

## 麹菌の発芽・増殖及び酵素生産 (第2報) — 無機塩類の影響 —

伊藤彰敏・西田淑男・幅 靖志・鳥居貴佳・深谷伊和男

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。製麹における麹菌の増殖や酵素生産に関与する諸要因の効果を明確にすることにより、麹の品質に留意した製麹方法の確立や製麹作業の効率化の実現が可能となる。前報<sup>1)</sup>において蒸米上における麹菌の発芽・増殖及び酵素生産に対する物理化学的要因(蒸米水分、孢子接種温度及び孢子接種時pH)の影響について検討を行った。本研究では、麹菌の栄養要求性に注目し、製麹時間の短縮化を目的として無機塩類の添加による製麹法の確立及び無機塩類添加麹の性質について検討を行ったので報告する。

### 実験方法

#### 1. 使用菌株

製麹には、*Aspergillus oryzae* KBN 1010 ((株)ピオック保存株)の乾燥孢子を使用した。

#### 2. 使用原料米及び $\alpha$ 化米の調製

平成12年産夢山水(70%白米)を使用した。これを15°Cで3時間浸漬、水切後、30分間蒸きょうし、95°Cで熱風乾燥して $\alpha$ 化米を調製した。

#### 3. 無機塩類の種類

酒税法により、仕込水に対し条件付きで必要最小限の添加が認められている無機塩類として、塩化ナトリウム(NaCl)、リン酸一カリウム(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、リン酸二水素カルシウム(Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)、リン酸一アンモニウム(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、硫酸マグネシウム(MgSO<sub>4</sub>)、硫酸カルシウム(CaSO<sub>4</sub>)、メタ重亜硫酸カリウム(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)、塩化マグネシウム(MgCl<sub>2</sub>)、硝酸カリウム(KNO<sub>3</sub>)及び硫酸アンモニウム((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を選択した。尚、特級試薬を使用した。

#### 4. 製麹方法

##### 4.1. シャーレ製麹法

岡崎の方法<sup>2)</sup>に従い、 $\alpha$ 化米試料2.0 gを時計皿にとり、ガラス棒の台座を敷いたシャーレ( $\phi$ 90 mm)中に

入れ、90°C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1.0 N NaOH 10 mlを加えた後、 $\alpha$ 化米試料に対し、無機塩類を所定濃度に溶解させた麹菌孢子懸濁液を接種し、35°Cで培養した。尚、相対湿度は96.5%、孢子接種量は $1.8 \times 10^5$ /g・ $\alpha$ 化米に設定した。

##### 4.2. フラスコ製麹法

所定濃度の各種無機塩類を溶解した浸漬水200 mlに試料米50 gを15°Cで6時間浸漬させ、無機塩類添加蒸米を調製後、 $3.0 \times 10^5$ /g・白米の種麹を接種し、500 ml 広口三角フラスコ中35°Cの条件で製麹を行った。

#### 5. 麹菌の増殖測定

大内らの方法<sup>3)</sup>に基づき、核酸法により増殖測定を行った。経時的に採取した麹について40 mlの0.5 N過塩素酸を加え、沸騰水中で15分間保持して、核酸を熱抽出後、ろ紙(No.5C, 東洋濾紙(株)製)でろ過後、ろ液を0.5 N過塩素酸で5倍に希釈して260 nmの吸光度(A<sub>260</sub>)を測定して増殖量とした。

#### 6. 麹の酵素力価の測定

2.0 gの麹試料に対して、0.5% (w/v) NaCl (pH5.0, 0.2 M 酢酸緩衝液を5% (v/v)含む) 10 mlを加え、5°Cで一晩抽出した。ろ紙(No.5C)でろ過後、ろ液を0.01 M 酢酸緩衝液(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。 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼの酵素力価については、第4回改正国税庁所定分析法注解<sup>4)</sup>に準じて測定を行った。

#### 7. 麹の消化性試験

堀江の方法<sup>5)</sup>に従って、麹試料30 gを0.04 M 酢酸緩衝液(pH5.0) 100 ml 中に入れ、55°Cで5時間消化させ、ろ紙(No.5C,  $\phi$ 185 mm)で正確に1時間ろ過し、第4回改正国税庁所定分析法注解に準じて、ろ液の液量、ボーメ、アミノ酸度、直糖を測定した。

