

菩提酏のメカニズムと微生物の遷移

松澤一幸^{*1)}

Mechanism and Changes microorganisms

of 'BODAIMOTO-Sake'

MATSUZAWA Kazuyuki ^{*1)}

約 600 年前に菩提山正暦寺において造りだされ、大正時代に消滅したといわれる酒母である「菩提酏」の復元に関する研究を通じて、菩提酏製造のメカニズムを解明し、酒母工程における関連する微生物、特に乳酸菌の遷移に関する知見を得た。つまり、生米浸漬中に乳酸菌 *Lactococcus lactis* が混入し、生米中の酵素によりデンプンからグルコース、マルトースを生産し、それを乳酸菌が資化することで pH が低下し有害菌が激減する。快適環境下で酵母が増殖し、アルコールが生産され、アルコール濃度の高まりに伴い乳酸菌の菌種が遷移していくことが明らかとなった。

なお、本報は「生物工学会誌」第 8 号 473 - 477 2011 からの再掲です。

^{*1)}元工業技術センター

菩提酏のメカニズムと微生物の遷移

松澤 一幸

菩提酏は、室町時代中期に、奈良市の郊外にある菩提山正暦寺において創製された酒母で、現在普及している速醸酏や生酏系酒母の原型であると考えられている¹⁻³⁾。この酒母の製造法は、気温の高い時期や温暖な地域において比較的安全に酒造りが可能なものとして広く普及していたとされており、菩提酏、水酏、漬け酏、笹籠酏(いかきもと)、菊酏、被酏(かぶりもと)など、いろいろな名称で呼ばれていた²⁾。しかし、明治になって乳酸を使用する速醸酏の技術が開発され、酒母の製造操作が容易、かつ安全、しかも短期間に製造できるようになり、この速醸酏の技術が全国に普及して、菩提酏は大正時代に姿を消したとされている⁴⁾。そのため菩提酏に関する研究については数が少なく^{4,5)}、これらの研究は、いずれも研究室の環境下で総米 1 kg 程度の規模で実験が行われている。その結論として、自然集積する微生物を利用する菩提酏造りでは、混入する微生物によって酒質が大きく変動することが欠点であり、それが菩提酏の衰滅した原因の一つであると指摘されている⁴⁾。

この幻となっていた菩提酏を用いた清酒(菩提酏清酒)を再現、復活させるため、1996年に奈良県内の酒造会社有志・正暦寺・奈良県工業技術センターをメンバーとして「奈良県菩提酏による清酒製造研究会」が立ち上げられた。また、関係機関・関係者の協力を受けながら活動を続け、1998年に

菩提酏清酒を再現、復活することができて、現在商品化している。

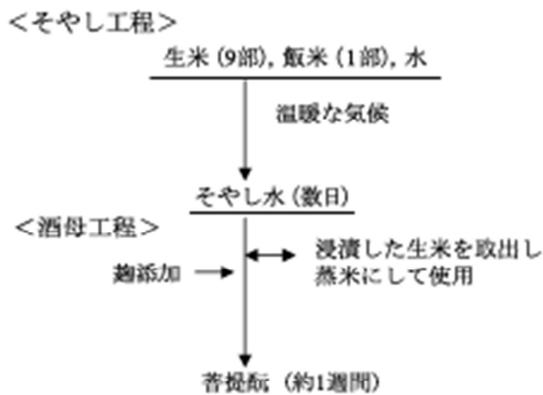


図1. 菩提酏の製造法

菩提酏の製造方法

「御酒之日記」に記述されている菩提酏の製造法を、図1に示す。

この酒母製造には、現在の清酒造りには見られない次のような特徴が見られる。清酒製造は通常冬場に行われているが、菩提酏は温暖な環境で製造される。清酒の酒母の原料米はすべて蒸してから使用されているが、菩提酏では生米を使用し、そこに少量の飯米を加えて乳酸発酵を行う。この乳酸発酵酸性液を「そやし水」と呼び、この水を仕込み水として利用している。現在の清酒製造法には見られないこれらの特徴的な製造方法を科学的に究明したことが菩提酏の製造メカニズムの解明につながった。

