

江田賞受賞記念講演

清酒醸造に於ける澱粉及び蛋白質の変化と之に
關与する清酒麹菌の酵素について

山邑酒造株式会社 蔭 山 公 雄

唯今醸造学会より第1回江田賞を授与されました事は身に余る光榮に存ずる次第でございます。私は酒造に對する優良麹菌の選定のために、醸造中の成分変化と米麴の酵素力の關係を研究したのでありますが、その研究内容が受賞に値するかを考えますと過分の事に存じます。

願ますと私は当大学で22年前に故江田先生の清酒醸造に關する特別講義を受けましたので、先生の弟子の1人と申す事が出来るのでありますが、誠に不勉強な学生でありまして唯漫然と貴重な御講義を聞き流してしまい、今更残念に思つてゐる次第でございます。

卒業後は山邑酒造株式会社に入社致し、酒造に従事しておりますが、その間学会の皆様の御指導御鞭撻は勿論であります。又研究に重点を置く会社の方針と、優秀な共同研究者、同僚の協力により研究を取りまとめる事が出来ましたので、誠に幸運と申すべく常に感謝しておる次第であります。

以下受賞されました研究の概略を述べさせて戴きます

緒 言

近来清酒醸造は酒精添加或いは三倍增醸により見掛上の増産を余儀なくされているが、之の様な清酒に清酒本来の濃醇味を保持させるには如何にすれば良いか、が之の研究の動機である。これに對して酒造に於ける澱粉及び蛋白質の変化を詳細に調べ、之に關与する麹菌の酵素力との關聯性を明かにして目的とする酒質に適當な麹菌を選定し、之により製麴して酒造を科学的に管理しようと考えた。製麴技術も勿論之を輕視する事は出来ない。

当社では昭和23年来下田博士により優良麹菌の選定、及び之の麹菌による実地醸造が行われ成果を挙げたが、その後麹菌酵素の研究及び分析方法の進歩により、醸造中の成分変化及び米麴の酵素力について新しく検討する必要を認めて之の研究を行った。

従つて之の研究は一応その時々にも最適と考えた酵素

力測定法による酵素力を基準として優良と判定した麹菌の実地醸造への応用を行いつゝ更に検討すると云う方式となり、先ず醸造中の糖成分の変化を調べ、次に米麴の Amylase の性質とその測定法、及び米麴の Protease の性質とその測定法に關する研究を行い、更に醸造中の窒素成分の消化を明かにし、之等を総括して米麴の酵素力が醸造経過及び酒質に及ぼす影響を調べ上げた。醸酵工学雜誌に発表の順序が即ち研究の過程を示しているが、之等を総括して述べる。

(I) 澱粉及び蛋白質の加水分解物の分析法について

先ず之等の研究に於いて第一に根底となる事は澱粉及び蛋白質の分解物である糖成分及び含窒素物の測定法であるが、之については数多の方法から本研究に適當な方法を選定し、之等を検討し、又改良して研究の根底に誤りなきを期した。

澱粉の加水分解による生成糖分については先ず糖定量法として LEHMANN-SCHOORL 氏法の $\frac{1}{2}$ 縮少法を設定し、糖成分の分離定量法については SOMOGYI 氏のパン酵母の選択酸酵による方法、及び PANN 氏が之を改変した方法を検討し、一部を改良して測定に採用した。

又清酒醪、清酒、或いは糖化型 Amylase 作用液の如く殆んど maltose を含まない試料中の Glucose のみを単離定量する方法として PHILLIPS、及び CALDWELL 氏法を追試検討して改変法を設定した。

次に蛋白質の分解による含窒素物の測定はその組成成分が複雑な為簡便且つ適切な方法が少いのであるが、先ず簡便な操作により測定可能な HILLERS 及び VAN SLYKE 氏の窒素物分別測定法を検討して第二区分 N (Pepton, Peptide 態 N) を除去するのにタンゲステン酸ソーダより除去率が良く、且つ短時間に除去を行い得る燐タンゲステン酸を用いる変法を設定した。

