

[生物工学会誌 第74巻 第2号 91-96, 1996]

「ムレ香」生成酵素の性質と生成条件[†]

西村 顕*・武内 素子・窪寺 隆文

元吉 徹・近藤 恭一

白鶴酒造株式会社
〒658 神戸市東灘区住吉南町4-5-5

(平成7年7月12日受付 平成7年10月16日受理)

Characteristics of a *Mureka*-Forming Enzyme and Conditions of Its Production
by Molds Used for Making *Koji*[†]AKIRA NISHIMURA,* MOTOKO TAKEUCHI, TAKAFUMI KUBODERA, TORU MOTOYOSHI, and KYOICHI KONDO (*Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., 4-5-5 Sumiyoshiminami-machi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658*) *Seibutsu-kogaku* 74: 91-96, 1996.

Mureka is an unpleasant smell that develops in non-pasteurized sake and which is composed of *i*-valeraldehyde (*i*-Val), ethyl *i*-valerate and 1,1-diethoxy-3-methylbutane. The main component, *i*-Val, is produced by an enzymatic reaction with *i*-amylalcohol (*i*-AmOH). A *mureka*-forming enzyme was purified approximately 32-fold by column chromatography on DEAE-Sepharose and Phenyl-Sepharose, and gel filtration on Sephadex G-100. The enzyme showed high activity with *i*-AmOH. The enzyme activity was inhibited by antioxidants and heavy metal ions such as Co^{2+} and Hg^{2+} , but not by EDTA and *o*-phenanthroline. The enzyme was presumed to be a new alcohol oxidase. Changes in the activity of the enzyme under various conditions were measured. The results showed that the formation of *mureka* (*i*-Val) depended on the species of mold used for making the *koji*. Also the activity was observed to be higher under anaerobic than under aerobic conditions.

[Key words: sake, *mureka*, *i*-valeraldehyde, *koji*]

清酒市場において、新鮮な香味を訴求点とする生酒、生貯蔵酒はいまや清酒の定番商品として定着している。生酒は火入れ処理を行っていないために各種酵素の活性が残存しており、常温で保存すると成分の変化が起きる。この変化は現状では限外ろ過処理などにより酵素活性を除外もしくは減少させることなくしては避けられない。¹⁻³⁾ そのような成分変化のうち「ムレ香」と呼ばれる劣化臭が発生すると、生酒としての商品価値が著しく低下する。著者らはこの「ムレ香」の研究を進めており、「ムレ香」成分の同定とその定量方法、⁴⁾ 「ムレ香」物質の官能評価⁵⁾ およびその生成機構⁶⁾ についてすでに報告した。

すなわち、「ムレ香」は *i*-valeraldehyde (*i*-Val), ethyl

i-valerate, 1,1-diethoxy-3-methylbutane の3物質の複合香であり、官能的に「ムレ香」の主体をなす物質は *i*-Val であることを明らかにした。生酒を 20°C で20日間保存すると、「ムレ香」の主体である *i*-Val は清酒中の閾値 (1.8 ppm) に達し、官能的にも不快臭として識別される。この *i*-Val は清酒中に 100~200 ppm 含まれる⁷⁾ *i*-amylalcohol (*i*-AmOH) を前駆体とした酵素反応により生成される。

本報では、「ムレ香」の主体をなす *i*-Val を生成する酵素（「ムレ香」生成酵素）の精製を試み、その性質と酵素生成条件について検討したので報告する。

実験方法

試料の調製 「ムレ香」酵素の由来を検討するため清酒醸造に使われている微生物の試料を調製した。酵母は醪中より分離した菌体の細胞抽出液を *i*-

[†] 清酒の「ムレ香」に関する研究 (第5報)。Studies on *Mureka* of sake (V).

* 連絡先, Corresponding author.

