清酒醸造における高濃度アルコール生成機構 (第 3 報)

黒麹菌体の酵母増殖促進効果

川原田肇, 古賀 肇, 林田晋策, 本江元吉

(九州大学農学部農芸化学科)

昭和 41 年 11 月 15 日 受 理

The Mechanism of Formation of High Concentration Alcohol
in Sake Brewing

Part III. Stimulation of Yeast Growth by Black Koji Mold

By Hajime KAWAHARADA, Hajime KOGA, Shinsaku HAYASHIDA
and Motoyoshi HONGO*Laboratory of Applied Microbiology, Department of Agricultural Chemistry,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

The present paper deals with component of a koji mold which stimulates the yeast growth and with its stimulating mechanism. The washed mycelium of a black koji mold which was cultured in a synthetic medium was used as the material. *Saccharomyces sake* was inoculated in a medium to the extent of 3×10^7 /ml in a flask with a fermentation bung, and incubated at 20°C for 5 days. Yeast population in the basal synthetic medium alone was 1.8×10^8 /ml, while in the medium with the black koji mold added, 4.7×10^8 /ml. Various kinds of extracts of the black koji mold (by water, 10% NaCl, 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH, and 70% EtOH) proved not to stimulate the yeast growth. This fact led to a conclusion that the effective component existed in an insoluble part of the mold. Fractionation of the insoluble component by centrifugation of the homogenate of the black koji mold gave the result that the mitochondrial fraction was shown to stimulate the yeast growth. The stimulating effect was not influenced under an anaerobic condition by N₂ gas replacement method. Hemoglobin also stimulated the yeast growth (3.2×10^8 /ml). In view of these fact, the effective component of the black koji mold was speculated as an electron acceptor to the yeast respiration.

(Received November 15, 1966)

麹菌, およびそのエキスが酵母の増殖を促進することは井上⁽¹⁾によって見いだされ, その後, 福井⁽²⁾はビタミン B 群では代替できない未知因子が麹エキスを存在することを示し, この因子が高濃度アルコール生成に対する重要な要素であろうと述べている. 著者らの研究においても, 酵母の増殖が高濃度アルコール生成の重要な条件であることが示されたので⁽³⁾, 麹菌の酵母増殖促進効果について検討を行なった. 麹菌としては当然酒造用黄麹菌を使用すべきであるが, 本研究室で他の研究に用いている黒麹菌の菌体が入手しやすかったので, まずこれを使用して実験を行なった. その結果, 従来考えられていたビオスの物質の効果は微小で, 麹菌体中にはさらに

大きな増殖促進因子が存在することが推定されたので, その物質を検索し, その作用機構を追求した.

実 験 方 法

1. 発酵試験の方法は前報⁽³⁾と同じで, 酵母接種量も同じく 3×10^7 /ml である. ただし, 規模を幾分小にし, 容器を 250 ml 容, 培地を 100 ml または 150 ml とし, 初糖濃度を 25% にし, 必要あるものだけ補糖したがほとんど補糖は行なわなかった. 期間は 3~5 日で打ち切り, 酵母密度を測定した.

2. 酵母密度は血球計数器によって計測した.

3. 黒麹菌には, *Aspergillus awamori* var. *kawachi* をジャーファーメンターで合成培地を用いて 30°, 2 日間

培養してその洗浄菌体を用いた。培地組成は、でんぶん 3%, KH_2PO_4 0.3%, 酢酸アンモン 1%, MgSO_4 0.1%, NaCl 0.05%, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.01%, MnSO_4 0.01%。

4. 黒麹菌体磨砕上澄液の調製には、黒麹菌体を乳鉢で磨砕して液状とし、12,000 g, 30 分間遠沈してその上澄を一応磨砕上澄液とした。

5. 黒麹菌体各抽出物の調製には、湿菌体 50 g のホモジネートを試料として下記の抽出を行なった。

a. 食塩水抽出物: 10% NaCl として 1 夜放置し、上澄を透析後減圧濃縮した。

b. アルコール抽出物: 70% EtOH として 1 夜放置し、上澄を減圧濃縮した。

c. 酸およびアルカリ抽出物 [() はアルカリ抽出の場合]: 0.1 N HCl (0.1 N NaOH) として 1 夜放置し、上澄を 0.1 N NaOH (0.1 N HCl) で pH 5.5 まで中和し、減圧濃縮した。

