黒 麹 菌 の 耐 久 性 に 就 て

坂口謹一郎, 飯塚 廣, 山口辰良 (東京大學農藝化學教室)

昭和 25 年 6 月 26 日 受理

A Study on the Durability of the "Kuro-Koji" Mould

By Kin'ichiro SAKAGUCHI, Hiroshi IIZUKA, and Tatsuyoshi YAMAGUCHI

(Dept. Agr. Chem., Univ. of Tokyo)

緒 言

黒麹菌の中でも *Aspergillus awamori* 系統の菌種は従来、所謂種麹の型式で保存する場合に発芽力を保持する耐久性が、黄麹菌に比して著しく劣り、胞子の発芽率は製麹後 20 日では 60.2~66.5%, 60 日では 0.3~1.0% に低下する。之等の菌株も各種の寒天培地では培養 25 日後では 97.4~100% を示す。著者等はさきに⁽¹⁻⁴⁾黒麹菌を廣く組織的に検討した際に使用した菌株分離試料⁽¹⁾を 1935 年春以來 14 年間保管して置いたので今回之等について、かゝる長期間、麹、麹室の土、もろみ其他の中に生存し得た菌株の分離を行い形態的及び生理的性質ことに實用上重要な生酸力、澱粉分解力及び製麹の難易等を検討し *Asp. Usamii* にも比肩し得る優良菌株を得たのでここに報告する。

試料： 1935 年春、琉球、鹿兒島、宮崎、八丈島等で採集し、封筒に入れ大型ブリキ罐に乾燥状態のまま保管した麹、土、其他醸造場の芥など合計 402 試料で内譯を大別すれば第 1 表の通りである。

Table 1. Numbers of Samples.

	Koji	Sail of the factory	Fermenting Mash etc.	
Lûchû islands	77	80	61	
Kagoshima and Miyazaki } prefectures	69	45	58	
Hachijo island	5	3	4	
Total	151	128	123	Total 402

分離集落の種類、比率： 全試

料につき同一稀釋度によつて麹汁寒天扁平培養上に分離し得た *Black Aspergilli*, *Asp. oryzae*, 其他の *Aspergilli*, *Mucoraceae*, *Penicillium* 其他の絲狀菌について集落数の比率を調べた。その中

で 1935 年の分離結果と比較した數例を第 2 表に示した。又此の比率を、後述の實驗に示す様に比較的優秀な黒麹菌を分離し得た試料について數例を示せば第 3 表の通りである。

Table 2. Numbers of Isolated Colonies from Kuro-Koji, for Example.

Table 2. Numbers of isolates											
Name of Sample		<i>Mucoraceae</i>	<i>Bl. Asp.</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>Penicillium</i>	Name of Sample		<i>Mucoraceae</i>	<i>Bl. Asp.</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>Penicillium</i>
照屋孚錦 0310	1935	2	6	0	1	佐々木政 良0610	1935	7	33	0	0
	1949	21	0	0	0		1949	15	0	0	0
宮平良喜 0410	1935	8	25	1	0	喜舎場朝 賢1010	1935	2	8	0	0
	1949	5	0	0	0		1949	0	0	0	0
西平ツル 0510	1935	4	12	0	0						
	1949	1	0	0	0						

Table 3. Numbers of isolated colonies from Kuro-Koji, other examples.

Name of sample		Kinds of samples	Muc.	Bl. Asp.	A. oryzae	other Asp.	P.	other mould
玉那覇實信	R.6533	Koji	3	3	1	0	3	0
木場清次郎	K.5141	"	0	16	0	0	2	1
新垣 芳盛	R.2111	"	0	1	0	0	0	0
喜舍場朝賢	R.1022	the other	15	13	0	0	0	0
堺 ヤ	K.0712	Koji	22	7	0	0	0	0
西 敬二	K.3321	soil	a few	many	0	0	0	1

試料の種類別と黒麹菌の生存率： 之も個々の試料については略し地方別に集計した數を示し第 4 表とする。即ち總計 402 試料中、黒麹菌を分離し得たのは 167 試料で、琉球試料は分離率が低く、八丈島は 0 である。

Table 4. Durability Ratio.

Kinds of samples	Koji			Soil of the factory			Fermenting mash etc.		
	A	B	B/A %	A	B	B/A %	A	B	B/A %
Districts									
Lûchû island	77	12	15.6	80	28	35.0	61	17	27.8
Kagoshima and Miyazaki	69	50	72.6	45	28	62.4	58	32	55.2
Hachijo-island	5	0	0	3	0	0	4	0	0
Total	151	62	41.0	128	56	43.7	123	49	39.8

A : Total of samples. B : Numbers of samples from which Black Asp, was isolated.

