〔農化 第 48 卷, 第 10 号, p.529~535, 1974〕

麴の高濃度アルコール生成因子*

林田晋策, 南里信也, 鄧 德豊, 本江元吉
(九州大学農学部農芸化学科)

昭和 49 年 3 月 25 日 受 理

The High Concentration Alcohol-Producing Factor in Koji (The Mechanism of Formation of High Concentration Alcohol in Sake Brewing Part VII)

By Shinsaku HAYASHIDA, Nobuya NANRI, Dent Der FENG and Motoyoshi HONGO
*Laboratory of Applied Microbiology, Department of Agricultural Chemistry,
Kyushu University, Fukuoka, Japan*

Koji mold proteolipid, or protein body in rice grains, was found to be the high concentration alcohol-producing factor, showing both actions of the yeast growth promotion and of the formation of high concentration, more than 20 percent, of alcohol in the complete synthetic medium. The yeast growth promotion by proteolipid was also observed in the contamination-preventing environment, such as the low temperature, the anaerobic condition and the presence of sufficient amount of lactic acid, sugar and alcohol, shown in the seed culture of sake brewing.
(Received March 25, 1974)

緒 言

清酒醸造の特性である高濃度アルコール生成現象の機構を解明するために、清酒醸造独自の原料である米麴が追究されたのは当然のことと考えられる。山崎⁽¹⁾はもろみにおける米麴の固形部の存在が、高濃度アルコール生成の必須条件であると結論した。ついで、井上⁽²⁾は麴菌体あるいは麴菌体のアルコール抽出液による酵母増殖の耐アルコール性増強を明らかにしたが、対照培地に Hayduck 氏液が使用されたため、特殊因子の存在については考察されず、また高濃度アルコール生成との関係も検討されなかった。さらに、福井ら⁽³⁾、中西ら⁽⁴⁾は、それぞれ麴エキスの未知物質による酵母増殖の耐アルコール性と耐糖性との増強を報告した。山城ら⁽⁵⁾は、高濃度アルコール生成が麴エキスの添加だけでは達成されず、麴固形部が有効であるとして山崎の結果を支持して

いる。著者らは、既報⁽⁶⁾のとおり、山崎の結果を基礎として、清酒醸造における高濃度アルコール生成の要因を検討した結果、清酒もろみは、自己の発酵力を増強し、かつ保護する独自の機能を備えていることを認めた。発酵力増強機能としては、麴菌プロテオリピド (PL) による酵母増殖の促進効果を見だし⁽⁷⁾、また発酵力の保護機能としては、(1) 低温発酵による生成アルコールの害作用の緩和、(2) 並行複発酵による酵母への濃糖圧迫防止、(3) 米のたん白質オリゼニンによるトリプトファンなどの発酵副生有害物質の吸着⁽⁸⁾、(4) PL, その他の成分による、もろみの酸化還元電位維持と調節⁽⁹⁾を見だし、これらの総合結果として、清酒もろみでは高濃度アルコール生成が達成されることを提示した。特に酵母増殖促進効果は、麴の水溶性区分には認められず、麴菌体、水に懸濁する麴菌体内の顆粒および生体膜破砕物区分に認められ、さらに麴菌体からクロロホルム・メタノール混合溶媒によって抽出分離される PL に見いだされた。

* 清酒醸造における高濃度アルコール生成機構 (第 7 報)。

本報では、基本合成培地に麴菌 PL を添加すると、20% 以上の高濃度アルコールが短期間に生成されること、つまり麴菌 PL は酵母増殖促進作用とともに高濃度アルコール生成作用を示すことを見だし、麴菌 PL は、高濃度アルコール生成因子 (high concentration alcohol-producing factor) であることを明らかにした。ついで、低温、濃糖、アルコールおよび乳酸の存在ならびに嫌気という、一般の微生物の増殖が阻害される環境においても、PL の存在は酵母の増殖を促進して培養系の発酵力を増大させた。つまり、PL による各環境での酵母増殖の耐性増強効果を認め、並行複発酵の雑菌汚染防止条件下における清酒酵母の増殖促進の機作を考察した。

