酵素による醤油麹菌体量の定量および 菌体量の醸造上の意味について

加藤 威, 小林邦男, 泉 保廣, 花岡嘉夫

(キッコーマン醤油株式会社関西工場研究課)

昭和 51 年 3 月 31 日 受理

An Enzymatic Method for the Estimation of the Mycelial Content of *Shoyu koji* and the Significance of its Content in *Shoyu* Production

By Takeshi KATOU, Kunio KOBAYASHI, Yasuhiro IZUMI and Yoshio HANAOKA

Research Laboratory, Kansai Plant, Kikkoman Shoyu Co., Ltd.,

Takasago Hyogo

An enzymatic method was devised for the estimation of mycelial content of *Shoyu koji* and the significance of its content in *Shoyu* production was studied.

The crude enzyme preparation, containing β -1,3-glucanase and chitinase, was separated from the culture fluid of *B. circulans* (IAM 1165). This enzyme had the lytic activity on the cell walls of *Asp. sojae* X-816 and liberated N-acetylglucosamine. Determining the liberated N-acetylglucosamine as a clue, mycelial content was calculated.

Correlation analyses of mycelial content vs. various indications for *Shoyu* production yielded following correlation coefficients, mycelial content vs. protease activity of koji: 0.693, ** vs. amylase activity of koji: 0.723, ** vs. degradation rate of total-N in koji digestion: 0.602, ** vs. ratio of amino-N to total-N in koji digestion: 0.314, vs. ratio of glutamic acid to total-N in koji digestion: 0.595. **

As the result of contingency table tests, there existed no relation between spore formations of koji and either the mycelial content or the degradation rate of total-N.

(Received March 31, 1976)

緒 言

醤油麹は原料の大豆, 小麦の混合物に直接麹菌を生育させ, これを食塩水とともに仕込むものであるが, その良否は製品品質, 原料の利用性に大きな影響を及ぼすため, 良い麹を得ることは製造上重要な問題となっている。しかしながら, 良い麹の判定はむづかしく, 現在はプロテアーゼ, アミラーゼなど生成酵素の活性, あるいは孢子着生の程度を意味する“花付”等, いわば間接的方法により行なわれている。そこで醤油麹中の麹菌体量を直接定量し, 麹良否の判定の一助としようと考えた。

固体麹中の麹菌体量の定量については, すでに報告がなされている。米麹における有馬ら⁽¹⁾, 大内ら⁽²⁾, 醤油麹における小崎ら⁽³⁾の報告である。これらの報告は, す

べて試料麹を酸分解し, 麹菌細胞壁の成分であるキチンより生成するグルコサミンを定量指標としたものであるが, 原料の米, 大豆, 小麦よりの定量妨害物質を除去する操作が煩雑である。

掘越ら⁽⁴⁾によると, *Bacillus circulans* IAM 1165 は β -1,3-グルカナーゼ, およびキチナーゼを良く生産し, その培養液は麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 細胞壁を特異的に溶解する。

本報告は, *B. circulans* IAM 1165 の生成する酵素を醤油麹菌 (*Asp. sojae* X-816)⁽⁵⁾ に作用させ, 生成する N-アセチルグルコサミンを指標として醤油麹中の菌体量の定量を試み, さらにその方法で求めた菌体量が醸造上に有する意味を考察するため, 菌体量と既存の各種醸造指標との相関関係を検討したものである。

実験方法

I. 定量法の検討

1. 溶菌酵素の調製

i) 培地の調製: 堀越らの培地⁽⁴⁾に準じたが, 前培養培地としてはグルコースを 10.0g/l あて補強したものを, 本培養培地としてはグルコースを除き, 代りに後述する方法で採取した麴菌菌糸 (*Asp. sojae* X-816) を 30.0g (wet weight)/l あて添加したものを使用した. 麴菌菌糸の採取は, 次のとおりに行なった. 麴と穀殻を等量混合したものに, 重量で 80% の水を撒水し, 水蒸気で, 120°C, 30 分加圧殺菌後, *Asp. sojae* X-816 の種麴を接種し, 30°C で 3 日間培養した. 得られた麴に約 5 倍量の水を加えて良く混合, 攪拌後, 振動ふるい (三英製作所製) でふるい分けした. 150~400 メッシュ区分に集まる麴菌菌糸を採取し, 充分に水洗後検鏡して, 菌糸のみであることを確認した.