又麴の蛋白分解力の測定法としては Casein を基質とし酵素分解液中の未分解蛋白質をトリクロール醋酸

9 (526) (蔭山) 清酒醸造に於ける澱粉及び蛋白質の変化と之に關与する清酒麹菌の酵素について

で除去した後に FOLIN-CIOCALTEU 氏の Phenol 試薬により発色せしめ蛋白分解物の総量を測る方法 (ANSON 氏法) を検討し、米麴の如く比較的蛋白分解力の弱い場合の測定法を設定した。

(Ⅱ) 米麴の Amylase 力及び Protease 力について

米麴の Amylase 力及び Protease 力については既に多くの研究があり、特に Amylase については故徳岡氏の詳細な研究があるが、米麴の両酵素の性質、組成が明かにされなかつた為に、一般には両酵素の性質に立脚した測定法によつておらず、研究の結果に首肯し難い点が多い。そこで前述の糖成分の分離定量、Protease 力の測定法等により米麴の之等の酵素の性質を明かにし、最も妥当な酵素力の測定法を設定し、米麴の麹菌々株による酵素力価の相違、及び製麴中の酵素力の変化を明かにした。

従来 Amylase 力、或いは Protease 力として総合的に測定されている力価を、各酵素の組成により可成各々単独の酵素力を測定して米麴の酵素力と正確に把握しようと考えたわけである。

米麴の Amylase については、 α -Amylase は赤堀氏の方法により得た黄麴菌の α -Amylase の結晶 (Take amylase-A) により、又糖化型 Amylase は米麴浸出液の α -Amylase を破壊した処理液により両 Amylase の性質を検討した。その概略は第 1 表の如くである。之等の Amylase の性質に基き、又酵素液作成法を検討して米麴の α -Amylase 及び糖化型 Amylase の力価を各々単独に測定する条件を定めて両 Amylase の測定法を設定した。

又米麴の Isomaltose 分解力については、その作用は 40°C で最適 pH 4.8~5.4 であり製麴中に Maltase 力に

第 1 表 米麴のアミラーゼの性質
浸出法 0.5% NaCl, pH 5.0 醋酸-醋酸ソーダ緩衝液 5cc/100cc

	生成醱酵性糖	pH, 温度の抵抗	測定法
α -	殆どマルトース	pH, 3.5 40°C, で完全失活	沃度反応消失
S-	殆どグルコース	同上にて完全残存	α -消失液による還元力の増加

伴つて消長するが、その比率は約 $\frac{1}{10}$ であり、尚黄麴菌の結晶 α -Amylase は Isomaltose 分解力を示さない事を認めた。

之等の Amylase 力測定法により麹菌々株を異にする米麴の Amylase 力価を調べ、その力価及び比率に相当の差異のある事を認め、又製麴中の力価の消長を追求して仕舞仕事 20 時間位迄はその増加率は衰えない事を明かにした。

米麴は一般に α -Amylase 力が強く低級 dextrine 及び maltose を可成り生成するので、無処理酵素液による総合糖化力 (全還元力) を以つて糖化型 Amylase 力を判定し得ず、両 Amylase 力を単独に測定するを要する。

米麴の Protease についても数多くの研究があるが、麹菌の Protease の研究が殆んどタカヂヤスターゼ、麴麴について追求されており、その場合に中性付近で働く trypsin 様の Protease が主力である為に、麹菌の生産する Protease はもつぱら中性付近で働く Protease であると断定し、米麴の Protease 力測定も主として之の酵素を追つていた。偶々吉田氏が黒麹は麴麴で酸性側で働く pepsin 様の Protease を多く生産する事を報告したので、黒麹と黄麴菌により米麴を造り、その浸出液を調べた処、麴とは逆に黄麴菌の米