実験方法

1. 発酵試験 米麴に存在すると推察される高濃度アルコール生成因子を見いだすために、既報⁽⁸⁾のとおり、既知栄養素を十分量含有した基本合成培地 (窒素源はクエン酸アンモニウム) を使用して、補糖培養法による発酵試験を、実際のもろみに近似させた条件で実施した。発酵栓を付した被験発酵瓶の重量を経日的に測定し、その減量を炭酸ガス出量として表示し、その培養系の発酵力の指標とした。また、使用培地が十分量の既知栄養素を含有していることは、50,000 rpm, 60 分間遠心分離を行なって懸濁物質を除去した麴エキスを添加しても、酵母増殖と生成アルコール濃度は変らなかったことから明らかであり、この合成培地は麴エキスと同程度かそれ以上の効力を示し、麴エキスにおける特殊因子存在の可能性は小さいと推考した。酵母の前培養としては、綿栓を付した 250 ml 容発酵びんに糖濃度を 10% とした基本合成培地を 100 ml 入れ、斜面培養から酵母を 1 白金耳接種し、30°C, 48 時間静置培養をした。その遠沈菌体のみを計数し、 3×10^7 /ml となるように接種した。

2. 酵母密度 前報⁽¹⁰⁾のとおり、メチレンブルー染色法の生菌数で示した。

3. アルコールの定量 前報⁽⁸⁾のとおり。

4. PL の調製 Folch の法⁽¹¹⁾によった。

5. 米プロテインボディの調製 満田の法⁽¹²⁾によった。

実験結果

1. 麴菌 PL の高濃度アルコール生成効果

基本合成培地 (150 ml) に麴菌 PL を 0.1, 0.3, 0.5, 1

Fig. 1. Effect of Proteolipid on Alcohol Formation.

Fermentation tests in the synthetic medium with ammonium citrate as N source: ●—● none [1.2×10^8] (15.9%), ▲—▲ koji mold proteolipid 0.1% added [1.6×10^8] (19.3%), △—△ 0.3% [3.0×10^8] (19.6%), □—□ 0.5% [4.1×10^8] (20.3%), ○—○ 1% [5.3×10^8] (20.6%), ⊙—⊙ 2% [4.2×10^8] (15.9%). In the synthetic medium with amino acids as N source: ●---● none [7×10^7] (14.1%), ○---○ proteolipid 1% added [4.1×10^8] (19.8%). Yeast population per ml, after 5 days, and the final concentration of alcohol are shown in brackets and in parentheses respectively.

および 2% 濃度となるように添加して 250 ml 容発酵瓶使用の発酵試験を行なった。Fig. 1 に示すとおり、PL 添加によって酵母増殖は促進され、炭酸ガス出量も増大し、生成アルコールの最終濃度は PL 1% 添加の場合、最大の 20.6% に達した。窒素源をアミノ酸とした場合も、PL 1% 添加によって 19.8% のアルコール濃度に達した。したがって、麴菌 PL は酵母増殖促進作用とともに高濃度アルコール生成作用を示す高濃度アルコール生成因子と考えられる。

2. 酵母増殖の耐アルコール性に及ぼす麴菌 PL の効果

基本合成培地 (150 ml) に、アルコールをそれぞれ 0, 3, 5 および 8% 濃度となるように添加して発酵試験を行なった。Fig. 2 のように、PL 無添加の場合には、添加アルコール濃度の増大に伴って酵母増殖は顕著に低下し、とくに 8% 添加では増殖は認められず、Fig. 4 の

Fig. 2. Effect of Proteolipid on Yeast Growth and Alcohol Formation in the Presence of Alcohol.

Fermentation tests: to the basal synthetic media, ●—● no alcohol added without proteolipid [1.1×10^8] (16.7%), ○—○ no alcohol added with 1% proteolipid [5.2×10^8] (20.3%), ▲—▲ 3% alcohol added without proteolipid [7.3×10^7] (17.7%), △—△ 3% alcohol added with 1% proteolipid [4.5×10^8] (20.5%), ■—■ 5% alcohol added without proteolipid [5.2×10^7] (17.5%), □—□ 5% alcohol added with 1% proteolipid [4.0×10^8] (20.3%), ×—× 8% alcohol added without proteolipid [2.7×10^7] (15.3%), ⊙—⊙ 8% alcohol added with 1% proteolipid [5.3×10^7] (17.8%).

