

麴における黄麴菌の増殖量と代謝生産物量との関係

岩野君夫・中沢伸重・伊藤俊彦

(秋田県立大学)

平成14年5月13日受理

The relation between the growth of *aspergillus oryzae* and metabolism products in sake koji

Kimio IWANO, Nobushige NAKAZAWA, Toshihiko ITO

(Akita Prefectural University, Nakano Shimo-Shinryo, Akita 010-0195)

We analyzed the relationship between the growth of *aspergillus oryzae* and metabolites of the sake-koji. Despite using the same raw material rice and the same seed *aspergillus oryzae* strain, a significant difference was found in the growth of koji. The various enzymes, glucose, amino acids, and inorganic phosphoric acid, which are metabolites from *aspergillus oryzae*, were also produced at high levels in proportion to the growth of *aspergillus oryzae*. The enzyme activity per mycelia was divided into two groups. One group, in which the enzyme activity per mycelia was constant, includes α -amylase, acid phosphatase, and phytase. The another group, in which the enzyme activity per mycelia had a negative correlation to the amount of mycelia, contains glucoamylase, acid protease, and acid carboxypeptidase. It was presumed that the inorganic phosphoric acid which was eluted to moromi-water from koji was more than that from brewing-water.

Key words : 菌体量, 酵素生産, 代謝生産物

緒言

黄麴菌が清酒麴中に生産する代謝産物は清酒醸造において重要な役割を担っており、(1) 蒸米の溶解・糖化をつかさどる酵素類の酒母・醪への供給、(2) 栄養素の提供による清酒酵母の増殖・発酵の促進、(3) 麴菌生産物による酒質の直接的、間接的形成の3つの役割が挙げられている。酵母の増殖にはグルコース等の炭素源、アミノ酸等の窒素源、およびカリウム、マグネシウム、無機リン酸などの無機化合物が必要である。麴菌が麴中に生産するグルコース、アミノ酸及び無機リン酸は、酒母仕込時に仕込水に溶出し酵母増殖の立ち上がりに利用されると考えられるが、これらの含有量については古い研究報告^{2,3,4)}が見られるのみである。

筆者等は担当の学生実験の一環として40人の学生それぞれに麴を造ってもらい、その麴を使った小仕込

試験を行い、麴の発酵に及ぼす影響について調べる清酒の試験醸造を実施している。麴は同じ原料米、種麴菌、製麴設備、製麴温度経過で製麴したにもかかわらず、菌体量、酵素活性、グルコース量、無機リン酸量、アミノ酸量に大きな違いが認められた。醸造の現場での麴と若干違うと思われるが、麴菌の増殖量と代謝生産物との関連を調べる貴重なデータと考えられるので解析を行った。

実験方法

1. 製麴

製麴は、40人の学生がそれぞれ70%美山錦(秋田県産)100gを原料白米とし通常の洗米、浸漬、蒸し、放冷、種麴菌散布、製麴を行った。種麴菌は秋田今野モヤシ(醪用)を使用し、原料白米に対して0.1%の使用量とした。製麴容器はポリプロピレン製タッパー(W120×L170×D55mm)を利用した。製麴は40

人の学生が同時に行った。温度と湿度がプログラムできる恒温恒湿装置 (Nkssystem 社製 BIOTRON LPH-200, W 50×H 95×D 45 cm) を 2 台用いて、装置内の 4 段の棚にタッパーをそれぞれ 1 層で広げて上部空間を十分にとり温度・湿度が均一となるようにして製麴を行った。床期間は、物量をタッパーの片側に寄せ、ろ紙で表面を覆いタッパーの蓋をして、温度 31°C、湿度 90% で 20 時間行った。手入れ後、物量をタッパー全面に広げて表面をろ紙で覆い、タッパーの蓋は除いて、温度 38°C、湿度 85% で 25 時間無手入れで製麴した。解析に用いた麴のデータは筆者等が分析した数値を用いた。

2. 酵素活性の測定

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活性は国税庁所定分析法⁹⁾により測定した。酸性ホスファターゼ及びフィターゼは既報⁶⁾に従い測定した。

