

PM菌の焼酎醸造への利用の検討

—植物組織崩壊活性を有する麹菌の活性発現機構の解析及び工業化利用技術の確立—

佐野一成・江藤 勸・樋田宣英
食品工業部Study on the Application of *Aspergillus* sp. PM for brewing Shochu-Analysis for the Plant-Macerating Activity of *Aspergillus* sp. PM and Development of its Industrial Use-

Kazunari SANO, Susumu ETO, Nobuhide HIDA

Food Science & Technology Div.

要 旨

強い植物組織崩壊活性を有する麹菌（PM菌）の工業利用化技術の確立へ向けた取り組みの一環として、焼酎醸造へのPM菌の適用について検討を行った。PM菌の植物組織崩壊活性は蒸煮した大麦に対しても有効であり、速やかに麦粒を崩壊させた。一方、焼酎小仕込み試験を実施したところ、PM菌を用いた麦麹では有機酸、特にクエン酸の生成量が常用される *Aspergillus kawachii* の麹に比べて少なく、もろみ酸度が低かった。また、デンプンの液化・糖化力も非常に弱かったが、1次もろみの段階での立ち上がりの悪さを除けば焼酎醸造への影響は少なかった。もろみ粘度もPM菌利用区で低下しており、作業性の向上にも有効であると考えられる。よって、PM菌単独の利用でも焼酎の醸造は可能であるが、もろみの管理等に注意が必要であるため、従来の *A. kawachii* を用いた2次もろみの段階でPM菌を添加する用法が望ましいと考えられた。

1. はじめに

強い植物組織崩壊活性を有する麹菌（PM菌）については、植物細胞の強固な細胞壁の構成成分であるペクチンやセルロースを分解する酵素活性が強いことが確認されており、この活性発現機構の解析及び遺伝子組換えによる高機能菌株の育種を目的として、酵素タンパク質の分離・精製、遺伝子のクローニングに取り組んできている。その一方で、PM菌自体の実用化についても検討するため、PM菌の大量培養技術、用途開発を目的とした共同研究事業の一環として、PM菌を用いた焼酎の試験醸造を実施し、応用の適否の検討を行った。PM菌が有する植物組織崩壊活性により、もろみ粘度の低下による作業性及び、原料炭素源の資化率の向上とそれに伴う目的産物（焼酎の場合はアルコール）の生成量の向上、廃棄物の減量化等が見込まれる。

2. 方 法

2.1 菌株

共同研究先である、うすき生物科学研究所が所有するPM菌（*Aspergillus* sp.）を用いた。

2.2 PM麹の調整

蒸煮した麦にPDA培地でフレッシュしたPM菌を接種し、胞子の形成が見られるようになるまで30℃で培養したものを種麹とした。大麦を水に1時間浸漬し、1時間水切りした後、105℃で1時間オートクレーブした。蒸煮麦を約40℃まで放冷したのち、

約1/100量の種麹を割り砕いて加え、麦焼酎用麹の製麹法に従って製麹した。

2.3 フスマ培養抽出液の調整

フスマと水を1:1で混合し、121℃、30分オートクレーブしたものをフスマ培地として用いた。約40℃まで放冷後、1/100量の種麹を割り砕いて加え、30℃で5日間培養した。培養終了後、10倍量の水を加えて5℃で1日抽出し、遠心分離した上清をフスマ培養抽出液とした。

2.4 組織崩壊性試験

蒸煮麦にPM麹及びフスマ培養抽出液を添加し、雑菌の混入を抑えるため、クエン酸とアルコールを添加して30℃でインキュベートした。ブランクは蒸煮麦25gに水60mlとエタノール10ml、20%クエン酸4mlとし、各試験区は麹及びフスマ培養抽出液でそれぞれ蒸煮麦及び水の一部を置換して行った。

