

麹菌の発芽・増殖及び酵素生産 (第1報)

伊藤彰敏・深谷伊和男・西田淑男・鳥居貴佳

「一麹、二酒母、三もろみ」という言葉があるように、麹は清酒製造の根幹を担うものであり、もろみの発酵あるいは酒質に大きな影響を及ぼす。

製麹操作は依然として手作業で行う酒造メーカーが多く、ときには深夜労働を伴うこともあり、麹の製造は過酷な労働の上に成り立っている。また、ポスト社氏時代の到来が現実味を帯びはじめ、製麹作業に対する効率化や、技術的対策の検討が急務となっている。そこで、製麹時間の短縮化を目的として本研究を遂行した。

麹菌胞子の発芽・増殖及び酵素生産に対する蒸米水分、胞子接種温度及びpHといった物理化学的要因が及ぼす影響について検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料米の調製

愛知県産酒造好適米である夢山水(70%白米)を15℃で3時間浸漬、水切後、30分間蒸きようし、95℃で熱風乾燥して α 化米を調製した。

2. 製麹方法

岡崎の方法¹⁾に従い、シャーレ法による製麹実験系を設定した。 α 化米試料2.0gを時計皿にとり、ガラス棒の台座を敷いたシャーレ(ϕ 90mm)中に入れ、90℃で2時間乾熱殺菌した。放冷後、調湿のためシャーレ底部に1.0N NaOH 10mlを加えた後、 α 化米試料に対し、所定蒸米水分、胞子摂取温度及びpHになるように麹菌胞子懸濁液を接種し、35℃で培養した。なお、供試麹菌株は *Aspergillus Oryzae* KBN1010を使用した。

3. 発芽率の測定

休眠胞子と発芽胞子の耐熱性の違いを利用し、奈良原の方法²⁾を改変して発芽率の測定を行った。すなわち経時的に麹2gをサンプリングして0.01%Tween80溶液に加え、振とう攪拌し蒸米上の胞子を懸濁、洗浄した。

つぎに懸濁液を二分して、一方はそのまま(無処理区)、もう一方は55℃で3分間熱処理(熱処理区)し、発芽胞子を死滅させ、それぞれをツァベック寒天培地で平板培

養しコロニー数より発芽率を算出した。

$$\text{発芽率 (\%)} = (A - B) \times 100 / A$$

A: 無処理区コロニー数 B: 熱処理区コロニー数

4. 走査型電子顕微鏡による麹菌胞子の発芽の観察

蒸米上における麹菌胞子の発芽過程を形態的に検討するため、経時的にサンプリングした麹をオスミウム酸固定し、エタノール洗浄、臨界点乾燥した後、白金蒸着させて走査型電子顕微鏡により観察した。なお、製麹はシャーレ法で行い、相対湿度96.5%、蒸米水分36.6%、培養温度35℃、胞子接種量 1.8×10^5 /g・試料米に条件設定した。

5. 麹菌の増殖測定

大内らの方法³⁾に基づき、核酸法により増殖測定を行った。経時的にサンプリングした麹について40mlの0.5N過塩素酸を加え、沸騰水中で15分間、核酸を熱抽出後、東洋濾紙(株)製No.5Cろ紙でろ過後、ろ液を5倍に希釈して260nmの吸光度(A_{260nm})を測定して増殖量とした。

6. 麹の酵素力価の測定

出麹試料に対し、0.5% NaCl (pH5.0 0.2M Acetate bufferを5%含む) 10mlを加え、5℃で一夜抽出した。No.5Cろ紙でろ過後、ろ液を0.01M Acetate buffer (pH5.0) 中で一夜透析し、2倍量に定容して酵素液を調製した。 α アミラーゼ(AAase)、グルコアミラーゼ(GAase)、酸性プロテアーゼ(APase)及び酸性カルボキシペプチダーゼ(ACPase)の酵素力価については、第4回改正国税庁所定分析法⁴⁾に準拠して測定を行った。

