琉球大学学術リポジトリ

優良泡盛麹菌の検索と製麹条件の検討(生物資源科学科)

メタデータ	言語:
	出版者: 琉球大学農学部
	公開日: 2008-02-14
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 安田, 正昭, 佐藤, 充宏, 坂口, 真樹, 石原, 昌信, 当山, 清善, Yasuda, Masaaki, Sato, Atsuhiro, Sakaguchi, Maki, Ishihara, Masanobu, Toyama, Seizen
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3845

優良泡盛麹菌の検索と製麹条件の検討

安田正昭*・佐藤充宏*・坂口真樹*・石原昌信*・当山清善*

Masaaki YASUDA, Atsuhiro SATO, Maki SAKAGUCHI, Masanobu ISHIHARA and Seizen TOYAMA : Screening of *Aspergillus awamori* and production of kojis with the selected fungi

Summary

Awamori koji prepared by growing *Aspergillus awamori* on steamed rice is a very important material for the production of awamori beverage which is a traditional distilled liquor in Okinawa Prefecture, Japan. In awamori beverage production, the strain which has high amylolytic enzyme activities and acidity is needed.

In this study, production of the amylolytic enzyme activities and acids was investigated with twenty-nine strains in *Aspergillus awamori.* As the results, two strains which had high α-amylase activities, two strains which had high saccharifying abilities, and one strain which produced a high acidity were selected. Microbial characteristics such as states of spore, sizes of colony, disappearances of iodo-starch reaction, colors of mycerial tuft and spore, and assimilation of sodium nitrite varied among the strains of *Aspergillus awamori.*

The highest production of each enzyme activities and acidity was obtained by employing atmospheric non-glutinous rice or by autoclaved broken rice from Thailand.

緒　言

泡盛は黒麹菌（泡盛麹菌）を使用した米麹と水を原料として発酵した一次もろみを単式蒸留器で蒸留した沖縄県の代表的な蒸留酒である。泡盛麹の製麹条件は、製品の品質に直接影響を与えることから古くから重要視されてきた。泡盛麹の伝統的な製麹法は友種麹法によるものであったが、現在では、種麹を使用した自動製麹法に変わり、泡盛の製造規模も大型化されるようになった。しかしながら、消費者ニーズに合わせた製品の多様化が求められ、それに対応する技術開発と、使用目的に合致した麹菌の選択が要請されている。

泡盛麹菌に関する研究は、1901年に乾[3]や宇佐美[16]が泡盛麹から同麹菌を分離したことに始まり、

*琉球大学農学部生物資源科学科

琉球大学農学部学術報告　38：255～262（1991）

1936年に中沢ら[7]も同様に泡盛麹から種々の黒麹菌を分離し、微生物学的性質を明らかにした。1950年に坂口ら[9]は泡盛麹菌を含む黒麹菌について形態的及び生理的諸性質を検討し、その分類学的位置を確立した。一方、著者の一人当山[13,14]は1966年に沖縄県下泡盛酒造所の友種麹より泡盛麹菌を分離し、各種酵素活性の面からグループ分けを行い、分離菌株の生産する酵素の基礎的性質を明らかにするとともに、小型製麹装置を用いた麹の製造法についても報告した[15]。管間ら[10]（1975）や照屋[11]（1976）も沖縄県内の泡盛麹から泡盛麹菌を分離した。

本研究においては、泡盛の収量増大や多様化傾向に合致した菌株を選択するために酵素活性（α－アミラーゼ、グルコアミラーゼの作用による糖化力）及び生酸力の高い泡盛麹菌を広く検索・選抜し、優良泡盛麹菌の微生物学的性質及び麹製造条件の検討を行ったので報告する。

実験方法

1．供試泡盛麹菌

供試泡盛麹菌株は、琉球大学農学部における保存菌株（25菌株）と沖縄県工業試験場における保存菌株（現在泡盛製造工場で実際に使用されている実用泡盛麹菌4菌株（2119、2149、2321、2366））の合計29菌株である（Table 1）。

Table 1. Strains of *Aspergillus awamori* and *Aspergillus saitoi*, used in this experiments.

