

特定アミノ酸による麹菌増殖抑制技術の開発に関する研究

伊藤彰敏^{*1}、深谷伊和男^{*2}

Studies on Growth Inhibition of *Koji*-mold by the Specific Amino Acid

Akitoshi ITO and Iwao FUKAYA

Food Research Center, AITEC^{*1*2}

吟醸酒等の高品質特定名称酒の製造には、低水分麹の使用が不可欠である。塩基性アミノ酸であるリジンを添加した麹は、蒸米上における麹菌の増殖抑制効果により、低水分化が可能となった。また、リジン添加麹は1) 突きハゼ型の状貌、2) 高G/A比、3) 低プロテアーゼ活性を呈し、高品質酒製造に適した麹であることが確認された。

1. はじめに

国税局における平成15酒造年度清酒製造状況によると、精米歩合70%以下の特定名称酒比率は31.0%を占め、本醸酒では減少が認められるものの、吟醸酒、純米酒系統では年々増加の傾向を示している。このことは、清酒メーカーの企業姿勢がコスト至上主義から脱却し、酒質をより重視した清酒製造へ方向転換している現れである。

麹は清酒製造において、もろみの発酵経過や最終酒質に多大な影響を及ぼす。蒸米上における麹菌の増殖は、各種の物理化学要因や栄養要因により微妙に変化する¹⁾ため、製麹操作は高度な技術と経験を必要とする。特に、高品質酒を製造するには、水分含量が低く、品質的に酵素バランスの整った吟醸麹の使用が不可欠となる。筆者らは、各種栄養素を添加した麹の性質を検討した中で、特定アミノ酸による麹菌の増殖抑制効果を見出した。そこでこの性質を利用した低水分高品質麹の開発について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

製麹には、*Aspergillus oryzae* KBN1010 ((株)ピオック保存株)の乾燥胞子を使用した。

2.2 使用原料米及び化米の調製

平成13年産夢山水を使用した。夢山水70%白米を15で2時間浸漬、水切後、30分蒸きょうし、95で熱風乾燥して化米を調製した。

2.3 製麹試験

2.3.1 シャーレ製麹試験

岡崎の方法²⁾に従って試験を行った。化米試料に対し、L-アミノ酸またはL-アミノ酸塩を溶解させた麹菌胞子懸濁水を接種し、蒸米水分は31.0%、胞子接種量は1.8

$\times 10^5/g \cdot$ 化米、L-アミノ酸またはL-アミノ酸塩添加量は $5mM/g \cdot$ 化米の条件で製麹を行った。製麹は恒温恒湿器中で行い、相対湿度は96.5%、培養温度35に設定した。

2.3.2 フラスコ製麹試験

所定濃度のリジン塩酸塩を溶解した浸漬水200mLに試料米(夢山水70%白米)50gを15で2時間浸漬させ、リジン添加蒸米を調製後、 $3.0 \times 10^5/g \cdot$ 白米の種麹を接種し、500mL広口三角フラスコ中で製麹した。製麹は恒温恒湿器中で行い、相対湿度は96.5%、培養温度35に設定した。

2.3.3 箱麹製麹試験

40Lの浸漬水に70gのL-リジン塩酸塩を添加し、10mM/Lのリジン浸漬水を調製した。夢山水60%白米10kgをリジン浸漬水中30分間限定吸水させ、水切後一晩放置し(10)蒸きょうした。得られたリジン添加蒸米に対し、可溶性デンプンで5倍希釈した種麹(吟醸用、ピオック(株))を25g接種した。製麹は麹室で行い、常法により温湿度管理を行った。

2.4 麹菌の増殖測定

大内らの方法³⁾に基づき、核酸法により麹菌の増殖測定を行った。また、麹菌体量測定キット(キッコーマン(株)製)を用いて測定した。

2.5 麹の酵素力価の測定

2.0gの麹試料に対し、0.5%(w/v)NaCl溶液(pH5.0、0.2M酢酸緩衝液を5%(v/v)含む)10mLを加え、5で一夜抽出した。ろ紙(No.5C)でろ過後、ろ液の酵素力価を測定した。なお、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ活性はキッコーマン(株)製の醸造分析用酵素活性測定キットを使用し、酸性プロテアーゼ

活性は第4回改正国税庁所定分析法注解⁴⁾に準じて測定を行った。

2.6 麹の電子顕微鏡観察

出麹試料を2%オスミウム酸で固定後、エタノール脱水し、酢酸イソアミル置換後、臨界点乾燥、白金蒸着し、走査型電子顕微鏡(JSM820型、日本電子(株))で加速電圧10kVで観察した。

