

# *Aspergillus saitoi*を用いた小豆麴の調製について

山本晃司<sup>\*1</sup>、伊藤彰敏<sup>\*1</sup>、北本則行<sup>\*1</sup>、  
下末祥代<sup>\*2</sup>、杉山友理恵<sup>\*3</sup>、井上五郎<sup>\*3</sup>、野田 廣<sup>\*3</sup>

## Preparation of Adzuki Beans Koji using *Aspergillus saitoi*

Koji YAMAMOTO<sup>\*1</sup>, Akitoshi ITO<sup>\*1</sup>, Noriyuki KITAMOTO<sup>\*1</sup>,  
Sachiyo SHITASUE<sup>\*2</sup>, Yurie SUGIYAMA<sup>\*3</sup>, Goro INOUE<sup>\*3</sup> and Hiroshi NODA<sup>\*3</sup>

Food Reseach Center, AITEC<sup>\*1</sup>, Sugiyama Jogakuen University<sup>\*2</sup>, Koide Bussan Co.,Ltd.<sup>\*3</sup>

小豆を利用した新たな食品の開発を目的として、小豆を黒麹菌で発酵した小豆麴の調製を行った。小豆麴の孢子形成抑制、酵素活性、遊離アミノ酸、クエン酸、ブドウ糖を指標に製麴条件を検討した。その結果、小豆を黒麹菌で 30℃あるいは 35℃で 30 時間通気製麴した後に密閉環境にて 15~29 時間（合計 45~69 時間）製麴することで、孢子形成を抑制した小豆麴を調製できた。小豆麴は、遊離アミノ酸を多く含み、クエン酸による酸味と併せて発酵による特徴ある風味を有していた。

### 1. はじめに

小豆は、あん、赤飯、しる粉などに用途が限られており、小豆を利用した発酵食品は殆ど存在しない。主な理由は、小豆のデンプン粒子がタンパク質粒子に強固に取り囲まれているため、微生物が小豆デンプンを利用することが困難であるためと考えられる。近年、小豆の黒麹菌による発酵について井上らにより特許<sup>1)</sup>が出願されたが、小豆の黒麹菌での発酵に関する研究報告はない。そのため、酵素活性を始めとして、小豆麴の性質が全く明らかになっていない。そこで、本研究では、小豆を黒麹菌で発酵（製麴）させる最適条件を米での黒麹菌による発酵の報告<sup>2~4)</sup>と比較し、検討することとした。良好な発酵の指標として、黒麹菌孢子形成の抑制、酵素活性、遊離アミノ酸、クエン酸、グルコースについて分析した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 原材料

原材料として、北海道十勝産の小豆（きたろまん）を用いた。

#### 2.2 供試菌

種麹菌として *Aspergillus saitoi* IAM2210（黒麹菌）孢子可溶性デンプンで 10 倍量に増量して使用した。

#### 2.3 小豆麴の調製

小豆を蒸留水に一晩浸漬した。水切り後、圧力鍋にて 30 分間蒸煮した。放冷後、黒麹菌の種麹を小豆に対して 0.5%添加し、均一に攪拌した。種麹を接種した蒸煮小豆を 50g ずつ広口培養フラスコ（300mL 容）に分注し、

通気栓をして 30~40℃の温度で製麴した。また、密閉環境にて製麴を行う際は、通気栓をアルミホイルとサラップで 2 重に密封した。

#### 2.4 酵素活性の測定

小豆麴を 5g 秤量し、0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液（pH5.0）25mL を加え、5℃で一晩抽出した。抽出液をろ紙（No.5C）を用いてろ過したものを試験液とした。

$\alpha$ -アミラーゼ活性は  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定キット（キッコーマン(株)）、グルコアミラーゼ活性は糖化力分別定量キット（キッコーマン(株)）、酸性カルボキシペプチダーゼ活性は酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット（キッコーマン(株)）を用いて測定した。酸性プロテアーゼ活性は国税庁所定分析法<sup>5)</sup>に従って測定した。