麴に酸性側で働く Protease が多く、黒麹の米麴に少いと云う予想外の結果を得た。之により麴の原料により Protease の組成に大きな差異がある事を知り、米麴の Protease について詳しく研究を行う事になった。

そこで米麴の Protease 力を前述の測定法によりタカヂヤスターゼと比較しつゝその性質を検討して、アルカリ性 Protease 系は Casein に対して 37°C では最適 pH 7.0~7.5 で pH 3.0 以下ではその作用力を失ひ、酸性 protease 系は最適 pH 2.8~3.0 で pH 7.5 以下ではその作用力を失う事を認め、両 Protease 系の浸出条件を検討して、各々の力価を単独に測定する方法を設定した。

之により麹菌々株を異にする米麴の Protease 力を測定して通常の米麴の Protease は酸性 Protease 系が主体であり、同一菌株でも製麴原料により両 Protease 系の力価及び比率を異にし、特に糖成分によりその産生が著しく増加し、製麴原料米の精白度の低下と共にその力価が増加する事を認めた。又麴麴でも同様にアルカリ性 Protease 系が強く、麴麴の Protease 力から同一菌株による米麴の Protease 力を類推する事は殆んど不可能である事が明かとなつた。以上を一括すると第 2 表の如くである。

一般に米麴の Protease 力の測定は pH 5~7 に於け

(蔭山) 清酒醸造に於ける澱粉及び蛋白質の変化と之に關与する清酒麹菌の酵素について (527)

る蛋白質消化, 又はアミノNの生成を測定する方法が用いられるが, 米麴の両 Protease 系の性質から適切

な方法でないと考えられる。

尚 pH6.0 附近に最適pHを有する麴菌の生産する弱

第2表 米麴のプロテアーゼの性質
浸出法, 酸性: pH3.0乳酸-乳酸ソーダ緩衝液 アルカリ性: pH7.5磷酸カリ, ソーダ緩衝液

	酵 素 力		至適pH	作用停止pH	精白上昇による減少率	菌株による差異	フォルモール係数
	白 米	フスマ					
酸 性	大	小	2.8~3.0	7.5以上	小	少	大
アルカリ性	小	大	7.0~7.5	3.0以下	大	多	小

酸性 Protease について三浦氏, 安井氏等の研究があり, 米麴の之の Protease については鈴木, 布川氏等の研究があるが酸性 Protease 系が主力である事は変わらない。

又米麴の製麴中の Protease 力の変化を追求したが, 酸性 Protease 系は製麴時間と共に増加するが, アルカリ性 Protease 系は仕舞仕事後に一旦減少して再び増加する傾向があり, 米麴の如く云わば発育途上にある麴菌の酵素を利用する場合の力価の変動する原因となると考えられる。

(Ⅱ) 清酒醸造中の成分変化について

醸造中の澱粉及び蛋白質の変化については特に醱, 醪の均一な試料の採取方法を考案して, 成分変化を消化部分と未消化部分に分けて成分分析を行い, 消化の状態を明らかにした。

澱粉の消化については先ず酒造工場の1仕込の全原料の炭水化物を測定し之れが醸造中に於ける消化の状態を追求して, 速醱醪では仕込後2日で澱粉の消化は殆んど終了し, 生醪, 山麴醪では長期間に徐々に進行し, 醪の澱粉消化率は共に約80%であり, 醪では仕込後約15日前後で澱粉の消化は殆んど停止しその消化率は90%以上になる事を認めた。酒造に於ける原料の利用率についてはその後豊沢, 米崎氏等の詳細な研究がある。

次に速醱醪及び醪中の糖成分の変化を SOMOGYI 氏法により追求して, 何れに於いても dextrine の平均重合度は初期に5以下に低下し, 醪では熟成後も Maltose が残存するが, 醪では通常仕込後15日頃に殆んど消失する事を認めた。然し末期に醱酵を俾止する異常醪では Maltose の増加を認めて, 正常醪に於ける Maltose の消失には酵母の作用及び麴の Maltase 力が共に作用するのではないかと推論した。