6. 黒麹菌体顆粒区分の調製には、黒麹菌体をミキサー型ホモジナイザーで粗砕後、cell homogenizer (Braun 社製) で 0.45~0.50 mm の glass beads を用いて 1 分間ホモジナイズして完全なホモジネートとし、1,000 g, 10 分間遠沈した。その上澄をさらに 23,000 g, 15 分間遠沈し、沈澱物を顆粒区分とした。添加実験にはこの泥状液 5 ml を用いた。

7. 酵母ミトコンドリア区分の調製には、Nossal の方法⁽⁴⁾でパン酵母を試料として行なった。

8. 加熱黒麹菌体には、黒麹菌体 10 g (湿重) を 0.75 kg/cm², 15 分間処理したものを用いた。

9. 人参は 20 g をおろし金でおろして用いた。大豆粕は粉末を 10 g 用いた。ヘモグロビンは Difco 社製。

結 果

1. 黒麹菌体の酵母増殖促進物質

a. 黒麹菌体の効果: この種の実験で注意しなければならない条件は、使用する培地の組成と酵母の活性とである。すなわち、培地には既知の成育因子が総て十分に含まれている必要があり、酵母は移植をくり返して十分に生理的活性を保ったものを使用しなければならない。本実験で使用した培地は、前報までの実験に用いたと同じ純合成培地で、アルコール生成能の点からは添加物なしで 18% 前後のアルコールを生成し、十分に優れているといえる。増殖の点では窒素源に改良の余地があると考えられるが、最高 2×10^8 /ml 程度を示し、まず優れているといつてよい。この培地に麴を加えると Fig. 1

に示すように、酵母の激しい増殖が認められた。しかし生麴汁 (米麴に水を倍量加えて 60°, 5 時間糖化した濾液) の添加では、発酵促進は認められたが増殖の点ではほとんど効果がなかった。このことから、培地の栄養が十分に酵母の活性が強ければ、麴汁の効果はほとんどないといえる。しかしこのような好条件下でも、麴そのものの効果は顕著で、水不溶性の酵母増殖促進因子が存在すると考えられる。米の酵母増殖促進効果については既報で述べたが、麴菌にもその効果があるのではないかと考え、黒麹菌を使用してその効果を検した。その結果、同じく Fig. 1 に示すように、黒麹菌体には麴と同様、

Fig. 1. Effect of Washed Mycelia of Black Koji Mold on Yeast Growth.

●—● None (1.8×10^8 /ml)
○—○ Koji extract 50 ml/100 ml (2.0×10^8 /ml)
△—△ Koji 10 g/100 ml (4.6×10^8 /ml)
□—□ Mycelia of black koji mold 10 g (wet wt.)/100 ml (4.7×10^8 /ml)
Yeast population is shown in ().

Fig. 2. Effect of Dried Mycelia of Black Koji Mold.

●—● None (1.8×10^8 /ml)
○—○ Wet mycelia of black koji mold 10 g (wet wt.)/100 ml (4.1×10^8 /ml)
△—△ Dried mycelia of black koji mold 2 g (dry wt.)/100 ml (4.9×10^8 /ml)
10 g of wet mycelia is equivalent to 2 g of dried mycelia.

Fig. 3. Effect of Autoclaved Mycelia of Black Koji Mold.

- None (1.5×10^8 /ml)
- Mycelia of black koji mold 10 g (wet wt.)/100 ml (4.0×10^8 /ml)
- △—△ Autoclaved mycelia of black koji mold 10 g (wet wt.)/100 ml (4.0×10^8 /ml)

Fig. 4. Effect of Defatted Soybean.