Strain No.	*Awamori* Fungi		Strain No.	*Awamori* Fungi	
2119	*Aspergillus awamori* type		3144	*Aspergillus awamori* NAKAZAWA	IFO 4314
2149	*Aspergillus awamori* type		3145	*Aspergillus awamori* var. fumeus NAKAZAWA	IFO 4122
2321	*Aspergillus saitoi* type		3146	*Aspergillus awamori* var. fumeus NAKAZAWA	IFO 5708
2366	*Aspergillus saitoi* type		3147	*Aspergillus awamori* var. fuscus NAKAZAWA	IFO 4119
3130	*Aspergillus awamori*	ICR 3306	B-101	*Aspergillus awamori* sp.	
3134	*Aspergillus awamori*	IAM 2112	E-108	*Aspergillus awamori* sp.	
3135	*Aspergillus awamori* var. ferruginensis	IAM 2391	E-109	*Aspergillus awamori* sp.	
3136	*Aspergillus awamori* var. fumeus	IAM 2101	F-110	*Aspergillus awamori* sp.	
3137	*Aspergillus awamori* var. fuscus	IAM 2088	F-113	*Aspergillus awamori* sp.	
3140	*Aspergillus awamori* var. (Toyama)		G-120	*Aspergillus awamori* sp.	
3140-A	*Aspergillus awamori* var.		G-121	*Aspergillus awamori* sp.	
3140-B	*Aspergillus awamori* var.		G-122	*Aspergillus awamori* sp.	
3140-11	*Aspergillus awamori* var.		G-123	*Aspergillus awamori* sp.	
3140-12	*Aspergillus awamori* var.		G-124	*Aspergillus awamori* sp.	
3142	*Aspergillus awamori* NAKAZAWA	IFO 4033			

2．泡盛麹菌の製麹

泡盛麹菌の培養は照屋ら[12]の方法を参考にして行った。タイ国産砕米45ｇを500mℓ三角フラスコにとり、水15mℓを加え、室温で2時間吸水させた後、120℃で20分間加圧蒸煮した。放冷後の蒸煮米に各供試菌株の1白金耳を1mℓの滅菌水に懸濁させたものを植菌し、36℃で40時間製麹を行い、出麹とした。

3．分　　析

麹の酸度、α－アミラーゼ活性、糖化力の測定は国税庁所定分析法[6]に準じ、水分の測定は赤外線水分計（㈱ケット化学研究所製、Ｆ－１型）により行った。なお、糖化力の測定は、反応液中でグルコアミラーゼの作用により生成したグルコース量をグルコースオキシダーゼによる酵素法（ダイヤカラー・ＧＣ、㈱東洋紡社製）で定量することにより行った。グルコアミラーゼ活性は、著者ら[18]の方法に準じ、酵素反応で生成したグルコース量をグルコースオキシダーゼ法により定量することにより求めた。

4．泡盛麹菌の微生物学的性質

(1) 泡盛麹菌の巨大コロニー

泡盛麹菌の巨大コロニーの生育状態を観察するための培地はCzapek培地を用いた。培地組成は次の通りである。K_2HPO_4　1g、KCl　0.5g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　0.5g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$　0.01g、$NaNO_3$　2g、蔗糖　30g、水　1000mℓ、寒天　30g（pH5.0）。この培地に泡盛麹菌を植菌後、34℃で4日間培養し、コロニーの直径を測定し、菌の繁殖状況を観察した。

(2) ヨウ素ーデンプン反応

秋山ら[1]の方法に従い、Czapek培地に1％のデンプンを加えた寒天培地にて供試菌株を34℃で4日間培養し、N/100ヨウ素液を滴下したのち、コロニー周辺のヨウ素ーデンプン反応の消失幅（mm）を測定した。

(3) 亜硝酸の同化性

坂口ら[8]の方法に従い、Czapek培地の窒素源中、硝酸ナトリウムを亜硝酸ナトリウムに代えた培地にて供試菌株を34℃で7日間培養し、培養3日めと7日めにおける菌の繁殖程度をそれぞれ観察した。