#### 2.5 クエン酸の定量

小豆麴を 5g 秤量し、蒸留水を 45mL 加えて、ストマッカーで 60 秒間均一化した後、室温で 15 分間抽出した。抽出液を孔径 0.45  $\mu$ m のセルロースアセテートフィルターでろ過したものを分析試料とした。

クエン酸を有機酸分析システム((株)島津製作所)を用いて定量した。分析条件は以下の通りである。

カラム：Shimadzu SCR101H

検出器：電気伝導度検出器

移動相：4mM *p*-トルエンスルホン酸

緩衝液：4mM *p*-トルエンスルホン酸（100mM EDTA, 20mM Bis-Tris）

流速：0.8mL/min

#### 2.6 グルコースの定量

\*1 食品工業技術センター 発酵技術室（現発酵バイオ技術室） \*2 椋山女学園大学 \*3 (株)小出物産

グルコースはグルコース測定キット（和光純薬工業（株））を用いて酵素法で定量した。

## 2.7 遊離アミノ酸分析

小豆麴 2.5g を秤量し、熱水約 50mL を加えて加熱抽出し、抽出液をろ紙(No.2)でろ過し 100mL に定容した。抽出液をクエン酸リチウム緩衝液(pH2.2)で 2 倍希釈後孔径 0.45  $\mu$ m のセルロースアセテートフィルターでろ過し、アミノ酸自動分析装置(L-8500 型 日立計測器サーベイス(株))を用いて定量した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 小豆麴の調製条件の検討

黒麹菌による小豆の発酵条件について、温度 3 条件（30℃、35℃、40℃）、通気・密閉状態 9 条件からなる 27 試験区で予備試験を行った。その結果、蒸煮後の小豆に種麴を接種して 30 時間以上通気状態で製麴した場合、黒麹菌の孢子形成が始まり、経時的に孢子量が増え、小豆が黒い孢子で覆いつくされた。また、30 時間以内通気製麴した後、密閉製麴を行った場合、孢子形成が抑制され、白い菌糸に覆われた小豆麴となった。初期からの通気時間を 22 時間以下と短くすると、黒麹菌の生育が悪かった。密閉製麴後に通気製麴を合計 70 時間以上行ってもアミノ態窒素生成量が増加しなかった。また、40℃で製麴したものもアミノ態窒素生成量が少なかった。これらの結果を踏まえて本試験は、表 1 に示した温度 2 条件、通気状態 4 条件の計 8 試験区で行った。図 1 に示したとおり小豆麴の外観は、①、②の試験区では黒く孢子形成しており、通気時間の長い②の試験区は孢子量が多く、かなり濃い黒色となっていた。③、④の試験区では白い菌糸が小豆をとりまいていた。③、④の試験区は外観上大きな差はなかった。35℃で製麴した試験区は、

30℃の試験区と同様の外観であった。

### 3.2 小豆麴の酵素活性

小豆麴の製麴時に黒麹菌が生産する酵素によって、デンプンやタンパク質が分解されて糖類による甘みやアミノ酸による旨味が新たに付与される。本研究では小豆麴を利用して発酵酒を造ることと、その風味を生かした飲料としての利用を目指した。そこで、小豆麴の風味形成に重要な黒麹菌の糖質分解酵素（ $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ）及びタンパク質分解酵素（酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ）の酵素活性を測定し、その結果を図 2 に示した。

小豆麴の  $\alpha$ -アミラーゼ活性は試験区②を除いては、30℃の試験区の方が高く、30℃、35℃とも通気を継続した①と②の試験区で活性が高い傾向にあった。しかし、この①と②の試験区で活性に大きな差はなかった。45 時間経過以降は、酵素生産が少ないあるいは、生産された酵素が分解されていると推察された。一般に  $\alpha$ -アミラーゼは、40℃までは高い温度帯で多く生産されるが、黒麹菌で調製した小豆麴においては、そのような傾向は認められなかった。また、小豆麴の  $\alpha$ -アミラーゼ活性は、焼酎用米麴（160U/g）<sup>4)</sup>と比較して低かった。これは、小豆デンプン粒子がタンパク質に覆われているためデンプンが蒸煮工程で  $\alpha$  化しにくく、基質となる  $\alpha$  化デンプンが少ないためと推察された。