ii) *B. circulans* IAM 1165 の培養: 前述の前培養培地を殺菌試験管, および坂口コルペンにそれぞれ 10ml および 100ml ずつ採り, 120°C, 10 分間の加圧殺菌を行なった. 次に常法に従い, *B. circulans* の 1 白金耳を試験管中の培地に接種し, 30°C で 3 日間振盪培養した. この 1 本を坂口コルペン 1 本に接種し, 同様に 3 日間振盪培養した. この 3 本を前述の本培養培地 10l を含み, あらかじめ 120°C, 30 分間の加圧殺菌を行なったジャーファーマンター (丸菱理化学装置研究所 Disk Turbin Type, 20l 容量) に接種し, 37°C で 3 日間通気攪拌培養した. 通気は 10l/min, 攪拌は 300rpm で行なった.

iii) 酵素の調製: ジャーより排出した培養ブ罗斯を, 15,000×g で連続遠心分離 (トミー精工 No.90 UV 冷凍遠心機) し, その上澄液に硫酸アンモニウムを 70% 飽和あて添加後, 5°C で 1 夜放置した. 生じた沈殿を 1500×g で再び連続遠心分離し, pH 7.0 McIlvaine buffer 500 ml に溶解後, 1 昼夜 5°C の水に対して透析した. 次に, この透析内液の 40~60% 硫酸アンモニウム飽和で沈殿する区分を pH 7.0 McIlvaine buffer に溶解し, 蒸留水で充分透析後, 凍結乾燥した. 得られた粉末を溶菌酵素標品とし, 以後の実験に使用した.

iv) 酵素活性の測定: 麴菌の溶解に必要な β -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼの活性は, 次のように測定した.

β -1,3-グルカナーゼ活性: ラミナリン (ICN pharma-

ceuticals Inc.) を pH 6.5 McIlvaine buffer に 0.33% あて溶解し, この 4.5ml に前述の溶菌酵素標品の 1% 水溶液 0.5ml を添加し, 37°C で 5 分間酵素反応させた. 所定時間後, 100°C で 3 分間加熱して反応を止め, 塩酸およびカ性ソーダで pH 5.5 とし, 全体を 20ml に定容とした. この 1ml 中の生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ-パーオキシダーゼ法^(6,7)で定量し, 酵素標品 1mg 当りの生成グルコース量 (μ mole) に換算して酵素活性とした. なお, 反応 pH 6.5 はラミナリンを基質とし, 上述の方法で活性を求めた場合の至適 pH である.

キチナーゼ活性: Hackman⁽⁸⁾ および Berger⁽⁹⁾ の方法に準じて調製したコロイドキチン 2ml へ, 常用の 1/10 濃度に調製した pH 7.0 McIlvaine buffer 4ml と 0.5% 溶菌酵素液 1ml を添加して, 37°C で 2 時間酵素反応させた. 所定時間後, 100°C で 3 分間加熱して反応を停止させ, 反応液を 0.65 μ のメンブランフィルターで吸引濾過した. 濾液中の N-アセチルグルコサミン (以後 GlcNAc と略す) を Morgan-Elson 法⁽¹⁰⁾で比色定量し (124 形日立ダブルビーム分光光度計), 酵素標品 1mg 当りの生成 GlcNAc 量 (μ mole) に換算して酵素活性とした. なお, 反応 pH 7.0 はコロイドキチンを基質とし, pH 5.0~8.0 を McIlvaine buffer で 0.5 間隔に調製し, 上述の方法で活性を求めた場合の至適 pH である. また, McIlvaine buffer を常用の 1/10 濃度で使ったのは, Morgan-Elson 法における発色反応が至適 pH 8.9⁽¹¹⁾で行なわれるようにするためである.

2. 試料の調製

i) 醤油麴の培養: 重量で 125% の水を撒水した脱脂大豆を 120°C で 30 分間加圧蒸煮し, 放冷後, 撒水前の脱脂大豆と等量の炒熬割砕小麦を加えて良く混合した. これに *Asp. sojae* X-816 の種麴を少量接種して, 30°C で 3 日間培養した. 以後, 醤油麴を単に麴と記述する.

ii) 麴中の微生物の採取: 麴中に存在する微生物で当社中央研究所保存の *Asp. sojae* X-816, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus caseolyticus* M 160⁽¹²⁾ を, それらが実際の製造過程で生育する環境と近似した培地で純粋培養し, 生育菌体を採取した.

