床期間密閉製麹と非密閉製麹の麹菌増殖と 酵素生産に与える影響

家村芳次・加藤祐樹・片岡浩平・吉永和彦・原 昌道
＜菊正宗酒造(株)総合研究所＞

平成 7 年 12 月 5 日 受理

Effects of *Koji*-making Sealed Up in *Toko* Period or Not Sealed Up in *Toko* Period on Growth of Mycelia and Enzyme Production

Yoshitsugu IEMURA, Yuki KATOH, Kohei KATAOKA,
Kazuhiko YOSHINAGA and Shodo HARA
(General Research Laboratories of Kiku-Masamune
Sake Brewing Co., Ltd., 1-8-6 Uozaki-nishimachi,
Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658)

The growth of *koji*-mold and the production of enzymes during *toko* period (the time after the inoculation of mold spores on steamed rice to *kirikaeshi*, the breaking up the steamed rice heap) of *koji*-making process were compared in conventional method and in the *koji*-making machine. In the traditional *toko* process, the steamed rice was closely covered with clothes over another. So, the concentration of O_2 in the layer of steamed rice decreased rapidly with the growth of *koji* mold and was about 0% at *kirikaeshi* operation. On the contrary, the concentration of CO_2 increased and was about 20% at *kirikaeshi* operation. On the other hand, in the *koji*-making machine which had excess space on the layer of steamed rice, both the decrease of O_2 and the increase of CO_2 were insignificant.

These conditions were reproduced in the laboratory, and their effects on the growth of mycelia and enzyme production of the *koji* were investigated. *Koji*-making tests were carried out with the two methods; *koji*-making sealed up in *toko* period (Method I) and *koji*-making not sealed up in *toko* period (Method II). As the result, the *koji* made with the former method was higher in the activities of α -amylase and glucoamylase, while lower in the amount of mycelia and the activities of both acid protease and acidcarboxypeptidase than with the latter method.

Key words: 床期間密閉製麹・麹菌の増殖・酵素生産

緒 言

近年、機械製麹の普及により床期間において蒸米がおかれる条件は非常に多様になっている。すなわち伝統的な製麹においては、床に引き込まれた蒸米は床揉み後切返し(盛り)までの期間、Fig. 1(A)もしくはFig. 1(B)に示すように、布等で完全に覆われ、外気と遮断された状態におかれる。一方、機械製麹の場合、例としてFig. 1(C)およびFig. 1(D)に示すように製麹装置の構造上、蒸米堆積層周辺にかなりの空間が存在する場合が多く、引込み直後より酸素供給量が比較的充分で、また、発生する炭酸ガスが拡散しやすい条件下におかれ

る。

本報では、床期間において蒸米がおかれるこのような条件の違いに着目し、それにより蒸米層内部の気相条件がどのように影響を受けるか、さらに、その結果切返し(盛り)以後の麹菌の増殖と酵素生産に対してどのような影響が現われるかについて検討した結果を報告する。

実 験 方 法

1. O_2 濃度および CO_2 濃度の測定

O_2 濃度は新コスモス電気(株)製拡散式酸素濃度計 XO-326 ALA 型により測定した。また、 CO_2 濃度は(株)ガステック製ガステックを用いて測定した。

Fig. 1 Schemata of the traditional *toko* process and the *koji*-making machine in practical manufactory.

Fig. 2 Scheme of the *koji*-making test.

2. 実験室における製麹実験方法

常法により調製した蒸米（五百万石，精米歩合 70%）を 31℃ まで放冷後，種麹（今野もやし）を所定量散布し，以後恒温恒湿機を用いて製麹実験を行った。Fig. 2 に示すように引込みから切返し（切返しと同時に盛りとした）までの期間については，蒸米をポリエチレン袋に入れて密閉した場合（床期間密閉製麹）と，そのまま恒温恒湿装置に入れ密閉しない場合（非密閉製麹，発生す

る CO₂ が拡散しやすくするため麹層厚さは約 5cm）の 2 通りの条件で製麹し，切返し（盛り）後はポリエチレン袋を取り外し，両者とも同一条件で製麹を行った。製麹温度および湿度は Fig. 3 に示す通りであった。

3. 麹菌体量および酵素力価の測定方法

麹菌体量の測定は藤井他¹⁾の方法に従い，測定結果は N-アセチルグルコサミン量 (GlcNAc) で示した。また，酵素力価の測定方法は国税庁所定分析法注解²⁾に従

Fig. 3 Pattern of cultivation temperature and relative humidity.

() : Cultivation time after the *mori* operation.
Lines : —, temperature : ---, relative humidity.

