麴菌の混合製麴と醤油醸造

製麴現場にとって孢子（麴菌分生子）の飛散は悩みの種である。かつては孢子の着生が多いほど良い麴とされていたが、今日では必ずしもそうではない。

筆者らは作業環境改善のため短毛菌と長毛菌を混合し、孢子の飛散を少なくすることを試み、ほとんど孢子が飛散しない製麴法を確立した。さらに2種の麴菌の混合培養によりグルタミナーゼ活性が高くなる現象を見出した。

本稿では、安定して高い水準の製麴システムの構築と実用化の詳細をまとめていただいた。

植木達朗, 野田義治

1. はじめに

優良醤油麴菌の条件の1つとして、分生子着生が旺盛で種麴の調製が容易であることが挙げられる。しかし、麴室から麴を取り出す出麴作業の際に飛散する麴菌分生子は、作業環境を悪化させ労働衛生上の問題になって来ている。そこで、機械製麴には不向きであるが分生子着生時期の遅い1麴菌株と分生子柄の短い醤油用麴菌株の混合製麴を行い、前述の飛散麴菌分生子の軽減が可能か試験した。その試験の過程でこの混合培養麴が、それぞれの単一培養麴に比べグルタミナーゼ活性が高いことを認めた。グルタミナーゼ活性は生揚醤油中のGlu/T.N.（グルタミン酸量/全窒素）と高い相関を示し¹⁻²⁾、グルタミナーゼ高生産性麴菌が醤油のグルタミン酸含量を増加させる事が示唆された³⁻⁴⁾。グルタミン酸は醤油の重要な旨味成分であり、グルタミナーゼ活性の増加は醤油麴として有益である。また、麴菌の混合培養における酵素の生産性について中野ら⁵⁻⁷⁾は、味噌用市販種麴の中で複菌種麴の培養液は純粋種麴のそれより低いアミラーゼとプロティナーゼ活性を有し、麴菌の混合培養液の酵素生産は混合比率に従って相加的であり相乗的作用は観察されないとした。一方、Fiedurekら⁸⁾は *A. niger* の混合培養液中のグルコアミラーゼ活性が、それぞれの単一培養液中の活性より高くなる事を報告したがその機作につ

いては明確ではない。ここでは、表題の混合培養麴の醤油麴としての評価と実用化、加えてグルタミナーゼ活性増加の機作について若干の知見を得たので概要を記述する⁹⁻¹²⁾。

2. K2株とHG株の混合製麴とその生揚醤油の品質

45時間培養したK2株とHG株の混合培養麴中の分生子数は、 2.8×10^7 /g 麴でありK2株の単一培養麴の約1/10であった。一方、HG株の単一培養麴では分生子の着生は観察されなかった。3種類の麴のロイシンアミノペプチダーゼ、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ活性はほぼ同じ値を示した。K2株とHG株の混合培養麴のプロテアーゼ活性は576 units/g 麴でありK2株の単一培養麴よりやや低い傾向にあった。一方、そのグルタミナーゼ活性は11.3 units/g 麴であり、K2株とHG株の単一培養麴の2倍以上の値を示した（第1表）。K2株とHG株の混合培養麴はK2:HGが7:1から1:7の範囲で単一培養麴の約2倍のグルタミナーゼ活性を示した。また、そのプロテアーゼ活性は、K2株とHG株の単一培養麴の中間の値でK2株の単一培養麴より低かった（第2表）。この様に、K2株とHG株の混合培養麴のプロテアーゼ活性は2種の種麴の混合比率に応じて推移し、ロイシンアミノペプチダーゼ、 α -アミラーゼ、グルコア

Mixed Culture of Two *Koji* Moulds and Soy Sauce Brewing
Tatsuro UEKI, Yoshiharu NODA (*Fukuoka Soy Sauce Brewing Cooperation*)

第1表 麴の酵素活性と分生子着生

種麴	分生子着生 ($\times 10^7$ /g 麴)		酵素活性 (U/g 麴)				
	45 h ^a	69 h ^b	プロテアーゼ	ロイシンアミノ ペプチダーゼ	α -アミラーゼ	グルコアミラーゼ	グルタミナーゼ
K2	21	65	641	1.5	3.5×10^5	366	4.7
HG	ND	8.6	561	1.6	3.5×10^5	359	4.4
K2+HG	2.8	28	576	1.8	3.6×10^5	369	11.3

