琉球大学学術リポジトリ

豆腐[ヨウ]原料用黄麹の製造について(農芸化学科)

メタデータ	言語: Japanese 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, 上地, 玄作, 宮里, 興信, Yasuda, Masaaki, Uechi, Gensaku, Miyazato, Koshin メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4054

豆腐餻原料用黄麹の製造について †+

安田正昭*・上地玄作*・宮里興信*

Masaaki YASUDA, Gensaku UECHI and Koshin MIYAZATO: On the Production of Koji with *Aspergillus oryzae* for TOFUYO Manufacturing

I 緒 言

黄麹菌（*Aspergillus oryzae*）を蒸米に生育させた米麹は清酒や味噌製造における酵素剤として広く利用されている。この米麹は"豆腐餻"の製造原料としても使用されている。豆腐餻は，乾燥処理豆腐を漬汁（紅麹，黄麹，食塩および泡盛とよく混合し磨砕したもの）に漬込んで熟成させた豆腐の発酵食品である[11]。従来，*Aspergillus oryzae* の米麹の製造法に関しては清酒や味噌などで確立されている[3,7]ものの，豆腐餻製造に適した麹の製造法に関する知見は極めて少ない。豆腐餻製造に適した米麹としては，タンパク質分解酵素，デンプン質分解酵素，核酸分解酵素などの酵素活性を有し，これらの酵素はアルコールに対する安定性が高く，熟成期間を通して或る程度の酵素活性を維持することが望ましく，また生酸性が低く美味で芳醇な豆腐餻を醸成させ得る麹であることが望ましい。

本報においては，豆腐餻製造に使用される黄麹の製造法を確立するために製麹過程における麹の品温経過，生酸性ならびに各種酵素活性の動向について調べるとともに，豆腐餻製造用麹に適した原料米，蒸米の調製法について検討を行なったので報告する。

II 実験方法

1. 使用菌株と種麹の調製

供試麹菌として*Aspergillus oryzae* №3100菌を使用した。種麹調製に使用したウルチ米（50 g）は室温で18時間浸漬し，水切後大型シャーレに採り1時間蒸煮殺菌した。蒸煮米に供試菌株を無菌的に接種し32℃，6日間培養して充分に胞子を着生させ，乾燥した麹を低温保存（4℃）したものを種麹として用いた。

2. 麹蓋による製麹

黄麹の製造は麹蓋（縦35×横55×高さ4.5cm）を用いて32℃の恒温器（内寸法幅59×奥49×高さ49cm）内で行なった。この方法で原料米4kgまで製麹することができる。供試原料米はウルチ米（2kg）で水

†沖縄における豆腐餻の製造に関する研究（第4報）

+本論文の要旨は日本食品工業学会第28回大会（昭和56年4月福岡市）で発表した。

*琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 28：111～118（1981）

洗浄後18時間水に浸漬した。水切後1時間蒸煮殺菌を行なった。無菌的に放冷された蒸米（34～37℃）は麹蓋に入れ，種麹20gを接種混和したのち所定温度で製麹を行なった。種菌接種後20時間目に品温の上昇がみられたので切り返しを行なった。製麹過程中，経時的に麹を採取し分析に供した。

3. 麹抽出液

麹抽出液の調製は次のように行なった。麹20gに0.01*M*酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）100ml を加えて室温（25℃）で60分間時々振とうして抽出を行ない，抽出後の沪液又は遠心分離後の上清液を麹抽出液として分析に供した。なお，pHおよび酸度の測定には緩衝液の代りにイオン交換水を用いた。

4. pHおよび酸度

上記抽出液のpHをpHメーター（ベックマン社製，SS－2型）で測定した。酸度は抽出液10mlを中和するに要する0.1 N－NaOHのml数で表わした。

5. 酵素活性の測定

供試麹中の各種酵素活性の測定は当山ら[9]が泡盛麹の酵素力を調べた方法を参考にして行なった。

(1) α－アミラーゼ活性の測定法：　麹抽出液のα－アミラーゼ活性は山田[10]の方法に準じて行なった。酵素反応混液の組成は0.16％可溶性デンプン1.0ml，0.1 *M*酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）1.0mlおよび酵素液1.0mlで酵素反応は37℃，10分間行なった。反応混液に沃素－塩酸混液5.0mlを加えて反応を停止させるとともに沃素呈色を行ない720nmにおける吸光度を測定した。酵素1単位は上記条件下で沃素呈色度を10％低下させる酵素量として定義した。

