みがあるとされ、人気を保っている。日本酒の歴史の中で、速醸酛の歴史は浅く、生酛のような酵母の力強さが無いとも言われているが、その分飲みやすい酒に仕上がる。当然のことであるが、日本酒造りを発展させてきた原動力は、人間の舌である。日本酒には有機酸やアミノ酸などの様々な成分が含まれており、その変化を知るのは、人間の舌である。また、どの日本酒を買って飲むかという判断も当然に舌で決めている。現在でも手間暇のかかる生酛造りで日本酒を造っている酒蔵は、それを維持し、継承してほしいと切望する。もっと言わせてもらえば、日本酒造りが自然の力を借りて行われていることを実感できるのも生酛の方が高く、もっと多くの酒蔵が生酛造りを維持し、継承してほしいと願っている。

はじめに日本酒は麴菌と酵母だけを使用して造られると言ったが、生酛造りでは混入した乳酸菌も役割を担っている。もちろん、酒蔵によっては、乳酸菌を添加して生酛を造っているところがあるかもしれないが、本来は、酒蔵に存在している乳酸菌が勝手に入って増殖することを利用している。ヨーグルトや漬物などの例を出すまでもなく、発酵食品と乳酸菌はとても密接な関係にある。私たちの周りには相当数の乳酸菌が存在して生きている証拠であり、人間はそれらを上手く利活用してきた。ただ、日本酒造りにおいては問題が生じることがある。それは、乳酸菌の一部は、20%程度のエタノール濃度でも増殖することができ、それらが日本酒造りにおいて混入した場合、日本酒が腐造するからである。先に述べた火入れの目的は1つではなく、様々な酵素を失活させる効果などがあるが、その主目的は、この火落ち菌とよばれる乳酸菌を死滅させることにある。また、田村学造博士が火落ち菌の生育因子として火落ち酸（メバロン酸）を発見したことは有名である。

5. 日本酒に含まれるバクテリアDNAの多様性

私たちは、33の異なる酒蔵から44の澄んだ日本酒、3の濁り酒、11の酒粕に含まれるバクテリアDNAをPCRによって増幅し、それらのバクテリア菌叢解析を行った。その結果はバイオインフォマティクスのジャーナルに発表

した[4]。これらの58のサンプルからバクテリアDNAを属レベルで分類したところ、175属のバクテリアを検出した。サンプル毎のバクテリア菌叢をクラスター解析したところ、3つの主要クラスターに分かれた[4]。興味深いことに、11の酒粕はその中の1つのクラスターだけに含まれ、そのバクテリア菌叢は日本酒よりも多様度が低い結果であった。このことから、日本酒に混入するバクテリアの多くは、日本酒造りの過程で死滅して、細胞表層が破裂し、そのDNAが溶液中に放出されており、細胞表層が頑丈で、破裂しないようなバクテリアの場合は、死滅後に酒粕の方に含まれると考えられる。例えば、放線菌に属するコクリアはエタノール存在下においても細胞表層が破裂しないことが報告されており[5]、このバクテリアのDNAは濁り酒と酒粕からのみ検出されている。後述するが、コクリアのDNAが検出された日本酒はすべて同じ酒蔵のものであった。日本酒造りの過程で細胞構造が維持されているバクテリアは限られたものであり、大半は細胞が破裂して、その内部にあったDNAは溶液である日本酒に存在することになる。

日本酒に含まれるバクテリアDNAを検出できるということは、死滅し、細胞崩壊したバクテリアのDNAは迅速に分解されるのではなく、完全に分解されていないDNAが日本酒中を漂っていることを示している。よって、日本酒造りの過程におけるバクテリア菌叢についても、DNAからの解析であれば、それ以前の菌叢を引きずりながら示していることとなる[5-9]。

日本酒に用いる水を仕込み水というが、この仕込み水に含まれるバクテリアDNAを調べたところ、日本酒のものとは全く異なっていることがわかった[10, 11]。すなわち、日本酒において検出されたバクテリアDNAは、仕込み水に入っていたものではなく、日本酒造りの過程において混入し、一時的に増殖して細胞数がある程度になったバクテリア由来のDNAであることがわかる。また、同じ銘柄の日本酒を異なる製造年で比較したところ、バクテリア菌叢が違っていた[10]。さらに、前述したように、製造された酒蔵の地域を比較したところ、バクテリアDNAを属レベルで分類した場合には、地域ごとのクラスターは見られなかった[4]。これらの結果より、日本酒に入り込むバクテリアは環境の影響を大きく受け、極めて多様であることがわかった。そこで、地域ごとではなく、その酒蔵に特有のバクテリアが存在しているかどうかについて調べることにした。

