[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.62, No.11, pp.1649~1654, 1988]

Rhizopus 菌による酒類製造に関する研究 (第2報) ——蒸米上に繁殖する *Rhizopus* 菌の選定

月岡 本, 廣井忠夫, 鈴木恒夫
(新潟県醸造試験場)

昭和 63 年 4 月 11 日 受 理

Alcoholic Beverage Production with Genus *Rhizopus* (Part 2) ——Selection of the *Rhizopus* Strain Suitable for “Sake” Brewing

Mototsugu TSUKIOKA, Tadao HIROI and Tsuneo SUZUKI

Niigata Prefectural Institute of Brewing, Suidocho 2, Niigata, 951

Seven strains of the genus *Rhizopus* were tested for use in “Sake” brewing: 4 strains were obtained from the IFO collection, 3 strains from rice-cake koji produced in Malaysia. *Rhizopus oryzae* IFO 4705 showed the highest mycelium growth and spore adhesion and the highest production of fumaric acid. Therefore, this strain was selected as the parent strain, and its mutant strains were obtained by treatment of the parent strain with ultraviolet rays. One of the mutants, U-12 strain, produced the highest mycelium growth and spore adhesion and produced the same favorable flavor as the parent strain.

(Received April 11, 1988)

緒 言

Rhizopus 菌を酒類製造に利用する場合、この菌は、*A. oryzae* 菌と異なり蒸米に生育しにくいため生米を利用しているのが常である⁽¹⁾。

しかしながら、生米を利用すると雑菌が混入しやすく、再現性よく良質な麴を得ることが困難となる。良質な麴を作るためには、是非とも原料米を蒸して殺菌しておく必要があると考えられる。

前報⁽²⁾において、*Rhizopus* 菌が蒸米に生育しにくく、生米に生育しやすいのは、米に含まれるタンパク質の熱変性のみによるのではなく、遊離のアミノ酸組成や量にも原因があるのではないかと考えた。そこで、米の浸漬水に適当なアミノ酸を添加して得た蒸米上には、*Rhizopus* 菌が良好に生育することを確認した。また、清酒原料米(品種・五百万石)の玄米、白米(真精米歩合 72.3%)、蒸米についてそのアミノ酸組成を測定し顕著な差を認めた。さらに *Rhizopus* 菌の培地としてよく用いられる麴エキス、バレイショエキス中のアミノ酸組成とも比較して、*Rhizopus* 菌の生育に必要でしかも蒸米に欠けているアミノ酸の種類と量について報告した。

本報では、*Rhizopus* 菌の産生する酸味と特徴ある香味を清酒製造に利用して新しいタイプの清酒を作ることとを目的として、財団法人発酵研究所(以下 IFO とよぶ)保存の *Rhizopus* 菌 4 株、マレーシアの餅麴から分離した 3 株の計 7 株について検討を加えた。その結果、芳香性と産生した有機酸の柔らかさが、香味に特徴ある清酒を製造するのに適していると思われる菌株 *R. oryzae* IFO 4705 を得た。IFO 4705 を親株とした変異株のなかで親株の 1.3 倍の菌糸繁殖能力を有する変異株 U-12 を得、蒸米上での特性を検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株 使用した *Rhizopus* 菌は下記に示す 7 株と *R. oryzae* IFO 4705 から誘導した変異株 18 株のうち優良な変異株 U-12 を使用した。なお、変異株は IFO 4705 の分生胞子に紫外線を照射して得られた変異株のうち優良なものを分離した。対称としての *Aspergillus oryzae* は市販の種麴(秋田今野製)を使用した。

- 1) *Rhizopus oryzae* IFO 4705
- 2) *Rhizopus oryzae* IFO 4716
- 3) *Rhizopus japonicus* IFO 4758

- 4) *Rhizopus oryzae* IFO 4804
- 5) *Rhizopus* unknown-1 Malaysia (Malaysia-1)
- 6) *Rhizopus* unknown-2 Malaysia (Malaysia-2)
- 7) *Rhizopus* unknown-3 Indonesia (Malaysia-3)

2. 胞子の着生 前報⁽²⁾の実験結果で見られるように, バレイショエキスには *Rhizopus* 菌の生育に適したアミノ酸の含有量が多いので, これを用いて次の培地を調製した. すなわち, バレイショ (昭和 58 年北海道産の「男爵」を皮を除いて使用) 200 g に水 1 l を加え, 沸とう湯浴中で 2 時間抽出し, 抽出液は東洋濾紙 No. 2 を用いて濾過し, 濾液に水を加えて 1 l とした. これにスクロース 20 g, 寒天 20 g を加え, pH 5.6 に調整した.

