中国曲中の微生物について

筆者は中国麴である曲を中国の自由市場で収集し、曲からカビ、酵母、乳酸菌を分離同定した。カビはリゾーブス属菌が主要菌であるが、酵母、乳酸菌も検出された。

本稿は、その曲を用い小仕込試験を行って、もろみ中の微生物の推移に検討を加えた、極めて貴重な解説である。

柳 田 藤 治

はじめに

御承知のように、日本の麴と中国の曲（麴の簡字体）には微生物学的にみて大きな違いがある。日本の麴は、米麴や豆麴、小麦麴のように蒸した原料に種麴を加えて、その表面に麴菌を増殖させた散麴で、そこに使用されているのは *Aspergillus* (麴菌) であるが、これに対し中国の曲は原料の穀類を粉碎してから水でねりかため、これに *Rhizopus* を増殖させた餅麴である。曲をつくるのには粉にした原料を水で練ってかため、練瓦のような塊をつくり、あるいは団子とし、これに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る。麴子と呼ばれるのは、高粱酒（パイカル）の麴で練瓦状で、使用時にはこれを砕いて粉にして用いる¹⁻⁴⁾。

筆者は、1984～1985 年にかけて、中国南部の貴州省、雲南省を訪れる機会があり、この地の自由市場で市販されている曲を収集した。販売されている状態からみると、少数民族や漢民族が自家用用として使っているように考えられた。

ここでは曲より有用菌の分離と、曲が酒造りについてどのような役割をしているかを考えてみることにしよう。

1. 中国曲からの微生物の分離

第 1 表に示すような、中国南部の貴州および雲南省で収集した市販曲、22 試料を用いた。酒麴曲とは水の代りに草根木皮の注出液で練りかため、これにカビや酵母を増殖させたものである。甜酒曲は甘い酒用の曲という意味である。

中国曲より微生物を分離する前に、供試曲の水分を測

定した結果は 12.8～13.7% であった。

22 試料中の中国曲より分離したカビ・酵母・乳酸菌数を第 2 表に示した。2 試料以外からはカビが分離された。カビ菌数の少ないのは試料番号 9, 12 と 14 の 3 試料で、これら菌数の少ないものや、カビの分離されない曲を使った場合には、糖化発酵しない恐れがある。カビ菌数の多いもので $10^8/\text{g}$ で、大部分は $10^3\sim 10^6/\text{g}$ であった。これらの分生子数から考えて、製造中に雑菌が混入する可能性が十分にある。実際には小規模の自家用酒に使用するので問題はないかも知れないが気になる点である。

酵母については 4 試料のみで、 $10^6\sim 10^7/\text{g}$ であった。酵母の分離試料が少ないことから曲が酒造りにおける酵母源とは考えられない。自家用酒製造においては、発酵順調なもろみを少量、新しいもろみに加えることが多いことから、これらが酵母源ではないかと推察される。酵母菌が分離された曲については、後で述べるように 3 試料では *Saccharomyces cerevisiae* 菌群が多く同定されたことから、酵母供給源の一部をなしていると考えられた。また実際の工場においては、雑菌混入や腐造を防ぐ

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 糰	雲南省景洪
6	燒 酒 曲	貴州省雷山	17	甜 酒 曲	雲南省景洪
7	甜 酒 麴	貴州省雷山	18	甜 酒 曲	雲南省景洪
8	糖 化 曲	貴州省雷山	19	甜 汎 曲	雲南省景洪
9	甜 酒 麴	貴州省雷山	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

On Microbes Isolated from Chinese Kojis
Fujiharu YANAGIDA (Department of Brewing and Fermentation)

第2表 中国曲中のカビ・酵母・乳酸菌数(g当たり)

試料 No.	カビ数	酵母数	乳酸菌数
1	4.3×10^6	4.5×10^7	8.0×10^4
2	9.0×10^6		8.0×10^3
3	5.9×10^5		8.0×10^6
4	6.0×10^5		1.5×10^5
5	1.0×10^5		5.1×10^6
6	2.0×10^5		2.5×10^5
7	1.6×10^6		8.0×10^5
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			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		4.0×10^6
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		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		