#### 8. 小仕込試験

難波らの方法<sup>6)</sup>に従い、表1に示した仕込配合により、愛知県酵母FIA2を用いて総米200 gの小仕込試験を行っ

た。米は平成12年度産夢山水の70%白米を使用した。麴はフラスコ製麴法により調製した各種無機塩類添加麴を使用した。もろみは最高温度15°Cで留後18日間の発酵を行い、遠心分離(10°C, 3000rpm, 30min)により上槽し、上澄液を製成酒とした。尚、経時的に炭酸ガス減量を測定した。

表1 小仕込試験の仕込配合

	添	仲	留	合計
総米 (g)	35	65	100	200
蒸米 (g)	25	50	75	150
麴米 (g)	10	15	25	50
汲水 (ml)	52	78	130	260

## 9. 製成酒の成分分析

アルコール、日本酒度、酸度、アミノ酸度、着色度及びグルコースは第4回改正国税庁所定分析法注解に準じて測定した。ビルビン酸は3-デオキシグルコソ法<sup>7)</sup>により、全糖はフェノール硫酸法により、尿素窒素はウレアゼ・インドフェノール法(和光純薬工業(株)尿素窒素B-テストワコー)により測定した。

## 実験結果及び考察

### 1. 麴菌の増殖に及ぼす無機塩類の影響

シャーレ法により、蒸米上における麴菌の増殖に及ぼす各種無機塩類の影響について検討を行った。表2に麴菌孢子接種後、24, 33, 45時間後の蒸米上における麴菌の増殖量を示す。尚、無機塩類の添加量は $\alpha$ 化米1g当り0.1mMに設定した。

表2 麴菌の増殖に及ぼす無機塩類の影響

	懸濁水 pH	増殖量 (A <sub>260nm</sub> )		
		24hr	33hr	45hr
対照	5.05	0.210	1.241	1.506
NaCl	4.84	0.336	1.256	1.523
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.46	0.348	1.535	1.782
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	3.07	0.403	1.602	1.824
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.30	0.502	1.622	1.902
MgSO <sub>4</sub>	5.28	0.233	1.265	1.558
CaSO <sub>4</sub>	5.43	0.218	1.243	1.522
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	3.92	0.000	0.000	0.000
CaCl <sub>2</sub>	5.68	0.213	1.311	1.512
MgCl <sub>2</sub>	5.26	0.233	1.333	1.577
KNO <sub>3</sub>	5.28	0.418	1.562	1.804
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.33	0.241	0.686	0.862

岡崎ら<sup>8)</sup>は、無機成分として、窒素は発芽誘導期間を短縮化し、増殖速度を増加させ、カリウム及びリン(リン酸)は麴菌の菌体増殖量の律速要因であると報告しているが、本実験においても窒素、カリウム及びリン(リン酸)を含む無機塩類で同様な添加効果が認められた。すなわち、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及びKNO<sub>3</sub>の添加により、対照の最大増殖量(45時間)に12時間速く到達した。一方、硫酸塩は麴菌の増殖に効果を示さず、K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>及び(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>は増殖を阻害した。孢子懸濁水のpHは、麴菌の増殖に対し直接的な影響を及ぼさなかったが、これは $\alpha$ 化米(蒸米)によるpH緩衝能によるものと推察された。以上の結果から、麴菌の増殖促進効果の認められた無機塩としてKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及びKNO<sub>3</sub>を選択し、また、阻害効果を示す無機塩として(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を選択して、以下の実験に供した。

### 2. 無機塩類添加麴の実用製麴法

実際の現場において製麴を行う場合、無機塩類の添加方法が問題となる。蒸米に対し直接無機塩類を添加すると添加ムラを生じ、麴菌の増殖が不均一となり製麴管理が難しくなる。そこで、蒸米に対し均一に無機塩類を添加する方法として、無機塩類を溶解した水中に白米を浸漬、吸水させることとした。シャーレ法により選択したKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>及び(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>について、浸漬濃度を10mMに設定し、白米を15°Cで6時間浸漬吸水後、フラスコ中で製麴を行った。表3に浸漬条件を示す。

