

[生物工学会誌 第89巻 第1号 20–26. 2011]

中国餅麴（曲）由来の新規黒色糸状菌の焼酎醸造特性

野崎 直樹^{1*}・中原 徳昭¹・山本 英樹²・榊原 陽一³
林 幸男⁴・小川喜八郎⁴・水光 正仁³

¹雲海酒造株式会社, ²宮崎県食品開発センター, ³宮崎大学農学部, ⁴宮崎大学工学部

(2010年8月9日受付 2010年11月26日受理)

Fundamental studies on shochu brewing characteristics of the novel black filamentous fungi isolated from Chi-chu

Naoki Nozaki^{1*}, Noriaki Nakahara¹, Hideki Yamamoto², Yoichi Sakakibara³, Sachio Hayashi⁴, Kihachiro Ogawa³, and Masahito Suiko³ (*Unkai Shuzo Co. Ltd.*, 1800-5 Minamimata, Aya, Miyazaki 880-1303¹; *Miyazaki Prefecture Foods Development Center*, 16500-2 Higashikaminaka, Sadohara, Miyazaki 880-0303²; *Faculty of Agriculture*³ and *Faculty of Engineering*⁴, *University of Miyazaki*, Miyazaki 889-2192) *Seibutsu-kogaku* **89**: 20–26, 2011.

The potential of 16 strains of black filamentous fungi isolated from Chi-chu was investigated for use as koji in shochu making. Of the 16 black filamentous fungi strains cultivated on rice solid culture koji, 5 strains—KNO4 and KNO9 (belonging to the *Aspergillus niger* Tiegh. sp.) and KNO16, KNO17, and KNO18 (belonging to the *Aspergillus* sp.)—exhibited high capabilities of citric acid production and high enzyme activity compared to *Aspergillus awamori* RIB 2602. On further screening, KNO16 and KNO18 were selected based on their external characteristics, production of stable conidia, and high acid carboxypeptidase activity compared to *A. awamori* RIB 2602. Further, unlike *A. awamori*, these strains did not produce 2-methylisoborneol and geosmin, which is responsible for a high fragrant flavor. Addition of artificial ash to rice and barley media promoted >80% germination, and the strains produced 10⁹ g⁻¹ of conidia in the koji. Importantly, the 2 selected strains did not produce aflatoxin or ochratoxin in the koji solid culture. The acid carboxypeptidase activity of KNO16 and KNO18 was >2.6 fold that of *A. awamori* RIB 2602. The 2 selected strains were used for alcoholic fermentation tests of laboratory scale under optimal temperature conditions for citric acid and enzyme productions in the koji. KNO16 and KNO18 had alcoholic fermentation rates that corresponded to that of commercial strain *A. awamori*. Further, the selected strains showed highly productivity of isoamyl alcohol with commercial strain *A. awamori*. From these results, it was concluded that the novel strains, KNO16 and KNO18, are very useful for shochu making.

[**Key words** : black filamentous fungi, enzymatic activity, flavor component]

焼酎の原型とされる泡盛に使用されている黒麹菌は、中国大陸南方系の米の蒸留酒を醸造している地域に由来している。著者らは、その地域の焼酎醸造環境に着目し、その地域で醸造に使用されている餅麴（曲）から16株の*Aspergillus*属に帰属すると推定される菌株を取得した。これらの16株の中から標準株の*Aspergillus awamori* RIB 2602と比較して優れたクエン酸生成および酸性カルボキシペプチダーゼなどの高い酵素活性を示す5株の

有用菌を選抜できた¹⁾。本研究の目的は香味形成、酵素活性の増強などの酒質向上に及ぼす新規有用黒色糸状菌の選抜にあり、得られた5株は優れた醸造特性を持ち応用性の高い新規有用株の可能性が示唆された。前報¹⁾では、菌株特性に主体をおき菌株選抜を行い、製麴では経過時間による製麴管理を行い、菌株選抜を行った。

しかし、焼酎醸造では温度による製麴管理が行われていることから、取得した16株の黒色糸状菌の焼酎醸

*連絡先 E-mail: kenkyu4@unkai.co.jp

造への応用性を実証するために、スケールアップした条件下で、温度による製麹管理を行い、出麹酸生成および酵素活性、麹の性状や香味に与える影響を確認した。製麹試験の結果、分生子着生能にすぐれ、異臭のない優良な菌株KNO16およびKNO18の2菌株について、主原料を麦とした発酵試験を行い、発酵醪の経時的アルコール濃度や蒸留原酒の香気成分およびアミノ酸分析を行い、醸造特性を確認した。その結果、上記の2菌株は醪の発酵が良好で、すぐれた香気を呈し、高いアルコール生成を示した。以上の醸造特性から考察し、従来焼酎醸造に使用されている黒麹菌との差別化が図れる黒色系糸状菌の可能性が示唆されたので報告する。

