醸 造 研 究

昭和 28 年 度

黒 粕 の 成 因 に 就 い て (第一報)

黒粕より分離した一種の *Dematium* 菌に就いて

小武山温之, 二瓶孝夫, 田中佐亀三, 森 博 司

(昭和 28 年 6 月 1 日受理)

一昨年醸造試験所に於て醗二本, 群馬県の或る酒造場では数本圧搾後の清酒粕が二三日目頃から表面に褐色の斑点を生じ, 漸次全面に拡がり, 益々暗褐色がかつて来ると云う現象を見出した。これらの黒粕生成の原因に就いて色々研究したのであるが, 最初はチロシナーゼの作用ではなかろうかと思われたが, 黒粕も普通清酒粕も同様の作用を行うので, 更に菌の分離を行つた処一種の黒粕菌を分離した。

該菌は *Dematium* 属に入れられるべきもので, (黒粕菌 1 と称す。) 菌叢が黒色であつて, 酒精及び酸にも耐えて発育する事が解つた。然し普通の清酒粕にはどの様にしても発育せず, 清酒粕をアルコール抽出した残渣に葡萄糖を添加する場合良く発育するが, 抽出液にはどの様にしても発育を見なかつた。

尙カブリン酸が該菌の発育を阻害する事も判明した。現在更に二種の菌を分離し, 併せて諸性質を研究中であるが, 本酒造年度は各所に黒粕の現象が見られたので取敢えず報告する。

尙これらの菌は普通醸造庫の各所に繁殖し, 壁などに黒色斑点状をなして見られる。故に予防方法としては庫を清潔にすることが肝要で, 庫の殺菌剤には何がよいかは目下試験中である。

終始御指導下さつた坂口教授, 山田所長, 松本憲次先生に厚く御礼申上げる。

1. 黒粕から分離した黒粕菌の生理

1. 繁殖温度 10°C 以下 40°C 以上では殆ど繁殖を見ない。25°C~30°C 附近が最適繁殖温度。
2. 死滅温度 60°C では死滅しないが 70°C 10 分で死滅する。
3. 繁殖 pH pH 3~8 繁殖最適 pH 5~6 附近。
4. 耐酸試験 乳酸 1.4% まで繁殖, 醋酸には 0.1% で阻害を見る。琥珀酸 1% 以上阻害。0.1% 麴酸には阻害されない。
5. 耐アルコール試験 10% 以上のアルコールには繁殖しない。
6. 糖 質 源 ヘンネベルヒ氏人工培養液使用, 糖質源を変化させ黒粕菌の繁殖する糖類を見ると, 葡萄糖, 蔗糖, 麦芽糖, 果糖, ガラクトース, ラフィノース, アラビノースにはよく繁殖, キシロース, マンノースには繁殖するが黒色にはならない。ラクトースには繁殖しない。

2. 酒粕中の繁殖阻害物質

黒粕より分離した黒粕菌を黒色にならない普通の酒粕に接種する時黒粕菌の繁殖を見ない。これは結局普通の酒粕には該菌を阻害する何等かの物質がある様に思われるので, 今酒粕をアルコール, 水で抽出, 抽出液を培養液中に添加して阻害の有無を検した。

抽出液

酒精抽出液—酒粕 50 g を酒精で抽出, 抽出液を減圧濃縮しアルコールを除去 50 cc とする (A液)

水抽出液—酒粕 50 g を水で抽出, 抽出液を減圧濃縮し 50 cc とする (B液)

上記の如き抽出液 A, B を培養基に次表のように添加, 黒粕菌を接種し扁平培養, 27°C の恒温に保ち 4 日目, 7 日目繁殖状態を検した結果は次の通りである。

番号	培 養 基				4 日 目	7 日 目
No.1	A 液 10 cc	+ 水 0 cc	+ 葡萄糖 7 %	+ 寒天	-	-
2	5	5	//	//	-	-
3	2.5	7.5	//	//	-	-
4	B 液 10 cc	0 cc	//	//	±	+
5	5	5	//	//	±	+
6	2.5	7.5	//	//	±	+
7	対照 (Bllg 10° 麴寒天)				++	++

結果 酒粕のアルコール抽出液は黒粕菌の繁殖を阻止する。

3. 酒精抽出粕の黒粕菌繁殖試験

前記試験により酒粕のアルコール抽出液は黒粕菌の繁殖を阻害することが判明したが、抽出後の酒粕に黒粕菌が繁殖するかを検した。

7 日目の繁殖状態

No.1 対照 アルコール抽出しない酒粕

-

2 アルコール抽出粕

+++

抽出粕は酒粕をアルコールで充分抽出、抽出後水洗してアルコールを除去乾燥したものに葡萄糖を加えたもの。

酒粕をペトリ皿に採り黒粕菌を接種、27°C の恒温に 7 日間保ち繁殖するかを検した。

結果 アルコール抽出粕にはよく繁殖するが、抽出処理しない粕には繁殖しない。

4. 黒粕菌の繁殖阻害物質に関する試験

米油及び各種脂肪酸の黒粕菌に対する阻害

前記試験により酒粕中の黒粕菌阻害物質はアルコールにより抽出されることが判明したが、今抽出物の大部分と考えられる米油及び脂肪酸として蟻酸、醋酸、プロピオン酸、正酪酸、イソ酪酸、イソヴァレリアン酸、正ヴァレリアン酸、正カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸を添加、阻害試験を行うに米油は全く阻害せず、脂肪酸では分子量の相当高いカプリン酸が阻害が甚しく 0.01 % では全く菌の繁殖を見ない。更に高級の固結したワウリン酸以上のものは余り阻害を見ない様である。