ために、培養酵母を添加して、アルコール発酵を行わせ、安全発酵を行っている²⁻³⁾。

乳酸菌については3試料を除いて大部分の試料から検出された。菌数の少ないものは $10^3/g$ で、多いものでは $10^{10}/g$ であったが、 $10^6/g$ が平均菌数であった。乳酸菌数の多い曲がカビの菌数が少ない傾向にある。これらの乳酸菌が何に由来するかは甚だ興味のあるところであるが、曲製造中に混入するものと推定される。菌数の多い曲では、もろみ発酵中に乳酸発酵を伴う危険性があり、多くの酒は多酸酒となる傾向にあると考えられる。恐らく短時間発酵で、低アルコール濃度で蒸留して蒸留酒にして飲料に供していると考えられる。

2. カビの酵素力

カビはGYP培地にクロラムフェニコール $100 \mu g/ml$ 添加して菌数測定を行った同培地で⁵⁾、色および菌糸の異なるものを純粋分離し、384株を得た。色および菌糸から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り、 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⁶⁾。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第3表に示した。単位は $U = D_{490}^{40}$ である。分離株のうち、活性が300に近い株が4株あり、対照株のうち最も高い*R. arrhizus*よりも4.5株も高かった。*R. arrhizus*よりも活性の高い分離株が33%以上を占め、 α -アミラーゼ活性は高かった。

第3表 分離カビのアミラーゼ力価

α -アミラーゼ活性	菌株数
300 to 201	12 (10.0%)
200 to 101	28 (23.3%)
Below 100	80 (66.7%)

標準株: *Rhizopus oryzae* 40, *Rhizopus javanicus* 27, *Rhizopus arrhizus* 67

第4表 分離カビの総合糖化力

総合糖化力	菌株数
198 to 101	10 (8.3%)
100 to 51	73 (60.8%)
Below 50	37 (30.8%)

標準株: *Rhizopus oryzae* 20, *Rhizopus javanicus* 36, *Rhizopus arrhizus* 72

第5表 分離カビのタンパク分解力

タンパク分解力 (pH 6.0)	菌株数
382 to 301	6 (5.0%)
300 to 201	6 (5.0%)
200 to 101	27 (22.5%)
Below 101	81 (67.5%)

標準株: *Rhizopus oryzae* 120, *Rhizopus javanicus* 30, *Rhizopus arrhizus* 64

総合糖化力は $U = mg$ グルコース/60分で示した。総合糖化力の結果を第4表に示した。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倍も高い株があった。分離株の61%が*R. arrhizus*の糖化力より高かった。

プロテアーゼ活性(pH 6.0)は $U = \mu g$ チロシン/分で示した。その活性を第5表に示した。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。

酒製造においては、原料であるデンプンを糖化する酵素は不可欠である。分離株においては α -アミラーゼ力価は低く、逆に糖化型アミラーゼ力が高い。実は次に述べる同定試験の結果、酵素力の高いカビは*Rhizopus*属とこれに類似したカビ属であったので、ここでは対照菌として*Rhizopus*属を使った。

3. カビの同定

カビの酵素力試験において、酵素力価の高かった19株を使って同定試験を行った。カビの分離株の同定は宇田川ら⁷⁾の方法に従ったが、*Rhizopus*属についてはM. M. A. SCHIPPER⁸⁾の方法で行った。第6表に供試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。

仮根については供試した19株のうち、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*属と同定した。仮根を有しない5株は、生育が速やかで、菌糸の状態は*Mucor*属

第6表 分離株の酵素力と仮根の有無

試料番号	α -アミラーゼ力	糖化力	仮根の有無
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	+

第7表 生育温度によるリゾプス属の同定

試料番号	35℃	40℃	45℃	リゾプス属
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

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、その結果を第7表に示した。生育温度により45℃以上で生育した5株を *R. microsporus* とし、36℃以上で生育し45℃で生育しなかった6株を *R. oryzae* とし、36℃で生育しなかった3株を *R. stolonifer* と同定した。

R. stolonifer グループは接合胞子形成能、胞子のう柄の着生形成から *R. stolonifer* var. *stolonifer* 2株と *R. stolonifer* var. *lycoccos* に同定された。

R. microsporus グループは接合胞子形成能、胞子のう胞子の形から *R. microsporus* var. *oligosporus* 4株と *R. microsporus* var. *microsporus* 1株に同定された。