上記の培地 10 ml を直径 9 cm のシャーレに入れ, 各供試菌株を 1 白金耳シャーレの中心部に接種し, 30°C で 5 日間培養した. 胞子数の測定は, 菅野⁽³⁾の方法に準じて培地一面に繁殖した菌糸をはがしとり, 0.1% Tween 80 水溶液 100 ml を加え, ブレンダーで胞子を分散させた後, 希釈してヘマチトメーターにより行った.

3. 有機酸生産性と酵素力価 200 ml 容三角フラスコに, 前述のバレイショ・スクロース培地 (寒天を含まない) を 100 ml 入れ, 常法どおり殺菌後, 各供試菌株を 1 白金耳接種し, 30°C で 5 日間静置培養した. 菌体重量は, 菌体を東洋濾紙 No. 2 の濾紙で濾別後, 菌体に水 25 ml を 2 回加えて培地を洗浄除去し, 菌体を 105°C, 3 時間乾燥した後秤量した.

培養液の酸度, 総合糖化力, α -アミラーゼおよび酸性プロテアーゼの測定は, 上記の濾液を用い国税庁所定分析法⁽⁴⁾により行った. グルコアミラーゼと酸性カルボキシペプチダーゼの測定は岩野⁽⁵⁾の方法によった.

4. 有機酸の測定 前述の濾液をウォーターズ社製 Sep-pack C₁₈ カートリッジを通して, 試料中の夾雑物を除去し前処理を行った後 HPLC を用いて含有される有機酸の分離定量を行った. 分析条件は, 前報⁽⁶⁾に従い次のとおりである.

使用機器: Shimadzu LC-4 A, Column SCR-101 H 7.9 mm ϕ ×30 cm, Mobile phase pH 2.2 H₃PO₄, Pressure 35 kg/cm², Flow rate 0.8 ml/min, Detector UV-210 nm, Sample size 10 μ l.

5. 官能検査 200 ml 容三角フラスコに, Table I に示す 5 種の培地 (寒天を含まない) 100 ml を入れ, 殺菌後, 各供試菌株を 1 白金耳接種し, 5 日間培養した後, 培養液の官能試験⁽⁷⁾を 5 名のパネラーによってプロファイル法で行った.

なお, ヘンネベルヒ氏液は, カビ用合成培地⁽⁸⁾のなかで *Rhizopus* 菌が最も良好に増殖したため用いた. 麴エキスは前報⁽²⁾の方法により調製し, 清酒製造への適否を検討するため, 麴エキスのなかに清酒原料米 (品種・五百万石) の白米 (真精米歩合 72.3%) あるいは同蒸米を入れ試験を行った. また, 前報⁽²⁾で得られたアミノ酸液浸漬白米の蒸米を培地にした麴は, 次項の方法で Ala を用いて調製し, 肉眼的観察と官能検査を行った.

6. 蒸米上での醸造特性 蒸米の調製は, 前報⁽²⁾により浸漬水に添加したアミノ酸のなかで *Rhizopus* 菌の繁殖が良好で水に溶解しやすい Ala を使用し, 添加量を変え, 白米を浸漬して行った. 得られた蒸米を 35°C まで冷却した後, *R. oryzae* IFO 4705 とその変異株 U-12 の乾燥菌体を原料白米 10 g に対して 30 mg ずつ接種し, 35°C で 3 日間培養した後, その酸生産力と香味について検討を加えた.

Table I. Compositions of Media for Genus *Rhizopus*

Media	Composition
Henneberg's solution	glucose 100 g, peptone 10 g, MgSO ₄ ·7 H ₂ O 2 g, KNO ₃ 2 g, (NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄ 2 g, CaCl ₂ 0.1 g, H ₂ O 1 liter.
Potato extract	potato 200 g/1 liter H ₂ O, sucrose 20 g.
Koji extract-1	koji 1 kg/3 liter H ₂ O.
Koji extract-2	koji extract-1 100 ml, 72.3% polished and non-steamed rice 30 g.
Koji extract-3	koji extract-1 100 ml, 72.3% polished and steamed rice 30 g.
Polished and steamed rice	Ala 0.3% (w/v) solution 30 ml, 72.3% polished and steamed rice 10 g.