3. グルコース及び無機リン酸 (Pi) の定量

麴 2g に 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 8ml を加え、冷蔵庫中で時々攪拌しながら 2 時間抽出し、東洋ろ紙 No. 5 A でろ過して抽出液とした。グルコースは和光純薬 (株) のグルコース B テストを用いて定量した。

無機リン酸の定量は中村氏変法⁷⁾で行い、Pi (μg/1g -koji) として表した。

4. アミノ酸分析

日立高速アミノ酸分析計 L-8800 を使用し生体アミノ酸分析法 (分析時間 2 時間 30 分) で行った。試料の調製は前報⁸⁾と同じ方法で行った。単位は麴 1g 当たりの mg として表した。

5. 麴の菌体量

キッコーマン社製の麴菌量測定キットを使用して測定し、菌体量をグルコサミン量 (mg/g-koji) として求めた。

実験結果

1. 清酒麴の菌体量及び代謝生産物

40 個の麴の菌体量、各種酵素活性、グルコース、アミノ酸及び無機リン酸量を調べた。菌体量の分布は Fig. 1 に、麴 1g 当たりの酵素活性及び含有量を Table 1 に、菌体量 1mg 当たりの酵素活性及び含有量を Table 2 に示した。原料白米、種麴菌、製麴方法及び製麴温度経過が同一にもかかわらず菌体量は Fig. 1 から明かなように大きな差異が認められた。麴菌の蒸米上での増殖に及ぼす影響因子については奈良

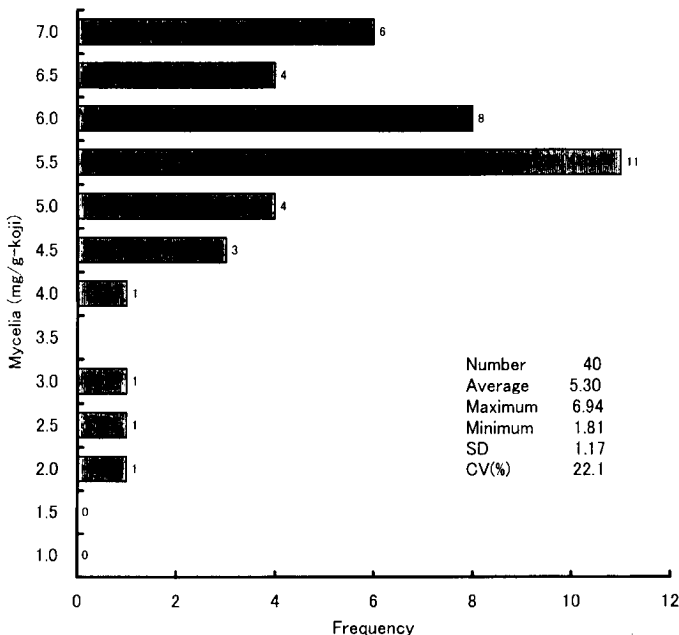


Fig. 1 Frequency distribution of mycelia density in sake koji

原ら^{9,10)}、岡崎ら^{11,12)}、他多くの報告¹³⁾があり、蒸米水分と温度の影響が大きいことが明かにされている。各種酵素活性、グルコース、アミノ酸及び無機リン酸含有量は Table 1 から明かなように大きな変動が認められた。

2. 清酒麴中の麴菌代謝生産物の相関分析

菌体量当たりの各種酵素活性、グルコース、アミノ酸及び無機リン酸含有量は Table 2 から明かなように大きな変動が認められた。これは麴菌代謝生産物量は菌体量当たり一定でないことを意味する。そこでこの 40 個の麴を試料として、菌体量と代謝生産物である種々の酵素、グルコース、アミノ酸及び無機リン酸の生産との関連について相関分析を行った。結果は、麴 1g 当たりの麴菌代謝生産物間の相関係数を Table 3 に、菌体量 1mg 当たりの麴菌代謝生産物間の相関係数を Table 4 に示した。

