

### 3 発 酵 工 業 部

#### 3.1 種麴の違いによる醤油醸造特性の差異について

日高 修<sup>※</sup>, 中村照志<sup>※</sup>, 水元弘二, 東 邦雄 (※鹿児島県醤油醸造協同組合)

##### Some Differences in Characteristics of Soy Sauce Brewing Species of Koji-Mold

Osamu HIDAKA, Terushi NAKAMURA, Koji MIZUMOTO and Kunio  
HIGASHI (※Kagoshima Shoyu Brewing Cooperation)

市販種麴より麴菌株をスクリーニングし、その形態及び生理作用の特徴より *A. sojae*, *A. oryzae* の同定と配合率を測定し、又、醸造試験を行ない次のことが明らかになった。

- (1) 市販種麴のうち、*A. sojae* と *A. oryzae* の占める割合は *A. oryzae* 械単独、及び *A. oryzae* 株主体の種麴が圧倒的に多かった。
- (2) *A. sojae* 株と *A. oryzae* 株間に、プロテアーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ及びエンドポリガラクトナーゼ (Endo-PG) の3種の酵素生産能パターンに特異性が認められた。
- (3) *A. sojae* と *A. oryzae* の醸造特性について調査し、*A. sojae* は *A. oryzae* に比較して T-N 分解率、TN 溶解利用率及び L-グルタミン酸生成量が高く、火入れ量が少ない。
- (4) 熟成に関与する微生物に及ぼす影響については、*A. sojae* 株仕込みでは乳酸菌の生育が良好な反面、*Zygosaccharomyces rouxii* (S 酵母) の生育はやや抑制される傾向にあった。
- (5) ガスクロマトグラフィーによる揮発性フェノール成分定量時に偶然検出された未知物質 (*A. sojae* 株仕込みに特徴的) や、官能的評価から *A. sojae* と *A. oryzae* 株仕込み間に、香りの点でも差異が認められた。

##### 1. はじめに

麴菌の性質が、収率や製品の品質に及ぼす影響は大きく、麴菌の選択は醸造における重要な課題の1つである。村上<sup>※1</sup> は主として分生子表面の形態的特徴から、麴菌を *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarill* の3つに分類し、又、寺田<sup>※2</sup> は生理作用の面からその酵素生産能を比較し、 $\alpha$ -アミラーゼとエンドポリガラクトナーゼ (Endo-PG) の2種の酵素生産能に著しい差異を認め、*A. oryzae* と *A. sojae* の種別を容易に推進しうることを報告している。

筆者らは今回、村上、寺田の分類法に従い、生

揚工場で現在使用している種麴メーカー3社の種麴について試験し、スクリーニングを行ない、形態的分类とふすま固体培地における培養特性の観察及び酵素生産能を測定することにより、市販種麴中の *A. oryzae* と *A. sojae* との配合比率を推定し、又、小規模醸造試験ならびに工業規模醸造試験を行ない種麴の相違が品質に及ぼす影響について若干検討したので報告する。

##### 2. 実験方法

###### 2.1 供試麴菌株

種麴メーカー3社より購入の市販種麴（濃口用5点うち1点は注文ソーヤ菌株，淡口用2点），分譲株（*A. oryzae* HA, *A. sojae* K（味噌用変異株）及びスクリーニング株を使用した。

## 2.2 市販種麴標品からの麴菌株の単離

0.05%ラウリル硫酸ナトリウム殺菌水溶液に市販種麴を加え，よく振盪して麴菌胞子を懸濁調整した。さらにこの懸濁液を同じSLS 殺菌水溶液で適宜希釈し，麦芽寒天平板上にて30℃で45時間培養した。平板上に生じた30～50個の麴菌コロニーについて，その生育速度，孢子着生の状態，色調等の相違を観察し，スクリーニング株を麦芽寒天スラントで培養保存した。

## 2.3 麴菌の培養

さらに，ツアベック寒天培地による培養観察を行ない，ふすま培地（三角フラスコ内）及び脱脂加工大豆小麦培地（小規模，及び工業規模製麴）における培養特性を観察し，脱脂加工大豆・小麦培地の出麴に限り塩水で仕込み醸造した。

### 2.3.1 ふすま培地フラスコ培養

ふすまに80%散水し，その10g綿栓乾熱殺菌した200ml容三角フラスコに採り，1kg/m<sup>2</sup>で60min蒸煮した。これに各麴菌のスラントより3白金耳接種し，30℃にて66時間培養した。

### 2.3.2 脱脂加工大豆・小麦培地小規模試験

蒸煮脱脂加工大豆（180%散水，1.8kg/cm<sup>2</sup>にて3.5min処理）と炒熱割砕小麦及び各種類麴菌株を混合（等重量）し，寒冷紗で造った袋に麴を入れ，回転円盤通風製麴中に麴の中に埋め込み，常法の温度管理で43時間培養した。出麴の一部を5lを広口ガラス瓶に食塩水で仕込み，乳酸菌（*Pediococcus halophilus* P-1），T酵母（*Candida versatilis* 及び *C. etc-hellsii*）及びS酵母（*Zygosaccharomyces rouxii* S-32）を添加し，15～20℃にて1ヶ月間，25～30℃にて4ヶ月間醗酵熟成させ諸味液汁を得た。

## 2.3.3 工業用規模試験

ほぼ等量の脱脂加工大豆・小麦を約7.2トン使用し，回転円盤通風製麴装置で常法により43時間製麴後食塩水で仕込み，天然醸造法にて，約10ヵ月間（4月～翌年2月まで）熟成後，諸味液汁を得た。

## 3. 酵素液の調整

培養終了後，100mlの水とトルエン2mlを加えて室温で2時間抽出し，濾過して粗酵素液を得た。この濾液を各種の酵素活性測定に応じて適宜希釈して使用した。

### 4. 走査型電子顕微鏡による分生子の検鏡

（株）明石製作所製ALPHA-10により各スクリーニング株の分生子表面の状態を観察した。

## 5. 酵素活性測定

### 5.1 プロテアーゼ

Anson - 萩原<sup>※3</sup>の方法に準じて次のように行なった。Hammarstenのミルクカゼイン（Merck製）を基質（反応液中濃度1%）とし，30℃で10分間反応後トリクロール酢酸（5% TCA）を加えて反応を停止させ，可溶性区分のFolin試薬呈色を660nmの吸収で測定した。30℃ PH 7.0で1分間にチロシン1mg相当量のFolin試薬呈色のTCA可溶性物質を生成する酵素量を1単位とした。

### 5.2 α-アミラーゼ

不破の改変法<sup>※4</sup>に準じて行なった。可溶性デンプンを基質（反応液中0.5%）とし，PH 4.8 30℃で20分作用させたときのヨウ素デンプン呈色の低下をOD700nmにて測定した。本条件下で1mgに相当する青色ヨウ素呈色を低下せしめる酵素量を1単位とした。

### 5.3 エンドポリガラクトナーゼ(Endo-PG)

Rodoz 等の方法<sup>※5</sup>に準じ，一部改変して行なった。1gペクチン酸を25mlの水に溶かし，0.2M相当のNaClを含むMcIlvaine 緩衝液（PH4.5）25mlを混合後，一夜放置して基質溶

液とした。この基質 2 ml に酵素液 0.2 ml を加え、30℃にて60分間作用させたときの相対粘度を測定した。粘度は反応液が懸垂したガラス製ホールピペット中を落下する時間 (Sec) により測定した。本条件下で反応液の相対粘度を50%低下させる酵素量を1単位とした。

#### 5.4 凝集活性

橋本<sup>※5</sup>の方法に準じ測定した。0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> にて0.6%濃度になるように加熱溶解したミルクカゼイン (Merck製) を冷却後、17.5% NaCl を添加し、適当に希釈したHClにてPHを5.0に調整し、凝集活性用基質とした。この基質 5 ml に17.5%のNaCl含有0.05M酢酸緩衝液 (PH5.0) に溶解した酵素液を1ml添加し、40℃にて1時間反応させた。氷水で冷却して反応を停止させた。700nmにて濁度を測定した。本反応条件下で700nmにおける吸光度を0.1増加させるような活性を100単位とした。

#### 6. *A. oryzae* と *A. sojae* の分別

種麹標品より単離した麹菌株について *A. oryzae* または *A. sojae* の分別は麹菌が生産する  $\alpha$ -アミラーゼ及びEndo-PGの活性を指標する寺田らの方法と、走査型電子顕微鏡による分生子の形態観察とにより同定した。