Yeast population per ml, after 5 days, and the final concentration of alcohol formed are shown in brackets and in parentheses respectively.

結果とも一致した。PL 添加 (1%) の場合には、添加アルコール濃度 0~5% では、増殖は顕著に促進され、酵母密度は 5 日目には 4×10^8 /ml 程度に達し、酵母増殖に対するアルコールの影響はきわめて小であった。生成アルコールの最終濃度は、いずれも 20% に到達した。しかし、8% アルコール添加では、増殖は PL によって促進されたが、その程度は低く、生成アルコール濃度も 20% には達しなかった。以上の結果から、PL は酵母増殖の耐アルコール性を増大させることを認めた。

Fig. 3. Effect of Proteolipid on Yeast Growth in the Presence of Sugar.

Fermentation tests in the initial sugar concentration of 20%, 30%, 40% and 50%: ●—● none, ○—○ koji mold proteolipid 1% added.

Yeast population is shown in parentheses in the figure.

3. 麴菌 PL の濃糖環境における酵母増殖促進効果

糖濃度を 20~50% にした基本合成培地に、麴菌 PL を 1% 添加し発酵試験を行なった。Fig. 3 に示すとおり、糖初濃度が 20, 30, 40 および 50% のいずれの場合も、PL 添加の最大酵母密度は、PL 無添加のそれに比べて 1.5~2.5 倍に達し、培養系の発酵力は増大した。しかし、清酒酵母は 50% の濃糖下でも、アルコールが低濃度ならば、増殖および発酵力に対する顕著な阻害は認められず、一方、アルコール低濃度 (0~5%) 下での糖の低濃度維持は、Fig. 4 のとおり、かえって培養系の発酵速度を低下させ、酵母増殖を減少させる傾向を示した。つまり、清酒酵母は元来、顕著な耐糖性を示し、さらに好糖性さえ示すものであるから、この実験の糖濃度範囲では、PL は濃糖下でも酵母増殖を促進し、培養系の発酵力を増大させると結論される。

4. 酵母増殖の耐低温性に及ぼす麴菌 PL の効果

Fig. 5 のとおり、PL 無添加の場合、8°C では酵母増殖は全く認められないが、PL 添加の場合には酵母増殖

Fig. 4. Effect of Concentration of Alcohol and Sugar on Alcohol Formation.

Fermentation tests in the initial alcohol concentration of $\circ$ — $\circ$ 0%, $\triangle$ — $\triangle$ 2%, $\square$ — $\square$ 5%, $\bullet$ — $\bullet$ 8%, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 10% and $\blacksquare$ — $\blacksquare$ 15%, by use of proteolipid-unsupplemented media.

Yeast population per ml, of 5th day, is shown in parentheses in the figure.

The sugar concentration in media was maintained by a gradual addition of sucrose.

Fig. 5. Effect of Proteolipid on Yeast Growth at Low Temperatures.

Fermentation tests at 8°C, 10°C and 15°C: $\bullet$ — $\bullet$ none, $\circ$ — $\circ$ koji mold proteolipid 1% added.

Yeast population per ml after 3 days and 7 days, is shown in parentheses in the figure.

が認められた。つまり, PL は酵母増殖の耐低温性を増大させた。

5. 乳酸の酵母への害作用に対する麹菌 PL の効果

福井ら⁽¹³⁾は, 合成培地に乳酸を 1~1.5% 添加して清酒酵母の静置培養を行なうと, 対数増殖期後半から酵母菌体の凝集が起こり, 死細胞が増大することを見いだした。著者らは, 1% PL 添加合成培地に乳酸を 0.5, 1.0, 1.5 および 2.0% 添加して発酵試験を行なった。その際, 使用合成培地の pH 緩衝能は大であるから, 1% PL 添加による培地 pH の変動は 0.05 と小であった。その結果, Fig. 6 のとおり, PL は乳酸存在下でも顕著に酵

Fig. 6. Effect of Proteolipid on Yeast Growth and Alcohol Formation in the Presence of Lactic Acid.