(1) 菌体量と酵素活性との相関関係

清酒麴 1g 当たりの酵素活性と菌体量との相関関係は Table 3 から明かなように 6 種類の酵素全てが正の相関関係が認められ、菌体量の多い麴は麴 1g 当たりの酵素活性も相対的に高いものと考えられる。一方、菌体量当たりの酵素活性と菌体量との相関関係は Table 4 から明かなように酵素間に違いが認められた。 α -アミラーゼ、酸性ホスファターゼ及びフィターゼは菌体量と相関関係が認められず菌体量当たりの活性はほぼ一定であったが、これに対して、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は Fig. 2 及び Fig. 3 に示したように菌体量当たりの酵素活性は菌体量と負の高い相関関係 ($r = -0.482^{***}$, $r = -0.848^{***}$, $r = -0.750^{***}$) が認められた。この結果は菌体量の少ない麴は菌体量当たりのグルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ及び酸

Table 1 Differences in the metabolism products per 1g of sake koji

	Average	Maximum	Minimum	SD	CV(%)
α Amylase	641	1042	121	191.0	29.8
Glucoamylase	146	205	51	30.5	20.9
Acid protease	2563	2966	1528	312.5	12.2
Acid carboxypeptidase	4851	6014	2462	725.1	14.9
Acid phosphatase	43	66	13	10.9	25.2
Phytase	11	18	3	3.3	29.7
Glucose	34.8	46.5	18.6	7.60	21.9
Amino acid	2.06	3.50	0.83	0.66	32.1
Inorganic phosphate	58.9	79.6	30.4	11.45	19.4

Enzyme activity ; units/g koji, Glucose ; mg/g-koji, Amino acid ; mg/g-koji, Inorganic phosphate ; μ g/g-koji

Table 2 Differences in the metabolism products per 1mg of mycelia

	Average	Maximum	Minimum	SD	CV(%)
α Amylase	120	169	41	24.12	20.0
Glucoamylase	28	53	19	5.31	19.0
Acid protease	510	1143	345	148.17	29.0
Acid carboxypeptidase	954	2095	686	245.17	25.7
Acid phosphatase	8.2	12.8	5.7	1.25	15.2
Phytase	2.1	3.4	1.2	0.43	21.0
Glucose	6.7	11.2	4.1	1.44	21.4
Amino acid	0.39	0.61	0.17	0.096	24.6
Inorganic phosphate	11.4	19.2	8.0	2.13	18.7

Enzyme activity ; units/mg mycelia, Glucose ; mg/mg mycelia, Amino acid ; mg/mg mycelia, Inorganic phosphate ; μ g/mg mycelia

性カルボキシペプチダーゼ活性が高いことを示すもので現場の麴造りを考える上で極めて興味深い結果である。製麴におけるどのような因子が酵素遺伝子の発現に関わっているか興味深い。最近の麴菌 DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の評価技術¹⁴⁾ やプロテオーム解析技術の応用による麴菌の酵素生産・分泌条件の検討¹⁵⁾ などによりまもなく解明されるものと期待される。すでに石田ら¹⁶⁾ はグルコアミラーゼ遺伝子 B (*glaB*) の発現条件を検討し、固体培養で *glaB* の転写を誘導する因子は、「水分活性」「高温培養」「菌糸伸長ストレス」であり、菌糸の伸長にストレスがかかる条件で転写が促進されることを報告している。

(2) 清酒麴のグルコース含有量菌体量

清酒酵母は主にグルコースを資化発酵するため、酒

母仕込み直後は麴に由来するグルコースが唯一の炭素源になるものと考えられる。清酒麴 1 g 中のグルコース含有量は Table 1 から明らかなように、平均 34.8 mg, 最大 46.5 mg, 最小 18.8 mg, 変動率は 21.9% で大きな変動が認められた。酒母の麴歩合 32%, 汲水歩合 110% の条件で麴中のグルコースが仕込水に溶出した時のグルコース濃度を計算すると、最大 1.45%, 最小 0.55%, 平均 1.02% と推定される。このグルコース濃度の違いが酒母における酵母増殖の立ち上がりに影響するかどうか今後検討する予定である。麴 1 g 当たりのグルコース含有量は、Table 3 に示したように α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、菌体量とそれぞれ正の高い相関関係 ($r = 0.746^{***}$, $r = 0.637^{***}$, $r = 0.689^{***}$) が認められた。五味ら¹⁷⁾