菩提酏における微生物の遷移

幻と考えられていた菩提酏が、奈良県内の酒造場で神社庁の委託を受けて昭和初期から連続と、毎年10月中旬の比較的温暖な時期に、総米1トンの規模で御神酒用濁酒の酒母として育成され利用されていることを知り、1999年10月実態調査を行った⁶⁾。図2にそやし水工程における微生物の経時変化を示す。生米を水に浸漬する温度は約20°Cで、一般細菌数は24時間後に 10^7 cfu/mlに増殖した。乳酸菌は32時間後に 10^7 cfu/mlになり、その後も増殖を続け90時間後には 10^8 cfu/ml以上になった。そして、そやし水のpHが4まで低下すると一般細菌数は激減した。

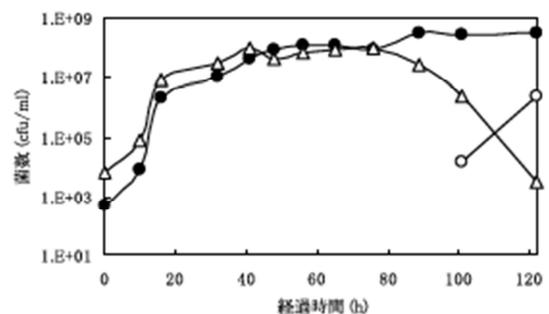


図2. そやし水における微生物の経時変化。●, 乳酸菌; △, 酵母; □, 一般細菌。

一方、発酵性の強い酵母はそやし水の初期には観察されず、100時間目以降に出現した。

酒母工程においては、酵母は 10^7 cfu/ml から4日目に 10^8 cfu/ml に増殖し、酸度7.3、アルコールが6.6%蓄積されると、乳酸菌は 10^1 に減少した。一方、一般細菌数は2日目以降 10^3 cfu/ml以下であった。

醪工程においては、酵母は 10^8 cfu/mlで推移した。品温が高かったため3日目でアルコールが14%まで増加すると、乳酸菌は 10^6 cfu/mlから 10^5 cfu/mlに減少した後6日間菌数変化は認められなかった。しかし、アルコールが16%以上に増加すると急減した。

濁酒の製造過程における乳酸菌叢の変化

乳酸菌はそやし水初期に 10^7 cfu/ml まで増殖し、その主要菌叢は *Lactococcus lactis* であった。そやし水後期には菌数は 10^8 cfu/ml に増加し、乳酸が蓄積し pH4、酸度 3.2 となると菌叢が変化し、*Lc. lactis* と *Leuconostoc citreum* が混在した。酒母工程になると *Lc. lactis* が減少し、一方 *Leu. citreum* が増加して 4×10^8 cfu/ml となり主要菌叢となった。酒母工程後期（酸度 7.3、アルコール 6.6%）には菌数は 5×10^7 cfu/ml に減少して *Lactobacillus pentosus* が主要菌叢となった。醪中の変化については、初期菌数は 10^7 cfu/ml で *Lb. pentosus* と *Lactobacillus paracasei* が主要菌叢として混在した。発酵終了時には 10^4 cfu/ml に低下して *Lb. paracasei* が主要菌叢であった。

これらの乳酸菌叢の遷移原因について検討するため、pH をファクターとして培養した時の経時変化を図3に示す。

GYP 培地を pH 4 に調整し 30°C で培養すると、*Lc. lactis* は7日目に pH 3.7(酸度 1.7)まで低下して菌数は激減した。*Leu. citreum* は pH 3.6(酸度 2.3)まで低下し菌数の減少が認められた。一方、*Lb. pentosus* は pH 3.1(酸度 4.3)まで低下し菌数は漸減、*Lb. paracasei* は pH 3.2(酸度 3.7)まで

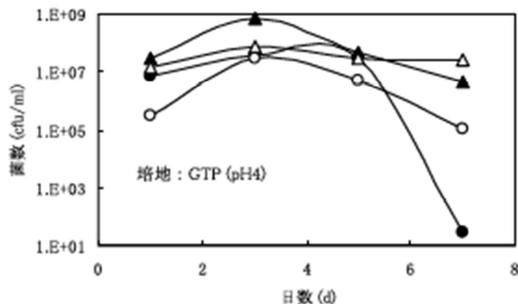


図3. 初発pH4における菌数経時変化。●, *Lc. lactis*; △, *Leu. citreum*; ▲, *Lb. pentosus*; ○, *Lb. paracasei*。

