中国曲の微生物菌数と分離カビの酵素活性及び同定試験

小泉幸道・舘 博・村 清司*・岡田早苗**

新村洋一***・柳田藤治

(東京農業大学醸造学科, *栄養学科, **農大総合研究所, ***農芸化学科)

昭和63年5月13日受理

The Microbial Count and Enzyme Activity of Molds Isolated and Identified from Chinese Kojis

Studies on Chinese Kojis (Part I)

Yukimichi KOIZUMI, Hiroshi TACHI, Kiyoshi MURA*, Sanae OKADA**,
Yo-ichi NIIMURA*** and Fujiharu YANAGIDA

(Department of Brewing and Fermentation, *Department of Nutrition,
Nodai Research Institute and *Department of Agricultural
Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1
Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156)

The viable cell count of molds, yeasts and lactic acid bacteria was determined on 22 samples of Chinese koji. Mold isolates were examined for their enzyme activity and identified. Results of this study were as follows: 1) The microbial count per gram of koji sample was determined. Molds were found to be present on 20 samples with values ranging from 10^3 to 10^6 . Yeasts were present on 4 samples and the count was 10^6 to 10^7 , whereas that of lactic acid bacteria which were present on 19 samples gave an average value of 10^6 . 2) The enzyme activity of the isolated molds were examined. In general, the activities of enzymes from Chinese kojis were low. 3) The mold isolates were identified to be mainly *Rhizopus* sp. and few strains belonged to *Syncephalastrum* sp.

Key words: 中国曲・カビ・酵素力価

緒 言

我が国の酒・味噌・醤油の製造に用いる麴は散麴であるが、中国では福建・浙江省などで造られている紅酒以外の酒のほとんどは、餅麴といわれる曲（麴の簡字体）によって造られている。

中国の曲については、鈴木¹⁾や大谷²⁾が紹介しておりここでは詳述しないが、曲は破碎した穀物に適当量の水を散布し、自然界からの微生物の混入や、既製の曲を混ぜて、微生物を繁殖させて乾燥させたものであり、これらを酒造原料に混ぜて、酒造り^{1~3)}が行われる。

筆者の一人である柳田らは、1984年と1985年に、中国南部の貴州及び雲南省で市販されている曲を収集した。この地方には米を原料とした蒸留酒があり、アルコ

ール分は20%位である。焼酒と呼ばれ、無色透明である。この種の酒は、同地方の店で売られているが、一般的には家庭で自家用酒として造られているが多い。

本研究は、収集した市販曲より、カビ・酵母・乳酸菌を分離し、分離株の同定を行い、これらの微生物群が酒造りへ及ぼす役割について検討することにある。本報では、市販曲のカビ・酵母・乳酸菌数を測定し、これらを分離すると共に、カビについては分離株の酵素力価を測定し、既知菌株と比較した。また、酵素力価の高い菌株に対して、同定を行った。なお、分離株の酵母と乳酸菌の同定は、次報で報告する。

実 験 方 法

1. 供 試 試 料

試料は中国南部の貴州及び雲南省で収集した市販曲、

中国曲に関する研究 (第1報)

第1表 供試曲

試料 No.	名 称	購入場所	試料 No.	名 称	購入場所
1	酒 麴 曲	貴州省貴陽	12	白 酒 曲	雲南省思茅
2	甜 酒 曲	貴州省貴陽	13	海燕日乙女曲	雲南省思茅
3	自家製曲	貴州省貴陽	14	甜 酒 曲	雲南省思茅
4	酒 麴 曲	貴州省貴陽	15	酒 曲	雲南省景洪
5	甜 酒 曲	貴州省凱里市	16	甜 酒 曲	雲南省景洪
6	燒 酒 曲	貴州省雲山	17	甜 酒 曲	雲南省景洪
7	甜 酒 麴	貴州省雲山	18	甜 酒 曲	雲南省景洪
8	糖 化 曲	貴州省雲山	19	甜 酒 曲	雲南省景洪
9	甜 酒 麴	貴州省雲山	20	濃縮甜酒麴	雲南省思茅
10	甜 酒 麴	貴州省貴陽	21	濃縮甜酒麴	雲南省思茅
11	釀 酒 曲	雲南省昆明	22	甜 酒 曲	雲南省思茅

22 試料を用いた。曲の名称及び購入場所を第1表に示した。

2. カビ数の測定及び分離

カビ数の測定は GYP 寒天培地（ブドウ糖 2.0%，酵母エキス 0.5%，ポリペプトン 0.5%，クロラムフェニコール 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，寒天 2.0%，pH 6.8）を用いて、30°C 恒温器にて2日間平板培養を行い測定した。カビの分離は、色及び菌糸の異なるものを純粋分離して、分離株とした。