Table 3 Correlation between the metabolism products per 1g of sake-koji

	Mycreila	AAase	GAase	APase	ACPase	APHase	PHYase	Glucose	Amino acid	Pi
Mycreila	1.000									
AAase	0.803	1.000								
GAase	0.788	0.870	1.000							
APase	0.511	0.626	0.745	1.000						
ACPase	0.710	0.713	0.806	0.786	1.000					
APHase	0.850	0.838	0.864	0.555	0.780	1.000				
PHYase	0.705	0.708	0.737	0.508	0.643	0.772	1.000			
Glucose	0.689	0.746	0.637	0.453	0.581	0.716	0.559	1.000		
Amino acid	0.709	0.610	0.588	0.479	0.664	0.680	0.558	0.683	1.000	
Pi	0.823	0.753	0.724	0.501	0.765	0.855	0.624	0.681	0.736	1.000

AAase ; α Amylase, GAase ; Glucoamylase, APase ; Acid protease, ACPase ; Acid carboxypeptidase
 APHase ; Acid phosphatase, PHYase ; Phytase, Pi ; Inorganic phosphate
 $|r| > r(38, 0.001) = 0.4740$, $|r| > r(38, 0.01) = 0.3665$, $|r| > r(38, 0.05) = 0.2638$

Table 4 Correlation between the metabolism products per 1mg of mycelia

	Mycreila	AAase	GAase	APase	ACPase	APHase	PHYase	Glucose	Amino acid	Pi
Mycreila	1.000									
AAase	0.073	1.000								
GAase	-0.482	0.524	1.000							
APase	-0.848	0.259	0.745	1.000						
ACPase	-0.750	0.303	0.769	0.951	1.000					
APHase	-0.133	0.540	0.730	0.401	0.517	1.000				
PHYase	0.018	0.252	0.110	-0.030	-0.015	0.238	1.000			
Glucose	-0.558	0.412	0.505	0.671	0.660	0.413	-0.001	1.000		
Amino acid	-0.113	0.254	0.245	0.335	0.403	0.332	0.098	0.501	1.000	
Pi	-0.639	0.299	0.530	0.782	0.828	0.451	-0.034	0.642	0.456	1.000

AAase ; α Amylase, GAase ; Glucoamylase, APase ; Acid protease, ACPase ; Acid carboxypeptidase
 APHase ; Acid phosphatase, PHYase ; Phytase, Pi ; Inorganic phosphate
 $|r| > r(38, 0.001) = 0.4740$, $|r| > r(38, 0.01) = 0.3665$, $|r| > r(38, 0.05) = 0.2638$

は液体培養では α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ遺伝子の転写・発現にはカタボライト抑制が存在し、グルコース量が多いと転写が抑制されると報告しているが、麴中のグルコース含有量とグルコアミラーゼ活性との間には正の高い相関関係が認められ、固体培養と液体培養の違いが興味深い。菌体量当たりのグルコース量でみると Table 4 から明かなように、 α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼとの相関が低下し ($r = 0.412^{**}$, $r = 0.505^{***}$)、菌体量とは負の相関関係 ($r = -0.558^{***}$) へと変化する。これは菌体量の少ない麴は菌体量当たりのグルコース含有量が多いことを示し、菌体量当たりのグルコアミラーゼ活性が高いことと一致している。

(3) 無機リン酸含有量

無機リン酸は酵母の増殖に必要な無機成分である¹⁸⁾。酵母や麴の初期においては供給が間に合わず無機リン酸が不足すること^{18,19)} から仕込みにリン酸一カリウムなどのリン酸塩の加工が行われている。原料米中のリン酸の形態はほとんど有機態であるが、筆者等は無機リン酸の遊離には酸性ホスファターゼが関わっており⁶⁾、酵素剤仕込みで酸性ホスファターゼを補填する

