

古糊生成過程の生物学的考察

— 物性値との関連において —

木川 りか・早川 典子・川野邊 渉・樋口 恒*・岡 泰央*・岡 岩太郎*

1. はじめに

日本画の掛け軸や巻物等の表装には、生麩粉（小麦粉澱粉）を煮て糊とした沈糊（新糊）のほかに、それを原料につくられる古糊が伝統的に用いられている。古糊は、沈糊の新糊と比べて粘稠性が少なく、変質しにくいといわれ、その結果、塗面の反りが少なく仕上がりがしなやかで、またカビによる書面の損傷を受けにくいといわれる^{1,2)}。古糊は、伝統的に古くから用いられ、その製法は各工房の秘伝に属するものであり、江戸時代の限られた記述もきわめて簡素なものであった¹⁾。

我々は、装こうで重要な役割をになっている古糊の修復材料としての評価を一連の研究において行うことを目的とし、物性値や微生物学的な側面からさまざまな性状を調べてきた。物性値や化学組成の面からの詳細は、早川らの論文³⁾に譲り、本報では古糊生成過程における生物学的見地からの調査結果を主に記述し、物性値等との関連において考察を行いたい。

2. 過去の文献にみる古糊生成の生物学的考察

古糊の諸性質と微生物学的調査については、大槻による一連の論文^{1,2,4-7)}がある。そのなかで、大槻は、新糊と古糊のヨウ素澱粉反応の呈色の違いや粘度の差違を調べ、古糊においては微生物の作用により直鎖状澱粉のアミロース（図1）の分解がすすむが、枝わかれ構造をもつデンプンのアミロペクチン（図1）については、枝分れ部分が完全に分解されずに残り（限界デキストリン）、それが残渣として濃縮されているのではないかと、1930年代にすでに推察している¹⁾。また、酸含有量においても、古糊がまさっていることを明らかにし、「この酸性の性質によって、古糊が微生物の増殖を阻害することは疑いない」と言及している¹⁾。

また、新糊と古糊とで、バクテリア（細菌）、糸状菌（カビ）、芽胞菌（酵母）の生菌数を比較し、「古糊は自然物としては異常に微生物が少ない」と述べている¹⁾。また、後に詳述するが、古糊生成過程で糊の表面に形成される黒色物について詳細な観察と記述を行っており^{1, 2, 5)}、古糊が生成する過程の一見雑多な生物現象のなかから、マクロな視点での共通現象を見いだして記述した、ひとつの規範となるものと考ええる。

さらに大槻は、表面の黒色物について、窒素含量が多いこと、雑多な微生物がきわめて多く繁殖していること、澱粉含量の少ないこと、の3点に言及し、「古糊生成過程の表面黒色物は、古糊において糊としての短所を吸い取って凝縮している」旨の感想を述べている¹⁾。

また、大槻は、古糊熟成過程の3年間における経過を詳細に観察しており^{2,5,6)}、その結果はきわめて興味深いものである。それによると、白色の糊表面に、2週間後には褐色斑点（糸状菌体をつくる桿菌）が現れ始め、3週間後には黒色斑点（桿菌）、緑色斑点（カビ）また桃赤色斑点（有色の酵母）や白色斑点（酵母）が現れたとしている⁵⁾。また、このころより、酒精臭が著しく、内部よりガス泡沫が上がってきた、としている。さらに、2カ月後には、カビの集落が増え、表面はほとんどカビに覆われ、3カ月後には、菌蓋が厚くなり、4カ月後には菌蓋の色

が黒色をおびてきた、と記述されている。さらに、6カ月後（大寒のころ仕込んだ沈糊では通常、夏季8月にあたる）に菌蓋は軟化し、ルーペで観察すると多数のダニが発生しており、6カ月以降は、外部的にはなんら大きな変化がみられなかった、と記述している⁵⁾。

以上は、約30個の小型ガラス容器を観察し、大勢としてみられた現象のようであるが、もちろん個体差はあり、表面の菌蓋の色やダニの有無（多少）については、差違があったことが記述されている。ちなみに、菌蓋がほとんどバクテリア由来のものが、29例中2例、菌蓋にダニが発生していなかったものが、29例中2例あったと記述している⁵⁾。

また、表面の微生物の変遷を菌類別にみると、おおまかにみてカビの菌糸の表面での生育のピークがおおよそ2カ月後、芽胞菌（酵母）の生菌数のピークがおおよそ3カ月後、バクテリアの生菌数のピークがおおよそ4カ月後、さらにカビによる厚い菌蓋が現れるのが6-7カ月後と記述している。したがって、「最初に頂点を示すは糸状菌（カビ）にして、この時、糊塊表層澱粉は液化或いは糖化せられ、そこに芽胞菌（酵母）が好餌を得て繁殖し、続いてバクテリア（細菌）が6月付近の温暖と前期2種菌類の繁殖による澱粉分解生成物或いは代謝生産物とを発育要因として頂点を示すものと解すべし」と考察している⁶⁾。ただし、大槻によると「糊熟成に関係する菌の種類決定はただ単純なものにあらざるは論なし」とのことである⁶⁾。

このほか、最近では、ダニが古糊の抗菌性に関与しているとする、滝沢による一連の文献⁸⁻¹¹⁾がある。また、善如寺らや藤波らは、大槻の記述した方式とは異なる製造方式の古糊について、古糊生成時に関与する微生物の調査を行っている¹²⁻¹⁴⁾。そのなかでは、古糊生成過程の糊と上に張った水を試料として、カビ、酵母、細菌の生菌数を調査するとともに、糊から分離された微生物のアルファアミラーゼ生産性や、グルコアミラーゼ活性、イソアミラーゼ活性、液化力、糖化力などが調査された。その結果、分離された微生物のなかで酵母が高いイソアミラーゼ活性を示したことから、古糊生成過程における酵母の重要性を言及している¹²⁻¹⁴⁾。また、藤波らは、貯蔵期間の短いものはカビを主体とした菌膜が顕著であり、初期段階でカビが主体的に澱粉の低分子化に関与しているものと推察している¹⁴⁾。

3. 古糊の製造過程

詳細は、早川らの論文³⁾を参照されたい。古糊の製法は、地域や工房によって、若干の違いがあるようである²⁾。

大槻の研究で使用した古糊は「生麩を糊化せしめて陶製壺に入れ、ハترون紙にて覆い紐で縛って蓋をなし縁側土中に大半を埋める。1年ごとに表面の黒色菌蓋を除去し、3年を経過したものの古糊とする。」（錦栄堂方式）⁵⁾によるが、ここでは京都方式の古糊の製法による（岡墨光堂方式）。すなわち、大槻の論文の付記²⁾にあるように、「古糊製造方法はこの後に調査せる所によれば前記と稍異なるものあり。京都地方にては多く生麩を糊化せしめて陶製壺に入れ表

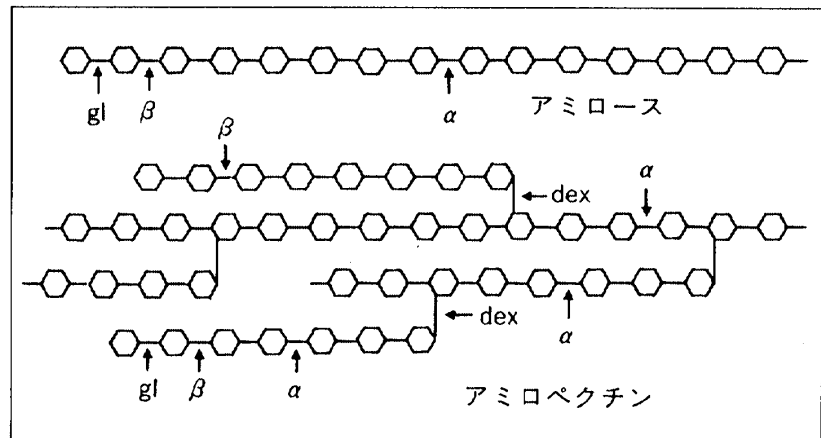


図1 アミロースとアミロペクチン

()はブドウ糖を示す。α, β, gl, dexはそれぞれアルファアミラーゼ、ベータアミラーゼ、グルコアミラーゼ、リミットアキストリナーゼの切断位置を示す。(井上¹⁶⁾より引用)

面数寸の深さに水を張り、蓋をなし床下に貯え置き、満一年を経て大寒時蓋を除き布を浸して水を吸い取る、再び水を張り蓋をして放置す。毎年之を繰り返す。或は数年間手を加えずに放置し、水は蒸発して糊表面は乾燥し褐色となれるを除く。」方式を基本とする。

