

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02109

研究課題名（和文）日本酒造りにおける蔵付きバクテリアの機能に関する研究

研究課題名（英文）Studies on function of kuratsuki-bacteria during sake brewing

研究代表者

西田 洋巳（Nishida, Hiromi）

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：60301115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：日本酒造りにおける蔵付きバクテリアの機能を明らかにするため、成政酒造（富山県南砺市）の蔵付きKocuria TGY1120\_3株およびTGY1127\_2株、白木恒助商店（岐阜県岐阜市）の蔵付きBacillus A-10株およびPriestia B-12株を用いて清酒酵母（AK25株、K901株、K1401株、K1801株）との共培養実験および実際の日本酒造りにおける試験醸造を行った。その結果、酸味、旨味、旨味コクが清酒酵母の菌株の違いでも蔵付きバクテリアの菌株の違いでも影響を受けた（ $p < 0.05$ ）。さらに、蔵付きバクテリアによって清酒酵母の遺伝子発現が影響を受けることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長年にわたって酒蔵に棲みつき、その酒蔵での日本酒造りにおいて必然的に混入する微生物が存在している。これまで日本酒造りにおける主役である清酒酵母だけが重視されてきた。例えば、限られた酒蔵における蔵付き酵母は優良株として、日本醸造協会が維持、管理、販売してきた。しかし、バクテリアなどその他の多くの微生物は無視され、研究対象にもされてこなかった。私たちは、蔵付きバクテリアを日本酒造りの過程から分離、同定し、それらの機能を明らかにした。本研究成果は、蔵付きバクテリアが清酒酵母と相互作用し、日本酒の味や香りに影響することを示す。この成果は、これまでになかった日本酒造りにつながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the function of kuratsuki bacteria in sake making, we performed co-culture experiments with sake yeast and test sake making using kuratsuki Kocuria strains TGY1120\_3 and TGY1127\_2 from Narimasa Sake Brewery (Nanto, Toyama), and kuratsuki Bacillus strain A-10 and Priestia strain B-12 from Shiraki Tsunesuke Sake Brewery (Gifu, Gifu). The sake yeast strains used were Saccharomyces cerevisiae AK25, K901, K1401, and K1801. We found that sourness, umami, and umami-richness were significantly ( $p < 0.05$ ) affected by the differences in the strains of sake yeasts and in the strains of kuratsuki bacteria. Furthermore, we found that kuratsuki bacteria influenced the gene expression of sake yeast via microbial interaction.

研究分野：微生物学

キーワード：日本酒造り 清酒酵母 蔵付きバクテリア コクリア 微生物間相互作用 日本酒の味と香り 共培養 試験醸造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本酒造りは完全無菌の環境で行われておらず、その過程において様々な微生物が混入する。多くの微生物の混入は偶然的と考えられるが、酒蔵に棲みついているような微生物の中には必然的に混入するものがある。日本酒造りにおいて必然的に混入する微生物を「蔵付き微生物」と呼んだ。火落ち菌以外の微生物は清酒酵母が造るエタノールによって増殖停止、あるいは死滅する。よって、混入した微生物は増殖を停止させるまで清酒酵母との間に相互作用が生じる可能性がある。

微生物の存在がわかっていない時代から日本酒は造られており、現在のように培養した清酒酵母を添加することなく、大きく自然に依存して日本酒は造られていた。その際にアルコール発酵の主役であった微生物が蔵付き酵母である。現在では、一部の酒蔵(日本酒醸造会社)における蔵付き酵母を優良株として、日本醸造協会が管理、維持、販売している。すなわち、多くの酒蔵では継承されてきた蔵付き酵母の利用を放棄し、販売されている酵母を使用して日本酒を造っている。

生もと造りではバクテリアである乳酸菌が利用されるが、蔵付き乳酸菌である場合が多い。しかし、蔵付き酵母および蔵付き乳酸菌以外の蔵付き微生物が徹底的に研究されたり、日本酒造りの過程から分離、同定されたり、維持、継承されたりはしていない。多くの蔵付き微生物は、その存在も確認されず、酒蔵に放置されてきた。日本酒は同じ材料を使用して造られても、酒蔵によって味や香りが異なることが一般的であり、その要因の1つとして各酒蔵の蔵付き微生物の違いが考えられた。

