

Table 14. Comparison between the amylo-process and Submerged amylase process

	Fermented Day	Residual Total Sugar %	Alcohol %	Fermentation Efficiency %	
Amylo process	7.3	1.02	6.86	83.37	475
Submerged amylase process	4.5	0.81	6.95	88.90	30

以上の如くアミロ法と比較した場合醱酵日数を短縮すると共に、醱酵歩合を向上せしめ得た。勿論液體麴法の仕込回数は少く生甘藷入荷時期の良好な原料であるため良成績となつたと云う事も考えられるがアミロ法の場合の生甘藷仕込<sup>9)</sup>(昭和10年12月中仕込回数66)の平均は残全糖1.00, 酒精分7.44%, 醱酵歩合86.30%であり之と比較しても尙液體麴法の場合が約2%の醱酵歩合の向上を示した。之等は既に報告<sup>3)</sup>した様に本法に於て使用する黒麴菌アマミラーゼの糖化の伸びがよい事, マルターゼが強い事, アミラーゼが耐熱, 耐酸性である事等の特質に由来するものであると考えられる。

### 要 旨

*Asp. Awamori spec* (Np 39) の液體麴によつて蒸煮醪を糖化しアミロ酒母を添加して酒精醱酵を行わしめる所謂液體麴法の工業化を確立せしめその工場成績について述べてアミロ法工場成績と比較して良好なる事を述べた。

1. 切干甘藷を主原料とし6回の仕込を行い醱酵時間70時間程度で88~89%の醱酵歩合を得た。
2. 生甘藷を主原料としては30回の仕込を行つたが醱酵時間100時間程度で平均88%の醱酵歩合を得た。
3. 前者の仕込に使用した液體麴の培地は玉蜀黍1%, 米糠2%, 麩3%, 硝酸ソーダ0.1%であるが後者は生甘藷9%, 麩1%, 尿素0.03%である。後者の培地では糖化力は前者と大差なかつたが液化力が稍々低かつた。醱酵成績には大差はない様である。
4. 液體麴主培養に接種する種菌は振盪培養によつて得たフラスコのもを接種しても又種菌培養タンクによつて得た稍々大量のもを接種しても大差はなかつたが菌體の繁殖速度或いは安全性等の點から種菌培養タンクを使用する事が管理上好ましい。
5. アミロ法工場成績と比較して液體麴法の醱酵成績が良好である事を指摘した。

終りに臨み終始御指導を賜つた阪大齋藤, 中村兩博士, 九大山崎博士, 廣大長西博士に衷心より感謝の意を表します。尙本研究の發表を御快諾下された森社長, 平山副社長に深謝致します。

### 文 献

- 1)~3) 室田, 猿野, 阿野: 本誌, 31, 179, 222, 282, 305, 357, 392, 488, 32, 8 (昭28, 29). 9) 木幡, 室田, 柴崎: 本誌, 15, 1055 (昭12) (昭和28, 11, 11 受理)

## 清酒麴菌の研究 (第5報) 米麴のイソマルトース分解力に就て

蔭山 公雄・杉田 脩 (山邑酒造研究所)

著者等は昨冬清酒醪の分析を行いつある際paper-chromatographyによりその糖組成を探索した所 isomaltoseのspotが留後4~10日頃に最も強くその後は順次弱まつて行く事を見出した。これにより醪中に isomaltose を分解する酵素のある事を推論し得たが、その後東北大麻生, 柴崎<sup>1)</sup>氏等の "非醱酵性糖に関する研究" により各種糸状菌により isomaltose の資化される事が報告されている。同氏等はこの事實から糸状菌の isomaltase 力 ( $\alpha$ -1,6 glucosidase) を類推され、又古くより TUCHIYA<sup>2)</sup>氏等は *Asp. miger* の一種が isomaltose を分解し、且 dextran<sup>3)</sup>をも分解し glucose を生成する事を認めている。然し isomaltose の純品を得る事の難しい爲かその他には isomaltase 力に関し多くの報文に接していない。近年 paper-chromatography により清酒中の未知糖の検索がしきりと行われ<sup>4)</sup> isomaltose が非醱酵性糖中の重要なものに考えられその酒質への影響に對する論議迄なされようとしているが、これが生成の過程については未だ明かではなく單なる澱粉分解物の醱酵残渣なるか或は transglycosidase<sup>5)</sup> 等による二次的生産物であるか詳らになし得ない。著者等はこれらの生成過程は一瀆措いて醪中の isomaltase 力が米麴からも由来し得るや否やを檢べる爲幸い N.R.R.L. の A. JEANES