Asp. sojae X-816: 脱脂大豆および炒熬小麦を 40 メッシュ以下に粉碎し, これらを等量ずつ混合した. これに, その重量の約 4 倍の水 (クロラムフェニコール 50 γ /ml 含有) を加えて泥状とし, シャーレに分注後 120°C,

30 分の加圧殺菌を行なって培地とした。乾熱殺菌した筆を用い、*Asp. sojae* X-816 の胞子をナイロン濾布上に無菌的に塗布し、これを前述の泥状培地上に置き、30°C で 3 日間培養した。濾布上に生育した菌体を集め、蒸留水で 4 回洗浄後、凍結乾燥した。

B. subtilis, *M. caseolyticus* M-160 : 前述の方法で培養した麴に 5 倍量の水を加え、30°C で 4 時間放置後、全体を濾紙濾過した。濾液の pH を 8N カ性ソーダで 7.0 に調製後、120°C、10 分間の加圧殺菌を行ない、生ずる沈殿を 15,000×g で 10 分間遠心分離し、さらにその上澄液を 0.65 μ のメンブランフィルターで殺菌試験管中へ無菌濾過し、これを培地とした。この培地へ、それぞれのスラントより 1 白金耳あて接種し、30°C、24 時間の振盪培養を行ない、生育菌体を 8000×g で 10 分間遠心分離した。以後蒸留水を用い、同様な遠心分離による洗浄を 4 回くり返し、最後に菌体を凍結乾燥した。

3. 定量原理の確認 : 麴 80 g に 12% 食塩水 250 ml およびトルエン 10 ml を添加し、ミキサーでホモゲナイズした後、37°C で 2 日間消化した。このときの食塩濃度は、約 8% となる。また、消化スラリーの採取は先太のピペットで行なったが、その粘性、およびホモゲナイズの際にスラリー中へ巻き込まれる気泡等のため、採取する絶対容量の正確さは期しがたい。従って、以下に記すスラリーの採取容量は、すべて相対値と見なし、採取絶対量が必要な場合は後述するごとく、食塩量を基にして行なった。

消化スラリーの 2, 4 および 6 ml を先太のピペットで採取し、東洋濾紙 No. 2 上で、その洗液が 250 ml となるまで水洗した。濾紙上の残渣を前述したごとく、常用の 1/10 濃度に調製した pH 7.0 McIlvaine buffer でそれぞれ別個の L 字管中へ洗い込み、その全容を 14 ml とした。その中へ 0.5% の溶菌酵素液 1 ml ずつを加え、37°C で酵素反応させた。反応時間が 1, 2, 3 および 4 時間のとき、各反応液より 3 ml ずつを採取し、ただちに反応を停止後、東洋濾紙 No. 5 で濾紙濾過した。濾液中の生成 GlcNAc を Morgan-Elson 法で定量し、585 nm における各吸光度 (O. D.₅₈₅ と略す) で表示した。なお、反応 pH 7.0 は前述した *Asp. sojae* X-816 の乾燥菌体を基質とし、溶菌酵素を作用させて求めた至適 pH である。

4. 標準添加法による菌体量の推定 : 前述どおりホモゲナイズした麴のスラリー 5 ml ずつを 4 本の試験管

に採り、この中へ *Asp. sojae* X-816 の乾燥菌体を 0, 50, 100 および 150 mg あて添加し、37°C で 2 日間消化した。以後、前述したごとく各消化液を濾紙上で水洗し、その残渣を L 字管中へ洗い込み、各全容を 14 ml とした。この中へ 0.5% の溶菌酵素液 1 ml ずつを添加して、37°C で 2 時間酵素反応させ、各々の生成 GlcNAc を定量し、各 O. D.₅₈₅ で表示した。

5. 麴菌細胞壁の自己消化 : 麴 80 g に蒸留水 250 ml およびトルエン 10 ml を添加し、ただちにミキサーでホモゲナイズ後、その 5 ml ずつを 5 本の試験管に採り、この中へそれぞれの食塩濃度が 0, 5, 10, 15 および 20% となるように結晶食塩を添加した。37°C で 2 日間消化した後、各々の消化液を前述どおりに水洗し、その残渣を L 字管中へ洗い込み、各全容を 14 ml とした。この中へ 0.5% 溶菌酵素液 1 ml ずつを添加して、37°C で 2 時間酵素反応させ、各々の生成 GlcNAc を定量し、O. D.₅₈₅ で表示した。