4. 古糊の製造過程の目視観察

前述のように岡墨光堂の古糊製造方式には、2種類がある（早川ら³⁾参照）。ひとつは、「生麩を糊化して陶製壺に入れ、表面数寸の深さに水を張り、木製の蓋を和紙で目張りし、床下に貯え置き、数年間（およそ10年間）手を加えずに放置し、水は蒸発して褐色ある



写真1-a 「水替えなし」方式の古糊表層物 (昭和63年仕込み, 11年目)

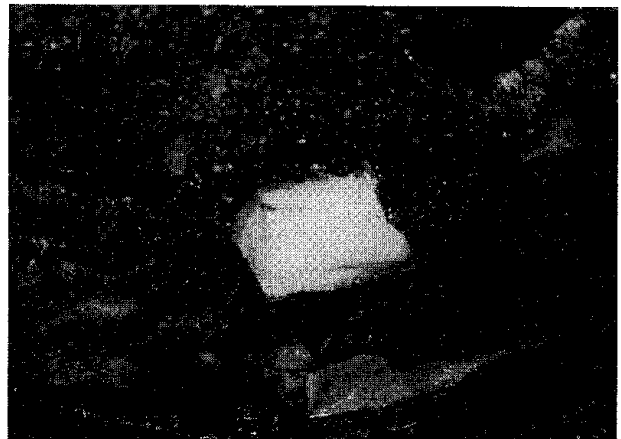


写真1-a 内部の古糊 (昭和63年仕込み, 11年目)

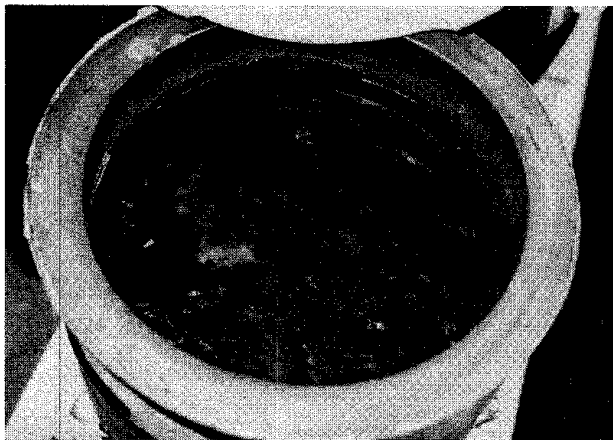


写真1-b 「水替えなし」方式の古糊表層物 (昭和62年仕込み, 13年目)



写真1-b 内部の古糊 (昭和62年仕込み, 13年目)



写真1-c 「水替えなし」方式の古糊表層物 (昭和59年仕込み, 16年目)



写真1-c 内部の古糊 (昭和59年仕込み, 16年目)

いは黒色となった糊表面を除去して下部の糊を使用する」もの（「水替えなし」方式）。この方式でつくった古糊は、技術者によれば「粘りの少ない」古糊ができるとのことであるが、「着色が濃い」のが欠点であるという。

もうひとつは、「生麩を糊化して陶製壺に入れ、表面数寸の深さに水を張り、木製の蓋を和紙で目張りし、床下に貯え置き、満一年を経て大寒時に蓋を除き水をかい出し、同時に形成された微生物由来と思われる膜を除く。再び水を張り蓋をして、毎年これを繰り返す。これを数年間経過したものを使用する」もの（「水替えあり」方式）。この方式でつくった古糊は、技術者によると「粘りがつよく、すえた臭いが強い」が、「着色がやすい」のが逆に長所という。

したがって、それぞれの特長を活かして、適所に用いているのが現状とのことである。以下にそれぞれについての観察所見を述べる。

4-1 「水替えなし」方式の糊の表層物の観察所見

およそ10年間を経過して、開封した古糊の表面は、色見はそれぞれ若干異なるものの、古糊として使用に耐えるものは、おおよそすべて黒色の菌蓋で覆われ（写真1）、その下にオレンジ色の層、また場合によっては、その下にクリーム色の層構造が見られる。また、内部の古糊はほぼ均一で、全体にクリーム色かうすいオレンジ色に着色されているのが一般的である（写真1）。また、膜構造は、層になっており、一部では硬い顆粒状のものがみられる層が存在することもある。

この観察結果と照合するために、再び大槻の論文¹⁾を引用すると、「3年の熟成期を経て古糊塊表面は黒色物をもって覆はる。篋子をもって掻き取り廃棄す。古糊生成の一原因がこのものの生成にありと思惟し、該物質の諸性質を検す。表面空気に触るる所は黒色を呈すれども新鮮なる断面は赤色なり。内部に至るに従ひ糊分多く灰色となり、白色に終る。赤色乃至灰赤色の部分は砂粒の感ある固形物の存在肉眼的に著明なり。」¹⁾

我々の観察した古糊との着色の違いは、熟成期間の差違と、大槻の方式では、菌蓋を毎年除去しているのに対し、岡墨光堂では菌蓋を除去していないことからきていると思われる。しかし、そのような若干の違いはあるものの、およそこの方式でつくられる古糊で、装こうに問題なく使用できるものは、工房の技術者の長年の観察と我々の数年にわたる観察の結果とあわせ見ても、ほぼ大槻によって記述されたような表面および内部の状況と一致する。非常に興味深いことである。

さらに、我々の観察でも黒色の菌蓋は、表面全体または一部が濡れたように見えることが多かったが、大槻の記述によれば、「このような場合には、ほとんどでダニが発生しており、これはダニがカビの菌蓋を消化したためである」としている²⁾。我々も、その部分を顕微鏡で拡大して観察した結果、後に述べるようにいくつかの試料でダニの存在を確認した。

4-2 「水替えあり」方式の糊の表層物の観察所見

一般に、水替えなし方式よりも、開封したときに、すえた臭いが強い。技術者の経



写真2 「水替えあり」方式の糊の表層物浮遊物

(平成6年仕込み、水替えをして6年目の糊の表層浮遊物)

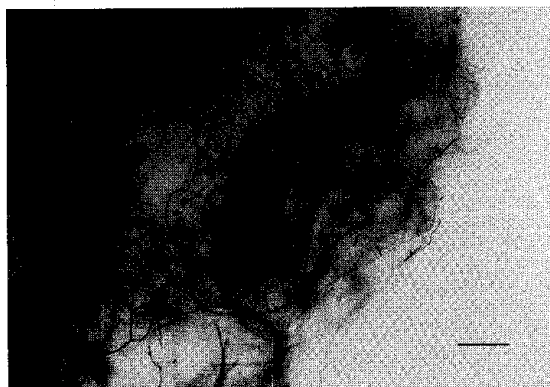


写真3-a 「水替えなし」方式の古糊表層物の顕微鏡観察像の例
(スケール:100 μ m)
最も表層部の黒色菌糸の光学顕微鏡観察像($\times 100$)
(昭和61年仕込み, 14年目の古糊のもの)

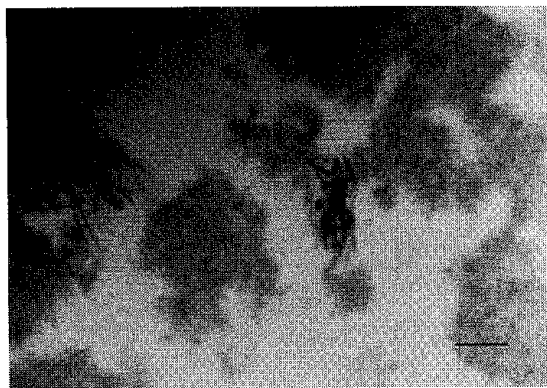


写真3-b 「水替えなし」方式の古糊表層物の顕微鏡観察像の例
(スケール:100 μ m)
黒色表層物中のダニの死骸($\times 100$)
(平成元年仕込み, 13年目の古糊のもの)

験によれば, 一般的に1年目には多くの微生物が表面に浮いているが, 2年目以降はあまり多くなく, 一年の期間をへて開封すると, 毎年似たかんじのぬるぬるとしたクリーム色ないしは褐色や黒色のうすい膜が形成されていることが多いとのことである。その一例を写真2に示す。この方式の場合, 糊の表面には常に水が張ってあるため, 好気性の微生物であるカビの分厚い菌蓋に覆われてしまうことはない。

5. 古糊の製造過程の表層物の顕微鏡観察

5-1 「水替えなし」方式の表層物の顕微鏡観察所見

表面は分厚い微生物の菌蓋に覆われ, その菌蓋はさきに述べたような層構造をなしている。全体としてカビ, 酵母状のもの, 細菌, ダニなどきわめて雑多な微生物によって構成されているように見える。もっとも表層部の菌糸は, ほとんど黒色化し, すでに大部分が死滅しているものと思われる(写真3-a)。また, ほとんどの古糊の表層物でダニ(写真3-b)が確認されている。ここでの観察所見は, ほぼ大槻による記述と一致する¹⁾。