実験方法

使用菌株 前報¹⁾で報告した黒色系糸状菌16株(KNO2～KNO7, KNO9～KNO18)を実験に供した。特に実用株の可能性が示唆されたKNO4, KNO9は*Aspergillus niger* Tiegh.の記載に最も類似し、KNO16, KNO17およびKNO18は*Aspergillus* sp.の記載に最も類似している。また、比較対照菌株は、標準株の*A. awamori* RIB 2602 (ATCC 14331, NBRC 4388) (以後標準株と略す)および市販黒麹菌(*A. awamori*)を用いた。発酵試験は焼酎用協会2号酵母(以後SH4と略す)を用いて行った。

菌体培養用培地 糸状菌用培地にはポテトデキストロース平板培地²⁾(以下PDA平板培地と略す)を用い、酵母用培地にはYM液体培地³⁾を使用した。

精白米および精白大麦の α 化 白米および大麦は75%精白原料を用い α 化米⁴⁾の調製法に準じて行った。

大型ガラスシャーレを用いた製麹 直径20 cmの大型ガラスシャーレに、米および麦の α 化原料400 gを秤取し、蓋の内側をろ紙(No.5A, Advantec製)で覆い、95°Cで1時間乾熱殺菌を行い室温まで冷却した。次に、滅菌済み0.1% Tween 80溶液を用い、初発の分生子数が 5×10^5 個/gおよび水分量が約36%となるように分生子懸濁液を均一に吸水させ分生子接種を行った。38°Cで静置し、品温が42°Cに達した時点で混合攪拌し、品温を36°Cに調温する工程を2回繰り返した。さらに再度品温が42°Cに達した時点で混合攪拌し品温を30°Cに調温した。蓋を少し開け、水分の蒸散を行いながら30°Cで13時間静置後、混合攪拌し蓋を全開にして3時間後に出麹とした。

出麹酸度測定 出麹酸度の測定⁵⁾は、国税庁所定分析法注解に準じて行った。

酵素活性測定 酵素溶液の調製および酵素活性測定⁵⁾は、国税庁所定分析法注解に準じて行った。

麹のカビ臭測定 固相マイクロ抽出(SPME)ガス

クロマトグラフ質量分析器を用い下記の条件で絶対検量線法により測定を行った。

オートサンプラー：SPME用オートインジェクター AOC5000 (島津製作所製)、分析装置：GCMS-2010 plus (島津製作所製)、ファイバー：2 cm-50/30 μ m StableFlex DVB/Carboxen/PDMS (Supelco製)、加熱温度：65°C、抽出時間：30分、注入法：スプリットレス 1分、気化室温度：230°C、カラム：J & W Scientific DB-5MS (Agilent Technologies製) 60 m $\times$ 0.25 mm i.d., 膜厚0.25 μ m、キャリアガス：ヘリウム (250 kPa)、カラム温度：50°Cで5分保持後、230°Cまで4°C/minで昇温させ230°Cで5分保持、イオン化モード：EI、イオン化電圧：70eV、イオン源温度：200°C、測定モード：SIM、標準物質：水質検査用 2-methylisoborneol standard solution (和光純薬工業製)、水質検査用 2-methylisoborneol-geosmin mixture standard solution (和光純薬工業製) データ解析：島津ガスクロマトグラフ質量分析用 GCMSsolution Ver.2.53を使用した。

分析用試料は、米麹 5 gを20 ml SPME用バイアルに秤量し供試した。

分生子着生能確認 直径9 cmの滅菌済みプラスチックシャーレに米および麦の α 化原料を15 g秤取し、95°Cで1時間乾熱殺菌を行い室温まで冷却した。人工木灰として0.3% KH_2PO_4 、0.1% MgSO_4 を含む滅菌済み0.1% Tween 80溶液を用い、初発の分生子数が 5×10^5 個/gおよび水分量が約40%となるように分生子懸濁液を均一に吸水させ分生子接種を行った。調湿用6.5% NaOH溶液が200 ml入った大型ガラスシャーレ中に静置し、35°Cで24時間、37°Cで48時間、30°Cで72時間静置培養した。最終24時間は調湿水を除去し分生子を乾燥させた。着生した分生子を分散させるため麹1 gを0.1% Tween 80溶液100 mlに添加し、適宜攪拌しながら1時間静置後、トーマ氏血球計を用い分生子数を算出した⁶⁻⁸⁾。