Fig. 4 Changes in concentration of O_2 and CO_2 in the layer of steamed rice in *toko* period in practical manufactory.

Symbols for O_2 and CO_2 : ● and ▲ in the traditional *toko* ; ○ and △ in the *koji*-making machine.

実験結果

1. 実際の製造場の床期間における蒸米層内部の O_2 濃度と CO_2 濃度の経時変化

実際の製造場において Fig. 1 (B) に示したように床に積み上げられた蒸米層内部と、Fig. 1 (C) に示した回転円盤式機械製麹機に取り込まれた蒸米層内部について、引込みから切返し（盛り）までの期間、 O_2 濃度と CO_2 濃度の経時変化を測定した。その結果、Fig. 4 に示すように床の蒸米層内部の O_2 濃度は麹菌の増殖にともなって急速に減少し、切返し付近ではほぼ 0% になった。逆に CO_2 濃度は減少した O_2 濃度とおき換わるように上昇し、切返し時には約 20% まで増加した。一方、機械製麹機の場合は O_2 濃度の減少はごくわずかで、切返し時点でも 18% までしか低下せず、 CO_2 濃度も 2% 前後であった。このように床期間における気相条件は床の場合と機械製麹機の場合とで著しく異なっていた。そこで実験室においてこのような気相条件の違いを再現し、麹菌の増殖と酵素生産に与える影響を検討した。

2. 床期間密閉製麹と非密閉製麹の麹菌増殖と酵素生産に与える影響

(1) 蒸米層内部の O_2 濃度および CO_2 濃度の経時変化と麹菌の増殖

Fig. 2 に従い、実験室において床期間密閉製麹と、非密閉製麹を行い、蒸米層内部の O_2 濃度および CO_2 濃

Fig. 5 Changes in concentration of O_2 and CO_2 in the layer of steamed rice, water content of the steamed rice and the amount of mycelia (GlcNAc). Condition are detailed in Fig. 2 and Fig. 3.

Symbols for O_2 , CO_2 , water content and GlcNAc : ●, ▲, ■ and ▼ in the method I ; ○, △, □ and ▽ in the method II.

度の経時変化と蒸米水分の経時変化および麹菌の増殖量を測定した。結果は Fig. 5 に示すように、蒸米層内部の O_2 濃度および CO_2 濃度の経時変化は床期間密閉製

Fig. 6 Relationship between enzyme activities and the amount of mycelia (GlcNAc) of the *koji* after *mori* operation.

Symbols for α -amylase and glucoamylase: ● and ▲ in the method I; ○ and △ in the method II.

麹の場合、Fig. 4 で示した実際の製造場における床の蒸米層内部の経時変化とはほぼ同一の経過となり、切返し時点の O_2 濃度はほぼ 0%， CO_2 濃度は約 20% となった。一方、非密閉製麹の場合は、Fig. 4 で示した機械製麹機の床期間における O_2 濃度および CO_2 濃度とはほぼ同様の経過を示し、床期間において O_2 濃度はわずしか減少せず、また、 CO_2 濃度の上昇もわずかであった。また、床期間における麹菌の増殖量は、非密閉製麹では約 15 時間目以降急激に麹菌体量が増加したが、密閉製麹では麹菌体量の急激な増加は見られず切返し（盛り）まではば一定（60～84 $\mu\text{g/g}$ ）の菌体量であった。このように床期間密閉製麹と非密閉製麹とは床期間における麹菌の増殖量に著しい違いが認められた。

また、切返し（盛り）後は両者とも同一の条件で製麹を行ったが菌体量の差はさらに増大し、その後長時間製麹を続けても菌体量の差はあまり縮まらなかった。なお、水分の経時変化については両方の製麹方法でほとんど差は見られなかった。

(2) α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの生成に与える影響

床期間密閉製麹と非密閉製麹における麹菌体量と α -アミラーゼ力価との関係、および麹菌体量とグルコアミラーゼ力価との関係を Fig. 6 に示した。床期間密閉製麹では菌体量が約 700 ($\mu\text{g/g}$) までは α -アミラーゼ力価およびグルコアミラーゼ力価ともに菌体量にほぼ比例して増加したが、菌体量が約 700 ($\mu\text{g/g}$) を越えると両方の酵素とも、菌体量の増加に対して酵素力価の増加が

Fig. 7 Relationship between enzyme activities and the amount of mycelia (GlcNAc) of the *koji* after *mori* operation.

Symbols for acid protease and acid carboxypeptidase: ■ and ▼ in the method I; □ and ▽ in the method II.