#### 7. 出麹のPH

麹に5倍量の沸騰水を加え、10分間保って酵素反応を停止させ、冷却後直接PHを測定した。

#### 8. 火入れ歪量測定

生揚を65℃にて90分間、85℃にて60分間の二段火入れを行ない簡易的に火入れ歪容量パーセントで示した。

#### 9. 諸味液汁分析

L-乳酸、L-グルタミン酸は酵素法で、フェノール成分は野田<sup>※7</sup>らの方法により、又、一般成分は基本分析法に準じて行なった。

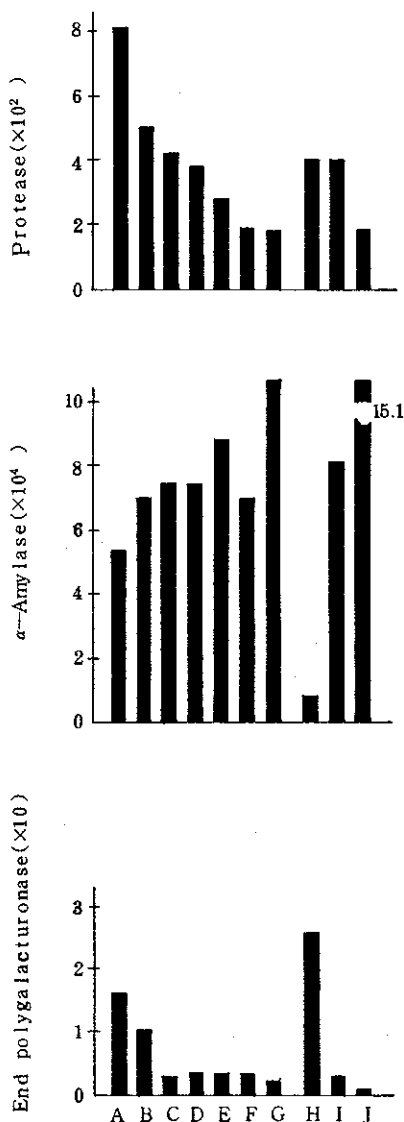


図1 市販種麹の各種酵素生産能

(ふすま培地)

A~E 市販濃口用

F・G // 淡口用

H: *A. sojae*H-A

I: *A. oryzae*H-B

J: *A. niger* (KAWACHI)

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 市販麹の酵素生産能

市販麹標品から麹菌の分離をおこなわずにそのままふすま培地、30℃64時間培養における各種麹菌株の酵素活性を測定した。図1に見られるように、まずプロテアーゼ生産能は濃口用の高いものから淡口用の低い値のものまで段階的に変化がみられた。 $\alpha$ -アミラーゼについては、A-sojaeHA標準株のような低いものは存在せず、広範囲にわたって高い値を示した。Endo-PG生産能では2例(特性ソーヤ種麹A、1メーカー新製品B、)を例外として、従来より使用中のC~Gの種麹においてはA.oryzaeHA標準株に近い低い酵素活性であった。つまりC~GはA.oryzaeの麹菌が主体であろうと推察される。

#### 3.1 市販麹からの麹菌株の単離

市販麹について麹菌の単離をおこない、これが単一菌株よりなるものか、あるいは2種以上の複合菌株よりなるものかについて検討した。生揚工場で使用中の又、使用するか検討中の市販麹を供し、単離した全コロニーについてふすま培地における酵素生産能の違いについて試験した。

その例としてまず市販種麹Cについて、プロテアーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、Endo-PGの酵素生産能パターンを図2-1に示した。

図より明らかに3酵素のいずれにおいても、A.oryzaeHA標準株に類似したパターンを示し、スクリーニング株M1~M15のいずれも親株Cと類似しており、単一菌株よりなるものと判定した(単一麹菌の例)。又、図2-2に複合菌(市販種麹B)の例を示す。スクリーニングスラント25株のうち、HHS1、2, 4~8, 10の8菌株はA.oryzaeHAやA. sojaeHB標準株の3倍強のプロテアーゼ生産能をもつのが特徴で、 $\alpha$ -アミラーゼ生産能はA.oryzaeHAの半分程度と低いが、Endo-PG生産能が高くA. sojaeタイプに属する菌株と思われる。又HHS3, HHS9はA. sojae