2.7 小仕込試験

表1に示した仕込配合により、夢山水60%白米、愛知県吟醸酵母FIA2を用いて総米5kgの小仕込試験を行った。初添12、仲添7、留添7で吟醸仕込を行い、もろみ最高温度10で、留添後24日間の発酵を行い、袋吊りにより上槽した。

表1 仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	合計
総米 (kg)	0.2	0.7	1.6	2.5	5.0
掛米 (kg)	-	0.5	1.3	2.2	4.0
麹米 (kg)	0.2	0.2	0.3	0.3	1.0
汲水 (L)	0.5	1.0	2.0	3.0	6.5

酒母,アンプル酒母(乳酸使用量2g)

2.8 もろみろ液及び製成酒の成分分析

経時的にもろみを採取し、遠心分離(10、3000rpm、30分)したろ液を分析に供した。アルコール、日本酒度、酸度、アミノ酸度、吸光度(A260、A280)、着色度、グルコース、有機酸及び香気成分は第4回改正国税庁所定分析法注解⁴⁾に準じて測定した。固形分率(%w/w)はもろみサンプル重量に対する遠心分離残渣重量により求めた。ピルビン酸は3-デオキシグルコソン法により、全糖はフェノール硫酸法により、尿素窒素はウレアーゼ・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。

3. 実験結果及び考察

3.1 L-リジンによる麹菌の増殖抑制効果

18種類のL系列アミノ酸またはアミノ酸塩を孢子懸濁水に個別に添加し、シャーレ製麹を行った。表2にL-アミノ酸添加試験の結果を示す。孢子懸濁水のpHは6.83~7.03の範囲内であり、増殖に対するpHの影響はないと考えられる。酸性アミノ酸添加で顕著な増殖促進効果が認められ、他のアミノ酸についても促進効果を示したが、塩基性アミノ酸であるリジンは唯一増殖抑制効果を示した。なお、同様の実験系で、麹菌の増殖抑制に及ぼすリジン添加濃度について検討した結果、10mM/g・化米まで濃度依存性が確認された。また、市販されている4社の清酒用種麹について同様の試験を行った結果、すべての種麹でリジン添加による増殖抑制が認められた。これらのことから、L-リジンを用いた製麹法及び麹の品

質について検討することとした。

表2 アミノ酸添加による麹菌の増殖活性

	菌体量 (A260)		
	24hr	36hr	48hr
対照(無添加)	0.212	1.241	1.506
L-Gly	0.355	1.344	1.758
L-Ala	0.441	1.569	1.883
L-Val	0.231	1.243	1.523
L-Leu	0.223	1.286	1.524
L-Ile	0.235	1.231	1.513
L-Ser	0.244	1.306	1.549
L-Thr	0.222	1.354	1.579
L-Pro	0.298	1.438	1.687
L-Glu.Na	0.481	1.578	1.852
L-Asp.Na	0.391	1.489	1.782
L-Lys.HCl	0.103	0.854	1.023
L-Arg.HCl	0.354	1.378	1.772
L-His.HCl	0.203	1.264	1.544
L-Tyr	0.208	1.231	1.512
L-Trp	0.219	1.244	1.521
L-Phe	0.237	1.269	1.578
L-Met	0.225	1.252	1.513
L-Cys.HCl	0.245	1.321	1.545

アミノ酸添加濃度:5mM孢子懸濁水/g・化米

3.2 リジン濃度の検討

実際の現場に対応させるため、蒸米を利用したフラスコ製麹法について検討を行った。また、リジンの添加についてはより現場で応用可能な方法として、浸漬水に添加することとし、麹菌の増殖抑制を示すリジンの濃度について検討を行った。図1に示した結果から、より低濃度で麹菌の増殖を抑制させるため、10mMに設定した。

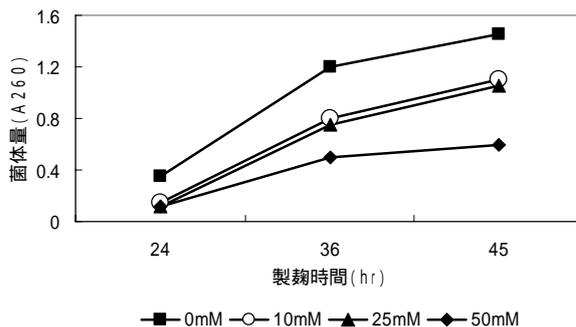


図1 麹菌体量に及ぼすリジン濃度の影響

3.3 リジン添加による麹水分の低減化

浸漬水のリジン濃度を10mMに設定し、箱麹法により製麹を行った。表3に製麹時間経過、図2に対照麹(無添加麹)とリジン麹の麹菌増殖-蒸米水分経時変化を示す。

製麹時間について、リジン麹は対照麹と比較し、6時間から7時間遅れた製麹経過を辿った。揉上げから切返盛までの時間差が出麹まで影響した。一方、水分変化に

ついて調べた結果、リジン添加麹は麹菌の増殖が遅いため、蒸米表面の水分が蒸発し、結果として低水分麹が得られた。種麹量の調節や蒸米水分の調節といった物理的な製麹調整に加え、リジン添加という化学的処理を加えることにより、コンスタントな低水分麹の製造が可能になると考えられる。

