中国曲の微生物相と酵素活性

横山直行*・田中一良**・杜連祥***・荒巻功
木崎康造・小林信也・岡崎直人
(国税庁醸造試験所・***中国天津軽工業学院)

平成5年7月30日受理

Microflora and Enzyme Activities of Chinese *Qu*

Naoyuki YOKOYAMA*, Kazuyoshi TANAKA**, Lianxing DU***, Isao ARAMAKI,
Yasuzo KIZAKI, Shin-ya KOBAYASHI and Naoto OKAZAKI
(National Research Institute of Brewing, 2-6-30, Takinogawa, Kita-ku,
Tokyo, 114; ** Tianjin Institute of Light Industry,
1038 Dagu Nanlu, Tianjin, P. R. China)

Microflora, enzyme activities and components of Chinese *Qu*, which has been used as the starter for the traditional Chinese liquor making, were studied. Results were as follows:

1. There were several layers on a cutting section of *Qu*. Fungi (except yeast) were present in large numbers in the second and third layer, but a few in the first (surface) and center layer. Yeasts were present in large numbers in the second layer. Enzyme activities were the highest in the fourth layer. Comparing the activities with those of koji made by *A. oryzae*, α -amylase was lower, glucoamylase was slightly lower, acid-proteinase was the same and acid-carboxypeptidase was lower.

2. The content of lactic acid in *Qu* was the largest in the first and second layer and reached 1~2 weight % of *Qu*. The ethyl alcohol content was the largest in the second layer, in agreement with the distribution of the organisms.

3. Many *Absidia* were identified from *Qu* contrary to former reports that fungi separated in *Qu* were mainly *Rhizopus*.

4. We were able to reappear the Chinese *Qu* by *Qu*-making experimentally which had a same layer construction.

Key words: 曲・アブシディア・麴・酵素

緒 言

中国で広く酒類製造に用いられている曲(麴の簡略字体)は、穀類を粉碎し無蒸煮のまま、適当量の水を加えて成形し、自然界の微生物または既成の曲をスターターとして混和して製造されている。日本古来の麴が、蒸米にカビを生育させた散麴であるのに対し、中国曲は餅麴という独特な形態を有する。

曲は原料である穀物の種類等により細かく分類され、大曲、夫曲、酒糟曲、小曲、紅曲等がある¹⁾。

曲の主要微生物(糸状菌)は古くは齊藤²⁾、山崎³⁾、最

近では小泉ら⁴⁾、柳田ら⁵⁾の研究によっても *Rhizopus* 属であると報告されているが、曲は穀類を蒸さずに自然に近い状態で製造されているところから、新たな有用醸造微生物が存在する可能性が考えられた。そこで、中国天津市の製造場から曲を入手し開始した。入手した曲(以後、中国曲とする)は麦を主原料とする大曲で、その切断面に色や硬度の異なる層状の構造が見られたことから、この層状構造ごとの微生物相を明らかにするとともに、酵素活性等との関係を検討したので報告する。また、曲を製造し層状構造ができることを確認した。

* 現在 仙台国税局鑑定官室

** 現在 田中酒造(株)

Table 1 Ratio (weight %) of raw materials used in *Qu* making.

Material	Barley (meal)	Barley (whole)	Barley bran	Wheat (meal)	Wheat (whole)	Broad bean (meal)	Azuki bean (meal)	Total
(%)	35	1	24	9.5	0.5	25	5	100

45 weight % of water was added to total raw material. The meal material was cracked 1~2 mm in size.

実験方法

1. 試料

中国曲は平成3年に中国河北省天津市の酒類製造場から入手した。その切断面に層状構造が見られたので着色や硬度の違いによって切り出し5区分に分画し試料とした。また、試験製造した曲も層状構造が認められたので、同様な処理を行った。得られた分画試料5gを滅菌水(0.01%-Tween 80 水溶液) 50 ml に懸濁し、段階的に希釈して懸濁液を調製した。

2. 糸状菌の分離

懸濁液 0.1 ml を 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 0.01%, プロピオン酸ナトリウム 0.25%, 寒天 2.0%, pH 6.8) に接種し, 30°C で2日間平板培養を行い糸状菌数を測定するとともに, 生育した糸状菌のコロニーを釣菌した。さらに, 平板培養を繰り返し純粋分離を行った。