分生子発芽率 麹に着生した分生子を150メッシュの篩を用い回収した。滅菌した0.1% Tween 80溶液10 mlに分生子を添加し、無菌的に約 5×10^2 個/mlとなるように希釈後100 μ lをPDA平板培地に塗布し、30°Cで約30時間静置培養後に形成されたコロニーを数え発芽率を算出した⁶⁻⁸⁾。

マイコトキシン生成確認 製麹した米麹、麦麹および分生子を十分着生させた米麹、麦麹を用い、ベラトックスマイコトキシン検査キット (Neogen製) およびマイクロプレートリーダー Synergy HT (BioTek製) を使用し、アフラトキシンおよびオクラトキシンの生成の有無を確認した。

発酵試験 市販黒麹菌と選抜されたKNO16およびKNO18は、8 l容ガラス製発酵容器を用い、米麹800 g(原

料換算), YM液体培地で30°C, 24時間振盪(100 rpm)培養したSH4を 1×10^6 個/mlとなるように蒸留水で調製し, 汲み水歩合120%, 30°Cで6日間発酵を行い一次醪とした。二次醪は75%精白大麦1600 g, 汲み水歩合160%の配合で0°C 14日間発酵を行った。

醪分析法 醪分析は国税庁所定分析法注解⁹⁾に準じて行った。また, アルコール濃度は簡易アルコール分析器AL-2(理研計器製)を用いて定量した。

蒸留 醪3 lをロータリーエバポレーターRE-10E-100(SIBATA製)を用い, 65°C, -680 mmHg, 蒸留歩合90%で蒸留を行った。

アミノ酸分析 高速液体クロマトグラフィーアミノ酸分析システム(島津製作所製)を用い下記の条件で絶対検量線法により測定を行った。分離カラム: Shim-pack Amino-Na(島津製作所製) 100 mm × 6.0 mmφ, 粒子径 5 μm アンモニアトラップカラム: Shim-pack ISC-30/S0504 Na 50 mm × 4.0 mmφ, 流速: 0.6 ml/min サンプル注入量: 10 μl, 標準液: アミノ酸混合液(和光純薬工業製, なかH型)を使用した。データ解析: 島津高速液体クロマトグラフ用LCワークステーションLabSolutions/LCsolution ver.1.1を使用した。

分析用試料は, 醪を遠心分離(3000 rpm, 15分)後にろ紙(No.5A, Advantec製)ろ過を行い, 超音波脱気し, ろ液と等量の特級 99.5%エタノール(和光純薬工業製)を加え, よく攪拌後, 2°Cの恒温下で一夜静置した。遠心分離(3000 rpm, 15分)後, 上澄みを回収し, アミノ酸分析用希釈バッファー[0.2N $\text{Na}_3(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$), pH2.2]で5倍希釈後に0.45 μ Millex HPフィルター(Millipore製)を用い, ろ過後に供試した。

低沸点香気成分分析 ヘッドスペースガスクロマトグラフィーを用い下記の条件で内部標準法により測定を行った。ヘッドスペースサンプラー: Turbo Matrix 40(Perkin Elmer製), 温度条件: 60°C, 30分, 分析装置: GC-2010 plus(島津製作所製), カラム: J & W Scientific DB-WAX(Agilent Technologies製) 30 m × 0.53 mm i.d., 膜厚1 μm, キャリアガス: ヘリウム(40 kPa), カラム温度: 35°Cで10分保持後, 90°Cまで5°C/minで昇温させ90°Cで10分保持, 検出器: FID(230°C), 標準液: acetaldehyde(和光純薬工業製, 特級), ethyl acetate(和光純薬工業製, 特級), *n*-propyl alcohol(和光純薬工業製, 特級), isobutyl alcohol(和光純薬工業製, 特級), isoamyl acetate(和光純薬工業製, 特級), isoamyl alcohol(和光純薬工業製, 特級), ethyl caproate(和光純薬工業製, 特級)をethanol(和光純薬工業製, 特級)および蒸留水を用い調製を行った。内部標準物質: 4-methyl-2-pentanol(和光純薬工業製, 特級)を0.2%となるようにethanol(和光純薬工業製, 特級)および蒸留水を用い調

製を行った。データ解析: 島津ガスクロマトグラフ用GCワークステーションGCsolution ver.2.3を使用した。

分析用試料は, 醪を遠心分離(3000 rpm, 15分)後にろ紙(No.5A, Advantec製)ろ過を行い, 超音波脱気した。蒸留原酒は, 原酒を0.3 μフィルター(Advantec製)ろ過後, アルコール分25%に割り水を行い, 再度0.3 μフィルター(Advantec製)ろ過後に供試した。