蒸煮脱脂加工大豆 56 g, 砕割小麦 24 g, 種麴 20 mg を 15 cm シャーレに盛り込んだ。ただし, 混合種麴は K 2 株と HG 株の分生子を重量比で 1:1 に混合したものを用いた。

^a, 30°C で 26 時間さらに 25°C で 19 時間, 合計 45 時間製麴した; ^b, 30°C で 26 時間さらに 25°C で 43 時間, 合計 69 時間製麴した。ND, 観察されず。

第2表 種麴の混合比率 (K 2: HG) のグルタミナーゼ活性とプロテアーゼ活性への影響

種麴 (mg)		グルタミナーゼ (U/g 麴)	プロテアーゼ (U/g 麴)
K2	HG		
20.0	0	5.1	685
19.0	1.0	8.5	636
17.5	2.5	12.0	641
15.0	5.0	10.1	592
10.0	10.0	11.5	581
5.0	15.0	10.7	587
2.5	17.5	10.9	585
1.0	19.0	8.2	588
0	20.0	5.0	570

表1と同様に盛り込み 30°C で 26 時間さらに 25°C で 19 時間, 合計 45 時間製麴した。ただし, 混合種麴は K 2 株と HG 株の分生子を表中の重量比で混合したものをそれぞれ種麴として用いた。

ミラーゼ活性はほぼ同じ値を示した。しかし, 混合培養麴のグルタミナーゼ活性は一定の範囲の混合比率で高い値を示した。次に, K 2 株と HG 株の混合培養麴で生揚醬油を試醸し K 2 株の単一培養麴と比較した。

原料 7,200 kg で 60 石自動製麴装置により K 2 株と HG 株の混合培養麴を製造した。ただし, K 2 株と HG 株の混合比率は分生子数として 3:1 とした。麴品温は, 製麴 25 時間目までは約 30°C 付近, それ以後は約 26°C 付近で推移した。静圧は製麴開始 12 時間目より上昇を始め最大約 80 mmAq に達した。また, 26 時間目以降に静圧が上昇したが, そのピークは約 65 mmAq であり最大値を下回った。この様に K 2 株と

HG 株の混合培養麴は K 2 株の単一培養麴に比べ, 製麴後期に麴がやや締め易い傾向を示したが, それは許容範囲であり異常に麴品温が上昇する事もなくこの規模の機械製麴は可能であった (第1図)。この K 2 株と HG 株の混合培養麴の分生子数は, K 2 株の単一培養麴の約 1/5 であり, 出麴において麴菌分生子の飛散が観察されず作業環境は著しく改善された (第2図)。混合培養麴のプロテアーゼ活性は K 2 株の単一培養麴より低い傾向にあり, グルタミナーゼ活性は K 2 株の単一培養麴の 2 倍以上の値を示した。K 2 株の単一培養麴の生揚醬油と混合培養麴の生揚醬油の全窒素, 全窒素当たりのホルモール窒素 (F.N./T.N.) はほぼ同じ値を示した。一方, 混合培養麴の生揚醬油の窒素利用率は K 2 株の単一培養麴のそれに比べ 1.4% 低下した。しかし, Glu/T.N. は K 2 株の単一培養麴のそれに比べ有意 (危険率 0.05% 以下) に高かった (第3表)。このように, 混合培養麴が出麴の作業現場の環境改善と生揚醬油の品質向上を同時に達成する事が明らかになった。しかも種麴の混合という比較的簡単な作業を既存の工程に加えるだけで容易に利用できる。しかし, K 2 株の単一培養麴に比べプロテアーゼ活性が減少し, その生揚醬油の窒素利用率も低下した。混合培養麴の実用化のためにはそのプロテアーゼ活性を増強し窒素利用率を増加させる事を必要とした。