5-2 「水替えあり」方式の菌膜の顕微鏡観察所見

分厚い菌蓋こそないものの, 膜構造のものを観察すると, やはりさまざまな大きさの微生物らしき構造が見られ, 酵母や細菌ではないかと思われる。また, 褐色, 黒色の部分は, カビの菌糸, なかでも黒色酵母のものと思われる着色した菌糸が見られることが多かった。

この製造方式では, 糊表面に水が張ってあるため分厚い菌蓋が形成されないためか, 我々が観察した限りでは, ダニは発見されなかった。ダニが古糊の製造過程に重要な役割を担っているという説も提唱されているが⁸⁻¹¹⁾, 「水替えあり」方式で製造されて「古糊」と呼ばれているものに限っていえば, この方式で製造される限りダニの関与はほとんどないものと思われる。

6. 古糊の製造過程でみいだされる微生物の定性的調査

今回の調査では, あくまで「主要にみいだされる微生物」を分離するにとどめ, 各々の定量的な評価は行っていない。が, 製造過程のそれぞれの時点でみいだされる主要な微生物層を, 同じ時点での糊の物性値や化学組成との関わりにおいてみることにより, それぞれの時点でそれらの微生物が糊の製造に関与する過程を考察していきたい。

6-1 予備的調査の結果とその考察

古糊が製造される過程で、特徴的にみられる現象は、微生物の増殖、糊の軟化、糊のpHの低下（酸性度の上昇）である。予備的調査によると、糊の軟化は触った感触で、少なくとも糊の上層については仕込み後一年でかなり進むこと、また糊のpHも、炊き立てのときのpH値がほぼ中性（pH6.8程度）であるのに対し、仕込み後一年でほとんどの場合、pH3程度にまで低下することがわかっている（早川ら³⁾参照）。また、仕込み後一年間でpHが3程度に低下する現象は、善如寺らによっても、報告されている^{12,13)}。

そこで、まずおおまかに糊と共存する主要な微生物を、仕込み後1年、仕込み後6年、仕込み後10年以上の糊について調査した（表1）。

その結果、「水替えなし」方式、「水替えあり」方式を問わず、ほとんどのすべての試料で共通に見いだされた微生物は酵母であった（写真4に分離の一例を示す）。一方、細菌は、調査した時点では、仕込み後1年しか経過していない試料においても、主要な微生物としては、検出されることはなかった。一部で、例外的に腸内細菌の類が検出された試料もあったが（データは示していない）、ほとんどのpHが3程度の糊試料では、すでに細菌は主要な微生物層ではない。

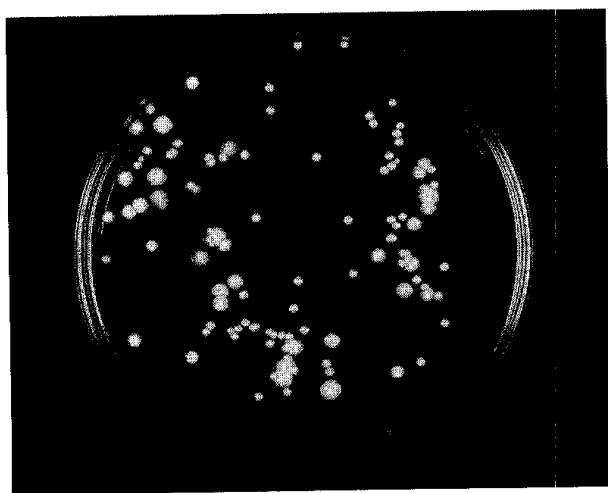


写真4 1年後の糊の上澄みから主に分離された微生物のコロニーの例
細菌のコロニーは現れず、ここでは主に3種類の酵母のコロニーがみられる(MRS寒天培地)

表1 古糊および古糊生成過程で検出された主要な微生物(予備的調査)

| 試料 | 古糊製造方式 | 主に検出された微生物 | ダニの有無 | pH (pH試験紙*による) |
|-----------------------------|--------|-----------------------------------|-------|----------------|
| 平成11年仕込み(1年目)の糊の上澄み液 | 水替えあり | 細菌: 検出されず 酵母: 3種類 カビ: 検出されず | - | 約3付近 |
| 平成6年仕込み(6年目)の糊の上澄み液、および黒色被膜 | 水替えあり | 細菌: 検出されず 酵母: 6種類 カビ: 検出されず | - | |
| 平成元年仕込み(11年目)完成古糊表面黒色菌蓋 | 水替えなし | 細菌: 検出されず 酵母: 2種類 カビ: 3種類 | + | 約4付近 |
| 昭和62年仕込み(13年目)完成古糊表面黒色菌蓋 | 水替えなし | 細菌: 検出されず 酵母: 3種類 カビ: 1種類 | + | 約4付近 |

(平成12年1月31日採取試料)

*pH試験紙は、Macherey-Nagel社製、pH0.5-5.5用(Nr.902 05)を使用した。
微生物の分離法:各試料を無菌的に分取し、滅菌蒸留水に添加し、希釈系列を 10^1 から 10^6 倍の範囲で作成する。各希釈物0.1mlを普通寒天培地、PD寒天培地、YM寒天培地、MRS寒天培地に塗抹し、30℃で培養し、分離されたコロニーの微生物種を顕察した。なお、1年目の糊の上澄み液から分離された微生物の例を写真4に示す。

通常、細菌の大多数の種類は、pH3程度の酸性環境では、生育可能域の限界にさらされていることになる。このpH値で生存できるのは、乳酸菌や酢酸菌などの限られた種類の細菌にすぎない。従って、糊の仕込み後、糊の分解と、発酵により、一年以内にカビ、細菌、酵母などによる微生物の消長が起こるが、やがて糊のpHが3程度に低下すると、酸性環境では生育できない多くの微生物が死に絶え、耐酸性の酵母やカビが糊の中で生存する主要な微生物となる、というおおまかな筋書

きが予想された。

さらに、この筋書きは、大槻の観察結果「古糊製造過程の6カ月目までは顕著な微生物の消長がみられ、それ以降は大きな変化は目ではみられなかった」⁵⁾ や、善如寺らや藤波らの考察^{13,14)}、および岡墨光堂技術者による観察「1年目の変化は大きく、それ以降は微生物の浮遊物の量は落ちつき、以後何年かは似たような状態が続く」などの所見とも矛盾しない。

従って、以降は、仕込み後1年未満(6カ月)の糊で細菌を含めた微生物を調査し、pHが3程度に低下した仕込み後1年以降の糊については酵母とカビを中心に調査をすすめた。

6-2 古糊製造過程(6カ月後, 1年後, および10年以上を経過した糊)の主要な微生物と糊の物性値

仕込み後6カ月後, 1年後, および10年以上を経過した糊(そのうち, 3つはすでに古糊として使用されているもの)について, 主に検出された微生物と同じ試料について調べた物性値(早川ら³⁾ 参照)を, 一覧表にした(表2)。6カ月後, 1年後の糊は, 同一の糊を経時的に調査したものである。

6-2-1 仕込み後6カ月後の糊

仕込み後6カ月後の試料で興味深いことは, そのひとつ(表2(2))において, 乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*) (写真5) 2種類が主要な細菌として検出されたことである。乳酸菌は, 低いpH域で生育できる数少ない細菌種のひとつである。ただし, この増殖がすすむと乳酸濃度の上昇に伴いこのような乳酸菌も徐々に死滅していくため, ここでは古糊製造過程の初期でみられる微生物消長の一断面で現れる細菌を検出した可能性がある。これらが6カ月目に検出されたということは, 古糊製造の初期において, これらの類の細菌が糊のなかでの発酵過程, ひいてはpHの低下に関与していたことを示唆する重要なデータである。

しかも, GPC (gel permeation chromatography: ゲル浸透クロマトグラフィー) により, このときの糊の分子量分布をみると, 仕込み後6カ月後の試料(表2(2), (3))において, すでに糊の高分子成分の重量平均分子量は, 新しい糊のその50分の1以下に低下しており, このとき微生物による糊の分解(低分子化)が相当に進行していることがわかる(早川ら³⁾ 参照)。さらに, 低分子成分をみると, 新しい糊ではみられなかった, グルコース(ブドウ糖)と思われる成分が検出されており, この時点で, 糊の分解, グルコースの遊離(糊の糖化)がかなり進んでいる状況であることがわかる(グルコースと考えられる成分についてのクロマトグラムの詳細は, 早川ら³⁾ 参照)。

また, 興味深いことには, 有機酸分析の際の液体クロマトグラフィーの保持時間から推定される糊のなかの有機酸をみると, このとき, すでに乳酸や酢酸と考えられる有機酸が主に検出されている。これらは, 新しい糊でわずかに検出された有機酸(グリコール酸, ピルビン酸と推定)などとは, 全く性質を異にするものである(詳細は, 早川ら³⁾ 参照)。