実験結果

出麴酸度 焼酎醪の雑菌汚染防止のため, 酸性条件での発酵が必須であり, 醪のpHを下げるため麴菌の生成する出麴酸は重要である。

出麴酸生成能が低い菌株は実用化の可能性が低いため, スケールアップした条件においても十分な出麴酸生成能を有することが重要である。一般的に行われる麴蓋法の原料層厚は1~2 cmであり, 大型ガラスシャーレを用いた製麴試験において層厚1~2 cmを形成し, 原料の温度をできるだけ均一化し温度調整を効率よく行うため, 400 gのα化原料を用いスケールアップした製麴試験を行った。

優良菌株として得られた16株の黒色系糸状菌の出麴酸度測定を行った結果, KNO_2 および KNO_3 を除く14株は, 米麴では標準株の1.0~1.7倍を示し, 麦麴では0.9~1.2倍の出麴酸度を示した(Table 1)。

酵素活性 焼酎醸造に重要である主要な糖化酵素のα-アミラーゼおよびグルコアミラーゼ, ペプチドおよびアミノ酸の生成に重要である酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼ活性を測定した。取得した16株の黒色系糸状菌を用いた米麴中の各酵素活性を標準株と比較した。α-アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性に標準株との大差はなかったが, KNO_3 の酸性プロテアーゼ活性は標準菌の1.6倍の高い活性を示した。酸性カルボキシペプチダーゼ活性では, KNO_9 が2.3倍, KNO_{10} および KNO_{14} が2.4倍, KNO_{15} が2.2倍, KNO_{16} が2.6倍, KNO_{17} および KNO_{18} が2.8倍の高い活性を示した。原料タンパク由来のアミノ酸が増加し, 酵母のアミノ酸代謝により焼酎の香気成分へ間接的に影響があることが知られている高級アルコール増加の可能性が示唆された。麦麴では, 酸性カルボキシペプチダーゼ活性は KNO_{10} が1.3倍, KNO_{11} が1.6倍, KNO_{14} および KNO_{15} が1.4倍, KNO_{16} , KNO_{17} および KNO_{18} が1.7倍の高い活性を示した(Table 1)。

麴のカビ臭 *A. niger*に代表される黒色系糸状菌が生成する炭臭様の異臭として知られる2-MIB(2-methylisoborneol)やgeosmin^{9,10)}は, 麴の香りに影響を与えるだけでなく, 蒸留後の製品へも炭臭様の異臭を付与してしまうため麴での未生成が重要である。そこで, 固相

Table 1. Protease activities and acidity in rice and barley solid culture koji of the 16 isolated strains.

Strains	Rice solid culture koji			Barley solid culture koji		
	Acidity of koji	Acid protease	Acid carboxypeptidase	Acidity of koji	Acid protease	Acid carboxypeptidase
KNO2	120	94	66	62	100	66
KNO3	148	117	94	102	63	72
KNO4	144	125	95	96	97	55
KNO5	126	135	68	111	66	81
KNO6	132	135	70	115	50	58
KNO7	104	142	194	113	74	46
KNO9	159	110	233	108	75	107
KNO10	171	95	243	102	104	134
KNO11	157	110	192	99	85	155
KNO12	160	101	167	100	94	111
KNO13	30	95	67	17	100	33
KNO14	139	134	238	88	68	142
KNO15	145	127	221	93	68	136
KNO16	152	115	259	111	106	165
KNO17	157	136	281	111	116	174
KNO18	153	163	281	113	121	172

Protease activities and acidity in *A. awamori* RIB 2602 standard strain in rice solid culture koji are as follows: acidity, 7 ml/g dry-koji; acid protease, 10,524 U/g dry-koji; acid carboxypeptidase, 4958 U/g dry-koji.

In barley solid culture koji: acidity, 9.1 ml/g dry-koji; acid protease, 10,581 U/g dry-koji; acid carboxypeptidase, 6017 U/g dry-koji.

Table 2. The amount of 2-MIB and geosmin in rice solid culture koji of 16 isolated strains of black filamentous fungi.

Strains	2-MIB (ng/l)	Geosmin (ng/l)
Commercial A	—	—
KNO2	—	9.2
KNO3	—	5.4
KNO4	—	9.9
KNO5	—	2.2
KNO6	—	7.1
KNO7	—	2.2
KNO9	—	7.3
KNO10	—	6.4
KNO11	—	9.2
KNO12	16.0	9.7
KNO13	10.3	—
KNO14	77.8	24.7
KNO15	22.5	17.5
KNO16	—	—
KNO17	—	1.7
KNO18	—	—

—, undetected.