(2) 糖化型アミラーゼ活性の測定法：　酵素反応混液の組成は，1％可溶性デンプン3.0ml，0.1 *M* 酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）1.0ml，酵素液1.0mlで，37℃，10分間酵素反応を行ない生成した還元糖をSomogyi－Nelson法[6,8]により比色定量し，D－グルコースとして計算した。酵素1単位は上記条件下で1 μmole のD－グルコースを生成する酵素量として定義した。

(3) 酸性プロテアーゼ活性の測定法：　麹抽出液の酸性プロテアーゼ活性はIchishimaら[2]の方法を参考にして行なった。酵素反応混液の組成は，2％カゼイン溶液（Hammarsten，pH 2.8）1.0ml，0.1 *M* 塩酸－クエン酸ナトリウム緩衝液pH 2.8で，37℃，10分間酵素反応を行ない0.4 *M*三塩化酢酸2.0ml を加えて反応を停止させた。酸素反応後，三塩化酢酸可溶物をFolin試薬によって呈色させチロシン量で表わした。酵素単位は上記条件下で反応1分間に1 μmole のチロシンを生成する酵素量として定義した。

Ⅲ　実験結果及び考察

1. 製麹過程における麹の品温，水分，酸度およびpHについて

黄麹の製麹過程における品温，水分，酸度およびpHの動向について調べた結果をFig. 1に示した。種菌接種後約20時間目で品温が38℃に上昇した。そこで品温調節のため，手入れを行ない以後の品温を34℃前後に保持したところ，32時間以後の品温（34℃）は一定になった。麹中の水分含量は時間の経過とともに減少するが，酵素の生成時期である製麹14時間目から50時間目にかけての水分含量は30％前後であった。これは森本ら[5]が指摘しているように製麹中の望ましい水分含量（30－35％）に近い値を示していた。本麹のpHは6.8付近で36時間目以降一定になった。