2.5 焼酎小仕込み試験

麹96gに水96mlを加えたものに、前培養した酵母培養液1mlを添加したものを1次もろみとし、適宜攪拌しつつ30℃で培養し、炭酸ガス減量をモニターした。5日経過後、蒸煮麦300g、汲み水350mlを入れた1,000ml容三角フラスコに、1次もろみの全量を添加して2次もろみとし、メイセル管硫酸トラップをセットした。適宜攪拌しつつ30℃で培養し、炭酸ガス原料をモニターした。

2.6 もろみの分析

もろみの諸性質の分析は、国税庁所定分析法に準じて行った。

粘度については、B型粘度計により測定した。

もろみ中の有機酸組成の分析については、Shodex Ionpak801+カラムを用いたHPLCにより分離、検出した。

3. 結果及び考察

3.1 組織崩壊性試験

PM麴及びフスマ培養抽出液を添加した試験区を設定し、蒸煮麦に対する崩壊性を確認した。各試験区分を Table 1 に、試験経過の写真を Fig. 1 にそれぞれ示した。

Table 1 組織崩壊性試験区分

試験区分	蒸煮麦 (g)	麦麴 (g)	PM麴 (g)	抽出液 (ml)	水 (ml)
①	25	-	-	-	60
②				10	
③				20	
④				40	
⑤	15	10	10	-	60
⑥		-			
⑦		25			

※全試験区に20%クエン酸4m l, アルコール10m l 添加。

②～⑦には glutaseS(100U/ml)0.5ml 添加。

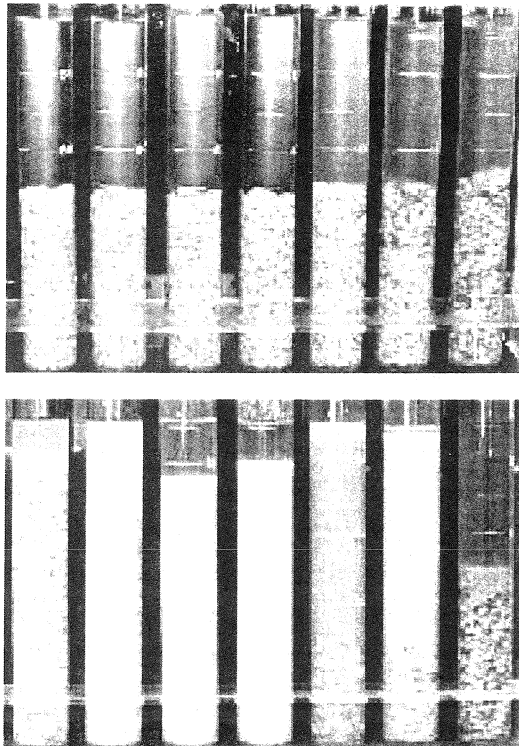


Fig. 1 組織崩壊性試験経過 開始直後(上), 10日経過後(下)

Fig. 1 (懸濁, 30分静置後撮影)に見られるように、③～⑥では、蒸煮麦の粒がよく溶けているが、顕微鏡下観察の結果、デンプン粒が大量に残存していることが確認された。常用される

Aspergillus kawachii を用いた麴を添加し、同条件で試験した場合(⑤)に比べてデンプン粒の残存が非常に多いことから、PM菌ではデンプンの分解に関与する液化・糖化酵素の活性が弱いことが考えられた。また、PM麴を用いた試験区では、フスマ培養抽出液を用いた場合と同様に蒸煮麦の強い崩壊が見られたが、麴由来の麦が溶け残る傾向が強くなり、PM麴のみを用いた試験区⑦では麦粒の崩壊がほとんど見られなかった。これについては、麴の水分が低下しているためとも考えられたが、水に浸漬して長時間置いても膨潤しないため、麦の表面に張り巡らされたPM菌の菌糸あるいはPM菌の分泌物による影響があるのではないかとと思われる。