中国曲の主要菌が *Rhizopus* 属であることは斉藤⁹⁾、中西¹⁰⁾や山崎ら¹¹⁾により、近年には小泉ら¹²⁾により報告

第8表 分離酵母の形態学的性質

試料番号	形態	栄養体生殖	偽菌糸	菌糸	芽出胞子	胞子の形	皮膜の形成
3-1	球状形～楕円形	多極出芽	+	-	-	+	+
3-2	球状形～円筒形	多極出芽	+	-	-	球状形	-
3-3	卵形	多極出芽	+	+	+	帽子形	-
3-4	卵形～伸長形	多極出芽	+	+	+	-	-
11-1	卵形	多極出芽	+	+	+	帽子形	-
11-2	球状形～円筒形	多極出芽	+	-	-	球状形	-
11-3	卵形と伸長形	多極出芽	+	+	+	+	+
12-1	球状形～円筒形	多極出芽	+	-	-	形状形	-
18-1	卵形	多極出芽	+	+	+	帽子形	-
18-2	球状形～円筒形	多極出芽	+	-	-	球状形	-
18-3	球状形～卵形	多極出芽	+	-	-	+	+

されている。

ここに分離同定された菌群から考察すると、*R. oryzae* は以前ラギーから分離され、デンプン糖化力を有し、*R. stolonifer* は“Chrisese yeast”の主要構成菌として、アルコール飲料の製造に、またアミロ法によるアルコール製造にも用いられている¹³⁾。またインドネシアにおける発酵食品の“Tempeh”の製造にも関与していることが知られている¹⁴⁾。*R. microsporus* も類縁菌である。一方 *Syncephalastrum* はハリシトカビモドキ属と呼ばれ、一種の腐生菌で、日本にも広く分布し、ときには空中雑菌として知られている。これら *Rizopus* 属や *Syncephalastrum* 属の産生する糖化酵素がデンプンの分解に主要な役割を果していることには間違いはない。

斉藤¹⁵⁾は曲中にはジアスターゼの他、インベルターゼ、マルターゼ、ラフィナーゼ、蛋白分解酵素、リパーゼ等が存在するとしている。外池¹⁶⁾は、曲中のアミラーゼとしては、グルコアミラーゼ（アミログルコシダーゼ）や α -アミラーゼから構成されていると考えている。

4. 酵母の同定

第2表に示したように、22試料の中国曲より酵母が検出されたのは、4試料で、菌数はいずれも $10^6 \sim 10^7/g$ であった。菌数測定と同様の培地⁵⁾で、1枚の平板培地に出現しているコロニー数が50以内のものを選び、すべての酵母を純粉分離して同定に供した。4試料から分離した103株を同定した。同定法はThe yeasts(1984)¹⁷⁾に従った。各試料から得られた菌をグループ分けしその形態学的性質を第8表に示した。

真菌糸ならびに出芽胞子を形成するものは5グループあり、その中の3グループは帽子形の子のう胞子が観察された。真菌糸を形成しないものは6グループで、その中の3グループは子のう胞子がみられ、子のう胞子の形は何れも球状であった。皮膜の形成は3グループで認められたが、皮膜を形成したものには子のう胞子はみられなかった。

第9表 分離酵母の生理学的性質（その1）

試料 番号	糖の発酵							糖の資化性													
	G	Ga	Su	Ma	La	Ra	Me	Ga	Su	Ma	La	Ra	Me	St	Rh	Er	Man	Cit	I	No ₃	Ety
3-1	+	-	+	+s	-	+w	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3-2	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-3	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	±	-	-	+w	-	-	-	+w
3-4	+	+s	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+w	+	+	-	-	+
11-1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+s	-	±	-	-	-w	-	-	-	+w
11-2	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-3	+	-	-	-	-	-	-	-	+s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12-1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+s	-	±	-	-	+w	-	-	-	+w
18-2	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-3	+	+	±	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	±	-	+	-	-	-	+

G: グルコース, Ga: ガラクトース, Su: スクロース, Ma: マルトース, La: ラクトース, Ra: ラフィノース, Me: メリビオース, St: 可溶性デンプン, Rh: L-ラムノース, Er: エリスリトール, Man: D-マンニトール, Cit: クエン酸, I: イノシトール, No₃: 硝酸カリ, Ety: エチルアミン塩酸塩

