

〔生物工学会誌 第71巻 第2号 115-127. 1993〕

 総 合 論 文

麹菌の米粒上での増殖特性に関する研究

(平成4年度 日本生物工学会江田賞受賞)

伊 藤 清

 国税庁醸造試験所
 〒114 東京都北区滝野川2-6-30

Studies on the mycelial growth of *Aspergillus oryzae* on rice grain. —Monograph— KIIYOSHI ITO (*National Research Institute of Brewing, 2-6-30, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114*) *Seibutsu-kogaku* 71: 115-127, 1993.

Rice *koji*, a solid-state culture of *Aspergillus oryzae* on steamed rice grains, is used as an enzyme source and raw material for *sake* fermentation, and the quality of *koji* is regarded as the most important factor determining the quality of *sake*. However, the control of solid-state culture is very difficult compared with submerged culture. In Japanese breweries, the control of *koji* making is traditionally done by observing features such as mycelial distribution and odor. In order to develop an automatic control system for *koji* making, we first studied the mycelial growth mode in rice grains from the respiratory activity, using a gas analyzer. The relationships between the properties of rice grains and the growth mode was studied, and it was recognized that the growth mode was affected not only by nutritional conditions and moisture, but also by physical properties like hardness and the shape of rice grains. We also studied the features and odor of *koji* in order to apply the traditional method of controlling *koji* making to a novel automatic control system by means of an expert system, or fuzzy control system. Mycelial distribution in rice *koji* was measured to elucidate the steric growth mode in the solid-state culture. The mycelial density showed an exponential distribution against the distance from the surface of rice *koji*. On the basis of this phenomenon, mycelial distribution was expressed by a mathematical model and shown quantitatively. The mycelial distribution and enzyme composition in rice *koji* made in *sake* factories were examined and the relationships between the mycelial distribution and the quality of *koji* were studied. The results suggested that when the degree of mycelial penetration is low, the activities of acid protease and acid carboxypeptidase are high. The volatile compounds produced by growing *A. oryzae* on steamed rice during *koji* making were collected with a Tenax column and analyzed by GC and GC-MS. Eight kinds of alcohols, three kinds of aldehydes, five kinds of ketones, and an ester were identified. The production of volatile compounds was affected by the oxygen concentration, and aldehydes and ketones increased significantly with a deficiency of oxygen. The production of most of the volatile compounds was maximum at the middle stage of growth, and decreased thereafter. The tendency of 1-octen-3-ol was different from other volatile compounds; it increased with the cultivation time and did not decrease.

は じ め に

麹に代表されるような糸状菌の固体培養技術は酒、
 醤油、味噌等の発酵食品、また酵素の生産等に広く用

いられているが、不均一基質を扱う固体発酵技術は
 均一培地である液体培養に比べ種々の制約を持ってい
 ることも事実である。

固体発酵では基質の有効利用が液体培養に比べ困難

であるが、その理由としては基質内部への菌糸の侵入が制約され利用可能な空間が制限されるということ、^{2,3)} 基質内部での酸素、二酸化炭素および栄養塩類の拡散が制約されること、⁴⁻⁶⁾ および培地の水分活性の低下^{7,8)} 等があげられる。

また固体発酵でのプロセス制御が液体培養に比べ困難であることも固体発酵の自動制御を遅らせている理由の一つである。その原因は固体培養における菌体増殖の測定が困難なこと、⁹⁾ 糸状菌は先端生長をし、¹⁰⁾ 分化をしながら生理的な性質が変化すること、¹¹⁾ 生理的な性質は培地の栄養、¹²⁾ 水分活性、⁸⁾ およびガス組成¹³⁾ 等によって変化することである。固体培地上での糸状菌の増殖は液体培養の場合とは異なった面が多く、その解析には特殊な手法が要求される。¹⁴⁻¹⁶⁾

清酒産業においては麴の品質は製品である清酒の品質を決定づける最大の要因とされているが、一方では清酒の品質は多様化し、これらの清酒を醸造するための麴も種々のタイプのものが求められている。清酒製造の現場においては経験的な製麴管理技法が伝えられ、さまざまな状況に柔軟に対応し、また品質的にも高いものが製造されてきている。しかし清酒産業にあっては特に後継者不足が深刻であり、麴製造も自動化せざるを得ない状況におかれている。麴の品質向上また製麴管理の自動化を図る場合においても、固体培養の特殊性が大きな課題として存在する。そこでこれらの点を解決するとともに、伝統的な技法を尊重しエキスパートシステム等を用いた製麴管理に生かすことを最終的な目標とし、検討を行った。

米粒上での麴菌の増殖

麴の管理がむずかしい最大の理由は、それが液体培養のように均一な系で培養されるのではなく、米粒という不均一な固体培地で培養されるところにある。そこで最初に固体培養の特殊性を検討してみた。^{17,18)}

増殖経過の測定 固体培地上での糸状菌の増殖経過の測定については、岡崎ら^{19,20)} が呼吸活性を利用して測定する装置を開発し、麴菌の増殖特性の解析を行っている。しかしこの装置を用いて製麴できる量は非常にわずかであり、でき上がった麴について種々の解析を行うには十分な量ではない。そこで基本的には岡崎らのモデルを参考にしながら、約200gの麴が製麴できる装置を作成した。装置の概要をFig. 1に示す。麴培養槽に空気を定量的に導入し通気培養を行ったが、一部は加湿器を通し、一部は加湿器を通さない空

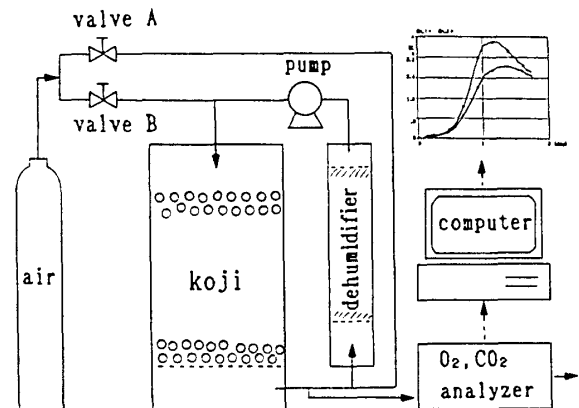


Fig. 1. Apparatus for measurement of the mycelial growth from respiratory activity. The dehumidifier and culture vessel were placed in an oven at 36°C.

気を導入し湿度の調整を行った。またこの通気量だけでは増殖に伴って発生する熱を除去できないので強制的に空気を循環し蒸発潜熱を除去した。排ガス中の酸素および二酸化炭素濃度をガス分析計で測定し、吸収された酸素量および発生した二酸化炭素量を求めたが、データはオンラインでパソコンに取り込み解析を行った。結果の一例をFig. 2に示した。正確な菌体の増殖経過を求めるには岡崎のモデル¹⁸⁾ を用いて解析しなければならないが、便宜的には、初期には呼吸活性がほぼ菌体量に比例し、最大呼吸活性量が終期の菌体量（最大増殖量）に比例するとほぼみなすことができるので、¹⁸⁾ 以下の解析には主にこの簡便法を用いた。

植菌量と増殖経過の関係 麴の製造においては「もやし」と称する麴菌の分生子を蒸米上に散布し、これを発芽させるところから麴造りが開始する。もやしの量は製麴の経過を左右する重要な因子であるとさ

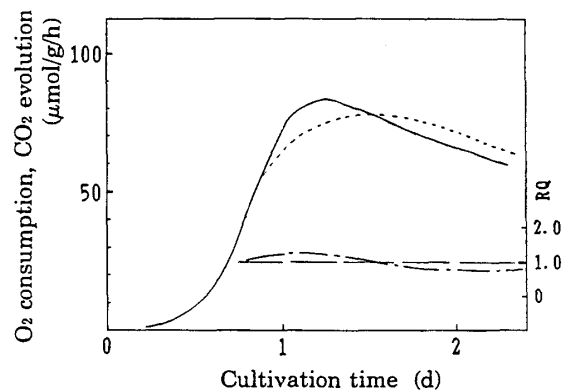


Fig. 2. Changes in the respiratory activity during *koji* making. Lines: —, CO₂; ---, O₂; - · -, RQ (respiration quotient).