マイクロ抽出 (SPME) ガスクロマトグラフ質量分析器を用い、取得した黒色糸状菌 16 株を用いて製麹した米麹の 2-MIB および geosmin を測定した結果、本実験条件において、KNO16 および KNO18 の 2 株では、2-MIB および geosmin は検出されなかった (Table 2)。

分生子着生能および発芽率 クエン酸生成能、酵素活性およびカビ臭測定の結果、特に KNO16 および KNO18 は実用化の可能性が示唆される黒色糸状菌であることが確認された。実用化の際、安定した種麹の製

造を行うためには分生子着生能および発芽率が高いことが重要である。そこで、種麹菌株としての特性を評価するために KNO16、KNO18 および市販黒麹菌の分生子着生能および発芽率試験を行った。KNO16 および KNO18 は、人工灰無添加米麹では $5.7 \sim 6.0 \times 10^8$ 個/g の分生子を着生し、人工灰添加米麹では $1.2 \sim 1.4 \times 10^9$ 個/g の分生子着生を示した。人工灰添加の影響はなく 80% 以上の高い発芽率を示した。人工灰無添加麦麹では $1.5 \sim 1.8 \times 10^9$ 個/g の分生子を着生し、人工灰添加麦麹では $2.3 \sim 2.9 \times 10^9$ 個/g の分生子着生を示した。人工灰添加の影響はなく 90% 以上の高い発芽率を示した (Table 3)。

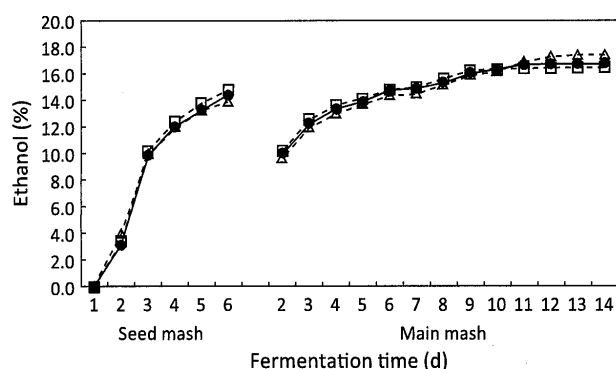
市販黒麹菌は、人工灰無添加米麹では 5.8×10^8 個/g の分生子を着生し、人工灰添加米麹では $1.2 \sim 1.3 \times 10^9$ 個/g 分生子着生を示した。人工灰添加の影響はなく 85% 以上の高い発芽率を示した。人工灰無添加麦麹では 1.7×10^9 個/g の分生子を着生し、人工灰添加麦麹では $2.4 \sim 2.5 \times 10^9$ 個/g 分生子着生を示した。人工灰添加の影響はなく、85% 以上の高い発芽率を示した (Table 3)。

マイコトキシン生成 *Aspergillus* 属の一部の菌株はアフラトキシンやオクラトキシンを生成することが報告されている^{11,12)}ことから、安全性確認のため、アフラトキシンおよびオクラトキシンの生成確認を行った。KNO16 および KNO18 は、本試験条件において本検出キットの検出限界である 1 ppb 以下を示し、アフラトキシンおよびオクラトキシンの生成は確認されなかった。

発酵試験 KNO16 および KNO18 を用いた米麹の発酵への影響確認のため、一般的に焼酎醸造で使用されている市販黒麹菌を用いた米麹を比較対照とし、発酵試

Table 3. Number of conidia and germination rate in rice and barley solid culture koji of isolated strains, KNO16, KNO18 and commercial strain, *A. awamori*.

Strains	Rice solid culture koji				Barley solid culture koji			
	0.3% KH ₂ PO ₄	0.1% MgSO ₄	Number of conidia (individual/g-koji)	Germination rate (%)	0.3% KH ₂ PO ₄	0.1% MgSO ₄	Number of conidia (individual/g-koji)	Germination rate (%)
Commercial A			5.8×10^8	88			1.7×10^9	90
	+		1.3×10^9	87	+		2.4×10^9	88
	+	+	1.2×10^9	85	+		2.5×10^9	89
KNO16			6.0×10^8	88			1.8×10^9	90
	+		1.3×10^9	92	+		2.3×10^9	95
	+	+	1.2×10^9	87	+	+	2.3×10^9	90
KNO18			5.7×10^8	87			1.5×10^9	94
	+		1.3×10^9	86	+		2.5×10^9	96
	+	+	1.4×10^9	84	+	+	2.8×10^9	95

Fig. 1. Ethanol production in shochu mash brewed with novel strains, KNO16 and KNO18, and the commercial strain, *A. awamori*. Symbols: ●, commercial A; □, KNO16; △, KNO18.