6. 共存物質の影響 : 麴に重量で約 5 倍量の水を加え、30°C で 5 時間抽出後、濾紙濾過した。得られた濾液をさらに 15,000×g で 10 分間遠心分離し、その上澄液に結晶食塩を添加して、その濃度が 8% となるようにした。これを酵素液とし、この 8 ml ずつを 6 本の試験管に分注し、それぞれへ蒸着脱脂大豆 1 g、炒熟割砕小麦 500 mg、前二者の混合物、および *Asp. sojae* X-816, *B. subtilis*, *M. caseolyticus* M 160 の各乾燥菌体 75 mg を添加して、37°C で 2 日間消化した。次に、それぞれの消化残渣を 15,000×g で 10 分間遠心分離し、引き続き同様な遠心分離による水洗を行なった後、各残渣に 1/10 濃度の pH 7.0 McIlvaine buffer 14 ml および 0.5% 溶菌酵素液 1 ml ずつを添加して、37°C で酵素反応させた。2 時間後反応を停止させ、15,000×g で 10 分間の遠心分離を行ない、各上澄液中の GlcNAc を定量し、O. D.₅₈₅ で表示した。なお、脱脂大豆、小麦および *Asp. sojae* X-816 の供試量については、前述した麴の消化スラリー 5 ml 中に含まれる妥当な推定量であるが、*B. subtilis*, *M. caseolyticus* M 160 のそれについては、推定量の約 10 倍の量である。

II. 菌体量の醸造上の意味

1. 菌体量の異なる麴の培養 : 培養方法は前述どおりとしたが、菌体量が広範囲で異なるようにするため、種麴の接種量を 5 段階に変えた。すなわち、麴と粃殻に培養した *Asp. sojae* X-816 の種麴をふるい分けし、145

メッシュ以下に集中する胞子を集め、接種後の胞子数が 5×10^4 , 2.5×10^5 , 5×10^6 , 2.5×10^6 および 5×10^6 個/g となるようにした。各段階とも 4 サンプルずつとし、計 20 サンプルを 30°C で 3 日間培養した。

2. 麴水分の測定： 上述の麴各 5 g を精秤し、 105°C で 6 時間乾燥した場合の各減量分を麴水分とした。

3. 酵素活性の測定： 醬油分析法⁽¹³⁾に記載されている方法を一部改変して行なった。麴 10 g に蒸留水 200 ml を添加し、ときおり振盪しつつ室温で 5 時間抽出後、東洋濾紙 No. 2 で濾過し、その濾液を酵素液とした。

プロテアーゼ活性：カゼイン-275 nm 吸収法⁽¹⁴⁾で行なった。pH 7.0 McIlvaine buffer に溶解した 0.6% カゼイン (Hammarsten Merk) 溶液 5 ml に、前述の酵素液の 5 倍希釈液 1 ml ずつを添加し、 30°C で 10 分間酵素反応させた。所定時間後、0.44 M トリクロル酢酸溶液 5 ml を添加して反応を停止させ、約 20 分放置して蛋白質の沈殿を完全にした。沈殿を東洋濾紙 No. 5 で濾別し、濾液の 275 nm における吸光度 (O. D.₂₇₅) を測定した。測定試料の O. D.₂₇₅ から、それぞれのブランク値を差し引き、酵素液の希釈を考慮し、乾燥麴 1 g 当りの O. D.₂₇₅ に換算して表示した。

アミラーゼ活性：可溶性デンプンを基質とした場合の生成還元糖を測定して、酵素活性とした。30 ml 容の試験管に 0.2% 可溶性デンプン水溶液 1 ml, 0.02 M pH 4.8 酢酸緩衝液 0.5 ml および 10 倍希釈の酵素液 0.5 ml を添加し、 30°C で 10 分間酵素反応させた。これにソモギーの銅試薬 2 ml を加えて反応を停止させ、以後 Somogyi-Nelson の常法⁽¹⁵⁾に従い、生成還元糖を 500 nm における吸光度 (O. D.₅₀₀) で測定した。プロテアーゼ活性と同様、それぞれのブランク値を差し引き、希釈倍率を考慮し、乾燥麴 1 g 当りの O. D.₅₀₀ に換算して表示した。