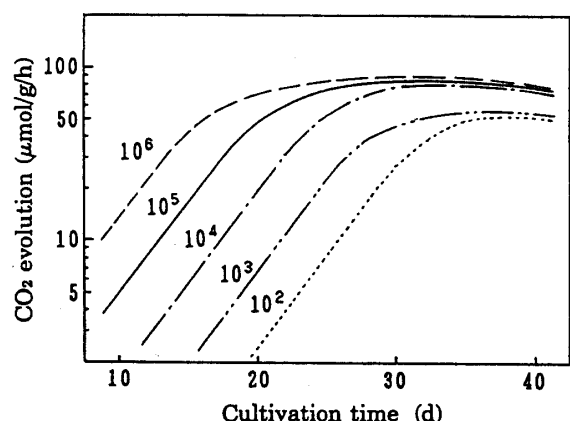


Fig. 3. Effect of inoculum size on the growth of *A. oryzae* in solid state culture.

れているが、これに関する詳細な報告は見あたらなかったもので、まずこの点について検討した。Fig. 3は植菌量を変えた製麹経過の結果であるが、通常の製麹における植菌量は $10^5/g$ である。当然ながら植菌量の少

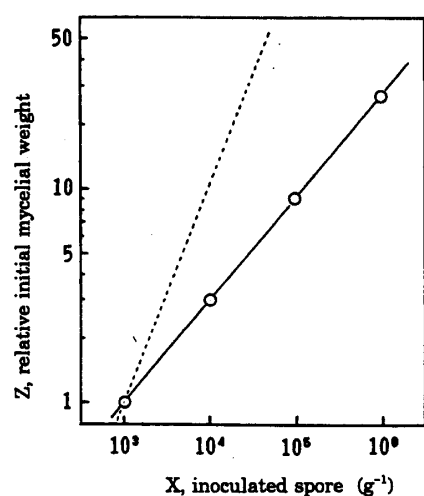


Fig. 4. Relationships between the inoculated spore and calculated initial mycelial weight. The initial mycelial weight (mycelial weight at cultivation time=0) was calculated from the apparent lag time (T , cultivation time at CO_2 evolution rate was $10 \mu mol/g/h$) and shown as relative value (Z) to the standard (inoculum size is 10^5 , $Z=1.0$) using following equation; $Z = e^{k(T_s - T_0)}$; T_s is lag time of sample and T_0 is that of standard; k is specific growth rate. The data points and solid line show the relative initial mycelia calculated from the lag time in Fig. 3 using above equation. The relationships between the inoculated spore (X) and initial mycelia (Z) is shown as $Z = aX^{0.5}$, it means that only square root of inoculated spore acts as effective spore. Dotted line shows the relationships when all of the inoculated spore acts as effective spore.

ない麹は増殖が遅れ、見かけ上の lag time があるが、 $10^6/g \sim 10^4/g$ の範囲では最大増殖量はほぼ同一であった。しかし $10^3/g$ 以下になると最大増殖量も低下する傾向が認められた。液体培養の場合では、植菌量の差は初発の菌濃度の差とほぼみなすことができるが、固体培養の場合でも同様に扱うことができるかどうか検討した。

Fig. 4はFig. 3における lag time から見かけの初発菌濃度を計算しこれを有効胞子としたものであるが、その結果固体培養の場合には有効胞子は植菌量の $1/2$ 乗に比例することがわかった。これは固体の場合には、植菌量が多くなると胞子が培地の表面で近接し互いに抑制しあう確率が増えるためだと考えている。また植菌量を $10^3/g$ まで減らした麹の写真をFig. 5に示したが、菌糸が増殖している範囲（破精廻り）が少なく、いわゆる「突き破精」になっていることがわかる。このため利用できる空間が限定され最大増殖量が減少したと考えられる。

形状あるいは物性を異にした培地での増殖特性固体発酵は液体培養と異なり培地が不均一であるという点が最も大きな特徴であるが、この培地の形状あるいは物性の差異が増殖経過に影響を与えるかどうかを検討した。Fig. 6には4つの試料を用いた場合の増殖経過を示したが、この4つの試料は栄養および水分的な条件はすべて揃えてある。対照は普通の蒸米であるが、老化米とは冷蔵庫で軽くデンプンを老化させたも



Fig. 5. Features of rice koji with limited inoculum size ($10^3/g$). Under picture is a surface of koji taken by reflected light and upper picture is a section of koji taken by transmitted light. Magnification is $\times 30$.

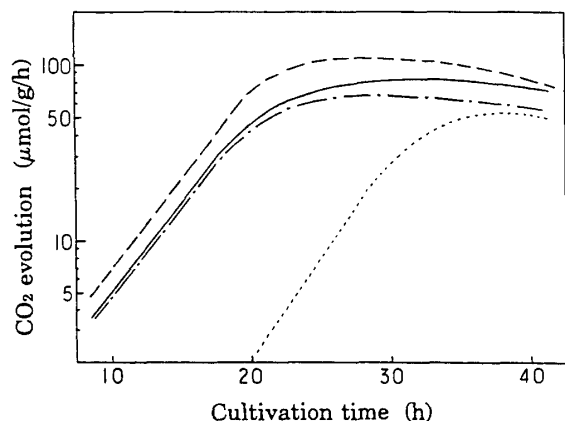


Fig. 6. Growth mode of *A. oryzae* in solid state culture. Lines: —, sample A; ---, sample B; - · -, sample C; · · · ·, sample D. Sample A is control (ordinary steamed rice); sample B is limited in the inoculum size (10^2 /g); sample C is retrograded steamed rice, whose texture is hard and mycelial penetration is inhibited; and sample D is powdered rice. All of the four samples are equal in nutritional conditions and moisture.