6. 初添えからのバクテリアの単離と同定

酒母に麴、蒸米、水を加えて醪（もろみ）が造られる。

その際、三段仕込みで行われることが一般的で、初添え、仲添え、留添えと呼ばれる。初添えと仲添えの間にはそのまましておく踊りという工程が入る。麴、蒸米、水を加える作業を3回に分けることによって、酵母が効率よく発酵するように工夫されている。醸造りの過程のバクテリアDNAの菌叢変化を調べたところ、ほとんど変化しないことがわかった[10, 12]。このことは、日本酒造りにおけるバクテリアの混入は、酒母および麴造りの過程において生じていることを示している。そこで、私たちは酒母と麴が最初に混ぜられる初添えからバクテリアの分離を試みた。

初添えサンプルは、富山のある酒蔵から異なる時期に仕込まれた6つをいただき、それらからバクテリアの分離を行った。46株のバクテリアを分離し、それらの系統的位置を知る目的で、リボソームRNA遺伝子の部分塩基配列を比較した。その結果を属レベルで分類したところ、コクリアに属するバクテリアが23株、スタフィロコッカスが12株、バチルスが6株、レイフソニアが2株、マイコバクテリウムが2株、エンテロコッカスが1株であった（図1）。また、コクリアは6つの異なる初添えからすべて検出され、スタフィロコッカスは4サンプル、バチルスは3サンプルから検出されたが、あとの3つのバクテリアは1サンプルからのみであった[4]。これらの結果より、コクリアはこの酒蔵に特有の（おそらく住み着いている）バクテリアであると考えた。

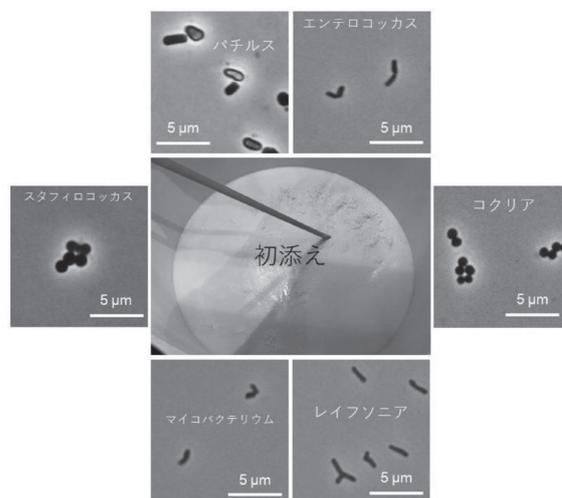


図1 コクリアを分解した酒蔵の初添えとそこから分離されたバクテリアの顕微鏡写真

そこで、先の33の異なる酒蔵からの58サンプルの日本酒と酒粕におけるバクテリア菌叢の結果において、コクリアを探したところ、3サンプルにその存在が確認でき、それらはすべてがこの酒蔵のサンプルであった[4]。このバクテリアが酒蔵に長年住み着いている蔵付きであるか、この酒蔵において酒造りにかかわっている人からの混入である

かはわかっていないが、私たちが調べた限りにおいて、この酒蔵だけから検出されたバクテリアである。酒蔵にあったラックからバクテリアを分離したところ、初添えから分離したものは別のコクリアを分離できた。このことは、この酒蔵には多様なコクリアが住み着いていることを意味していると考えている。また、前述したようにコクリアDNAは濁り酒と酒粕のサンプルにおいて検出されたが、澄んだ日本酒からは検出されなかった。このことは、日本酒造りの過程において、コクリアは死んだとしても細胞は破裂することなく存在していたことを示す。私たちが知る限りにおいて、乳酸菌以外で日本酒造りと深い関連があるバクテリアの最初の報告となった[4]。

乳酸菌も放線菌もグラム陽性のバクテリアであるが、系統進化上大きく違った系統群であり、乳酸菌はゲノムのグアニン・シトシン (GC) 含量が低いファーミキューテス門、放線菌はGC含量が高いアクチノバクテリア門に属す[13]。コクリアは放線菌に属しているが、胞子は形成せず、胞子を介して環境中に拡散することはない。

7. コクリアのゲノム解析

リボソームRNA遺伝子の部分塩基配列の比較から、コクリアに属する分離株は、2つのグループに分かれることがわかったため、それぞれのグループから1つの分離株を選択し、それらのゲノム塩基配列を決定した。その結果、分離株TGY1120_3はクロモソームのほかに3つのプラスミドを持ち、分離株TGY1127_2はクロモソームとプラスミド1つから成り立っていることがわかった。これら4つのプラスミドのいずれをクエイリー配列にして類似配列検索を行っても、これらの4つのプラスミドがヒットすることより、これら4つのプラスミドは共通の祖先を持っていると考えられる[14]。また、1308塩基、435アミノ酸のトランスポゼースが全く同一の塩基配列でTGY1120_3のクロモソームに2カ所、そのプラスミドの1つに1カ所、さらに、TGY1127_2のプラスミドに1カ所にコードされていることがわかった。これらのことは、コクリアに属するこれらの2つの系統間において、プラスミドの水平伝播が生じ、細胞内においてはトランスポゾンの転移が生じていることを強く示唆している[14]。