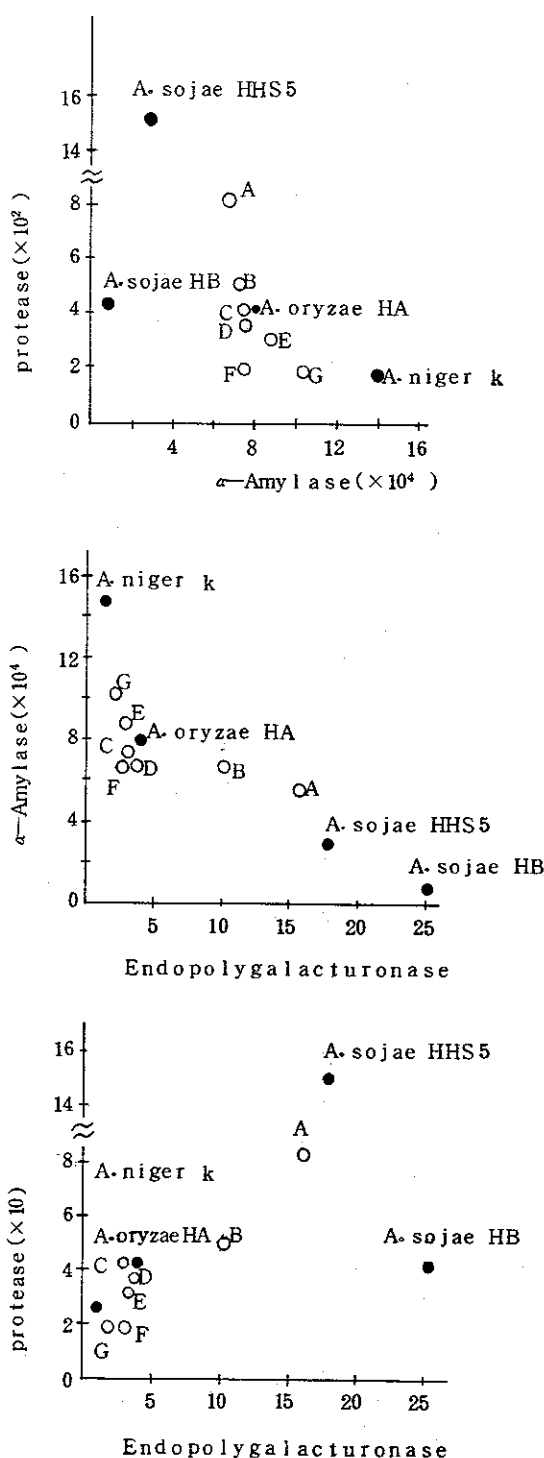


Fig1-2 市販種麹の各種酵素生産能

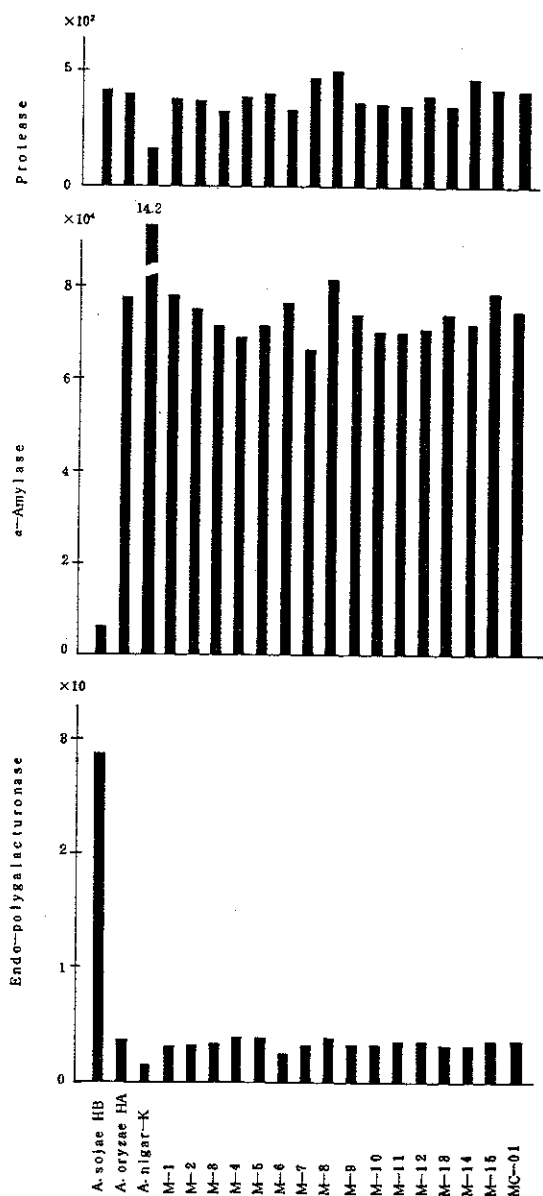
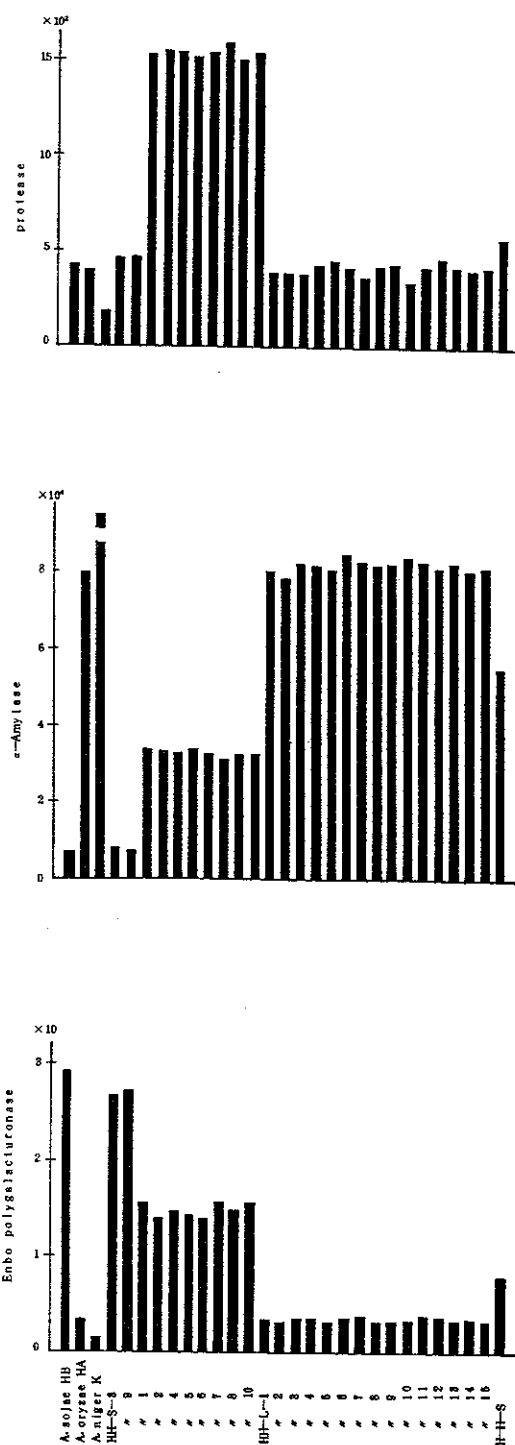


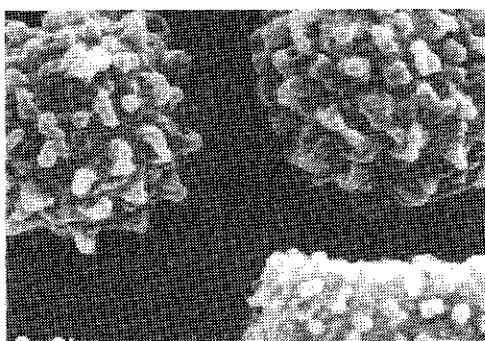
Fig2-1 スクリーニング(Cより)の

### 各種酵素生産能

HB標準株と、又HHL1~15はA. oryzae HA標準株と同様の3酵素生産能パターンを示すことにより、親種麹菌BはA. sojae 2種、A. oryzae 1種の3種の麹菌株よりなる複合菌株であろうと推定される。そしてその配合比率はA. sojae HHS 3 : A. sojae HHS 5 : A. oryzae HHL 1 = 2 : 8 : 15 程度で混合されていることになる。市販種麹(A~G)を同様に試験し、又写真1に示す分生



子表面の小突起の有無を観察し、A. oryzae 及び A. sojae の分別を明らかにし、その結果を表1にまとめた。



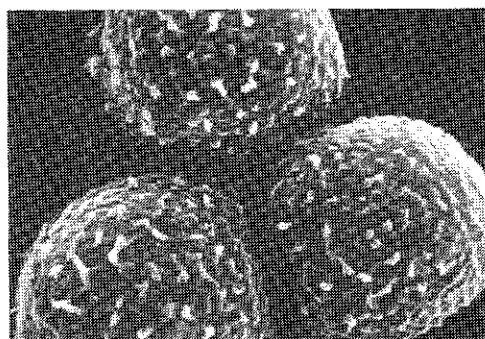
*A. sojae* HB



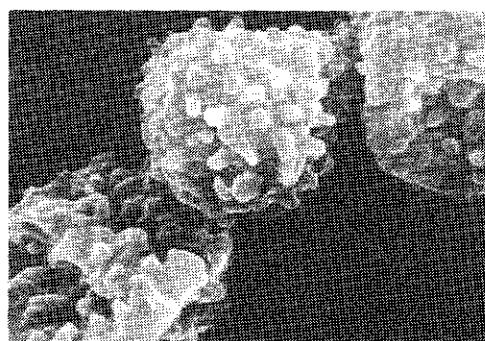
*A. oryzae* HA



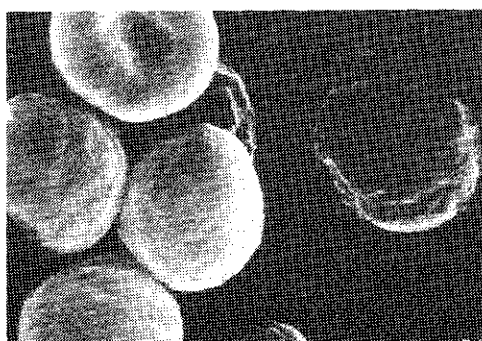
*A. sojae* HHS3



*A. oryzae* M1



*A. sojae* HHS5



*A. niger* K

写真1 種麴の分生子の走査型電子顕微鏡写真

表 1 醤油用市販麹による単離した麹菌株の培養特性および酵素生産能

| 種麹<br>菌株                 | スクリー<br>ニング株 | 生育<br>速度 | 菌叢<br>の色 | 分生子<br>柄 長 | 分生子の<br>着生状態                        | 分生子<br>突起の有<br>無 | プロテ<br>アーゼ           | $\alpha$ -アミ<br>ラーゼ  | Endo<br>P-G | soj・ory<br>の 分 別 |
|--------------------------|--------------|----------|----------|------------|-------------------------------------|------------------|----------------------|----------------------|-------------|------------------|
| A. sojae HB              |              |          | 濃緑色      | 250 $\mu$  | irregularly<br>radiate              | +                | $\times 10^2$<br>4.4 | $\times 10^4$<br>0.7 | 29.2        | soj              |
| A. oryzae HA             |              |          | 黄緑色      | 500 $\mu$  | radiate to<br>globose               | -                | 4.1                  | 7.9                  | 2.7         | ory              |
| A. niger K               |              | +        | 白 色      | 100 $\mu$  | radiate to<br>globose               | -                | 1.7                  | 13.5                 | 1.6         | niger            |
| HS-1~7<br>A              |              |          | 濃緑色      | 250 $\mu$  | straightly irr-<br>egularly radiate | +                | 4.8                  | 0.7                  | 28          | soj              |
| HS-8~15                  |              |          | 濃緑色      | 300 $\mu$  | irregularly<br>radiate              | +                | 16.0                 | 3.2                  | 15          | soj              |
| HHS-3, 9<br>B            |              |          | 濃緑色      | 250 $\mu$  | straightly irre-<br>gularly radiate | +                | 4.6                  | 0.8                  | 27          | soj              |
| HHS-1, 2,<br>4~8, 10     |              |          | 濃緑色      | 300 $\mu$  | irregularly<br>radiate              | +                | 15.4                 | 3.4                  | 14          | soj              |
| HHL-1~15                 |              |          | 黄緑色      | 600 $\mu$  | radiate to<br>globose               | -                | 4.2                  | 8.2                  | 3.5         | ory              |
| C M-1~15                 |              |          | 黄緑色      | 300 $\mu$  | broom like                          | $\pm$            | 4.1                  | 7.2                  | 3.8         | ory              |
| D HD-1~15                |              |          | 黄緑色      | 500 $\mu$  | broom like                          | $\pm$            | 4.3                  | 7.6                  | 4.0         | ory              |
| K-1~3<br>E               |              | +        | 白 色      | 900 $\mu$  | radiate to<br>globose               | $\pm$            | 1.8                  | 10.7                 | 5.8         | ory ?            |
| K-4, 11, 14              |              |          | 黄緑色      | 600 $\mu$  | radiate to<br>globose               | -                | 2.1                  | 11.4                 | 3.9         | ory              |
| K-5-10, 12,<br>13, 15~19 |              |          | 濃緑色      | 200 $\mu$  | broom like                          | +                | 3.2                  | 6.9                  | 3.8         | soj ?            |
| F MU-1~15                |              |          | 黄緑色      | 500 $\mu$  | broom like                          | -                | 2.5                  | 7.1                  | 4.0         | ory              |
| G KU-1~15                |              |          | 黄緑色      | 600 $\mu$  | broom like                          | -                | 2.2                  | 11.3                 | 3.6         | ory              |