4. 麴菌体量の測定： 後述する考察の項に記した方法で行なった。

5. 麴の溶解および成分分析： 試料麴 10 g に 21.6% 食塩水 125 ml とトルエン 5 ml を添加し、 37°C で 14 日間消化した。次にその全体をミキサーでホモゲナイズした後、一部を東洋濾紙 No. 2 で濾過し、濾液中の総窒素 (TN と略)、アミノ態窒素 (Amino-N と略)、グルタミン酸 (Glu-A と略) を醬油分析法に従って分析した。また原料窒素の溶解性は、次のように算出した。各麴のホモゲナイズスラリー約 5 ml を東洋濾紙 No. 2 で

濾過洗浄し、その洗液を 250 ml に定容とした。洗液および濾紙上の残渣の総窒素をそれぞれ A および B とした場合、 $A/(A+B) \times 100$ をもって原料窒素の溶解性とした。

6. 相関分析： 菌体量 vs. 各種醸造指標、すなわちプロテアーゼ活性、アミラーゼ活性、原料窒素の溶解性、溶解液の Amino-N/TN, Glu-A/TN につき各相関図を描き、それぞれの相関係数を算出した。

7. いわゆる“花付”と菌体量および原料窒素の溶解性との関係： いわゆる“花付”とは麴を肉眼観察した場合、麴菌胞子に起因する黄色の程度を意味するが、この花付と菌体量および原料窒素の溶解性との関係につき検討した。I-2-i の方法で無作為に培養した 1 対の麴を試料とし、いずれか一方の麴に着目して花付の良否、および測定菌体量の多少に関する順位付を行なった。すなわち花付、菌体量ともに 1 位の場合には (1, 1)、花付は 1 位、菌体量は 2 位の場合には (1, 2)、同様に (2, 1), (2, 2) 等の符号をその麴に付した。同様のことを 1 日 1 対ずつ 24 対の麴について行ない、各符号の発生回数につき 2×2 分割表を作成した。このデータをもとに独立性に関する χ^2 -検定を行ない、花付と菌体量が独立であるか否かを検討した。また、花付と原料窒素の溶解性についても、同様なことを行なった。

結果および考察

I. 定量法の検討

溶菌酵素 5 ロットの β -1, 3-グルカナーゼおよびキチナーゼ活性の平均は、それぞれ $2.22 \mu\text{mole/mg}$, $0.23 \mu\text{mole/mg}$ で、その標準偏差は 0.66, 0.09 であった。以後の結果は、 β -1, 3-グルカナーゼ活性が $1.74 \mu\text{mole/mg}$, キチナーゼ活性が $0.29 \mu\text{mole/mg}$ の標品を用いて行なった実験結果である。

1. 定量原理および標準添加法による菌体量の推定： 基質の麴スラリーを 2, 4 および 6 ml と変化させた場合の各反応時間における GlcNAc の生成量を Fig. 1 に示した。図に示すごとく、各反応時間とも、生成 GlcNAc と供試スラリー量とは直線関係を有し、後述する Table II の結果 (GlcNAc は麴菌菌体のみに由来する) も考慮すると、一定時間における GlcNAc の生成量は、基質菌体濃度に比例すると判断された。従って、この GlcNAc の生成量を比較することにより、試料間の麴菌体量の比較が可能となった。以後の実験においては適度な吸光度

を考慮し、反応時間をすべて 2 時間に統一した。

次に、菌体量の絶対量の推定を標準添加法で行なった一例を Fig. 2 に示した。供試スラリー中の大豆、小麦

Fig. 1. Liberation of N-Acetylglucosamine by Lytic Enzyme.

Shoyu koji was homogenized and digested at 37°C in the concentration of 8% NaCl. After two days, 2, 4, 6 ml of digested slurries were washed with water on separate filter papers. Using pH 7.0 McIlvaine buffer, each residue on the paper was transferred to test tube and the total volume of each was adjusted to 14 ml. Adding 1 ml portions of 0.5% lytic enzyme solution, mixtures were incubated at 37°C in the presence of toluene. Liberated N-acetylglucosamine was determined by Morgan-Elson method at hourly intervals. —○— 1 hr, —△— 2 hr, —●— 3 hr, —▲— 4 hr.

Fig. 2. Estimation of Mycelial Content by the Method of Standard Additions.

0, 50, 100, 150 mg of dry cells of *Asp. sojae* X-816 were separately added to 5 ml of homogenized slurries of *koji* and the mixtures were digested at 37°C in the concentration of 8% NaCl. In similar procedures as Fig. 1, each residue was transferred to test tube and incubated with the lytic enzyme at 37°C. After two hours, liberated N-acetylglucosamine was determined by Morgan-Elson method. Confer Table II for the meaning of the base line (0.03).