B/A : Durability Ratio

分類 : 全試料から分離した菌株の合計は第 5 表で總計 705 株, 此の内黒麹菌 250 株について形態及分類學的検討を加え坂口等の分類表⁽²⁾にあてはめ且つ分離の頻度を第 6 表に示した。

Table 5. Numbers of isolated strains.

Districts	Muc.	Bl. Asp.	Asp. org.	other Asp.	P.	other mould
Lûchû islands	173	86	26	22	44	15
Kagoshima and Miyazaki	83	164	23	5	31	33
Hachijo island	1	0	1	3	3	0
Total	257	250	50	30	78	48

Table 6.

<i>A. Usamii</i> Sakaguchi et al.	2 strains
<i>A. Saitoi</i> Sakaguchi et al.	28 strains
<i>A. Saitoi</i> var. <i>Kagoshimaensis</i> Sakaguchi et al.	180 strains
<i>A. Inuii</i> Sakaguchi et al.	0
<i>A. aureus</i> Nakazawa	0
<i>A. Nakazawai</i> Sakaguchi et al. 0	
<i>A. awamori</i> Nakazawa	40 strains

即ち前回 1935 年に比して *Asp Saitoi* var. *Kagoshimaensis* が特に多く, 又 colonies olive と認められるものも多少あつたが琉球黒麹の主要菌と考えられる *A. Inuii* に一致するものは得られなかつた。 *A. Nakazawai* も全く得られなかつた。尚, 1935 年分離後各代表菌株を麹寒天斜面上に培養し植継ぎをせずに保管したものは 1947 年春には全く生存するものがなかつた。

生酸力及び澱粉分解力試験 第 6 表によつて判る様に生存期間の長短は菌種によつて大差がみられるので, 従来ことに種麹としての生存期間に弱點があると云われる黒麹菌については實用上重要な事であるから全菌株につき生酸力と澱粉分解力試験を行った。

方法は前報と同様⁽³⁾で, 切干甘藷 3g を 100 cc 三角フラスコに入れ水 1.3 cc を加え数時間浸漬の後 1 時間

Table 7. Amylolytic Power.

	10~20%	20~30%	30~40%	40~50%	Total
<i>A. Usamii</i>	0	0	0	2	2
<i>A. Saitoi</i> {A	0	0	9	0	9
{B	0	9	10	0	19
<i>A. Saitoi</i> {O	0	0	6	14	20
var. {D	0	12	16	2	30
<i>Kag.</i> {D	50	77	3	0	130
<i>A. awamori</i>	0	3	36	1	40
Total	50	101	80	19	250 strains

Table 8. Acidity (N/10 NaOH cc per 5cc Koji extract medica)

	0.1~0.49cc	0.50~0.99	1.00~1.49	1.50~1.99	Total
<i>A. Usamii</i>	0	1	0	1	2
<i>A. Saitoi</i> {A	1	8	0	0	9
{B	2	10	7	0	19
<i>A. Saitoi</i> {C	0	7	13	0	20
var. {D	4	18	7	1	30
<i>Kag.</i> {E	10	117	3	0	130
<i>A. awamori</i>	29	11	0	0	40
Total	46	172	30	2	250 strains

Table 9. Max. and Min. Values of Acidity and Amylolytic Power in each Species.

<i>A. Usamii</i> R*0635(Control)	1.03 cc	42.8%
" R-6533	1.97	42.6 min.
" K-5141	0.54	45.6 max.
<i>A. Saitoi</i> K-1711	0.76	37.6 max.
" K-0831	0.88	22.3 min.
<i>A. Saitoi</i> {K-4521	0.93	45.6 max.
var. {K-5232	0.77	12.8 min.
<i>A. awamori</i> K-1742	0.84	43.0 max.
" K-3921	0.18	20.2 min.