それによれば、*A. oryzae* 単一菌株よりなるものは濃口用 C, D の 2 点, 淡口用 F, G の 2 点の計 4 点に対し、*A. sojae* のみの 2 菌株よりなる複合菌は特別注文品の A が 1 点、*A. sojae* 2 種と *A. oryzae* 1 種 (その逆) よりなる 3 種混合菌は B, E の 2 点であった。その内、商品 E では形態的には *A. sojae* であるが、生理作用の面ではむしろ *A. oryzae* に近いと思われる *A. sojae* 株を含む 3 種混合菌であった。以上 7 種類の種麹商品より 12 株の麹菌を単離したが、A と B から単離した麹菌 *A. sojae* HHS5 と *A. sojae* HS5 と *A. sojae* HS8, 又 *A. sojae* HHS3 と HS1 は同一のものであろうと推察された。表 1 のスクリーニング株 12 株の 3 種酵素生産能をグラフ化したのが図 3 である。それに依れば、 $\alpha$ -アミラーゼ生産能と Endo-PG 生産能とは逆相関の関係があるように推察され、又、特別注文品 A と新製品 B を除く在来の種麹は  $\alpha$ -アミラーゼ生産能が高く、Endo-PG 生産能が低い *A. oryzae* HA 標準株の位置する域に集中している。しかも、*A. sojae* 株と *A. oryzae* 株の酵素生産能パターンを比較すれば、 $\alpha$ -アミラーゼ生産能は *A. sojae* 株が低く、*A. oryzae* 株が高い値を示し、又、Endo-PG 生産能は逆に *A. sojae* 株が高く、*A. oryzae* 株は極端に低い傾向があった。プロテアーゼ生産能については、非常に高い値を示した種麹 1 種 (*A. sojae* HS8 と HHS5 は同一もの) を除くと *A. oryzae* 株間の差はさ程違いが見られなかった。以上の事より、市販種麹標品 (在来品 C ~ G の 5 種類) のほとんどが  $\alpha$ -アミラーゼ活性が高く、Endo-PG 活性の低い *A. oryzae* タイプの麹菌を使用していることが判った。

#### 4. 小規模醸造試験

##### 4.1 醤油麹の酵素力価の差異

麹菌の各種酵素生産能は、その培養基質により大きく変動することが知られている。等重量の脱脂加工大豆と小麦を基質として調製した醤油麹に

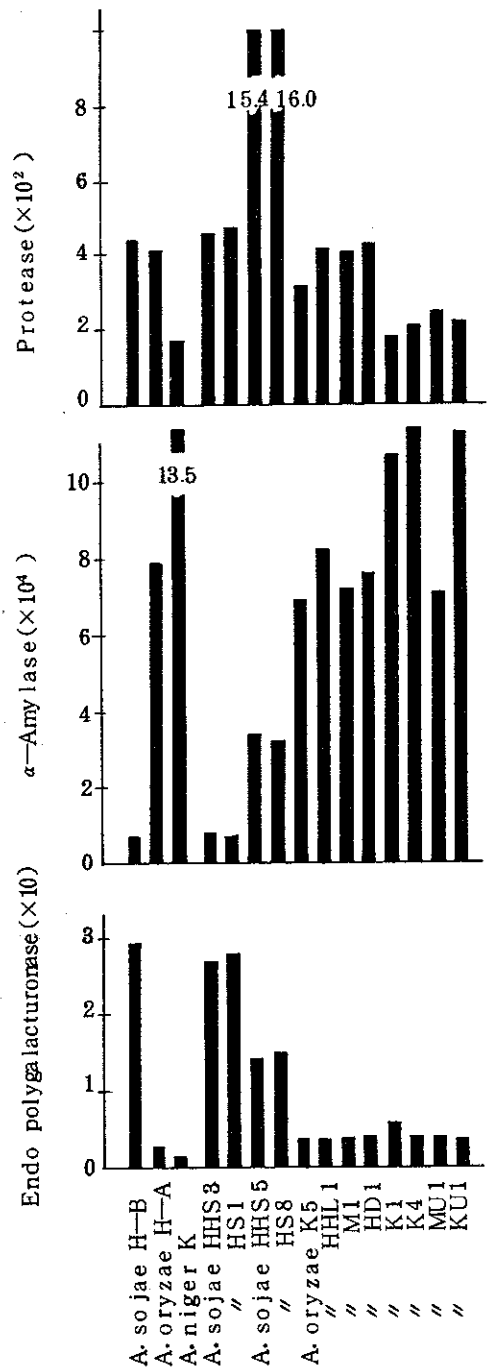


図 3-1

麹菌スクリーニング株の  
酵素生産能パターン

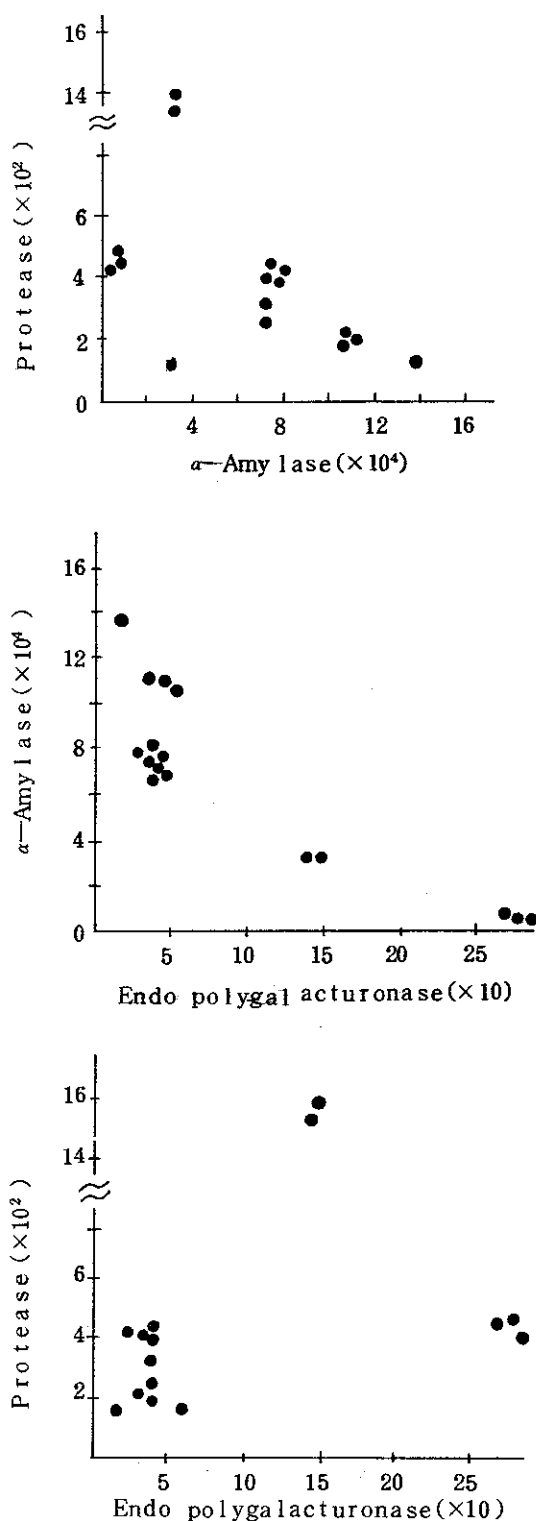


図 3-2 麹菌スクリーニング株の酵素生産能パターン

ついて、標準株と典型的な酵素生産能パターンを持つスクリーニング株及び市販種麹を用いて醸造試験を行なった。得られた出麹中の3種の酵素生産能を測定した結果を図4に示す。典型的な麹菌株 *A. sojae* HHS5, *A. sojae* HB, *A. oryzae* HAと市販種麹A~E(淡口用), *A. niger* kの酵素生産能パターンはふすま培地における結果(図1-1, 1-2)の特徴と一致したパターンを示した。又, *A. sojae* HBとそれぞれ *A. oryzae* HA, *A. niger* kとの混合菌使用の麹では各麹菌各々の特徴の中間的な酵素生産能パターンを示した。