従って, 表2の試料(2), (3)で検出された主要な微生物と, 同じ試料の諸性質を見比べると, 仕込み後6カ月後に, すでに微生物によるデンプンの分解と, それに伴うグルコースの生成, さらにそのグルコースを使つての発酵過程とそれに伴う微生物の消長, 乳酸, 酢酸などの有機酸の放出とpHの低下, などの一連の現象が起きているものと解釈できる。今回見出された乳酸, 酢酸については, 見城らによる古糊の分析¹⁵⁾ においても検出されていることから, 古糊に広範に見出される有機酸である可能性がある。

なお, 仕込み後6カ月後の試料(表2(2))で分離された酵母(*Rhodotorula* sp.) (写真6)は,

表2 古糊および古糊製造過程で糊から検出された主要な微生物と糊の物性値

| 試料 | 古糊製造方式 | 主に検出された微生物 | pH* | GPCによる主要ピークの重量平均分子量* | LCの保持時間より推定される主要な有機酸* |
|--|--------------|---|-----|---|-------------------------------|
| (1) たきたての糊 (平成12年) | - | - | 6.8 | 高分子成分 154×10 ⁴ 低分子成分 68 | グリコール酸 ビルビン酸 |
| (2) 平成12年仕込み No.2 (6カ月目)の糊上部および上澄み液 | 水替えなし 注1) | 細菌: 2種類 (いずれも乳酸桿菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>) 酵母: 1種類 (<i>Rhodotorula</i> sp.) カビ: 1種類 (<i>Paecilomyces</i> sp.) | 2.8 | 高分子成分 2.7×10 ⁴ 低分子成分 151 | 乳酸 酢酸 グリオキサール酸 |
| (3) 平成12年仕込み No.3 (6カ月目)の糊上部および上澄み液 | 水替えなし 注1) | 細菌: 検出されず 酵母: 1種類(未同定) カビ: 1種類 (<i>Penicillium</i> sp.) | 2.5 | 高分子成分 2.0×10 ⁴ 低分子成分 218 | 乳酸 グリオキサール酸 |
| (4) たきたての糊 (平成13年) | - | - | 6.8 | 高分子成分 46.0×10 ⁴ 低分子成分 122 | グリコール酸 ビルビン酸 |
| (5) 平成12年仕込み No.2 (1年目)の糊上部および上澄み液 | 水替えなし 注1) | 細菌: (未調査) 酵母: 1種類 (<i>Candida</i> sp.) カビ: 1種類 (<i>Penicillium</i> sp.) | 2.9 | 高分子成分 3.2×10 ⁴ 低分子成分 179 | 乳酸 酢酸 グリオキサール酸 |
| (6) 平成12年仕込み No.3 (1年目)の糊上部および上澄み液 | 水替えなし 注1) | 細菌: (未調査) 酵母: 1種類(未同定) カビ: 1種類 (<i>Penicillium</i> sp.) | 2.5 | 高分子成分 2.3×10 ⁴ 低分子成分 199 | 乳酸 酢酸 |
| (7) 平成2年仕込み(11年目)の糊上部および上澄み液 | 水替えあり | 細菌: (未調査) 酵母: 2種類(未同定) カビ: 1種類 (<i>Paecilomyces</i> sp.) | 4.8 | 高分子成分 2.3×10 ⁴ 低分子成分 75 | 乳酸 グリオキサール酸 マレイン酸 |
| (8) 平成1年仕込み(12年目)の古糊 | 水替えあり | 細菌: (未調査) 酵母: 1種類 (<i>Candida</i> sp.) カビ: 検出されず注2) | 3.2 | 高分子成分 3.2×10 ⁴ 低分子成分 70 | 乳酸 酢酸 マレイン酸 |
| (9) 平成1年仕込み(12年目)の古糊 | 水替えなし | 細菌: (未調査) 酵母: 2種類 (主要1種類は <i>Candida</i> sp.) カビ: 検出されず注2) | 2.7 | 高分子成分 1.5×10 ⁴ 低分子成分 77 | 乳酸 酢酸 グリオキサール酸 マレイン酸 |
| (10) 昭和61年仕込み(12年目)の古糊 | 水替えなし | 細菌: (未調査) 酵母: 3種類 (主要2種類は <i>Candida</i> sp.) カビ: 検出されず注2) | 3.4 | 高分子成分 1.7×10 ⁴ 低分子成分 73 | 乳酸 酢酸 グリオキサール酸 マレイン酸 |

(6カ月後の試料のみ平成12年8月2日採取, 他は, 平成13年2月2日採取) *早川ら³⁾ 参照

注1) ただし, この段階ではいずれも糊の上部に張った水は残っている状態であった。

注2) 使用している古糊は製造容器の内部の部分なので, 表層部の試料よりは格段にカビの胞子が少ない状態にあると思われる。ただし, まったくのゼロなのではなく, のちに糊原体を培地に再接種して調べた結果, 平成1年仕込みの古糊2種類からは, *Paecilomyces* sp.が, 昭和61年仕込みの古糊1種類からは*Penicillium* sp.が検出された。

微生物の分離および同定法: 各試料を寒天培地(TSA, MRSA, PDA, DRBCA)に直接接種して培養したのち, 培養平板上のコロニーを観察した。優勢に生育した一部の微生物について, 酵母は形態観察および性状試験を行い, 文献^{18,19)}を参考に同定し, 細菌はAPI 50 CHおよびAPI 50 CHL(ビオメリュー社製)を用いて同定した。なお, 同定した微生物の形態, 性状は, 写真5, 6および表3~5に示した。

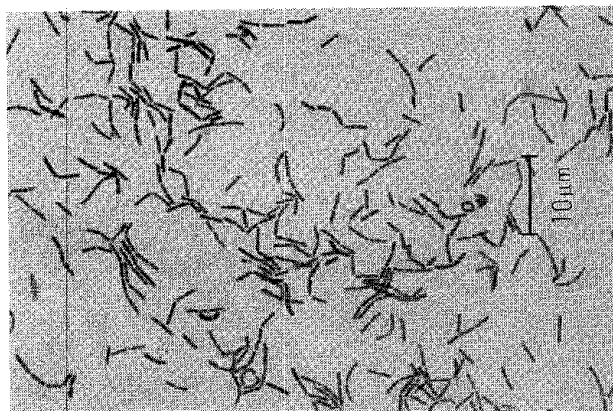


写真5 6カ月後の糊から分離された細菌 (*Lactobacillus paracasei*) の形態の一例

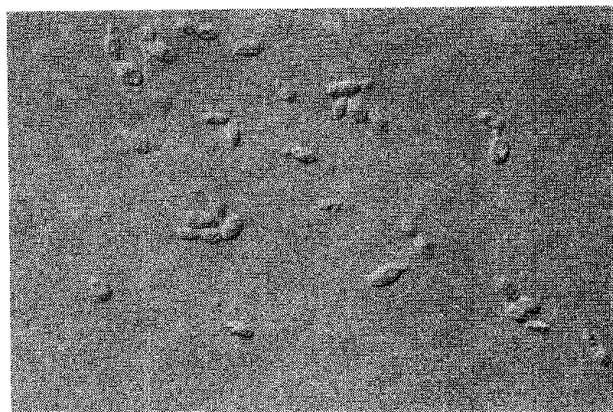


写真6 6カ月後の糊から分離された酵母 (*Rhodotorula* sp.) の栄養細胞の形態の一例 (微分干渉, $\times 940$)

集落が淡いオレンジ色になるものであり、大槻が6カ月以内の初期過程に主要に現れたとする桃赤色の酵母の集落³⁾との類似点があることは興味深い。

ただし、われわれが今回調べた糊は、上澄み液または、表層に近い部分の試料(最大でも10 cm程度の深さのもの)であり、工房で一般的に用いる陶製容器の内部の糊では、より酸素に触れる機会がないため、状況はやや異なる可能性がある。また、糊の物性も、容器の上部と深部では差がある可能性がある。このことは、大槻によっても、触れられている¹⁾。大槻は、糊上部と糊下部について、ヨウ素デンプン反応を調べた所見をもとに、糊の分解は上部から徐々に進行し、下部も一年を経過した頃に完全ではないにしてもほぼ分解が進む、と記述している¹⁾。

6-2-2 仕込み後1年後の糊

次に、同一の糊の試料を仕込み後1年後に調査した。物性値上での性質は、6カ月後と比べてあまり大きな変化はない(早川ら³⁾参照)。しかし、主に検出された微生物をみると、興味深いことには、6カ月の時点とは別の種の酵母(*Candida* sp., 白色コロニーを形成)が主要な酵母として検出されている(表2(5))。これは、のちに表3でも述べるように、今回の古糊製造過程の微生物の調査で広く検出されたグループのものであり、pHが3程度の酸性環境の糊に広く見いだされた。このことから、糊のpH低下による酸性環境が長く持続することによって、微生物層がこれらの環境により適応した耐酸性の酵母やカビへと移行していく過程がうかがえる。