### 2. 研究の目的

日本酒における味や香りは、その中の有機酸やエステルの組成の違いによっている。日本酒における有機酸やエステルの多くは清酒酵母が生産している。よって、清酒酵母における代謝の変化は日本酒の味や香りの変化となって表れる。本研究では、清酒酵母における代謝の変化を日本酒における味の変化を測定することによってモニターした。

人工培地に加え、麹溶液を使った清酒酵母の単独培養および清酒酵母と蔵付きバクテリア(Nishida, 2023, Biosci Biotechnol Biochem 88, 249-253)の共培養を行い、それぞれの培養溶液の味の違いを測定し、蔵付きバクテリアの添加が味へどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした(西田, 2024, 日本醸造協会誌 119, 64-72)。さらに、単独培養および共培養における清酒酵母の遺伝子発現の異同を網羅的 RNA シークエンス解析によって明らかにすることを目的とした。

実験室における共培養実験に加え、実際の日本酒造りの酒蔵における試験醸造を行い、蔵付きバクテリアを添加した場合の日本酒の味の違いを明らかにすることを目的とした。これら実験結果に基づき、蔵付きバクテリアの機能を利活用して、これまでになかった日本酒造りを提案することが目標である。

### 3. 研究の方法

(1) 清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AK25 株、K901 株、K1401 株、K1801 株、成政酒造(富山県南砺市)の蔵付き *Kocuria* TGY1120\_3 株と TGY1127\_2 株、白木恒助商店(岐阜県岐阜市)の蔵付き *Bacillus* A-10 株と *Priestia* B-12 株を用いて、共培養実験を行った。清酒酵母の単独培養と清酒酵母・蔵付きバクテリアの共培養における糖度と酸度を糖酸度計によって経時的に測定し、味認識装置 TS-5000Z(インテリジェントセンサーテクノロジー)を用いて培養溶液の味(酸味、塩味、苦味、苦味雑味、渋味、渋味刺激、旨味、旨味コク)を測定した。単独培養と共培養における差分から蔵付きバクテリア添加の影響を評価した。

(2) 清酒酵母 K1401 株と蔵付き *Kocuria* TGY1127\_2 株を用いて、酵母単独培養および両者の共培養における酵母の遺伝子発現を網羅的な発現 RNA のシークエンスによって解析し、比較した。

(3) 成政酒造における日本酒造りにおいて、蔵付きバクテリアを添加した試験醸造を行い、できあがった日本酒に対して、味認識装置を用いた味の測定を行った。

(4) プラスミドを用いて蔵付き *Kocuria* の遺伝子操作方法の構築を行った。

(5) 石川県金沢市の F 酒造における山廃酒母の酒母造りの過程およびその後の醪過程におけるバクテリア菌叢解析を行った。

#### 4. 研究成果

( 1 - 1 )分散分析の結果、麹溶液を使った共培養における酵母の菌株の違いおよび蔵付きバクテリアの菌株の違いいずれにおいても影響を受けた味は、酸味、旨味、旨味コクであることを明らかにした ( Yazaki and Nishida, 2023, Arch Microbiol 205, 290; Kobayashi and Nishida, 2024, Appl Microbiol 4, 147-161 )。

( 1 - 2 ) 麹の種類によっても蔵付きバクテリア添加の味への影響が異なることを明らかにした ( Yazaki and Nishida, 2023, FEMS Microbiol Lett 370, fnad020 )。日本酒造りにおいて、麹は各酒蔵において造られており、日本酒の味や香りへの影響があることを再確認した。

( 1 - 3 ) 蔵付きバクテリアへの水素処理の影響は、清酒酵母への同様の水素処理よりも味への影響が強く出たことより、蔵付きバクテリアの細胞の状態が日本酒の味や香りに影響することを強く示唆した ( Saito and Nishida, 2023, Fermentation 9, 516 )。