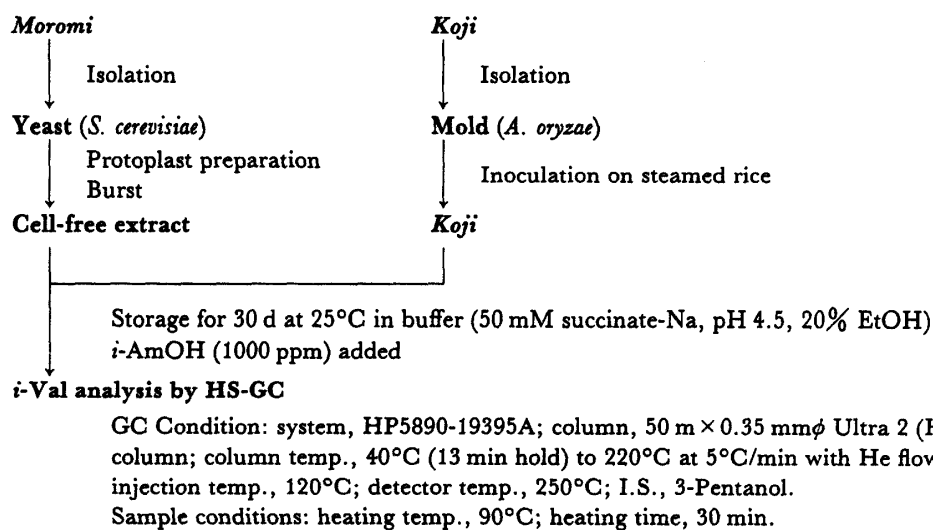


Fig. 1. Scheme for measuring activity of sake-making organisms.

AmOH を含むコハク酸緩衝液 (pH 4.5, 50 mM) に添加し, 生成する *i*-Val 量を HS-GC 分析にて測定した. また麹菌は麹より単離した菌を用い無菌的に再び麹を造り, その麹を *i*-AmOH を含むコハク酸緩衝液に添加し生成する *i*-Val 量を HS-GC 分析にて測定した. その試料調製フローを Fig. 1 に示した.

粗酵素液の調製 酵素の精製を行うために粗酵素液を調製した. 既報⁴⁾に従い原酒を約300倍に濃縮した活性区分をリン酸緩衝液 (pH 6.5, 50 mM) で透析後, 限外ろ過処理にて濃縮し粗酵素試料とした.

精製ステップ DEAE-Sephrose, Phenyl-Sephrose カラムクロマトグラフィーおよび Sephadex G-100 によるゲルろ過にて酵素の精製を行った.

酵素活性測定方法 「ムレ香」生成酵素の活性は, 前報⁹⁾に従って LPBV 法にて測定した.

製麹方法 原らの方法⁹⁾に従い, 殺菌した α 化米 50 g に孢子を 10^5 個/g となるように接種し, 製麹装置に入れ 35°C 一定で45時間製麹を行った.

製麹装置 伊藤の装置¹⁰⁾を参考にしながら, 約 100 g の麹を製麹できる装置を作製した. その装置図

を Fig. 2 に示す. 酸素濃度を調整した気体 (窒素, 酸素混合気体) を加湿した後, 一定温度に設定した培養槽に導入し製麹した.

供試菌株 国税庁醸造試験所より分譲を受けた *Aspergillus oryzae* RIB23, RIB40, RIB128 株および当社で単離した *Aspergillus oryzae* HO-1 株, *Aspergillus kawachii* HK-1 株, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* HL-1 株を使用した.

麹菌体量の測定 五味らの方法¹¹⁾を改変して, 麹菌体量を測定した. すなわち, 麹菌細胞壁溶解酵素として *Oerskovia* 由来の溶解酵素のかわりに *Trichoderma harzianum* 由来の溶解酵素 (Sigma 社製: Lot No. L2265) を使用した.

酵素力価測定法 麹の α -アミラーゼ, グルコアミラーゼ, 酸性プロテアーゼ, 酸性カルボキシペプチダーゼの酵素力価は, 国税庁所定分析法注解¹²⁾に従って測定した.

麹の *i*-Val 生成能の測定 基質として *i*-AmOH (1,000 ppm) を含むコハク酸緩衝液 (pH 4.5, 50 mM, Ampicillin 100 γ) 10 ml に麹を 6 g 添加し, 30°C で2日間反応させた後, 生成した *i*-Val を HS-GC にて測定した. *i*-Val 生成能は, 時間あたり, 菌体量あたりの *i*-Val 生成量 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{d}$) で示した.