註 試験は Bllg 10°C 麴寒天に各脂肪酸、米油を添加、扁平培養し 27°C の恒温に 7 日間保ち繁殖の有無を検した。

要 約

暗褐色になった黒粕中より分離した菌の一種はデマチウム属の菌で、該菌はアルコール、酸に耐える性質を有して黒粕の原因になると考えられる。該菌の諸性質を検討したが現在カプリン酸添加の場合繁殖しないことが解つた。

該菌は普通の清酒粕には繁殖しないから、普通の粕には該菌の繁殖を抑える特殊成分があると考えられる。この物質が何であるか亦如何なる原因から造られるか現在研究中である。

On the occurrence of dark browned sake-cake. (part I)

On the microbes isolated from the sake-cake.

Y. Kobuysma, J. Nihe, S. Tanaka, and H. Mori

(Received June 1 1953)

We isolated a species of microbes belonging to Dematium from the dark browned saké-cake. The microbes propagate on the culture containing 5% alcohol or 1.3% lactic acid, but cannot propagate on the culture containing 0.01% capric acid or on the normal saké-cake.

As we considered that the normal saké-cake contained some substance which protected the

propagation of the these microbes, we began to study what this substance is or how this substance is made during the sake brewing.

二三麹菌酵素力の比較 麹の研究 (X)

村上英也, 石川正弘

(昭和 28 年 6 月 1 日受理)

麹菌酵素を研究する場合特別の目的以外その酵素の生産者である麹菌の種類や性質の差は概ね問題とされず、多くの場合実験上又は実用上の見地から或種の酵素には常に或種の麹菌が用いられその他の麹菌に就ては顧みられない事が多い。然しこの事は最近の糸状菌 diastase の研究に俟つまでもなく直接には積極的に麹菌を利用しようとする場合等閑に附する事の出来ない問題であり、間接には複雑暗黒な醸造の過程を窺い知る端緒を得る可能性も考えられるわけで大事な事と思う。

ここに多数の麹菌を醸造別に分類し、且いろいろの市販種麹より麹菌の分離を行つたのを機会にその主なる加水分解酵素及び酸化酵素を検出比較しこの問題に対する若干の参考を供し度いと思う。

供試麹菌は清酒用 4, 甘酒用 5, 味噌用 6, 正油用 8, 他に *Asp tamari* group 5, *Asp candidus* sp 1, (菌号 No 51) *Asp ochraceus* sp 1, (菌号 No 60) 醸造に使用困難なもの (菌号 No 21) 1, 計 31 株と市販種麹より分離したもの清酒用 13, 正油株 5 計 18 株, 総計 49 株である。試験した酵素は Protease, Diastase, Invertase, Lipase, Urease, Pectinase 及び Catalase, Peroxidase, Tyrosinase で, Protease に就ては Pepsin, Trypsin, Erepsin を検出し、且 milk casein, 大豆 Glycinin, 米 Oryzenin, 小麦 Glutenin 及び Gelatin 等基質を異にした場合の混合 Protease の酵素力を比較した。麹菌利用の立場から之を diastase を主として利用する菌株と Protease を主として利用する菌株とに大別すると Invertase はむしろ後者に多く存し、就中 *Asp tamari*, *Asp candidus* 等は強力であり、Lipase はむしろ前者に多く見られ液面培養に於て芳香を生ずる菌株は概して強力 (必らずしも最強ではない) である。Urease は成長繁殖力の弱い麹菌非生産株によく検出され、酸化酵素については一定の傾向を見出す事は困難であるが Tyrosinase の強力なものは麹汁の着色も濃い菌株である。基質を異にした場合の混合 Protease の強弱は菌株と基質の種類により異なるが総ての基質に対して常に強力なものと又常に弱いもの数株を選出する事が出来た。又市販種麹に於ける diastase 強力菌株と Protease 強力菌株との分布を見ると最近の醸造法の進歩に伴つてか之等が醸造の種類を問わずかなり自由に混合配分されている事がわかる。

実 験

酵素液 A の調製

Ballg 12° Koji ex に 32°C で 12~14 日間培養した後生ずる麹菌蓋を分取し、水道水で充分に洗つて培養液を除いた後真空 desicator で乾燥し乳鉢で粉末としたものの 1g を 100 cc の水道水で 1 昼夜浸出し、濾過し濾液を酵素液 (A) とする。

酵素液 B の調製

麹 5g を常法により 200 cc 三角フラスコ中で 32°C で 5 日間製麹し、水 100 cc を加え室温に 15 時間浸出し濾過し、濾液を酵素液 (B) とする。

(1) Pepsin の検出

酵素液 (A) 5 cc + 蒸溜水 5 cc + 1 N HCl 3 cc + Carmin-Fibrin 適量 + Toluene 0.5 cc の作用液を試験管に採り 37°C に 20 時間の後 Carmin 色素の溶解度を比色によつて測りその強弱を+(強)-(弱)の符号を以て表示する。

Carmin-Fibrin は Fibrin 20g を 0.5% Carmin 溶液 40 cc に 24 時間浸し、5 分間 60°C に加熱した後取り出し、洗滌液が着色しないまで水で充分洗滌し乾燥したものを用い、その一定量 (約 0.2g) を作用液に添加する。この酵素は酸性に於て蛋白質を albumose, pepton まで分解する。