6-2-3 仕込み後10年以上を経過した糊

表2の(7)~(10)にあたるが、(8)~(10)はすでに最終的な古糊として使用されているものである。

全般にいえることは、まずGPCにより糊の分子量分布をみると、6カ月後、1年後には、はっきりとみいだされたグルコースと考えられる成分が、10年以上を経過した糊では消失していることである(詳細は、早川ら³⁾参照)。すなわち、これらの糊では微生物による発酵、すなわち遊離の糖を使う過程が十分にすすみ「熟成」が終わった、と解釈することが可能であろう。

したがって、これらの「古糊」の場合、「低いpH値になっていると同時に、微生物の「餌」となるグルコースがすでに消費しつくされている」という状況にあると考えられ、一般に微生物が生育しにくいという特長をもつことになる。すなわち、これは従来から指摘されてきた古糊の特長を説明する事象といえる。

表3 6カ月後の糊から分離された細菌2株の性状

| 試験項目 | 試験結果 | |
|--------|------------|------------|
| | a (表2 (2)) | b (表2 (2)) |
| 形態 | 桿菌 | 桿菌 |
| グラム染色性 | + | + |
| 孢子 | - | - |
| 運動性 | - | - |
| カタラーゼ | - | - |

そして、この「熟成」過程を経た古糊から検出されるのは、耐酸性の酵母がほとんどである。今回、検出された主要な酵母の株のうちいくつかを同定した結果、いずれも *Candida* sp. の酵母であった (表2, 表6, 表7)。この熟成過程で関与すると考えられる微生物については、次項でくわしく考察したい。

また、GPCによる古糊の高分子成分の重

表4 6カ月後の糊から分離された細菌2株のAPI 50 CHおよびAPI 50 CHLによる同定結果

| 試験項目 | 分離細菌 | | 試験項目 | 分離細菌 | |
|-----------------------|--|---|-------------------|------|---|
| | a | b | | a | b |
| 酸の生成 | | | 加水分解 | | |
| コントロール | - | - | エスクリン | + | + |
| グリセロール | - | - | 酸の生成 | | |
| エリスリトール | - | - | サリシン | + | + |
| D-アラビノース | - | - | セロビオース | ? | ? |
| L-アラビノース | - | - | マルトース | + | + |
| リボース | + | + | ラクトース | - | - |
| D-キシロース | - | - | メリビオース | - | - |
| L-キシロース | - | - | シュークロース | + | + |
| アドニトール | ? | ? | トレハロース | + | + |
| β -メチル-キシロシド | - | - | イヌリン | + | + |
| ガラクトース | + | + | メレチトース | + | + |
| D-グルコース | + | + | D-ラフィノース | ? | - |
| D-フルクトース | + | + | アミドン | - | - |
| D-マンノース | + | + | グリコーゲン | - | - |
| L-ソルボース | - | - | キシリトール | - | - |
| ラムノース | - | - | β -ゲンチオピオース | - | - |
| ズルシトール | ? | ? | D-ツラノース | + | + |
| イノシトール | - | - | D-リキソース | - | - |
| マンニトール | + | + | D-タガトース | + | + |
| ソルビトール | + | ? | D-フコース | - | - |
| α -メチル-D-マンノシド | - | - | L-フコース | - | - |
| α -メチル-D-グルコシド | + | + | D-アラビトール | - | - |
| N-アセチル グルコサミン | + | + | L-アラビトール | - | - |
| アミグダリン | ? | ? | グルコン酸塩 | ? | ? |
| アルブチン | + | + | 2-ケト-グルコン酸塩 | - | - |
| | | | 5-ケト-グルコン酸塩 | - | - |
| 同定結果 | | | | | |
| 分離細菌a (表2 (2)) | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2 | | | | |
| 分離細菌b (表2 (2)) | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2 | | | | |

* ? : 判定保留

量平均分子量は、新しい糊の重量平均分子量の約50分の1、すなわち約2万に落ちつくことが明らかになっている。(詳細は早川³⁾ら参照)。微生物によるデンプンの分解を考えた場合、このような物質にあたる分子種の候補としては、限界デキストリン様物質である可能性も考えられる。限界デキストリンとは、枝分れ構造をもつデンプンの分子、アミロペクチン (図1) をアミラーゼによって切断、糖化したさい、連鎖の枝分れ状の分岐点付近は、これらの酵素が分解できないために最終的に残る分子の集団をいう。ただ、その分子種については、今回の一連

表5 6カ月後の糊から分離された酵母 (*Rhodotorula* sp.) の性状

| 項目 | 結果 |
|---------------|------------------------------|
| 栄養細胞の形態 | 卵形～楕円形 |
| 増殖形式 | 多極出芽 |
| 液体培養 | 沈殿はみとめるが皮膜の形成は認めない(25℃, 3日間) |
| 偽菌糸 | 形成せず(25℃, 3日間) |
| 真菌糸 | 形成せず(25℃, 3日間) |
| クランプ コネクション | 形成せず(25℃, 57日間) |
| 子実体 | 形成せず(25℃, 57日間) |
| 担子器 | 形成せず(25℃, 57日間) |
| テリオスポア | 形成せず(25℃, 57日間) |
| 射出胞子 | 形成せず(25℃, 57日間) |
| グルコースの発酵性 | — |
| イノシトールの資化性 | — |
| 硝酸塩の資化性 | — |
| 集落の色調 | 淡いオレンジ色 |
| 細胞壁中のキシロースの存在 | — |
| 尿素の分解 | + |
| DBBの呈色 | + |

表6 古糊および古糊熟成過程で検出された主要な酵母およびカビ

| 試料記号 | 試料 | 古糊製造方式 | 主に検出された酵母 | 主に検出されたカビ | pH* |
|------|---------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------|-----|
| A | 平成12年仕込み No.1 | 水替えなし (まだ上澄みあり) | 2種類 | <i>Penicillium</i> sp. | 3.2 |
| B | 平成12年仕込み No.2 | 水替えなし (まだ上澄みあり) | 1種類 (<i>Candida</i> sp.) | <i>Penicillium</i> sp. | 2.9 |
| C | 平成12年仕込み No.3 | 水替えなし (まだ上澄みあり) | 1種類 | <i>Penicillium</i> sp. | 2.5 |
| D | 平成12年仕込み No.7 | 水替えなし (まだ上澄みあり) | 1種類 | <i>Penicillium</i> sp. | 2.5 |
| E | 平成1年仕込み古糊 | 水替えあり | 1種類 (<i>Candida</i> sp.) | 検出されず* | 3.2 |
| F | 平成1年仕込み古糊 | 水替えなし | 2種類 (主要1種 <i>Candida</i> sp.) | 検出されず* | 2.7 |
| G | 昭和61年仕込み古糊 | 水替えなし | 3種類 (主要2種 <i>Candida</i> sp.) | 検出されず* | 3.4 |
| H | 平成2年仕込み | 水替えあり | 2種類 | <i>Paecilomyces</i> sp. | 4.8 |
| I | 平成4年仕込み | 水替えあり | 2種類 | <i>Paecilomyces</i> sp. | 3.7 |
| J | 平成5年仕込み | 水替えあり | 2種類 | <i>Paecilomyces</i> sp. | 3.5 |
| K | 平成6年仕込み | 水替えあり | 4種類 | <i>Paecilomyces</i> sp. | 3.4 |
| L | 平成7年仕込み | 水替えあり | 2種類 (いずれも <i>Candida</i> sp.) | <i>Paecilomyces</i> sp. | — |
| M | 平成8年仕込み | 水替えあり | 2種類 | <i>Paecilomyces</i> sp. | 3.7 |
| N | 平成11年仕込み | 水替えあり | 2種類 | <i>Paecilomyces</i> sp. | 3.3 |
| O | 平成12年仕込み | 水替えあり | 1種類 | <i>Paecilomyces</i> sp. | 2.9 |

(平成13年2月2日採取試料)

*pHは、pHメーター (HORIBA, B-212) で測定した。ただし、A~Dまでは上澄み液のpHをそのまま測定し、E~Oについては蒸留水で5倍希釈した溶液のpHを測定した。

微生物の分離および同定法：試料を寒天培地 (PDA) に接種し、25℃で3日間培養し、酵母、カビのコロニーを観察した。培養後、平板上に優勢に生育した酵母7株を分離し、形態観察および性状試験を行い、文献^{18, 20}を参考にして属を決定した。また、カビについては形態観察から主要なものの属を決定した (分離酵母の性状および同定結果を表7に示す)。