博士より御惠送を賜つた isomaltose を用いて実験を行い、後述の如く通常の清酒用麹菌は程度の差はあれ明かに米麹とした際に isomaltase 力を有する事を確認した。前報<sup>7)</sup>に於て著者の一人は島田、水本と共に米麹の糖化型 amylase 測定法を一應探り得たので、製麹中の酵素力の推移をも合せ検し、これらの酵素力と isomaltase 力との関係に就ても考察を試みた。

実 験

A) 米麹中の isomaltose 分解力

i) 酵素液: 米麹10gに1% NaCl 100ccを加え、15°Cで1時間振盪浸出後、その濾液10ccに95% alcohol 40ccを加え全酵素を沈澱せしめ、これを遠心分離後25ccに fill up して酵素液とした。

ii) 酵素液中の isomaltase 力の確認: paper-chromatogram に単一の isomaltose の spot を得るだけの isomaltose 液に酵素液を加え40°C1時間pH 5.0で反応せしめた後、paper-chromatogram を作成した所明かに isomaltose の spot は弱まり glucose の位置に新たな spot を得、且反応液の還元力も増大した。

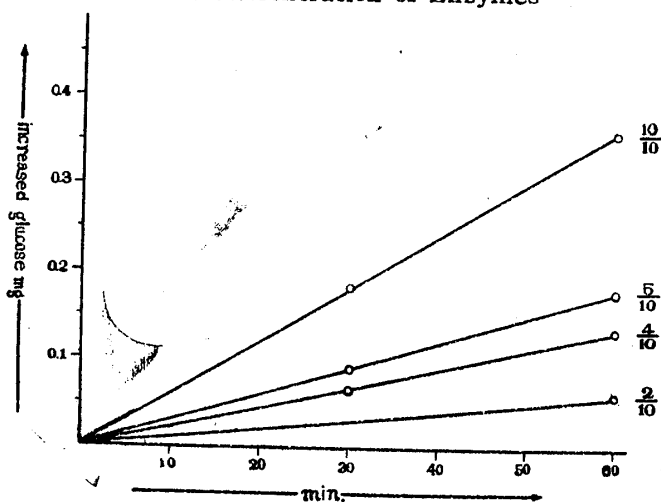
iii) isomaltase 力測定法の選定

a) 経時的分解曲線の作成

400r/cc isomaltose 液50cc, pH 5.0の M/10 acetateacetic acid buffer 10cc 及び酵素液10ccをよく混和し40°Cに保ち経時的にその還元力の増加及び生成 glucose 量を Somogyi 法により検べた所第1圖の如くなつた。

即ち反応液の還元力の増加は isomaltose が2分子の glucose に分解されたために起り、この条件では、transglycosidase の作用を考慮に入れる必要のない事が分つた\*。従つて以後は還元力の増加を以

Fig 2. Decomposition Grade of Isomaltose in Each Concentration of Enzymes



この結果1時間以内では isomaltase 力は pH 4.8~5.4の間で變化なく、他の pH ではそれぞれ減少する事が分つたので、力價測定にはpH 5.0を取る事とした。

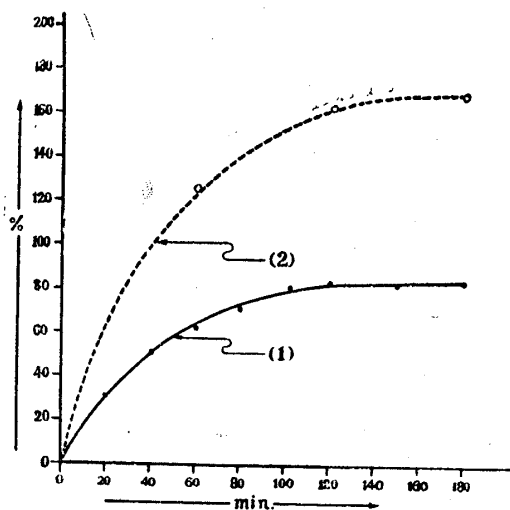
c) 力價の比較

上述の実験により大體分解率20%迄は殆ど直線的に glucose を生成する事を知つたので前報<sup>7)</sup>の考えに倣つてこの範圍に於て力價と増加 glucose が比例するかを調べた所第2圖の如くなつた。