製麹時における麹の *i*-Val 生成量の測定 *i*-AmOH を含まないコハク酸緩衝液 (pH 4.5, 50 mM, Ampicillin 100 γ) 10 ml に麹を 6 g 添加, 5°C で24時間抽出した後, 緩衝液中に抽出された *i*-Val を HS-GC にて測定した.

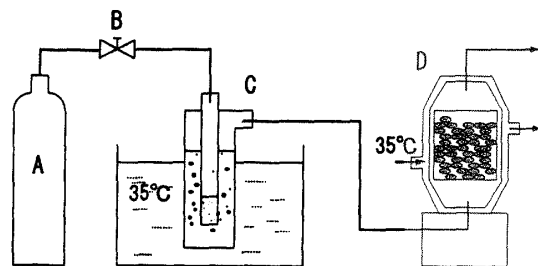


Fig. 2. Apparatus for making koji. A, gas cylinder; B, valve; C, humidifiers; D, culture vessel.

Table 1. Formation of *i*-Val by yeast and mold.

	<i>i</i> -AmOH addition	<i>i</i> -Val formation (ppm)
Control	+	0.0
<i>S. cerevisiae</i>	—	0.0
	+	0.0
<i>A. oryzae</i>	—	0.0
	+	1.9

i-AmOH was added at 1,000 ppm. The *i*-Val concentration was measured after storage for 30 d at 25°C.

実験結果および考察

「ムレ香」生成酵素の由来 「ムレ香」生成酵素が清酒醸造に関与している微生物、つまり清酒酵母と麹のいずれに由来するかを検討した。その結果を Table 1 に示す。醪から分離した酵母は TTC 染色、 β アラニン要求性、泡無しなどの性質により協会 K-701 酵母と確認した。この分離した酵母の細胞抽出液を添加した系では *i*-Val は生成しないが、麹を添加した系では *i*-Val の生成が認められ、*i*-Val 生成酵素が麹菌由来であることが明らかになった。

「ムレ香」生成酵素の部分精製

1) DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー 粗酵素液を用い、DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー (5 cm×30 cm) を行った。溶出には 0~0.5 M NaCl 濃度勾配を用いた。その溶出結果を Fig. 3 に示す。「ムレ香」生成酵素活性は矢印で示したピーク (0.18 M NaCl 付近) のみに存在した。この画分をアミコン社製限外ろ過膜 (分画分子量20,000) を用いて濃縮後、リン酸緩衝液 (pH 6.5, 50 mM) に対し透析を行った。

2) Phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィー DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーで得られた活性画分を、1.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含むリン酸緩衝液 (pH 6.5, 50 mM) で平衡化したカラムに注入した。非

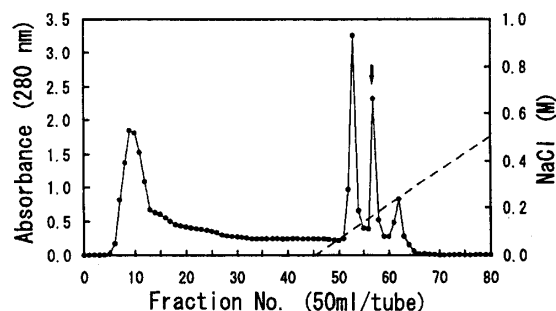


Fig. 3. DEAE-Sephadex column chromatogram of mureka-forming enzyme.

吸着区分を溶出させた後、1.7~0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度勾配を用いて溶出した。その結果、「ムレ香」生成酵素活性は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.1 M 付近に溶出したピークに認められた。

3) Sephadex G-100 によるゲルろ過 Phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィーで得た活性画分を脱塩、濃縮後、Sephadex G-100 (2.5 cm×75 cm) によるゲルろ過を行った。

以上の精製操作の過程を Table 2 にまとめて示した。また、SDS-PAGE にて酵素の精製度合を確認したが、主要な濃いバンドの他に、非常に薄い夾雑バンドが1本認められ、収率4.2%で32倍の部分精製であった。