(4) 菌そう色

常法通り、ポテトーグルコース培地（pH6.5）の斜面培地にて供試菌株を34℃で40時間培養し、Munsell soil color charts (1954) により菌そうの色をそれぞれ観察した。

実験結果及び考察

1．優良泡盛麹菌の選抜

泡盛製造における理想的な麹の条件として、発酵過程中におけるもろみの雑菌による汚染防止のために充分な酸度を保ち、アミラーゼ活性の高いことが重要である。そこで、優良泡盛麹菌を選抜するために、各種の泡盛麹菌によりタイ国産砕米を原料として製麹を行い、麹のpH、酸度、水分率、α－アミラーゼ及び糖化力を調べ、その結果をTable 2に示した。

麹のpHは3.05～4.23の範囲内にあった。麹の酸度は6.24～0.94の範囲内にあり、生酸力の高い菌株は3145、3136、E－108、3142、2321、E－109の順であり、いずれも3.5以上の酸度を示した。酸度が3.0以上の値を示す菌株数は供試菌株（29菌株）中9菌株で全体の31％を占めていた。なお、2321菌は、現在泡盛製造に使用されている菌株である。麹の水分率は、32.0～39.0％の範囲内にあり、35％前後の値を示すものが多かった。

α－アミラーゼ活性は7.4～62の範囲内にあり、高い活性を有する菌株は3142、3134、3140－B、3140－12、3140、3137の順であり、これらの菌株は供試実用泡盛麹菌のそれに比べて高い値を示した。なお、酵素活性が30以上の値を示す菌株数は9菌株で、全供試菌株に占める割合は31％であった。糖化力は通常のグルコアミラーゼ活性の測定に比べて酵素量を多く、しかも反応時間を長くした時にデンプンから生成するグルコース量を定量し、その生成率を表したものである。糖化力の高い菌株は2321、G－122、3142、2119、2366、G－120の順であり、2321菌（実用泡盛麹菌）のそれは最も高い値を示した。一方、G－122や3142菌も2321菌に匹敵する程の高い値を示すことがわかった。なお、糖化力が10％以上の値を示す菌株数は12菌株で、全供試菌株に占める割合は41％であった。

以上の実験結果から、①α－アミラーゼ活性の高い菌株（3142、3140－B）、②糖化力の高い菌株（2321、G－122）、③生酸力の高い菌株（3145）の5菌株を選定した。なお、これらの結果に基づき、選抜菌株の生酸力、α－アミラーゼ活性、糖化力等をまとめ、Table 3に示した。

Table 2. Distribution of pH, acidity, moisture, α-amylase, saccharifying ability of kojis in various *Aspergillus awamori* fungi.

Strain No.	pH	Acidity (mℓ)	Moisture (%)	α-Amylase (D_{30}^{40})	Saccharifying ability (%)
2119	3.58	2.62	35.0	21.9	16.3
2149	3.58	2.80	37.2	26.8	11.2
2321	3.30	3.57	37.6	23.1	22.5
2366	3.33	3.07	37.4	20.9	15.8
3130	4.05	1.24	32.0	18.7	3.1
3134	3.85	2.18	37.6	52.2	10.9
3135	3.36	3.28	35.8	10.6	3.5
3136	3.13	4.96	34.4	38.2	10.4
3137	4.07	1.67	35.4	44.0	14.5
3140	3.89	2.80	38.4	47.5	7.5
3140-A	3.95	1.68	32.4	32.9	4.8
3140-B	3.11	2.88	37.2	51.1	13.4
3140-11	3.81	2.83	36.2	33.0	8.7
3140-12	4.12	1.10	36.8	47.9	8.9
3142	3.47	3.58	34.0	62.0	16.5
3144	4.21	2.30	38.0	14.1	6.8
3145	3.05	6.24	36.0	12.8	4.2
3146	3.85	1.62	36.0	11.8	2.7
3147	3.45	3.40	37.2	27.4	8.2
B-101	3.99	1.12	35.2	9.5	3.4
E-108	3.28	3.80	33.0	10.1	4.4
E-109	3.78	3.55	37.8	7.4	9.4
F-110	3.53	2.32	35.8	24.1	6.2
F-113	3.46	2.30	35.2	9.6	1.4
G-120	3.39	2.98	36.6	12.2	14.6
G-121	4.23	0.94	33.8	15.2	1.3
G-122	3.64	2.18	39.0	18.3	19.5
G-123	3.58	2.32	38.6	9.9	11.5
G-124	3.89	1.33	34.2	9.1	8.3

Table 3. Distribution of pH, acidity, moisture, α-amylase, saccharifying ability of the kojis from selected strains.