Fermentation tests in the presence of 1% koji mold proteolipid: $\circ$ — $\circ$ none of lactic acid [4.2×10^8] (20.1%), $\triangle$ — $\triangle$ 0.5% lactic acid [4.5×10^8] (18.7%), $\square$ — $\square$ 1% lactic acid [4.3×10^8] (17.5%), $\square$ — $\square$ 1.5% lactic acid [4.1×10^8] (16.3%), $\circ$ — $\circ$ 2% lactic acid added [3.8×10^8] (16.0%). In the absence of proteolipid: $\bullet$ — $\bullet$ none [1.3×10^8] (16.4%), $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 0.5% lactic acid [1.1×10^8] (15.9%), $\blacksquare$ — $\blacksquare$ 1% lactic acid [1.0×10^8] (14.6%), $\blacksquare$ — $\blacksquare$ 1.5% lactic acid [7.0×10^7] (13.1%), $\bullet$ — $\bullet$ 2% lactic acid added [7.0×10^7] (12.3%).

Yeast population per ml, after 3 days, and the final concentration of alcohol formed are shown in brackets and in parentheses respectively

Photo. A

Photo. B

Fig. 7. Sake Yeast Kyokai No. 7 Grown in Lactic Acid Containing Medium ($\times 1000$).

The yeast was cultured for 7 days in the synthetic medium (ammonium citrate as N source) containing 1% lactic acid: no aggregation was observed, as shown in Photo. A, in the presence of 1% koji mold proteolipid; the aggregation was slightly observed, as shown in Photo. B, in the absence of proteolipid.

母増殖および炭酸ガス出量を増大させた。つまり PL は、酵母の乳酸耐性を増大させた。顕微鏡観察の結果, Fig. 7 のとおり, PL 無添加では細胞凝集の傾向がみられ, 7 日目ですでに酵母細胞の変形, 内容物の沈着がみられた。一方, PL 添加では, そのような細胞の凝集や異常は認められなかった。しかし乳酸は, PL 添加の場合でも, 高濃度アルコール生成の抑制を示した。

6. 嫌気条件下の酵母増殖と高濃度アルコール生成に及ぼす PL の効果

さきに黒麹菌体添加の場合の酵母増殖は, 嫌気による影響をほとんど受けないことを報告した。本報では麹菌 PL の効果を検するために基本合成培地 150 ml を 250 ml 容発酵栓付発酵瓶に注加し, 1% PL 添加あるいは無添加とし, 流動パラフィンを重層し, 培地中に高純度窒素ガスを 15 分間通気して溶存酸素を除去し, これをベックマン型溶存酸素計で検した後, 常法の前培養酵母を接種して発酵試験を行なった。Fig. 8 のとおり, 嫌気-PL 無添加では対照の静置-PL 無添加に比して増殖およびアルコール生成はともに低値を示したが, 嫌気-PL 添加では, 静置-PL 添加と同程度の増殖と生成アルコール濃度を示した。つまり, PL の添加によって嫌気条件下でも酵母増殖促進と高濃度アルコール生成が認められた。

7. 米および米麴の PL 含量

既報^(8,10)のように, 米麴添加と同様, 米の多量添加にも高濃度アルコール生成効果が認められた。米および米麴の PL 含量の概略値を明らかにするために, 75% 精白

Fig. 8. Effect of Proteolipid on Alcohol Formation in Anaerobic Cultures.

In fermentation tests, ●—● none (16.8%), ○—○ koji mold proteolipid 1% added (20.4%). In anaerobic cultures, ●---● none (14.3%), ○---○ proteolipid 1% added (20.1%).

Final concentration of alcohol formed is shown in parentheses.

米とそれを原料とした米麴とから, PL を Folch 法にしたがって分離し, 凍結乾燥後秤量した。その結果を Table I に示す。麴製造歩合 1.16 から計算すると, 製麴によって PL 量は約 36 倍に増加したことになる。

Table I. Proteolipid Contents in Rice and Rice-koji

	Proteolipid content
Rice	0.08 g/kg
Rice-koji	2.50 g/kg

Proteolipid contents were shown in the weight of the lyophilized preparations of proteolipid which were extracted by Folch's method from rice and rice-koji made from the rice. Milling ratio of rice : 75%, moisture of rice : 11.5%, moisture of koji : 17.6%, koji obtained from rice in 116% yield.