実験結果及び考察

1. 蒸米上における麹菌胞子の発芽

(1) 発芽率について

麹菌胞子の発芽率の測定は、液体培養において顕微鏡により観察を行うことが一般的である⁵⁾。本研究では固体培養である蒸米上での麹菌胞子の発芽について検討を行った。その際、麹菌胞子の発芽前後における耐熱性の

違いを利用して、発芽率の測定を行った。なお、ここで発芽とは、胞子から出芽管の出る前段階の生理的变化を示すものとする。麹菌胞子の発芽率に及ぼす蒸米水分、胞子接種温度及び胞子接種時 pH の影響を図 1 から図 3 に示す。

蒸米水分については、30～40%水分で発芽時間をもっとも短く、培養 2 時間後には 95%以上の発芽が確認された。50%水分では、やや発芽が遅れ、20%水分では、発芽までのタイムラグがかなり長くなった。胞子発芽の初期は、水分の吸収による胞子の膨潤化であるといわれており⁶⁾、低水分条件下では胞子の膨潤化が遅く、発芽までに時間を要したものと考えられた。

胞子接種温度（蒸米温度）については、30～40℃で発芽時間をもっとも短く、50℃では発芽が遅れた。

胞子接種時 pH については、酸性領域において検討を行ったが、胞子の発芽は pH4～6 の弱酸性領域では顕著な差は認められなかったが、pH3 では発芽が遅れた。

以上の結果から、蒸米水分 30～40%、胞子接種温度（蒸米温度）30～40℃、pH4～6 が麹菌胞子の発芽時間に対する最適条件であることが示された。これらの条件は、現場で行われている製麹条件に合致するものであった。

(2) 麹菌胞子の発芽過程の観察

蒸米上における麹菌胞子の発芽について形態的に考察するため、走査型電子顕微鏡による観察を行った。麹菌胞子の発芽過程における経時変化を図 4 に示した。

麹菌胞子接種 1 時間後では、発芽胞子は確認されず、中央部の窪んだ胞子が数多く観察された。これは、胞子の水分吸収による膨潤化が不十分な状態を示すものである。しかし、胞子は蒸米表面に半分埋もれた形で存在しており、蒸米に付着した時点から酵素を分泌するなどの発芽誘導活動を開始しているものと考えられた。

胞子接種 3 時間後では、発芽管を伸ばした胞子が観察された。胞子の形態は膨潤しており、水分の吸収により麹菌胞子内の一連の代謝活性が高まり、発芽が開始されるものと推察された。

胞子接種 6 時間後では、蒸米表面には穴が点在し、麹菌胞子は観察されなかった。穴の部分拡大すると、胞子の存在が確認できた。また、蒸米表面には、菌糸の伸長によるひび割れが観察された。これらのことから、麹菌胞子は、蒸米を溶解しながら蒸米内部へもぐり込み、菌糸を水平方向に伸ばしていることが確認できた。

胞子接種 9 時間後では、菌糸が蒸米表面を伸長していることが観察された。菌糸には表層部を溶解しながら伸長する基中菌糸と、溶解を伴わずに伸長する気菌糸が観察され、分岐した菌糸も認められた。