+: 陽性, +w: 弱く陽性, +s: 遅く陽性, -: 陰性, ±: 陽性又は陰性

第10表 分離酵母の生理学的性質（その2）

試料番号	アルブチンの分解	ビタミンフリー培地での生育	50%グルコースでの生成	37℃での生育	100ppmのシクロヘキシミドでの生育
3-1	+	-	-	+	-
3-2	-	-	-	+	-
3-3	-	-	-	+	+
3-4	-	+	-	+	-
11-1	+	-	-	+	+
11-2	-	-	-	+	-
11-3	-	-	-	+	-
12-1	-	-	-	+	-
18-1	+	-	-	+	+
18-2	-	-	-	+	-
18-3	-	-	-	+	-

+: 陽性, -: 陰性

次に生理学的性質を第9表と第10表に示した。

糖類の発酵性については、全グループがグルコースを発酵した。炭素源の資化性は可溶性デンプンを資化するものが、6グループで認められた。窒素源の資化性は3グループが硝酸カリを資化した。アルブチンの分解性は3グループで認められ、ビタミン欠培地では1グループが生育した。50%ブドウ糖培地による生育は全グループが陰性であった。

形態学的性質と生理学的性質から第11表に示すように同定結果を示した²²⁾。

上記の同定結果から酒造りの主要菌株である *Saccharomyces* は4試料から分離されたが、その菌数の全酵母数に対する割合は試料12では100%、11と18の2試料ではそれぞれ27%前後であった。恐らくもろみではアルコール発酵に多いに寄与していると考えられる。しかし、22試料の中国曲のうち酵母を分離できたのは僅か4試料であり、これらの曲より確実にアルコール発酵が行われるとは考えられない。実際には自家用酒製造においては順調な発酵もろみを少量添加しているので、この中の酵母が発酵源と考えられる。

第11表 分離酵母菌の同定

試料番号	種	分離菌数
3-1	<i>Candida fabianil</i>	6/9
3-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1/9
3-3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	1/9
3-4	<i>Pichia burtonii</i>	1/9
11-1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	20/42
11-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11/42
11-3	<i>Saccharomycopsis vini</i>	1/42
12-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12/12
18-1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	27/40
18-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11/40
18-3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	2/40

試料11と18では *S. fibuligera* が分離されているが、タイ国の餅麴であるルックパンやインドネシアのラギーなどの常在菌であり、しかもデンプンの糖化力^{19,19)}が強い。試料11では *S. fibuligera* が71%を占めるので、糖化力として役立っていることが考えられる。特にこの試料ではカビが分離されていないので、非常に興味ある点である。試料18でもこの菌が61%と多い。

試料3の主要酵母である *C. fabianil* は産膜酵母で培養液の臭いが悪く、酒造りには不適当と思われる。

5. 乳酸菌の同定

乳酸菌は菌数測定用の GYP-CaCO₃ 培地⁵⁾で分離し、純粋分離を行い75株を供試した。乳酸菌の同定は東京農業大学乳酸菌同定マニュアル²⁰⁾に従って行い、同定結果を Bergyes Manual (第8版)²¹⁾に照し合せ、各々同定を行った。

75株を *Streptococcus* 属(連鎖球菌), *Pediococcus* 属(四連鎖球菌), *Lactobacillus* 属(桿菌)の3属の配分割合について試験を行い、その結果を第12表に示した。

乳酸菌が認められた19試料のうち、4試料を除くすべてから *Streptococcus* 属がみられ、特に試料6, 13, 16と

第 12 表 形と連鎖による分離乳酸菌の分布

試料番号	分 布 率 (%)		
	球 菌		桿 菌
	連 鎖	四 連 菌	
1	70	30	—
2	100	—	—
3	90	10	—
4	80	20	—
6	100	—	—
7	86	14	—
8	33	67	—
9	40	30	30
10	30	70	—
11	30	70	—
12	—	—	100
13	100	—	—
15	—	—	100
16	100	—	—
17	—	—	100
18	70	30	—
19	100	—	—
20	—	55	45
21	60	—	40

19 の 4 試料は *Streptococcus* 属のみで構成されていた。これらの結果を基に、さらに詳細な同定を行い、その結果を第 13 表に示した²²⁾。*Streptococcus* 属については、何れも pH 9.0 のアルカリ域で良く生育し、L-アラビノースまたはソルビトールを発酵するものを *Str. faecalis*、また L-アラビノースかソルビトールの何れかを発酵できないものを *Str. faecium* と同定した。*Pediococcus* 属については、中温性で中性域を好んで生育することからすべてが *Ped. pentosaceus* と同定した。*Lactobacillus* 属については、*L. casei*、*L. cellobiosus*、*L. brevis*、*L. coprophilus*、*L. viridescens* と *L. salivarlius* が同定された。

