

## 焼酎もろみに含まれる生育阻止物質について

山元正博, 安藤昭一, 藤井貴明, 矢吹 稔  
(応用微生物学研究室)

小倉長雄  
(農産製造学研究室)

### Growth Inhibitory Substance of Syochu-Moromi.

Masahiro YAMAMOTO, Akikazu ANDO, Takaaki FUJII, and Minoru YABUKI.  
(Laboratory of Applied Microbiology)

Nagao OGURA  
(Laboratory of Food Chemistry and Technology)

#### ABSTRACT

A substance, which inhibited the growth of bacteria, yeasts and fungi, was extracted from Syochu-Moromi (fermenting mash, prepared from sweet potato and Syochu-Koji). The origin of this growth inhibitory substance was examined.

One bacterium which had anti-fungal activity was isolated from the Syochu-Moromi. Its growth inhibitory substance was clearly different in solubility in chloroform and Rf value on TLC from that of Syochou-Moromi.

Growth inhibitory substance was also extracted from Syochu-Koji. Its anti-microbial spectrum and Rf value were significantly like to those of Syochu-Moromi.

After cultivation of yeast with MY medium Supplimented with ethyl acetate extract of Syochu-Koji, other growth inhibitory substance, which was more similar to that of Syochu-Moromi, was produced in the broth.

#### 緒 言

#### 実験材料及び方法

南九州で生産される焼酎もろみは通常 30°C前後の高温で発酵が安全に行われる。これは焼酎づくりに使用される麹菌, *Aspergillus awamori* var. *kawachii* Kitahara (通称河内菌) の生産するクエン酸により保護されるため, 酵母によるアルコール発酵が順調に進むと考えられている(室田, 1929)。しかし, 清酒用の黄麹(*Aspergillus oryzae*) にクエン酸を添加して同様のもろみをつくっても同様な効果は得られない(室田, 1948)。一方, 焼酎の原料であるさつまいもはイポメアマロンという抗菌性物質を生産することが知られている(平および深川, 1959)。また, 清酒麹については, これを汚染する細菌がある種の抗菌性物質を生産するという報告もある(林田および塚本, 1981)。これらの事実から焼酎もろみ中には未知の抗菌性物質の存在が予測される。そこで筆者らは焼酎もろみ中に含まれる抗菌性物質の検索に着手した。

#### 焼酎麹の培養

破碎精米を 30 分浸漬, 50 分水切り後, 常圧で 60 分間蒸した。これを 30 g ずつ直径 9 cm のシャーレに入れ, 100°Cで 60 分殺菌したものに河内菌 (*Aspergillus awamori* var. *kawachi* Kitahara) を 1 白金耳接種し, 30°C48 時間培養したものを焼酎麹として用いた。

#### 焼酎もろみの調製

さつまいも (高系 14 号) 1 kg を常圧で 60 分間蒸した後, 粉碎し, 焼酎麹 500 g と麹汁培地で 1 晩前培養した焼酎用酵母 (鹿児島県工業試験場酵母) 10 ml を加えて, 良くかくはんした。これを 30°Cで開放状態で発酵を行い, 焼酎もろみとして実験に使用した。

#### 焼酎もろみからの抗菌性物質の抽出

上記焼酎もろみ 50 g に対して各種有機溶媒 50 ml 加えて, 適宜かくはんしながら 30°C, 3 時間抽出後, デカ

ントにて有機溶媒部分を分取し、ロータリーエバポレーターで完全に有機溶媒部分が除去されるまで濃縮した。

**生育阻止活性の検定**

麴汁寒天培地 (Blg. 10°, 寒天 1.5%) に鹿児島県工業試験場酵母を懸濁し (10<sup>7</sup>個/ml), 直径 9 cm のシャーレに分注固化した。殺菌済 (115°C, 30 分) のペーパーディスク (直径 9 mm) に検定物質 (0.3 g) を吸収させ、調製直後の上記平板培養上に置き、30°C で 18 時間培養した。その結果生じた酵母の生育阻止円の直径を測定して生育阻止活性 (抗酵母活性) とした。