低下しても菌数変化は認められなかった。

次に、アルコールをファクターとして培養した時の経時変化を図4に示す。GYP培地にアルコールを添加し、7%と15%に調整して30°Cで培養した結果、7%では*Lc. lactis*と*Leu. citreum*は3日目には減少が認められ、5日目には死滅した。一方、*Lb. pentosus*では漸減傾向が認められた。*Lb. paracasei*では減少が認められずアルコール耐性が強い株であることを確認した。15%ではすべての菌株が減少したが、菌株によって菌数の減少スピードが異なることを確認した。

以上の結果から、菩提酛製造の各工程における乳酸菌の遷移は、微生物が有する特性と、その増殖環境にあると説明することができる。

歴史のある蔵内で古い木桶(図5)を使い、70年余りも連続と製造されてきた濁酒造りでは、毎年のように酒質が異なる

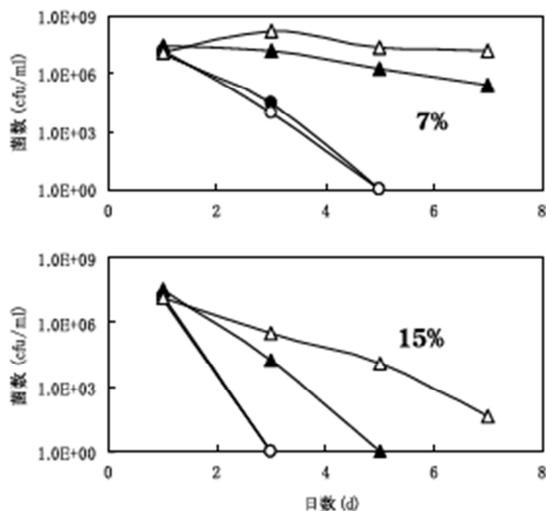


図4. 濁酒乳酸菌のアルコール耐性。●, *Lc. lactis*; △, *Leu. citreum*; ▲, *Lb. pentosus*; ○, *Lb. paracasei*。



図5. 木桶

るという。まさに、目に見えないところで、蔵付き微生物の複雑な遷移、生存競争が行われているのであろう。

菩提酏製造のメカニズム

そやし水製造工程における有用乳酸菌の探索

1996年から菩提酏清酒の再現に取り組み、試行錯誤しながら調査・研究を繰り返した。

その中で、菩提酏製造のメカニズムを究明する上で重要な役割を果たしたのが、正暦寺境内の山水より分離した乳酸菌であった。この乳酸菌は、前述の御神酒用濁酒製造工程の実態調査でも確認されたが、次の実験の中で偶然に発見したものであった。

安定したそやし水（乳酸酸性水）を製造することが菩提酏製造の特徴であり、また必須要件であると考えた。そこで生酏や山麩酏では重要な役割を果たしている *Lactobacillus sakei* (IFO 3541) を、生米浸漬時に 10^6 cfu/ml 添加しそやし水の製造を行った。この実験で乳酸菌数は、仕込み後 12 時間目に 2×10^7 cfu/ml まで増殖した後、24 時間目まで菌数は停滞した。その時の pH は 4.6、酸度は 0.3 であった。30 時間後になると 4×10^8 cfu/ml まで急増し、pH の低下と酸度の増加が観察された (pH 4.0、酸度 0.8)。菌数変化に注目して経時的に乳酸菌の菌叢を観察したところ、仕込み初期は *Lb. sakei* と認められるグラム陽性の桿菌であったが、24 時間後にはグラム陽性の球菌に主要菌叢が変化していた (図 6)。

このグラム陽性球菌の由来を調査した結果、仕込み水として使用した正暦寺の山水に生育していることを認めた。表 1 にこの菌の諸性質を示す。また、これらの諸性質の他、アピ