3. 酵母及び細菌数の測定

懸濁液 0.1 ml を YM 寒天培地(ブドウ糖 1.0%, 酵母エキス 0.3%, ポリペプトン 0.5%, 麦芽エキス 0.3%, クロラムフェニコール 0.005%, プロピオン酸ナトリウム 0.25%, 寒天 1.5%, pH 5.8) に接種し, 25°C で3日間平面培養を行い生育する酵母数を測定した。

細菌数は, 懸濁液 0.1 ml を BCG 培地(ブドウ糖 2.5%, 酵母エキス 1.0%, ポリペプトン 0.5%, 硫酸マグネシウム 0.01%, 硫酸マンガン 2.5 ppm, 硫酸第一鉄 2.5 ppm, アクチジチオン 5 ppm, アジ化ナトリウム 50 ppm, ブロムクレゾールグリーン 10 ppm, 寒天 2.0%, pH 6.8) に接種し, 2.0% の寒天(アジ化ナトリウム 50 ppm を含む)を重層後, 30°C で3日間平面培養を行い測定した。

4. 中国曲の成分分析及び酵素活性の測定

分画試料 1 g に蒸留水 100 ml を加え, 5°C で18時間攪拌抽出し, 濾過後, 濾液の酸度, pH, アルコール分を測定した。有機酸及びアミノ酸組成は, 濾液をスルフォサリチル酸による脱タンパク後, 昭和電工社製 Shodex-LC-ST 3 型有機酸分析計及び日立製社 835 型高速アミノ酸分析装置を用いてそれぞれ分析した。

酵素活性は国税庁所定分析法⁹⁾に従い, 曲分画試料から 5°C で18時間抽出した酵素抽出液を用い, α -アミラ

ーゼ (pH 3.5, 5.0), グルコアミラーゼ (pH 5.0), 酸性プロテアーゼ (pH 3.0) 及び酸性カルボキシルペプチダーゼ (pH 3.0) を測定した。

5. 糸状菌の分類

純粋分離した糸状菌については, 宇田川⁷⁾らの方法に従い分類した。さらに, 同一属に分類された菌に関しては, コロニーの色や形状を基準に細分類を行った。

6. 中国曲の試験製造

中国曲を実験室的に製造するため, Table 1 に示した原材料(穀類), 水, 及び, スターターとして粉碎中国曲を混合後, 晒し布を敷いた長辺 22 cm, 短辺 15 cm, 高さ 6 cm の直方体の型に入れ, 押し固めてレンガ状に成形した。成形物を取り出し, 晒し布ごと 30°C, 相対湿度 80% の恒温恒湿機中で 30 日間培養した。

実験結果及び考察

1. 曲の層別微生物相

中国曲の断面は5層を呈しており, 曲の表面から内側に向かって第1~5層とした。それぞれの層の特徴は, 第1層は穀類の砕粒または粒の原形を残しており, 第2層は穀類粒がくずれかなり硬く, 灰色をしている。第3層は穀物粒は原形をほとんど残しておらずやや硬く, 白い。第4層は褐色で比較的軟らかく穀物粒は原形を止めていない。第5層は白くて比較的軟らかく, 穀物粒はほとんど原形を止めていなかった。

各層ごとの糸状菌, 酵母, 細菌数を Table 2 に示した。糸状菌は表面の第1層で最も少なく, 第2, 3層が多かった。また, 中心の第4, 5層では第2, 3層に比べ数分の一であった。

Table 2 Numbers of viable cells in each fraction of Chinese *Qu*. (cell numbers/g *Qu*)

No. of layer	Mold	Yeast	Bacteria
1	1.9×10^6	4.1×10^6	11×10^6
2	77×10^3	23×10^6	3.1×10^6
3	93×10^6	2.0×10^6	0.5×10^6
4	32×10^6	0.2×10^6	3.0×10^6
5	22×10^6	1.3×10^6	1.9×10^6

Chinese *Qu* was fractionated by its color and hardness. Each fraction was named first layer to fifth layer toward the surface to the inside of *Qu*.