「ムレ香」生成酵素の諸性質

1) 金属、薬剤の影響 各種金属塩 (1 mM) の存在下で酵素活性を測定し、金属イオンの影響を検討した結果を Table 3 に示した。活性を増加させる金属イオンは見られなかった。一方、 Co^{2+} および Hg^{2+} イオンにより活性はほとんど阻害された。また、 Ag^{2+} 、 Cu^{2+} イオンにより約60%の活性が阻害された。

次に、各種阻害剤が活性に与える影響を検討した。その結果を Table 4 に示す。アスコルビン酸、イソアスコルビン酸、メタ重亜硫酸カリウムの酸化防止剤により完全に活性は阻害され、重亜硫酸ナトリウムによ

Table 2. Purification of the enzyme.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (mU/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Dialysis	2,590	0.59	0.23	100	1.0
DEAE-Sephadex	248	0.17	0.69	28.8	3.0
Phenyl-Sepharose	148	0.11	0.74	18.6	3.2
Sephadex G-100	3.4	0.025	7.35	4.2	32.0

Table 3. Effects of inorganic salts on enzyme activity.

Metal ion*	Relative activity (%)
None	100
CuCl ₂	90
LiCl	95
AgNO ₃	47
MgCl ₂	89
CaCl ₂	97
CoCl ₂	0
CuSO ₄	36
ZnSO ₄	95
CdCl ₂	96
HgCl ₂	0
FeCl ₃	94

* The concentration of each ion was 1 mM.

り50%活性が阻害された。一方, *o*-フェナントロリン, EDTA のキレート剤や DTNB, PCMB の SH 酵素阻害剤で阻害効果が認められなかった。

以上の結果および清酒中の溶存酸素濃度を低くすることにより *i*-Val の生成が抑制されること¹³⁾から, 本酵素はアルコールデヒドロゲナーゼではなくアルコールオキシダーゼだと考えられる。

2) 基質特異性 炭素数 C1~C6 の直鎖あるいは分枝アルコールに対する基質特異性を検討した。その結果を Table 5 に示した。 *i*-AmOH に対してもっとも強い反応性を示し, この時の相対活性を100%として

Table 4. Effects of reagents on enzyme activity.

Reagent*	Relative activity (%)
None	100
Ascorbic acid	0
<i>i</i> -Ascorbic acid	0
Cysteine	78
2-Mercaptoethanol	67
Potassium metabisulfate	0
Sodium bisulfite	48
<i>O</i> -Phenanthroline	95
EDTA	93
Sodium diethyldithiocarbamate	101
Sodium dodecyl sulfate	75
DTNB	99
PCMB	95

* The concentration of each reagent was 1 mM.

Table 5. Substrate specificity of the enzyme.

Substrate*	Relative activity (%)
Methanol	2
Ethanol	8
1-Propanol	13
2-Propanol	21
1-Butanol	24
<i>i</i> -Butanol	44
<i>tert</i> -Butanol	52
<i>n</i> -Amyl alcohol	88
<i>i</i> -Amyl alcohol	100
<i>act</i> -Amyl alcohol	40
<i>n</i> -Hexanol	32
Glycerol	0
1,4-Butanediol	0
Phenol	0

* The concentration of each substrate was 1,000 ppm.

表わした。

炭素数 C5 にもっとも強い反応性を示し, 炭素数が少なくなるに従い反応性が低くなった。また, 直鎖アルコールより分枝アルコールに強い反応性を示した。

このような性質の酵素は今までに知られておらず, 本酵素は新しいタイプのアルコールオキシダーゼと考えられる。

「ムレ香」酵素生成の諸条件

1) 麹菌株間の差 「ムレ香」生成酵素は麹菌由来である。そこで, 麹菌の種類により *i*-Val 生成能に差が認められるかを検討した。 *A. oryzae* の標準株として RIB23, 40, 128 株, 当社で分離した *A. oryzae* HO-1 株, 焼酎麹として *A. kawachii* HK-1 株, *A. luchuensis* mut. *kawachii* HL-1 株を用いて麹を調製後, 各菌株の *i*-Val 生成能を測定した。その結果を Table 6 に示す。