験を行った。二次醪14日目の醪アルコール濃度は、市販黒麹菌で16.8%, KNO16で16.5%, KNO18で17.4%を示し、選抜したKNO16およびKNO18は市販黒麹菌と同等に優良な発酵となることが示唆された (Fig. 1)。

KNO16およびKNO18は、醪の発酵が良好で、酸臭や墨汁様の異臭がなく良好な香りを呈した。

アミノ酸 麹菌の生成する各種酵素によりアミノ酸が生成され、酵母は焼酎醪中のアミノ酸を取り込み、香氣成分生成に関与¹³⁾することから、焼酎醪中のアミノ酸分析を行った。KNO16およびKNO18の一次醪および二次醪のアミノ酸濃度は、KNO16の isoleucine で市販黒麹菌の1.6倍の値が見られたが、他のアミノ酸では0.9~1.3倍の値を示した (Table 4)。

低沸点香氣成分 焼酎の一般成分としてアセトアルデヒドおよび主要高級アルコールの低沸点香氣成分分析を行った。一次醪では、KNO16およびKNO18のイソアミルアルコール濃度が市販黒麹菌と比べ1.8倍以上の高い値を示し、アセトアルデヒドで0.8~1.0倍、酢酸エチルで1.2倍、*n*-プロピルアルコールで1.0~1.1倍、イソブチルアルコールで0.9~1.2倍、酢酸イソアミル

で0.8~1.0倍、カプロン酸エチルで1.1~1.2倍の値を示した。 (Table 5)。二次醪および蒸留原酒では、酒母と同様の7成分で KNO16およびKNO18は、市販黒麹菌と比べ0.8~1.1倍の値を示した。

考 察

東南アジア圏は、十分な湿度と温度に恵まれたことから、カビや酵母などの育成に適している。このような条件を背景に、東南アジア圏はカビを使った酒の醸造が発達し、本格焼酎醸造にも受け継がれている。わが国の焼酎の原型は泡盛焼酎であるが、その泡盛焼酎が沖縄で造られ始めたのは15世紀になってからと言われており、黒麹菌 (*A. awamori*) が使用されてきた。日本への黒麹菌の伝播については諸学説があるが、東南アジアから琉球へ醸造・蒸留技術と一緒に渡来したと考えられているのが一般的であり、中国大陆南方系の米の蒸留酒を醸造している地域に由来していると考えられる。中国餅麴 (曲) は、微生物の生育環境を自然生態系の中に求めており、複雑なマイクロフローを形成しているため新たな有用微生物の発掘原点である。筆者らはその焼酎醸造環境に着目した。本研究の目的は香味形成、酵素活性の増強等により酒質向上に及ぼす新規有用黒色系糸状菌の選抜にあり、取得した菌株の焼酎醸造への応用を実証するためスケールアップし醸造特性を確認した結果、前報¹⁾で報告した新規有用株の可能性が示唆された5株中のKNO4, KNO9およびKNO17を除く、KNO16およびKNO18は実用化の可能性が示唆される優良菌であることが明らかになった。

取得したKNO16および KNO18は安定した焼酎醸造に重要な出麹酸 (クエン酸) を標準株と比較し、米麴で1.5倍、麦麴で1.1倍生成し、酸性プロテアーゼ活性ではKNO18で標準株の1.6倍、酸性カルボキシペプチダーゼ活性では、KNO16が2.6倍、KNO18が2.8倍の高い活性を示した。小スケールの米麴での酸性カルボキシペ

Table 4. The amount of relative amino acid components in seed and main mash of isolated strains, KNO16 and KNO18.