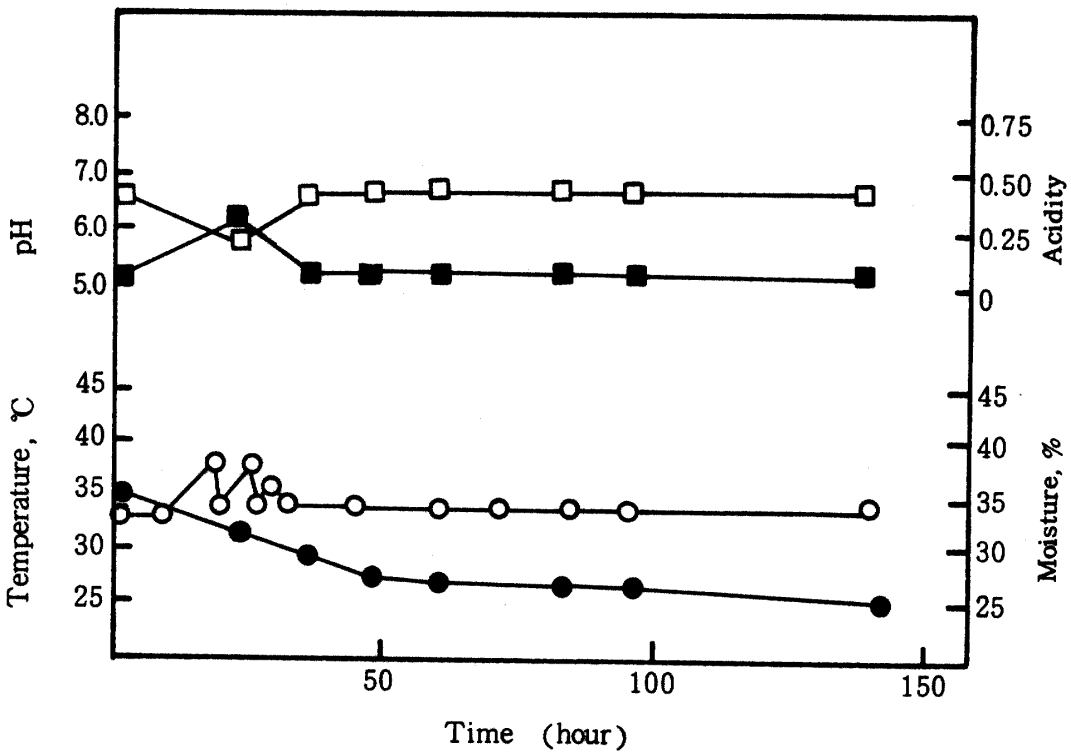

Fig. 1. Changes in Temperature, Moisture, pH and Acidity of Koji during the Production of Ki-Koji

Cultivation was carried out for the time indicated. Steamed rice (2,000 g of non-glutinous which prepared from the method of general steaming) was inoculated with seed koji of *Aspergillus oryzae* No. 3100, and cultured in the incubation box (32 ℃). Koji samples for analysis were taken in the course of the cultivation.

—○—; Temperature, —●—; Moisture, —□—; pH, —■—; Acidity

2. 製麹過程における麹の酵素活性

黄麹の製麹過程におけるα－アミラーゼ，糖化型アミラーゼ（以下S－アミラーゼと称す），プロテアーゼ活性の動向について調べた結果をFig. 2に示した。麹中の各種酵素活性は，種菌接種後18時間目より50時間目にかけて急激に増大することが観察された。一方，最大の酵素活性が得られる時期はプロテアーゼでは製麹40時間目から64時間目，α－アミラーゼでは76時間目，S－アミラーゼでは50時間目であった。これらの三つの酵素はさらに150時間まで培養を続けてもほぼ同程度の酵素活性が維持されるが，胞子の着生が著しく，麹が緑色に着色してくるので豆腐餻製造には不適当であった。従って製麹76時間目付近で出麹とすることが最適であることが明らかになった。

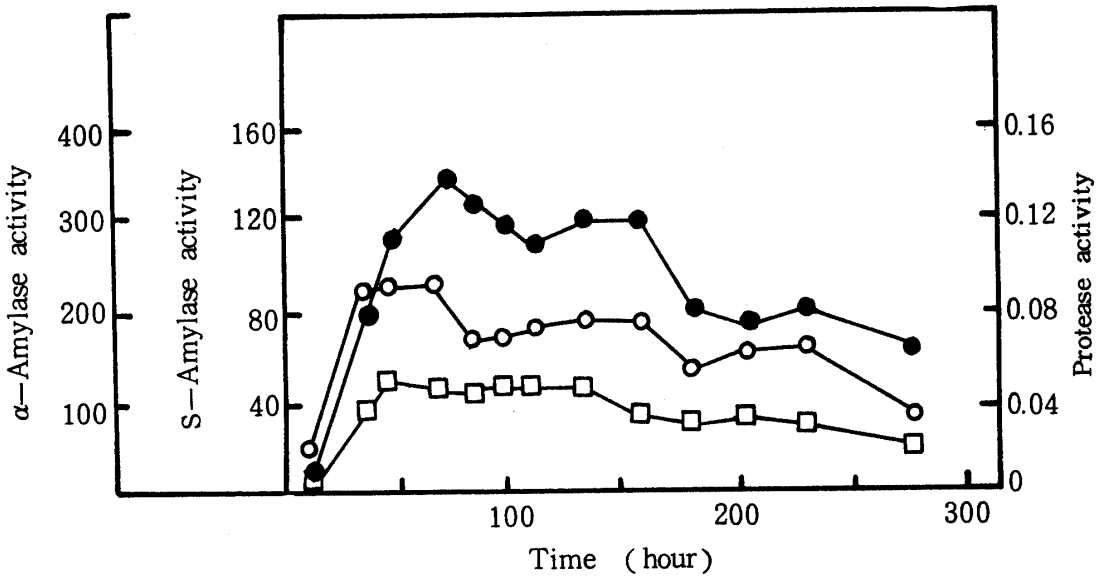

Fig. 2. Time Course of Formation of α—, and Saccharifying Amylases and Protease during the Production of Koji