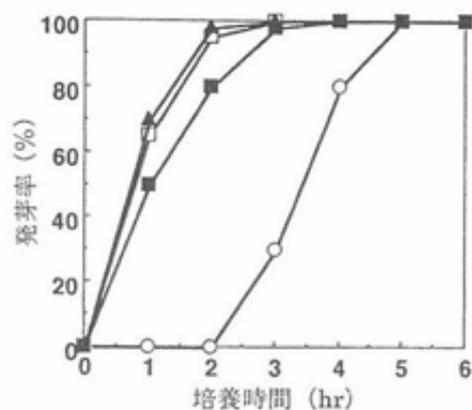


図 1 蒸米水分と発芽率

○, 20%; □, 30%; ▲, 40%
■, 50%

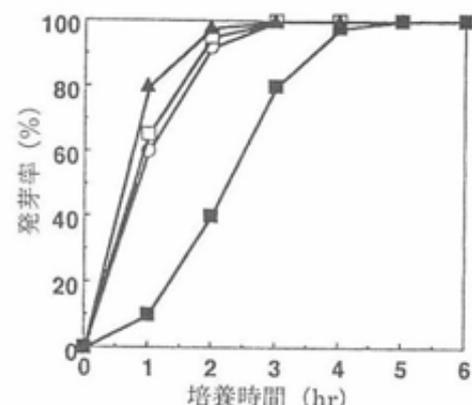


図 2 胞子接種温度と発芽率

○, 20°C; □, 30°C; ▲, 40°C
■, 50°C

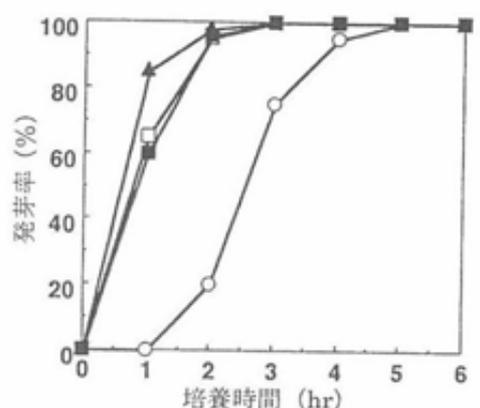
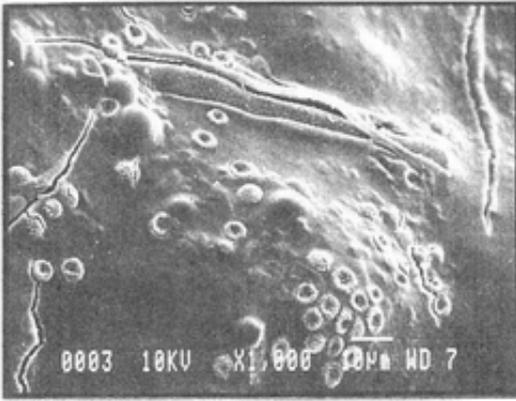


図 3 胞子接種時 pH と発芽率

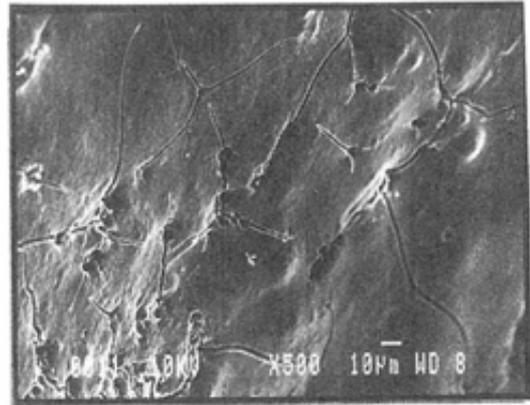
○, 3; □, 4; ▲, 5; ■, 6

以上の形態観察の結果から、麹菌胞子の発芽は、胞子接種後 3～4 時間後の発芽管の出現により終結しており、その後の過程は麹菌の増殖としてとらえられる。

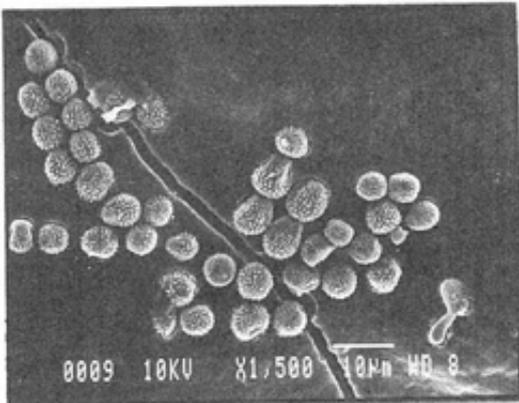
発芽率の測定及び形態観察の結果から、麹菌胞子の発芽までの時間は最長でも 4 時間であり、45 時間という麹時間全体の 11 分の 1 に過ぎず、これ以上の短縮化は困難と思われた。