3. プロテアーゼ高生産性株 K 2-4 株と HG 株の混合製麴とその生揚醬油の品質

混合培養麴のプロテアーゼ活性を強化するためにプロテアーゼ高生産性株 K 2-4 株と HG 株の混合製麴

第1図 60石製麴装置におけるK2株とHG株の混合製麴の麴品温と静圧の経時変化

AがK2株の単一培養麴, BがK2株とHG株の混合培養麴を示す。

K2株の単一培養麴

K2株とHG株の混合培養麴

第2図 出麴時の自動製麴装置内部の写真

を試み生揚醬油を試醸した。原料21,600kgで180石自動製麴装置によりK2-4株とHG株の混合製麴を行った。ただし、従来のK2株の単一培養麴は製麴前期温度から後期温度に切り替える時期を製麴開始26時間としたが、K2-4株とHG株の混合培養麴はプロテアーゼ活性を高めるために製麴開始20時間後とした。K2株の単一培養麴の品温は26時間目に約30°Cから約24°Cに低下した。K2-4株とHG株の混合培養麴は20時間目に約25°Cに低下した。また、これらの麴は製麴開始10時間後に静圧が上昇し、K2株の単一培養麴とK2-4株とHG株の混合培養麴の静圧の最大値はそれぞれ150mmAqと160mmAqであった。このように、短毛菌(K2-4株)と長毛菌(HG株)の混合比率が分生子数として10:1の混合種麴を用いたこの規模での機械製麴は可能であった(第3図)。

K2-4株とHG株の混合培養麴のグルタミナーゼ活性とプロテアーゼ活性は、それぞれ4.5と900units/g麴であり、K2株の単一培養麴の活性に比べグルタミナーゼは約2倍、プロテアーゼは約1.4倍に強化された。また、K2-4株とHG株の混合製麴においてK2株とHG株の混合製麴と同様に出麴作業の際に飛散する麴菌分生子は観察されなかった。K2株の単一培養麴とK2-4株とHG株の混合培養麴で製造した

第3表 工場スケール製麹した K2 株と HG 株の麹の酵素活性と生揚醬油の品質

種麹	麹の酵素活性		生揚醬油の分析値			
	(U/g 麹)		T. N.	F. N. /T. N.	Glu/T. N.	T. N. Y. (%)
	グルタミンナーゼ	プロテアーゼ				
K2	1.8	690	1.84	0.571	0.663	90.8
K2+HG	4.5	525	1.85	0.578	0.822	89.4

T. N., 全窒素; F. N., ホルモール態窒素; Glu, グルタミン酸量; T. N. Y., 窒素利用率。

第3図 180石製麹装置における K2-4 株と HG 株の混合製麹の麹品温と静圧の経時変化
A が K2 株の単一培養麹, B が K2-4 株と HG 株の混合培養麹を示す。

生揚醬油の全窒素は類似の値を示したが, この混合培養麹の生揚醬油の F. N. /T. N. は K2 株の単一培養麹に比べやや高い傾向にあった。また, これらの生揚醬油の窒素利用率は, それぞれ 91.4% と 90.8%, Glu/T. N. は 0.826 と 0.663 であり, いずれも混合培養麹の生揚醬油が K2 株の単一培養麹のそれを上

回った (第4表)。このように, K2-4 株と HG 株の混合培養麹で製造した生揚醬油は窒素利用率を損なう事なく Glu/T. N. を 25% 強化した。これによって混合培養麹の実用化ができた。尚, データーは示していないがこれらの生揚醬油は pH, 塩分, 還元糖量, アルコール含量そして色は類似の値を示した。

第4表 工場スケールで製麹したプロテアーゼ高生産株 K2-4 株と HG 株の麹の酵素活性と生揚醬油の品質

種麹	麹の酵素活性		生揚醬油の分析値			
	(U/g 麹)		T. N.	F. N. /T. N.	Glu/T. N.	T. N. Y. (%)
	グルタミンナーゼ	プロテアーゼ				
K2	2.0	650	1.84	0.571	0.663	90.8
K2-4+HG	4.5	900	1.87	0.581	0.826	91.4