Koji used for the enzyme assay was produced as shown in Fig. 1. Koji (20 g) was immersed into 5 volumes (w/v) of 0.01*M* acetate buffer (pH4.5). After standing at room temperature (25 ℃) for an hour, the crude enzymes were obtained by filtlation and centrifugation. —●—; α—Amylase, —□—; Saccharifying amylase, —○—; Protease

3. 原料米の種類と蒸煮法の検討

良い豆腐餻を製造するためには酵素活性の高い麹を得ることが重要である。麹中の酵素活性の増大をはかるために森本ら[4,5]は原料米の精白度や製麹中の水分含量について検討し，Ichishima ら[1]は化学成分を添加する方法を考案したが，この方法を豆腐餻原料用麹の製造に適用するには食品衛生の立場から問題がある。筆者らは化学成分の添加によらずに原料米の種類や蒸煮法を検討することにより酵素活性の高い麹を製造することを試みた。

原料米にウルチ米，モチ米，タイ国産砕米（泡盛麹製造用原料米）を用いて，普通蒸煮法（原料米を浸漬，水切後1時間蒸器で蒸す方法）あるいは加在蒸煮法（121 ℃，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て製麹を行なった。出麹における麹中の酵素活性の比較を行なった結果をTabl I に示した。各麹の酵素活性はウルチ米を普通蒸煮して製麹した麹の酵素活性を100とした時の相対活性として表わした。普通蒸煮を行なった系においては，モチ米で製造した麹中の酵素活性がウルチ米のそれに比べて増大することがわかった。特にモチ米による麹中のプロテアーゼ活性はウルチ米によるそれに比べて2倍も増大することが明らかになった。従って，普通蒸煮法により麹を製造する場合にはウルチ米よりもモチ米を使用することが適当である。一方，加圧蒸煮を行なった系においてはウルチ米で製造した麹中の酵素活性がタイ国産砕米やモチ米に比べて高いことが判明した。従って，加圧蒸煮法により製麹する場合には原料米としてウルチ米を使用することが適当である。

Table I. Effect of Kinds of Rice and the Methods of Steaming on the Production of Koji-Enzymes

	Relative activity (%)					
	General steaming			Steaming under pressure		
	I[a]	II[b]	III[c]	I[a]	II[b]	III[c]
α－Amylase	100	100	117	533	463	104
S－Amylase	100	104	139	308	319	95
Protease	100	132	229	346	292	150

[a] I： Non-glutinous, [b] II： Crashed rice of Thailand,
[c] III： Glutinous rice

次に，原料米の種類ごとに蒸煮方法を変えて蒸米を調製して製麹した麹中の酵素活性を比較した（Table I）。加圧蒸煮法により調製した蒸米で得られた麹中の酵素活性が著しく増大する傾向が見られ，特にウルチ米を加圧蒸煮して製麹した麹においては普通蒸煮法による場合に比べてα－アミラーゼ活性が5倍，S－アミラーゼ，プロテアーゼ活性がともに3倍に増大することが明らかになった。麹中のプロテアーゼ活性は無機窒素化合物を添加することにより60％増大することが報告されている[1]が，筆者らは蒸米調製のための蒸煮方法を変えることにより同酵素活性が約3.5倍に増大することを見出した。タイ国産砕米においてもウルチ米の場合とほぼ同様の傾向が見られた。しかし，モチ米においては加圧蒸煮による効果が期待できず，α－アミラーゼ，S－アミラーゼおよびプロテアーゼ活性はむしろ減少することがわかった。以上の実験結果から，豆腐餻製造用黄麹の製麹にあたっては原料米にウルチ米を用いて加圧蒸煮法で蒸米を調製することが望ましいことが明らかになった。

4. 豆腐餻原料用黄麹の酵素的性質

豆腐餻原料用黄麹中，酵素の基礎的性質をTable IIにまとめた。

Table II. Properties of Koji-Enzymes

	α－Amylase	S－Amylase	Protease
Optimum pH	5.0	4.0－5.0	3.0
pH Stability	5.0－9.0	6.0－8.0	3.0－5.0
Optimum temperature (℃)	40	55	45
Thermal stability (℃)	30	30	45