#### 4.2 熟成諸味液汁成分

上記の麹を食塩水で仕込み、醸造微生物の添加温度経過、攪拌の程度などすべて同一の操作を施し、醱酵・熟成をおこなわせ、熟成諸味液汁を得た。まず、各麹菌株の仕込みについて、T-N分解率とL-グルタミン酸生成量について定量した結果を図5に示す。窒素分解率及びL-グルタミン酸生成量との間には  $r = 0.808$  の正の相関がみられ、*A. sojae* 株仕込みの方が、*A. oryzae* 株仕込みに比較して相方とも高い値を示した。その他の成分量については表2にまとめた。還元糖は *A. sojae* 株仕込みの方が *A. oryzae* 株仕込みより多い結果を得た。これは *A. sojae* 株の方が製麹過程の炭水化物消費が小さいと考えられる。アルコール濃度は *A. oryzae* 株仕込みの方がより多く、主醱酵酵母によるアルコール醱酵の程度に若干の差がみられた。又主醱酵期に生成されるとされる一価芳香族アルコール：2-フェニルエタノール(2PE)と、主として後熟酵母 *C. versatilis*, *C. etchellsii* 等により生成される揮発性フェノール成分4-エチルグアヤコール(4-EG)と4-エチルフェノール(4-EP)を野田等の方法に従い同時分析した。エーテル可溶性中性区分のこれら3成分とも、*A. oryzae* 株仕込みに差異なく、*Candida* 属酵母の良好な生育、醱酵が観察された。唯ここで、図6に観られるよ

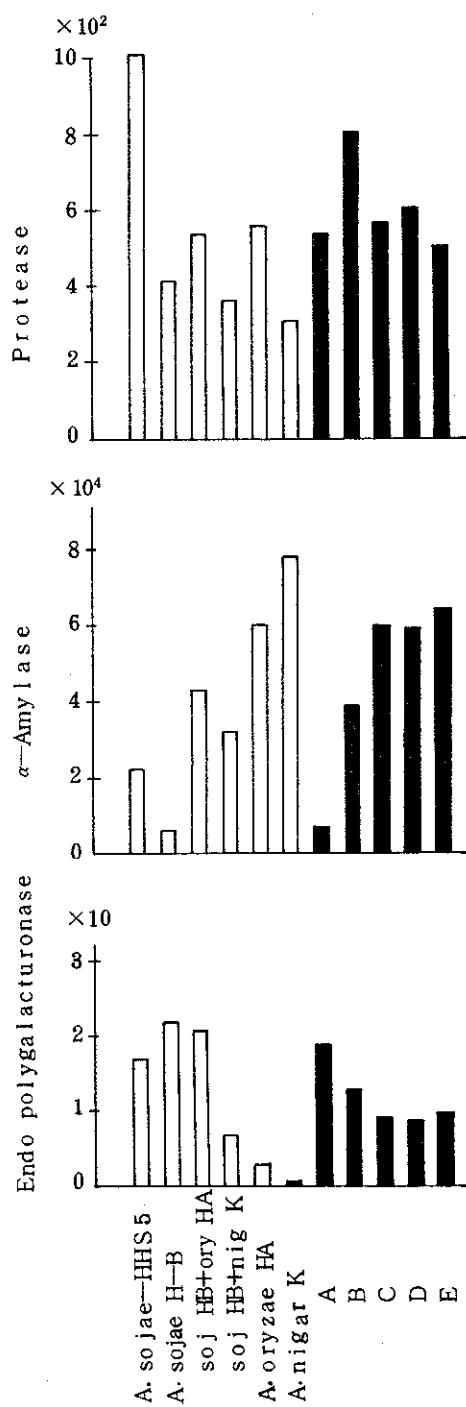


図4 出麹の酵素生産能  
(小規模試験)

うに, *A. sojae* 株仕込みでは, *A. oryzae* 株仕込みにおいて検知されない未知のピークが2PE

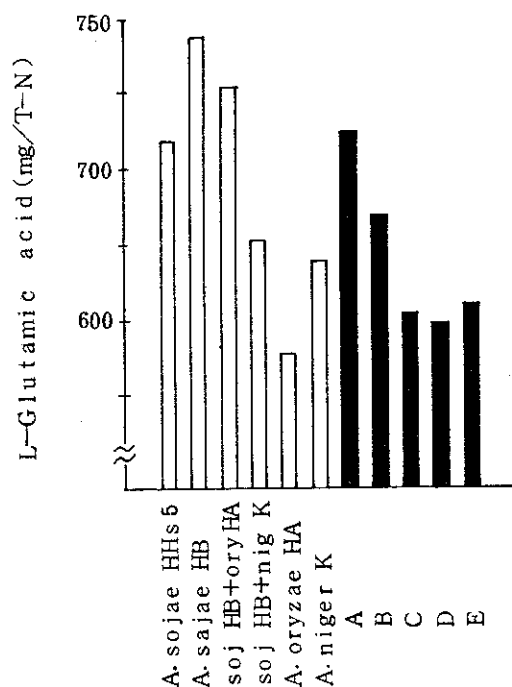


図5-1 諸味液汁中L-グルタミン酸生成量

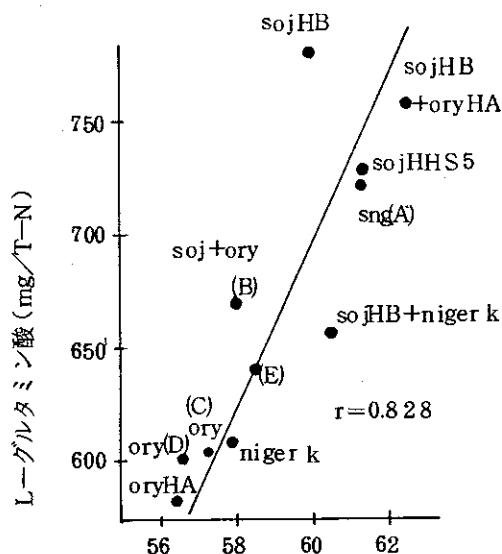


図5-2 L-グルタミン酸生成量と  
T-N分解率との相関

表-2 熟成諸味及び液汁成分

| 種 麴                                   | A-sojae<br>-HHS5 | sojHB | sojHB<br>+<br>oryHA | sojHB<br>+<br>nigk | oryHA | A-niger<br>-k | A<br>soj | B<br>soj+<br>ory | C<br>ory | D<br>ory | E<br>soj+<br>ory |
|---------------------------------------|------------------|-------|---------------------|--------------------|-------|---------------|----------|------------------|----------|----------|------------------|
| 出麴 PH                                 | 6.85             | 6.90  | 6.69                | 6.62               | 6.52  | 6.38          | 6.90     | 6.59             | 6.58     | 6.56     | 6.55             |
| 諸 味                                   | T-N              | 1.63  | 1.54                | 1.55               | 1.52  | 1.59          | 1.48     | 1.59             | 1.56     | 1.62     | 1.60             |
| 液 汁                                   | NaCl             | 17.5  | 17.7                | 17.4               | 17.4  | 17.4          | 17.8     | 17.6             | 17.4     | 17.3     | 17.3             |
|                                       | PH               | 4.52  | 4.37                | 4.55               | 4.51  | 4.42          | 4.53     | 4.47             | 4.46     | 4.48     | 4.49             |
|                                       | P. E             | 19.5  | 19.1                | 18.4               | 19.0  | 19.7          | 17.2     | 19.3             | 19.7     | 18.8     | 19.0             |
|                                       | R-S              | 5.6   | 5.9                 | 3.7                | 5.1   | 4.6           | 2.7      | 4.9              | 5.4      | 3.7      | 3.9              |
|                                       | R-OH             | 1.89  | 1.75                | 2.69               | 2.02  | 2.68          | 2.35     | 1.97             | 2.39     | 2.58     | 2.63             |
|                                       | lyE450           | 0.85  | 0.84                | 0.82               | 0.82  | 0.85          | 0.75     | 0.84             | 0.82     | 0.82     | 0.82             |
| 火入れ近量<br>%(V)                         |                  | 15    | 0                   | 15                 | 11    | 19            | 0        | 11               | 15       | 17       | 16               |
| 火入れ近凝集活性                              |                  | 0.15  | 0.05                | 0.11               | 0.10  | 0.20          | 0.12     | 0.08             | 0.14     | 0.27     | 0.19             |
| 残存活性<br>$\alpha$ -アミラーゼ $\times 10^3$ |                  | 2.6   | 1.2                 | 2.9                | 1.7   | 4.3           | 1.8      | 2.3              | 2.7      | 3.5      | 3.9              |
| 2 P E                                 |                  | 15.1  | 13.1                | 12.5               | 12.9  | 12.1          | 13.1     | 14.2             | 13.1     | 12.3     | 13.9             |
| 4 E G                                 |                  | 6.9   | 4.9                 | 5.7                | 6.1   | 5.8           | 5.3      | 6.7              | 6.2      | 5.7      | 5.3              |
| 4 E P                                 |                  | 0.38  | 0.16                | 0.39               | 0.36  | 0.40          | 0.38     | 0.43             | 0.36     | 0.37     | 0.33             |
| unknown<br>(ピーク比/1.5)                 |                  | 1.1   | 0.9                 | 0.7                | 0.6   | 0             | 0        | 1.2              | 0.9      | 0        | 0                |
| L-グルタミン酸<br>(mg/FN)                   |                  | 739   | 786                 | 753                | 656   | 580           | 637      | 727              | 671      | 604      | 598              |
| 分解率                                   |                  | 61.3  | 60.0                | 62.5               | 60.5  | 56.5          | 58.5     | 61.4             | 58.0     | 57.2     | 56.6             |
| 溶解利用率A法                               |                  | 85.9  | 82.6                | 82.3               | 82.8  | 84.1          | 80.5     | 83.3             | 84.7     | 84.0     | 83.9             |
| " B法                                  |                  | 89.9  | 85.8                | 87.0               | 90.6  | 87.5          | 85.7     | 86.1             | 88.4     | 87.2     | 87.1             |