ので、このようにすると菌糸が米粒の内部に侵入せず表面だけで増殖するいわゆる「塗り破精」となる。粉碎米は対照と同一条件で調製した蒸米を α 化後粉碎し、その後水分をそろえたものであり粒度が小さく表面積が増大したものである。植菌量を減らした試料は

前項で述べた通りであり、米粒表面での麹菌の増殖範囲が小さくなっている。

さて、これらの試料の増殖経過をみると、まず老化米では初期の増殖経過はほとんど同じであるが最大増殖量が減少していることがわかる。これは老化米では塗り破精となり米粒内部へ菌糸が侵入できないため利用可能な空間が減少したことによると考えられる。逆に粉碎米では増殖経過はやや速くなり、また最大増殖量も増大しているが、これは表面積が増大した結果見かけの有効胞子数が増大したことと、粒径が小さくなった結果菌糸が内部まで侵入し、利用可能な空間が増加したことによる。また突き破精麹の最大増殖量が減少するのは先の項で述べた通りである。このように固体培養の場合には、培地の形状や物性が変わっただけで増殖経過が変化するので、液体培養に比べその解析は困難である。

固体培地中での無機塩の移動 固体発酵のもう一つの特長は、菌体が培地の表面付近に多く存在するため培地の内部にある栄養塩類等は拡散によって菌体まで到達しなければならない、この拡散速度によって増殖が律速されるということである。¹¹⁾ もっとも液体培養の場合にあっても、菌糸がペレットを形成する場合には、ペレット内部への栄養塩類あるいは酸素の拡散速度によってペレット内部の増殖速度が律速されると

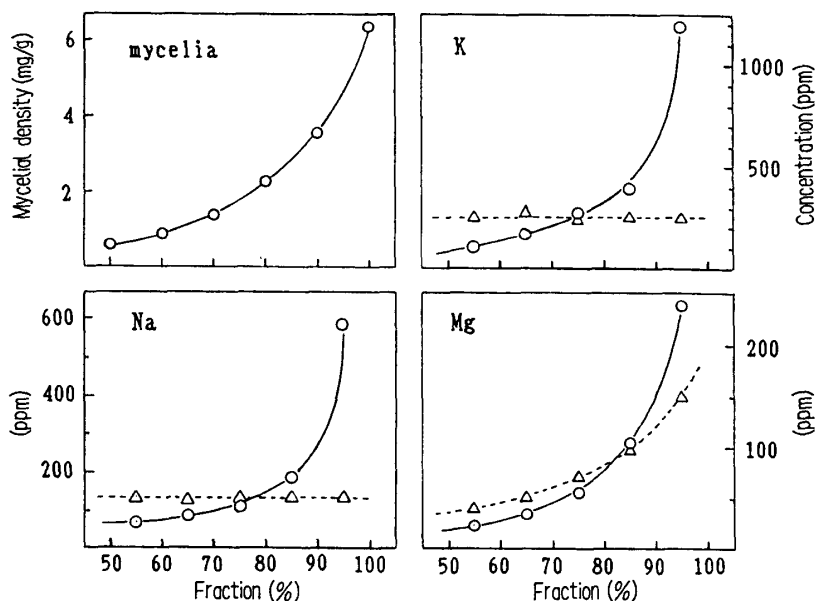


Fig. 7. Mineral distribution in rice koji. Lines: —, distribution in koji; ---, distribution in rice. Steamed rice was dehydrated by ethanol and fractionated with testing mill. Mineral concentration in fractionated rice was measured and mineral distribution was calculated. Mineral distribution in koji was measured as same method. Mycelial distribution was measured as in Fig. 9.

いうことは起こりうる。²¹⁾ Fig. 7は米麹の菌体および無機塩の分布を示したものである。菌体分布については後述するが、米粒の外側には多くの菌体が存在するのに対し、内部にいくに従い菌体は減少し、菌体の分布を形成している。3種類の無機塩の分布を示したが、点線は麹菌が増殖する前の無機塩分布を示している。これは α 米を表面から分画して分布を測定したものである。カリウムおよびナトリウムについてはまったく均一の分布をしていることがわかったが、浸漬および蒸しの工程で均一化するものと思われる。マグネシウムについては α 米においてもやや米の外側に多く存在したが、これはフィチン酸等に結合して存在しているものと思われる。麹を造った後の無機塩分布は菌体分布とほぼ同様の分布パターンを形成していることがわかった。すなわちこれらの無機塩は菌体に吸収され菌体外の濃度が減少するので、拡散によって固体培地内を移動していることを示している。速度論的な検討は行っていないが、これらの無機塩の拡散速度が固体培地での増殖を律速していることは十分に考えられる。これはまたグルコース等の移動速度についてもいえることであり、酸素および二酸化炭素の移動速度についても同様と思われる。⁴⁻⁶⁾

米粒上での麹菌の菌体分布

固体培養では糸状菌は基質の表面だけではなく内部においても増殖する。基質の粒度、あるいは厚さが小さい場合には菌糸は十分に内部に侵入し有効に基質を利用することができるが、そうでない場合には菌糸の侵入が制約され基質が有効に利用できなくなる。したがって基質内部へ菌糸を侵入させることは、基質を有効に利用するとの観点から非常に重要な因子である。また清酒産業においては、麹内部への菌糸の侵入は「破精込み」と呼ばれ、麹米の有効利用、すなわち麹の消化性、²²⁾に関わると同時に麹の品質との相関が高いとしてもっとも重要視されている。

破精込みとはなにか 麹菌が蒸米に繁殖して菌糸が白く肉眼で見えるようになった状態を破精といい、菌糸が米粒表面に繁殖した状態を破精廻り、米粒内部にいくこんでいる状態を破精込みという。また破精の状態を示す言葉に、総破精、突き破精、塗り破精、バカ破精等がある。Fig. 8に総破精麹の断面写真を示したが、麹菌が米粒の内部においても増殖していることが観察される。また麹菌は米粒の内部においては菌体分布を形成し、外側には菌体が多く、内部にはほとんど

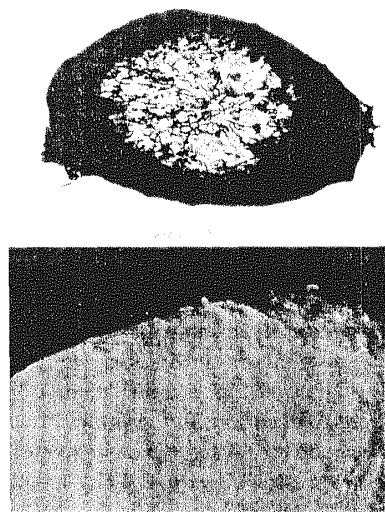


Fig. 8. Features of rice *koji* with normal inoculum size ($10^5/g$).

菌体が観察されないこともわかる。このことは米粒の中心付近は麹菌によって利用されていないことを示している。さて、この「破精」とは言葉を変えれば米粒という固体培地における麹菌菌体の3次元的な分布、ということになる。すなわち、米粒表面における菌糸の水平的な分布が破精廻りであり、米粒表面から内部へ向かっての垂直的な分布が破精込みである。

破精込みの測定方法 麹の評価を行うにはこの破精を的確に捉える必要があるが、従来破精の評価は経験や勘に頼ることが多く、また破精の意味も曖昧であった。そこで破精の意味を改めて考える一助とするために、破精の評価を客観的に、また定量的に行うための検討を行った。^{23,24)} 前項で述べたとおり破精込みとは麹菌菌糸の米粒内における垂直的な分布であると定義できる。言葉を変えれば、破精込みの良い麹とは米粒の内部にも菌糸が多く存在し、破精込みの悪い麹、すなわち塗り破精麹は米粒の内部には菌糸が少なく表面に菌糸が多く存在する麹であるということが出来る。すなわち破精込みを定量的に測定するためには米粒表面から内部に向かっての菌体量の分布を測定すればよいということになる。このためには麹を分画しながら各部分の菌体量を測定すればよいし、分画の方法としては精米機の使用が考えられる。測定方法の概略をFig. 9に示した。

麹中の菌体分布 この方法で測定した結果をFig. 10に示した。実験的に直接得られるデータは分画麹中の菌体量であるが、これは菌体量を麹の中心からの積算値として求めたものであり、各画分における麹菌

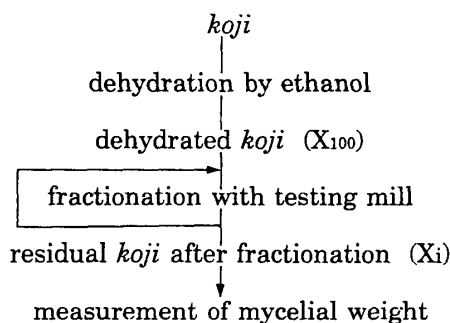


Fig. 9. Schematic illustration of the measurement of mycelial distribution. Mycelial weight was measured by N-acetyl glucosamine method.⁹⁾ X means the weight of one thousand granules of whole (X_{100}) and fractionated (X_i) koji. The degree of fractionation was expressed as *fraction* (I) by $I = X_i/X_{100}$.