と醗初期の発酵が大きく改善されることを明かにした²⁰⁾。今回、麴中の無機リン酸含有量 (Pi, $\mu\text{g/g-koji}$) について調べた。麴 1 g 中の無機リン酸含有量は Table 1 に示したように平均 58.9, 最大 79.6, 最小 30.4, 変動率 19.4% であった。酒母の麴歩合 32%, 汲水歩合 110% として水麴時の無機リン酸濃度を計算したところ平均 0.56 mM, 最大 0.76 mM, 最小 0.29 mM であった。醸造用水中の無機リン酸濃度を灘の宮水のデータから推定すると 0.07 mM ほどである。学生実験の麴は醸造の現場の麴と若干違うと思うが、麴からの無機リン酸の供給は醸造用水よりも多いと考えられる。藤谷²¹⁾ は酵母が必要とする無機リン酸の最適限界濃度は増殖で 1 mM, 発酵には 0.5 mM と報告しているが、今回の結果は麴からの持ち込まれる無機リン酸だけでは酵母の増殖に不足することを示す。麴 1 g 当たりの無機リン酸含有量は Table 3 に示したように酸性ホスファターゼ ($r = 0.855^{***}$)、フィターゼ ($r = 0.624^{***}$) 及び菌体量 ($r = 0.823^{***}$) と高い正の相関関係が認められたが、菌体量 1 mg 当たりの無機リン酸含有量は Table 4 に示したように酸性ホスファターゼとの相関が低下し ($r = 0.451^{**}$)、フィ

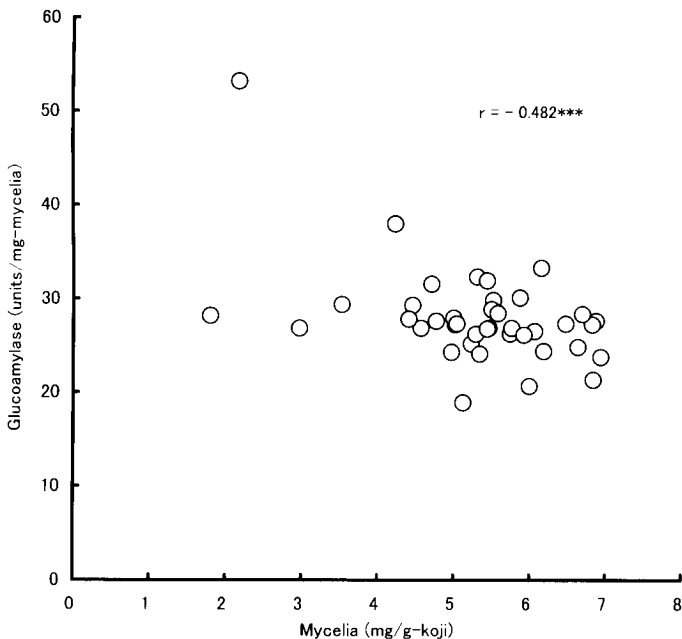


Fig. 2 Correlation between the glucoamylase activity and mycelia

ターゼとは無相関に、菌体量とは負の相関関係 ($r = -0.639^{***}$) へと変化する。この結果はグルコースの場合と同様で菌体量の少ない麴は菌体量当たりの無機リン酸含有量が多いことを示す。

(4) アミノ酸含有量

麴菌が清酒麴中に生産するアミノ酸類は、酒母において酵母の増殖に最初に利用される窒素成分と考えられ、その含有量は酵母増殖の立ち上がり大きく影響していると考えられる。そこで清酒麴中のアミノ酸をアミノ酸アナライザーで定量し、アミノ酸の総量 (mg/g-koji) として求めた。結果は Table 1 に示したように清酒麴 1g 当たりの値で平均 2.06mg, 最大 3.50mg, 最小 0.83mg で変動率 32.1% と大きな分散を示した。麴中のアミノ酸が仕込水に溶出した時のアミノ酸濃度を計算すると、酒母の麴歩合 32%, 汲水歩合 110% の条件で、最大 1,014 ppm, 最小 240 ppm, 平均 597 ppm と計算された。麴中のアミノ酸量及びアミノ酸組成の違いが酵母の増殖にどのような影響を及ぼしているのか検討中である。麴 1g 当たりのアミノ酸量は Table 3 に示したように酸性プロテアーゼ ($r = 0.479^{***}$), 酸性カルボキシペプチダーゼ ($r = 0.664^{***}$) 及び菌体量 ($r = 0.709^{***}$) と正の高い相