**抗菌スペクトルの作成**

供試細菌 (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) は nutrient broth (肉エキス 1%, ポリペプトン 1%, NaCl 0.5%, pH 7.2 に NaOH で調整) で 1 晩前培養したものを用いた。酵母 (*Candida albicans*) は麴汁培地で 1 日前培養したものを用いた。また、かび (*Asp. oryzae*, *Asp. awamori*, *Aspergillus niger*) は麴汁寒天 (1.5%) 培地で 5 日間培養し、生じた胞子を用いた。なお培養はすべて 30°C で行なった。これらの菌もしくは胞子をプレート当り約 10<sup>8</sup>個均一に塗抹し、これに前項と同様にしてペーパーディスクを乗せて培養し、出現した生育阻止円の直径を測定して抗菌スペクトルを作成した。

**抗麴菌活性を持つ細菌の焼酎もろみからの分離**

抗麴菌活性を持つ細菌の分離用培地としてシクロヘキシミド (10 mg/l) および寒天 1.5% 含む nutrient broth を用いた。

焼酎もろみ (30°C, 120 時間培養) 1 g を滅菌水 9 ml に加え懸濁し、これを適宜希釈して細菌分離用培地に塗抹して 30°C, 2 日間培養した。出現したコロニーを竹串でシクロヘキシミドを含まない細菌分離用培地に移植し、30°C, 1 日培養した。この培養表面に河内菌の胞子約 10<sup>7</sup>個を散布し、さらに 30°C, 1 日培養後河内菌に対して生育阻止ゾーンを形成するコロニーを抗麴菌活性を持つ菌として分離した。

**生育阻止活性物質の定性試験**

生育阻止活性の検定には抗酵母活性の検定に用いたのと同じ酵母、培地を用いた。

シリカゲル (Merck 製 Kieselgel 60 F 254) の薄層プレートの下から 10 mm の位置に試料をスポットし、TLC 展開槽で室温で 10% の酢酸エチルを含むクロロホルムを展開溶媒として 15 分展開を行なった。風乾後、活性部分をオートバイオグラフィーにより確認した。

**使用試薬類**

試薬類はすべて市販の特級品を用いた。肉エキスは極東製薬工業製を用い、ポリペプトンは大五栄養化学製を、

またシクロヘキシミドは Sigma 製を用いた。

**実験結果**

**焼酎もろみからの抗酵母性物質の抽出テスト。**

焼酎もろみを各種有機溶媒で抽出し、その抽出物について抗酵母性を試験した (表 1)。その結果、本実験で用いた焼酎もろみからは酢酸エチルで最もよく酵母生育阻害物質が抽出されることが明らかとなった。以下、この画分について実験を行なった。

**焼酎もろみからの酢酸エチル抽出物の抗菌スペクトル。**

前項の結果から、最も高い抗酵母活性のある酢酸エチル抽出画分について抗菌スペクトルを調べた。表 2 に示すように本画分はグラム陽性菌、陰性菌、酵母、糸状菌等広範囲にわたって生育阻止活性を有することがわかった。

**焼酎もろみからの抗菌活性を有する細菌の分離。**

生育阻止活性物質の由来をさぐるため、これが *Asp. awamori* に対して抗菌活性を有することを利用して、本焼酎もろみから生育阻止活性を有する細菌の分離を試みた。その結果、本焼酎もろみには 5 × 10<sup>8</sup>個/ml の細菌が存在しており、分離した 1,000 個のコロニーから 1 株の抗麴菌活性を有する細菌が得られた。そこで、この菌株を nutrient broth で 30°C 2 日間振とう培養 (50 rpm) し、これの 50 ml を各種有機溶媒 50 ml で抽出した。その抽出物の抗酵母活性を表 3 に示す。この培養液からは、焼酎もろみの場合と同様に、酢酸エチルによって最もよく抗酵母活性が抽出されたが、クロロホルムやベンゼンでは抽出されない点が異なっていた。