- None (1.8×10^8 /ml)
- Defatted soybean powder 10 g/100 ml (4.0×10^8 /ml)

Fig. 5. Effect of Carrot.

- None (1.6×10^8 /ml)
- Homogenized carrot 20 g/100 ml (5.3×10^8 /ml)

顕著な効果が認められた。黒麹菌体の効果は Fig. 2, Fig. 3 に示すように、これを乾燥したり加熱してもほ

Fig. 6. Effect of Supernatant of Homogenized Mycelia of Black Koji Mold.

- None (1.8×10^8 /ml)
- Mycelia of black koji mold 20 g (wet wt.)/100 ml (4.1×10^8 /ml)
- △—△ Supernatant of homogenized mycelia of black koji mold (1.9×10^8 /ml)

Fig. 7. Effects of Extracts of Black Koji Mold.

- None (1.8×10^8 /ml)
- Black koji mold (4.1×10^8 /ml)
- △—△ 10% NaCl ext. (1.8×10^8 /ml)
- 70% EtOH ext. (2.0×10^8 /ml)
- ×—× 0.1N HCl ext. (1.7×10^8 /ml)
- 0.1N NaOH ext. (1.7×10^8 /ml)

んど変わらなかった。同様な効果は Fig. 4, Fig. 5 に示すように、大豆粕や人参のような植物性物質にも認められ、有効成分は生物界に広く分布する物質であるとも考えられる。

b. 黒麹菌体磨砕上澄液の効果 : a. で麴汁には酵母の増殖促進効果がないことを示したが、黒麹菌についてその水溶性区分の効果を検した。水溶性区分はできるだけ高濃度に抽出する必要があるので、菌体を磨砕してその上澄を用いた。結果を Fig. 6 に示す。すなわち、水溶性区分には効果がないことが明らかになった。したがって、黒麹菌体の酵母増殖促進効果は菌体のもつ水溶性の栄養分によるものではないといえる。なお、この程度の遠沈では完全な上澄液とはいえないが、もはや効果

はなく、遠沈が不十分であるとかかなりの効果が認められ、懸濁している微細粒子が有効であると考えられる。

c. 黒麹菌体各抽出物の効果 : b. において有効成分は水不溶であることが示されたので、その可溶化を試みた。10% NaCl, 70% EtOH, 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH で各々抽出を行ない、これを添加してその効果を検したが、Fig. 7 に示すようにいずれも効果がなく、可溶化はできなかった。

d. 黒麹菌体顆粒区分および酵母ミトコンドリア区分の効果 : b. で言及したように、黒麹菌体のホモジネートの遠沈が不十分である場合、その上澄が有効であることから菌体内顆粒に注目し、その効果を検した。結果を Fig. 8 に示す。すなわち、顆粒区分には十分な効果があった。この顆粒区分は、その遠沈による分画から考

Fig. 8. Effect of Intracellular Particles of Black Koji Mold.

●—● None (1.3 × 10⁸/ml)
○—○ Homogenate of black koji mold 30g (wet wt.)/150 ml (3.4 × 10⁸/ml)
△—△ Intracellular particles of black koji mold (3.2 × 10⁸/ml)

Fig. 9. Effect of Mitochondrial Fraction of Baker's Yeast.

●—● None (1.8 × 10⁸/ml)
○—○ Mitochondrial fraction of baker's yeast (3.2 × 10⁸/ml)

えてミトコンドリアが主体であると考えられる。このことを裏付ける目的で、パン酵母のミトコンドリア区分の効果を検した。その結果、Fig. 9 に示すように、酵母のミトコンドリア区分にも効果が認められ、有効成分がミトコンドリアに存在する可能性が強くなった。

e. 黄麹菌およびその顆粒区分の効果 : 実際の酒造に用いられている麹菌は黄麹菌であるので、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* について黒麹菌と同様の効果を示すかどうかを検した。培養および顆粒区分の調製は黒麹菌の場合と同じである。その結果、Fig. 10 に示されるように黄麹菌の顆粒区分も有効であった。