グルコアミラーゼ活性はすべての試験区で焼酎用米麴（280U/g）<sup>4)</sup>に比べて高く、②の試験区以外は 30℃の試験区のほうが高い値となった。また、通気を継続した①と②の試験区で活性が高い傾向にあった。黒麹菌にとって、生育条件の良い通気を継続した試験区でよりグルコースが必要となり、グルコアミラーゼ生産量が増えたと推察された。以上の結果より、小豆麴は  $\alpha$ -アミラーゼ活

表 1 小豆麴の試験区

	①	②	③	④
	通気	通気	通気→密閉	通気→密閉
30℃	45h	69h	30h→15h	30h→39h
35℃	45h	69h	30h→15h	30h→39h

図 1 小豆麴の写真（30℃）



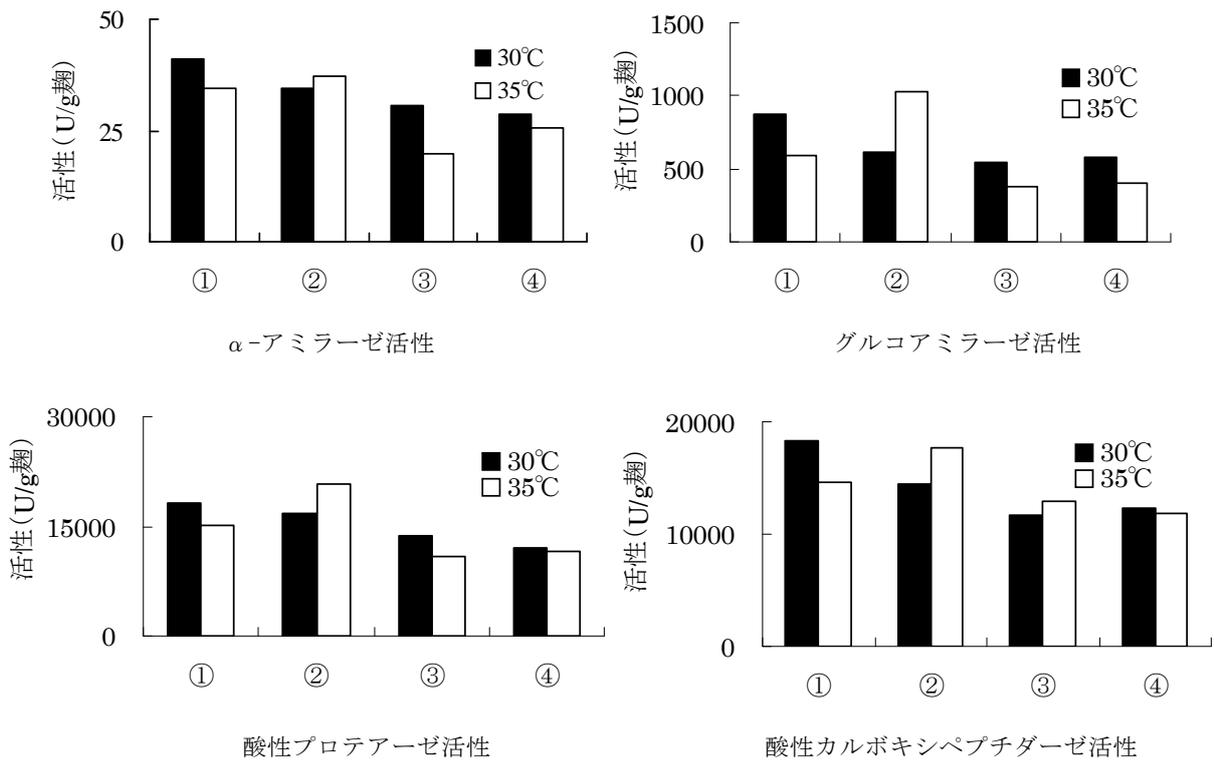


図2 小豆麴の酵素活性

試験区： ①、②（通気製麴）、③、④（通気後密閉製麴）

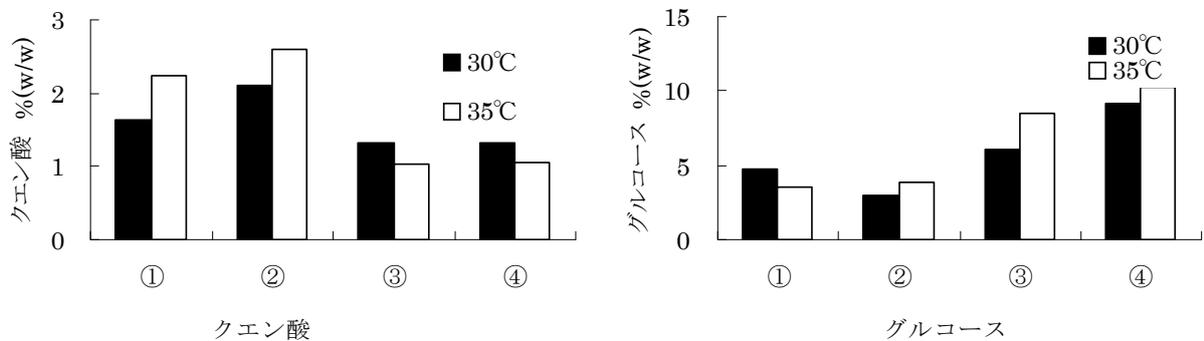


図3 小豆麴のグルコースとクエン酸

試験区： ①、②（通気製麴）、③、④（通気後密閉製麴）

性は低い、グルコアミラーゼ活性は高かった。グルコアミラーゼにより生成したグルコースが黒麹菌に資化されなければ、小豆麴への甘み付与が期待できる。