また、ゲノムアノテーションより、TGY1120_3には4つ、TGY1127_2には7つのアルコール脱水素酵素遺伝子がコードされていることがわかった。アルコール脱水素酵素はエタノールの分解の際に働くことで知られている[15, 16]。

また、TGY1127_2にはウレアーゼ遺伝子群が存在しているが、TGY1120_3には存在していないことがわかった。

胃の酸性条件でもヘリコバクターは生存できるが、その要因は、ウレアーゼを持っていることであることが知られている[17]。よって、TGY1127_2の方がTGY1120_3よりもエタノールや酸に対して耐性を有していることが推定された。

8. 本研究の意義

初添えから分離したコクリアの2株の培地中での増殖は5, 15, 30℃の中で15℃が最も活発であった。系統進化的に同じあるいは最近縁のコクリアの種は30℃から37℃の範囲で最適生育温度であることを考えると、分離したコクリアは、15℃に適應するように進化したものであると考えられる。これらのコクリアは、コクリアの集団として、日本酒造りに適応し、いまなお、進化途中にあるのであろう。

日本酒造りの過程から分離したコクリアは、食品科学だけではなく、微生物生態学や微生物進化学における研究対象となりつつある。現在、コクリアの分離株2株を使った日本酒酵母との共培養の実験などを行っており、極めて興味深い結果が得られている。近々に論文発表する予定である。

さて、本研究の意義とは？現在行っている共培養の実験から、コクリアの有無による違いが明確となり、その機能についての研究の扉が開けられつつある。すなわち、酵母だけではなく、日本酒造りの過程において、放線菌の仲間であるバクテリアが実際に機能していることを明らかにする。

本研究を通して、各酒蔵には、その酒蔵特有の微生物が住み着いており、それらは、日本酒造りにおいて「機能している」と確信をもって主張できるようになった。今後は、多くの酒蔵のご協力を得ながら、そのことを示していく所存である。

さて、本研究の意義は、上記のような学術的なものだけではない。神々しい山々にひっそりとたたずむ酒蔵、自然と一体となった日本酒造り、これらは、人間が生きていく過程で重要なものは何かを問いかけていると感じ、その思いは、大学における教育にも重要であるのではないかと考えている。

この研究テーマが大学における研究として成り立つのかどうか、当初はとても不安に感じながら研究をスタートさせた。個人的な趣味の要素が強く、明確なゴール設定ができない状況であったからである。ただ、趣味の要素が強いほど、興味がある場合が多い……。

また、この研究では、「日本酒に含まれるバクテリアDNA」のタイトルで2017年にこの紀要に研究を紹介しているが[6]、その後目的を見失っている。すなわち、バイオフィォーマティクスが威力を発揮するのは、コントロー

ルと対象が明確な違いがある場合であることを思い知った。前述したように、日本酒に含まれているバクテリアDNAは極めて多様であり、地域ごとのまとまりなどを属レベルでは見出すことができないことがわかったからである。

不思議なもので、ここまで来ると開き直るしかなくなり、実際に日本酒造りに影響を与えるバクテリアを分離しようということになった。多くのバクテリアが日本酒の品質を劣化させると考えられている状況において、よい影響を与えているものを分離するという目標を立てた。このことで、研究目的がはっきりとして、いわゆる腰を落ち着けて取り組むことができたように思う。

コクリアは、ある酒蔵に特有のバクテリアであると考えられた際、これまでのDNAのデータにコクリアを探したところ、前述したように、その酒蔵の産物にだけそのDNAが検出されていたことがわかった。北陸や富山に特有なバクテリアがあるはずだという先入観にとらわれ、特定の酒蔵だけに検出されたものを抽出していなかったことを反省した。ただ、実際にバクテリアを分離し、それらを同定したことを目の当たりにしない限り、日本酒造りにおいて影響を与えるバクテリアには出会えていなかったことも事実である。余談であるが、コクリアを分離した酒蔵とは異なる酒蔵の初添えにコクリア分離株を添加して長期間インキュベーション後の溶液を口に含んだところ、コクリアを入れた方が入れていないものよりも美味しいと感じた。