体の存在状態を表したものではない。そこで実線から画分5%ごとの菌体量を計算し、これを菌体密度として…△…で示した。実線を微分したものが点線であるといえる。なおこの図では、全菌体量の約50%の菌体が麴の表面から15%の間に存在しているが、麴菌体は思った以上に麴の表面付近に集中して存在することがわかった。

菌体分布の数量化 Fig. 11は縦軸に菌体密度の対数、横軸に残粒歩合 (I; cumulative mycelial weight, fractionと同義) の3乗根をとったものである。その結果、両者はきれいな直線関係にあることがわかった

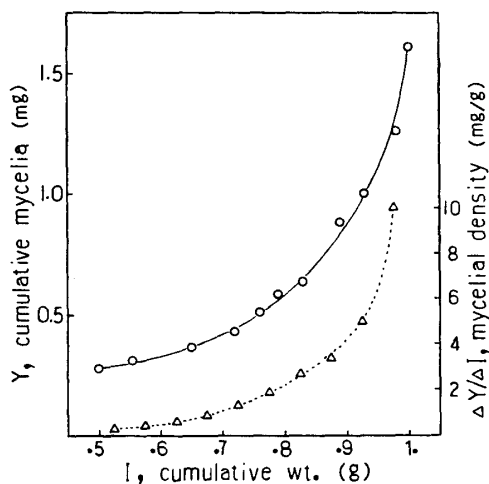


Fig. 10. Cumulative mycelial weight and mycelial density curve. Lines: —, cumulative mycelial weight; ---, mycelial density. Mycelial weight in a cumulative weight i , i g of the central part in 1 g of whole koji, was shown as cumulative mycelial weight, and average mycelial density in each 5% fraction was shown as mycelial density.

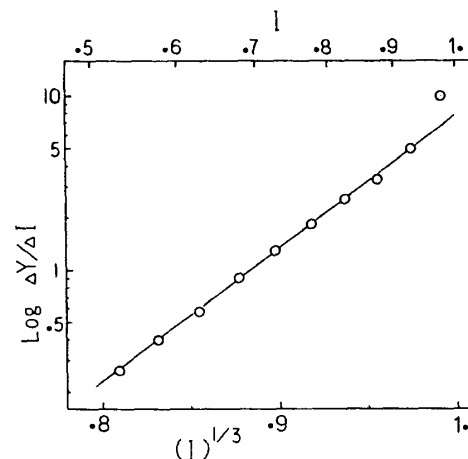


Fig. 11. Relationships between the cubic root of cumulative weight and the logarithm of mycelial density.

が、このことは菌体密度は麴の表面からの距離に対して指数的な分布をしていることを示している。同様の現象が糸状菌の表面集落においても、菌糸密度が集落外縁からの距離に対して指数関数的に増加するとして認められているので、糸状菌の集落形成としては一般的な現象かもしれない。¹⁴⁾ただ Fig. 11をみても明らかなように、麴の表面では菌体密度は直線からはずれ、より多くの菌体が存在していることがわかった。これは気菌糸²⁵⁾等を含めた表面菌糸によるものと考え、麴の菌体分布に関して以下の数式モデルを提示し

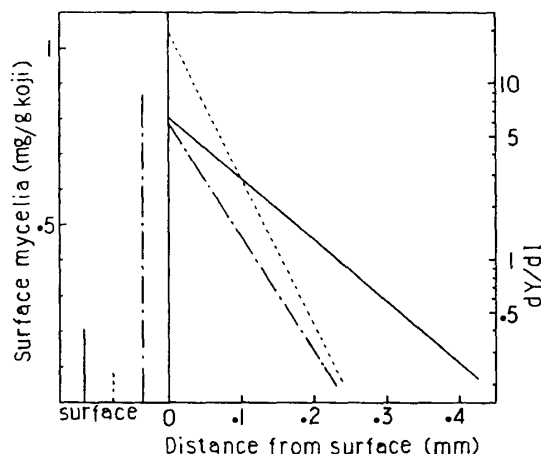


Fig. 12. Mycelial distributions of the three different types of koji. The solid line is sample A, the dotted line is sample B, and the dashed line is sample C. Mycelial distributions were expressed by the following equations. $c = 4\pi\rho$.

Sample A: $Y_i = 6.5 c \int e^{-8.9(R-r)} r^2 dr + 0.21$, $Y_i = 1.6$.

Sample B: $Y_i = 19.7 c \int e^{-21.3(R-r)} r^2 dr + 0.08$, $Y_i = 1.7$.

Sample C: $Y_i = 6.2 c \int e^{-16.3(R-r)} r^2 dr + 0.87$, $Y_i = 1.6$.

た.

$$Y_t = 4 a \pi \rho \int e^{b(R-r)} r^2 dr + Y_s$$

Y_t は全菌体量, Y_s は表面菌体量, R は麴を球とみなした時の半径, r は麴の表面からの距離, π は円周率, ρ は麴の密度, a および b は定数である. 右辺の第1項が米粒内部の菌体量を表しているが, この定数 b が菌体密度分布の傾きでありこの値の絶対値が小さいほど米粒内部にも菌糸が侵入している. 麴の菌体量分布はこうに全菌体量, 表面菌体量および菌体密度分布の傾き b で把握することができる. Fig. 12 に3つのタイプの異なる麴の菌体分布を示した. 全菌

体量は3つの試料ともほぼ同じであるが, 試料Aは破精込みがよく, Bは破精込みが悪いこと, Cも破精込みが悪いが, この試料は特に表面菌糸が多いこと等がよく表現されていると思う. また数量化された結果からもこのことは明らかである. なお, これらの試料は実験室的に作ったものであるが, Aは普通の蒸米, Bはやや水分の少ない蒸米, Cは老化させた蒸米で作ると再現性よく上記のような麴を作ることができた.