8. 米のプロテオリピドとプロテインボディの効果

米胚乳中のたん白質と脂質の大部分は、プロテインボディ (PB) と呼ばれる米胚乳の顆粒中に存在すると考えられているから⁽¹²⁾, 前項の精白米 PL は米 PB に由来すると推論される. 米 PL および米 PB の高濃度アルコール生成に対する効果を検するため, 米 PL および米 PB を分離し, それぞれ添加発酵試験を行なった. Fig. 9 の

Fig. 9. Effects of Rice and Rice Components.

Fermentation tests : ●—● none [9×10^7] (14.6%), ○—○ protein body 1% added [3.8×10^8] (21.0%), △—△ rice grain proteolipid 1% added [4.0×10^8] (20.7%), □—□ rice powder 20% added [3.0×10^8] (20.8%), ×—× oryzenin 3% added [1.0×10^8] (19.5%).

Yeast population per ml, after 3 days, and the final concentration of alcohol formed are shown in brackets and in parentheses respectively.

とおり, 米 PL および米 PB は, 少量添加で米粉やオリゼニンより, さらに顕著な酵母増殖促進効果と高度濃アルコール生成効果を示した. さきに発酵副生有害物質の吸着作用を認めたオリゼニンも, 米 PB に存在すると考えられているから⁽¹²⁾, 米粒中の高濃度アルコール生成因子の本態は PB であると考えられる. また, 武藤ら⁽¹⁴⁾によって見いだされた“米粒効果”も, ガラス玉が示すような単なる固形物効果だけによるものではなく, また既報の米多量添加や米糠添加による高濃度アルコール生成も, それらのたん白質部分による発酵副生有害物質の吸着除去作用だけによるものではなくて, 米 PB の PL としての作用が関与していると推考される.

考 察

PL は 1951 年, Folch ら⁽¹¹⁾によって初めて分離された脂質-たん白質複合体で, 水不溶の点でリボたん白質と区別される. 最も詳細に研究されたのは牛腦 PL であるが, その構造と機能については不明の点が多い.

本報では, 麹菌 PL 添加合成培地使用による補糖培養法によって, 20% 以上の高濃度アルコール生成が, 15 日という短期間に実験室的方法によって達成された. 既往の酵母増殖因子と異なっており, 麹菌 PL の特性は酵母増殖促進作用と, さらに高濃度アルコール生成作用を示す“高濃度アルコール生成因子”である点に認められる. この特性は, PL のもつ脂質-たん白質複合体構造に由来すると考えられる. 麹菌 PL は作用の類似性から, 既往の“酵母のアルコール耐性*に有効な麹固形部”や, “麹菌体の酵母増殖の耐アルコール性増強因子”などの本態と推察される. 米麹は各種の酵素, 生長素のほか PL を含有し, もろみという酵母が増殖と発酵とを営む環境の形成に重要な役割を果たしている. 本報では麹菌 PL が, 低温, 乳酸酸性, 濃糖, アルコール存在, さらに嫌気条件という一般微生物の増殖に不適当な条件でも, 酵母を旺盛に増殖させることが明確となったから, 開放系無殺菌でありながら雑菌を淘汰して清酒酵母を強力に増殖させ, 正常な発酵を営むもろみの機能が, いっそう

* 高濃度アルコール生成現象を酵母の側から論ずるとき, “酵母のアルコール耐性”といい, 「酵母自身が生成したアルコールに耐えて, いっそう高濃度のアルコールを生成する酵母の能力」を意味し, 発酵試験による生成アルコールの限界濃度で表わす. これに対し, “耐アルコール性”とは「添加アルコールに対する酵母生理機能の耐性の程度」を指している.

明確となった。この際、もろみでは、清酒醸造が並行複発酵という独自の形式で行なわれ、米の PB や米麴の麴菌生体膜部分（主成分は PL）が常に酵母と共存する結果、嫌気状態における高濃度アルコール生成要因が満足され、もろみの発酵力は増強され保護されて、高濃度アルコールが容易に生成されると考えられる。他方、醗では 1% 前後の乳酸が存在する点で、もろみとは異なっている。福井ら⁽¹³⁾は、1.5% 乳酸を含む合成培地で清酒酵母の静置培養を行なうと、対数増殖期から酵母の凝集がはじまり、定常期では死細胞が著しく増加することを見いだしている。本報でも、PL 無添加では酵母増殖能は乳酸によって阻害されたが、PL 添加では乳酸による酵母増殖の阻害はみられず正常に増殖して、 5×10^8 /ml に達した。PL のこの機能によって、醗では乳酸の存在にもかかわらず、酵母が高密度に増殖するものと推考される。しかし、PL の存在下でも、乳酸がもろみにおける高濃度アルコール生成の抑制傾向を示したことは、醗ともろみの機能的差異を示唆するものである。また、20% 以上の高濃度のアルコールが短期間に生成したことから、並行複発酵のモデル実験における PL 添加合成培地使用による補糖培養法の適合性が明確となった。