その結果増加 glucose 量は酵素濃度に正比例する事が分つた。従つて著者等は次の方法で isomaltase 力を測定する事とした。即ち3本の20cc 薑線試験管にそれぞれ次の如く液を入れ、40°C1時間後 N-NaOH 0.5cc を添

\* PAN 氏等の研究によれば transglycosidase 力の測定は、反應基質濃度が、0.5%以上なければならない。

Fig 1. Decomposition of Isomaltose by komé-koji Extract.



$$(1) \frac{\text{increased reducing power}}{\text{original reducing power of isomaltose}} \times 100$$

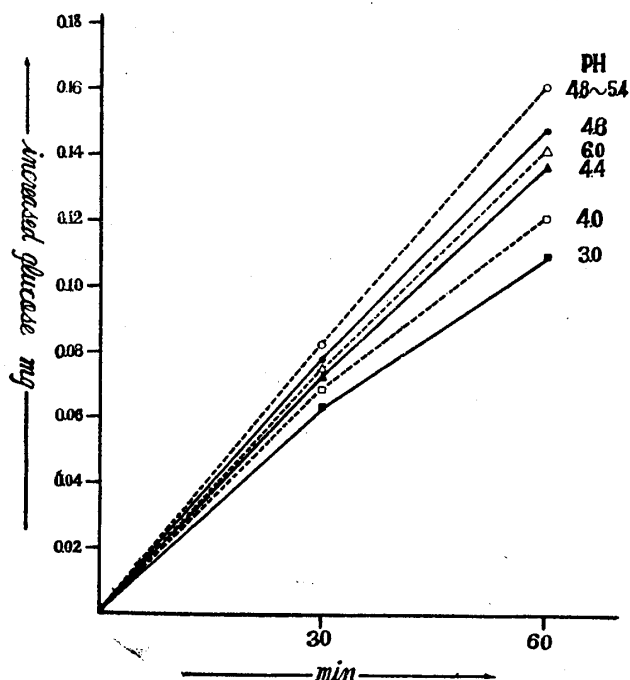
$$(2) \frac{\text{reducing power of formed glucose}}{\text{original red. power of isomaltose}} \times 100$$

て増加 glucose 量(新たに還元力を得た glucose 量)を計算する事とした。

b) optimum pH の決定

反應液の pH を種々變化させ各々40°Cにて1時間迄の経時 glucose 増加曲線を取つた所第3圖の如くなつた。(pH の測定はガラス電極(堀場製作所 Model H)を用いた。)

Fig 3. Optimum pH of Isomaltase Activity



加し酵素作用を止め、30~60分室温に放置後N-HClを用い中和しつゝ20ccに充し、それぞれ5 cc中の還元力をSOMOGYI法により調べ、各々A, B, C ccとし、(A-B-C) ccに相当する glucose mgを2.5倍(原酵素0.5cc當り)して力價とする。

- A { 400r/cc isomaltose 液10cc  
M/10 Acetate-Acetic acid Buffer (pH 5.0)2cc  
酵素液 2 cc
- B { 400r/cc isomaltose 液10cc  
Buffer (Aと同じ) 2cc  
蒸溜水 2 cc
- C { 蒸溜水 10cc  
Buffer (Aと同じ) 2cc  
酵素液 2 cc

iv) 菌株を異にする米麹の isomaltase 力及びその他の酵素力

$\alpha$ -amylase, 糖化型 amylase 測定法は後報<sup>8)</sup>記載の通り、又 maltase 力は isomaltase 力測定の際と

同様の前実験の後 isomaltose 液の代りに0.1% maltose 液を用いてこれと全く同様の方法を採用した。実験に供した菌株は当社で市販種麹より分離したA-3,B-1, F-18, F-36の4株及び東大坂口教室より分譲されたS-4-15の5株である。その結果を第1表に示す。