酵素分布 酵素の分布も菌体分布と同様の方法で測定できる. Fig. 13はタイプの異なる麴の酵素分布を示したものである. 菌体分布と同様に酵素も麴の表面近くに集中して存在すること, また麴のタイプによ

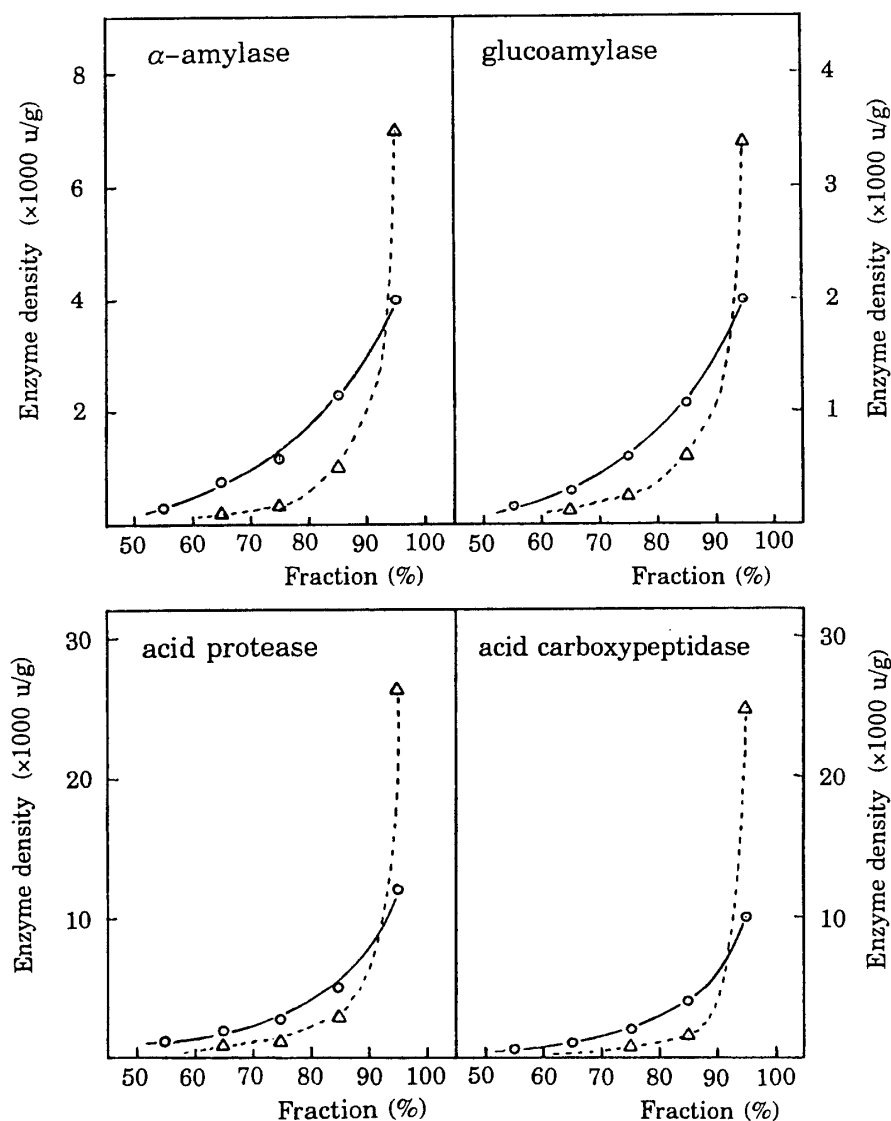


Fig. 13. Enzyme distribution in *koji*. Solid line is sample A and dotted line is sample B. *Koji* was dehydrated by ethanol and fractionated as in Fig. 9. The enzyme distributions were measured and shown as enzyme density.

Table 1. Properties of *koji* made in *sake* factories (n=20).

No.	Item	unit	mean	σ	max.	min.
1	Polishing ratio	%	67.9	4.0	73.0	63.0
2	Water in steamed rice	%	32.7	3.8	36.1	28.6
3	Water in <i>koji</i> product	%	28.9	5.2	34.1	24.8
4	Y_t	mg/g	1.58	0.26	2.08	0.99
5	Y_s	mg/g	0.14	0.25	0.81	-0.23
6	b	—	-13.6	4.9	-7.8	-24.8
7	AAase	u/g	883	223	1414	550
8	GAase	u/g	223	73	308	110
9	APase	u/g	2090	343	2818	1625
10	ACPase	u/g	6276	1043	8040	4504

Y_t : total mycelia, Y_s : surface mycelia, b : coefficient of the change of mycelial density. AAase: α -amylase, GAase: glucoamylase, APase: acid protease, ACPase: acid carboxypeptidase.

Table 2. Correlation matrix.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	.047								
3	.270	.452 ^a							
4	.496 ^a	.119	.380						
5	-.391	-.089	-.247	.090					
6	.210	-.265	-.337	-.078	-.265				
7	.293	.285	-.124	.050	.093	.242			
8	.052	.203	-.018	.015	.157	.029	-.068		
9	-.283	.078	.214	-.002	.218	-.597 ^b	-.473 ^a	.023	
10	-.056	-.192	.016	.066	.189	-.400	-.318	-.001	.751 ^b

^a Significant at the 5% level.

^b Significant at the 1% level.

って分布の仕方が異なることがわかったが、このことは麴自体の溶解性に深く関わることであろう。²²⁾ また菌体分布が異なると酵素力価も変動する傾向が認めら

Table 3. Principal component analysis.

Component	1	2	3	4	5
Eigenvalue	2.67	2.05	1.35	1.18	1.01
Variable no.	Factor loading				
1	-.438	.610	-.377	.338	.101
2	-.004	.610	.620	-.329	-.008
3	.186	.821	-.046	-.281	-.020
4	-.022	.656	-.159	.571	-.079
5	.368	-.296	.531	.582	-.192
6	-.742	-.294	-.228	.093	.236
7	-.584	.125	.437	.255	-.404
8	.042	.085	.426	.226	.858
9	.917	.099	-.064	-.021	.016
10	.758	.001	-.298	.296	.007

れたが、これは麴の品質に関わることと思われる。²⁶⁾

菌体分布と麴の品質 全国の酒造場20社から麴を集め、製造要因、酵素力価、菌体分布等を分析した。分析結果を Table 1 に、相関マトリックスを Table 2 に、主成分分析の結果を Table 3 に示した。抽出された主成分のうち興味あるのは第1主成分であるが、これは菌体密度分布の傾斜(変数6)と相関が高いため破精込みと関わりのある主成分と考えられる。第1主成分は同時にプロテアーゼおよびカルボキシペプチダーゼと非常に高い相関をもっていた。この結果は破精込みが酵素力価と深く関わっていることを示しているが、特に破精込みが悪いとプロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ力価が増加する傾向にあることを示している点に興味もたれる。この理由は不明であるが、今後検討していかなければならない大きな問題であろう。

麴の揮発成分

麴の香りの意義 清酒の製造現場では麴を造る時に、先に述べた破精込みの他に、香りの変化に気をつかう。この目的としては、よい香りのする麴を使えば生成酒の香りもよくなるといった意味も無くはないであろうが、²⁷⁾ 主な目的は麴の香りの変化を指標として製麴管理を行うことであろう。麴の香りの用語としてよく知られているものに、オハグロ臭、栗香、キノコ臭等がある。オハグロ臭は仲仕事前に出る青臭い感じの香りであり、この香りがすると仲仕事時期であることを知る。栗香は仕舞仕事後数時間すると出る焼き栗を想像させる香りであり、この香りで出麴時期が近いことを知る、この時期が過ぎるとキノコ香に変わり、やや出麴時期を過ぎたことを知る。すなわち麴の香りは製麴管理を行うにあたっての重要な情報源であり、香り成分（揮発成分）を分析すれば製麴管理の指標が得られるのではないかと考えた。²⁸⁾

麴の揮発成分の分析 麴の揮発成分を測定した例としては鈴木ら²⁹⁾の報告があるが、近年テナックス等の揮発成分捕集剤の進歩がいちじるしい³⁰⁾のでこれを使ってみることにした。また麴を加熱して揮発成分を捕集するのではなく、培養中の麴菌が生成する揮発成分をそのまま捉えることに主眼をおいた。このた

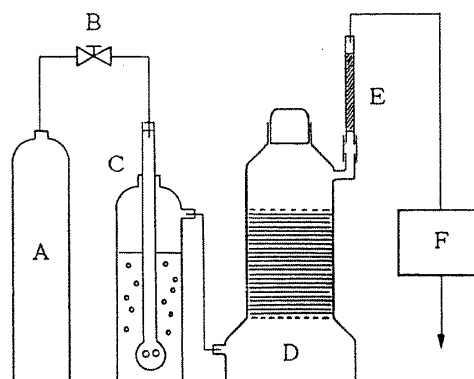


Fig. 14. Apparatus for collecting the volatile compounds produced by the growing mycelia. A, air cylinder; B, valve; C, humidifier; D, culture vessel; E, Tenax-TA; F, exhaust gas analyzer. The humidifier and culture vessel were placed in an oven at 36°C.