表から明らかなようにα－アミラーゼ，S－アミラーゼの最適pHはそれぞれ5.0，4.0－5.0にあり，よく似た値を示している。プロテアーゼの最適pHは3.0付近にあり，典型的な酸性プロテアーゼである。α－アミラーゼ，S－アミラーゼおよびプロテアーゼの最適温度はそれぞれ40℃，55℃，45℃にあった。

沖縄において豆腐餻を製造する際には漬汁中に食塩とともに泡盛が加えられている。そこで，豆腐餻製造過程における漬汁中の酵素活性の挙動を明らかにするために，酵素活性におよぼす食塩濃度とエチルアルコール濃度の影響についてそれぞれ調べた。その結果をFig. 3およびFig. 4に示した。

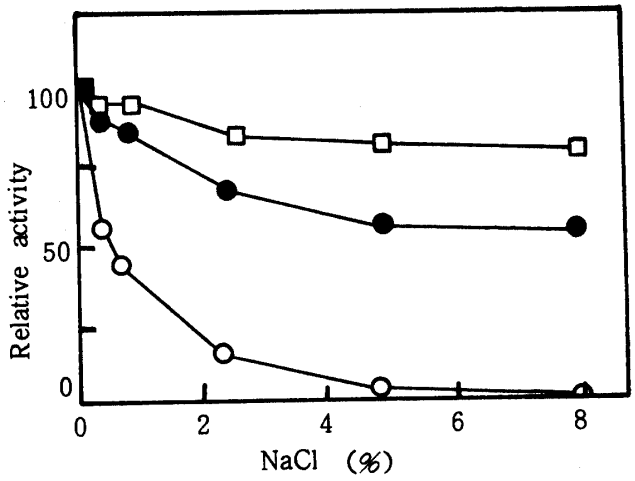

Fig. 3

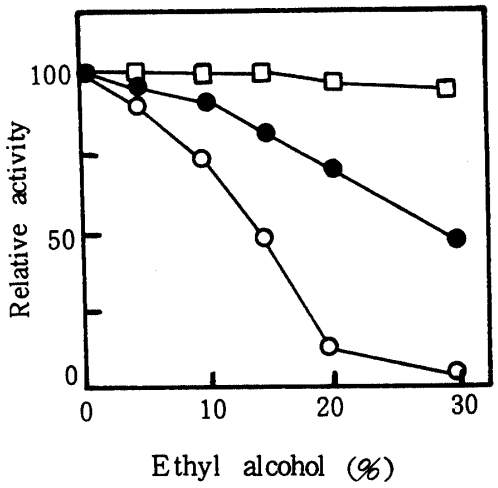

Fig. 4

Fig. 3. Effect of NaCl on Activities of the Enzymes
Each enzyme activities were assayed at various concentratin of NaCl.
—●—; α—Amylase, —□—; Saccharifying amylase, —○—; Protease

Fig. 4. Effect of Ethyl Alcohol on Activities of the Enzymes
Each enzyme activities were assayed at various concentration of ethyl alcohol.
—●—; α—Amylase, —□—; Saccharifying amylase, —○—; Protease

まず耐塩性について調べたところ，α—アミラーゼは食塩濃度0.5％ではほとんど失活を受けず，また8％においても約50％の相対活性を有していた。S—アミラーゼは食塩濃度1％以下ではほとんど失活を受けず，また8％でも約80％の相対活性を有しており耐塩性が極めて秀れていた。一方，プロテアーゼは酵素反応液中の食塩により著しく影響を受け，食塩濃度1％でも相対活性は50％以下であった。（Fig. 3）。次にアルコールに対する安定性について調べたところ，α—アミラーゼはアルコール濃度10％以下ではほとんど影響を受けず，30％でも約50％の相対活性を示した。S—アミラーゼはアルコール濃度が30％になるまでほとんど影響を受けず，従ってアルコールに対する安定性が特に秀れていることが判明した。一方，プロテアーゼは酵素反応液中のアルコールにより著しく影響を受け，アルコール濃度20％でも10％以下の相対活性を示すに留まった（Fig. 4）。以上の結果から，供試麹中のS—アミラーゼは耐塩性および耐アルコール性であり，豆腐餻熟成過程でS—アミラーゼ，α—アミラーゼとともに豆腐餻中の糖分の生成に関与しているものと考えられる。一方，プロテアーゼ活性はアルコール存在下では著しく低下しており，本酵素による豆腐タンパク質の分解は極めてゆるやかに行なわれていることが示唆される。このことは豆腐餻に必要な保形性の観点から重要なことと思われる。豆腐餻熟成のメカニズムを明らかにするためには実際に豆腐を漬込んだ「漬汁」中の各種酵素の挙動を詳しく調べる必要がある。また，豆腐餻の製造には，伝統的に紅麹が原料として用いられているので，豆腐餻製造に適した紅麹の製麹方法についても検討中である。