Amino acid (ppm)	Seed mash			Main mash		
	Commercial A	KNO16	KNO18	Commercial A	KNO16	KNO18
Aspartic acid	405.0	480.7	391.2	159.6	177.9	154.3
Threonine	341.9	419.0	337.7	186.7	226.4	198.8
Serine	241.0	284.7	236.3	144.7	163.9	143.0
Glutamic acid	987.2	1322.2	1098.4	407.2	493.8	414.2
Proline	262.7	267.7	241.6	112.4	110.7	113.5
Glycine	216.9	230.5	193.1	209.8	227.8	191.3
Alanine	901.4	1084.7	856.4	573.6	659.2	524.4
Cystine	50.1	64.9	58.9	23.6	27.2	28.2
Valine	328.7	376.8	310.2	218.4	251.2	216.0
Methionine	185.4	221.0	194.3	104.0	121.1	108.0
Isoleucine	138.4	221.0	124.1	91.4	100.7	87.4
Leucine	824.1	986.4	836.2	427.1	483.2	432.9
Tyrosine	640.7	691.0	615.1	176.7	198.2	176.1
Phenylalanine	542.0	627.5	561.7	292.1	329.2	297.7
Histidine	553.5	625.1	559.7	237.7	261.7	249.1
Lysine	576.5	581.3	510.2	324.4	368.0	323.0
Ammonia	122.2	129.5	110.2	65.6	68.7	68.3
Arginine	1632.3	1901.9	1663.4	514.8	571.5	509.7

Table 5. The amount of relative volatile components in a rice solid culture koji seed mash of isolated strains, KNO16 and KNO18.

Flavor component (ppm)	Strains		
	Commercial A	KNO16	KNO19
Acetaldehyde	12.81	13.12	10.76
Ethyl acetate	22.38	27.64	26.22
<i>n</i> -Propyl alcohol	64.98	72.13	63.77
Isobutyl alcohol	34.70	40.82	30.87
Isoamyl acetate	0.33	0.33	0.26
Isoamyl alcohol	92.44	169.28	192.80
Ethyl caproate	0.04	0.04	0.04

ブチダーゼ活性が標準株の2.7倍であったことから¹⁾, KNO16およびKNO18はスケールアップした場合でも安定した酵素活性を示すことが明らかとなった。

また、一般的に *A. niger* に代表される黒色系糸状菌は炭臭様の異臭として知られる 2-MIB や geosmin を生成することが知られているが, KNO16 および KNO18 では, 2-MIB および geosmin の生成は確認されなかった。

選抜した黒色系糸状菌を実用化するためには安定した種麹の供給が必須である。そのため菌株の分生子着性能が高いことが重要となる。

KNO16 および KNO18 は, 人工灰無添加米麹では $5.7 \sim 6.0 \times 10^8$ 個/g の分生子を着生し, 人工灰添加米麹では $1.2 \sim 1.4 \times 10^9$ 個/g の分生子着生を示し, 80% 以上の高い発芽率を示した。

市販黒麹菌は, 人工灰無添加米麹では 5.8×10^8 個/g の分生子を着生し, 人工灰添加米麹では $1.2 \sim 1.3 \times 10^9$ 個/g の分生子着生を示した。人工灰添加の影響はなく 85% 以上の高い発芽率を示したことから, KNO16 および KNO18 は実用化の可能性が高いことが示唆された。

一部の *Aspergillus* 属では肝細胞がんを引き起こす原因物質として知られるアフラトキシンや腎臓での各種酵素活性を阻害し腎毒性を示すオクラトキシンなどのマイコトキシン生成が報告^{11,12)}されているが, KNO16 および KNO18 はアフラトキシンおよびオクラトキシン生成は確認されなかった。

米麹を用いた発酵試験では, KNO16 は 16.5%, KNO18 は 17.4% のアルコール生成が確認され, 市販黒麹菌では 16.8% のアルコール生成が確認されたことか

らKNO16およびKNO18は市販黒麹菌と同等に優良な発酵となることが示唆された。

低沸点香氣成分分析を行った結果、焼酎醸造に使用される市販黒麹菌に比べ、KNO16およびKNO18では一次醗において1.8倍以上のイソアミルアルコール生成が見られた。イソアミルアルコールは、アセチルCoAと酵母菌体内酵素であるアルコールアセチルトランスフェラーゼによりバナナ様の香りを呈する酒類の重要な香氣成分の一つである酢酸イソアミルが生成されることが知られている¹³⁾。酵母は培地中のアミノ酸を取り込み炭素数の一つ少ない高級アルコールを生成する。ロイシンからイソアミルアルコール、イソロイシンから活性アミルアルコール、バリンからイソブタール、フェニルアラニンから β フェネチルアルコールが生成することが知られているなど、酵母のアミノ酸代謝により高級アルコールが間接的に焼酎の香氣成分の生成に関係している¹⁴⁻¹⁶⁾。アンモニアやメチオニンなどの濃度が高い場合には、ロイシンの取り込み量が低下し、エールリッヒ経路による、イソアミルアルコールの生成が少なくなるが^{15,16)}、本条件の一次醗では、KNO16およびKNO18のアンモニア、メチオニンおよびロイシンの濃度は市販黒麹菌と同等な値を示した。また、他にも糖からアミノ酸生合成に従い高級アルコールを生成する場合や酢酸の縮合によりイソアミルアルコールやイソプロパノールを生成する経路なども報告¹³⁾されていることから、イソアミルアルコール高生成要因についてはさらに検討が必要であると考えられる。