表3 浸漬条件

	浸漬濃度	浸漬水 pH
対照	0 mM	6.18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM	5.16
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM	3.84
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM	4.72
KNO <sub>3</sub>	10 mM	6.12
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM	6.23

#### (1) 麴菌の増殖に及ぼす影響

図1に無機塩類添加蒸米上における麴菌の増殖の結果を示す。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>及びKNO<sub>3</sub>添加麴は対照麴(無添加)に比べ増殖速度が速く、対照の最大増殖量(製麴45時間)に12時間速く到達した。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>添加では、シャーレ法と同様に、本製麴法においても麴菌の増殖が抑制された。これらの結果から、無機塩類溶液への浸漬によってもシャーレ法と同様の効果が確認された。しかし、シャーレ法で促進効果の認められたNH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>添加は効果を示さず、麴菌の増殖が抑制された。このことから、

麹菌の増殖調節は無機塩類の濃度の影響を受けるものと考えられた。

### (2) 酵素生産に及ぼす影響

酵素生産に及ぼす無機塩類の影響について検討を行った。麹菌の増殖が12時間程速められたので、無機塩類添加麹は製麹33時間のもの、対照麹は製麹45時間のものの酵素活性を測定した。麹1g当りの酵素活性から、対照麹に対する無機塩類添加麹の酵素活性の比を算出し、相対活性とした。

図2にアミラーゼ生産に及ぼす無機塩類の影響を示す。α-アミラーゼ及びグルコアミラーゼ活性はKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及びCa(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>では対照よりやや高くなり、KNO<sub>3</sub>では同程度、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>では低くなった。この原因は、主に麹菌の増殖の差によるものと考えられた。また、α-アミラーゼ生産は無機塩類の添加により高められやすく、低下しにくくなり、逆にグルコアミラーゼ生産は、高められにくく、低下しやすい傾向が認められた。

図3にプロテアーゼ生産に及ぼす無機塩類の影響を示す。酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、麹菌の増殖を抑制させたNH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>では低く、アミラーゼ生産と同様の結果を示した。一方、麹菌の増殖を促進させたKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及びCa(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>では高い傾向を示し、KNO<sub>3</sub>は対照麹に比べやや低い傾向を示した。岡崎ら<sup>1)</sup>は、酸性プロテアーゼ生産はリン酸添加により高くなり、窒素成分添加により低下すると報告しており、本結果と一致した。

増殖及びα-アミラーゼ・プロテアーゼ生産に及ぼす無機塩類の影響を検討した結果、増殖及び酵素バランスが良好なものは、KNO<sub>3</sub>であることが判明した。

### (3) 消化性試験

表4に対照麹(45時間)及び無機塩類添加麹(33時間)の消化性試験の結果を示す。「真の消化性」は液量から、「真の糖化性」はボームから、麹乾物当りに換算した値で、それぞれ麹の溶解力及び糖化力の目安となるものである。「乾き度」はボームの値を10倍し、液量で除した値で、麹の乾き具合を表す。「総合力価」は「真の糖化性」と「真の消化性」を掛けた値で、麹の総合的な品質を表している。

無機塩類添加の影響を見ると、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>及びKNO<sub>3</sub>添加麹では、全ての分析項目において対照麹と同程度か、やや高い値を示した。この結果から、これらの無機塩類を添加することにより、33時間の短時間製麹でも、品質の高い麹ができることが判明した。しかし、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>添加麹は、麹菌の増殖が抑制されたことにより、全ての分析項目において対照麹よりも低く、品質の高い麹が得られなかった。

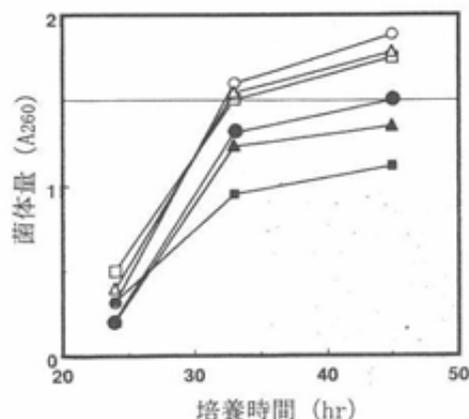


図1 麹菌の増殖に及ぼす無機塩類の影響

●, 対照 ; ○, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
□, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; ▲, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
△, KNO<sub>3</sub> ; ■, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