3.2 焼酎小仕込み試験

PM菌の植物組織崩壊活性の効果を検討するため、*A. kawachii* 及び市販の酵素製剤を添加した試験区を設定した。1次及び2次もろみの仕込み配合を Table 2 に示した。炭酸ガス減量でモニターした各試験区の発酵経過を Fig. 2 に、また、2次もろみの外観の推移を Fig. 3 に示した。

外観上の差異としては、1次もろみの段階では、PM麴区ではPM菌特有の麴臭が有り、さらに、添加した蒸煮麦は速やかに崩壊しているものの、麴由来の麦の崩壊がほとんど見られなかった。2次移行後、酵素・フスマ培養抽出液添加区では麦の粒がよく崩壊し、上清のきれも良好で分離が速やかであるのに対し、PM麴区では麦の崩壊は速いものの、濁りがなくなり上清の分離が確認されるまでに時間を要した。発酵が進むにつれてPM麴区にあった特有の麴臭は徐々に減少し、終もろみでほとんど感じられなくなった。また、PM麴区では、メイセル管硫酸トラップに他よりもかなり強い着色が見られ、PM菌によって *A. kawachii* とは異なる揮発成分が産生されていると考えられた。

発酵経過を見ると、①～⑤の1次もろみは共通の配合で、経過もほとんど一致しており、順調に発酵が開始されていた。PM麴を用いた試験区⑥、⑦では1次もろみでの発酵の立ち上がりが遅れ、特に顕著な⑦では約3日遅れて炭酸ガス減量が確認されるようになったことから、デンプンの液化・糖化が十分に進まず、酵母の増殖、アルコール発酵が制限されていることがうかがわれた。2次もろみ移行後、いずれの試験区も順調な伸びを示したが、麴歩合の小さい試験区⑦では他に比べて緩やかな発酵経過をたどり、炭酸ガス減量が確認されなくなるまでの期間も約3日長くなった。これは、麴歩合が小さく糖化力が不足しているために、アルコール発酵に必要な十分量のグルコースを供給できなかったためと考えられる。

本来 *A. kawachii* が産生する液化・糖化酵素は焼酎醸造における必要量よりも過剰に分泌されているといわれ、崩壊性試験でこれらの活性が小さいことが示唆されたPM麴区でも最終的な炭酸ガス減量は *A. kawachii* を用いた試験区とほとんど差がなかった。このことから、PM菌が有する糖化力でも必要量のグルコースを供給することは可能であると考えられる。しかしながら、1次もろみの段階で酵母の増殖が遅いと考えられることから、焼酎酵母

の純粋培養という本来の目的には不向きであると思われる。

Table 2 焼酎小仕込み配合

1) 1次配合

試験区分	麴 (g) <i>A. kawachii</i>	PM麴 (g)	蒸蕎麦 (g)	汲水 (ml)	酵母
① ~ ⑤	96	-	-	96	培養液 1ml
⑥	-	96	-	-	
⑦	-	50	46	-	

2) 2次配合

試験区分	掛麦 (g)	汲水 (ml)	フスマ培養抽出液 (ml)	その他		
①	300	350	-	-		
②		348.5		セルロシン AL 1.5ml		
③		342.5		同上, glutase S 6ml		
④		315		35	-	
⑤		250		100	-	
⑥		350		-	-	-
⑦						