め装置は Fig. 14 に示したものを使用し、培養槽の出口にテナックスを装着し、これで捕らえた揮発成分をガスクロマトグラフィーあるいはGC-MSで分析した。Fig. 15 にガスクロ分析の一例、Table 4 に GC-MS で同定した揮発成分の一覧表を掲げたが、多くの成分から構成されていることがわかった。

酸素濃度と揮発成分 仲仕事時には菌体増殖がもっとも盛んとなるが、製麴工程を考えるとこの時期に

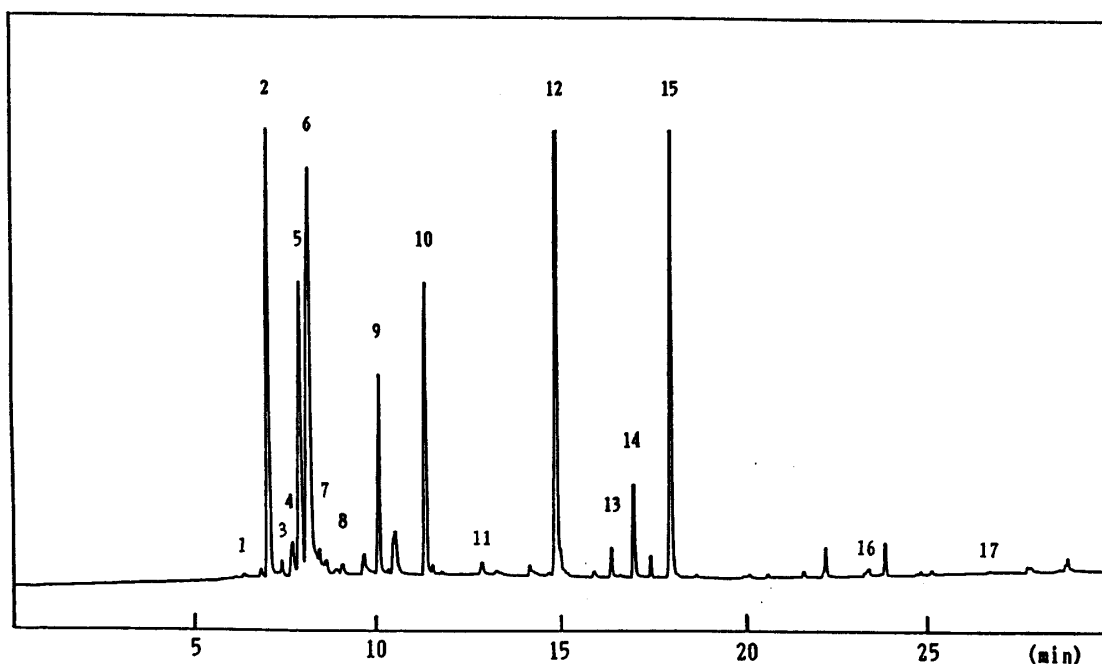


Fig. 15. Gas chromatogram of the volatile compounds produced by the growing mycelia. Two hundreds grams of *koji* were cultured for 24 h and transferred to the culture vessel. The *koji* was cultured in the culture vessel with the air passing at 200 ml/min and the volatile compounds in the exhaust gas were collected.

Table 4. Volatile compounds found in the vapor from rice *kōji*.

Groups	No ^a	Compounds	Groups	No ^a	Compounds
Alcohols	7	Ethanol	Aldehydes	1	Acetaldehyde
	9	<i>n</i> -Propyl alcohol		2	<i>i</i> -Butyl aldehyde
	10	<i>i</i> -Butyl alcohol		6	<i>i</i> -Valeraldehyde
	11	<i>n</i> -Butyl alcohol	Ketones	3	Acetone
	12	<i>i</i> -Amyl alcohol		5	2-Butanone
	13	3-Met-3-buten-1-ol		8	Diacetyl
	16	1-Octen-3-ol		14	3-Octanone
	17	<i>n</i> -Octanol		15	Acetoin
Ester	4	Ethyl acetate			

^a No of peaks in the chromatogram.

は麴はまだ厚く盛られているし、自動製麴の場合でもこの時期には温度があまり上昇していないので通風量は少ないのが普通である。そうすると酸素濃度不足になることが十分考えられる。そこで酸素の有無と揮発成分生成の関係について検討してみた。結果を Fig. 16 に示したが酸素が不足すると揮発成分、特にアルデヒドの量が顕著に増加することがわかった。先に述べたとおり仲仕事前には麴は酸欠状態になっていると考えられるが、このとき麴はアルデヒドを主成分とする揮発成分を多量に放出し、これが「オハグロ臭」と

して感じられるのであろう。これを杜氏が感じとり、仲仕事を行い酸素を供給してやるということになるのではないだろうか。

揮発成分の経時変化 清酒麴の製麴では、床、盛り、仲仕事、仕舞仕事、出麴という製麴工程をとるのが一般的である。そこでこの分析システムを用い製麴経過に伴う揮発成分の変化を追って分析し、結果を Fig. 17 に示した。実際の製麴工程では段階的な昇温を行うが、ここでは実験室的にシャーレを用い一定温度で製麴を行っているのでやや経過は異なるが、18時