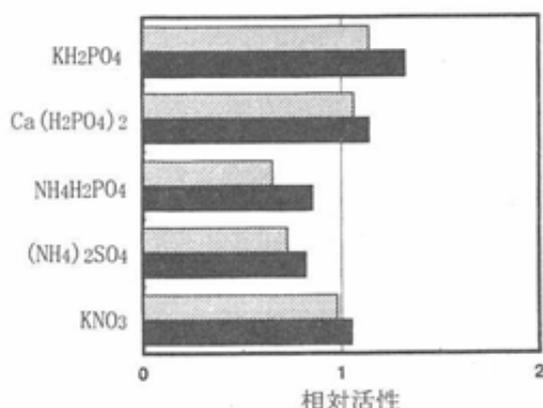


図2 アミラーゼ生産に及ぼす無機塩類の影響

製麹33時間後の酵素活性を示す。対照麹(45時間)の酵素活性を1とした。

■, α-アミラーゼ  
□, グルコアミラーゼ

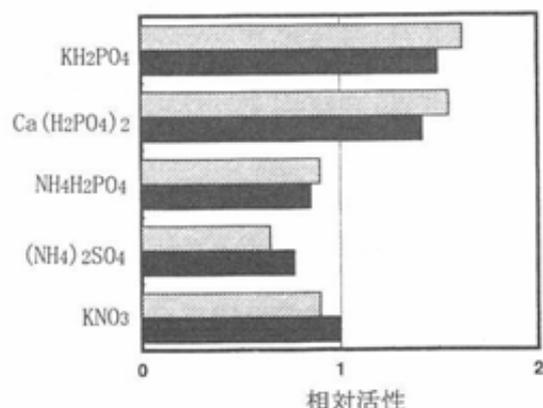


図3 プロテアーゼ生産に及ぼす無機塩類の影響

製麹33時間後の酵素活性を示す。対照麹(45時間)の酵素活性を1とした。

■, 酸性プロテアーゼ  
□, 酸性カルボキシペプチダーゼ

表4 堀江法による栄養素添加麹の品質評価

	対照	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KNO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
水分 (%)	31.5	33.0	31.8	29.5	31.5	29.4
液量 (ml)	73	76	76	59	75	62
ポーメ	8.2	8.6	8.8	6.5	8.4	7.2
アミノ酸度 (ml)	2.4	2.6	2.5	1.6	2.5	2.0
直糖 (%)	12.5	12.8	12.5	9.2	11.8	10.5
真の消化性	66.7	69.3	69.4	54.2	68.5	57.0
真の糖化性	12.0	12.6	12.9	9.22	12.3	10.2
乾き度	1.12	1.13	1.16	1.10	1.12	1.04
総合力価	800	873	895	500	843	581

対照は製麹45時間後、無機塩類添加麹は製麹33時間後の分析値を示す。

### 3. 無機塩類添加麹のもろみに及ぼす影響

無機塩類添加麹を用いて、総米200g、麹歩合25%、汲水歩合130%の仕込配合とし、初添15℃、仲添10℃、留添8℃で3段仕込による小仕込試験を行った。図4にもろみ発酵経過を示す。尚、対照麹は製麹45時間、無機塩類添加麹は製麹33時間のものを使用した。

無機塩類添加麹の分析結果から推察できるように、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>及びKNO<sub>3</sub>添加麹試験区は33時間麹でも、45時間対照麹試験区と同様に順調な発酵経過を示した。一方、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>添加麹試験区では麹の総合力価が低いため、もろみの発酵は鈍く停滞した。

表5に製成酒の成分分析結果を示す。Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>添加麹試験区は固形分率が低く、アルコール濃度の高い製成酒が得られた。