に由来する O. D. ₅₈₅ は後述するごとく 0.03 であるためこれを考慮するとこの例の場合は、スラリー 5 ml 中に 90mg の乾燥菌体が含まれていると推定された。この値を基にして乾燥菌体含量(%)を計算するわけであるが前述した理由で採取容量は絶対的ではないため、代りに食塩量を手掛かりとして次のように行なった。

硝酸銀規定液で定量した洗液 250 ml, すなわちスラリー 5 ml 中の食塩量は 0.3 g であった。一方、試料麴 80 g の消化の際に使用した 12% 食塩水 250 ml 中の食塩量は 30 g であるため、この中に含まれる乾燥菌体量は 9 g と計算された。さらに、麴の水分 30% を考慮して、乾物換算すれば 12.8 となり、小崎ら⁽³⁾の報告とほぼ一致した。なお、この標準添加法はすべての試料については行なわず、他の試料については、Fig. 2 より求めた O. D. = 1.0 当りの乾燥菌体量 (=360 mg) をもとにして計算した。

2. 麹菌の自己消化 : *Asp. sojae* X-816 を培養して得られる麹はわずかではあるが、溶菌酵素 β -1, 3-グルカナーゼおよびキチナーゼ活性を示す⁽¹⁶⁾。従って、定量操作における麹の消化に際し、麹菌の細胞壁が溶解されることがあれば定量誤差を生ずる。これを防止するため、 β -1, 3-グルカナーゼおよびキチナーゼの非耐塩性に着目し、麹の消化に 12% 食塩水を使用したわけであるが、その効果を Table I に示した。異なる 5 種の食塩濃度で消化した各残渣より生成する GlcNAc 量はほとんど変わらず、消化中、特に食塩存在下における麹菌の自己消化は無視し得るものと判断した。

3. 共存物質の影響 : 本定量法は GlcNAc を定量指

Table I. Autolysis of *Asp. sojae* X-816 in Digesting *Shoyu koji* at Various Concentrations of NaCl

NaCl concentration in digesting sample <i>koji</i> (%)	O. D. ₅₈₅
0	0.190
5.00	0.190
9.60	0.202
14.16	0.202
18.80	0.216

Homogenized slurries of *koji* were digested at 37°C for two days in various concentrations of NaCl. In similar procedures as Fig. 1, 5 ml portions of digested slurries were washed with water and each residue was transferred to test tube and incubated with the lytic enzyme at 37°C. After two hours, liberated N-acetylglucosamine was determined.

Table II. Effects of Coexistings in *Shoyu koji* on the Estimation of Mycelial Content

Sample	O. D. ₅₈₅
Cooked soybeans	0.02
Roasted wheat	0.02
Cooked soybeans+roasted wheat	0.03
<i>Aspergillus sojae</i> X-816	0.23
<i>Bacillus subtilis</i>	0.02
<i>Micrococcus caseolyticus</i> M160	0.02

One g of cooked soybeans, 500 mg of roasted wheat, mixture of cooked soybean (1g) and roasted wheat (500 mg), 75 mg of dry matters of *Asp. sojae* X-816, *M. caseolyticus* M160, and *B. subtilis* were incubated with the enzyme solution extracted from *Shoyu koji* at 37°C in the concentration of 8% NaCl. After two days, washed with water by centrifugation at 15,000 × g, each residue was incubated with 15 ml of lytic enzyme solution for two hours at 37°C. Liberated N-acetylglucosamine was determined by Morgan-Elson method.

標としているが、麴中には麴菌菌体以外にも GlcNAc を含むものがある。すなわち、一般細菌はその細胞壁に N-アセチルムラミン酸と結合して大量に、大豆はその蛋白質中に糖蛋白として^(17,18)、また酵母類はその出芽痕にキチン⁽¹⁹⁾として、それぞれ少量ずつ含有している。従って、溶菌酵素によって、これらの物質より GlcNAc が溶出するならば、定量法は不正確なものとなる。これを確認するための実験であるが、麴中の酵母類はほとんど無視し得る数⁽²⁰⁾であるため、これを除外し、大量成分である小麦を加えて実験を行なった。結果 (Table II) に示すとおり、*Asp. sojae* X-816 の O. D.₅₈₅ が圧倒的に大きく、麴の消化残渣に溶菌酵素を作用させて生成する GlcNAc は、ほとんど麴菌のみに由来すると判断した。次に共存物質の影響であるが、細菌類の O. D.₅₈₅ は前述した実験条件を考慮すると完全に無視し得るが、大豆、小麦の混合物の O. D.₅₈₅ は大豆中の GlcNAc 含量が僅少^(17,18)であることを考慮すると、その値 0.03 は GlcNAc に起因するとは思われないが、菌体量の正確な推定には、この値をブランクとして控除する必要があると判断した。