酵母は第2層が最も多く、その他の層では少なく、表層から中心層に向かって減少する傾向があった。

細菌は第1層で多く内部の層に行くに従って少なくなる傾向があった。

以上のように、中国曲の各層で微生物相が異なっていることが認められ、初発菌相は均一であったのが、曲表面からの水分の揮散、表面と内部の品温及び酸素濃度の変化等によって微生物相に変化が生じたと考えられる。

2. 曲の層別酵素活性

中国曲の層別酵素活性を Table 3 に示した。表層に比べ内層の方が酵素活性は高く、褐色を呈していた第4層がすべての酵素活性について最も高かった。しかし、Table 2 に示した糸状菌の分布とは一致しなかった。

田中ら⁹⁾は、曲様の培地上に *Aspergillus oryzae* 及び *Rhizopus* 属を純粋培養して酵素活性を比較している。その結果と比較すると、中国曲は、*A. oryzae* の酵素生成に比べ、 α -アミラーゼ活性がかなり低く、グルコアミラーゼ活性はやや低く、酸性プロテアーゼは同等、酸性カルボキシペプチダーゼは低かった。一方、中国曲と *Rhizopus* 属に関しては、類似した酵素組成を示したが、幾分グルコアミラーゼ活性及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性が高かった。

また、山崎らは、中国各地から集めた曲類から分離した糸状菌 *Rhizopus* 属⁹⁾、*Aspergillus* 属¹⁰⁾、*Mucor* 属¹¹⁾、*Absidia* 属¹²⁾の醗酵化学的作用を検討するため、もち米に培養し、総酸、アミノ酸、還元糖等の生成を比較し、*Aspergillus* 属は糖化力が強く、エチルアルコール生産は *Rhizopus* 属が多く、*Absidia* 属はいずれも少ない結果を報告している。このことから *Absidia* 属の酵素活性は高くはないと考えられるが、中国曲の第3、4層に見られる酵素活性は、微生物相から見て *Absidia* によるものと考えられること、中国曲の酵素活性は *Rhizopus* 属の酵素活性と類似していること等から、今後、純粋分離した *Absidia* 属を用いた製麴試験によって酵素活性の程度を確認する予定である。

Table 3 Enzyme activities of each layer fractionated from *Qu*. (unit/g *Qu*)

No. of layer	AAase (pH 5.0)	Acid-AAase (pH 3.5)	GAase (pH 5.0)	APase (pH 3.0)	ACPase (pH 3.0)
1	66	62	70	2,260	6,110
2	363	211	462	10,200	12,100
3	234	259	602	11,500	11,000
4	434	276	1,620	29,300	19,100
5	282	234	565	10,900	7,030

AAase: α -amylase, Acid-AAase: acid- α -amylase, GAase: glucoamylase, APase: acid-protenase, ACPase: acid-carboxypeptidase.

3. 中国曲の層別成分

Table 4 に示したとおり、水分は7~10%で曲表面からの水分の揮散のため表層が少なかった。

エチルアルコールは第2層が多く、Table 2 の微生物分布で酵母が第2層で多いことと一致した。

有機酸は乳酸が第1、2層に多く、それぞれ曲重量の1%及び2%含まれていた。これらの層では、細菌(第1層)及び酵母(第2層)が多かった。また、リンゴ酸、ピログルタミン酸は反対に表層から内層に行くほど増加しており、微生物分布とは一致しなかった。また、有機酸は塩の形で存在しているためか、各相のpHはほぼ中性を示した。

層別のアミノ酸組成を Table 5 に示した。総アミノ酸量は、第1層で少なく、内部に向かって増加し、第4層が最も多かった。層別のアミノ酸量とタンパク質分解酵素の活性の強さは、比例関係にあった。

個々のアミノ酸では、第2、3層でヒドロキシアミノ酸であるスレオニンやセリンが多く、第4層とは異なる組成を示した。

4. 曲から分離した糸状菌の分類

純粋培養した糸状菌について、コロニーの色、菌糸の隔壁の有無、接合胞子、輪生状胞子嚢、仮根の有無及び仮根の位置を基準に分類し、その結果を Table 6 に示した。分離された糸状菌は *Aspergillus oryzae* 9株、*As-*

Table 4 Components of each layer fractionated from *Qu*.