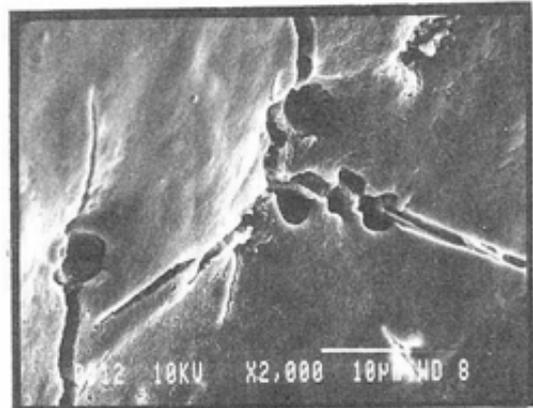
胞子接種 1 時間後



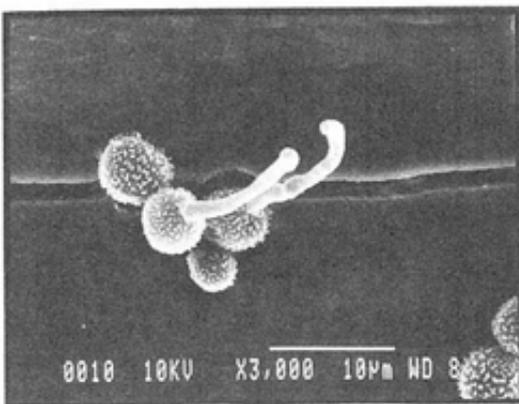
胞子接種 6 時間後



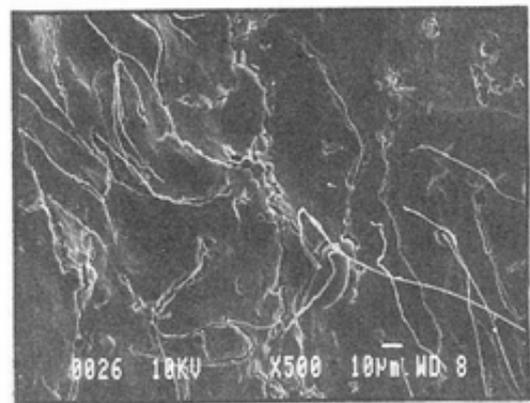
胞子接種 3 時間後



胞子接種 6 時間後



胞子接種 3 時間後



胞子接種 9 時間後

図 4 蒸米上における麹菌胞子の発芽過程 (形態観察)

また、前記のように現場で行われている麹菌胞子接種時の条件は、麹菌胞子の発芽最適条件に適合している。したがって、製麹時間の短縮化を図るに当たっては、麹菌胞子の発芽時間よりもその後の増殖に注目して、検討することが必要と考えられた。

2. 蒸米上における麹菌の増殖

蒸米上における麹菌の増殖について、経時的にサンプリングし検討を行った。通常、麹菌の増殖は、菌体細胞壁のグルコサミンの定量により測定されているが、大内ら³¹⁾の核酸法による A_{260nm} の測定値はグルコサミン量とよく相関しており簡便であることから本法により測定を行った。蒸米水分、胞子接種温度及び胞子接種時 pH の麹菌胞子の増殖に対する影響についてそれぞれ図 5、図 6 及び図 7 に示した。

蒸米水分については、水分含量が多いほど麹菌の増殖が速い傾向が認められた。蒸米水分 18.4% の低水分では立ち上がりの増殖が鈍り、その後の増殖も著しく遅れた。

胞子接種温度（蒸米温度）については、40℃で最もよく増殖した。このことから、現場では蒸米温度 33℃前後で胞子を接種するのが一般的であるが、40℃の接種により、製麹時間の短縮化が可能であることが示唆された。

低温の 20℃及び高温の 50℃では、増殖の立ち上がりが鈍く、その後の増殖も遅れた。

胞子接種時 pH については、pH 4～6 間での差は認められなかった。これは、蒸米の pH 緩衝作用が働いたためであると思われる。pH 3 では他の試験区に比べてやや増殖が悪くなった。

以上の結果から、蒸米水分 30～40%、胞子接種温度（蒸米温度）30～40℃、pH 6 の条件が麹菌の増殖（製麹時間）に対する最適条件であることが示された。これらの条件は、麹菌胞子の発芽最適条件同様、現場で行われている製麹条件に合致するものであった。麹菌胞子接種時の初期条件が、発芽やその後の増殖に影響を及ぼすことが確認された。しかし、製麹時間の短縮化の観点から物理化学的要因の影響について検討した場合、現場で行われている製麹条件で十分であり、栄養要因など他の要因についての検討が必要である。