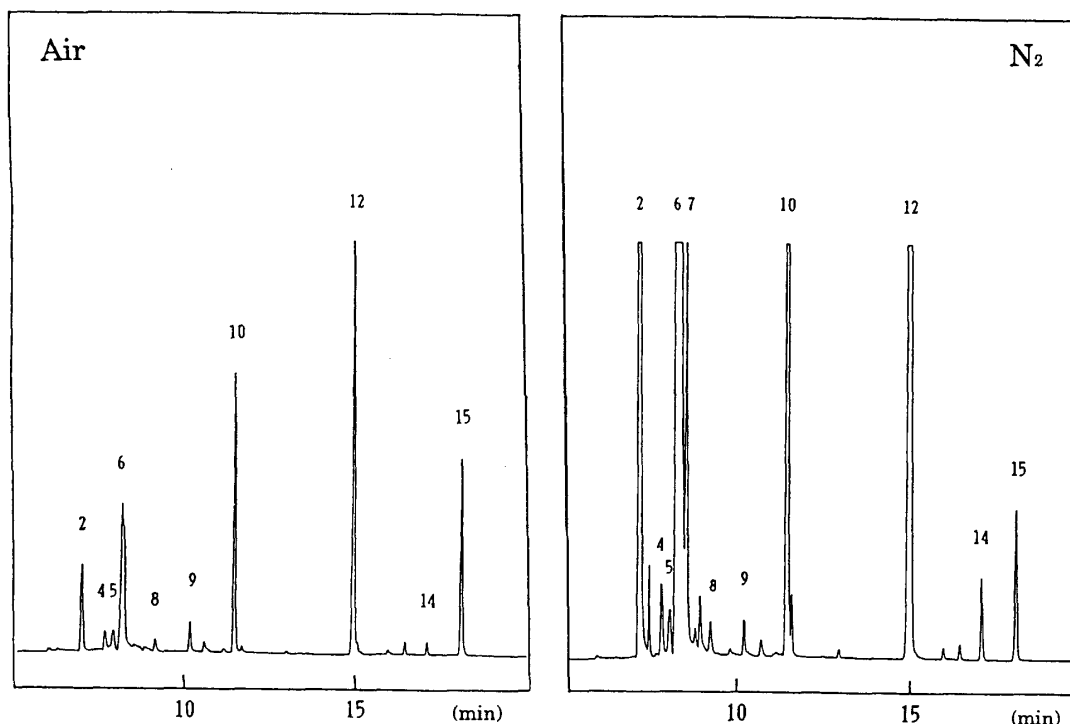


Fig. 16. Effect of oxygen on the production of volatile compounds. Cultured *kōji* was put into the vessel and volatile compounds were collected by passing air (left side of Fig.) or nitrogen gas (right side) through.

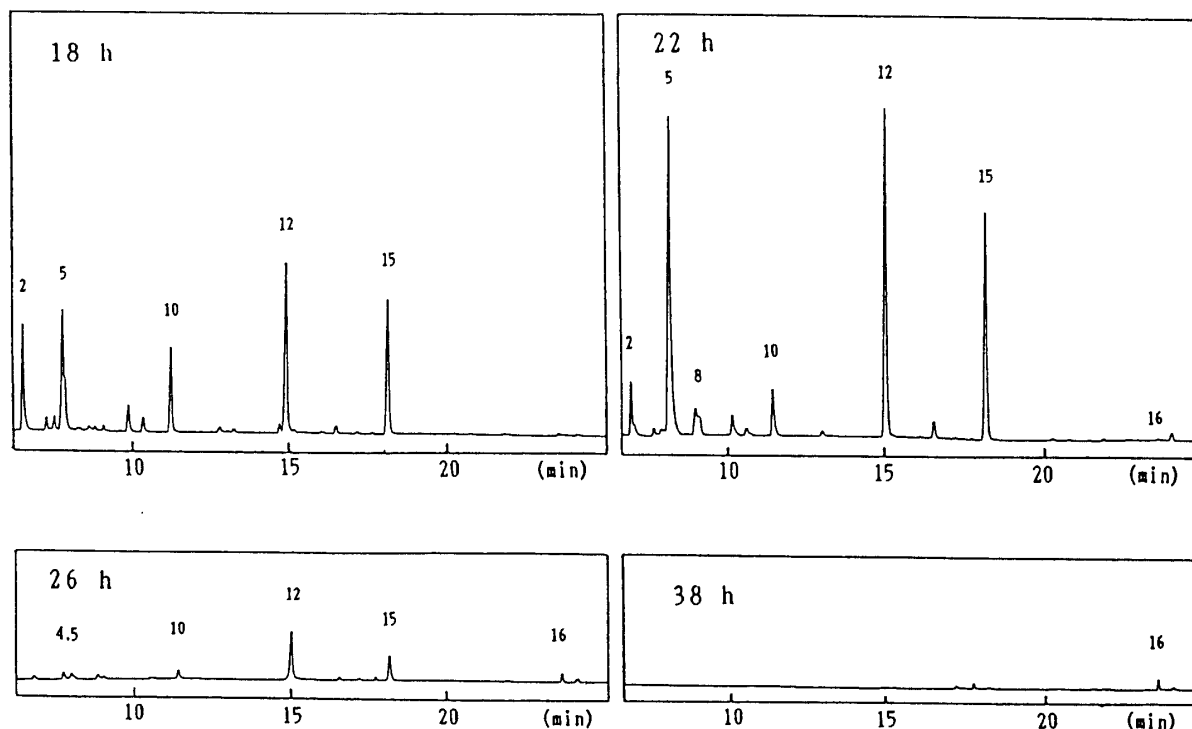


Fig. 17. Changes in the volatile compounds in the course of *koji* making. *Koji* was made in a petri dish and the volatile compounds at the four stages of *koji* making were analyzed.

間目が盛り、22時間目が仲仕事、26時間目が仕舞仕事、38時間目が出麴に相当する。当初は菌体量がもっとも多い出麴時期に揮発成分の量が多くなると予想したが、案に反して出麴時期には揮発成分はほとんど検出できなかった。揮発成分生成がもっとも多くなる時期は菌体量はまだ少ない仲仕事時期だった。

この点をさらに詳細に検討するために、麴を連続的に培養し、生成する揮発成分の変化を半連続的に追ってみた。Fig. 18は麴菌の増殖経過を呼吸活性から岡崎らのモデル¹⁸⁾を使って求めたものである。仲仕事時期に相当する22時間目に増殖速度は最大となり、以後減少し出麴時期である38時間目には菌体量はほぼ最大量となっているが増殖はほとんど停止している。Fig. 19に揮発成分の変化を要約して3次元グラフで示した。この場合も22時間目の仲仕事期にもっとも揮発成分の量が多くなり、構成成分は高級アルコール、ケトン、アルデヒドが中心である。したがって官能的には青臭い感じがする。これらの成分はアミノ酸代謝の中間体であり、³¹⁾ 菌体増殖速度のもっとも盛んなこの時期に生成量が多いのは理解できる。仕舞仕事は26時間目であり、揮発成分の量はかなり減少するが、この時期から1-octen-3-olが増加する。出麴は38時間であるが、この時期には揮発成分はほとんど検出されな

い。しかし1-octen-3-olのみはさらに増加し続ける。1-octen-3-olはマッシュルームや松茸等のキノコ³²⁾および糸状菌の香^{33,34)}の主成分として知られているものである。

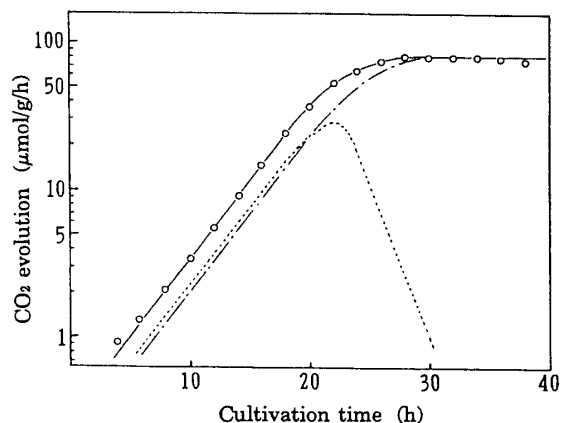


Fig. 18. Growth mode of *koji*. The respiratory activity was analyzed by the evolution of carbon dioxide. Total respiratory activity (R) was divided into two parts, i.e. respiratory activity concerning the growth (B); which is proportional to the net growth rate, and respiratory activity concerning the maintenance of mycelia (A), which is proportional to the mycelial weight. They are shown as follows: —, R; ---, A; ----, B.