**さつまいもならびに焼酎麴からの生育阻止物質の抽出。**

焼酎もろみに存在する生育阻止物質の由来として考えられるのは前項で検討した可能性の他にさつまいもおよび焼酎麴からの由来がある。そこで、さつまいも、麴 (河内菌)、そして河内菌を麴汁培地で 30°C, 2 日間培養した

表 1 焼酎もろみ抽出物の酵母生育阻止活性

抽出溶媒	生育阻止円 (直径, mm)
アセトン	—
酢酸エチル	20
クロロホルム	15
ベンゼン	13
トルエン	10
四塩化炭素	9
ヘキサン	—

表2 焼酎もろみ酢酸エチル抽出物の  
抗菌スペクトル

使用菌株	生育阻止円(直径, mm)
<i>Escherichia coli</i>	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	26
<i>Bacillus subtilis</i>	25
<i>Candida albicans</i>	14
<i>Aspergillus oryzae</i>	18
<i>Aspergillus awamori</i>	19
<i>Aspergillus niger</i>	—

表3 焼酎もろみから分離した抗麴菌活性を  
有する細菌からの抗酵母性物質の抽出  
テスト

抽出溶媒	生育阻止円(直径, mm)
酢酸エチル	12
クロロホルム	—
ベンゼン	—
トルエン	—
四塩化炭素	—
ヘキサン	—
アセトン	—
エタノール	—

培養液の各々50gについて酢酸エチルで抽出し、その抗酵母活性を検定した(表4)。これにより、焼酎麴が抗酵母活性を有することがわかった。

蒸し米に培養する焼酎麴では殺菌が完全ではないので、製麴中に混入する微生物の影響も無視できないが、完全に殺菌した麴汁培地による河内菌の培養液にも抗酵母活性が認められたことから、河内菌自体が抗酵母性物質を生産している可能性が高い。この焼酎麴の各種有機溶媒抽出物の抗酵母活性を表5に示す。この様に酢酸エチルまたはアセトン抽出で最も高い活性が示されたので、この酢酸エチル抽出物について、各種微生物に対する抗菌スペクトルを調べた。表6に示す様に、焼酎麴の抽出物と焼酎もろみの抽出物の抗菌スペクトル(表2)には類似性が認められた。

焼酎麴からの抽出物、焼酎もろみからの抽出物、および焼酎もろみより分離した抗麴菌活性をもつ細菌培養液からの抽出物中の成分の異同を比較するためにバイオオートグラフィーを行なった。図1に示す様に、抗麴菌活性を持つ細菌の培養液からの抽出物中の抗酵母活性物質のRf値が0であったのに対し、焼酎もろみ抽出物中の抗酵母活性物質のRf値は0.22と高かった。一方、焼酎麴抽出物の抗酵母活性物質のRf値は0.14と焼酎もろ

表4 さつまいもならびに焼酎麴からの生育  
阻止物質の抽出

	酵母生育阻止円(直径, mm)
さつまいも(A)	—
焼酎麴(B)	17
河内菌培養液(C)	10

A: さつまいも(高系14号)50gを50mlの酢酸エチルで抽出濃縮したもの

B: 焼酎麴(河内菌)50gを同様に酢酸エチルで抽出濃縮したもの

C: 麴汁培地に河内菌を接種し30°C48時間培養した培養液50gを同様に酢酸エチルで抽出濃縮したもの

表5 焼酎麴抽出物の抗菌性

抽出有機溶媒	酵母生育阻止円(直径, mm)
エタノール	13
アセトン	17
酢酸エチル	17
クロロホルム	—
トルエン	—
四塩化炭素	—

表6 焼酎麴酢酸エチル抽出物の抗菌スペクトル

使用菌株	生育阻止円(直径, mm)
<i>Escherichia coli</i>	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	24
<i>Bacillus subtilis</i>	29
<i>Candida albicans</i>	10
<i>Aspergillus oryzae</i>	16
<i>Aspergillus awamori</i>	19
<i>Aspergillus niger</i>	—