表7 古糊および古糊製造過程の糊から分離された酵母の性状と固定結果

| 分離株* ----- 項目 | B-1 | E-1 | F-1 | G-1 | G-2 | L-1 | L-2 |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 栄養細胞の形態 | 球形～伸長系 | 楕円形～伸長系 | 卵形～伸長形 | 卵形～伸長形 | 球形～伸長系 | 卵形～伸長形 | 楕円形～伸長系 |
| 増殖形式 | 多極出芽 | 多極出芽 | 多極出芽 | 多極出芽 | 多極出芽 | 多極出芽 | 多極出芽 |
| 液体培養 (25℃, 3日) | 沈殿および皮膜を認める | 沈殿のみを認める | 沈殿および皮膜を認める | 沈殿および被膜を認める | 沈殿および皮膜を認める | 沈殿および皮膜を認める | 沈殿および皮膜を認める |
| 偽菌糸 | 形成する | 形成する | 形成する | 形成する | 形成する | 形成する | 形成する |
| 真菌糸 | 形成する | - | - | - | - | 形成する | - |
| 子嚢胞子** | 認めない | 認めない | 認めない | 認めない | 認めない | 認めない | 認めない |
| グルコースの発酵性 | + | + | + | + | + | + | + |
| イノシトールの資化性 | - | - | - | - | + | - | - |
| 硝酸塩の資化性 | - | - | - | - | - | - | - |
| 尿素の分解 | - | - | - | - | - | - | - |
| DDBの呈色 | - | - | - | - | - | - | - |
| 同定結果 | <i>Candida</i> sp. | <i>Candida</i> sp. | <i>Candida</i> sp. | <i>Candida</i> sp. | <i>Candida</i> sp. | <i>Candida</i> sp. | <i>Candida</i> sp. |

*酵母の分離株の記号は、表6の試料記号に対応する。

**YM, ME, アダムス, ゴロドコバ, V-8およびPDA各寒天培地での胞子形成。

の実験では確認していないため、あくまでもこれは推測の域を出ない。

このような古糊の生成が順調に進行した場合について、一部推測をまじえて、全般に起きている過程を推測すると、「微生物の活発な関与によって、仕込み後およそ1年以内の短期間に糊のデンプンの分解がすすんで、デキストリン様物質と推測される分子種と単糖であるグルコースが放出される。このグルコースを用いて、微生物による発酵がおき、乳酸、酢酸といった有機酸の放出により糊のpHが低下する。さらに長い熟成過程で、遊離のグルコースが主に耐酸性の微生物に消費しつくされて古糊が完成する」という過程がモデルとして考えられる。

6-2-4 製法の違いによる差違

次に製法のちがいはによる糊の特長の違いであるが、「水替えあり」(表2(7),(8))のほうが、「水替えなし」(表2(9),(10))のグループより、重量平均分子量はやや高めである(詳細は早川ら³⁾参照)。これは、工房の技術者による「水替えありの古糊のほうが粘り気が多い」という一般的所見と一致するものである。これを微生物の関与という面から考察すると、「水替えあり」の製法ではつねに糊の表面が水で覆われていることから、2年目以降はとくに「カビを中

心とする好気性微生物の厚い菌蓋」が形成されることはなく、もっぱら通性嫌気性の過程、おそらく酵母などによる発酵が中心となっていると解釈される。これに対して、「水替えなし」の製法では表面の水分がなくなり「カビを中心とする厚い黒色菌蓋」にその上部をつねに覆われており、この微生物の堆積層の関与のために、さらなる糊の低分子化が進んでいるものと解釈される。しかし、これらの古糊からも酵母が検出されることから、もちろん糊の内部では、ここでも通性嫌気性の酵母を中心とする発酵過程が起きていると思われる。

古糊の製造過程における表面の黒色菌蓋の重要性は大槻によっても指摘されている¹⁾。大槻は、「新糊のヨウ素デンプン反応は青色、古糊は紫色」としたうえで、古糊表面と内部のヨウ素デンプン反応を調べ、古糊を製造する過程で、「表層は速やかに紫色に、内部は徐々に紫色に移行する」と述べている¹⁾。それはすなわち、デンプンの分解が、表層から内部へ、アミラーゼなどのデンプン分解酵素を含む物質が拡散することによって行われていることを示唆する事象とではないか、と推測される。

7. 古糊「熟成」過程でみられる微生物について

古糊を一種の醸造過程と考えた場合、他の醸造過程との比較においてその過程を検討することができよう。

ほとんどすべての醸造食品は、熟成工程をへて製品となる。熟成とは、何も手を加えずに放置しておくことにより、品質を決定づける効果が現れる現象をいう。

先の項までで、仕込み後およそ1年の間に微生物による糊のデンプンの低分子化、およびグルコースの放出、発酵過程の進行、pHの低下がおきることをみてきたが、最終標品の古糊が完成するまでにどのような微生物がみいだされるかを調べるため、昭和61年から平成12年までの製造途上の糊、および最終的古糊までの15試料について、主に検出される酵母とカビを調査した(表6)。すでにpHが約3に低下している試料の場合、細菌を検出することはまれであることがわかってきたため、ここでは酵母とカビを対象をしぼって調査をすすめた。その結果、すべての試料から酵母が主要な微生物として検出された。それらの酵母を顕微鏡で観察したところ、そのほとんどすべてが胞子をつくらない、だ円形、あるいは伸長形の酵母であった(写真7に例を示す)。その中で、代表的なもの7株を選び、同定を行った結果、いずれも*Candida* sp.の酵母であることがわかった(表7)。

Candida sp.は、「子のう菌系の不完全菌酵母であり、栄養細胞は主として球形、だ円形、円筒形、伸長形であり、多極出芽で増殖し、胞子を形成しない」性質をもつ酵母を総称するものである。したがって、ひとつの属に分類されてはいるものの、実際にはかなり多様な種を含むグループである。自然界に広く分布し、土壌、大気、水や植物、食品などに存在する。

同定した7株は、同じ*Candida* sp.とはいえ、種類の共通性はあまりないことがわかった。しかし、いずれもグルコースの発酵性を有するものであり(表7)、したがって、これらの酵母は、古糊の熟成過程において、糊のなかの遊離のグルコースを発酵によって消費する役割をになっていると考えられる。おそらく、空気中などに存在する常在菌のうち、たまたま糊に入りこんだもので、耐酸性があり、グルコースの発酵性があるものが、古糊熟成に関わっていると考えられる。その種については、今回分離された酵母の場合は、詳細に同定したものの以外についても、形状などの観察所見から推定するとおそらくほとんどが*Candida* sp.と考えられるが、それ以外のものであっても耐酸性があり、グルコースの発酵性を有するものならば、かなり広範な種類がその過程にかかわれるものと推測される。

なお、表6では、「水替えあり」の製法による糊を中心に調査を行った結果を示したが、「水

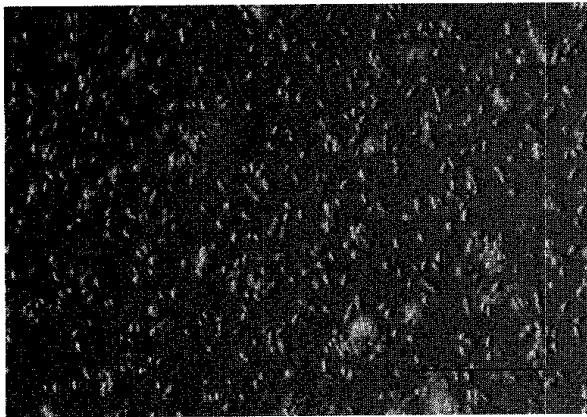


写真7-a 古糊および熟成過程の糊より分離された酵母の栄養細胞の形態の例
平成元年仕込み、古糊(表3, F)から分離された酵母の栄養細胞の形態の一例(明視野, $\times 400$)
スケール: $50 \mu\text{m}$



写真7-b 古糊および熟成過程の糊より分離された酵母の栄養細胞の形態の例
平成6年仕込み、熟成過程の糊(表3, K)から分離された酵母の栄養細胞の形態の一例(明視野, $\times 400$)
スケール: $50 \mu\text{m}$

替えなし」の製法においては、表面の黒色菌蓋も熟成過程に関与していると考えられる。

8. 考 察

8-1 ほかの醸造過程との類似性について

古糊の製造過程を微生物との関わりにおいてみると、清酒、醤油、みそなどといった食品の醸造過程と現象的に類似している部分があると考えられる。ここで、「醸造」とは、「発酵作用を応用して、酒類、醤油などをつくること」さらに、「発酵」とは「酵母類、細菌類などの微生物によって、有機物を分解してアルコール類、有機酸類、ガスなどを生ずる作用。酒、醤油、みそなどはこの作用を利用して製造する」とされている¹⁶⁾。