米にも PL が含有されており、米 PL およびその存在部位と考えられる PB は、高濃度アルコール生成因子としての作用を示した。しかし、75% 精白米の PL 含量は麴に比して 36 分の 1 程度であるから、実際の酒造では主として麴 PL が、もろみの高濃度アルコール生成に関与していると考えられる。さらに、米 PB は胚乳の表層ほど高密度で存在している。したがって、嫌気状態を助長する仕込の大型化と、PL 含量を減少させる精白歩合の向上、および麴使用歩合の低下とが、ともに極限に達した場合には、発酵の不安定化を招来する可能性が推察される。

PL は動物、植物、微生物各界に広く分布しているから、米、米糠、人参、大根、麴菌体、酵母菌体内顆粒、牛筋肉、牛肝臓など、既報^(7,15)の一連の酵母増殖や高濃度アルコール生成に有効な添加物は、生体膜成分である PL を多少の量的差異はあるにしても、いずれも含有していると考えられ、したがって、それら添加物の有効成分の本態は PL であると推察される。麴菌 PL の化学組成や、発酵力増強の機作については統報する。

要 約

清酒醸造における高濃度アルコール生成の機構を明確にするため、完全合成培地に協会 7 号酵母を 3×10^7 /ml 接種し、各種条件下で補糖培養による発酵試験を行ない、次の結果をえた。

(1) 麴菌プロテオリビドは、酵母増殖促進と高濃度アルコール生成の両作用を示す“高濃度アルコール生成因子”であることを見いだした。

(2) 本因子は酵母増殖の耐低温性、耐乳酸性、耐糖性、耐アルコール性をそれぞれ増強し、また嫌気条件下でも顕著な高濃度アルコール生成作用を示した。したがって本因子は、醗という乳酸存在環境下での酵母増殖促進と、もろみという嫌気環境下での高濃度アルコール生成に重要な役割を果たしていると考えられる。

(3) 米粒プロテインボディが高濃度アルコール生成因子の作用を示したことから、いわゆる米粒効果の機作を考察した。

(4) 本因子の含量は、製麴によって約 36 倍に増加した。

- (1) 山崎何恵：発酵協会，**16**，335 (1958)。
- (2) 井上貞三，高岡祥夫，秦 昌造：発酵工学，**40**，511 (1962)。
- (3) 福井三郎，谷 喜雄，岸部忠信：，同上，**33**，59 (1955)。
- (4) 中西 透，灘井幸明，照井堯造：同上，**38**，564 (1960)。
- (5) 山城敬一，下出光男，谷 喜雄，福井三郎：同上，**44**，602 (1966)。
- (6) 林田晋策：化学と生物，**9**，648 (1971)。
- (7) 川原田肇，林田晋策，本江元吉：発酵工学，**48**，29 (1970)。
- (8) 本江元吉，林田晋策，井上 繁，小泉隆司，川原田肇：農化，**41**，630 (1967)。
- (9) 川原田肇，古賀 肇，林田晋策，本江元吉：農化，**41**，640 (1967)。
- (10) 川原田肇，林田晋策，本江元吉：発酵工学，**47**，682 (1969)。
- (11) J. Folch and M. B. Lees：J. Biol. Chem., **191**，807 (1951)。
- (12) H. Mitsuda, K. Yasumoto, K. Murakami, T. Kusano and H. Kishida：Agr. Biol. Chem., **31**，293 (1967)。
- (13) 谷 喜雄，下出光男，角野一成，福井三郎：発酵工学，**41**，445 (1963)。
- (14) 武藤 浩：醸造協会，**57**，819 (1962)。
- (15) 川原田肇，林田晋策，本江元吉：発酵工学，**47**，689 (1969)。