本研究の意義は、実験データを整理するだけでは「情報を活かす」研究にはなっておらず、研究者や実験者がポイントを明確にしてデータ解析を進めることの重要性を再認識したことにある。結局は、いつまでたっても私は微生物に教えてもらっている。

謝辞

本研究では、複数の醸造会社大変にお世話になりました。厚くお礼申し上げます。本来であれば会社名を挙げる必要があるかと思いますが、まだ研究が継続していることを考慮し、ここでは記載いたしません。また、応用生物情報学研究室に所属し、研究テーマとして日本酒とバクテリアを選択し、実験研究を行った、寺寄桃香さん、福山明香利さん、宮川沙也加さん、赤池美咲さん、宮川滉都さん、木村友妃子さん、井上藍瑠さん、岩田斗真さん、佐藤智紀さん、金本恵実さん、吉田早希さんに感謝いたします。

本研究は富山県の大学連携加速化プロジェクト支援事業に「日本酒に混入・増殖する微生物の利活用による機能性日本酒造り」のタイトルで2018年度と2019年度に採択され、その支援を受けました。深く感謝いたします。

引用文献

- [1] 上原浩 (2011) 純米酒を極める. 光文社, 東京
- [2] 松本武一郎 (1979) 「御酒之日記」とその解義. 日本醸造協会雑誌, 第74巻, 748-751頁
- [3] 山田翼 (2018) 生酛の歴史と未来. 生物工学, 第96巻, 703-707頁
- [4] Terasaki M, Nishida H (2020) Bacterial DNA diversity among clear and cloudy sakes, and sake-kasu. *Open Bioinformatics Journal* 13, 74-82. DOI: 10.2174/1875036202013010074
- [5] Fujita K, Hagishita T, Kurita S, Kawakura Y, Kobayashi Y, Matsuyama A, Iwahashi H (2006) The cell structural properties of *Kocuria rhizophila* for aliphatic alcohol exposure. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 511-518. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.033
- [6] 寺寄桃香, 高橋裕里香, 西田洋巳 (2017) 日本酒に含まれるバクテリアDNA. 富山県立大学紀要, 第27巻, 44-47頁
- [7] Terasaki M, Fukuyama A, Takahashi Y, Yamada M, Nishida H (2017) Bacterial DNA detected in Japanese rice wines and the fermentation starters. *Current Microbiology* 74, 1432-1437. DOI: 10.1007/s00284-017-1337-4
- [8] 西田洋巳 (2019) 日本酒造りの過程で混入, 増殖するバクテリアの利活用. 北陸経済研究, 7月号, 34-35頁
- [9] Akaike M, Miyagawa H, Kimura Y, Terasaki M, Kusaba Y, Kitagaki H, Nishida H (2020) Chemical and bacterial components in sake and sake production process. *Current Microbiology* 77, 632-637. DOI: 10.1007/s00284-019-01718-4
- [10] Terasaki M, Miyagawa S, Yamada M, Nishida H (2018) Detection of bacterial DNA during the process of sake production using *sokujo-moto*. *Current Microbiology* 75, 874-879. DOI: 10.1007/s00284-018-1460-x

- [11] 西田洋巳 (2020) 生物進化と細胞外DNA 微生物創生への挑戦.丸善プラネット, 東京
- [12] Bokulich NA, Ohta M, Lee M, Mills DA (2014) Indigenous bacteria and fungi drive traditional kimoto sake fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 5522-5529. DOI: 10.1128/AEM.00663-14
- [13] 岩槻邦男・馬渡俊輔 監修, 杉山純多 編集 (2005) 菌類・細菌・ウイルスの多様性と系統, 裳華房, 東京
- [14] Terasaki M, Kimura Y, Yamada M, Nishida H (2021) Genomic information of *Kocuria* isolates from sake brewing process. *AIMS Microbiology* 7, 114-123. DOI: 10.3934/microbiol.2021008
- [15] Zheng Y, Zhang K, Su G, Han Q, Shen Y, Wang M (2015) The evolutionary response of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase of *Acetobacter pasteurianus* CGMCC 3089 to ethanol adaptation. *Food Science and Biotechnology* 24, 133-140. DOI: 10.1007/s10068-015-0019-x
- [16] Luong TT, Kim E-H, Bak JP, Nguyen CT, Choi S, Briles DE, Pyo S, Rhee D-K (2015) Ethanol-induced alcohol dehydrogenase E (AdhE) potentiates pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 83, 108-119. DOI: 10.1128/IAI.02434-14
- [17] Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287, 482-485. DOI: 10.1126/science.287.5452.482

Existence and function of bacteria that have been overlooked in sake brewing

Hiromi Nishida

Department of Biotechnology

KeyWords: bacteria, sake brewing, kuratsuki, *Kocuria*, genome