蒸煮し麹汁寒天上 7 日目の前培養から一白金耳量を接種し 62 時間, 30° に培養し, 此の間は 24 時間ごとに振つて麹のつき具合を一様にする。培養を終れば水 20 cc を加え 60°, 3 時間糖化し濾過し直ちに水を加えて 100cc とし, その 10cc につき N/10 NaOH で滴定酸度 cc 数を求め生酸力とする。又別に 1 cc をとりレーン氏變法によ

り還元糖を測定し澱粉分解力を示した。対照として従来最もよい *A. Usamii* 0635 を用う。結果を分類表にもとづく各菌種群ごとにまとめ澱粉分解力を第 7 表に、生酸力を第 8 表に示す。

次に各菌種ごとに分解力の max., min. を第 9 表に示し他は省略する。

即ち澱粉分解力、生酸力ともに優れ、*Asp. Usamii* 0635 と同等又は以上のものとして *Asp. Usamii* 2 株、*Asp. Saitoi* var. *Kagoshimaensis* 11 株を得た。

(附) 分離菌種中には *Mucoraceae* が多数あつたので、256 株から任意に 24 株をとり同様の試験をしたが、生酸力は max. 0.23 cc, min. 0.04 cc. 澱粉分解力は max. 25.9%, min. 7.2% にすぎなかつた。

各種培地に於ける生酸力、澱粉分解力：上の結果良好な 13 株と対照として *Asp. Usamii*, *Asp. awamori* とを麹汁、米に培養し同様の試験をしたが、麹汁では酸度は *Asp. Saitoi* var. *Kag.* は *Asp. Usamii* の 2

Table. 10. Acidity and Amylolytic Power on Rice Media

		acidity	amylolytic power
<i>Asp. Usamii</i>	R 0635	0.16 cc	43.0%
"	R 6533	0.30	51.5
<i>Asp. Saitoi</i> var.	R 1022	0.65	62.8
<i>Kag.</i>	K 4521	0.64	58.8
<i>Asp. awamori</i>	NAK.	0.21	51.7

倍前後であり *Asp. awamori* は殊に少なかつた、米麹の結果の一部は第 10 表に示す。

累代培養の影響：*Asp. Usamii*

2 株、*Asp. Saitoi* var. *Kag.* 11 株及び対照として *Asp. awamori*, *Asp.*

Usamii 0635 とについて麹汁寒天に累代培養し初代、2 代、5 代につき切干甘藷麹で生酸力、澱粉分解力を試験した。一部を第 11 表に示す。

Table. 11. Difference in Generations.

		acidity cc				Amylolytic Power %			
		F.1	F.2	F.5	F.5	F.1	F.2	F.5	F.5
<i>A. Usamii</i>	R 0635	1.03	0.83	1.75	1.57	42.8	41.4	39.5	39.4
<i>A. awamori</i>	NAK.	1.97	1.52	1.59	1.50	42.6	36.7	38.6	38.7
<i>A. Usamii</i>	R-6533	0.54	0.46	0.49	0.52	45.6	41.8	35.8	35.0
"	K-5141	0.93	1.02	1.56	1.28	45.6	40.2	36.1	33.0
<i>A. Saitoi</i> var. <i>Kag.</i>	K-4521	—	0.53	0.48	0.53	—	34.2	29.3	30.9

結果は *A. Saitoi* var. *Kag.* の優良 11 株は累代培養によつていずれも分解力の減退を示すが *A. Usamii* は安定である。

次に 5 代目につき扁平培養して得られる集落 8 個づつについて個體差を求め 2 例を第 12 表に示す。

Table. 12. Difference in Each Colonies from the same Strain

Strain	Colony	Number	Acidity	Amylolytic Power	Strain	Colony	Number	Acidity	Amylolytic Power
<i>A. Usamii</i> 6533	(1)	1.45cc	1.43cc	39.0%	<i>A. Saitoi</i> var. <i>Kag.</i> 4521	(1)	1.33	1.39	34.0
	(2)	1.31	1.51	41.6		(2)	1.47	1.34	34.8
	(3)	1.30	1.54	39.7		(3)	1.33	1.29	35.1
	(4)	1.41	1.51	39.9		(4)	1.46	1.32	35.1
	(5)	1.41	1.59	39.5		(5)	1.35	1.39	33.6
	(6)	1.54	1.54	41.6		(6)	1.46	1.38	36.8
	(7)	1.40	1.69	37.6		(7)	1.59	1.41	35.0
	(8)	1.40	1.45	39.5		(8)	1.62	1.39	43.9
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2		No. 1	No. 2	No. 1	No. 2

第 12 表の K 4521 菌株 (8) は 43.9 の分解力を示したので更に之を扁平培養して 8 個の集落をとり試験した

Table. 13. Koji production test.