更に三倍増醪酒に關聯して糖質原料の糖成分の分離定量を行い, 又熟成醪に Maltose 或いは Dextrine を添加した場合に Maltose は消失して非醱酵性糖は増

加し, 且つその平均重合度が低下する事を認め, Maltase 力及び α -1-6 結合合成酵素の存在を推定した。

醸造中の蛋白質の変化については HILLERS 及び VAN SLYKE 氏法の変法, 及び Formol 法により, 醱及び醪自体を試料として窒素成分の変化を追求した。

酒母に於いては山麴醪, 速醱醪の何れも原料米中の全蛋白質の約60%が溶出される。第一区分N (T.C.A. にて沈澱) は何れに於いても全段階で測定し得ず, 第2区分N (燐タングステン酸にて沈澱) は山麴醪では8~10日頃最大となり以後は減少して第2→第3区分Nの移行が強く行われる事を示すが, 速醱醪では第2区分Nは漸次増加するのみで, 第2→第3区分Nの移行の弱い事を示す。第3区分Nは山麴醪では漸次増加して常に溶出全Nの80~90%を占めるが, 速醱醪では仕込2日頃から増加せず, 膨れ時には山麴醪の%程度の第3区分Nを保持する。一方 Formol Nは全期間を通じて速醱醪は山麴醪の $\frac{2}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ である。

こゝに第3区分Nに包含される蛋白分解物の分解程度, 平均重合度の大略を知る数値として第3区分Nを Formol Nで除した数値を採り, 清酒フォルモール係数と仮称した。山麴醪の清酒フォルモール係数は2.2→1.5, 速醱醪では5.8→3.5で明かに速醱醪の第3区分Nには比較的分解程度の高い窒素物が多い事を示す。

以上により山麴醪及び速醱醪の蛋白分解の相違について考察すると, 両醪共溶出全Nが殆んど同じである事は米麴の Protease が酸性側が主力である事から首肯出来る。然し山麴醪に於いて速醱醪と同一pHに低下した仕込後6~8日頃に第2区分Nが最高となり, 更にそれ以後の第3分N, Formol Nの増加の相違は山麴醪に於いては米麴以外の Protease 系が蛋白の消化に關与しているのではないかと示唆する。

そこで米麴, 生醪の初期に増殖する細菌, 細菌 Proteinase 及び乳酸菌等を使用して山麴醪, 速醱醪のモデル試験を行い, 山麴醪の蛋白消化行程を次の如く

(528) (蔭山) 清酒醸造に於ける澱粉及び蛋白質の変化と之に関与する清酒麹菌の酵素について

提唱した。

即ち生醗系酒母に於いては、初期に細菌が蒸米の澱粉及び蛋白質に成る程度の変化を与え、老化を防ぎサバケを良好ならしめる下地を造り、初暖気以後 pH が下つて麴の Amylase 系、酸性 Protease 系が良く働いて少々高分子の蛋白分解物を生じ、之れが乳酸菌の peptidase 的作用によりアミノ酸に変化すると云う経路を推定した。

清酒醪については、仕込後 2～4 日高泡前に第 3 区分 N, Formol N が最少となり、醪の前期は山廃醗型の蛋白分解様式となり清酒フォルモール係数低く、後期には速醗醗型の様式となり清酒フォルモール係数は高くなる。

(IV) 麹菌々株の酵素的特性と之が酒質に及ぼす影響について

数種の麹菌々株を用いて酵素組成に特長のある米麴を造り、之により同一条件で小仕込試験を行い次の結論を得た。

酵素力と製成酒の成分に関しては、 α -Amylase 力は米麴では大体過剰であつて成分に影響少く、糖化型 Amylase 力は或る程度以上強い事が必要で清酒濃度は之に大体比例する。Amylase 力と残存糖成分は糖化型 Amylase に大差ない場合は特に関係性なく、他の Protease 力、醗酵促進因子等による醗酵経過に影響され、Protease 力の弱い場合は残存糖成分が多い。