明らかに大きくなった。一方、非密閉製麹では菌体量が約 1,400 ($\mu\text{g/g}$) を越えると菌体量の増加に対して酵素力価の増加量が大きくなった。その結果、麹菌の増殖に対する酵素生産のバランスが2種類の製麹方法により著しく異なり、床期間密閉製麹では比較的少ない菌体量で、しかも α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価の強い麹が得られた。

(3) 酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼの生成に与える影響

麹菌体量と酸性プロテアーゼ力価との関係、および麹菌体量と酸性カルボキシペプチダーゼ力価との関係を Fig. 7 に示した。これらの酵素の場合には α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの場合に見られたような、床期間密閉製麹と非密閉製麹との間における顕著な差は認められなかった。すなわち製麹方法に関係なく麹菌体量と酵素力価との間には常にほぼ一定の対応関係が見られた。

以上の結果から、床期間密閉製麹では非密閉製麹に比べ、菌体量、酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼ力価は少なく、しかも α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価の強い麹が得られることが明らかになった。

3. 盛り時の菌体量がその後の製麹経過および酵素生産に与える影響

前述の2種類の製麹方法で、得られる麹の菌体量と酵素力価のバランスが何故著しく異なるのか、原因の検討

を行った。Fig. 5 で麹菌体量の経過を比較すると、床期間密閉製麹では非密閉製麹に比べ、切返し（盛り）の時

Fig. 8 Influence of the amount of mycelia (GlcNAc) at *mori* operation on the subsequent growth of mycelia.

Conditions are detailed in Fig. 2 and Fig. 3. Symbols show length of *toko* period and amount of mycelia at the *mori* operation 21h and 60.7 μg/g (◆), 24h and 68.2 μg/g (■), 26h and 80.6 μg/g (●) in the method I; 12h and 40.2 μg/g (▽), 15h and 36.1 μg/g (△), 18h and 77.6 μg/g (◇), 21h and 139.4 μg/g (□), 24h and 378.6 μg/g (○) in the method II.

Fig. 9 Relationship between enzyme activities and amount of mycelia (GlcNAc) of the *koji* after *mori* operation. Conditions are detailed in Fig. 2 and Fig. 3. Symbols are the same as shown under Fig. 8.

点で菌体量が少なかった。これがその後の製麹経過と酵素生産に影響を与えることが考えられたため、非密閉製麹の床期間を短くし、切返し（盛り）時の菌体量を少なくすることにより密閉製麹と同様の麹が得られるかどうかを検討した。床期間密閉製麹については床期間の長さを 21, 24, 26 時間の 3 通り、非密閉製麹については床期間の長さを 12, 15, 18, 21, 24 時間の 5 通りにして、切返し後は Fig. 2 に従い、いずれの麹も同一条件で製麹を行った。

まず、Fig. 8 の床期間非密閉製麹で、盛り時の菌体量とその後の麹菌の増殖との関係を見ると、盛り時の菌体量が多い麹ほどそれ以後菌体が急増し菌体量の多い麹となった。逆に盛り時における菌体量が少ないと以後の増加も緩やかで菌体量の少ない麹が得られた。一方、床期間密閉製麹では床期間を長く取ったにも関わらず盛り時の菌体量は少なく、その後の菌体の増加も緩やかで菌体量の少ない麹が得られた。

このときの麹菌体量の増加と α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価の増加との関係を Fig. 9 に示した。図のように、盛り時の菌体量が少ないほど、菌体量に対して α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価の強い麹が得られ、床期間密閉製麹で得られる麹に近づいた。一方、酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼの生産に与える影響も検討したが、結果は Fig. 7 とほぼ同様であり（データは省略）、製麹条件に関係なく麹菌体量と酵素力価との間には常にほぼ一定の対応関係が認められた。

以上のように非密閉製麹においても、盛り時の菌体量を少なくすることにより、少ない菌体量でしかも α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価の強い麹が得られたことから、床期間密閉製麹と非密閉製麹で菌体量と酵素力価のバランスに差が生じる最大の原因は盛り時の菌体量の違いであることが分かった。

4. 製麹末期に菌体増加量あたりの α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ生産量が増大する原因

以上の製麹実験において、製麹末期に菌体増加量あたりの α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ生産量が増大した。もし製麹末期にこのような現象が現われず、製麹末期においても菌体増加量とこれらの酵素の生産量が常に比例関係にあれば、盛り時の菌体量が異なっても、製麹末期に菌体量と α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価のバランスに差が生じることはないと考えられる。従って、製麹末期に菌体増加量あたりの α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ生産量が増大することも床期間密閉製麹と非密閉製麹で菌体量と酵素力価のバランスに差が生じる原因の一つであると考えられる。

Fig. 10 Growth of mycelia after the *mori* operation. Length of *toko* period was 24 h and cultivation temperature was 31°C (constant) after the *mori* operation. Other conditions were the same as detailed in Fig. 2 and Fig. 3.