村上は, *A. oryzae* RIB23 株を嫌氣的生育株(発酵型), RIB40 株を好氣的生育型(呼吸型), RIB128 株を中間型に分類し, 好氣的生育型株は嫌氣的生育株に比べ一般に強い酸化酵素を有することを報告している。¹⁴⁾しかし酸化酵素の一種である「ムレ香」生成酵素による *i*-Val 生成能については, 嫌氣的生育株の RIB23 が好氣的生育株の RIB40 より高くなる結果が得られた。このように *A. oryzae* では菌株の違いにより *i*-Val 生成能に差が認められたが, *A. kawachii*, *A. luchuensis* の焼酎麹では *i*-Val 生成能はほとんど見られず, 黒麹菌と黄麹菌では *i*-Val 生成能が異なることが示唆された。

Table 6. Comparison of *i*-Val-forming activity and other enzyme activities among several strains.

Strain	Mycelia (mg/g)	AAase (U/g)	GAase (U/g)	APase (U/g)	ACPase (U/g)	<i>i</i> -Val-forming activity (μmol/mg/d)
<i>A. oryzae</i>						
RIB23	7.72	919	355	3,092	6,687	0.030
RIB40	7.92	1,520	367	3,481	7,476	0.015
RIB128	8.78	607	283	1,407	7,722	0.027
HO-1	9.00	889	76	2,713	8,208	0.018
<i>A. kawachii</i>						
HK-01	3.93	70	290	6,055	1,251	0.001
<i>A. luchuensis</i>						
HL-01	3.07	129	452	7,528	2,073	0.001

AAase, α -amylase; GAase, glucoamylase; APase, acid protease; ACPase, acid carboxypeptidase.

Mycelial weight was measured by the *N*-acetyl gulucosamine (*N*-AcGlcNH₂) method of Gomi *et al.*¹¹⁾

i-Val forming activity was measured by the HS-GC method. *Koji* of each strain was cultivated for 45 h at 35°C.

2) 製麴時の経時変化 *A. oryzae* RIB-128 株を用いて製麴中における *i*-Val 生成能, 菌体量ならびに麴自体が生成した *i*-Val 量の経時変化について検討した。その結果を Fig. 4 に示す。製麴開始34時間(仲仕事~仕舞仕事)後に *i*-Val 生成能が増加し始め, 「ムレ香」生成酵素は麴が生産する他の酵素と同様,¹⁵⁾ 菌体の増殖と連動して増加することが明らかとなった。また, 麴自体が生成する *i*-Val 量は, *i*-Val 生成能が増加し始める34時間目に最大となり出麴時にはほとんど検出されなかった。伊藤は仲仕事時に *i*-Val や *i*-butylaldehyde が多く放出され, これが「オハグロ臭」として感じられ杜氏による製麴作業の目安となっていることを報告¹⁰⁾ しており, 今回の結果は伊藤の報告と一致している。また, 麴自体が生成する *i*-Val 量が最大になる時期と *i*-Val 生成能が増加し始める時期が一致することより, *i*-Val 生成酵素が何らかの条件によって誘導されることが推察されるが, 詳細については今後の検討が必要である。

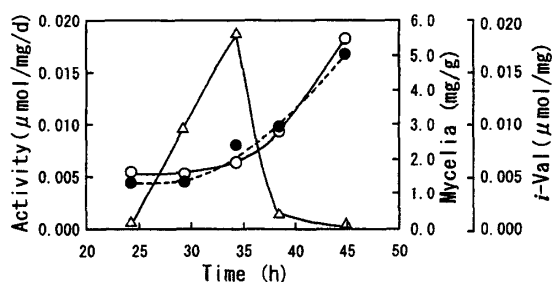


Fig. 4. Changes in *i*-Val-forming activity during *koji* making. Symbols: ○, activity; ●, mycelia; Δ, *i*-Val.

3) 製麴時の通気条件 製麴中の通気条件は重要な項目である。東角と佐々木は, 酸素通気麴と炭酸ガス通気麴で麴によって生産される有機酸組成が異なることを報告している。¹⁶⁾ 伊藤は, 嫌気条件下での製麴において麴はアルデヒドを主体とする揮発成分を多量に放出することを報告している。¹⁰⁾ そこで酸素濃度を変えた, 嫌気, 好気条件による *i*-Val 生成能への影響について検討した。嫌気, 好気条件の設定には酸素濃度が5%, 10%, 20%の酸素窒素混合ガスを使用した。24時間目の切返し時まではすべて酸素濃度20%のガスを通気し, その後各条件のガスに切り替え 35°C 一定で45時間製麴を行った。各条件における *i*-Val 生成能の測定結果を Table 7 に示す。酸素濃度が20%から5%へ低下すると, *i*-Val 生成能が約70%増加した。

岡崎らは, 製麴において炭酸ガス濃度が1%以上に

Table 7. Effect of oxygen supply on *i*-Val formation during *koji* making.