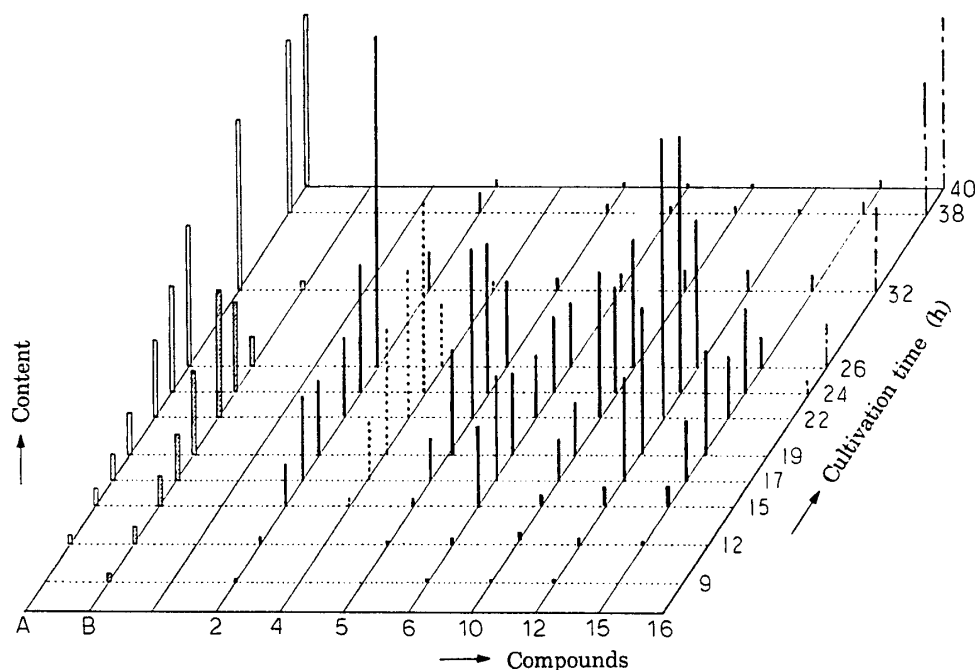


Fig. 19. Three dimensional graph of the changes in the volatile compounds and the mycelial growth. Symbol A is the mycelial weight and symbol B is the mycelial growth rate obtained from Fig. 18. Volatile compounds are shown as No. of compounds. The contents of mycelia and volatile compounds are shown as a relative value. Symbols: ---, 10-fold; —, 50-fold of the standard —.

これらの事実と香りの変化を結びつけて考えれば次のように考えられる。仲仕事時には菌体増殖がもっとも盛んで揮発成分の生成量が多く、成分的には青臭く感じられるものが主体である。またこの時期には先にも述べたように酸欠になりやすいので揮発成分の生成はさらに増加するものと思われる。仕舞仕事時にはこれらの成分は減少するので香りが質的に変化する。この時期から 1-octen-3-ol が増加し続けるので出麴時期を過ぎるころからキノコ香が感じられる。栗香については現在のところ解明していない。1-octen-3-ol は他の揮発成分とは異なり脂肪酸の酸化によって生成すると言われており、³²⁾ 培養時間に伴って生成量が増加するので麴菌のエージを反映した物質とも考えることができる。本物質の生成を感度よくとらえることができれば、出麴時期をよりの確に判定する指標になり得るかもしれない。

おわりに

固体発酵は液体発酵と異なり、培地の形状または物理的な性状が異なるだけでも増殖経過が異なるが、これを米麴に当てはめれば原料米の種類あるいは処理方法によって製麴経過が異なることにつながると考えら

る。これらの条件を予測することは困難な面が多いが、製麴管理を安定して行うためには今後解決して行かなければならない問題であろう。このことは逆にいえば、麴が造りやすい、あるいは安定して製麴ができる米が良い原料米（麴米）という見方もでき、この観点からのアプローチにも期待したいところである。またこの研究を通じて伝統的な製麴管理技法にも一理あるということを感じたが、今後これらの知識を生かしたエキスパートシステムを構築したいと考えている。伝統的な、また製品の官能的な評価を重んずる醸造にあっては他の工業に増してこのようなアプローチが必要であると考えている。

本研究は醸造試験所第7研究室で行ったものである。貴重な意見を賜った宮野室長、小林室長はじめ多くの共同研究者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) Hesseltine, C. W.: *Bioeng.*, **14**, 517-532 (1972).
- 2) Laukevics, J. J., Aspate, A. F., Viesturs, U. S., Tengerdy, R. P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1687-1690 (1985).
- 3) Pirt, S. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **47**, 181-197 (1967).
- 4) Peters, A. C., Wimpenny, J. W. T., Coombs, J. P.: *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1257-1263 (1987).

- 5) Han, Y. W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 672-674 (1987).
- 6) Jurus, A. M., Sunderberg, W. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 284-287 (1976).
- 7) Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Atthasam-punna, P., Taguchi, H.: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 453-459 (1984).
- 8) Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., Bensoussan, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 457-463 (1988).
- 9) 五味勝也, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷知栄子, 井上 博, 飯村 稔, 原 昌道: 醸協, **82**, 130-133 (1987).
- 10) Trinci, A. P. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **81**, 225-236 (1974).
- 11) Georgiou, G., Shuler, M. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 405-416 (1986).
- 12) Okazaki, N., Fukaya, I., Sugama, S., Tanaka, T.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 491-500 (1981).
- 13) Bajracharya, R., Mudett, R. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2219-2235 (1980).
- 14) Trinci, A. P. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **67**, 325-344 (1971).
- 15) Steele, G. C., Trinci, A. P. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **91**, 362-368 (1975).
- 16) 菅間誠之助, 岡崎直人: 醸酵工学, **60**, 151-163 (1982).
- 17) 伊藤 清, 君塚 敦, 石川雄章, 小林信也: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 116 (1989).
- 18) 佐藤俊二, 杉本隆司, 伊藤 清, 石川雄章: 日本醸造学会大会要旨集, p. 7 (1990).
- 19) Okazaki, N., Sugama, S.: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 413-417 (1979).
- 20) Okazaki, N., Sugama, S., Tanaka, T.: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 471-476 (1979).
- 21) 柳田友道: 微生物科学 2, p. 359, 学会出版センター (1981).
- 22) 古川恵司, 渡辺和夫: 醸協, **80**, 67-72 (1985).
- 23) 原田祥司, 瀬頭一平, 吉田 肇, 若林邦宏, 伊藤清, 蓮尾徹夫, 宮野信之: 醸協, **83**, 485-490 (1988).
- 24) Ito, K., Kimizuka, A., Okazaki, N., Kobayashi, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 7-13 (1989).
- 25) Wildermuth, H.: *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 43-50 (1970).
- 26) 布川弥太郎: 麹学, p. 217, 日本醸造協会 (1986).
- 27) Suzuki, S., Yoneyama, T., Koizumi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 171-177 (1980).
- 28) Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T., Kobayashi, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 169-172 (1989).
- 29) Suzuki, S., Yoneyama, T., Koizumi, T., Suzuki, M.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 167-174 (1977).
- 30) Tsugita, T., Imai, T., Doi, Y., Kurata, T., Kato, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1351-1354 (1979).
- 31) Fincham, J. R. S., Day, P. R., Radford, A.: *Fungal Genetics*, p. 285, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, USA (1979).
- 32) Yajima, I., Yanai, T., Nakamura, M., Sakakibara, H., Hayashi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 373-377 (1981).
- 33) Kaminski, E., Libbey, L. M., Stawicki, S., Wacowicz, E.: *Appl. Microbiol.*, **24**, 721-726 (1972).
- 34) Kaminski, E., Stawicki, S., Wacowicz, E.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 1001-1004 (1974).