のピークのすぐ後に検出されることと、又このピークは高温製麴経過の麴を使用したもの程高い値を示し、A. oryzae 株仕込みの諸味液汁でも過度の火入れによって生成されることが観察された。この味知ピークがA. sojae株に特徴的な性質なのか、製麴工程中等の発熱作用、あるいはバクテリア等の汚染などが関与して生ずるものなのかは不明であるが、A. oryzae株仕込みの諸味液汁（生揚）では観られない興味ある現象である。香りの官能の評価、差異については、JAS 味味審査員5名及び生揚工場8名の計8パネルで審査した限りにおいて以下の様であった。A. sojaeとA. oryzaeの麴菌そのものの体臭は若い諸味では著しく異なり、A. sojae株仕込みの特徴香と

して酸臭がきつく、産膜酵母臭類の弱い不快臭、はなやかではあるがきれいさに欠ける等の評価があったが、熟成が進むにつれてその特徴も大部分軽減された。

火入れ近量については、A. sojae株仕込みが、A. oryzae株仕込みに比較してやや少ない傾向にあると観察された。参考の為使用したA. nigerの変種A. niger k仕込みでは火入れ近の生成がなかった。近凝集活性（プロテアーゼ活性と相関あり）及び $\alpha$ -アミラーゼ残存活性とともにA. oryzae株仕込みの方がA. sojae株仕込みに比較して高い値であり、酵素タンパク量の絶対量が多いことが、近生成量の多い原因の一つになっている可能性を示唆している。

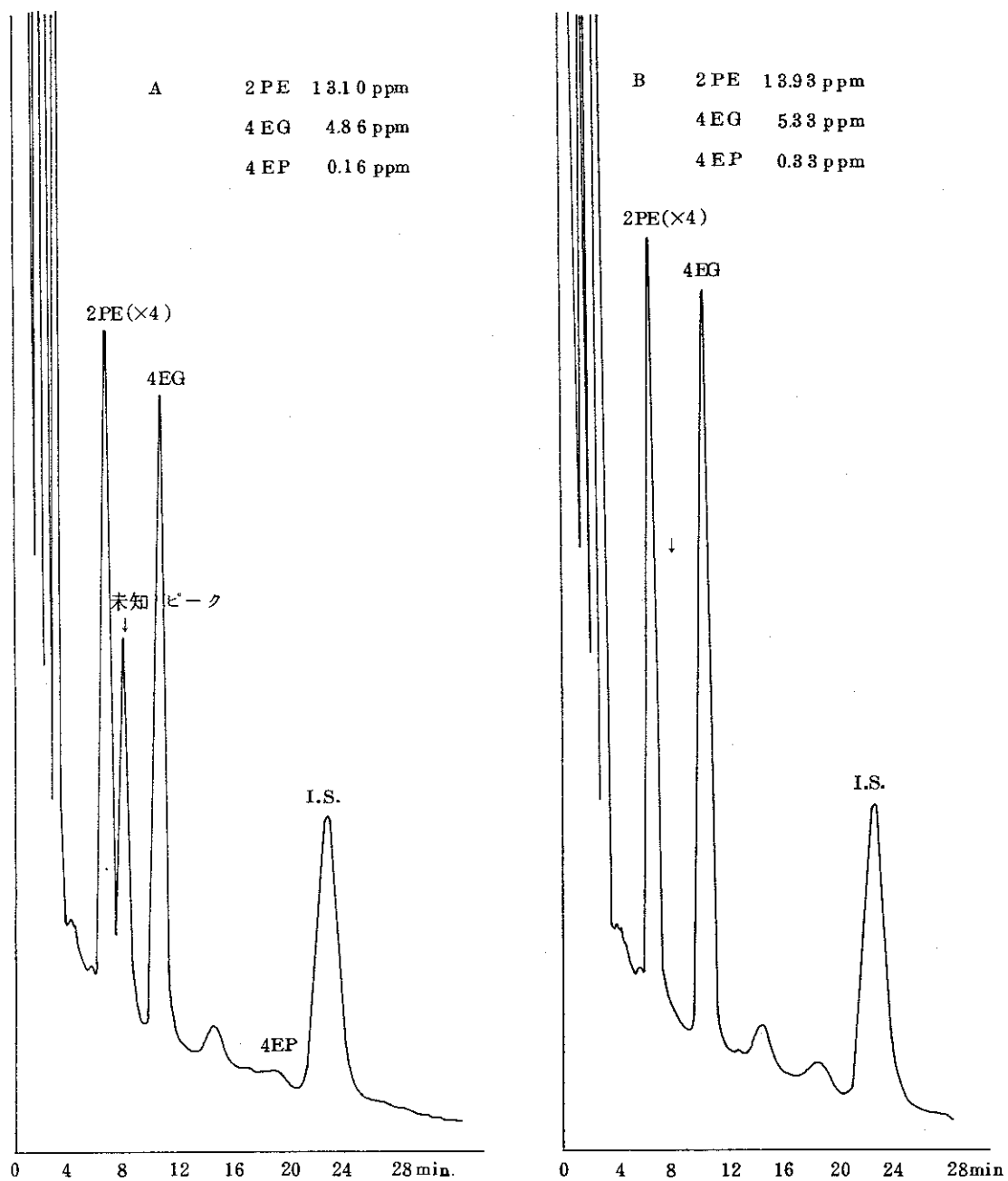


図-6 諸味液汁のガスクロマトグラム (A:A. sojae 使用, B:A. oryzae 使用)

## 5 工業規模仕込み試験

### 5.1 醬油麹の酵素力価の差

上記の小規模試験で明らかにされた *A. sojae* 株と *A. oryzae* 株との醸造特性の差が、実際の工業規模仕込み試験でも観察されるか否かを検討した。

供試株は上述の濃口用種麹 A～E を用い常法に従い通風製麹、仕込みを行ない 10 カ月間醗酵熟成を行なわせ諸味液汁を得た。又添加酵母による影響も同時に検討した。まず出麹の酵素生産能について測定した結果を図 7 に示した。ふすま培地試験及び小規模試験と比較してプロテアーゼ活性において A と B とで値が逆転した程度で全般的に 3 酵素の生産能パターンは前述の結果と一致し、しかも数回の再現性試験の結果からみて各種麹の酵素生産能の不変性が確認された。

### 5.2 熟成諸味液汁成分

まず、図 8 にみられる様に、T-N 分解率と L-グルタミン酸生成量との間には小規模試験結果と同様に正の相関 ( $r = 0.735$ ) が観られ、*A. sojae* 株仕込みの方が *A. oryzae* 株仕込に比較して相方とも高い値を示した。又、T-N 溶解利用率も *A. sojae* 仕込みが高い値を示し、これが L-グルタミン酸生成量とも高い相関 ( $r = 0.745$ ) を示したことは、種麹の条件 (プロテアーゼ力価が高く、しかも L-グルタミン酸生成量がより高いこと) としての満足すべき特性を兼ねそろえていることになる。その他の分析値は表 8 に示す。これによっても、火入れ量は *A. sojae* 仕込みが *A. oryzae* 株仕込みに比較して少ないことが判った。小規模試験で差異が観察された。還元糖の値は、今回、*A. sojae* 株 *A. oryzae* 株仕込み間で大きく、又アルコール生成量も相方、種麹菌の差というよりも培養酵母及び仕込みタンク棟の違いによる影響の方が大きいことがわかった。L-乳酸生成量は、*A. sojae* 株仕込みの方が高い値を示したが、アルコール生成量、L-乳酸生成