みのそれに近い値を示した。更に、この焼酎麴酢酸エチル抽出物をMY培地に添加して酵母を培養した培養液からは、Rf値0.14の他にRf値0.19と焼酎もろみ抽出物のそれに近いもう1つの抗酵母活性物質が検出された。なを、MY培地のみで酵母を培養した培養液には抗酵母活性は検出されなかった。また、MY培地に焼酎麴酢酸エチル抽出物を添加した培地に、酵母を接種せずに30°C、2日間置いたものからは、Rf値0.14の抗酵母性物質しか検出されなかった。

これらの事実から、焼酎麴の抗酵母活性物質を基質として、酵母の発酵過程にもう1つの活性物質が生成されると推察された。

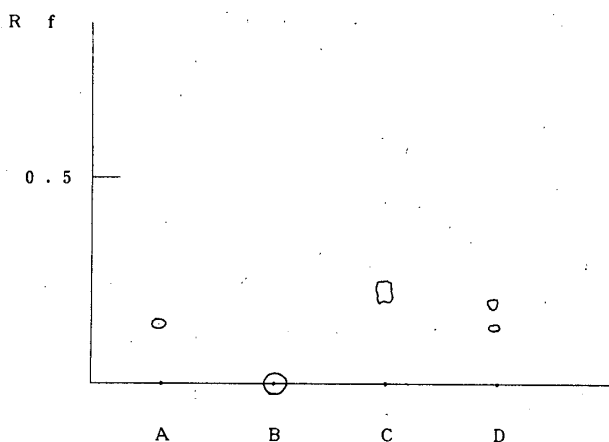


図1 生育阻止物質のバイオオートグラフィー

- A: 焼酎麴の酢酸エチル抽出物
- B: 焼酎もろみより分離した抗麴菌活性を持つ細菌を Nutrient broth で 30°C 24 時間培養した培養液のクロロホルム抽出物
- C: 焼酎もろみからの酢酸エチル抽出物
- D: MY 培地 (酵母エキス 0.3%, ペプトン 0.5%, 麦芽エキス 0.3%, glucose 10%) に焼酎麴からの酢酸エチル抽出物を 0.5% 添加したものを培地として酵母を 30°C 48 時間培養した培養液からの酢酸エチル抽出物

### 考 察

蒸しさつまいもと焼酎麴で調製した焼酎もろみから、グラム陽性菌、陰性菌、酵母、麴菌と広範な生育阻止活性を持つ物質が、酢酸エチルで抽出された。この活性物質の由来としては、焼酎もろみ中に混在する微生物の影響と、原料のさつまいもや焼酎麴の影響が考えられた。そこで焼酎もろみから生育阻止活性を持つ細菌 1 株を分離したが、この活性物質の各種溶媒に対する溶解性や、バイオオートグラフィーの Rf 値は焼酎もろみの活性物質と大きく異なっていた。また、焼酎もろみより分離したコロニー約 1,000 個中、抗菌活性を持つコロニーは 1 株のみであったことから、この菌は焼酎もろみでは極めて小数を占めるか、あるいは分離操作中に外部から侵入した菌である可能性が非常に高く、焼酎もろみ中での生育阻止物質生産に関与している可能性は低いと考えられた。

蒸しさつまいもからの酢酸エチル抽出物に生育阻止活性がないことや、さつまいもを含まない焼酎もろみにも焼酎もろみの生育阻止物質類似の活性が認められた事から、焼酎もろみの生育阻止物質は、羅病さつまいもが生産する抗菌性物質イポメアマロンとは異なると考えられる。

焼酎麴からは、焼酎もろみの活性物質と類似の抗菌スペクトルと Rf 値を持つ物質が酢酸エチルによって抽出された。河内菌の麴汁培地培養液にも同様の抗菌活性を持つ物質が認められたことから、この活性物質は製麴中に河内菌によって生産されると考えられる。