3. カビの酵素力試験

分離カビの酵素力試験は、麴 10g に水 7ml を加えて、オートクレーブで1気圧 15 分殺菌後、各試料より分離したカビを接種して、30°C 恒温器で5日間培養したものを麴麴とした。酵素力試験は、 α -アミラーゼ、総合糖化力、プロテアーゼ（pH 6.0）を、国税庁所定分析法注解⁴⁾に従って測定した。活性単位は、 α -アミラーゼは $U=D_{490}^{30}$ ，総合糖化力は $U=\text{mg}$ グルコース/60 分，プロテアーゼ（pH 6.0）は $U=\mu\text{g}$ チロシン/分とした。

4. 酵母数の測定及び分離

酵母数の測定は、YM 寒天培地（酵母エキス 0.3%，麦芽エキス 0.3%，ポリペプトン 0.5%，グルコース 1.0%，寒天 1.5%，pH 5.8）を用いて、28°C 恒温器にて2日間平板培養を行い測定した。酵母の分離は、1枚の平板培地に出現しているコロニー数が 50 以内のものをを選び、全ての酵母を純粋分離して分離株とした。

5. 乳酸菌数の測定及び分離

乳酸菌数の測定は、GYP- CaCO_3 寒天培地（ブドウ糖 0.2%，酵母エキス 0.1%，ポリペプトン 0.1%，Na-acetate $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%，Tween 80 0.05%， $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%， $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg/100ml， $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg/100ml，NaCl 1mg/100ml， CaCO_3 0.5%，寒天 1.5%，pH 6.8）を用いて平板後、1.5% の寒天を重層して、30°C 恒温にて3日間平板培養を行い、培地に含まれる CaCO_3 を溶解したコロニーを測定した。乳酸菌の

分離は、同様にコロニーを溶解しているものを純粋分離して分離株とした。

6. カビの同定

カビの分離株の同定は、宇田川ら⁵⁾の方法に従ったが、*Rhizopus* 属については、M. M. A. SCHIPPER⁶⁾の方法で行った。

実験結果及び考察

1. 中国曲のカビ・酵母・乳酸菌数

中国曲より微生物菌数を測定するにあたり、供試曲の水分含量を測定した所、12.8~13.7% であった。22 試料の中国曲より、カビ・酵母・乳酸菌数を測定した結果を、Table 2 に示した。カビについては、No. 11 と 19 の試料からは検出されず、20 試料より検出された。カビ数の少ないものは、No. 9-14 の $10^1/\text{g}$ で、多いものは No. 16 の $10^8/\text{g}$ であったが、ほとんどの試料は $10^3\sim 10^6/\text{g}$ であった。従ってこれらのカビによる酵素作用は、十分に考えられた。酵母については、4 試料（No. 3-11-12-18）のみ検出され、何れも $10^6\sim 10^7/\text{g}$ であった。酵母が検出された試料が少ないことから、酒造りにおいては曲が確実な酵母の供給源とは考えられない。自家用酒製造においては、順調な発酵もろみを少量、新しいもろみに加えているので、酵母源はこれらのもろみではないかと推察する。また、実際の工場においては、培養酵母を添加して、アルコール発酵を行わせている所も多い¹⁻²⁾。乳酸菌については、No. 5・14・22 の試料から

Table 2 Viable cell count (per gram sample) of molds, yeasts and lactic acid bacteria from various Chinese Koji.

Sample No.	Mold count	Yeast count	Lactic acid bacterial count
1	4.3×10^6		8.0×10^4
2	9.0×10^6		8.0×10^3
3	5.9×10^5	4.5×10^7	8.0×10^6
4	6.0×10^5		1.5×10^5
5	1.0×10^5		
6	2.0×10^5		2.5×10^5
7	1.6×10^6		8.0×10^6
8	1.0×10^3		6.4×10^4
9	1.0×10^1		1.0×10^6
10	3.0×10^3		8.6×10^6
11		5.1×10^6	1.7×10^6
12	1.0×10^2	1.4×10^7	5.8×10^6
13	3.0×10^7		1.6×10^6
14	1.0×10^1		
15	1.0×10^2		5.6×10^6
16	1.7×10^8		5.7×10^5
17	1.0×10^3		8.0×10^{10}
18	2.0×10^3	4.0×10^6	3.8×10^6
19			2.4×10^4
20	1.0×10^5		6.4×10^4
21	1.0×10^2		6.0×10^5
22	6.0×10^3		

は検出されず、19試料より検出された。乳酸菌の少ないものは、No.2 の $10^3/g$ で、多いものは No.17 の $10^{10}/g$ であったが、 $10^6/g$ が平均菌数であった。