Strain No.	pH	Acidity (mℓ)	Moisture (%)	α-Amylase (D_{30}^{40})	Saccharifying ability (%)
2321	3.30	3.57	37.6	23.1	22.5
3140-B	3.11	2.88	37.2	51.1	13.4
3142	3.47	3.58	34.0	62.0	16.5
3145	3.05	6.24	36.0	12.8	4.2
G-122	3.64	2.18	39.0	18.3	19.5

2．選抜泡盛麹菌の微生物学的性質

選抜菌株をシャーレによる寒天固体培養を行い、培養上の特徴を観察し、その結果をTable 4に示した。

Table 4. Microbiological properties of selected strains of *Aspergillus awamori*.

Strain No.	Giant colony				Color* of mycerial tuft	Assimilate nitrite
	conidial insertion	color*	diameter (mm)**	Iodine-starch reaction (mm)		
2321	rough	olive (4/3)	25	7	very dark grayish brown (3/2)	−
3140-B	fine	olive (4/3)	19	8	dark reddish brown (3/3)	−
3142	fine	olive (4/3)	20	7	reddish brown (4/3)	+
3145	rough	dark olive gray (3/2)	18	5	very dark brown (2/2)	+
G-122	fine	olive gray (5/2)	22	4.5	dark reddish brown (3/3)	−

*Color was judged by Munsell Soil Color Charts (1954).
*After 4 days incubation, the diameter of each giant colony was measured.

2321菌は生酸力が比較的良好であり、糖化力は最も高い値を示した。巨大コロニーの色調は黄緑色を呈し、その直径の大きさは最も高い値を示した。ヨウ素デンプン反応の消失幅の大きさは高い値を示した。菌そうの色調は極暗灰茶色を呈した。本菌の生育に亜硝酸は同化し得なかった。

3140－B菌はα－アミラーゼ活性が高く、それに対応してヨウ素－デンプン反応の消失幅の大きさも高い値を示した。巨大コロニーの色調は黄緑色を、菌そうの色調は暗赤褐色を呈した。本菌の生育に亜硝酸は同化し得なかった。

3142菌は生酸力、α－アミラーゼ活性や糖化力ともに最もバランスのとれた菌株であった。本菌のヨウ素－デンプン反応の消失幅の大きさは2321菌の場合と同様であった。巨大コロニーの色調は黄緑色を、菌そうの色調は赤褐色を呈した。本菌の生育に亜硝酸を同化した。

3145菌は生酸力の最も高い菌株であるが、α－アミラーゼ活性や糖化力は低い値を示した。ヨウ素－デンプン反応の消失幅の大きさはα－アミラーゼ活性に対応して低い値を示した。巨大コロニーの色調は暗黄緑灰色を、菌そうの色調は極暗褐色を呈した。本菌の生育に亜硝酸を同化した。

G－122菌は生酸力は低く、α－アミラーゼ活性も低いが糖化力が最も高い菌株である。ヨウ素－デンプン反応の消失幅の大きさはα－アミラーゼ活性に対応して低い値を示した。巨大コロニーの色調は黄緑色を、菌そうの色調は暗赤褐色を呈した。本菌の生育に亜硝酸は同化し得なかった。

選抜菌株5菌株の中で、亜硝酸同化性を有する菌株はタイプカルチャーの3142菌（*Aspergillus awamori* NAKAZAWA IFO 4033）と3145菌（*Aspergillus awamori* var. fumeus NAKAZAWA IFO 4122）であり、選抜された他の保存菌株に亜硝酸同化性を有するものは認められなかった。照屋[11]は1977年に、沖縄県下の泡盛酒造所から黒麹菌195菌株を分離し、分離菌株の微生物学的性質を調べたところ、亜硝酸同化性を有する菌株は全く存在しなかったと報告している。当山ら[13]は1966年に沖縄、八重山、宮古各島所在の泡盛製造場で使用している友種麹あるいは麹より97株の黒麹菌を分離し、胞子の形態及び色調等により*Asp. awamori*タイプ95株、*Asp. niger*タイプ2株に分類し、前者はデンプン及びタンパク質分解力により4つのグループに分類されたと報告している。