関が認められる。菌体量当たりのアミノ酸量は Table 4 から明らかなように菌体量とは無相関となり、 α -アミラーゼの場合と同じく麴中のアミノ酸含有量は麴菌の増殖に比例していると考えられる。

考 察

今回の学生実験の製麴は小試験であり醸造の現場の麴とは異なる可能性が大きい。同じ種麴菌、原料白米、製麴方法、温度経過で造った 40 個の麴は麴菌の増殖量と麴菌代謝生産物を解析する上で醸造の現場では得られない貴重な資料である。布川ら²²⁾は全国の清酒製造場から麴を集めて酵素活性を調査しているが、その全国調査の結果と今回の学生実験の麴を比べてみると今回の製麴実験の酵素活性は全国調査よりも低い。変動はほぼ同じであったことは極めて興味深い。醸造の現場での酵素活性の変動は様々な要因に起因するが、今回の学生実験は種麴菌、原料白米、製麴方法、温度経過はすべて同じで、違いは洗米の程度、浸漬吸水率、蒸米吸水率、種麴散布時の吸水率と品温などが考えられることから、今回の大きな変動は学生一人ひとりの性格に起因する種麴散布時の僅かな品温と吸水率の違いが種麴菌の発芽や増殖速度に大きく影響した

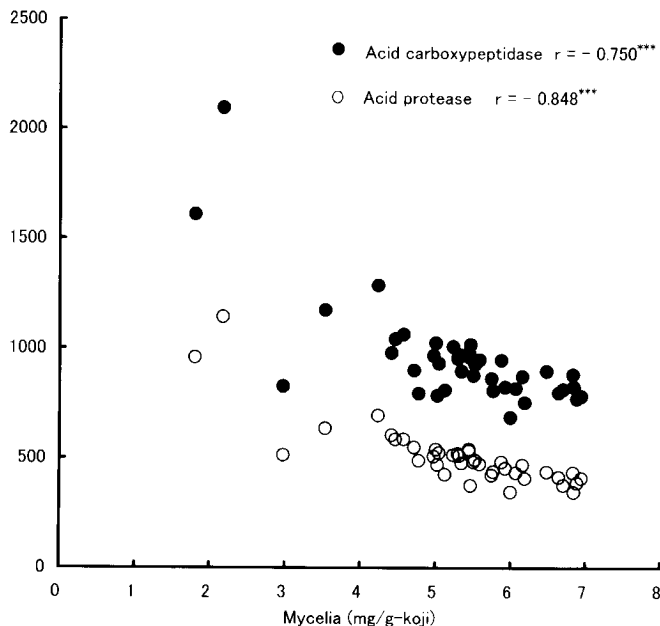


Fig. 3 Correlation between the enzyme activities per mycelia and mycelia

結果と考えられる。

今回、菌体量当たりの酵素活性を比較した結果、 α -アミラーゼ、酸性ホスファターゼ及びフィターゼは菌体量当たりの酵素活性は一定であり麴菌の増殖に比例しているのに対してグルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼは菌体量が少ない麴ほど菌体量当たりの活性が高いという逆の結果が得られた。この理由を麴菌増殖の観点から考察してみる。麴菌は増殖に必要なグルコースやアミノ酸を得るため種々の酵素を生産・分泌する。分泌された酵素により蒸米内部でデンプンやタンパク質の加水分解反応が行われる。蒸米内部の酵素反応は溶液中での酵素反応と異なり酵素の流動性が極端に悪いため酵素反応が行われる部位での水分が大きく反応速度に影響すると考えられる。一般に蒸米は吸水率（白米 100 g 当たりの吸水量(g)）が約 35~36% で麴室に引き込まれるが、製麴中は麴菌の増殖熱を蒸発潜熱として発散させるために減少し、出麴時には約 18% の吸水率に減少する。このように製麴工程中では大きな水分量の変化が見られることから麴菌が水分の多い時期に増殖するか少ない時期に増殖するかの違いが菌体量当たりのグルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性に大きく影響したものと推察される。酵素以外の代謝生産物を比べて見ると菌体量当たりのグルコースと無機リン酸はグルコアミラーゼと同じく、アミノ酸は α -アミラーゼと同じであった。麴中のグルコース、無機リン酸及びアミノ酸は麴菌の増殖に利用された残りと考えられることから解析は難しい。

要 約

1. 40 人の学生が同じ原料米、種麴菌、製麴設備、製麴温度経過で製麴したにもかかわらず、菌体量、酵素活性、グルコース量、無機リン酸量、アミノ酸量に大きな違いが認められた。