セルロシン AL : 市販品原液, glutase S : 200U/ml

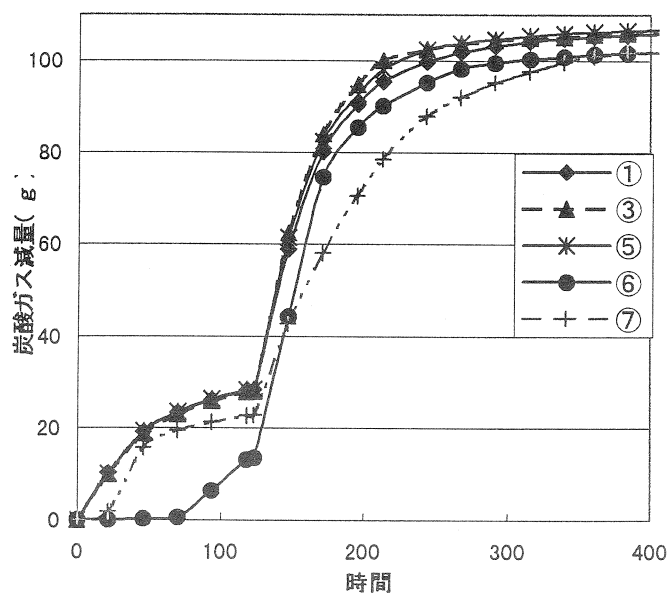


Fig. 2 小仕込み試験の発酵経過 (炭酸ガス減量)

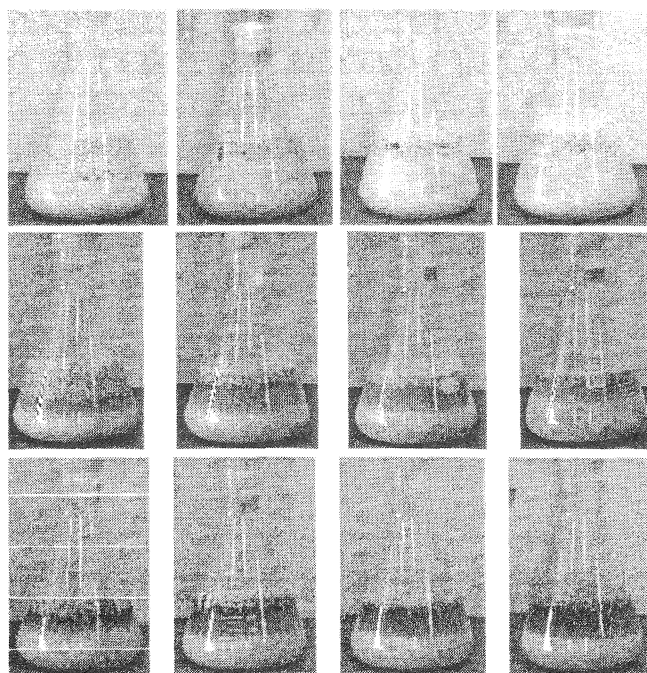
3.3 終もろみの分析

発酵終了したもろみの粘度及びアルコール含量等についての検討を行った。各試験区のもろみの性状を Table 3 にまとめた。

本試験で期待されたもろみの粘度低下については、25~35%程度の効果が認められた。その一方で、固液分離率 (懸濁後 30 分

点の上清部の割合) は市販の酵素を添加した試験区②、③で対照区①の 1.5 倍以上と顕著な向上を示したが、その他のPM菌を利用した試験区では逆に分離が悪化しており、もろみ粘度との間に相関は見られなかった。これは、もろみ粘度の上昇の要因となる植物細胞壁由来のセルロースやペクチンなどの増粘性多糖類が、PM菌の作用により分解を受ける一方で、PM菌の液化酵素の活性が弱いため、デンプンが水に難溶な状態で残されているからではないかと考えられる。また、アルコール収量については、⑦を除いて対照区①よりも4~8%程度向上しており、PM菌の利用は粘度低下による作業性の向上とともに、製品収量の向上にも効果があると考えられる。

しかしながら、もろみ pH は全試験区で差がなかったのに対し、もろみ酸度については、PM麴区では *A. kawachii* を用いた他の試験区に比べて約 2/3 と、かなり低くなっていた。この結果を受けて、各試験区の有機酸組成 (Fig. 4) を HPLC により測定したところ、*A. kawachii* に比べてクエン酸、コハク酸の生成が低下し、リンゴ酸の生成量が増加していた。この中でクエン酸生成量の低下は特に著しく、*A. kawachii* の約 18% しか生成していないことがわかった。常用の麴ではクエン酸がもろみ酸度の主体となっており、クエン酸の濃度低下が PM 麴におけるもろみ酸度の不足につながっているものと考えられた。フスマ培養抽出液を添加した試験区では麴は *A. kawachii* のものを用いたため、十分な酸度と糖化力に加え、PM 菌由来の組織崩壊活性が働いて、良好な結果が得られた。