酸性 Protease 系の力価は可成弱くとも醗酵は支障なく進行するが製成酒の窒素の各成分は之の力価に大体比例し、醗酵中の酵母の窒素代謝は正常な醪では製成酒の窒素成分に影響を及ぼさないと推定される。アルカリ性 Protease 系の力価は低く、又酒造中の pH から当然の事乍ら窒素成分と関係性がない。唯数多の試験の経験から之の力価の強い場合に蛋白混濁が多い様に思われる。

蛋白混濁については最近の私共の研究では α -Amylase, 糖化型 Amylase は各々蛋白混濁の母物質の一つである事が明かとなり、蛋白混濁は酵素も含めて未変性蛋白の火入による清酒中の熱変性であり之に凝集作用が伴うものと考えられる。

米麴の酵素力と製成酒の官能的判定については、 α -Amylase が強いと香気が鈍重で濃醇味があり、糖化型 Amylase は清酒の濃味を増すと考えられ、酸性 Protease 系の力価は清酒の雑味及び苦味の多少と関係があり清酒の品質に可成の影響を与える。以上を一括すると第 3 表の如くである。

官能的判定については、之を米麴の Amylase 力、

第 3 表 米麴酵素力と酒質との関係

区 分	製成酒成分	官 能 判 定
α -アミラーゼ	通常の $\frac{1}{10}$ ～ $\frac{1}{5}$ でも影響が少いが原エキ스는やや減少し粕も多い	強い場合香気は鈍重となり色味共に濃厚となる
S-アミラーゼ	製成酒の原エキ스에その強弱が影響する	影響不明
酸性プロテアーゼ系	強い場合 N-成分が全般的に多い。弱い場合はこれが少く且糖分が多い	強い時は雑味及び苦味多く弱い時は色淡く苦味が少い
アルカリ性プロテアーゼ系	N-成分に殆ど影響しない	強い時は火入後の白ぼけが強い

Protease 力のみの影響とする事は早計であるが、相当大きな影響を与えている事は推察出来る。従つて米麴の酵素力を測定する事により製成酒の成分及び官能的判定について概括的な予測を行う事が出来る。

本研究に関連のある報文は

○清酒麹菌の研究

第 5 報 米麴のイソマルトース分解力に就いて、本誌, 32, 65 (1954)。第 6 報 米麴のアミラーゼ測定法に就いて、本誌, 32, 68 (1954) 第 7 報 米麴の蛋白分解力に就いて(其の 1)。FOLIN-CIICALTEU の Phenol 試薬による蛋白分解力の測定、本誌, 33, 28 (1955)。第 8 報 米麴の蛋白分解酵素に就いて(其の 2) 米麴 Protease の性質、本誌, 33, 53 (1955) 第 9 報 米麴の蛋白分解力に就いて(其の 3) 米麴 Pratease の測定法及び米麴 Protease の組成、本誌, 33, 109 (1955)。

○清酒醸造中の各成分の変化

第 1 報 特に澱粉の消化に就いて、本誌, 29, 297 (1951) 第 1 報(続)澱粉の消化に就いて、本誌, 31, 189 (1953)。第 2 報 醗酵後期の糖類変化に就いて、本誌, 31, 243 (1953)。第 3 報 醗及び醪の窒素成分の変化に就いて、本誌, 33, 433 (1955)。第 4 報 A. HILLER and D. D. VAN SLYKE. 氏窒素物分別測定変法に就いて、本誌, 33, 538 (1955)。第 5 報 酒母中のアミノ酸の成因に就いて (I)。第 6 報 酒母中のアミノ酸の成因に就いて (II)。

○他の還元混在中の葡萄糖単独定量法

PHILLIPS 及び CALDWELL 氏等の方法の追試並びにその改変法に就いて、本誌, 32, 25 (1954)。