

中国浙江省龍游県産“烏衣紅曲”の黒麹菌の諸性質

和久 豊・村井總一郎・ 建昌\*

菅間誠之助\*\*

(株)ピオック・\*龍遊龍窖酒廠・\*\*浙江工業大学軽工系>

平成7年9月5日受理

Properties of Black Aspergilli Isolated from "Wuyihongqu"

Made in Longyousheng, Zhejiang, P.R. China

Yutaka WAGU, Soichiro MURAI, Jian Chang ZHONG\* and

Seinosuke SUGAMA\*\*

(Bio'c Co., Ltd., Muro-cho, Toyohashi, Aichi-ken 441,

\*Longyou-Longjiao Brewery, Longyousheng 3244003,

P.R.China and \*\*Zhejiang University of Technology,

No.6 Zhaohui District, Hangzhou 310014 P.R. China)

From Wuyihongqu prepared for Wuyihongjiu-making at Longyous-Longjiao Brewery, Zhejiang, P.R. China,  $10^7$  spores of mold,  $10^5 \sim 10^6$  cells of bacteria and  $10^4$  cells of yeast were isolated per g of qu, respectively. A11 nine strains purely isolated from the qu were identified as *Aspergillus saitoi* SAKAGUCHI *et al.*. Activities of  $\alpha$ -amylase, gluco-amylase, acid-protease and acid-carboxypeptidase of rice-qu prepared by the above nine strains were over two times as high as those of rice-qu inoculated with *A.saitoi* strain KBN 2200, which is practically used in Awamori-qu making.

**Key words :** 烏衣紅曲・黒麹菌・酵素活性

## 緒 言

中国で黄酒醸造に用いられる散麹には熟麦曲(原料は粗割砕小麦), 紅曲( 米, 陸稻米, 粳米), 烏衣紅曲( 米)などがあり, いずれも原料穀類は蒸して使われる<sup>1)</sup>。福建省から浙江省南西地域でつくられている烏衣紅曲は紅麹菌, 酵母, 黒麹菌の混合培養麹である。1960年代に浙江省平陽県などで生産されていた烏衣紅曲より, 糖化力が強く, 生酸力が弱く, 増殖の速やかなことを指標に分離, 選択された黒麹菌は, 中国科学院微生物研究所において *Aspergillus awamori* NAKAZAWA と同定され, 中国菌種保蔵委員会に AS 3.4319 として保存されている<sup>2)</sup>。筆者らは浙江省龍游県産黄酒用烏衣紅曲より黒麹菌を分離・同定し, その酵素活性, 生酸性を調べるとともに, 烏衣紅曲と泡盛黒麹との

関連性についても考察した。

## 実験方法

### 1. 供試試料

龍游県龍游龍窖酒廠において1993年10月に製造した烏衣紅曲を供試した。本曲は精米歩合90%前後の米(硬質米)を多少芯に生が残る程度に蒸し(吸水歩合130%未満),これに紅麹菌・酵母の混合前培養液(紅曲酒膠)と黒麹菌種麹(龍窖酒廠で斜面培養より蒸米を基質としてフラスコ培養したもの)を接種し,床麹法により,品温を最高42℃から徐々に30℃まで下げ,種付け後7日に出麹したものであり,製麹中に麹の水分補正と品温調節のため,製麹3日目から白米重量の12~16%に相当する水を3回に分けて散水している。本曲は完全粒と半割れ程度の米粒とからなる散麹(出麹歩合60%)で,紅色の麹粒表面は黒色の分生孢子を着生した黒麹菌の菌糸で被われている。

### 2. 糸状菌, 酵母, 細菌の分離

#### (1) 使用培地

- i) 麦芽エキス寒天培地: グルコース2%, ペプトン0.1%, 麦芽エキス2%, 寒天2%。
- ii) YM培地: グルコース1%, ペプトン0.5%, 麦芽エキス0.3%, 酵母エキス0.3%, 寒天2%。

#### iii) Nutrient Agar Difco

#### (2) 分離法

試料5gを50mlの滅菌生理食塩水(0.1% Tween80を含む)に懸濁し, 攪拌後, 10倍段階希釈を行い, 糸状菌は麦芽エキス寒天培地の平板塗抹法, 酵母はYM培地, 細菌はnutrient agarを使用し, 混釈法により菌数を測定した。なお, 耐熱性孢子を形成する好気性細菌は試料希釈液を85℃, 10min熱処理後同様に測定した。また, 糸状菌及び酵母の分離・計数には細菌の生育を抑えるため, 培地にクロラムフェニコール50ppm, ペニシリン50単位/mlを加え, 細菌の分離には糸状菌を抑えるためカビサイジン0.1mg/ml添加した。

### 3. 糸状菌の同定

麦芽エキス寒天培地による平板培養で得られたコロニーを釣菌し, 平板培養を繰り返すことにより, 純粋分離して得られた菌株を坂口他<sup>3)</sup>の方法により同定した。