小豆麴の酸性プロテアーゼ活性は、焼耐用米麴(29,000U/g)<sup>4)</sup>に比べてかなり低い値であった。酸性プロテアーゼ活性に対する温度の影響に関しては、②の試験区以外は30°Cの試験区の方が高く、通気を継続した①と②の試験区でより活性が高かった。黒麹菌の孢子形成にタンパク質分解物のアミノ酸、ペプチドが必要なため酸性プロテアーゼが多く生産されたと推察された。

酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、焼耐用米麴(9,240U/g)<sup>4)</sup>に比べて高い値となった。これは、小豆

のタンパク質量(20.2%)が精白米(9.2%)に比べて多いためであると考えられた。温度の影響については、特に傾向が認められなかったが、通気を継続した①と②の試験区で活性が高くなる傾向にあった。黒麹菌の孢子形成にアミノ酸が必要なため酸性カルボキシペプチダーゼ活性が多く生産されたと推察された。

### 3.2 小豆麴の成分分析

小豆麴において、黒麹菌による発酵で生成するクエン酸は、デンプン酵素分解で生成するグルコースとともに風味形成に重要な成分である。図3に小豆麴についてクエン酸とグルコースを定量した結果を示した。クエン酸量は、①、②の通気時間の長い試験区が③、④の密閉製