以上の結果から、原料と酵母との組み合わせを検討することにより、アミノ酸や香氣成分の増強が図れ、酒質向上につながることを示唆され、KNO16およびKNO18は、従来焼酎醸造に使用されている黒麹菌との差別化が図れる黒色系糸状菌の可能性が示唆された。

要 約

スケールアップした製麹試験で、標準株の*Aspergillus awamori* RIB 2602 (ATCC 14331, NBRC4388)と比較し、良好な出麹酸生成能および高い酸性カルボキシペプチダーゼ活性を示す黒色系糸状菌KNO16およびKNO18を取得した。*Aspergillus niger*に代表される黒色系糸状菌が生成する炭臭様の異臭として知られる2-MIBやgeosminの生成はKNO16およびKNO18では認められなかった。KNO16およびKNO18は、人工灰を添加した米麹および麦麹ともに 10^9 個/gの分生子着生能および80%以上の発芽率を示した。また、本試験条件においてアフラトキシンおよびオクラトキシンの生成は認められなかった。製麹した米麹(800 g)を用い、麦を主原

料とした発酵試験を行った結果、KNO16およびKNO18は、市販黒麹菌と同様に16%以上のアルコール生成が見られ、墨汁様の異臭がなく、芳醇な香りを呈した。発酵試験の醗および蒸留原酒の低沸点香氣成分分析を行った結果、KNO16およびKNO18の一次醗におけるイソアミルアルコール濃度が、市販黒麹菌の1.8倍以上の高い値を示した。本研究で得られたKNO16およびKNO18の2菌株は、出麹酸(クエン酸)生成、酸性カルボキシペプチダーゼ活性、イソアミルアルコール生成および分生子着生能に優れ、*A. niger*などが生成する2-MIBおよびgeosmin生成のない優良菌株であることが認められた。また、アフラトキシンおよびオクラトキシンの生成もないことが確認された。KNO16およびKNO18は、原料と酵母との組み合わせを検討することにより、アミノ酸や香氣成分の増強が図れ、酒質向上につながることを示唆され、従来焼酎醸造に使用される黒麹菌との差別化が図れる黒色系糸状菌である可能性が明らかとなった。

本研究を行うにあたり、醸造特性比較対照株として*Aspergillus awamori* RIB 2602 を快く分与いただきました独立行政法人 酒類総合研究所に深謝いたします。

文 献

- 1) 野崎直樹, 谷村 健, 吉村俊祐, 荻窪哲也, 甲斐孝憲, 林 幸男, 水光正仁, 小川喜八郎: 醸協, **104**, 377-386 (2009).
- 2) Klich, M. A.: *Identification of Common Aspergillus Species*, p.62-63, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht (2002).
- 3) Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.: *The Yeast, A Taxonomic Study*, Fourth Edition, p.79, Elsevier, Amsterdam (1998).
- 4) 岡崎直人, 弘中吉雄, 嶋崎順一, 菅間誠助: 醸協, **73**, 402-404 (1978).
- 5) 注解編集委員会編: 第四回改正国税庁所定分析法 注解, 日本醸造協会 (1993).
- 6) 松浦慎治: 醸協, **59**, 938-944 (1964).
- 7) 松浦慎治, 真鍋 勝, 中野政弘: 農化, **37**, 106-112 (1963).
- 8) 三輪大作, 上山英夫: 醸酵工学, **39**, 414-419 (1961).
- 9) 浜田信夫, 増田淳二, 福山丈二: 生活衛生, **43**, 135-143 (1999).
- 10) Miki, A., Isogai, A., Utsunomiya, H., and Iwata, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 178-183 (2005).
- 11) Yokoyama, K.: *Mycotoxins.*, **56**, 71-76 (2006).
- 12) Giancarlo, P., Giuseppina, M., Antonia, S., Paola, B., Amedeo, P., and Antonio, L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 680-685 (2006).
- 13) Yoshioka, K. and Hashimoto, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2183-2190 (1981).
- 14) 吉沢 淑: 醸協, **75**, 451-457 (1980).
- 15) 三枝維彦, 原田倫夫: 醸協, **89**, 435-440 (1994).
- 16) 秋田 修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝: 醸協, **81**, 626-632 (1986).