2. 黒麹菌体の酵母増殖促進効果

前報⁽³⁾で麹の酵母増殖促進は麹の redox 物質によると推定したが、黒麹菌体にも同様のことが考えられるので、その点について検討を行なった。

a. 嫌気条件下での黒麹菌体の効果 : 発酵栓を付しただけでも一応嫌氣的といえるが、本実験のように初期の増殖を問題にする場合、容器内の酸素の影響は無視できない。そのため完全に嫌氣的にするのに、液面にパラフィンを重ねし、さらに液中に高純度 N₂ ガス (99.99%) を通気してガス置換を行ない、その影響を検した。結果を Fig. 11 に示す。すなわち、添加物のない場合には著しく増殖が抑制されたが、黒麹菌体添加の場合は嫌気による影響はほとんど認められなかった。

b. 黒麹菌および人参の電位 : 黒麹菌体の効果は、酸素に代わるべき電子受容体、すなわち酸化型の redox 物質であると推定されたので、その電位はかなり高いと考えられる。そこで湿菌 2.5 g を 50 ml の水に懸垂し、

Fig. 10. Effect of Intracellular Particles of Yellow Koji Mold.

●—● None (2.0 × 10⁸/ml)
○—○ Yellow koji mold 20g (wet wt.)/150 ml (5.7 × 10⁸/ml)
△—△ Intracellular particles of yellow koji mold 5g (wet wt.)/150 ml (6.8 × 10⁸/ml)

Fig. 11. Influence of Anaerobic Condition on Effect of Black Koji Mold.

- None (1.6×10^8 /ml)
- None, anaerobic (0.9×10^8 /ml)
- Black koji mold 10 g (wet wt.)/100 ml (4.0×10^8 /ml)
- Black koji mold 10 g (wet wt.)/100 ml, anaerobic (3.3×10^8 /ml)

Fig. 12. Effect of Hemoglobin.

- None (1.5×10^8 /ml)
- Bovine hemoglobin 5 g/150 ml (3.2×10^8 /ml)

Michaelis 槽を用いて電極法でその電位を測定した。その結果, pH 7.0, 15° で $E_h = 0.263$ V, すなわち $rH = 22.8$ であった。酵母やバクテリアの電位は一般に低く rH 10 以下であるが, 黒麹菌はかなり高く酸化型 redox 物質の存在を示した。さらにこれに 0.1 M hydrosulfite を滴下したところ, 10 ml 加えてもほとんど降下が認められず, 菌体に含まれる loading substance の量はかなり多いと考えられる。黒麹菌体以外で強い酵母増殖促進効果をもつのは人参であったが, 人参の電位も rH 19.6 でかなり高く, 一連の酵母増殖促進物質が同一機作でその効果を呈することを暗示している。

次に, 同じ方法で黒麹菌の抽出液と顆粒区分について

その ORP 緩衝能の比較を行なった。抽出液は湿菌約 10 g を完全に磨砕, 遠沈して得た上澄液 50 ml を用い, 顆粒区分は前記の方法で得た顆粒区分 5 g (湿重) を M/15 phosphate buffer (pH 7) に懸濁して用いた。その結果, 終極電位は抽出液 $rH = 19.5$, 顆粒区分 $rH = 20.2$ でほとんど変わらないが, これに 0.3 M hydrosulfite を滴下して, 培養中の最低 rH である rH 6 まで低下するに要する滴下量を測定したところ, 抽出液では 0.25 ml であるのに対し, 顆粒区分では 2.5 ml を要した。このことは, 顆粒区分により多くの電子受容体が含まれていることを示している。

c. ヘモグロビン: 酸素に代るべき電子受容体が有効であると推定されたので, 直接酸素と結合しているヘモグロビンは当然有効であると考えられるので, その効果を検した。結果を Fig. 12 に示す。すなわちヘモグロビンは明らかに有効であった。