Symbols for the method I and the method II :
● and ○.

Fig. 11 Relationship between enzyme activities and the amount of mycelia (GlcNAc) of the *koji* after *mori* operation. Conditions and symbols are the same as shown under Fig. 10.

製麹末期に菌体増加量に対する α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ生産量が増大する原因は、品温経過 (Fig. 3) と菌体量の経過 (Fig. 8), および酵素生産 (Fig. 9) との関係から推察して、製麹末期の品温上昇による影響が考えられた。すなわち、製麹末期において品温の上昇により麹菌の増殖が抑制される (Fig. 8) が、このとき、麹菌の増殖抑制と連動して酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼの生産は抑制されるのに対し、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの生産はあまり抑制されないためであると考えられる。そこで、これを確認するため、盛り後も 31°C 一定で製麹を行い、

麹菌の増殖と α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの生成量との関係を見た。

まず、麹菌の増殖経過を Fig. 10 に示した。31°C 一定であれば、Fig. 5 あるいは Fig. 8 で見られたように、製麹末期に麹菌の増殖が抑制されることはなく、GlcNAc 量で 2,000 ($\mu\text{g/g}$) 近くまで菌体量が増加した。また、このときの麹菌の増殖と α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの生成量との関係は、Fig. 11 に示すように製麹終了時までほぼ比例関係にあった。この結果から通常の製麹条件において、製麹末期に菌体増加量あたりの α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ生産量が増大する原因には、製麹末期の品温上昇が関係していることが示唆された。

考 察

1. 床期間密閉製麹の意義

床期間密閉製麹では非密閉製麹に比べ菌体量、酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼは少なく、しかも α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価の強い麹が得られた。最近の清酒は淡麗な酒質が好まれる傾向が強くなり、淡麗な酒質を得るには菌体量の少ない若い麹の方が適しているといわれている³⁾。一方、醪において蒸米の溶解と発酵を正常に行わせるには十分量の α -アミラーゼとグルコアミラーゼが必要^{4,5)}とされており、床期間密閉製麹はこのような麹を得るのに適していると考えられる。

2. 麹菌の増殖と酵素生産との関係

床期間密閉製麹と非密閉製麹において、得られる麹の菌体量と酵素力価のバランスに何故差が生じるのか、その原因を検討した結果、最大の原因は盛り時の菌体量の差であることが分かった。また、それとともに製麹末期における品温上昇が関係していることが明らかになった。すなわち、製麹末期において品温の上昇により麹菌の増殖が抑制される (Fig. 8) が、このとき麹菌の増殖抑制と連動して酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼの生産は抑制されるのに対し、一方、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの生産はあまり抑制されないためであると考えられた。なお、このような現象がどのような温度条件において見られるのか、またその原因が、単に麹菌による酵素生産の最適温度の違いによるのか、あるいはそれぞれの酵素の生産機構の違い^{6,7)}に起因するのか、これらの詳細について、今後さらに検討する予定である。

要 約

(1) 実際の製造場で調査した結果、床に取り込んだ

場合、麹菌の増殖が始まると蒸米堆積層の酸素濃度は急速に減少し、切返し（盛り）付近ではほぼ 0% になった。逆に CO₂ 濃度は増加し約 20% に達した。一方、機械製麹機の場合、床期間における酸素濃度の低下および炭酸ガス濃度の上昇はわずかであった。

（2）実験室において上記のような気相条件の違いを再現し、麹菌の増殖と酵素生産に与える影響を調べた。その結果、引込みから盛りまで密閉状態に置き、盛り後常法により製麹（床期間密閉製麹）した場合は、引込みから盛りまで密閉しない状態におき、盛り後は前者と同一条件で製麹（非密閉製麹）を行った場合に比べ、菌体量、酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼは少なく、しかも α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ力価の強い麹が得られた。

文 献

- 1) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 醸協, 87(10), 757-759 (1992)
- 2) 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 (1993)
- 3) 日本醸造協会編: 清酒製造技術, p.92, 日本醸造協会 (1992)
- 4) 布川弥太郎: 醸酵工学, 58, 391-398 (1980)
- 5) 杉本芳範, 藤田栄信: 醸酵工学, 65, 199-215 (1987)
- 6) 菅間誠之助, 岡崎直人: 醸酵工学, 60, 151-163 (1982)
- 7) H. NARAHARA, Y. KOYAMA, T. YOSHIDA, S. PICHANGKURA, R. UEDA and H. TAGUCHI: *J. Ferment. Technol.*, 60, 311-319 (1982)