3．酵素活性及び生酸力の高い麹製造法の検討

酵素活性の高い麹を得るための手法が種々検討され、黄麹菌や黒麹菌の酵素活性の増大を図るために森本ら[4,5]は原料米の精白度や製麹中の水分含量を検討し、Ichishimaら[2]は窒素化合物を添加する方法

を考案した。著者らは化学成分を添加せずに、原料米の種類や蒸煮法による酵素活性及び生酸力の高い泡盛麹の製造方法を検討した。

原料米にタイ国産砕米、ウルチ米、モチ米を用いて常圧蒸煮法（原料米を浸漬、水切り後1時間蒸し器で蒸す方法）あるいは加圧蒸煮方法（120℃、20分間オートクレーブにて処理する方法）により蒸米を調製し、選抜5菌株のうち、酵素活性及び生酸力でバランスのとれた3142菌株を接種して製麹を行った。これらの出麹の酵素活性及び生酸力の比較を行った結果をTable 5に示した。酵素活性はタイ国産

Table 5. Effect of steaming methods and varieties of rice on the production of enzymes and acidity of *awamori*-koji with the strain No. 3142.

	Relative activity (%)					
	Steaming under atmospheric pressure			Steaming under pressure		
	A	B	C	A	B	C
α-Amylase	100	271	121	214	261	46
Glucoamylase	100	238	111	220	369	31
Saccharifying ability	100	245	111	220	241	30
Acidity	100	271	139	255	265	38

A: Non-glutinous rice, B: Broken rice from Thailand, C: Glutinous rice

砕米を常圧蒸煮して製麹した麹の酵素活性に対する相対値で表した。また、生酸力も同様に相対値で示した。常圧蒸煮を行った区における麹中酵素活性及び生酸力は、ウルチ米、モチ米、タイ国産砕米の順に高い値を示した。ウルチ米で製麹した麹のα－アミラーゼ、グルコアミラーゼ活性、糖化力及び生酸力はタイ国産砕米に比べて3倍前後の高い値を示した。加圧蒸煮を行った区における麹中酵素活性及び生酸力はウルチ米、タイ国産砕米、モチ米の順で高い値を示した。タイ国産砕米の麹の酵素活性及び生酸力は加圧蒸煮を行うことにより常圧蒸煮法によるそれに比べてそれぞれ2倍以上もの高い値を示したが、ウルチ米ではほぼ同程度の値を、モチ米ではむしろ低い値を示した。タイ国産砕米を加圧蒸煮して得た麹の酵素活性及び生酸性はウルチ米のそれとほぼ同様の値を示すことがわかった。なお、モチ米を加圧蒸煮するといわゆる団子状になり、菌の生育が悪く良好な麹が得られなかった。なお、これらの現象は、紅麹菌（*Monascus*属カビ）の製麹[17]においてもほぼ同様のことが観察された。以上のことから、原料米の種類あるいは蒸煮法を適宜選択することにより酵素活性及び生酸力の高い麹の得られることが判明した。今後、選抜菌株におけるα－アミラーゼやグルコアミラーゼの酵素化学的諸特性を明らかにするとともに、選抜菌株を用いた泡盛の試験醸造を行う予定である。

要　約

（1）泡盛麹菌の選抜

優良泡盛麹菌を検索するためにアミラーゼ活性と生酸力を指標として琉球大学農学部における保存菌株（25菌株）と沖縄県工業試験場における保存菌株（4菌株）の合計29菌株について比較検討を行った。その結果、α－アミラーゼ活性の高い菌株（2株）、糖化力の高い菌株（2株）、生酸性の高い菌株（1株）の合計5菌株を選定した。