考 察

麹菌の酒造における役割としては 2 つのことが考えられる。すなわち, アミラーゼその他の酵素の生産と酵母の生育因子類の供給とである。前者は並行複式発酵という形式をとることにより糖濃度を適度に保持させ, 後者はその豊富な生育因子を酵母に与えることによりその増殖を盛んにして, それぞれアルコール生成量の増加に寄与している。後者については, 既知の各種生育因子の他に麹エキスを未知生育因子の存在も示されており⁽²⁾, 麹菌は栄養的に酵母の生育に寄与しているものと考えられる。したがって麹菌を栄養的に不足している培地に添加すれば, 酵母の増殖が促進されるのは当然である。著者らの実験結果では麹菌そのものと麹菌抽出液とはその効果に大きな差が認められ, この実験に使用した合成培地を用いれば麹菌抽出液にはほとんど効果が認められなかった。したがって, 従来の生育因子的な物質とは全く異なった因子が麹菌体に存在することが想定された。種々検討の結果, 麹菌体には酵母増殖促進効果が認められ麹菌体には前述の 2 つの役割の他に第 3 の役割があることが想定されるに至った。その物質が何であるかは, 現段階では水に不溶性の物質でミトコンドリアその他の顆粒に含まれていること以上には明らかでない。

また, その作用については麹菌体の効果が特に嫌気条件下で顕著(対照と比較して)であることから, 2 つのことが考えられる。第 1 は, 好気条件下でしか合成されない物質を麹菌体が含まれていることである。この点につ

いては水溶性物質には該当するものがないことが示されたが、水不溶性の物質、たとえば脂質などについて今後検討する必要がある。第 2 は麴菌体がある成分を電子受容体として、酵母が呼吸ないしそれに準じた代謝を行なうことで、このように考えると嫌気条件下での酵母の盛んな増殖も首肯できる。

以上、麴菌の酵母増殖促進効果についての考察を述べたが、既報の実験結果をも併せて考えて清酒醸造における高濃度アルコール生成の問題について言及すると、この問題は 1 つの要因だけでは到底説明されず、幾つかの要因から成っているであろうが、現時点では次の 5 つが考えられる。(1) 低温発酵であること、(2) 糖およびアミノ酸濃度が適度に保持されていること、(3) 麴によって酵母に生育因子が供給されること、(4) 麴中の redox 物質の作用により、醗が初期に酸化的、後期に還元的に保たれること、(5) 米は副生有害物（フーゼル油など）の吸着を行なうこと。以上 5 つの要因の総合的結果として、酒造では容易に 20% 以上のアルコールが生成されるものと考えられる。これらの諸要因は、醗中に米、麴、酵母が同時に存在すること、すなわち並行複式発酵に由来するものであるから、結局、清酒醸造に独特な並行複式発酵という発酵形式にすべてが帰せられると考えられる。

要 約

(1) 黒麴菌体の酵母増殖促進効果は、栄養豊富な培地ではその水溶性区分にはなく、不溶性区分に顕著であった。

(2) 黒麴菌体の有効成分は、ミトコンドリアその他の顆粒区分に含まれることが認められた。

(3) 黒麴菌体の効果は嫌気条件下でもほとんど影響を受けなかった。

(4) ヘモグロビンにも酵母増殖促進効果があった。

(5) 懸垂黒麴菌体の電位は約 rH 22 で、その顆粒区分は還元剤による電位の低下に対して、水溶性区分に比較して強い緩衝を示し、電子受容体となることが示された。

(6) 黄麴菌でも黒麴菌と同様その顆粒区分が有効であった。

なお、本報告の要旨は昭和 41 年 4 月、日本農芸化学会大会で発表した。

(1) 井上貞三、高岡祥夫：大阪醸造学会第 5 回講演会発表 (1953)。

(2) 福井三郎、谷 喜雄、岸部忠信：発酵工学, **33**, 59 (1955)。

(3) 川原田肇、林田晋策、本江元吉：本誌, **41**, 635 (1967)。

(4) P. M. Nossal: *Biochem. J.*, **57**, 62 (1954)。