表3 製麹時間経過

	品温 ()	対照麹 (hr)	リジン麹 (hr)
揉上げ	30	0	0
切返盛	31	22	27
仲仕事	36	32	39
仕舞仕事	38	38	45
手入れ	40	42	50
出麹	43	48	55

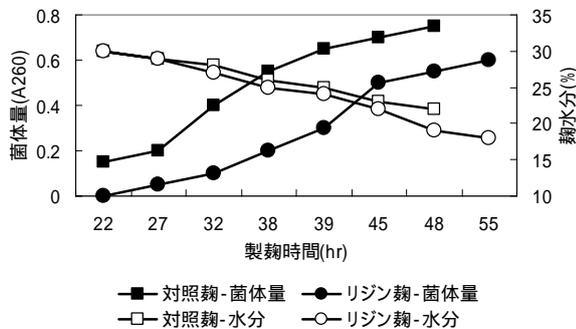


図2 麹菌増殖-蒸米水分経時変化

3.4 リジン添加麹の品質

表4にリジン添加麹の酵素活性値を示す。なお、活性値は菌体量あたりに換算した。

表4 麹の品質

	対照麹	リジン麹
菌体量 (mg/g麹)	3.12	2.93
AAase (U/mg菌体)	263	184
GAase (U/mg菌体)	56	51
APase (U/mg菌体)	454	441
ACPase (U/mg菌体)	913	867
G/A比 (GAase/AAase)	0.21	0.27
DF (U/mg菌体)	28	29
Tyr.ase (U/mg菌体)	trace	trace
細菌酸度 (mL)	trace	trace

AAase: アミラーゼ、GAase: グルコアミラーゼ
APase: 酸性プロテアーゼ、ACPase: 酸性加水分解力
DF: デフェリフェクリシン、Tyr.ase: プロテアーゼ

リジン添加麹は対照麹と比較し、麹菌の増殖が抑制されていることから、菌体量が低い値を示した。しかし、G/A比(グルコアミラーゼ/アミラーゼ活性比)は高い値を示し、高品質麹の特徴を有していた。また、清酒

の雑味に關与する、タンパク質分解系の酵素活性が、リジン麹では低い値を示しており、酒質の向上が示唆される結果が得られた。なお、麹の負の要因であるデフェリフェクリシン生産、チロシナーゼ生産及び細菌酸度については対照麹と同様で問題は生じなかった。

3.5 リジン添加麹の性状

図3に麹の蒸米内部構造を示す。蒸米内部への麹菌糸のハゼ込みを示したものであるが、リジン麹は対照麹と比較して、ハゼ込んでいる菌糸の量は少ないが、菌糸径が太い傾向を示した。また、菌糸は蒸米中心部まで食い込んでおり、高品質麹の特徴である突きハゼ型構造を示した。

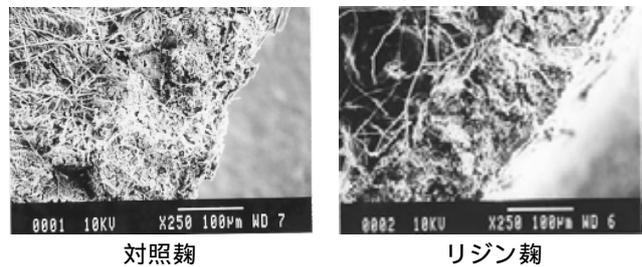


図3 麹の蒸米内部構造 (SEM)

3.6 リジン麹仕込酒の品質

対照麹及びリジン麹を用いて、表1に示した仕込配合により、純米吟醸小仕込試験を行った。なお、酒母麹は対照麹及びリジン麹を別々に使用し、掛米は試験区に差をつけずに仕込んだ。図4に並行複発酵の経過、表5に製成酒成分を示す。

図4からわかるように、ポーメについてリジン麹仕込酒では、対照麹仕込酒と比較し、やや低い値で推移した。これは、対照麹と比較し、全体的に酵素活性値が低いことに起因している。従って、最終到達アルコール度数も、リジン麹仕込酒では対照麹仕込酒より低い値を示した。しかし、発酵バランス及びもろみ品温経過は順調に推移し、もろみ成分変化も大きな変動はなく、順調な経過を示した。