（2）選抜菌株の微生物学的性質

選抜5菌株の微生物学的性質を調べた。その結果、選抜菌株間では、胞子の着生状態、コロニーの大きさ、ヨウ素－デンプン反応の消失幅の大きさ、菌そうの色調、亜硝酸同化性などにそれぞれ差異のあ

ることがわかった。

（3）酵素活性及び生酸力の高い麹製造法の検討

酵素活性及び生酸力でバランスのとれた3142菌を用いて麹の酵素活性及び生酸力に及ぼす原料米の種類と蒸煮方法の検討を行った。その結果、常圧蒸煮方法ではウルチ米を、加圧蒸煮法ではタイ国産砕米を使用することが適切であることがわかった。

本研究を遂行するにあたり、泡盛麹菌の保存菌株をご恵与くださいました沖縄県工業試験場、食品室長照屋比呂子氏に感謝致します。また、研究費の一部は沖縄県産業振興基金によるものであり、同基金に対して厚く御礼を申し上げます。

文　献

1）秋山裕一、長沢稔、村上英也　1961　種麹の新検査法、醸協誌、56：723～728.

2）E. Ichishima and F. Yoshida　1962　Studies on the Proteolytic Enzyme of Black *Aspergilli*. Part VIII. Effect of Inorganic Nitrogen Compounds for the Production of Acid Protease by Kuro-Koji Mold Group in Solid Cultivation, Agric. Biol. Chem., 26：547～553.

3）乾　環　1901　泡盛醸造に関与する微生物の研究、東京大学紀要（理科）、15：465～476.

4）森本輝彦、三吉和重、照井堯造　1960　米麹におけるProtease組成の変化、発酵工学、38：422～431.

5）森本輝彦、照井堯造　1961　米麹における代謝過程（第4報）水分と水解酵素生産、発酵工学、39：200～203.

6）村上英也監修、注解編集委員会編　1984　第3回改正国税庁所定分析法注解、(財)日本醸造協会、東京)、P.210.

7）中澤亮治、霜三雄、渡邊寛　1936　泡盛発酵菌の研究（第1報）アスペルギルス属について、農化、12：931～974.

8）坂口謹一郎、王寅章　1934　菌類による亜硝酸塩の同化について（第1報）亜硝酸塩を窒素給源とせる糸状菌の一新培養基、農化、10：459～476.

9）坂口謹一郎、飯塚廣、山崎千二　1950　黒麹菌に関する研究（総括）農化、24：138～142.

10）管間誠之助、西谷尚道、大場俊輝、河内邦英、照屋比呂子、原昌道、村上英也　1975　泡盛麹菌に関する調査　黒麹菌の分布とその性質、醸協誌、70：595～598.

11）照屋比呂子　1976　泡盛酒造所から分離した黒麹菌について　その培養特徴と二、三の生理的性質、沖縄県工試業務報告、4：25～31.

12）照屋比呂子、我如古正昭、宮城勝治　1978　泡盛麹の製麹条件に関する試験、沖縄県工試業務報告、6：56～65.

13）当山清善、宮里興信　1966　泡盛麹菌に関する研究（第1報）澱粉及び蛋白質分解力からみた泡盛麹菌について、琉球大学農学報、13：118～126.

14）S. Toyama and K. Miyazato 1967 Studies on *Aspergillus awamori* II. On Some Properties of Amylase and Protease of A. *awamori* Isolated from Awamori Breweries, Sci. Coll. Agr. Univ. Ryukyus, 14：161～166.

15）当山清善、宮里興信、安田正昭、仲唐英之　1974　泡盛麹菌による麹の製造と酵素力及び酸度について、琉球大学農学報、21：109～122.

16）宇佐美桂一郎　1901　泡盛酒醸造研究報告、工化、4：1437～1461.

17）安田正昭、宮里興信、上地玄作　1983　豆腐よう製造に用いる紅麹の製造、日食工誌、30：63～67.

18) M. Yasuda, M. Kuwae and H. Matsushita 1989 Purification and Properties of Two Forms of Glucoamylase from *Monascus* sp. No. 3403., Agric. Biol. Chem., 53 : 247～249.