T. N., 全窒素; F. N., ホルモール態窒素; Glu, グルタミン酸量; T. N. Y., 窒素利用率。

4. 麴中の麴菌体量とグルタミナーゼ活性の変化

寺本ら¹³⁾は麴菌のグルタミナーゼは細胞壁とペリプラズマ空間に局在する菌体内酵素である事を報告した。よって、混合培養麴の高グルタミナーゼ活性はその麴菌体量と深く関連するものと考えられる。そこで、ナイロン・ペースト培養菌体のグルコサミン含量を指標として麴中の菌体量を概算した。3種類の麴とも3日目でピークに達し、醤油麴の出麴時間の2日目(48時間)では、それぞれ0.17, 0.19, 0.17 g/g 麴であった(第4図)。麴中の菌体当たりのグルタミナーゼ活性は、K 2-4 株の単一培養麴は2日目に35 units/g 菌体に達しそれ以降はわずかな増加であった。HG 株のそれは、2日目で約30 units/g 菌体であったが、2-5日目にも活性が増加し約100 units/g 菌体に達した。これらの混合培養麴は、1-2日目に活性が増加し2日目で約100 units/g 菌体であった(第5図)。このように出麴時期(培養48時間目)の混合培養麴の菌体当たりの活性が単一培養麴の約3倍であるのに対して菌体量の差はほとんど無かった。よって、K 2-4 株とHG 株の混合培養麴の高グルタミナーゼ活性は、菌体

量の増加ではなく菌体当たりの活性の増加に起因していることが判明した。

5. K 2-4 株による HG 株のグルタミナーゼ生産促進

両面ナイロン・ペースト培地(第6図)の表裏両面に生育したK 2-4 株のグルタミナーゼ活性は、3日目に両面とも約70 units/g 菌体に達し、それ以降はわずかな増加であった。HG 株は、K 2-4 株に比べ経時変化の立ち上がりが遅い傾向にあり、3日目の活性は表が20 units/g 菌体、裏が60 units/g 菌体であったが、3-4日目に急激に増加し表が180 units/g 菌体、裏が270 units/g 菌体に達した。この2種の麴菌を混合して両面ナイロン・ペースト培地の表裏両面に混合培養すると、グルタミナーゼ活性は2-3日目に急激に増加し、表が140 units/g 菌体、裏が180 units/g 菌体に達し、単一培養菌体の2倍以上の値を示した(第7図)。また、別々に3日間単一培養させたK 2-4 株とHG 株の菌体を混合して活性を測定しても、3日間混合培養させた菌体のように高いグルタミナーゼ活性は観察されず、培養時に両菌株が近傍に位置することが

第4図 麴中の麴菌体量の経時変化

表1と同様に盛り込み、30°Cで26時間それ以降は25°Cで培養した。ただし、混合種麴はK 2-4 株とHG 株の分生子を重量比で5:1に混合したものを用いた。○はK 2-4 株の単一培養、△はHG 株の単一培養、□はK 2-4 株とHG 株の混合培養を示す。

第5図 麴中の麴菌体当たりのグルタミナーゼ活性の経時変化

図4と同様に盛り込み培養した。○はK 2-4 株の単一培養、△はHG 株の単一培養、□はK 2株とHG 株の混合培養を示す。

第6図 両面ナイロン・ペースト培地

脱脂加工大豆粉と小麦粉を1:1で混合し、1.25倍量の水を追加ペースト状にした。厚さ3-4 mmに広げ直径9 cmの円盤に切り出し、6×6 cmのナイロン布をその両面に貼り付け加圧殺菌し両面ナイロン・ペースト培地とした。

重要であった（データーは示していない）。さて、混合培養菌体が第7図のような経時変化を辿るためには、混合培養菌体中のK 2-4株の菌体の活性が増加するか、HG株の菌体の活性の立ち上がり及早まる必要がある。そこで、両面ナイロン・ペースト培地の表と裏に2種の麴菌を別々に生育させた。表にK 2-4株、裏にHG株を生育させた場合、K 2-4株の3日目の活性は45 units/g 菌体であり、K 2-4株のグルタミナーゼ活性の増加は観察されなかった。しかし、HG株の活性は、2~3日目に急激に増加し170 units/g 菌体に達した。この様に、HG株の活性はHG株の単一接種であるにもかかわらず3~4日目の活性の上昇が2~3日目にシフトした。これは表にHG株、裏にK 2-4株を生育させた場合も同様に観察された（第8図）。これらの結果から、混合培養菌体の高グルタミナーゼ活性は、K 2-4株に由来する因子によってHG株のグルタミナーゼ生産が促進された結果と推論した。