( 2 ) 日本酒の味や香りへの影響が、清酒酵母と蔵付きバクテリアの相互作用によるものであることが、清酒酵母単独培養と蔵付きバクテリアとの共培養における酵母の遺伝子発現の違いから明らかにした。細胞周期や孢子形成にかかわる遺伝子発現の促進と代謝にかかわる遺伝子発現の抑制の傾向が顕著に見られた。ただ、糖度や酸度の変化に違いが見られず、エタノール発酵への影響は小さいと判断した ( Kobayashi and Nishida, 2024, Fermentation 10, 249 )。

( 3 ) 実際の酒蔵における日本酒造りの過程 ( 初添え ) における蔵付きバクテリアの添加は、その菌株が異なるとできあがった日本酒の味への効果が違っていることを明らかにした。さらに、水素処理の有無によっても日本酒の味に違いが生じることを示した ( 西田, 2023, アグリバイオ 7, 39-41 )。

( 4 ) 蔵付き *Kocuria* の菌株におけるプラスミドによる遺伝子操作方法を確立した。

( 5 ) F 酒造の山廃造りにおけるバクテリア菌叢変化を明らかにし、さらにその過程からバクテリアを分離、同定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yazaki Ayano, Nishida Hiromi	4. 巻 370
2. 論文標題 Effect of kuratsuki Kocuria on sake brewing in different koji conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fnad020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnad020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 西田 洋巳、廣島 達彦、吉田 憲司	4. 巻 100
2. 論文標題 異なる酒蔵の蔵付きバクテリアを添加した日本酒造り	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 390 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.100.7_390	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanamoto Emi, Terashima Keigo, Shiraki Yoshiji, Nishida Hiromi	4. 巻 9
2. 論文標題 Diversity of Bacillus isolates from the sake brewing process at a sake brewery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1760 ~ 1760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9081760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito Misaki, Nishida Hiromi	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular hydrogen treatment of sake yeast and kuratsuki bacteria affects sake taste	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fermentation	6. 最初と最後の頁 516 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/fermentation9060516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 西田洋巳	4. 巻 7
2. 論文標題 水素処理の蔵付き細菌と日本酒造り	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 39 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yazaki Ayano, Nishida Hiromi	4. 巻 205
2. 論文標題 Effect of kuratsuki Kocuria on sake 's taste varies depending on the sake yeast strain used in sake brewing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 290 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-023-03625-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Hiromi	4. 巻 88
2. 論文標題 Kuratsuki bacteria and sake making	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 249 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 西田洋巳	4. 巻 119
2. 論文標題 日本酒の味と香りへの蔵付きバクテリアの影響	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本醸造協会誌	6. 最初と最後の頁 64 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Karin、Nishida Hiromi	4. 巻 4
2. 論文標題 Effect of kuratsuki Bacillus and Priestia on taste of sake	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 147 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/applmicrobiol4010011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Karin、Nishida Hiromi	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcriptome analysis of sake yeast in co-culture with kuratsuki Kocuria	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fermentation	6. 最初と最後の頁 249 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/fermentation10050249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西田洋巳
2. 発表標題 日本酒造りと蔵付きバクテリア
3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田洋巳
2. 発表標題 微生物進化の原動力は何か?
3. 学会等名 キヤノン財団第1回講演会「微生物は縁の下の力持ち～サステナブルな未来をつくる微生物の不思議を考える～」 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田洋巳
2. 発表標題 日本酒造りで見過ごされてきた蔵付きバクテリアの利活用
3. 学会等名 富山県立大学秋季公開講座「未来を拓くバイオテクノロジー」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺崎桃香、木村友妃子、山田雅人、西田洋巳、小柳喬
2. 発表標題 酒蔵環境と日本酒製造過程における蔵付き微生物の探索
3. 学会等名 第16回ゲノム微生物学会大会（オンライン）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小柳 喬  (Koyanagi Takashi)  (20535041)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授   (23303)	
研究 分担者	戸田 弘  (Toda Hiroshi)  (60608321)	富山県立大学・工学部・講師   (23201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------