結果および考察

1. 胞子の着生

菌糸の繁殖および胞子の着生状況について肉眼的観察を行い、胞子数の測定結果を Table II に示した。菌糸の繁殖は、変異株 U-12 が最も良好で、IFO 4705 と 4758 および Malaysia-2 の菌株がこれに続いて良好であった。胞子の着生は、IFO 4705 と U-12 が最も早く、胞子数も他の菌株の 10 倍以上でとび抜けてよかった。

2. 有機酸の生産性と酵素力価

この特性は清酒製造に適する優良菌株を選定するときの重要な条件となる。

その結果を Table III に示した。培養液の酸度の最も

高い菌株は、変異株 U-12 であり、次いで IFO 4705 と Malaysia-2 であった。

酵素力価については、いずれの菌株も α -アミラーゼ活性が低く、*A. oryzae* と対称的な違いを示している。酸性プロテアーゼは、変異株 U-12 および IFO 4705 が強く、*A. oryzae* よりも強力である。さらに総糖化力については、*A. oryzae* より IFO 4705、IFO 4716 および変異株 U-12 が強い酵素力価を示した。

菌体重量は、変異株 U-12 が最も大きく、増殖も早い。これは Table II の菌糸、胞子の繁殖力とも一致している。Fig.1 には、変異株 U-12 の生育と有機酸の生産性の経時変化を親株の IFO 4705 と比較して示した。

Table II. The Growth of *Rhizopus* Mycelium and Spores

Strain	Growth of mycelium		Adhesion of spores		Number of spores ^a
	3 days	5 days	3 days	5 days	
IFO 4705	+++	+++	+++	+++	470×10^7
IFO 4716	+	++	+	++	96×10^7
IFO 4758	+++	+++	+	+	44×10^7
IFO 4804	++	++	+	+	62×10^7
Malaysia-1	+	++	+	+	20×10^7
Malaysia-2	+++	+++	+	+	18×10^7
Malaysia-3	+	++	+	+	26×10^7
U-12	+++	+++	+++	+++	530×10^7

+~+++ Measure in growth of mycelium and adhesion of spores.

^a Number of spores in a Petri dish of ϕ 9 cm.

Table III. Acid Production and Enzymatic Activity of *Rhizopus* Strains and *Asp. oryzae*

Strain	TA	A	AP	TS	DWM(mg)
IFO 4705	3.4	0.9	0.405	67	354
IFO 4716	2.2	0.6	0.247	67	265
IFO 4758	1.9	<0.5	0.201	16	182
IFO 4804	1.8	<0.5	0.183	24	203
Malaysia-1	2.2	<0.5	0.230	31	226
Malaysia-2	2.5	0.6	0.161	41	296
Malaysia-3	1.8	<0.5	0.147	22	149
U-12	3.5	1.0	0.440	65	482
<i>Asp. oryzae</i>	1.1	82.0	0.275	41	712

TA : Total acidity.

A : α -Amylase (unit/1 ml culture medium).

AP : Acid protease (optical density at 660 nm/60 min/1 ml culture medium).

TS : Total saccharification power.

DWM : Dry weight of mycelium.

Fig. 1. Time Course of Acid Production by *Rhizopus oryzae* (IFO 4705) and *R. oryzae* U-12 in stationary culture. O, MDW (mycelium dry weight) of U-12; ●, MDW of IFO 4705; △, TA (total acid) of U-12; ▲, TA of IFO 4705.

IFO 4705 は, 5 日目で菌体重量が最高になり, その後はほとんど変化が見られなかった. 一方, 変異株 U-12 は, 親株より菌体重量は大きく, 7 日目で最高となり, その後変化なかった. 有機酸の生産性は, 両株に顕著な差が見られず, 菌体重量が最高になった 1 日後および 2 日後から減少し始めた.

3. 有機酸組成

各菌株のバレイショ・スクロース培養液中における有機酸組成を Table IV に示した. 菌糸の繁殖と胞子の着生が最も良好で酸生産性の高かった変異株 U-12 は, フマル酸が非常に多く, 次いでリンゴ酸, コハク酸が多い. 酢酸, ピログルタル酸は少ない.