Table 1. Enzyme Activity of komé-koji

Strain	$\alpha$ -amylase	saccharogenic amylase	maltase	isomaltase	* iso/mal
A-3	31'	8.50	2.90	0.27	$\approx$ 1/11
B-1	31'	14.00	4.36	0.43	$\approx$ 1/10
F-18	149'	9.81	3.54	0.35	$\approx$ 1/10
F-36	26'	13.50	2.50	0.21	$\approx$ 1/12
S-4-15	39'	8.28	2.97	0.30	$\approx$ 1/10

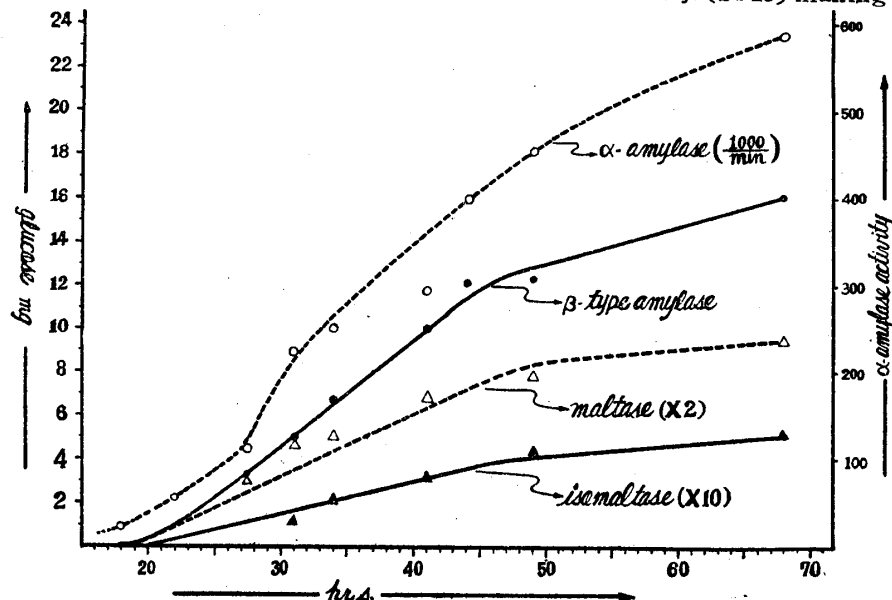
B) 製麹中の isomaltase 力の變化

代表菌としてS-4-15を選びこれを通常の製麹法に従い製麹しその過程中の酵素力を調べた所第四圖の如くなつた。

その結果仕舞仕事後は時間と共に  $\alpha$ -amylase 力, 糖化型 amylase 力, maltase 力, isomaltase 力は増加し, maltase/糖化型 amylase 及び iso-maltase/maltase は大體同一の値を示している。(この場合 maltase/糖化型 Amylase  $\approx$  3/8 isomaltase/

\* iso/mal = isomaltase activity/maltase activity

Fig 4. Transition of Enzymes Activities in Process of Koji (S4-15)-making



maltase=1/10) 従つて isomaltase 力は糖化型 amylase に伴つて消長するものと斷じて差支えないと考えられる。他の菌株についての結果も大體これと同様であり、たゞ maltase/糖化型 amylase の値が菌株により異なるのが認められるだけであるので本報にては省略する。

### C) 結晶 $\alpha$ -amylase の isomaltase 力

赤堀氏等の方法<sup>9)</sup>に従つて *Asp. oryzae* S-1-2 の液内培養液より抽出結晶化せしめた  $\alpha$ -amylase を用いて上述實驗と同様 isomaltase 力を検べたが、全くその作用を認める事が出来なかつた。又同時に、*L. mesentroides* により sucrose より合成した dextran (東大農学部塚野氏より分譲) に作用せしめたが、何等の還元力の増加を認められなかつたので、この  $\alpha$ -amylase は  $\alpha$ -1,6-glucosidase 力を有していないものと思われる。