発酵が起きるには、まず「糊化されたデンプンが糖に分解される」ことが、第一の過程である。デンプンには、枝分れした構造のアミロペクチンと、枝分れのないアミロースの2種類があり(図1)、もち米のように粘稠性の高いもののデンプンはアミロペクチンの含有量が高く、一度糊化すると粘稠性が持続する¹⁶⁾。デンプンの分解をになうのが、清酒や醤油、みそなどの醸造過程の場合、カビのこうじ菌であり、これは細胞の外のデンプンやタンパク質を分解して、低分子にする性質が特に強いものである。このデンプンの糖化に関わる酵素の代表的なものが、直鎖状のデンプン分子を切断する α アミラーゼであり、 α アミラーゼによって低分子となったデンプンを「 α 限界デキストリン」と呼ぶ。

一方、酵母、乳酸菌、酢酸菌などの醸造用微生物は一般にデンプンのような高分子物質を直接発酵することはできない¹⁶⁾ため、遊離した糖をつかって発酵を行う。

この発酵がすすむと、乳酸、酢酸などの有機酸の遊離によって醸造物は一般に酸性になり、この酸性であるということが、多くの醸造物において、雑菌の繁殖が抑えられている理由である¹⁶⁾。

清酒やみその醸造過程でおきる微生物種の消長については、わが国で、よく研究がすすんでおり、その例を図2、図3に引用した。清酒の場合(図2)、まずカビによってデンプンの分解、糖化がおきたのち、硝酸還元菌が増殖、次に低温性の乳酸菌も増殖し、乳酸が生成される。乳酸濃度が上がると、産膜性の酵母が死に、やがて乳酸菌自身も死滅し始め、耐酸性の高い酵母が生育する環境になる^{16,17)}。さらに醤油の場合(図3)も、原料は大豆や小麦のタンパク質が主であるが、同様に発酵微生物の消長と、pHの低下がおきていることが知られている^{16,17)}。さらに、清酒の場合には、発酵に重要な役割をになう酵母の種類が*Saccharomyces cerevisiae*、醬

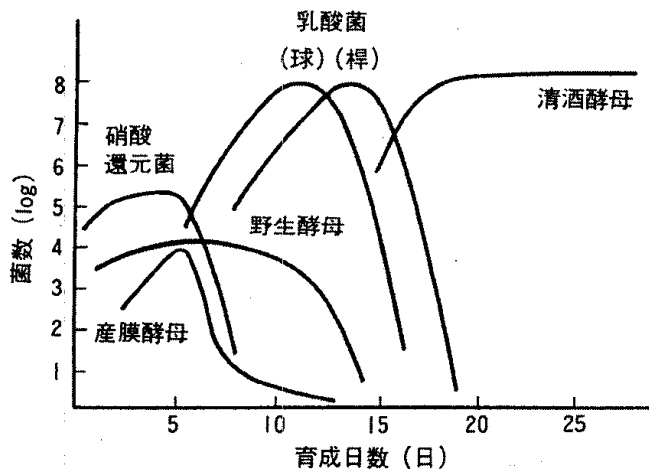


図2 (山麩) 醗育成中の微生物の消長
(井上¹⁶⁾, 野白ほか¹⁷⁾より引用)

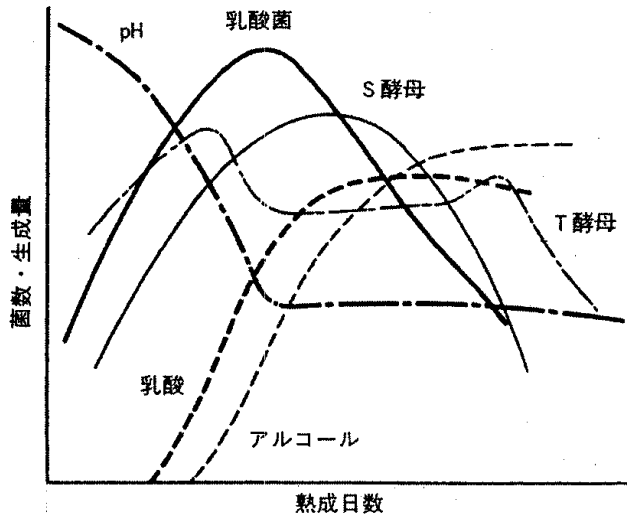


図3 醤油もろみ熟成中の変化
S酵母: *Saccharomyces rouxii*
T酵母: *Torulopsis versatilis*
(井上¹⁶⁾, 野白ほか¹⁷⁾より引用)

油づくりの場合には「S酵母」「T酵母」などと、特定の種として同定されている(16, 17)。

では、古糊の場合に、熟成過程で働く「古糊酵母」といふべきものが存在するかどうか興味のあるところであるが、今回の調査結果をみる限り、古糊の熟成過程、最終標品からみいだされる酵母のうち、同定を行ったものは、すべてがグルコース発酵性をもつ *Candida* sp. であったこと以外、とくに種レベルでの共通性はなかった。したがって、同じ工房でつくられた古糊であっても、属は同じとはいえ、その種類にはかなりばらつきがあるといえる。

古糊製造の場合は、発酵過程自体が大切なのではなく、デンプンの低分子化、なかでも、おそらくは、特に、デンプンの限界デキストリン様物質への移行が最も重要な過程であろうと考えられる。発酵は、その結果として生じたグルコースを消費しつくす過程でしかなく、発酵の結果として酸性になった環境で生き長らえつつ、最後までグルコースを消費しつくす耐酸性の酵母であれば、古糊の熟成の担い手として十分であると考えられ、その種はかなり多様なものと思われる。

8-2 糊のデンプンの低分子化に関わる微生物について

今回のGPCの結果より、糊のデンプンの低分子化、およびグルコースへの分解は、糊の仕込み後、6カ月後の時点でかなり進行しており、1年後には、少なくとも糊の上部についてはほぼ完了することがわかった(早川ら³⁾参照)。

初期におきるデンプンの分解に主要に関わる微生物種がどのようなものか、興味をもたれるが、今回の調査では、6カ月未満の糊の詳細な微生物種の調査を行っていないので、これを明らかにするためには今後の検討が必要である。

しかし、過去の報告と、我々のいくつかの観察所見をあわせると、その候補となる微生物種を、ある程度しぼることができると思われる。

まず、大槻によると、糊を仕込んでのちの初期過程を観察すると、すでに3週間後に細菌、カビ、酵母の集落が糊の表面に現れはじめ、およそ2カ月後には表面がカビによりほとんど覆われ、およそ3カ月後に酵母の生菌数のピークが、そして4カ月後に細菌の生菌数のピークが現れる、と記述されている⁶⁾。このことから、大槻は「最初に頂点を示すは糸状菌(カビ)にして、この時、糊塊表層澱粉は液化或いは糖化せられ、そこに芽胞菌(酵母)が好餌を得て繁

殖し、続いてバクテリア（細菌）が6月付近の温暖と前期2種菌類の繁殖による澱粉分解生成物或いは代謝生産物とを発育要因として頂点を示すものと解すべし」と考察している⁶⁾。

また藤波らは、貯蔵期間の短いものはカビを主体とした菌膜が顕著であり、初期段階でカビが主体的に澱粉の低分子化に関与しているものと推察している¹⁴⁾。

さらに我々が平成12年にガラス容器12個に仕込んだ糊の試料を1年後の平成13年に観察した結果、糊の上部の柔らかさ、すなわち糊の分解のされ方は、試料ごとに差があり、それは糊の上部の微生物層と相関があるように思われた。すなわち、糊の上部がカビの黒っぽい菌蓋に覆われているものは、その下部の糊が柔らかくなっている、という明確な傾向がみられた。表2で示した試料は、12の試料のうち、黒色菌蓋がはっきりと形成されている2つの試料について、データを示したものである。

その一方で、実験的になんらかの原因でカビの発生が抑制された試料については、1年後にも糊の分解が十分にすすんでいないという傾向がみられた。さらにこの傾向が明らかであったのは、脱酸素剤で酸素を0.1%未満に維持しておいた糊では、一部で嫌気性微生物によると思われるガスの発生はみとめられたものの、好気性微生物であるカビは全く生育せず、この場合、糊の固さという点では、1年が経過してもほとんど変化がないように見受けられた。このことから、カビが糊のデンプンの分解（液化、糖化）に重要な役割を果たしているものと思われる。

また、一般には、酒、醤油、みそなどの多くの醸造過程において、デンプンやタンパク質などの分解にカビ（こうじ菌）を積極的に使っていることから、カビのなかにはきわめて強力にアミラーゼを生産するものがあることはよく知られている。糊のデンプンの液化、糖化についても、カビが関与していると考えるのは自然であろう。多くのカビは、デンプン分解酵素（アミラーゼ）を細胞外に放出し、細胞外のデンプンを消化できる。したがって、カビの関与を仮定して考えると、いったんカビによって放出されたアミラーゼが、糊の容器中を上層から下層へと拡散していき、最終的に容器全体の糊が分解される可能性が考えられる。