Condition* (O ₂ :N ₂)	Mycelia density (mg/g)	<i>i</i> -Val-forming activity (μmol/mg/d)
20:80 ^a	6.04	0.007
10:90 ^b	5.85	0.009
5:95 ^c	6.16	0.012

* Atmospheric conditions:

^a Gas phase of 20% O₂ and 80% N₂ (0–45 h).

^b Gas phase of 20% O₂ and 80% N₂ (0–24 h) and then 10% O₂ and 90% N₂ (24–45 h).

^c Gas phase of 20% O₂ and 80% N₂ (0–24 h) and then 5% O₂ and 95% N₂ (24–45 h).

Koji was prepared with *A. oryzae* RIB128.

なると菌体の増殖がいくぶん阻害され酵素生産にも影響があるが,¹⁷⁾ 酸素濃度は酵素生産に影響ない¹⁸⁾と報告している。しかし、製麴時に嫌気条件にすると*i*-Val生成能が増加する結果から、*i*-Val生成酵素の生産については酸素濃度の影響が強いことが示唆された。つまり、製麴条件（通気条件）を管理することにより「ムレ香」の発生しにくい麴製造の可能性が示された。

今後、*i*-Val生成能の低い（「ムレ香」の発生しにくい）麴の育種や詳細な製麴条件を検討する予定である。

要 約

生酒の劣化臭である「ムレ香」の主体をなす*i*-valeraldehyde (*i*-Val) を生成する酵素が、麴菌由来であることを明らかにした。さらに本酵素を約32倍まで部分精製を行い性質を検討した結果、新しいタイプのアルコールオキシダーゼであることが示唆された。また製麴における酸素濃度の影響を検討した結果、嫌気条件の方が好気条件より麴の*i*-Val生成能が高くなることを明らかにした。

文 献

1) 近藤恭一, 草間 透, 中沢英五郎, 竹村成三: 醸協, 79, 142-143 (1984).

2) 近藤恭一, 大場俊輝, 中村欽一: 醸協, 79, 267-270 (1984).
 3) 西村 顕: 醸協, 84, 583-587 (1989).
 4) 西村 顕, 近藤恭一, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村成三: 醸酵工学, 67, 237-244 (1989).
 5) 西村 顕, 元吉 徹, 近藤恭一, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村成三: 醸協, 85, 576-579 (1990).
 6) 元吉 徹, 西村 顕, 近藤恭一, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村成三: 醸酵工学, 69, 1-6 (1991).
 7) 日本醸造協会: 醸造成分一覽, p. 88-98 (1977).
 8) 西村 顕, 武内素子, 近藤恭一, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村成三: 醸協, 90, 151-153 (1995).
 9) 原 昌道, 脇田征也, 大塚謙一: 醸酵工学, 45, 400-409 (1967).
 10) 伊藤 清: 生物工学, 71, 115-127 (1993).
 11) 五味勝也, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷知栄子, 井上 博, 飯村 穰, 原 昌道: 醸協, 82, 130-133 (1987).
 12) 第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, p. 213-228 (1993).
 13) 西村 顕, 武内素子, 近藤恭一, 三島秀夫, 竹村成三: 日本生物工学会大会要旨集, p. 53 (1993).
 14) 村上英也: 農化, 31, 715-719 (1957).
 15) 岡崎直人, 竹内啓修, 菅間誠之助: 醸協, 74, 683-686 (1979).
 16) 東角治雄, 佐々木幹二: 醸協, 51, 291-294 (1961).
 17) 岡崎直人, 木谷光伸, 田中利雄: 醸協, 79, 133-136 (1984).
 18) 岡崎直人: 醸協, 75, 831-835 (1980).