4. 結論：以上の結果から、次の結論に達する。麴を食塩存在下に消化すると、目的である麴菌菌体は溶解されずに残渣に残る。この残渣は麴菌のみでなく、原料等、他物質からの溶解残渣をも含んでいるが、これに溶菌酵素を作用させると、麴菌体のみより GlcNAc が生成する。この GlcNAc の一定時間における生成量は基質

Fig. 3. Correlation analyses of Mycelial Content vs. Various Indications for *Shoyu* production.

Twenty samples of *koji* were cultured so that the mycelial content varied each other. With these samples, correlation analyses of mycelial content vs. various indications for *Shoyu* production were performed. Correlation coefficient was shown in each scatter diagram. ** significant at 1% level.

菌体濃度に比例するため、これを定量することにより試料中の麴菌体量が定量できる。

具体的定量法は、次のように要約される。麴 80 g に 12% 食塩水 250 ml およびトルエン 10 ml を添加後、ミキサーでホモゲナイズして 37°C で 2 日間消化する。この消化スラリー 5 ml を先太のピペットで採取し、東洋濾紙 No.2 上で、その洗液が 250 ml となるまで水洗する。濾紙上の残渣を、常用の 1/10 濃度に調製した pH

7.0 McIlvaine buffer を用いて L 字管中へ完全に洗い込み, その全容を 14 ml とする. この中へ溶菌酵素の 0.5 % 水溶液 1 ml を添加して 37°C で 2 時間酵素反応させ, 反応停止後全体を東洋濾紙 No. 5 で濾過し, 濾液中の GlcNAc を定量する. 得られた O. D.₅₈₅ からブランク O. D.₅₈₅ (=0.03) を控除し, O. D.₅₈₅=1.0 当りの乾燥菌体量 360 mg, 麹スラリー 5 ml 中の食塩量, 麹の消化の際に使用した全食塩量, および麹の水分とから, 前述したごとく乾燥麹 100 g 当りの乾燥菌体量を算出する.

II. 菌体量の醸造上の意味

1. 菌体量と醸造指標との相関: モデル的に培養した麹 20 種の菌体量と各種醸造指標との相関図, および算出された相関係数を Fig. 3 に示した. 菌体量 *vs.* Amino-N/TN については相関関係が認められなかったが, 他の菌体量 *vs.* プロテアーゼ, アミラーゼの活性, 原料窒素の溶解性, Glu-A/TN については, 1% 危険率でそれぞれ正の相関関係を示した. この結果は, 菌体量が多くなれば各種醸造指標は好ましい方向へ移行することを示し, 常識的ではあるが, 原料の麹化の程度が進むほど良いことを示した. なお, 相関分析は相対値の比較で足りるため, Fig. 3 の菌体量の算出には, 前述のブランク値の控除は省略した. このため, 図中の菌体値は 1% 程度高い値を示している.

2. 花付と菌体量および原料窒素の溶解性: “花付”は麹の良否を判定する重大な指標の 1 つとされているが, これが真実良否を表現し得るものかを検討した. 花付と菌体量および原料窒素の溶解性に関する 2×2 分割表を, Table III および IV に示した. 帰無仮説を“花付と菌体量は無関係”, “花付と原料窒素の溶解性は無関係”として Yates の修正式に従って χ^2 を求めると,

Table III. 2×2 Contingency Tables about the Ranks of Spore Formations and Mycelial Content

Mycelial content	Spore formations		Total
	1 st	2 nd	
1 st	8	4	12
2 nd	6	6	12
Total	14	10	24

After fixing the ranks of spore formations and mycelial content in a pair of *koji*, a contingency tables was constructed with 24 pairs about the both ranks of either *koji*. Chi-square test for independence was performed. $\chi=0.171 < \chi_0$ (region of rejection)=3.84. Therefore the hypothesis could not be rejected.