Ⅳ 要 約

紅麹菌や黄麹菌を蒸米に生育させた米麹は豆腐餻製造に際して重要な原料である。本論文においては豆腐餻製造に適した黄麹の製造方法について，特に酵素活性の面から検討した。麹の品温は種菌接種後20時間目で上昇した。麹の水分含量は30％前後であり，酸度は極めて低かった。黄麹の製麹については76時間付近で出麹とすることが望ましいことが明らかになった。

加圧蒸煮法により蒸米を調製することにより麹中の酵素活性が著しく増大した。特にウルチ米を加圧蒸煮して製麹した麹においては普通蒸煮法による場合に比べてα－アミラーゼ活性が5倍，S－アミラーゼ，プロテアーゼ活性がともに3倍に増大することが明らかになった。黄麹のS－アミラーゼおよびα－アミラーゼは食塩およびアルコールに対する安定性がすぐれていることがわかった。

本研究に際し，御助言をいただいた琉球大学農学部農芸化学科当山清善教授ならびに小波本直忠教授に感謝します。

参 考 文 献

1. Ichishima, E. and Yoshida, F. 1962 Studies on the Proteolytic enzyme of Black *Aspergilli*. Part Ⅶ. 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.
2. Ichishima, E. 1970 Purification and mode of assay for acid proteinase of *Aspergillus saitoi*, *in* Methods in Enzymology (Ed. by Perlmann, G. E. and Lorand, L.), **XIX**, 397－406, Academic Press, New York.
3. 宮里興信 1954 味噌用米麹の簡易製造法，普及叢書，**9**：1－12，琉球大学研究普及部.
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，醸工，**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，醸工，**39**：200－203.
6. Nelson, W. 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose, J. Biol. Chem., **153**：375－380.
7. 小原哲次郎，越後多嘉志，露木英男，小山進 1980 食品製造学，初版第5刷，p 239－246，建帛社，東京.
8. Somogyi, M. 1952 Notes on sugar determination, J. Biol. Chem., **195**：19－23.
9. 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その酵素力および酸度について，琉大農学報，**21**：109－122.
10. 山田覃洋 1963 耐酸性アミラーゼに関する研究（第2報）アミラーゼ力価の新測定法，農化，**37**：633－636.
11. 安田正昭，上地玄作，宮里興信 1981 豆腐餻製造に関する研究：製麹法と漬汁の調製法について，日本食品工業学会第28回大会講演要旨集，p 49.

SUMMARY

The rice-koji which is *Monascus* or *Aspergillus oryzae* grown on the steamed rice is important material for TOFUYO manufacturing. In this paper, the enzyme activities of α-amylase, saccharifying amylase, acid protease and acidity of the koji (mold rice) produced with *Aspergillus oryzae* as seed koji are described. The kinds of rice and the method of steaming which are suitable for koji making are also described.

In the course of koji making, the temperature of the koji was increased remarkably 20 hr after inoculation of the seeds. And so, it was controlled at around 34℃ by a mixing called "Teire". The koji was found to have about 30% of moisture and a very low acidity (0.05). An appropriate incubation period of koji making was 76 hr after the seed koji was inoculated.

In the course of koji making, the formation of enzymes in Ki-Koji was depended upon the kinds of rice and the methods of steaming. It was found that the enzyme activities of the koji which was made by the non-glutinous rice treated with autoclave were increased markedly. In this case, it was observed that α-amylase, saccharifying amylase and protease activities of the koji were 5-, 3- and 3-folds, respectively, greater than that of koji making with the rice prepared from the method of general steaming.

Saccharifying amylase and α-amylase of Ki-Koji showed considerable alcohol-, and salt-tolerance.