2. 麴 1g 当たりの麴菌代謝生産物と菌体量とは全て正の高い相関関係が認められた。
3. 菌体量当たりの酵素活性は、 α -アミラーゼ、酸性ホスファターゼ及びフィターゼは菌体量と相関が認められず麴菌の増殖量と比例しているが、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は、菌体量と負の相関関係が認められ、菌体量

の少ない麴は菌体量当たりの活性が高かった。

参 考 文 献

- 1) 増補改訂清酒製造技術（第 6 版）：（財）日本醸造協会 p 130 (1998)
- 2) 豊沢誠，米崎治男：醸工，**31**, 412 (1953)
- 3) 大場俊輝，来間健次，布川弥太郎：醸協，**59**, 993 (1964)
- 4) 森太郎，渡辺和夫：醸工，**32**, 421 (1954)
- 5) （財）日本醸造協会編，第四回改訂国税庁所定分析法注解，平成 5 年
- 6) 岡部正人，桜田博克，清水弘人，中谷俊多美，三上重明，岩野君夫：醸協，**91**(3), 203-208 (1996)
- 7) 中村道徳：農化，**24**, 1-5 (1950)
- 8) 岩野君夫，天野仁：醸協，**96**(11), 789-795 (2001)
- 9) 奈良原英樹，岩田全且：味噌の科学と技術，**31**(4), 127-133 (1983)
- 10) 奈良原英樹，岩田全且：味噌の科学と技術，**31**(9), 358-363 (1983)
- 11) 岡崎直人，竹内啓修，菅間誠之助：醸協，**74**(10), 683-686 (1979)
- 12) 岡崎直人，福田典雄，菅間誠之助：醸協，**74**(10), 687-691 (1979)
- 13) 麴学：村上英也編著，（財）日本醸造協会 (1986)
- 14) 丸山稜，前田浩，戸塚良晃，櫻田ルミ，遠藤美砂子，山形洋平，阿部敬悦，五味勝也，町田雅之，中島佑：平成 14 年度農芸化学会大会講演要旨集 p 192
- 15) 長嶺一輝，下飯仁，伊藤清：平成 14 年度農芸化学会大会講演要旨集，p. 199 (2002)
- 16) H. Ishida, Y. Hata, E. Ichikawa, A. Kawato, K. Suginami and S. Imayasu : *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 301-307 (1998)
- 17) 五味勝也，Turner G. : 日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 147 (1993)
- 18) 嘉納成三：醸協，**53**(2), 139-144 (1958)
- 19) 森太郎，渡辺和夫：醸工，**36**, 476 (1958)
- 20) 清水弘人，中谷俊多美，岡部正人，三上重明，岩野君夫：醸協，**91**(5), 362-366 (1996)
- 21) 藤谷 健：醸協，**62**(2), 104 (1967)
- 22) 布川弥太郎，椎木敏，岩野君夫，斎藤和夫：醸協，**76**(5), 350-353 (1981)