2. カビの酵素力試験

試料より分離したカビ数は、全部で 384 株であった。この分離カビを、色及び菌糸から 13 のグループに分け、各グループから任意に数株ずつ選び、計 120 株について麴麴を作成後、 α -アミラーゼ・総合糖化力・プロテアーゼ (pH 6.0) を測定した。なお、比較対照菌株として、*Rhizopus oryzae*, *R. javanicus*, *R. arrhizus* の 3 株も同様に製麴後、酵素活性を測定した。 α -アミラーゼの結果を Table 3 に示した。分離株の活性が 300 に近い株は 4 株あり、対照株の最も高い *R. arrhizus* より、4.5 倍も高かった。分離株の 67% は活性が 100 以下であった。総合糖化力の結果を Table 4 に示した。分離株の最高値は 198 で、対照株の最も高い *R. arrhizus* よりも 2.8 倍高かった。分離株の 61% は活性が 51~100 であった。プロテアーゼ (pH 6.0) の結果を Table 5 に示した。分離株の最高値は 382 で、対照株の最も高い *R. oryzae* よりも 3.2 倍高かった。分離株の 68% は活性が 100 以下であった。

アルコール製造においては、原料が米の場合は、デンプンを糖化する酵素は不可欠である。 α -アミラーゼや

Table 3 α -amylase activity of the molds isolated from various Chinese Koji.

α -amylase activity	Total number of isolate
300 to 201	12 (10.0%)
200 to 101	28 (23.3%)
Below 100	80 (66.7%)

Standard strains: *Rhizopus oryzae* 40, *Rhizopus javanicus* 27, *Rhizopus arrhizus* 67

Table 4 Saccharifying ability of the molds isolated from various Chinese Koji.

Saccharifying ability	Total number of isolate
198 to 101	10 (8.3%)
100 to 51	73 (60.8%)
Below 50	37 (30.8%)

Standard strains: *Rhizopus oryzae* 20, *Rhizopus javanicus* 36, *Rhizopus arrhizus* 72

Table 5 Protease activity of the molds isolated from various Chinese Koji.

Protease activity (pH 6.0)	Total number of isolate
382 to 301	6 (5.0%)
300 to 201	6 (5.0%)
200 to 101	27 (22.5%)
Below 101	81 (67.5%)

Standard strains: *Rhizopus oryzae* 120, *Rhizopus javanicus* 30, *Rhizopus arrhizus* 64

総合糖化力の活性は全体的に低い、これらの曲は原料の糖化に、重要な役割を果たしているものと思われる。

3. カビの同定

カビの酵素力試験において、 α -アミラーゼと総合糖化力の活性が高かった 19 株に対して同定を行った。Table 6 に 19 株の α -アミラーゼと総合糖化力の活性と、仮根の有無について示した。仮根については 14 株に着色がみられ、生育が速く、ほふく枝、胞子のうを形成していることより、*Rhizopus* 属と思われた。分離株の No.9-1-13-2-13-9-16-1-17-1 の 5 株は、生育が速やかで、菌糸の状態は *Mucor* 属のようであったが、胞子のうが特異的で *Mucor* 属や *Rhizopus* 属とは異なる分節胞子のうを形成しており、*Syncephalastrum racemosum* と同定した。次に最高生育温度により、*Rhizopus* 属を 3 グループに分け、その結果を Table 7 に示した。

Table 6 Characteristics of molds isolated from various Chinese Koji.

Sample and strain No.	α -amylase activity	Saccharifying ability	Rhizoids
6-2	182	105	+
7-2	194	84	+
9-1	167	98	-
10-2	128	138	+
12-1	259	198	+
12-2	140	96	+
13-2	208	68	-
13-9	218	88	-
14-2	165	86	+
15-3	179	124	+
15-4	197	108	+
15-7	211	118	+
15-8	287	154	+
16-1	300	126	-
17-1	296	126	-
18-1	296	132	+
22-1	206	60	+
22-4	203	86	+
22-8	226	100	+

Table 7 Identification of *Rhizopus* strains based on their growth temperature.

Sample and strain No.	35°C	40°C	45°C	Identified <i>Rhizopus</i> group
6-2	+	+	-	<i>R. oryzae</i>
7-2	+	+	+	<i>R. microsporus</i> -group
10-2	+	+	-	<i>R. oryzae</i>
12-1	+	+	-	<i>R. oryzae</i>
12-2	+	-	-	<i>R. stolonifer</i> -group
14-2	+	+	+	<i>R. microsporus</i> -group
15-3	+	-	-	<i>R. stolonifer</i> -group
15-4	+	+	-	<i>R. oryzae</i>
15-7	+	+	-	<i>R. oryzae</i>
15-8	+	+	-	<i>R. oryzae</i>
18-1	+	-	-	<i>R. stolonifer</i> -group
22-1	+	+	+	<i>R. microsporus</i> -group
22-4	+	+	+	<i>R. microsporus</i> -group
22-8	+	+	+	<i>R. microsporus</i> -group

Table 8 Identification of *Rhizopus stolonifer*-group.