No. of layer	Water content (%)	Ethylalcohol in <i>Qu</i> (%)	Extract*		Organic acid (mg/g <i>Qu</i>)				
			Acidity	pH	La	Ma	Su	Ac	P-G
1	7.2	0.021	0.66	6.4	10.7	0.60	0.14	0.51	1.07
2	8.4	0.160	0.60	6.5	20.1	0.05	0.18	1.26	0.39
3	8.1	0.019	0.40	6.7	2.76	1.30	0.23	0.53	1.29
4	9.9	0.006	0.98	6.6	4.84	4.68	0.65	0.42	4.50
5	9.3	0.002	0.40	6.8	1.89	4.99	0.41	0.37	5.71

* 1g of *Qu* was extracted by 100 ml of water. Acidity was shown by the volume number (ml) of 0.1N NaOH titration to the 10 ml of extract.

La: Lactic acid, Ma: Malic acid, Su: Succinic acid, Ac: Acetic acid, P-G: Pyroglutamic acid.

Table 5 Amino acid components of each layer fractionated from *Qu*. (mg/g *Qu*)

Amino acid	No. of layer				
	1	2	3	4	5
Asp	0.37	0.43	0.58	1.83	1.12
Thr	0.63	5.57	6.24	1.82	2.43
Ser	0.30	1.44	1.72	1.02	0.96
Glu	0.69	2.78	3.84	4.74	2.91
Gly	0.19	0.70	1.00	0.98	0.79
Ala	0.47	1.52	2.65	3.86	1.80
Cys	0.09	0.26	0.45	0.74	0.46
Vla	0.36	1.41	1.84	1.90	1.11
Met	1.14	0.51	0.73	0.63	0.43
Ile	0.23	1.39	1.72	2.18	1.09
Leu	0.42	2.28	2.70	2.16	1.44
Tyr	0.17	1.04	1.44	1.02	0.74
Phe	0.46	2.06	2.53	2.21	1.57
γ -ABA	0.19	0.51	0.55	1.81	0.27
Orn	0.13	0.29	0.43	0.59	0.40
Lys	0.35	0.78	1.28	1.74	1.01
EOHNH ₂	0.05	0.07	0.11	0.16	0.06
NH ₃	0.69	1.49	2.21	3.34	1.59
His	0.21	0.78	1.04	1.03	0.92
Trp	0.21	0.38	0.50	0.58	0.20
Arg	0.15	0.69	0.97	0.94	0.60
Pro	0.81	5.08	8.03	9.91	9.07
Total	7.32	31.43	42.56	45.18	30.96

pergillus niger 14 株, *Monascus* 属 3 株, *Rhizopus* 属 1 株, *Absidia* 属 478 株で, ほとんどが *Absidia* 属であった。

山崎⁹⁾は, 1914 年から 1927 年の 14 年間に 205 種類の曲類を集め糸状菌を分離しているが, 中国曲で最も重要なものは *Rhizopus* 属, ついで *Aspergillus* 属と *Mucor* 属, そして *Absidia* 属であると報告している。ま

た, *Absidia* 属は老酒に用いられている¹³⁾との文献もある。今回の試料曲から分離された糸状菌のほとんどが少数派である *Absidia* 属であったことは, 中国曲の生育糸状菌属が混合物だけではなくかなり純粋で, しかも, 主要菌の *Rhizopus* 属ではないものがある可能性があり, 曲の多様性の一面を知り得た点から興味深い。

酵母については詳細な分類を行っていないが, 内村ら¹⁴⁾, 村ら¹⁵⁾の報告にあるようなデンプン糖化性を有する *Saccharomycopsis fibuligera* と思われる酵母の存在を確認した。

5. 曲の試験製造

試験製造した曲は中国曲同様, その断面が色や硬度の違いにより層状になることを確認した。層は 4 層であった。層別の微生物相と酵素活性を Table 7, 8 に示した。

糸状菌, 酵母等の生育は中国の曲と比較しよくなかったが, 糸状菌は表層に少なく, 第 2 層に多く分布すること, 細菌は表層に多く, 内層に向かって減少したこと等中国曲の微生物分布とよく一致した。

また, 酵素活性は中国曲と比べ全体的に高かったが, 組成的には, α -アミラーゼに比べグルコアミラーゼの活性が高く, タンパク分解酵素活性が強い等, 中国曲の酵素バランスと一致した。

Table 7 Numbers of viable cells in *Qu* made experimentally. (cell numbers/g *Qu*)

No. of layer	Mold	Yeast	Bacteria
1	0.3×10^6	2.0×10^6	2.6×10^6
2	6.7×10^6	0.6×10^6	1.0×10^6
3	1.3×10^6	0.4×10^6	1.0×10^6
4	0.9×10^6	0.1×10^6	0.5×10^6

The fractionation was done as same as in Table 2.