表1. 正暦寺由来の乳酸菌の特性

形態	:	球菌 (二連卵形)
サイズ	:	0.7~1.0 μm
グラム染色	:	陽性
カタラーゼ	:	陰性
発酵形式	:	ホモ発酵
生成乳酸	:	L 型
<生育特性>		
10°C	:	+
45°C	:	-
6.5%食塩	:	+
pH 9.6	:	+

50CHL および遺伝子塩基配列による同定の結果、正暦寺の山水由来の乳酸菌は、*Lactococcus lactis subsp. lactis* であることを確認した。

乳酸菌の特性

生米浸漬液中で正暦寺由来の乳酸菌 *Lc. lactis subsp. lactis* (以下、正暦寺乳酸菌)、*Lb. sakei*、*Leuconostoc mesenteroides* について乳酸生成量の経時変化を図 7 に示す。正暦寺乳酸菌は、清酒醪中で観察される他の乳酸菌と比べ、速やかに乳酸を生産していた。

そやし水の初期に正暦寺乳酸菌を添加した場合、短時間で正暦寺乳酸菌が増加し速やかに乳酸が生成されるためそやし水の pH を 4 以下に低下させることで細菌数を激減させるメカニズムを確認した (図 8)。また、この正暦寺乳酸菌は、前述した濁酒製造工程の初期で確認された *Lc. lactis* と一致したことから、温暖な環境におけるそやし水の製造に重要な役割を担っているものと判断された。

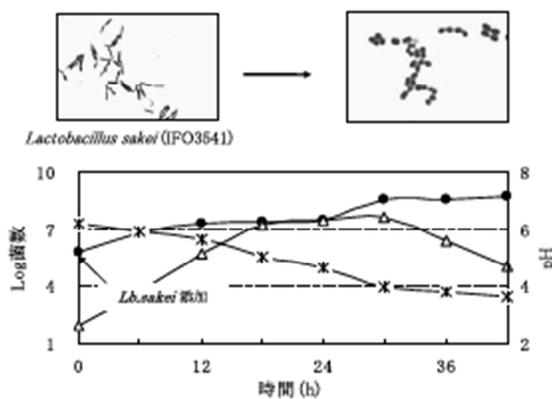


図6. *Lb. sakei* 添加. そやし水の経時変化. ●, 乳酸菌; ○, 細菌; *, pH.

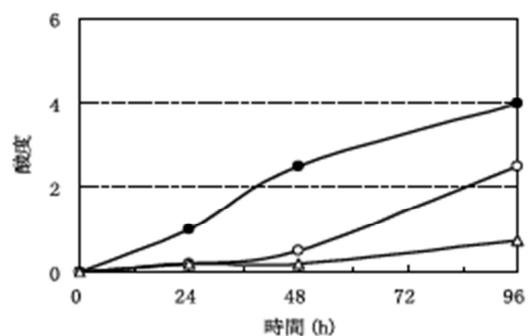


図7. 乳酸菌の生酸性比較. 培養条件: 培地, 殺菌生米 (70% 精米) 浸漬液; 温度, 30°C. ●, 正暦寺乳酸菌; ○, *Leu. mesenteroides* (NRIC1517); *, *Lb. sakei* (IFO15893).

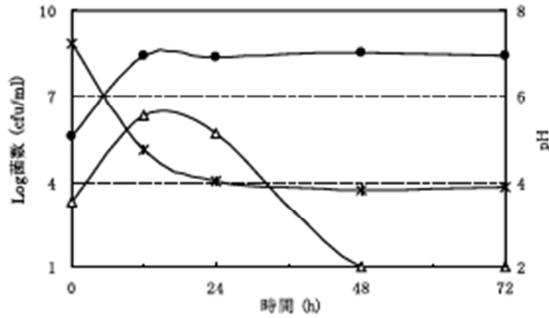


図8. 正暦寺乳酸菌添加そやし水の経時変化. ●, 乳酸菌; ○, 細菌; *, pH. 条件: 乳酸菌, 正暦寺乳酸菌添加; 培地, 生米 (70% 精米) 浸漬液; 温度, 30°C.