Sample and strain No.	Zygospores	Sporangiospores	Species
12-2	—	partly recurved	<i>R. stolonifer</i> var. <i>lyococcus</i>
15-3	—	erect	<i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>
18-1	—	erect	<i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>

Table 9 Identification of *Rhizopus microsporus*-group.

Sample and strain No.	Zygospores	Sporangiospores	Colony size (mm)*	Species
7-2	—	globose	10	<i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
14-2	—	globose	10	<i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
22-1	—	globose	10	<i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
22-4	—	globose	10	<i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
22-8	—	ellipsoidal	21	<i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>

* Incubated at 50°C for 120 hrs.

生育温度により、45°C 以上で生育した5株を *R. microsporus*-group とし、36°C 以上で生育し 45°C で生育しなかった6株を、*R. oryzae* とし、36°C で生育しなかった3株を *R. stolonifer*-group とした。さらに、*R. stolonifer*-group と *R. microsporus*-group は種の同定を行った。その結果、*R. stolonifer*-group については、Table 8 より No. 12-2 株は接合胞子を形成せず、胞子のう柄が反っていることより、*R. stolonifer* var. *lyococcus* とした。また、No. 15-3 と 18-1 株は接合胞子を形成せず、胞子のう柄が直立していることより、*R. stolonifer* var. *lyococcus* と同定した。次に *R. microsporus*-group については、Table 9 より No. 22-8 株は接合胞子を形成せず、胞子のう胞子が楕円形をしていることより、*R. microsporus* var. *microsporus* と同定した。他の4株は接合胞子を形成せず、胞子のう胞子が円形で、50°C で 120 時間培養でのコロニーの生育が、10 mm であったので、*R. microsporus* var. *oligosporus* と同定した。

以上の結果より、中国曲に含まれる主要なカビは、*Rhizopus* 属であった。中国の曲については前述のように、穀物原料に無蒸煮のまま水を加えて練り、自然界からの微生物が混入して繁殖する。従って原料は生穀粉であり、*Aspergillus* 属などは繁殖しにくく、*Rhizopus* 属が生育するものと思われる。鈴木¹⁾ や大谷²⁾ によると、中国の酒文獻にでてくる曲については、紅酒に用いられる紅曲カビ (*Monascus*) 以外は、そのほとんどが *Rhizopus* 属でいくつかの *Mucor* 属、*Aspergillus* 属がみられると報告している。本実験の供試試料からは、*Mucor* 属と *Aspergillus* 属は検出されなかった。一方、我が国の散麴については、米の蒸煮処理により蛋白質が熱変性を受け、蛋白質分解力の強い *Aspergillus* 属⁷⁾ が容易に繁殖するので、原料の処理法の違いと麴に繁殖するカビの種類が異なることで、餅曲と散麴の特徴が上げられる。

アジア各国には幾つかの麴酒があるが、その特徴は日本を除き、いずれも餅麴を用いることにあり、そこに繁殖する主要なカビは、*Rhizopus* 属⁷⁻⁸⁾ である。中国曲を含めたこれら麴の酒造りへの役割は、*Rhizopus* 属がアミラーゼ系酵素を分泌し、原料の糖化を果たしているものと思われる。

要 約

中国曲 22 試料について、カビ・酵母・乳酸菌数を測定し、カビについては分離株の酵素活性と同定を行った。

1. 微生物菌数を測定した所、カビについては 20 試料より検出され、ほとんどの試料は $10^3 \sim 10^6$ /g であった。酵母については 4 試料より検出され、 $10^6 \sim 10^7$ /g であった。乳酸菌については 19 試料より検出され、 10^6 /g が平均菌数であった。

2. 分離カビの酵素活性を測定し、既知菌株と比較した所、 α -アミラーゼでは 4.5 倍、総合糖化力では 2.8 倍、プロテアーゼ (pH 6.0) では 3.2 倍の高い株がみられたが、全体的に活性は低かった。

3. 分離カビの同定を行った所、ほとんどが *Rhizopus* 属であったが、*Syncephalastrum* 属も同定された。

本研究では、東京農業大学総合研究所プロジェクト研究により行ったものである。

文 献

- 1) 鈴木明治：食品工業，401 (1985)
- 2) 大谷惣助：醸協，68，(6) 423 (1973)
- 3) 大谷惣助：醸協，68，(8) 579 (1973)
- 4) 注解編集委員会編：第3回改正国税庁所定分析法注解，日本醸造協会 (1981)
- 5) 宇田川俊一，室井哲夫：カビの分離・培養と同定，医歯薬出版 (1983)
- 6) M. A. A. SCHIPPER：Studies in Mycology，No. 25 (1984)
- 7) 小泉武夫：麴カビと麴の話，(株)光琳 (1984)
- 8) 緒方浩一，和泉好計：醸協，68，(8) 589 (1973)