### 4. 酵素活性の測定

麹のα-アミラーゼ(以下AAaseと略), グルコアミラーゼ(GAase), 酸性プロテアーゼpH3.0(APase), 酸性カルボキシペプチダーゼ(ACPase)の活性は国税庁所定分析法<sup>4)</sup>にしたがい測定した。なお, 試料より純粋分離した糸状菌は岡崎他<sup>5)</sup>の方法により製麹し, 出麹について酵素活性を調べた。すなわち, 分離糸状菌の斜面培養より分生孢子を釣菌し, これを0.1% Tween80添加滅菌生理食塩水に懸濁し, 熱風乾燥法で調製した化米に $5 \times 10^5$  孢子/g・米となるように接種するとともに最終的な米の水分含量を33.3%に

調整した。製麹は恒温恒湿器内で温度 35℃，相対湿度 95%に 24 時間，以後は温度 30℃，相対湿度 90%で 18 時間の計 42 時間行った。

## 実 験 結 果

### 1. 烏衣紅曲の菌相

烏衣紅曲から分離された糸状菌，酵母，細菌の菌数を Table1 に示した。曲 1g 当たり分生孢子として  $8.6 \times 10^7$  存在する糸状菌はすべて黒色分生孢子を着生する菌株であり，紅麹菌は分離されなかった。ホモジナイズした曲を接種しても，培地に CZAPEK DOX 寒天・加糖馬鈴薯寒天・オートミール寒天を使用しても，また，培養温度を 30，35，40℃としても紅麹菌は分離されず，試料の保存，運搬中に死滅したものと思われる。

曲 1g 当たり  $10^4$  のオーダーで存在する酵母の大部分は球形～卵形を呈し，出芽により増殖する発酵性酵母であった。烏衣紅曲黄酒の醪(酒母を兼ねる)は烏衣紅曲に対して 5 倍量の水を加える全麹仕込みで，24℃ から 30℃ にいたる品温経過をとり，4～5 日目に蒸煮軋碎米を投入する(投入前の pH は 4 前後)。通常，仕込み時に酵母添加は行わず，曲が酵母の供給源となっている。分離した酵母の性質については別に報告する。

曲の細菌数は，わが国の清酒用米麹(麹 1g 当たり一般細菌が  $10^2 \sim 10^5$ ，耐熱性細菌が  $10^1 \sim 10^4$  存在)に比べて約 10 倍多く，両者の製麹時における微生物管理の違いによるものと思われる。

### 2. 分離糸状菌の同定

烏衣紅曲から純粋分離した 9 株の糸状菌について，分生子頭の形状，菌糸の隔壁の有無など各器官の形態的性質を調べた結果，すべて *Aspergillus* 属菌であった。これらは共通して，分生孢子の色は黒褐色，分生孢子柄の長さは 0.5～0.9mm，基底梗子(metu1a)を有す。分生孢子的表面はほとんど滑面という形態的特徴を有し，さらに坂口他<sup>3)</sup>の方法で亜硝酸資化性を調べたところ，9 菌株はすべて亜硝酸を資化せず，坂口他の分類表<sup>3)</sup>により *Aspergillus saitoi* SAKAGUCHI *et al.* と同定した。

### 3. 烏衣紅曲より純粋分離した黒麹菌の特性

#### (1) 製麹特性

対照として使用した(株)ビオック保存の *A. saitoi* の標準菌株 KBN 2200 に比べ烏衣紅曲から純粋分離した菌株は，蒸米上での比較増殖速度はほとんど同じで，かつ菌体生産能はやや低い，誘導期が短く(Table2)，麹の締まりが極めて弱く，分生孢子的着生も良好という特性を示し，製麹の容易な菌株であったが，出麹にややカビ臭があった。

カビ臭は菌株固有の特質と考えられ，製麹操作などでカビ臭の生成を抑制することは極めて困難である。しかし，烏衣紅曲ではカビ臭は認められず，*Monascus* 属菌や酵母との混合培養によりカビ臭がマスクされるとすれば，カビ臭のある有用麹菌の利用を図るうえで極めて興味あるところで，今後検討する予定である。

## (2) 純粋分離菌で製麹した米麹の酸度と酵素活性

分離した9菌株についての測定結果をTable3に示した。対照株であるKBN 2200に比べ酸性は同等乃至やや高い程度であった。またAAase, GAase, APase, ACPaseの活性は, すべての分離株で対照株の約2倍乃至それ以上に強かった。

## 考 察

鈴木<sup>9)</sup>, 小泉<sup>10)</sup>は烏衣紅曲に生育している黒麹菌を*A. niger*と紹介しているが, 中国科学院微生物研究所<sup>2)</sup>で*A. awamori*と同定されて以来, 中国の研究者は烏衣紅曲の黒麹菌は*A. awamori*とみなしている。しかし, 筆者の一人, 菅間が1994年10月, 中国浙江省の文成県醸造廠で烏衣紅曲用種菌として保存されている3本の斜面培養を観察したところ, 分生胞子の色は黒色で, *A. awamori*ではなく*A. saitoi*であろうと思われた。なお, 菅間他<sup>11)</sup>が1974年, 泡盛麹及びその製麹環境試料について黒麹菌相を調査した結果, 56%が*A. saitoi*で, 残りの44%が*A. awamori*であった。烏衣紅曲酒の製法は泡盛の国産化開始の約100年前に始まる琉球国と中国との人的交流の窓口であった福建省より浙江省へ伝えられたものであり, 烏衣紅曲から*A. saitoi*が分離されたことは, 泡盛黒麹菌の起源を探るうえで興味あることである。