		40 h.		95 h.	
Strain	Time	Acidity	Amylolytic Power	Acidity	Amylolytic Power
<i>A. Usamii</i>	R 0635	0.23 cc	31.6%	2.52 cc	31.2%
<i>A. awamori</i>	NAK.	0.11	20.3	0.75	35.3
<i>A. Usamii</i>	R-6533	0.32	39.5	2.38	31.2
"	K-5141	0.11	17.5	0.63	47.2
<i>A. Saitoi</i> var. <i>Kag.</i>	K-4521	0.25	30.1	1.88	31.2

がいづれも分解力 28.5~34.6% の間にとどまつた。

製麹時間

製麹の難易を数量的に表すために、40 時間、30° に製麹し室温に約 10 時間放置したものと、95 時間製麹のものとを生酸力、澱粉分解力の點で検討した。そ

の一部を第 13 表に示す。

即ち R-6533 によれば或は之が製麹時間の短縮に役立つかもしれない。

結 語

1935 年に琉球, 鹿児島, 宮崎, 八丈島で採集した試料 402 種から 14 年後に再び分離を行い 705 株を得, 先ず如何なる糸状菌が如何なる比率で長期間の保存に耐えたかを調べ, 更に之等のうち黒麹菌 250 株については菌學的に検討した。

(1) 此の保存に耐えた菌種は *A. Usamii* (2 株), *A. Saitoi*, (28 株), *A. Saitoi* var. *Kagoshimaensis* (180 株), *A. awamori* (40 株) で 1935 年の結果に比べて *A. Saitoi* var. *Kag.* が著しく多く, *A. aureus*, *A. Inuii*, *A. Nakazawai* は全く得られなかつた。

(2) 生酸力, 澱粉分解力の強い菌株は *A. Usamii* で *A. Saitoi* var. *Kagoshimaensis* の中には單孢子分離によつてしばしば優れたものの得られる菌株がある。

(3) 黒麹菌胞子の耐久性は保存の形式即ち, 麹, 麹室の土, もろみ等のいずれでも同様の傾向を示す。

(4) 之等の菌株中には澱粉分解力, 生酸力, 製麹の難易等が従來の優良株に比肩し得るものがある。

- (1) 坂口, 飯塚, 山崎: 應用菌學, 3 卷, 2 號, 54 頁 (1949)
- (2) 坂口, 飯塚, 山崎: 應用菌學, 3 卷, 4 號, 98 頁 (1950)
- (3) 坂口, 飯塚, 山崎: 應用菌學, 3 卷, 3 號, 66 頁 (1949)
- (4) 坂口, 飯塚, 山崎: 應用菌學, 4 卷, 1 號, 1 頁 (1950)

Summary

It is widely recognized that "Tane-Koji", or a starter for black Koji making, consisting chiefly of conidia of black *Aspergilli*, keeps not so well as those of yellow green *Aspergilli* or *Asp. oryzae* and *Asp. sojae*. The present research has been carried out to find out resistant strains for preservation of "Tane-Koji" among Kuro Koji (black *Asp.*) moulds.

About 14 years ago (from April to July, 1935) one of the authors (K. SAKAGUCHI) collected 402 samples of Kuro-Koji or mouldy material for Awamori (a distilled wine from rice) and Imo-Shôchû (a distilled wine from sweet potato) making, of soils of the factories and of the fermenting mash, from the southern districts of Japan, such as Kagoshima and Miyazaki prefectures and Lûchû and Hachijo islands, and isolated from them about three hundred different strains of black *Aspergilli* and classified them⁽¹⁾. From those samples which have been preserved in tin cans for these 14 years, the authors isolated the black *Aspergilli* and other moulds in May, 1949.

(1) The isolated species, which have survived for so long a time, were *A. Usamii* (2 strains), *A. Saitoi* (28), *A. Saitoi* var. *Kagoshimaensis* (180) and *A. awamori* (40). While *A. Inuii*, *A. aureus*, and *A. Nakazawai* have not been found.

(2) The amylolytic powers and the rates of acid productivity of the newly isolated strains were compared with those which had practically been used in the above fermentation industries. And several strains belonging to *A. Usamii* and *A. Saitoi* var. *Kagoshimaensis* were found to be effective for the purpose.

(1) K. SAKAGUCHI, H. IZUKA, and S. YAMAZAKI: *J. of Applied Mycology*, Vol. 3, No. 2, p. 53 (1949); Vol. 3, No. 3, p. 65 (1949); Vol. 3, No. 4, p. 97 (1950); Vol. 4, No. 1, p. 1 (1950)