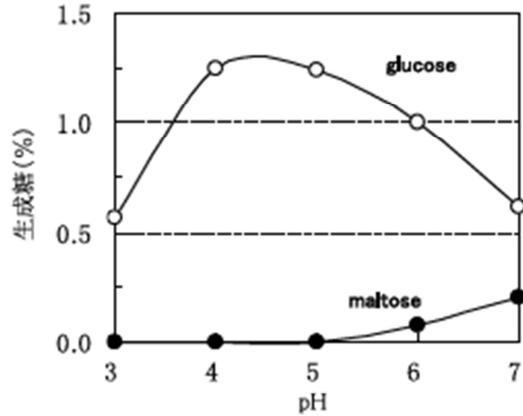


図10. 糖生成に及ぼすpHの影響. 条件: 30°C, 3日; 原料米, ヒノヒカリ (70% 精白).

生米に含有される酵素と特性

菩提酛製造の最大の特徴は、そやし水工程で生米を使用することである。なぜ蒸米ではなく生米なのか？ その疑問解決の糸口は、生米を 30°C で pH 4 の酢酸緩衝液に浸しておくこととグルコースが生成することから、生米中の酵素が関与しているものと考えた。そこで pH 4 の酢酸緩衝液に生米の精米歩合を 90% から 30% まで変化させて、30°C で 3 日間浸漬しグルコース生成量を測定した。その結果、いずれの精米歩合の生米においても 1% 以上のグルコース生成を確認した (図 9)。また、他に 11 品種の白米についても同様の実験を行い、同じ結果を得た。

生米浸漬液の pH を 3 から 7 に変化させ生成する糖組成を分析した結果、生成グルコース量は pH 4 から 5 で最大となり、pH 7 では 2 分の 1 以下に減少した。マルトースは pH 5 では検出されず、pH 7 では少量生成した (図 10)。

千葉らは生米中に α -glucosidase が存在すると報告している⁷⁾。そやし水に生米を使用する理由として、生米中に含有

される α -glucosidase が重要な役割を果たしていると推察し、生米中の α -glucosidase の分離・精製を試みた。酵素の分離は、生米を磨砕しリン酸バッファーで抽出、硫酸分画後、CM-Cellulose, SephadexG-100, DEAE-Cellulose の各カラムクロマトグラフィーを用いて酵素を精製した。なお、 α -glucosidase 活性は 4-ニトロフェニル α -D-グルコピラノシドを使用して測定した。その結果、生米中の α -glucosidase は分子量 88 kDa, 至適 pH 4.3 (図 11), 耐熱性 50°C の特性を有した。

そやし水に飯米を添加する効果

古文書によれば、そやし水の製造に生米に 1 割の飯米 (α 化した米) を添加している。その理由について確認するため、生米だけで調整したそやし水と、生米に蒸米を加えたそやし水で生成するグルコース量を比較した (図 12)。pH 4, 30°C で放置したとき 1 日目の生成量は生米だけの場合の 5 倍量であったことから、飯米はグルコース生産に寄与していることを確認した。

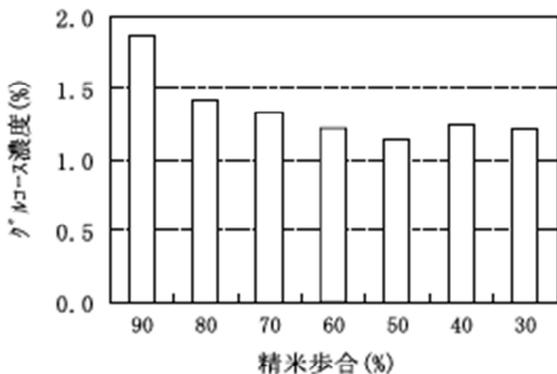


図9. 生米からグルコースの生成. pH 4酢酸緩衝液中, 30°C, 3日反応.