以上の結果より、乳酸菌が分離されたほとんどの中国曲から共通して *Sterptococcus* 属が認められた。しかし、*Str. faecalis* や *Str. faecium* は腸内球菌と判断される菌群である。また、これまで *Str. faecalis* や *Str. faecium* が発酵食品の乳酸菌として認められた例はなく、これらの菌種は、曲製造中の汚染菌と思われる。次に *Pediococcus* 属や *Lactobacillus* 属は、食品によくみられる乳酸菌であるが、曲から分離されたこれらの菌が、実際の酒造りにおいて仕込直後増殖して、安全発酵 (pH の低下) の役割を担うかについては、現地で仕込まれているもろみを採取し、乳酸菌を分離しこれを比較する必要がある。

日本を除くアジア各国には、餅麴を用いた酒があるが、小崎²³⁾と豊田ら²⁴⁾はフィリピンのブボッド、インドネシアのラギー、タイのルックパンなどの餅麴中の乳酸菌を調べたところ、どの餅麴にも *Ped. pentosaceus* し

第 13 表 分離乳酸菌の同定

試料番号	種	試料番号	種
1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	11	<i>Ped. peotosaceus</i>
	<i>Streptococcus faecium</i>		<i>Str. faecium</i>
2	<i>Str. faecium</i>	12	<i>L. cellobiosus</i>
	<i>Str. faecalis</i>		<i>L. brevis</i>
3	<i>Ped. pentosaceus</i>		<i>L. coprophilus</i>
	<i>Str. faecium</i>		<i>L. viridescens</i>
4	<i>Str. faecium</i>	13	<i>Str. faecium</i>
	<i>Ped. pentosaceus</i>	15	<i>L. coprophilus</i>
6	<i>Ssr. faecium</i>	16	<i>Str. faecium</i>
7	<i>Str. faecalis</i>		<i>Str. faecalis</i>
	<i>Ped. pentosaceus</i>	17	<i>L. coprophilus</i>
8	<i>Ped. pentosaceus</i>	18	<i>Str. faecium</i>
	<i>Str. faecium</i>		<i>Ped. pentosaceus</i>
9	<i>Str. faecalis</i>	19	<i>Str. faecium</i>
	<i>Ped. pentosaceus</i>	20	<i>Ped. pentosaceus</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>		<i>L. salivarlius</i>
10	<i>Ped. pentosaceus</i>	21	<i>Str. faecium</i>
	<i>Str. faecium</i>		<i>L. coprophilus</i>

第 14 表 使用した曲のカビ、酵母数と酵素力

試料番号	カビ数	酵 母 数	α -アミラーゼ	総合糖化力
23	4.4×10^2	3.8×10^5	7.2	24.0
24	3.0×10^4		37.4	56.0
25	未検出		29.3	32.0

と乾燥 (低水分活性値)、その後の高温多湿の環境下の保存が *Pediococcus* 属菌種を選択したと報告している。

6. 曲を用いた酒小仕込試験

上記の分離菌らの酒造りでの役割を解明するために小仕込試験と製造中の菌のフローラを追跡した。

6-1 菌の分離と酵素力について

上記の曲試料は少量で、仕込に使えなかったのも、新たに 1986 年陝西省西安市場で購入した曲 3 試料を用いた。ただ外観からして相当に古い曲で、品質的には良質のものではなかった。No. 23 は甜酒薬精、No. 24 は淀縮甜酒薬、No. 25 は甜酒曲の 3 点である。

カビ数、その酵素力と酵母数を第 14 表に示した。カビ数も先の試料に比べて少なく、試料 25 からは検出されなかった。酵母は試料 23 の試料のみから検出された。酵素力価も先の試料に比べて低い部類に属していると考えられる。さらに分離カビならびに酵母の同定を行った。酵母は *S. fibuligera* 1 種のみであった。カビの同定結果を第 15 表に示す。

今回の曲は、各試料に *Mucor* sp. が 1 株ずつ分離された以外はほとんどが *Rhizopus* 属であった。特に試料 24 の曲では *R. oryzae* が主要菌であった。