フマル酸と酢酸を除いて他の有機酸は親株 (IFO 4705) より多い. 一般に *Rhizopus* 菌は, *A. oryzae* 菌に比較してフマル酸が多く, コハク酸が少ないといえる.

4. 官能試験

各菌株を前述した 6 種類の培地で培養し, 官能試験し

た結果を Table V に示した. 評点の 1 は最もよい, 2 はややよい, 3 は普通, 4 はやや悪い, 5 は悪いとして, 5 名のパネラーが 1~5 点評価し, 各試料ごとに平均したものである. 評点が, 2.5 より少ないもの (表中アンダーラインをした) を官能試験で良好として選択した. ヘンネベルヒ氏液 (Test No. 1) では, Malaysia-3, IFO 4705, U-12, バレイショ抽出培地 (Test No. 2) では, IFO 4804, IFO 4705, IFO 4758, U-12, 麴エキス培地 (Test No. 3) では, U-12, IFO 4705, IFO 4758, Malaysia-1 がそれぞれ良好であった. 麴エキス培地に生の白米を加えた試験 (Test No. 4) では, IFO 4705, U-12, IFO 4804, Malaysia-2 が良好であった. 麴エキス培地に蒸米を加えた試験 (Test No. 5) では, Malaysia-1 および 2 を除いて他は良好であり, とくに U-12 が評点 1.4 と Table V 中で最もよかった. アミノ酸液浸漬白米の蒸米を培地にした麴の試験 (Test No. 6) では, 菌糸の繁殖の状態を肉眼的に観察した評価も加味して評点

Table IV Composition of Organic Acids Produced by Various *Rhizopus* Strains

Strain	Citric	Malic	Succinic	Lactic	Fumaric	Acetic	Pyro-glutamic	Total
IFO 4705	54	150	115	93	1240	27	11	1690
IFO 4716	81	225	172	106	729	2	72	1387
IFO 4758	149	152	170	267	547	2	56	1343
IFO 4804	54	263	230	213	190	2	33	985
Malaysia-1	76	144	125	86	590	3	21	1045
Malaysia-2	117	151	127	91	665	3	23	1177
Malaysia-3	49	134	103	167	534	2	44	1033
U-12	57	242	230	108	1031	7	18	1693
<i>Asp. oryzae</i>	54	288	415	146	79	2	61	1044

(ppm in culture medium)

Table V. The Functional Selection on the Flavour Production of Various *Rhizopus* Strains

Strain	Test No. ^a						Profile
	1	2	3	4	5	6	
IFO 4705	2.4	2.2	1.8	2.0	1.6	1.8	like melon, like diacetyl
IFO 4716	2.8	3.8	2.6	3.6	2.4	3.0	like drain, acid smell
IFO 4758	2.8	2.4	1.8	2.8	1.8	1.8	acid smell
IFO 4804	3.0	2.0	2.6	2.4	2.0	2.4	sweet and burnt smell
Malaysia-1	4.0	3.8	2.4	4.2	3.2	3.2	like diacetyl, like drain
Malaysia-2	2.2	3.2	3.0	2.4	2.8	3.2	sweet and acid flavour
Malaysia-3	3.4	3.0	2.8	3.6	2.2	2.2	acid smell, like drain
U-12	2.6	2.4	1.6	2.2	1.4	1.8	like melon, like apple

^a Test 1, Henneberg's solution; Test 2, Potato extract; Test 3, Koji extract; Test 4, Non-steamed rice in Koji extract; Test 5, Steamed rice in Koji extract; Test 6, Polished and steamed rice (Table 1).

Table VI. Influence of Amino Acid on Koji-mold

Strain	Ala. concentr. (%) in steeping water	A	AP	GA	ACP	TA
IFO 4705	0.2	11.0	0.231	69.4	641	2.5
	0.3	12.4	0.284	78.5	721	3.0
	0.4	13.5	0.318	82.8	853	3.3
U-12	0.2	12.3	0.237	70.1	564	2.7
	0.3	12.5	0.299	80.0	694	3.2
	0.4	13.8	0.327	84.9	842	3.3
<i>Asp. oryzae</i>		90.0	0.150	154.2	4063	0.15

A : α -Amylase (unit/g-dry matter).

AP : Acid protease (optical density at 660 nm/60 min/g-dry matter).

GA : Glucoamylase (mg-glucose/60 min/g-dry matter).