Table IV. 2×2 Contingency Tables about the Ranks of Spore Formations and the Degradation Rate of Total-N

Degradation rate of total-N	Spore formations		Total
	1 st	2 nd	
1 st	8	7	15
2 nd	6	3	9
Total	14	10	24

After fixing the ranks of spore formations and the degradation rate of total-N in a pair of *koji*, a contingency tables was constructed with 24 pairs about the both ranks of either *koji*. Chi-square test for independence was performed. $\chi=0.020 < \chi_0$ (region of rejection)=3.84. Therefore the hypothesis could not be rejected.

それぞれ 0.171, および 0.020 となり, 自由度 1 の χ^2 -分布の有意水準 5% の棄却域には入らず, 仮説は棄却されなかった. 従って, 花付は菌体量および原料窒素の溶解性の両者に対して独立であると判断された. 花付不良なるも, 両者とも良好な麹, またその逆の関係の麹の存在を示唆し, 麹花付は菌体量および原料窒素の溶解性を完全に表現しているとはいきえず, これを絶対視することは危険と思われた.

要 約

1. 酵素による麹菌体量の定量法を確立した. 試料麹を食塩存在下に消化すると, 目的である麹菌体は溶解されずに残渣中に残る. この残渣は麹菌体のみでなく, 他物質よりの溶解残渣をも含んでいるが, これに *B. circulans* IAM 1165 の培養液より調製した溶菌酵素を作用させると, 麹菌体のみより N-アセチルグルコサミンが生成する. この N-アセチルグルコサミンの一定時間における生成量は基質菌体濃度に比例するため, これを測定することにより試料中の麹菌体量が定量できる. 具体的定量法は, 考察 I-4 の項に記した.

2. 上述の方法で定量した麹菌体量が醸造上に有する意味を検討するため, 菌体量と各種醸造指標との相関分析を行ない, 次のような結果を得た.

菌体量 *vs.* プロテアーゼ活性 0.693**, *vs.* アミラーゼ活性: 0.723**, *vs.* 原料窒素の溶解性: 0.602**, *vs.* Amino-N/TN: 0.314, *vs.* Glu-A/TN: 0.595**.

また, 麹花付と菌体量, 麹花付と原料窒素の溶解性につき, 独立性に関する χ^2 -検定を行なった. 両関係とも互いに独立であることが判明し, 従来, 花付は麹良否の重大な指標の 1 つとして扱われているが, これを絶対視

することは危険と思われた。

終りにのぞみ, 発表を許可された安藤貴夫工場長をはじめ本社役員各位, χ^2 -検定をご指導いただいた当社中央研究所, 森修三氏, また多大なご助力をいただいた当研究課, 杉井泰利氏に深謝いたします。

- (1) K. Arima and T. Uozumi : *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 119 (1967).
- (2) 大内弘造, 石戸輝雄, 菅間誠之助 : 醸協, **62**, 1029 (1967).
- (3) 小崎道雄, 北原覚雄 : 食工誌, **21**, 38 (1974).
- (4) 堀越弘毅 : 農化, **41**, R21 (1967).
- (5) 井口信義 : 農化, **29**, 73 (1955).
- (6) 田主澄三, 川村信一郎 : 香川大農学報, **21**, 110 (1970).
- (7) 奥田 潤, 三輪一智 : 蛋白質 核酸 酵素, **17**, 216 (1972).
- (8) R. H. Hackman : *Australian J. Biol. Sci.*, **7**, 168 (1954).
- (9) L. R. Berger and D. M. Reynolds : *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 522 (1958).
- (10) 鈴木 旺, 松村 剛, 山科郁男 : 多糖生化学, 第 1 巻, 共立出版, 1969, p. 55.
- (11) J. L. Reissing, J. L. Storminger and L. F. Leloir : *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955).
- (12) 北原成之, 石塚善太郎 : 醸工, **47**, 1 (1967).
- (13) 日本醤油研究会編 : 醤油分析法, 1966, p. 63.
- (14) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, 第 2 巻, 朝倉書店, 1955, p. 237.
- (15) 安藤鋭郎, 寺山 宏, 西沢一俊, 山川民夫 : 生化学研究法, 第 1 巻, 朝倉書店, 1967, p. 256.
- (16) 菊地志昭, 石井茂孝, 福島男児, 横塚 保 : 農化, **45**, 235 (1971).
- (17) I. Koshiyama : *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 874 (1967).
- (18) 中浜敏雄編 : 醤油醸造の最新の技術と研究, 日本醸造協会, 1972, p. 8.
- (19) E. Cabib and B. Owers : *J. Biol. Chem.*, **246**, 152 (1971).
- (20) 芳賀 宏 : 調味科学, **20**(1), 13 (1973).