6-2 酒小仕込試験

米は糯米を使用し、一夜浸漬後、蒸して冷却後、仕込を行った。曲の添加量は各曲の一袋をすべて使用して

第 15 表 同定カビ名とその割合

試料番号	菌名	割合
23	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	2/9
	<i>Rhizopus oryzae</i>	2/9
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	1/9
	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>lyococcus</i>	2/9
	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	1/9
	<i>Mucor</i> sp.	1/9
24	<i>Rhizopus oryzae</i>	8/10
	<i>Mucor</i> sp.	1/10
	未同定	1/10

第 16 表 仕込配合

仕込	1	2	3	4	5	6	7	8
原料								
蒸米 (kg)	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
曲名	No. 23	No. 24	No. 25	No. 23	No. 24	No. 25	No. 23	No. 24
曲量 (g)	11.74	2.86	3.37	12.11	2.46	3.37	12.08	2.46
汲水 (l)	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.56	1.56

第 17 表 酸 度

仕込	1	2	3	4	5	6	7	8
日数								
3	3.4	2.8	0.8	4.9	3.0	1.8	3.6	4.1
6	6.8	10.6	1.3	5.4	7.1	6.5	8.9	8.9
9	9.0	15.1	5.4	5.7	7.5	15.4	11.2	10.8
12	10.4	17.0	6.6	6.1	7.7	18.7	12.8	10.6
19	11.2	16.0	5.8	6.5	8.3	11.4	12.6	12.4

酸度：滴定酸度

いるので、曲によりその量は異なっている。仕込配合を第 16 表に示した。

仕込 1~3 を標準仕込とし、仕込 4~6 は標準仕込にさらに *S. cerevisiae* IFO 0233 (Rasse II) を 10^2 /ml 添加してその影響をみた。仕込 7~8 は汲水量を米の 120% と伸して使用した。

実際の中国における仕込は固形仕込で、小量仕込から拡大仕込を行う方法を採用するので本仕込法とは異なる。

仕込中の成分変化を調べた。第 17 表に酸度を示した。

一般的に高い値を示し、酵母を添加した仕込 4 と 5 においては、酵母無添加の仕込 1 と 2 と比べるとその量は半量以下で、ある程度発酵は正常に行われたと思われる。その一つの原因は、酵母添加によりアルコール生成が急速に進み、主要な生酸菌である乳酸菌の増殖が抑えられたためと思われる。加水量を多くしたもろみのそれ

第 18 表 糖 分

仕込	1	2	3	4	5	6	7	8
日数								
3	18.3	17.3	8.3	3.6	0.2	0.6	6.1	10.7
6	23.1	23.7	14.6	1.7	0.6	1.4	13.3	18.9
9	20.2	21.1	12.3	3.0	2.1	1.8	13.1	15.7
12	18.8	19.0	10.2	3.4	3.2	2.2	10.5	10.3
19	15.3	18.7	8.3	5.8	4.9	3.7	10.0	10.4

糖分：%

第 19 表 アルコール

仕込	1	2	3	4	5	6	7	8
日数								
3	1.1	1.1	1.4	8.5	4.2	0.6	0.9	1.2
6	3.0	1.7	1.8	15.5	12.6	0.9	1.5	1.5
9	4.0	3.5	2.0	12.6	13.5	2.7	3.8	3.8
12	4.6	4.3	2.0	10.6	11.7	2.0	3.7	3.7
19	7.3	3.9	1.4	7.8	10.8	1.3	4.4	6.4
発酵歩合 (%)	28.5	16.3	7.8	60.7	52.6	10.4	18.9	27.4

アルコール：(%)

は、標準仕込のものと変らなかった。糖分の変化を第 18 表に示した。

直糖はアルコール生成と直接関係するが、標準仕込においてはアルコール発酵が弱く、従って残糖が多かった。酵母を添加した仕込は、カビが分離されなかった 6 仕込を除いては正常に発酵したと考えられる。

アルコールの生成を第 19 表に示した。標準仕込はアルコール発酵は遅く、その生成量も低かった。試料 25 の曲を使用した仕込は、糖化が行われなために発酵はほとんど行われず香りも悪かった。標準仕込に酵母を添加した仕込はアルコール生成も高かった。仕込 6 は標準仕込 3 と同様に曲が糖化源として働かないためアルコールの生成が行われなかった。発酵歩合も仕込 4 と 5 で 60% 前後と非常に低い。曲では発酵順調なもろみを加えると言われるが、このことが実証されたことになる。