9. まとめ — 古糊製造過程のモデルと今後の課題

以上の糊の定性的な微生物の調査と、pH、糊の分子量分布、糊の有機酸分析の結果を総合すると、古糊の製造過程について、次のようなモデルが考えられる。

- (1) 糊の仕込み後およそ1年以内に、カビやその他の微生物の積極的な働きにより、糊のデンプンの低分子化（液化、糖化）がおきる。その結果、遊離のグルコースが生じるとともに、デンプンのデキストリン様物質への移行がおきていると考えられる。
- (2) そのグルコースが、酵母や細菌などの微生物によって使用され、一種の発酵過程がおきる。その結果として、乳酸や酢酸といった有機酸が放出され、糊はpH約3の酸性となる。
- (3) 酸性となった環境で、多くの細菌は生存できずに死滅し、耐酸性の酵母、カビなどが生存して、主要な微生物となる。とくに糊の内部は空気と遮断されているため、内部においては酵母が主要な微生物と考えられ、今回の調査でみられた *Candida* sp. のような酵母が遊離のグルコースを消費する古糊の「熟成」過程がおきる。そして、最終的にグルコースがなくなった段階で、「古糊」最終標品となる。ただし、「水替えなし」製造方式の古糊では、上部の黒色菌蓋も、糊の熟成に関与すると考えられる。

今回の調査では、糊の製造の初期過程、とくに6カ月未満の過程については、検討を行っていないので、このモデルのとくに初期過程でおきる現象については、今後の検討が必要である。善如寺らによっても指摘されているように^{12,13)}、特に初期に糊のデンプンの分解に関わる微生物

物の調査およびその分解の機構が、今後の重要な検討課題であろう。

備考：本研究の一部は、(株) 岡墨光堂による平成11年度～12年度受託研究、「装こう材料の物性研究」として行われた。

謝辞

本報をまとめるにあたり、微生物の分離、同定に際して多くのご協力をいただきました(財)食品分析センター、多摩研究所の馬場浩氏、および(株) NCIMB Japanの技術担当の方々に深く感謝いたします。また、GPC、有機酸分析については、出光興産株式会社中央研究所の村越隆一郎氏、津村修氏に多大なご尽力をいただきましたことに感謝致します。

引用文献

- 1) 大槻虎男：糊の生化学的研究 I. 古糊とその材料に就て, 植物及動物, 2, 1818-1824 (1934)
- 2) 大槻虎男：糊の生化学的研究 III. 古糊熟成第2年及び第3年の経過に就て, 植物及動物, 5, 1459-1464 (1937)
- 3) 早川典子, 木川りか, 川野邊渉, 樋口恒, 岡泰央, 岡岩太郎：古糊の物性と化学組成に関する基礎的研究, 保存科学, 41, 15-28 (2002)
- 4) 大槻虎男：糊の生化学的研究 I. 古糊とその材料に就て (承前), 植物及動物, 2, 1984-1994 (1934)
- 5) 大槻虎男：糊の生化学的研究 II. 古糊熟成第一年の経過に就て, 植物及動物, 3, 1426-1432 (1935)
- 6) 大槻虎男：糊の生化学的研究 II. 古糊熟成第一年の経過に就て (承前), 植物及動物, 3, 1599-1605 (1935)
- 7) 大槻虎男：糊の研究 IV. 掛軸の汚染成生試験と汚染に興る二種の糸状菌の分離, 植物及動物, 5, 1809-1820 (1937)
- 8) 滝沢孝一, 鈴木隆元, 山田豊一, 福田憲六：古糊の抗カビ性について, 防菌防黴, 9巻, 4号, 185-189(1981)
- 9) 滝沢孝一, 山田豊一：古糊の研究, 中央大学理工学部紀要, 29, 317 - 333 (1986)
- 10) 滝沢孝一, 山田豊一：古糊の研究 (2), 中央大学理工学部紀要, 36, 51-67 (1993)
- 11) 滝沢孝一, 山田豊一：古糊の研究 (3), 中央大学理工学部紀要, 38, 51-69 (1995)
- 12) 善如寺朋子, 伊藤美香, 飯野久和, 大沢真澄：古糊から分離された微生物のデンプン分解性, 日本文化財科学会第15回大会, 研究発表要旨集, p190-191 (1998)
- 13) 善如寺朋子, 伊藤美香, 飯野久和, 大沢真澄：古糊生成過程における微生物関与についての一考察, 文化財保存修復学会第20回大会, 講演要旨集, p 116-117 (1998)
- 14) 藤波朋子, 藤岡春樹, 飯野久和, 大沢真澄：古糊生成時に関与する微生物の調査, 日本文化財科学会第17回大会, 研究発表要旨集, p200-201 (2000)
- 15) Kenjo, T., Arai, H. et al.: Studies on Aged Starch Paste for the Traditional Mounting of Hanging Scrolls, *Biodeterioration of Cultural Property* 3, 387-399 (1995)
- 16) 井上喬：「やさしい醸造学」, 工業調査会 (1997)
- 17) 野白喜久雄ほか：「醸造の事典」, 朝倉書店 (1996)
- 18) Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.: "The yeasts, A taxonomic Study" 4th edition, Elsevier Science B.V. (1998)
- 19) Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D.: "Yeasts: Characteristics and Identification" 3rd edition, Cambridge University Press (2000)
- 20) Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D.: "Yeasts: Characteristics and Identification" 2nd edition, Cambridge University Press (1990)

キーワード：古糊 (aged paste, *Furunori*) ; 日本画 (Japanese paintings)
微生物分析 (microbial analysis)

Microbial Involvement in the Generation of Aged Paste, *Furunori* for Restoration of Traditional Japanese Paintings

Rika KIGAWA, Noriko HAYAKAWA, Wataru KAWANOBE, Hisashi HIGUCHI*,
Yasuhiro OKA* and Iwataro OKA*

Special kinds of aged paste, called *furunori* are commonly used in restoration techniques of traditional Japanese paintings, especially for mountings. *Furunori* is made from starch paste, leaving it in large vases with lids on the ground under floors for many years. Many kinds of microbes flourish mainly on the surface, and finally the aged paste, which is less sticky and rather acidic, is generated after years. The final product is generally said to be less attacked by microbes such as fungi, a condition which is desirable for paste for restoration. The less sticky characteristic of this paste is quite suitable for several processes of restoration techniques of traditional Japanese paintings.

Our purpose in this research was to investigate the process of generation of *furunori*. Major microbes were examined in several stages of the maturation of the paste, together with pH, average molecular weights of ingredients of the paste and major organic acids in the paste.

In six months, the pH of the paste dropped from 6.8 to approximately 3 in all lots that we investigated. Average molecular weight of the paste ingredients dropped from about one million to twenty thousand. Interestingly, a peak of molecular weight of approximately 180 was also detected after six months, which was thought to be free glucose fraction. Organic acids such as lactic acid and acetic acid, which were not seen in new paste, were found in the paste after six months. The major microbes at this point were fungi on the surface of the paste and yeast in the watery portion. But we detected a lactic acid bacteria, *Lactobacillus paracasei* in one of the three samples we examined.

After one year, the pH, average molecular weight of pastes, organic acids and presumed fraction of glucose in pastes were similar to those after six months, but major microbes had changed: bacteria were hardly found at this point, and the dominant species were yeasts in paste and fungi on the surface, both of which were tolerant to acidic environment.

After more than ten years, the pH and the average molecular weight of pastes were almost similar to those after one year, but the fraction that presumably corresponded to glucose disappeared totally. The dominant microbes in pastes were acid-tolerant yeasts in the paste and fungi on the surface.

We identified yeasts and fungi isolated from several samples of pastes, ranging from one-year to fourteen-year-old ones. Most of the yeasts investigated were *Candida* sp. which could ferment glucose.

From these results, we made a model of *furunori* generation as below:

- (1) New starch paste is fragmented by microbes, perhaps mainly by fungi on the surface, and free glucose is generated.
- (2) Using free glucose, yeasts and bacteria, such as lactic acid bacteria, grow and fermentation is started, generating organic acids like lactic acid and acetic acid. This results in the dropping of the pH of the pastes. (after six months)

- (3) As the concentration of organic acids increases and the pH of the pastes drops, most of the bacteria and general yeasts die. But acid-tolerant yeasts and fungi survive to become dominant species. (after one year)
- (4) During maturation process, acid-tolerant yeasts and fungi use the free glucose in the pastes.
- (5) When the free glucose is totally spent, the maturation of *furunori* is completed.

Since we did not examine the early stages of the process, within six months, the roles of microbes in this period are unknown. Therefore, it would be the next important subject to study the process of *furunori* generation.