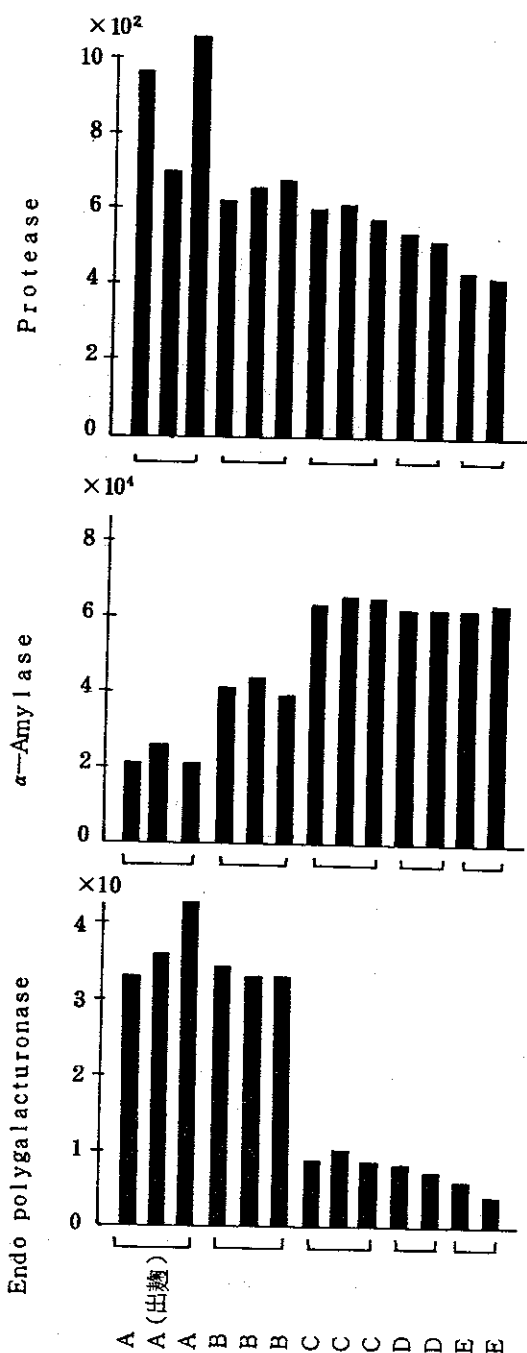


図 7 出麹の酵素生産能  
(工業規模試験)

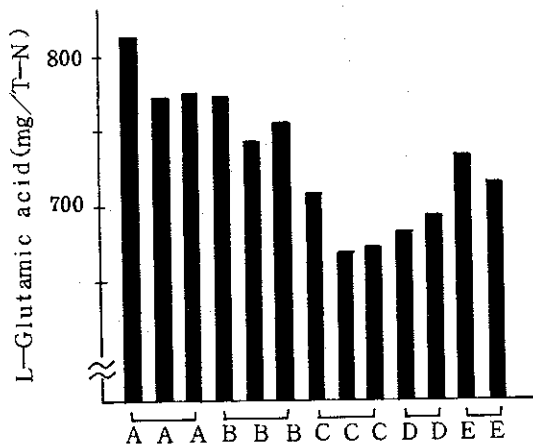


図 8 - 1 諸味液汁中の L - グルタミン酸

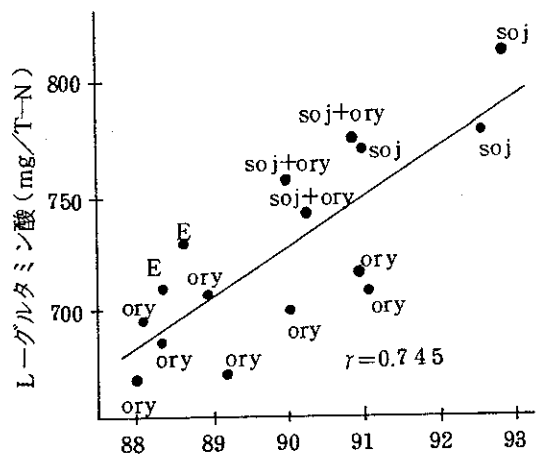


図 8 - 3 諸味液汁中の L - グルタミン酸と T - N溶解利用率との相関

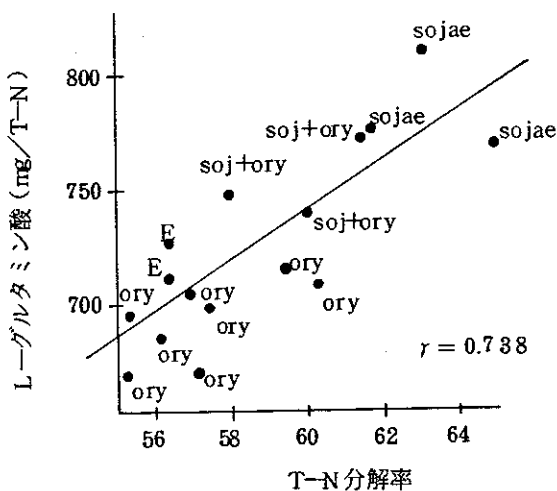


図 8 - 2 諸味液汁中の L - グルタミン酸と T - N 分解率の相関

量ともに、A. sojae 又は A. oryzae 株の違いと云うよりも、乳酸菌、酵母の絶対量なる因子によるところが大きいと思われる。

図 9, 10, 11 に、諸味中における乳酸菌、T 酵母及び S 酵母の消長について各々図示した。A. sojae 株仕込みでは A. oryzae 株仕込みに比較して、乳酸菌の棲息期間が長く、絶対量とも多かった。熟成諸味液汁の PH 値 (A. oryzae) 及び

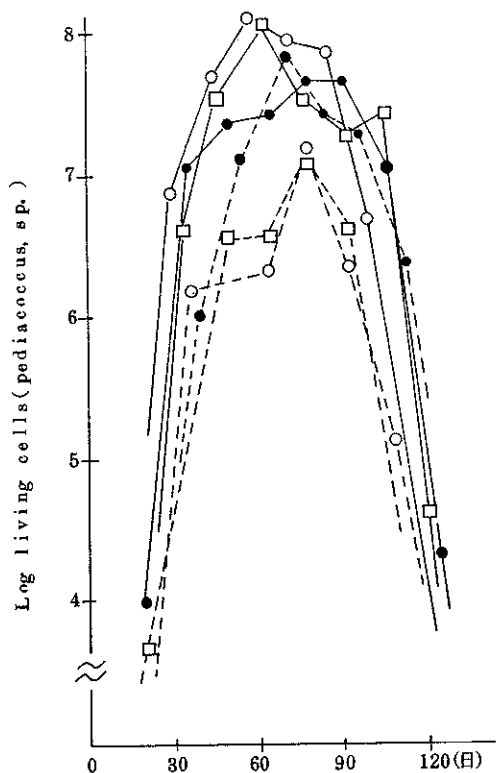


図 9 諸味中における乳酸菌の動態

● 対照, ○ T 酵母添加, □ TS 酵母添加  
A. sojae 仕込み(A) ..... A. oryzae 仕込(C)