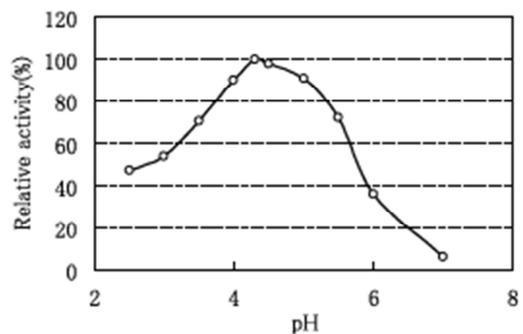


図11. 生米より分離した α -glucosidaseのpH特性

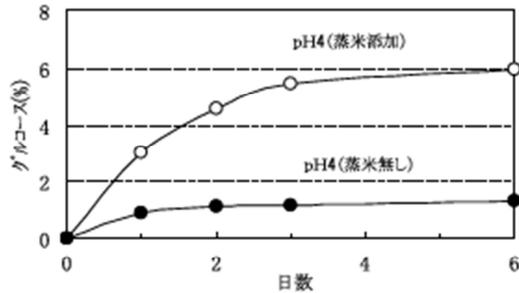


図12．蒸米添加とグルコースの生成．条件：温度，30°C；原料米，ヒノヒカリ（70%精白）；生米：水：蒸米 = 20：30：3．

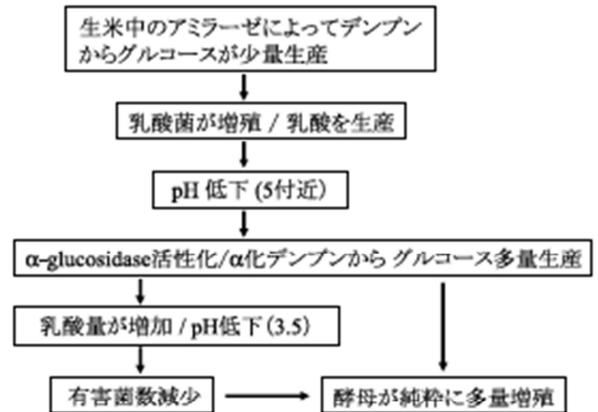


図13．菩提酏のメカニズム

菩提酏製造のメカニズム

以上の結果から，菩提酏製造のメカニズムは，生米が温暖な条件で浸漬液中に乳酸菌 *Lc. lactis* が混入する．

生米には酵素が存在し，デンプンからグルコース，マルトースを製造する．

生成した糖を乳酸菌が利用し，増殖と乳酸の生産を行う．乳酸蓄積により pH が 5.0 以下にすばやく低下する．

生米中の α -glucosidase が活性化される．

α 化されたデンプンからよりたくさんのグルコースが供給される．

pH が 4.0 以下となり一般細菌が激減する．

pH 低下と十分なグルコースの供給により酵母が増殖し，良質の酒母が完成する．

以上のメカニズムを図 13 に示す．

このように，中世に創製された菩提酏は現在普及している速醸酏の原型であり，温暖な環境下，生米浸漬液中の乳酸菌の特性，生米酵素の関与などの絶妙な関係を保ちながら酵母が純粋培養され，いわゆる酒母が完成する．

濁酒の製造過程における乳酸菌叢の変化においても述べたように，関与する乳酸菌は *Lc. lactis* だけでなく，数多くの乳酸菌がそれぞれの特性に応じて遷移している．一般にこれらの乳酸菌と酵母は共生の関係にあると考えられるが，火落菌などの有害乳酸菌が混入した場合には深刻な事態となるであろうし，過去には深刻な事態を引き起こしたこともある．幸いなことに，正暦寺では菩提酏復元以来 13 年間無事に酒母を提供することができている．このことは，菩提酏の製造法が全国に広まった事実を裏づけているものと考えられる．

文 献

- 1) 花岡正庸：実験清酒醸造法講義，丸亀税務監督局(1917).
- 2) 加藤百一：酒は諸白，p. 189，平凡社(1989).
- 3) 梅田紀彦：最新酒造講本，p. 84，日本醸造協会(1989).
- 4) 秋山裕一ら：醸協，75，314 (1980).
- 5) 河合正人：醸協，91，311 (1996).
- 6) 松澤一幸：醸協，97，734 (2002).
- 7) Chiba, S. *et al.*: *Agr. Biol. Chem.*, 35, 2015 (1971).