No. ① ③ ⑤ ⑦

Fig. 3 小仕込み試験発酵経過

上段 : 1 日目, 中段 : 7 日目, 下段 : 10 日目

Table 3 終もろみの分析

試験区分	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	
CO ₂ 減量 (g)	1次	28.4	28.2	28.0	28.5	28.5	13.7	22.8
	2次	77.5	79.5	78.1	78.1	78.3	88.3	79.3
	合計	105.9	106.7	106.1	106.6	106.8	102.0	102.1
固液分離率(%)	18.5	29.2	32.5	13.2	12.2	14.5	9.0	
アルコール含量(%)	17.1	17.4	17.5	17.4	17.5	17.1	17.0	
アルコール収量(ml)	97.9	105.7	107.5	103.4	105.3	102.2	95.9	
もろみ粘度(mPa·s)	66.7	50.3	33.7	47.8	50.5	42.8	46.0	
もろみ酸度	9.2	9.4	9.1	9.2	9.7	6.6	6.1	
もろみpH	4.03	4.03	4.04	4.04	4.07	4.13	4.09	

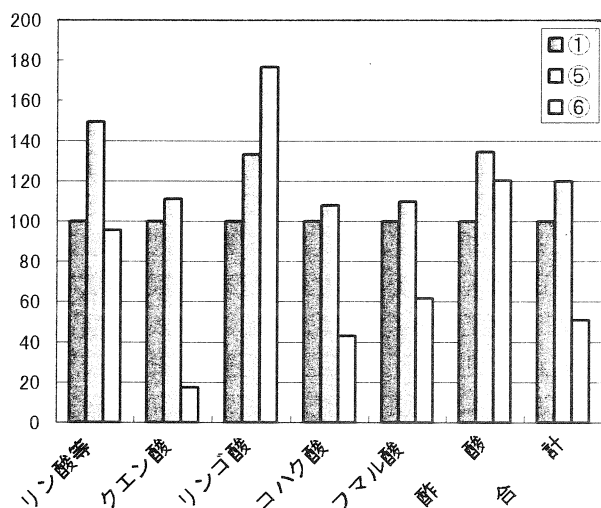


Fig. 4 終もろみの有機酸組成

それぞれ①の有機酸量を100とした

4. まとめ

強い植物組織崩壊活性を有する麹菌融合株 (PM菌) の工業化利用技術の確立を目的とした共同研究事業の一環として、焼酎醸造への応用の適否について検討した。

PM菌の焼酎醸造への応用においては、実験室レベルの小仕込み試験ではもろみ粘度の低下、アルコール収量の向上等の効果が見込まれる一方、もろみ酸度の不足、デンプンの液化・糖化力の弱さが問題となる可能性が示唆された。特にもろみ酸度の不足については、PM麹単独での仕込みの場合に発酵過程の管理が難しくなるため、何らかの方法で回避する必要がある。焼酎酵母以外の雑菌による汚染を回避するために、①仕込み時にクエン酸等の補酸を行う、②1次もろみの仕込みには *A. kawachii* 麹を用い、2次もろみへの移行の段階で培養抽出液やPM麹などの形でPM菌の植物組織崩壊酵素を添加する、などの方法が望ましいと思われる。この場合も、PM麹及び培養抽出液とも特有の麹臭が有り、添加量が多くなると製品まで臭気が移行する可能性もあるため、適当な利用条件についてはさらに検討を要する。また、スケールアップに伴って発酵過程の管理にも変動があるため、実際の工場規模での利用へ向けには、順次規模を拡大しながら効果を確認していく必要がある。