表3 熟成諸味及び液汁成分

| 種 類                  | A      |       |      | B      |       |      | C     |        |      | D    |      | E    |      |
|----------------------|--------|-------|------|--------|-------|------|-------|--------|------|------|------|------|------|
|                      | 1回目    | 2回目   | 3回目  | 1      | 2     | 3    | 1     | 2      | 3    | 1    | 2    | 1    | 2    |
| 出 麴 PH               | 6.89   | 6.94  | 6.74 | 6.91   | 6.89  | 6.91 | 6.78  | 6.71   | 6.61 | 6.75 | 6.78 | 6.81 | 6.79 |
| 分 解 率                | 57.4   | 55.6  | 55.1 | 56.0   | 55.1  | 55.1 | 52.6  | 51.9   | 52.8 | 51.7 | 50.9 | 55.9 | 56.8 |
| 溶解利用率A               | 89.3   | 86.7  | 86.6 | 87.2   | 89.1  | 87.8 | 86.3  | 87.0   | 86.6 | 86.9 | 87.3 | 86.2 | 86.8 |
| 〃 B                  | 92.4   | 89.1  | 90.0 | 90.6   | 91.9  | 90.6 | 91.4  | 90.8   | 89.9 | 90.3 | 91.1 | 89.6 | 89.6 |
| 諸 T-N                | 1.83   | 1.80  | 1.75 | 1.84   | 1.81  | 1.79 | 1.82  | 1.76   | 1.78 | 1.79 | 1.81 | 1.75 | 1.79 |
| 味 NaCl               | 16.9   | 17.0  | 16.8 | 17.2   | 17.2  | 17.3 | 17.0  | 17.5   | 17.7 | 17.8 | 17.4 | 17.4 | 17.3 |
| 液 PH                 | 4.90   | 4.80  | 4.94 | 4.86   | 4.77  | 4.78 | 4.70  | 4.83   | 4.73 | 4.77 | 4.85 | 4.81 | 4.77 |
| 汁 P. E.              | 21.6   | 22.0  | 21.3 | 21.3   | 21.4  | 20.9 | 22.1  | 20.6   | 20.9 | 20.9 | 20.5 | 20.7 | 21.1 |
| R-S                  | 4.3    | 4.9   | 4.4  | 3.8    | 4.1   | 3.8  | 4.9   | 3.7    | 3.7  | 3.8  | 3.6  | 3.7  | 3.9  |
| R-OH                 | 1.98   | 1.68  | 2.20 | 2.09   | 2.11  | 2.46 | 1.93  | 2.43   | 1.86 | 2.03 | 2.38 | 2.43 | 2.15 |
| logE 450nm           | 0.99   | 1.02  | 0.96 | 0.97   | 0.99  | 0.95 | 1.04  | 0.91   | 0.89 | 0.91 | 0.90 | 0.93 | 0.92 |
| 火入れ近量<br>%(V)        | 13     | 13    | 12   | 15     | 15    | 15   | 18    | 19     | 15   | 18   | 18   | 17   | 18   |
| 火入れ近凝集活性             | 0.30   | 0.06  | 0.42 | 0.26   | 0.06  | 0.05 | 0.06  | 0.06   | 0.09 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| L-グルタミン酸<br>(mg/T-N) | 812    | 772   | 776  | 771    | 743   | 756  | 705   | 668    | 673  | 685  | 692  | 732  | 711  |
| L-乳酸(mg/dl)          | 1,322  | 1,503 | 983  | 970    | 1,064 | 630  | 1,054 | 210    | 939  | 856  | 262  | 580  | 911  |
| 2PE                  | 3.47   | 3.45  | 4.53 | 3.08   | 3.12  | 5.67 | 4.23  | 4.11   | 7.46 | 3.41 | 7.86 | 11.6 | 9.35 |
| 4EG                  | 3.53   | 4.54  | 3.29 | 2.82   | 2.95  | 2.32 | 0.71  | 2.36   | 3.98 | 3.72 | 2.68 | 4.59 | 3.17 |
| 4EP                  | 0.28   | 0.34  | 0.32 | 0.37   | 0.27  | 0.27 | trace | 0.32   | 0.49 | 0.41 | 0.39 | 0.38 | 0.36 |
| unknown<br>(ピーク比/IS) | 1.2    | 1.3   | 0.9  | 0.9    | 0.7   | 1.0  | 0.2   | 0.1    | 0.1  | 0    | 0    | 0    | 0.1  |
| 分 解 率                | 62.7   | 65.6  | 61.6 | 61.4   | 61.1  | 57.6 | 59.6  | 55.0   | 57.6 | 56.1 | 55.4 | 55.4 | 56.5 |
| 溶解利用率A法              | 89.4   | 87.4  | 87.7 | 88.2   | 87.2  | 87.2 | 85.1  | 84.8   | 83.4 | 83.1 | 83.2 | 83.1 | 85.5 |
| 〃 B法                 | 92.8   | 91.0  | 92.6 | 90.9   | 90.3  | 90.0 | 89.0  | 89.3   | 88.0 | 88.6 | 88.2 | 88.6 | 88.3 |
| 備 考<br>T酵母, S酵母      | Ⓓ<br>Ⓔ | Ⓓ     | —    | Ⓓ<br>Ⓔ | Ⓓ     | —    | —     | Ⓓ<br>Ⓔ | —    | Ⓓ    | Ⓔ    | Ⓔ    | Ⓓ    |

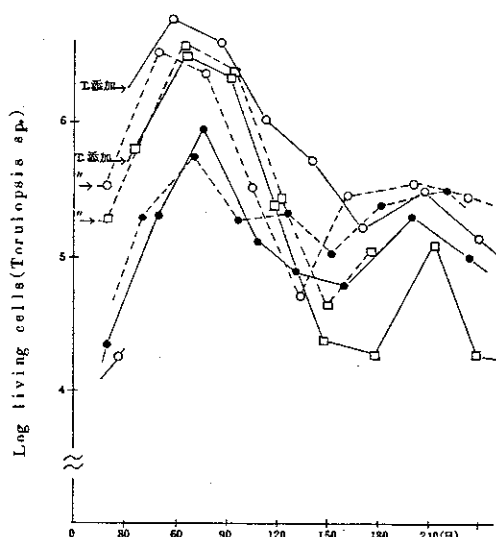


図 10 諸味中におけるT酵母の動態

● 対照, ○ T酵母添加, □ T・S酵母添加  
A. sojae 仕込み(A)……  
A. oryzae 仕込み ——

乳酸生成量 ( $A. sojae > A. oryzae$ ) から観ても、乳酸醗酵は  $A. sojae$  株仕込みに優位であることが推察できる。

S酵母では逆に  $A. oryzae$  株仕込みがより優位に棲息していることが観察されるが、T酵母に関しては有意性が観られなかった。これは  $C. versatilis$ ,  $C. etchellsii$  等によって生成される揮発性フェノール 4EG の生成量をみても A~E に大差はなく、T酵母は種麴の違いに影響されることなく旺盛に生育するものと考えられる。又、2PE の生成量は、アルコール醗酵の例年やや劣る醗酵棟に仕込んだ諸味 (C-1, C-2) を除けば、 $A. oryzae$  株仕込みがより高い値を示した。又、この 2PE は S酵母の増殖により関連して生成されることが観察された。又、前述の小規模仕込み試験で観察された未知の物質を同様に  $A. sojae$  株仕込みに特有のピークとして観察された。その他官能的評価 (小規模試験区と同様) も加え、 $A. sojae$  株と  $A. oryzae$  株の醸造に及ぼす特性の差異が小規模試験区と同様に認められた。

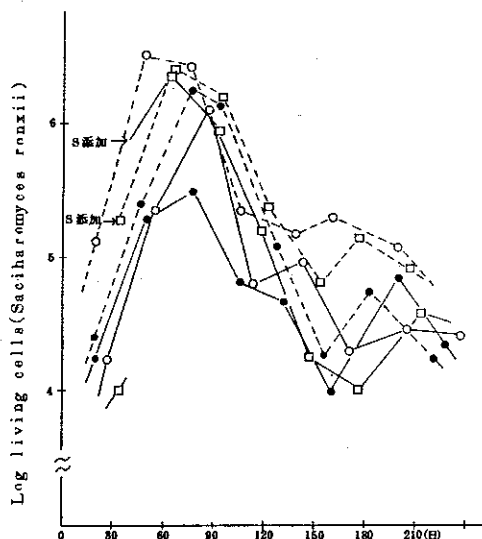


図 11 諸味中におけるS酵母の動態

● 対照, ○ T酵母添加, □ T・S酵母添加  
A. sojae 仕込み(A)……  
A. oryzae 仕込み ——

## 6. まとめ

市販種麴の素性と醸造特性の差異を明らかにする目的から、麴菌株をスクリーニングし、 $A. sojae$  及び  $A. oryzae$  の同定と配合率を測定し、又醸造試験を行ない次の事項を明らかにした。

- (1). 当生揚工場で従来より使用中の種麴は (C~G 5種類) は濃口、淡口用とも一種を除いて  $A. oryzae$  単独菌であった。その例外 E も生理的作用の面では  $A. oryzae$  グループに類する酵素生産能パターンを示した。使用を検討中の種麴 B と特別注文の種麴 A は  $A. sojae$  を含む複合菌であった。
- (2).  $\alpha$ -アミラーゼと End-PG 酵素生産能パターンに  $A. oryzae$ ,  $A. sojae$  間の差異が明らかに観察され、両者を分類するうえで一つの指標ともなりうることが判明した。
- (3).  $A. sojae$  株仕込みでは  $A. oryzae$  仕込みに比較して、PH 値、T-N 溶解利用率、T-N 分解率、L-グルタミン酸生成量、L-乳酸生成量、残糖量が高く、エ

ターノール濃度及び火入れ近量が少ない傾向にあった。

(4). 熟成に關与する微生物への影響も若干差異が觀られ、*A. sojae* 仕込みでは乳酸菌の生育がより旺盛となる反面、*S* 酵母の生育が抑制される傾向にあった。(5). *Candida* 属酵母の生育、すなわち、揮発性フェノール中性区分 4EG, 4EP の生成には直接的に影響はなかったが、エーテル可溶性中性区分の未知的物質の生成が *A. sojae* 仕込みに特異的に検出されたことと、官能的評価からも香りの面においても、両者間に差異が認められた。最後に、*A. sojae*, *A. oryzae* の醸造特性の違いについて検討したが、検体数がわずか 7 点と少ないことから、今回得られた以上の結果をもって、*A. sojae*, *A. oryzae* 一般の性質の差異と考えるのは危険であるが、供試株に関する限りにおいて興味ある知見が得られた。

## 参 考 文 献

- 1) H. Murakami : T. Gen, Appl, Microbiol, 17 281(1971)
- 2) 寺田 勝 : 醬研 6 75(1980)
- 3) 萩原文二 : 「酵素研究法」(赤堀四郎編, 朝倉書店) 2 237(1956)
- 4) H. Fuwa : J. Biochem, 41 588(1954)
- 5) Roboz, E. et : J. Biol, Chem. 195 459(1952)
- 6) H. Hashimoto, T. Yokotsuka : T. Ferment. Technol 51 661(1973)
- 7) 野田義治, 中野正路 : 醬研, 5 299 (1979)