## 要 約

(1) 供試した烏衣紅曲より糸状菌が孢子として $10^7/g$ , 細菌が $10^5 \sim 10^6/g$ , 酵母が $10^4/g$ 分離された。

(2) 烏衣紅曲より純粋分離した9株の糸状菌はすべて*A. saitoi*であった。

(3) 烏衣紅曲より分離された*A. saitoi*で製麹した米麹の  $\alpha$ -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活性は泡盛用として使用されている*A. saitoi*に比べて約2倍以上の活性を示した。

## 文 献

- 1) 景泉, 洪森, 海波編: 酒曲実用技術, 中国食品出版社(1988)
- 2) 傅金泉: 中国醸造, No.4, 16(1988)
- 3) 坂口謹一郎, 飯塚 広, 山崎千二: 応用菌学, 3, 53, 65, 97(1949); 応用菌学, 4, 1(1950)
- 4) 注解編集委員会編: 第4回改訂国税庁所定分析法注解, (財)日本醸造協会(1993)
- 5) 岡崎直人, 弘中吉雄, 島崎順一, 菅間誠之助: 醸協, 73(5), 402-404(1978)
- 6) N.OKAZAKI and S.SUGAMA: *J.Ferment.Technol.*, 57, 413-417(1979)
- 7) 五味勝也, 岡崎直人, 田中利男, 熊谷知栄子, 井上 博, 飯村 穰, 原 昌道: 醸協, 82(2), 130-133(1987)
- 8) J.L.REISSIC, J.L.STROMINGER, L.F.LELOIR: *J.Biol.Chem.*, 217, 959(1955)

- 9) 鈴木明治：藤巻ら編『食品工業』初版，p.403，恒星社厚生閣(1985)  
 10) 小泉武夫：野白ら編『醸造の辞典』，p.392，朝倉書店(1988)  
 11) 菅間誠之助，西谷尚道，大場俊輝，河内邦英，照屋比呂子，原 昌道，村上英也：  
 醸協，70(8)，595-598(1975)

Table 1 Numbers of Viable cells detected from Wuyihongqu tested.(Cell numbers/g-Qu)

Bacteria	$2.3 \times 10^6$
Ditto(aerobic spore formers)	$1.7 \times 10^5$
Yeast	$3.1 \times 10^4$
Mold	$8.6 \times 10^7$

Table 2 Growth Characteristic values of *A.saitoi* isolated from Whyijongqu

Strain No.	$T_{1.0}$	$\mu$	$O_{2max}$
1	17.1	0.240	3.24
2	16.7	0.241	3.14
3	16.4	0.234	3.19
4	16.5	0.237	3.15
5	17.4	0.239	3.23
6	16.5	0.241	3.11
7	17.4	0.248	3.22
8	16.5	0.235	3.19
9	16.6	0.243	3.11
Average	16.8	0.240	3.18
KBN2200*	18.6	0.247	3.41

Growth characteristic values was determined by the method of OKAZAKI and SUGAMA<sup>6)</sup>.

\* *A.saitoi* KBN2200 is practically used for Awamori-qu-making.

Table 3 Properties of rice-qe prepared by strains of *A.saitoi* isolated from Wuyihongqu as seed.

(acidity: ml N/10 NaOH/2g wet koji; enzymatic activity: unit/g wet Qu)

Strain No.	Acidity	N-AcGlc-NH <sub>2</sub>	Enzyme activities <sup>a</sup>				Enzyme activities <sup>b</sup>			
			AAase	GAase	APase	ACPase	AAase	GAase	APase	ACPase
1	9.3	1981	197	174	17418	8522	99	88	8793	4302
2	7.3	1815	192	179	19786	9717	106	99	10901	5354
3	8.2	1865	216	211	17072	8252	116	113	9154	4425
4	7.3	2060	200	188	20576	8329	97	91	9988	4043
5	8.0	1959	210	192	19391	6979	107	98	9898	3563
6	7.3	1887	214	192	19984	7095	113	102	10590	3760
7	9.0	2004	233	218	19243	6632	116	109	9602	3309
8	9.0	2094	211	197	20477	7057	101	94	9779	3370
9	8.8	1856	220	182	19046	5167	119	98	10262	2784
Average	8.2	1947	210	193	19221	7528	108	99	9885	3879
<i>A.saitoi</i>	7.2	2220	95	105	8635	3201	43	44	3890	1442

\* Acidity : ml N/10 NaOH/2g wet *koji*.

\*\* Rice-qe was digested with enzyme solution containing 0.5% each of Novozym, Yatalase and Chitinase(Sigma) by GOMI'S<sup>7)</sup> method and Liberated *N*-acetylglucosamine(abbreviated as AG)was measured by REISSIG'S method.