### 結 言

米麴中の isomaltase 力を検べた所明かにこの作用があり且製麴中には糖化型 amylase 及び maltase 力に伴つて消長する。而して菌株が異つても isomaltase/maltase は大體一定した値<sup>10)</sup>を示した。又結晶  $\alpha$ -amylase (*Asp. oryzae*) には  $\alpha$ -1,6 glucoseidase 作用を認め得なかつたので米麴中の isomaltase 力も糖化型 amylase 系<sup>10)</sup>に包含されるものと思われる。isomaltase 作用の至適 pH は 40°C に於て pH 4.8~5.4 の間に存在する。

終りに臨み本稿の發表を許可された、山邑酒造株式会社社長山邑太左衛門氏、御校閲を賜つた下田研究所長、及び實驗に御協力下さつた島田四郎氏、大島惠美子嬢始め所員一同に深謝する。又貴重なる Sample を御惠送下さつた N. R. R. L の A. JEANES 博士及び適切なる御助言を頂いた東北大柴崎助教授に謝意を表する。

(第5回大阪醸造學會に於て口演)

### 文 献

- 1) 麻生, 柴崎 et al: 本誌, 31, 81, 311 (1953).
- 2) TUCHIYA, H. M.: J. Amer. Chem. Soc. 71, 3265 (1949).
- 3) TUCHIYA, H. M. et al: J. Bact. 64, 513 (1952).
- 4) 麻生, 柴崎, 山内: 本誌, 30, 301, 306 (1952).
- 5) PAZUR, J. H. and FRENCH D.: J. Biol. Chem. 196, 265 (1952).
- 6) 柴崎: 本誌, 31, 354 (1953).
- 7) 島田, 杉田, 水本: 本誌, 31, 498 (1953).
- 8) 島田, 杉田, 水本, 蔭山: 本誌, 32, 68 (1954).
- 9) 赤堀, 荻原, 池中: Proc. Japan. Acad. 27, 350 (1951).
- 10) 岡崎: 農化 26, 447 (1952).
- 11) PAN, S. C. et al: Arch. of Biochem. & Biophys. 42, 406, 421 (1953).

(昭和 28, 11, 2 受理)

## 清酒麴菌の研究 (第6報) 米麴のアミラーゼ測定法に就て

島田四郎・杉田 脩・水本邦彦・蔭山公雄 (山邑酒造研究所)

### 緒 言

米麴のアミラーゼ力を正確に測定する事が清酒醸造上極めて重要な事は論を俟たず、既に多くの研究者によりその方法を探られて來た。而して徳岡氏<sup>1)</sup>により行われた鹽類溶液の浸出法により、 $\alpha$ -アミラーゼ力に關しては充分目的を達し得られる様になつたが、糖化型アミラーゼはそのもの自體の性質の解明がおくれたため、適切な方法が見出されなかつた。

多くの人々によつて行われている糖化力測定法は、澱粉基質に酵素液を一定時間作用させ、その還元力の増加を以て糖化力とするものであり、本研究第1~3報<sup>2)-4)</sup>に於てもこの方法を採用し實驗を行つたが、 $\alpha$ -アミラーゼ自體が還元力を増加せしめる作用を持つ以上、 $\alpha$ 型及び糖化型アミラーゼの混在系である麴の浸出液の如きものでは當然糖化型アミラーゼ力のみを調べ得る方法とはならず、特に米麴に用いる菌株 *Asp. oryzae* は  $\alpha$ 型と糖化型の比率が他の糸狀菌類に比して著しく  $\alpha$ 型過剰になつている<sup>5)</sup>ので殊更この方法は適切とは云い得ない。岡崎氏は糸狀菌の  $\alpha$ -アミラーゼを澱粉に働かせた場合に沃度反應消失以前には殆ど醱酵性糖(グルコース, マルトース, マルトリオース)を生成しない事に着目し  $\alpha$ 型・糖化型混在系に於ける糖化力の測定に、醱酵性糖の定量を行う事を提唱され、各種糸狀菌の糖化力を比較されている。<sup>6)</sup>これは誠に妥當な方法と思われるが、最近富金原, 村松<sup>6)</sup>氏等の研究によれば、Taka-Amylase中の糖化型アミラーゼは、麥芽糖を生ずる事なく、澱粉より直接グルコースを生成する事を認められ、北原, 村田氏<sup>7)</sup>等は北野氏<sup>8)</sup>の Taka-maltase 説を肯定せられ、著