6. おわりに

本研究は製麴工程の出麴作業中に飛散する麴菌分生

第7図 同じ分生子懸濁液を接種した両面ナイロン・ペースト培地上の麴菌の菌体当たりのグルタミナーゼ活性の経時変化

両面ナイロン・ペースト培地の表と裏のナイロン上に同じ麴菌分生子懸濁液（約 5.0×10^9 分生子/ml）を0.4 mlずつ接種し、30℃で26時間それ以降は25℃で培養した。○はK 2-4株の単一分生子懸濁液、△はHG株の単一分生子懸濁液、□はK 2-4株とHG株の混合分生子懸濁液を示す。

第8図 異なる分生子懸濁液を接種した両面ナイロン・ペースト培地上の麴菌の菌体当たりのグルタミナーゼ活性の経時変化
両面ナイロン・ペースト培地の表に K 2-4 株の単一分生子懸濁液 (約 5.0×10^9 分生子/ml) を 0.4 ml, 裏のナイロン上に HG 株の単一分生子懸濁液 (約 5.0×10^9 分生子/ml) を 0.4 ml 接種した。また, 表に HG 株, 裏に K 2-4 株の接種も同様におこなった。これを 30°C で 26 時間それ以降は 25°C で培養した。●は K 2-4 株の単一分生子懸濁液, ▲は HG 株の単一分生子懸濁液を示す。

子の軽減と生揚げ醤油の Glu/T.N. を安定して高い水準に維持する製麴システムの構築と実用化を目的とした。醤油麴の分生子数を低下させる 1 方法として, 通常用いられる短毛で分生子着生の旺盛な麴菌と長毛で分生子着生時期の遅い麴菌の混合培養を取り上げた。この混合培養麴は飛散麴菌分生子がほとんど観察されないだけでなくグルタミナーゼ活性が高く結果的に生揚げ醤油の Glu/T.N. を増加させ当初の目的を達成した。現在, K 2-4 株に由来する HG 株のグルタミナーゼ生産促進因子について検討を加えているところである。

製造現場の麴や諸味は混合培養系であってそこに存在する微生物のバランスは製品の香味に影響する。無数に存在する微生物の組み合わせの中で, 今後さらに, 有用な混合培養系が見い出されその相互作用の解明が進むことを期待する。 <福岡県醤油醸造協同組合>

文 献

- 1) 黒島英三郎, 大山義朗, 松尾隆治, 杉森恒武: 発工, **47**, 693 (1969)
- 2) 四方日出男, 安井卓男, 石上有造, 大森邦英: 醬研, **5**, 21 (1979)
- 3) 安井卓男, 四方日出男, 石上有造: 醬研, **8**, 117 (1982)
- 4) S. YAMAMOTO and H. HIROOKA: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 564 (1974)
- 5) 中野政弘, 太田輝夫: 食料研究所研究報告, **18**, 60 (1964)
- 6) 中野政弘, 太田輝夫: 醸協, **62**, 639 (1966)
- 7) 中野政弘, 太田輝夫: 醸協, **62**, 743 (1966)
- 8) J. FIEDUREK, Z. ILCZUK and A. PASZCZYNSKI: *Starch/Stärke*, **36**, 358 (1984)
- 9) T. UEKI, Y. NODA, Y. TERAMOTO, R. OHBA and S. UEDA: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 694 (1994)
- 10) T. UEKI, Y. NODA, Y. TERAMOTO, R. OHBA and S. UEDA: *J. Ferment. Technol.*, **78**, 262 (1994)
- 11) 植木達朗, 野田義治, 大場和則, 上田誠之助:

醬研, **23**, 61 (1997)

- 12) 植木達朗, 野田義治, 大場和則, 上田誠之助:
醬研, **23**, 111 (1997)

- 13) 寺本淳身, 石毛雅夫, 古谷 武, 内田一生, 吉
野 宏: 農化, **59**, 245 (1985)