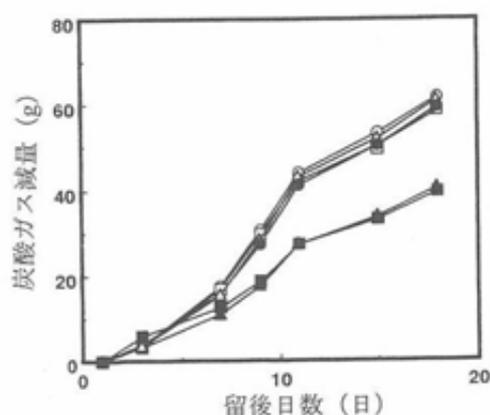


図4 無機塩類添加麹の発酵経過に及ぼす影響

●, 対照 ; ○, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 □, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ; ▲, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 △, KNO<sub>3</sub> ; ■, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

表5 無機塩類添加麹仕込酒の成分分析結果

	対照	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KNO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
製麹時間 (hr)	45	33	33	33	33	33
固形分率 % (w/w)	35.1	34.2	32.5	49.5	33.5	49.3
アルコール % (v/v)	18.1	18.5	18.6	15.2	18.1	14.9
日本酒度	-10	-9	-9.5	+2	-8.5	+1
酸度 (ml)	3.10	3.25	3.20	2.10	3.10	2.25
アミノ酸度 (ml)	2.25	2.75	2.65	2.00	1.90	2.05
ピルビン酸 (mg/ml)	0.35	0.33	0.38	0.21	0.33	0.19
着色度 (A430)	0.055	0.061	0.065	0.044	0.055	0.039
グルコース (mg/ml)	10.3	10.4	10.7	8.1	9.9	7.7
全糖 (mg/ml)	84.2	90.4	92.8	70.2	85.3	69.5
尿素窒素 (mg/dl)	1.25	1.13	1.09	1.00	1.35	1.02

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>添加麹試験区の製成酒は、麹の酵素力価が低いため、糖濃度が低く、それに伴いもろみの発酵が停滞し、アルコール度数が低く、日本酒度がブ

ラスの製成酒となった。また、無機塩類の添加は着色度に対して影響を及ぼさなかった。

神田ら<sup>2)</sup>は仕込水に無機塩類を添加することにより尿

素含量の少ない清酒製造が可能であると報告している。尿素は、火入れや貯蔵によりエタノールと化学的にエステル化反応を起こし、カルバミン酸エチルを生成する。よって、清酒中の尿素含量は低いことが望まれている。そこで、無機塩類添加麹仕込による製成酒中の尿素低減効果について検討を行った。その結果、 $\text{KNO}_3$ 添加麹試験区では、対照試験区よりやや高い傾向を示した。一方、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 及び $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 添加麹試験区では、製成酒中の尿素含量は対照試験区より低かった。神田らは $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 添加により製成酒中の尿素含量が低減化すると報告しており、本実験においても同様の結果が得られた。

## 要 約

酒税法により使用が認められている無機塩類を利用した栄養素添加麹の製麹法及び麹の性質について検討を行った。また、無機塩類添加麹のもろみ発酵経過及び製成酒に及ぼす影響について検討を行った。

1) 浸漬水に無機塩類を添加し、蒸米に無機塩類を補給することにより良質な麹が得られた。特に $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 及び $\text{KNO}_3$ を添加することにより、酵素力価が高く、酵素バランスのよい麹を短時間で製造できることが判明した。

2)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 及び $\text{KNO}_3$ 添加麹を用いたもろみは発酵が順調であり、製成酒中の成分値も正常であった。また、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 及び $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 添加麹は製成酒中の尿素的低減化に効果があることが判明した。

## 文 献

- 1) 伊藤彰敏・深谷伊和男・西田淑男・鳥居貴佳：愛知県食品工技年報，41，1（2000）。
- 2) 岡崎直人：醸協，74，738（1979）。
- 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）。
- 5) 堀江修二：麹研究会報，No.16，1（1980）。
- 6) 難波康之：醸協，73，295（1978）。
- 7) 西田淑男・久野敦史・幅靖志・深谷伊和男：醸協，94，416（1999）。
- 8) 岡崎直人・深谷伊和男・菅間誠之助・田中利雄：醱酵工学，59，491（1981）。
- 9) 神田晃敬・三森智子・浜地正昭・本間健光：醸協，84，114，（1989）。