ACP : Acid carboxypeptidase (μ g-tyrosine/60 min/g-dry matter).

TA : Total acidity.

を示した。Table II および Table III で得られた結果と同じく、菌糸の繁殖は U-12, IFO 4705, Malaysia-2 が良好であった。香気はいずれも No.1~No.5 までの試験よりは弱かったが、IFO 4705, U-12, IFO 4758 が良好であった。次いで、Malaysia-3, IFO 4804 も良好で Test No.5 に似た結果が得られた。

6 種類の培地試験のいずれでも官能結果が良好であったのは、IFO 4705 と U-12 であった。香りも多少ダイアセチル臭はあるものの、メロンのような芳香も感じられた。以上の実験結果から、IFO 4705 を親株とする変異株 U-12 は、菌糸の繁殖と胞子の着生が良好で、しかも親株と同様な芳香性と産生した有機酸の柔らかさが、香味に特徴を有する清酒を製造するのに適すると思われるので、変異株 U-12 を優良菌株として選定した。

5. 蒸米上での特性

ここで優良菌株として選抜した U-12 について、実際に蒸米上で培養してその特性を評価した。Ala を添加した浸漬水を用いて白米を浸漬し、これに変異株 U-12 および IFO 4705 を培養し、得られた麹について、酵素活性および酸生産性の変化を検討した。

その結果を Table VI に示した。酸性プロテアーゼとグルコアミラーゼの活性にアミノ酸添加効果が認められ、アミノ酸添加量の増加により強くなった。変異株 U-12 は酸性プロテアーゼとグルコアミラーゼ活性のいずれも親株の IFO 4705 より活性が強かった。酸生産性は、アミノ酸添加量の増加にしたがって増加した。変異株 U-12 と親株の IFO 4705 の両株の間に顕著な差は認められなかった。窒素源の添加効果については、菅野ら⁽⁸⁾はペプトンを、田中ら⁽⁹⁾はカザミノ酸について報告

している。

要 約

Rhizopus 菌の有機酸生産能力と特徴ある香味を清酒製造に利用する目的で、IFO 保存の *Rhizopus* 菌 4 株とマレーシアの餅麴から分離した 3 株の計 7 株について、菌糸の繁殖、胞子の着生について検討した。その結果、供試菌株中で IFO 4705 が菌糸の繁殖、胞子の着生が良好であり、高い有機酸の生産性を示した。

また、有機酸はフマル酸が非常に多く、その他の有機酸は少なかった。各菌株の培養液とアミノ酸液浸漬白米の蒸米を培地にした麹を官能試験した結果、いずれの試験でも IFO 4705 が良好であった。

そこで、IFO 4705 を紫外線処理して得た変異株 U-12 と親株 IFO 4705 の生育に伴う酸生産性の変化と浸漬水に Ala を添加処理した蒸米での特性を比較検討し、変異株 U-12 が親株の IFO 4705 より繁殖が早く、有機酸の生産性に顕著な差がなく、しかも親株と同様な芳香性と産生した有機酸の柔らかさが、香味に特徴を有する清酒製造に適すると考え、変異株 U-12 を選定した。

本研究に種々有益なご助言を賜りました大阪府立大学教授上田博夫博士、同教授外村健三博士、信州大学名誉教授清水純夫博士に厚く御礼申し上げます。

- (1) 大場俊輝, 佐藤 信: 醸協, 78, 412 (1983).
- (2) 月岡 本, 廣井忠夫, 鈴木恒夫: 農化, 63, 1643 (1988).
- (3) 菅野信男, 藤井 均, 梅田修治, 福田 整, 佐藤 信: 醸協, 77, 333 (1982).

- (4) 村上英也:「国税庁所定分析法注解」, 日本醸造協会 (1973).
- (5) 岩野君夫, 風間敬夫, 布川弥太郎: 醸協, **71**, 383 (1976); 岩野君夫, 布川弥太郎: 醸協, **71**, 792 (1976).
- (6) 月岡 本, 廣井忠夫, 鈴木恒夫: 農化, **62**, 971 (1988).
- (7) 佐藤 信:「酒類の品質鑑定法」, 高陽書院, 1959, p.171.
- (8) 山口和夫, 山口辰良:「最新応用微生物学入門」, 技報堂, 1968, p.174.
- (9) 田中利雄, 岡崎直人: 醸酵工学, **60**, 15(1982).