6-3 もろみ中の微生物の変化

もろみ中のカビの推移を第 20 表に示した。カビが検出されなかった試料 25 の曲を用いた仕込 3 と 6 の仕込においては、仕込期間を通じてカビは検出されなかった。他の仕込においては、仕込直後にカビの増殖がみられ、仕込 7 を除く仕込では 7 日以内にカビは死滅し以後は検出されなかった。この現象から、カビは仕込直後に増殖し、原料の糖化に関与していると推定される。

曲を加えて米酒を仕込、もろみ中の酵母数の推移を

第 20 表 もろみ中のカビの推移

仕込	1	2	3	4	5	6	7	8
日数								
1	7.3×10^3	4.0×10^4	0	3.3×10^4	0	0	2.6×10^3	0
3	6.0×10^4	2.0×10^3	0	2.3×10^3	3.0×10^3	0	3.3×10^3	1.0×10^3
5	0	0	0	0	1.3×10^3	0	2.0×10^4	0
7	0	0	0	0	0	0	5.0×10^2	0

菌数：1 g 中

第 1 図 もろみ中の酵母数の推移

調べた結果を第 1 図に示した。仕込後 4 日目には、すべてのもろみにおいて酵母の顕著な増殖がみられ、8 日目までに $1.4 \times 10^7 \sim 2.7 \times 10^7/\text{ml}$ まで増殖した。仕込 2 では、他のもろみに比べて増殖開始時期が 1 日早かったが、3 種のもろみにおける酵母の増殖パターンはほぼ一致していた。仕込後 8 日目のもろみより主要な酵母を分離し、分離株を同定した結果を第 21 表に示した。

仕込 1 のもろみ中の 4 株はすべて *Candida krusei*、仕込 2 のもろみ中の 3 株、および仕込 3 もろみ中の 2 株はすべて *C. tropicalis* であった。試料 23 には *S. fibuligera* が $3.8 \times 10^5/\text{g}$ 含まれていたが、もろみでの増殖は認められなかった。

もろみ中から分離された酵母 3 種を、グルコース濃度 10% に調整した Wickerham の合成培地 (pH 5.0) でアルコール発酵を 7 日間行った。その結果を第 22 表に示した。

C. tropicalis は 54~63% と発酵歩合は高かったが *C. krusei* は低かった。両 *Candida* 属の酵母はアルコール発酵したが、もろみはエステル臭が強く、香りはよくなかった。

標準仕込に酵母を添加した仕込 4~6 のもろみ中の乳酸菌の推移を 20 日間にわたり調べた。その結果を第 2 図に示した。

第 21 表 もろみ中から分離した酵母の同定

仕込番号	菌 株	種
1	23w-1	<i>Candida krusei</i>
	23w-2	<i>Candida krusei</i>
	23w-3	<i>Candida krusei</i>
	23w-4	<i>Candida krusei</i>
2	24w-1	<i>Candida tropicalis</i>
	24w-2	<i>Candida tropicalis</i>
	24w-3	<i>Candida tropicalis</i>
3	25w-1	<i>Candida tropicalis</i>
	25w-2	<i>Candida tropicalis</i>

第 2 図 もろみ中の乳酸菌の推移

仕込 4 では、表面生育細菌が発生して、乳酸菌の正確な菌数変化を追跡できなかった。仕込 5 と 6 では、仕込後 2 日目で $\times 10^7$ オーダーに達した。その後、仕込 5 は同じオーダーの菌数で維持し、仕込 5 では 5 日目ごろから菌数が減少しはじめる。ここで生育した乳酸菌は *Lactobacillus brevis* や *Lactobacillus casei* であった。

本小仕込試験においては、曲自体に多く棲息していた *Streptococcus* 属菌種の増殖は見られなかった。その代りに食品微生物として安全とされている *Lactobacillus* 属菌種が多く認められた。曲に見られた *Streptococcus* 属菌種は、酵母によるアルコール発酵で、生成したアルコールにより増殖できなかったものと考えられる。