3. 酵素生産について

麹の評価は、状態や菌糸の蒸米へのハゼコミといった、麹菌の増殖に対する評価の他に、麹菌による酵素生産が重要な要素となる。清酒醸造における麹の最大の役割は、麹菌の生産した酵素（糖類分解酵素や蛋白質分解酵素など）により蒸米を分解し、アルコール発酵の担い手である酵母に対するグルコースの供給を行い、清酒醸造の特質である並行複発酵のバランスをとることである。この理由から、酵素バランスを考慮した麹の品質評価が必要

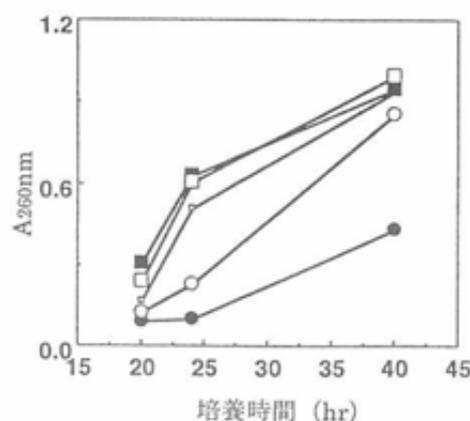


図5 蒸米水分と増殖

●, 18.4% ; ○, 27.5% ; □, 36.6%
■, 45.7% ; ◇, 54.8%

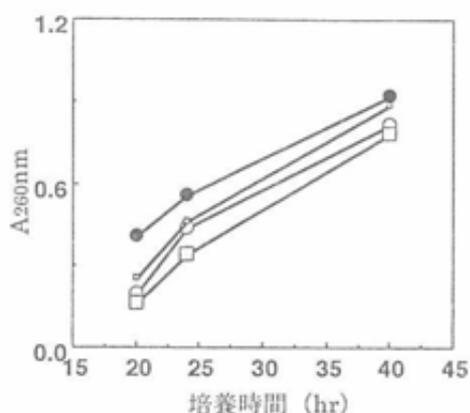


図6 胞子接種温度と増殖

○, 20℃ ; □, 30℃ ; ●, 40℃
◇, 50℃

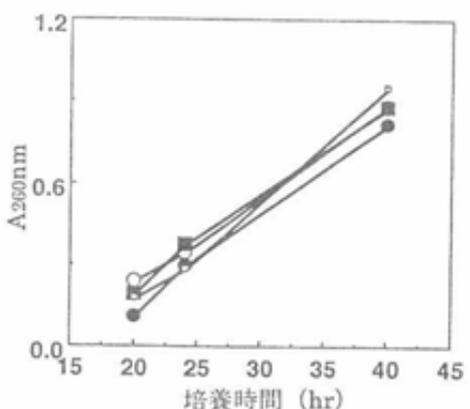


図7 胞子接種時 pH と増殖

●, 3 ; ○, 4 ; ■, 5 ; ◇, 6

である。

蒸米水分、胞子接種温度及び胞子接種時 pH の酵素生産に対する影響についてそれぞれ図 8、図 9 及び図 10 に示した。その際、対照区として蒸米水分 36.6%、胞子接種温度（蒸米温度）30℃、胞子接種時 pH 6 を設定し

た。それぞれ 42 時間培養後の 4 種の麹酵素活性を 1 とし、各試験区の酵素活性を対照区に対する相対活性で示した。なお、活性は麹 1g あたりで算出した。

蒸米水分については、水分含量が高くなると、 α -アミラーゼ活性が上昇する傾向が見られた。水分の多い麹ではもろみが溶けやすく、並行複発酵が前急型となるが、その要因は α -アミラーゼ活性が高いことに起因していることが示唆された。また、酵素バランスとして酸性プロテアーゼの活性が低い傾向を示した。低水分では、酵素バランスには差はないが、活性全体が著しく低くなることが確認できた。