Table 6 Classification of molds isolated from *Qu*.

Classification	Color	Observation of colony					Numbers of mold No. of layer					
		Septum	Zygospore	W.S.*	Rhizoid	Position of rhizoid	1	2	3	4	5	Total
<i>A.oryzae</i>	DY	+	—	—	—		9	0	0	0	0	9
<i>A.niger</i>	B	+	—	—	—		4	7	0	3	0	14
<i>Monascus</i>	R	+	—	—	—		0	0	1	2	0	3
<i>Absidia</i>	GB	—	+	+	+	Mycelia	3	9	3	1	4	20
<i>Absidia</i>	GW	—	+	+	+	Mycelia	85	77	97	98	71	428
<i>Absidia</i>	W	—	+	+	+	Mycelia	4	6	9	9	2	30
<i>Rhizopus</i>	DG	—	+	—	+	Sporangio-phore	0	1	0	0	0	1
							105	100	110	113	77	505

The fractionation was done as same as in Table 2. Color of colony was shown as follows. DY: dark yellow dark, B: black, R: red, GB: gray black, GW: gray white, W: white, DG: dark gray. * W.S. means whorl sporangio-phore.

Table 8 Enzyme activities of each layer fractionated from *Qu* made experimentally.
(unit/g *Qu*)

No. of layer	AAase (pH 5.0)	Acid-AAase (pH 3.5)	GAase (pH 5.0)	APase (pH 3.0)	ACPase (pH 3.0)
1	1,310	862	473	9,610	5,540
2	2,050	1,470	1,700	27,700	15,600
3	691	799	1,570	36,000	11,300
4	274	670	1,600	45,900	12,100

Enzyme activities were shown as same as in Table 3.

本研究は、科学技術庁国際共同研究計画に基づいて、国税庁醸造試験所と中国天津軽工業学院との協力で実施されたものである。

要 約

1. 中国曲の断面は色や硬度の違いによる層状構造を有し、層ごと微生物相及び酵素活性が異なっていた。糸状菌と酵母は表面に少なく、第2層に多かった。細菌は曲表面に多く、内層に向かって減少する傾向にあった。

酵素活性は第4層が高かったが、その酵素組成を麹菌の場合と比較すると、 α -アミラーゼ活性が低く、グルコアミラーゼ活性がやや低く、酸性プロテアーゼは同等、酸性カルボキシンペプチダーゼが低かった。

2. 曲中の有機酸では乳酸が最も多く、第1、2層では曲重量の1~2%に達し、リンゴ酸とピログルタミン酸は曲の内層ほど増加した。エチルアルコールは第2層で多く、微生物分布と一致した。

3. 分離した糸状菌は、曲の主要微生物と言われている *Rhizopus* 属でなく *Absidia* 属であった。

4. 曲試験製造により、中国曲と同様な層状構造を再現できた。

文 献

- 1) 大谷惣助：醸協，68，（6）423（1973）
- 2) 齊藤賢道：満鉄中試報告，第二輯（1914）
- 3) 山崎百治：醸造学雑誌，9，12，84，174，258（1931）
- 4) 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）
- 5) 柳田藤治：醸協，85，（2）82（1990）
- 6) 第4回改正 国税庁所定分析法注解：注解編集委員会編，（財）日本醸造協会（1993）
- 7) DAVID MALLOCH 著，宇田川俊一・室井哲夫訳：カビの分離・培養と同定，医師薬出版（1983）
- 8) 田中利雄，岡崎直人，木谷光伸：醸協，77，（11）831（1982）
- 9) 山崎百治，阿形吉雄：醸造学雑誌，9，397，484（1931）
- 10) 山崎百治，村田 磐：醸造学雑誌，9，634（1931）
- 11) 山崎百治，柏倉俊彌：醸造学雑誌，10，724（1932）
- 12) 山崎百治，佐藤七郎：醸造学雑誌，10，828（1932）
- 13) 鮫島廣年，奈良 高編：微生物と発酵生産，p.14 共立出版（1979）
- 14) 内村 泰，小崎道雄：平成4年度日本醸造学会講演要旨集，p.25（1992）
- 15) 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）