7. ま と め

25 の曲試料から分離されたカビは *Rhizopus* 属が主要な菌で、*Aspergillus* 属は全然検出されず *Mucor* 属も僅かに数株であった。これらの菌の酵素力はグルコアミラーゼと α -アミラーゼから構成され、デンプンの糖化に関与していると考えられる。これらの糖化酵素の性質については更に詳しく検討すれば、新規酵素の開発に繋がるものと思われる。酵母を含む曲は数株に過ぎなかったが、主要な菌は *S. cerevisiae* であるので、アルコール発酵にかかわっていると考えられる。また *S. fibuligera* が分離されたが、その糖化力もカビの糖化酵素と同じく働くことが推察される。また大部分の曲から乳酸菌が分離され、その菌がもろみの初期に増殖し、その酸が pH を下げて安全発酵に役立っているのか、あるいは多酸酒に導くのかは今後の研究に待ちたい。ただ *Streptococcus*

第 22 表 もろみ分離酵母の発酵歩合

菌 株	アルコール (%)	残 糖 (%)	発酵歩合
23w-1 (<i>Candida krusei</i>)	2.0	5.12	32.4
24w-1 (<i>Candida tropicalis</i>)	3.4	1.82	54.2
25w-1 (<i>Candida tropicalis</i>)	3.9	2.36	63.2

属が多く分離される曲は、これらが腸内球菌であることから衛生上の問題が残る。

曲を使った小仕込試験の結果、*S. fibuligera* が主要菌の曲を使ったもろみからはまったく性質の違う *C. tropicalis* と *C. krusei* しか分離されなかったことは興味深い。乳酸菌も小仕込もろみ中からは、*L. brevis* や *L. casei* が分離され、衛生上問題の多い *Streptococcus* 属の菌が検出されなかったことは、これらの菌が酒製造中に死滅すると考えられる。

曲中の微生物については、今後多くの問題を残しているが、実際の仕込と関連して解明する必要がある。

(東京農業大学醸造学科)

文 献

- 1) 外池良三：食の科学，No. 47，39 (1979)
- 2) 鈴木明治：食品工業，401 (1985)
- 3) 大谷惣助：醸協，68，(6) 423 (1973)
- 4) 大谷惣助：醸協，68，(8) 579 (1973)
- 5) 小泉幸道，館 博，村清司，岡田早苗，新村洋一，柳田藤治：醸協，84，(5) 341 (1989)
- 6) 注解編集委員会：第3回改定国税庁所定分析法注解，日本醸造協会 (1981)
- 7) 宇田川俊一，室井哲夫：カビの分離・培養と同一，医歯薬出版 (1983)
- 8) M. A. A. SCHIPPER：Studies in Mycology，No. 25 (1984)
- 9) 斉藤賢道：満鉄中試報告，第二輯，(1914)
- 10) 長西広輔：満鉄中試報告，第六輯 (1917)
- 11) 山崎百治：農学会報，153 (1918)
- 12) 小泉武夫，鈴木昌治，竹本葉子，野白喜久雄：発酵工学会昭和 60 年大会要旨集，p. 50 (1985)
- 13) T. INUI *et al.*：J. Gen. Appl. Microbiol., Suppl., 11, 1 (1965)
- 14) C. W. HESSELTINE：Mycologia，57，1 (1965)
- 15) 斉藤賢道：満鉄中試報告，第六輯，(1917)
- 16) 外池良三：食の科学，No. 47，13 (1979)
- 17) M. J. W. KREGER-VAN RIZ (ed.)："The Yeasts, A Taxonomic Study", Third revised and enlarged edition, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1984)
- 18) J. SUKHUMAVASI, K. KATO & T. HARADA：J. Ferment. Technol., 53, 559 (1975)
- 19) K. KATO, K. KUSWANTO, I. BANNO & T. HARADA：J. Ferment. Technol., 54, 831 (1976)
- 20) 東京農業大学微生物学研究室，(未発表)
- 21) M. ROGOSA：Bergeys Manual of Determinative Bacteriology", (R. E. BUCHANAN, N. E. GIBBONS), 8th ed. 576, The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 22) 村 清司，岡田早苗，小泉幸道，館 博，新村洋一，柳田藤治：(醸協) 84，(5) 345 (1989)
- 23) M. KOZAKI：Fermented food and related microorganisms in southeast Asia., J. A. Mycotoxiconology, 2, 1 (1976)
- 24) 豊田 泰，小崎道雄：東京農業大学農学集報，特別号，16 (1979)
- 25) 澄川好子，内村 泰，岡田早苗，小原直弘，小崎道雄：凍結及び乾燥研究会会誌，30，7 (1984)