孢子接種温度（蒸米温度）については、どの温度でも酵素バランスに差は認められなかった。蒸米温度を調節することにより、酵素バランスを変えることなく酵素活性を変化させることができ、目的に応じた麹の生産が可能になることが推察された。40℃で最も酵素活性が高かった。

孢子接種時 pH については、pH4 及び pH5 のとき酸性カルボキシペプチダーゼ活性が対照区に比べて高く、酵素バランス的にも突出していた。pH は蒸米上における麹菌の増殖に対しては顕著な相違は認められなかったが、酵素活性では相違が生じた。

物理化学的要因の酵素生産に及ぼす影響について検討した結果、酵素活性及び酵素バランスを指標とした麹の品質についても、麹菌孢子の発芽や増殖と同様、現場レベルの条件が最適条件であることが確認できた。

要 約

製麹時間の短縮化の観点から、麹菌孢子の発芽、増殖及び酵素生産に及ぼす物理化学的要因の影響について検討を行った。その結果、蒸米水分 30~40%、孢子接種温度 30~40℃、孢子接種時 pH4~6 といった条件が最適条件であることが判明した。これらの物理化学的条件は、現場レベルの製麹条件であるが、さらに製麹に技術的改良を加えるためには、麹菌の栄養生理を踏まえた検討を行う必要がある。

文 献

- 1) 岡崎直人：醸協，74，738（1979）。
- 2) 奈良原英樹：麹研究会報，19，45（1983）。
- 3) 大内弘造，石戸輝雄，菅間誠之助，野白喜久雄，醸協，62，1029（1967）。
- 4) 注解編集委員会編：第4回改正国税庁所定分析法注解（日本醸造協会，東京），p.213~p.228

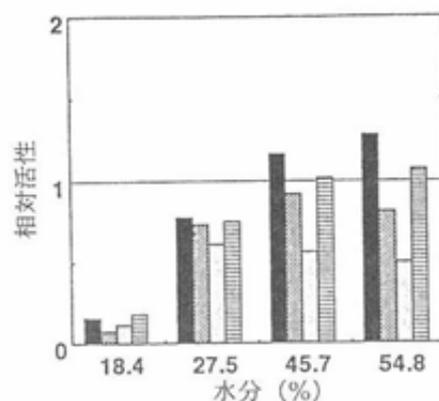


図8 蒸米水分と酵素活性（培養 42 時間）
水分 36.6%の酵素活性を 1 とする。

■, α -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

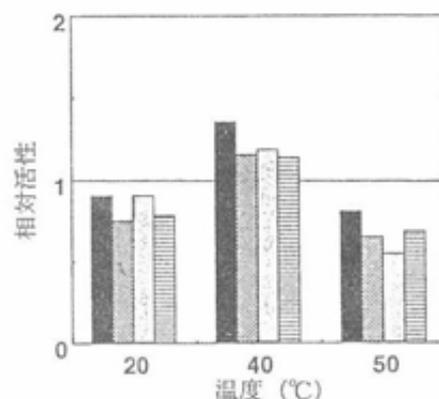


図9 孢子接種温度と酵素活性（培養 42 時間）
30℃の酵素活性を 1 とする。

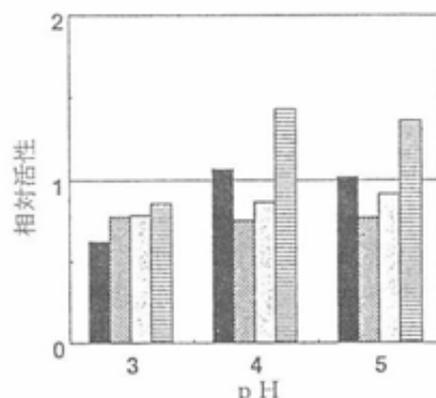


図10 孢子接種時 pH と酵素活性（培養 42 時間）
pH6 の酵素活性を 1 とする。

(1993).

- 5) 柳田友道：微生物科学 3（学会出版センター，東京），p.288（1982）。
- 6) 柳田友道：微生物科学 3（学会出版センター，東京），p.289（1982）。