焼酎もろみの生育阻止物質はクロロホルム可溶性であるが、焼酎麴の生育阻止物質はクロロホルム不溶性であった。しかし、この焼酎麴の酢酸エチル抽出物を MY 培地に加えて、酵母を発酵させると、クロロホルム可溶性で Rf 値 0.19 と焼酎もろみの生育阻止物質に類似した活性物質が、新たに生成された。これらの事実から、焼酎もろみより発見された生育阻止物質は、焼酎麴が生成する活性物質と関連性が高いと考えられる。

下田は一部の清酒用黄麴菌 (*Asp. oryzae*) が火落菌に対する抗菌性物質を生産することを報告している(下田, 1952)。竹田らは *Asp. oryzae* の培養ろ液から yeastcidin という抗菌性物質を見いだしている(竹田および塚原, 1971)。坂口も *Aspergillus* 属のうちに *Staphylococcus aureus* の繁殖を阻止する物質を生産する種類のあることを明らかにしている(坂口ら, 1949)。また、室田は泡盛用黒麴に水を加えたものの水蒸気蒸留液に細菌の抑制作用があることを報告している(室田, 1949; 室田 1950)。しかし焼酎用の麴菌として最も普及している *Asp. awamori* var *kawachii* Kitahara からこのような広範な生育阻止活性を持つ物質が直接抽出されたのは本報告が初めてである。しかも、この生育阻止物質は細菌類のみならず、*Asp. awamori* に対しても発育阻害作用を示すこと、また本菌の工業的使用目的であるアルコール発酵の主役たる酵母に対しても阻害作用があることは大変興味深い。

今後は、この抗菌活性物質の精製を急ぎ、その精製物について酵母や麴に対する作用を検討し、実際の焼酎もろみ中での働きを解明していく予定である。

### 摘 要

さつまいもと焼酎麴から調製した焼酎もろみより、細菌、酵母、麴菌に対して生育阻止活性を持つ物質を抽出した。本研究ではこの物質の由来について検討した。

焼酎もろみより抗麴菌活性を持つ細菌も分離したが、この細菌の生成する生育阻止活性物質は酢酸エチルによく溶けるが、クロロホルムには不溶性であった。焼酎もろみに存在する生育阻止活性物質はやはり酢酸エチルに最も良く溶けるがクロロホルムにも溶ける事、また薄層クロマトグラフィーでの Rf 値にも大きな差があり、両者の関連性はうすいと考えられた。

焼酎麴から酢酸エチルによって生育阻止活性物質をを

抽出した。この物質の抗菌スペクトルや薄層クロマトグラフィーによる Rf 値は焼酎もろみ由来の生育阻止活性物質によく似ていた。また焼酎麴からの酢酸エチル抽出物を MY 培地中で酵母とともに培養すると Rf 値がさらに焼酎もろみの生育阻止活性物質に類似した活性物質が生成された。

#### 引用文献

林田晋策・塚本桂子 (1981)：清酒麴における抗酵母性細菌の検定と同定，農化 **54**，1021～1025。  
室田晋次 (1948)：黒麴焼酎もろみの研究 (第 1 報)，発酵工学，**26**，395～398。  
室田晋次 (1949)：黒麴焼酎もろみの研究 (第 2 報)，

発酵工学，**27**，115～120。

室田晋次 (1949)：黒麴焼酎もろみの研究 (第 5 報)，発酵工学，**27**，320～328。

室田晋次 (1950)：黒麴焼酎もろみの研究 (第 6 報)，発酵工学，**28**，73～78。

坂口謹一郎・木原芳次郎・室岡治義 (1949)：麴菌の生理に関する二、三の知見 (予報)，農化，**22**，34。

下田忠次郎 (1952)：麴菌の生産する抗生物質 Oryzacinin に関する研究 (第 1 報)，農化，**25**，254～260。

平友恒・深川矢弥子 (1959)：甘藷酒精蒸留の際に分離する苦味成分について，農化，**32**，513～514。

竹田正久・塚原寅次 (1971)：*Saccharomyces sake* の特性 (第 1 報)，東京農学集報，**16**，14～19。