表2 小豆麴の遊離アミノ酸

30°C					35°C				
アミノ酸(mg/100g)	①	②	③	④	アミノ酸(mg/100g)	①	②	③	④
アスパラギン酸	42	72	156	291	アスパラギン酸	36	66	226	328
スレオニン	21	25	64	107	スレオニン	18	29	90	130
セリン	24	30	66	104	セリン	18	26	103	153
アスパラギン	0	0	0	0	アスパラギン	0	0	0	0
グルタミン酸	170	258	374	580	グルタミン酸	204	258	459	696
グルタミン	195	250	81	84	グルタミン	119	173	53	67
プロリン	24	25	48	75	プロリン	0	0	75	95
グリシン	13	15	30	46	グリシン	13	18	53	74
アラニン	65	58	113	154	アラニン	67	33	155	206
バリン	9	8	52	103	バリン	11	8	108	162
システイン	14	13	21	23	システイン	12	15	21	22
メチオニン	5	6	48	70	メチオニン	8	8	79	104
イソロイシン	8	8	54	108	イソロイシン	9	6	90	130
ロイシン	16	17	201	327	ロイシン	20	13	319	451
チロシン	13	10	94	149	チロシン	20	11	145	190
フェニルアラニン	11	11	150	235	フェニルアラニン	16	10	233	332
トリプトファン	15	6	41	60	トリプトファン	7	6	54	68
リジン	77	71	159	237	リジン	61	54	297	400
ヒスチジン	26	28	51	88	ヒスチジン	30	27	117	143
アルギニン	60	71	179	277	アルギニン	43	39	292	393
(GABA)	(18)	(24)	(98)	(86)	(GABA)	(32)	(28)	(122)	(98)
合計	808	982	1,982	3,118	合計	712	800	2,969	4,144

試験区：①、②（通気製麴）、③、④（通気後密閉製麴）

麴を行った試験区に比べて明らかに多く、35°Cで通気時間が長いものが最もクエン酸量が多かった。③、④の密閉製麴を行ったものは30°Cの試験区でクエン酸量が多かった。クエン酸発酵は好氣的であり、密閉製麴を行ったものは、酸素量が制限されクエン酸量が少なかったと考えられた。③、④の密閉製麴を行った試験区においても、クエン酸量は1%以上あり、酸味は認められた。

グルコース量は、密閉製麴を行った試験区③、④で密閉時間が長いほど多くなる傾向にあった。また、密閉製麴した試験区では30°Cに比べると35°Cの方が多くなる傾向にあった。通気製麴を継続した試験区①、②では、グルコアミラーゼ活性がかなり高いが、グルコース量は少ない。これは、黒麹菌の増殖及び孢子形成にグルコースが利用されたためと考えられた。

小豆には、タンパク質が多く含まれ、黒麹菌の酸性プロテアーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼによって、タンパク質がペプチドやアミノ酸に分解されて旨味が形成されることが期待できる。表2に小豆麴の遊離アミノ酸分析結果を示した。遊離アミノ酸量は、密閉製麴時間が長いほど多い傾向にあり、35°C④の試験区が最も多かった。同じ温度条件の試験区で比べると通気製麴を継続した試験区のアミノ酸量は、密閉製麴した試験区の半分以下となっていた。麴にすることで旨味のあるアミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）がどの試験区も多く生成していた。タンパク質分解酵素の活性が高い通気を継続した試験区でアミノ酸量が低いのは、生成したアミノ酸の大部分が黒麹菌の増殖及び孢子形成に利用された

ためと考えられた。小豆麴中に遊離アミノ酸を多く蓄積させるには、密閉製麴によって孢子形成を抑えることが重要であった。酸性プロテアーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性に大きな差はなかったが、35°Cで密閉製麴することでより多くのアミノ酸を蓄積できることがわかった。なお、発酵酒の麴として使用する場合は、アミノ酸は雑味となる可能性も有り、過剰に蓄積させる必要はない。

#### 4. 結び

小豆を黒麹菌で発酵した小豆麴の開発に取り組んだ。小豆を黒麹菌で発酵させる際に30°Cあるいは35°Cで30時間通気製麴した後に密閉環境にて15~29時間（合計45~69時間）製麴することで、孢子形成を抑制した小豆麴を調製できた。小豆麴は、原料小豆に殆どない遊離アミノ酸とクエン酸が黒麹菌による発酵により生成し、新たな風味を有していた。

#### 文献

- 1) 特開 2008-263904：小豆発酵食品
- 2) 岩野君夫，三上重明，福田清治，能勢晶，椎木敏：日本醸造協会誌, **82**, 200 (1987)
- 3) 瀬戸口真治，山口 巖，浜崎幸男：鹿児島県工業技術センター研究報告 **2**, 13(1988)
- 4) 発酵と醸造Ⅲ (2003)，光琳：
- 5) 第4回改正国税庁所定分析法注解，(1990)，日本醸造協会