表5からわかるように、製成酒の日本酒度はほぼ同じ値を示したが、リジン麹仕込酒は対照麹仕込酒と比較して、固形分率が4.3%高い値を示した。また、アルコール度数が低いため、酒化率の観点から、リジン麹は経済酒製造の使用には向かないと考えられる。

リジン麹仕込酒は対照麹仕込酒と比較し、酸度、アミノ酸度、もろみの溶解指数であるA260及びタンパク質溶解指数であるA280が低い値を示した。着色度(A430)及び有機酸では顕著な差は認められなかった。香気成分では酢酸イソアミル、カブロン酸エチルといったエステル

成分が、リジン麹仕込酒のほうが高い値を示した。また、窒素成分を添加するため、もろみ中での酵母による尿素生成が考えられたが、尿素窒素の値は、対照麹仕込酒と同レベルであった。官能評価では、やや味に薄さは感じるものの、淡麗で香味バランスのよい製成酒が得られた。

成分分析値及び官能評価の結果から、リジン麹は高品質酒製造への利用が向いていることが確認できた。

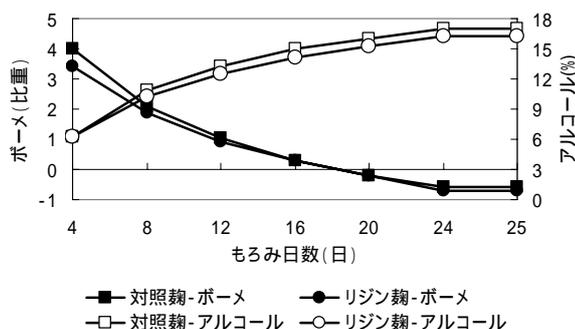


図4 並行複発酵の経過

表5 製成酒成分

	対照麹 仕込酒	リジン麹 仕込酒
日本酒度	+7	+6.5
アルコール (%v/v)	16.95	16.20
固形分率 (%w/w)	45.9	50.2
酸度 (mL)	2.10	1.85
アミノ酸度 (mL)	0.95	0.85
グルコース (mg/mL)	2.62	1.90
ピルビン酸 (ppm)	160	153
尿素窒素 (ppm)	29.5	30.1
A260	7.060	6.170
A280	7.245	6.460
着色度 (A430)	0.027	0.024
乳酸 (mg/100mL)	29.6	29.3
リンゴ酸 (mg/100mL)	33.5	31.0
クエン酸 (mg/100mL)	4.22	3.54
コハク酸 (mg/100mL)	57.9	53.1
イソamilアルコール (ppm)	102	115
酢酸イソamil (ppm)	2.0	2.5
E/A	1.96	2.17
加 ^o 酸 ^o 酸 ^o (ppm)	1.85	2.12
官能評価	酸うく やや雑味	きれい やや味薄

E/A : 酢酸イソamil × 100 / イソamilアルコール

3.7 添加リジンの物質収支

酒造工程における、添加したリジンの物質収支について検討した結果を表6に示した。なお、遊離リジン及び全窒素について追跡を行い、清酒以外は乾物換算で計算し、()は全窒素に対する比率を表している。リジンを添加したことにより、蒸米のリジン濃度を人為的に変えることができた。リジン添加蒸米から調製した麹の遊離リジンの増加量が少なく、清酒及び酒粕の遊離リジンは、リジン添加区と対照区でほとんど差がないことから、物質収支を考えると、添加リジンは麹菌及び酵母により菌体内で資化されたものと考えられる。

表6 添加リジンの物質収支

	遊離リジン (mg/100gDRY)	全窒素 (mg/100gDRY)
対照区	白米	0.46(0.05)
	蒸米	0.3(0.04)
	麹	64.46(7.78)
	清酒	1.54(2.17)
	酒粕	16.78(0.74)
リジン添加区	蒸米	57.08(6.89)
	麹	61.13(7.37)
	清酒	1.57(2.30)
	酒粕	15.94(0.71)

清酒 : mg/100g (): 全窒素に対する割合 (%)

4. 結び

塩基性アミノ酸である L-リジン塩酸塩を添加した麹は、蒸米上における麹菌の増殖抑制効果により、低水分化が可能となった。また、リジン添加麹は 1) 突きハゼ型の状貌、2) 高 G/A 比、3) 低プロテアーゼ活性を呈した。リジン添加麹を利用した清酒は酸度及びアミノ酸度が低く、香味に優れており、高品質酒製造に適した麹であることが確認された。

文献

- 菅間誠之介, 岡崎直人: 醗酵工学会誌, 60, 151 (1982)
- 岡崎直人: 醸造協会誌, 74, 738(1979)
- 大内弘造, 石戸輝雄, 菅間誠之介, 野白喜久雄: 醸造協会誌, 62, 1029 (1967)
- 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)

