

〔醸酵工学 第60巻 第3号 151-163. 1982〕

総 説

麹菌の増殖特性とその製麹管理への応用

(昭和56年度 日本醸酵工学会江田賞受賞)

菅間誠之助・岡崎 直人

国税庁醸造試験所

1. はじめに

麹は清酒醸造に限らず醸造工業に重要な役割を果たしている。しかし、固体培地上における麹菌の増殖を定量的に扱うことが困難なため、酵素などの生産物を増殖との関連でとらえた研究は少なく、従って実際の製麹管理においても経験や勘に頼ることが多いのが実状である。

固体培地上における増殖菌体量や培地組成を定量的に把握するため、アスベストを麹材料に用いる Bindal ら¹⁾、坂口ら²⁾ の、ペースト麹法による Yamamoto ら³⁾ の、スポンジを用いる藤島ら⁴⁾ の方法が報告されている。しかし、これらの方法は著者らが対照としている清酒用麹の製麹条件の検討には、適さないとされた。その後、直接麹の菌体量を定量する方法として照井と森本⁵⁾ は、麹の菌体以外の成分を酵素消化した後、ろ別し、残渣を菌体とする方法を用いて、製麹中の増殖量、呼吸、生産物の関係を詳細に検討した。また、比較的近年になって麹菌細胞壁の構造が明らかにされ、その構成成分であるグルコサミンを菌体量の指標とする方法が Arima と Uozumi⁶⁾ によって開発され、その後、大内ら⁷⁾、Sakurai ら⁸⁾、加藤ら⁹⁾ によって改良法が提出された。これらの方法は実際の麹に適用できるという大きなメリットがあるが、清酒麹の場合、増殖菌体量がたかだか原料白米の2～3%にしか達しないので、特に増殖の初期の菌体量の少ない場合には定量

が困難であることや、分析操作に多くの時間を要する欠点がある。

清酒醸造においては昔から“一麹、二酛、三造り”と言われるように麹の果たす役割は大きく、麹菌の生産する酵素の研究は数多く報告されているが、近年、併行複発酵である清酒醪の酵素化学的解明がなされ、蒸し米の溶解・糖化・発酵に関連の深い酵素およびその作用が明らかにされつつある。¹⁰⁻¹²⁾ 醪における酵素の大部分は麹に由来するので、清酒醸造と関連の深い酵素の生産条件を麹菌の増殖との関連でとらえることは意義深いことと思われる。

著者らは増殖測定法として、製麹にともなう呼吸量がその指標になるのではないかと考え、¹³⁻¹⁵⁾ 呼吸量を精度よく、長時間にわたって測定可能な自動増殖測定装置を考案した。¹⁶⁾ この装置を用いて蒸し米上における麹菌の増殖特性と、酵素生産に及ぼす要因を検討した。¹⁷⁻¹⁹⁾ また、増殖特性を利用したより有効な製麹管理法²⁰⁻²²⁾ についても検討を加えた。

2. 培養法および呼吸速度の測定

麹菌の増殖には蒸し米水分や孢子接種量などが影響すると考えられるし、また、無菌的な培養操作が必要である。このため以下に述べる熱風乾燥 α 米を用いる方法¹⁴⁾を用いた。すなわち、白米(特にことわらない限り精米歩合75%)を洗米、浸漬および蒸きょう後、90°Cで含水率5%以下まで乾燥し α 米として保存した。培養開始にあたって、一定量の α 米を培養容器に入れ、90°Cで約1時間乾熱殺菌後、一定量の麹菌分生孢子(以後、主に *Aspergillus oryzae* var. *viride* MURAKAMI RIB 128 を使用)を懸濁した蒸留水を計算量添加し、無菌的に混合する。 α 米 100 g 当たり添加する孢子

Growth characteristics of koji-mold on steamed rice grains and koji-making utilizing the characteristics. —A monograph— SEINOSUKE SUGAMA and NAOTO OKAZAKI (National Research Institute of Brewing, 2-6 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114, Japan)

懸濁液量 x (ml) は次式で示される.

$$x = \frac{(S+R)(100-A)}{100-R} - A$$

ここで

$$S : \text{蒸し米吸水率} = \frac{\text{蒸し米重量} - \text{白米重量}}{\text{白米重量}} \times 100$$

$$R : \text{白米水分} = \frac{\text{水分含量}}{\text{白米重量}} \times 100$$

$$A : \alpha \text{ 米水分} = \frac{\text{水分含量}}{\alpha \text{ 米重量}} \times 100$$

α 米を用いても、通常の蒸し米そのものを用いても、麹菌の増殖や酵素生産にほとんど違いが認められないので、実験の再現性、無菌操作の簡便さなどの利点を生かし、以下、 α 米を用いた。

増殖の指標としての炭酸ガス発生量あるいは酸素吸収量の測定は Fig. 1~Fig. 3 に示すような培養管法,¹³⁾ シャーレ法¹⁴⁾ およびワールブルグ改良容器法¹⁶⁾ により行った。

培養管法は、あらかじめ炭酸ガスを除いて調湿した空気を 12~16 ml/g・乾物 通気しつつ培養する。麹菌の増殖にともない発生する炭酸ガスを苛性ソーダ溶液に捕集し、炭酸バリウム滴定法によって定量した。

シャーレ法は、孢子懸濁水の一定量を添加した α 米を、Fig. 2 に示すように湿度調整液を入れた大型シャーレ中に静置して、恒湿条件のもとに培養する。調湿液の NaOH または H_2SO_4 濃度によって空気の相対湿度を調整できる (Table 1)。また調湿液の苛性ソー

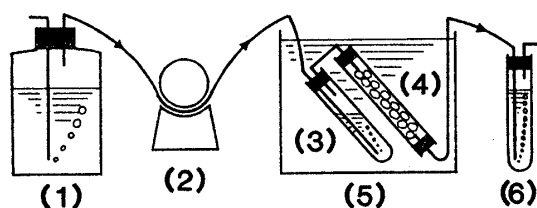


Fig. 1. A collection method of CO_2 evolution during a solid state cultivation.¹³⁾

1. Air washer containing 400 ml of 10% aqueous NaOH soln.
2. Peristaltic pump (20 ml air/g dry steamed rice/h)
3. Relative humidity regulator (1.5×18 cm) containing 25 ml of 6.5% aqueous NaOH soln.
4. Incubation tube (1.2×25 cm) for 8 g dry steamed rice grains
5. Thermostat (30°C)
6. CO_2 collector (1.5×18 cm) containing 20 ml of 2% aqueous NaOH soln.

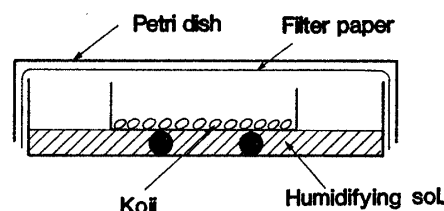


Fig. 2. A solid state cultivation controllable of atmospheric humidity.¹⁴⁾

For humidifying solution, see Table 1.

ダは炭酸ガスを吸収し、これより炭酸ガスの定量も可能である。

ワールブルグ改良容器法で用いる培養容器は Fig. 3 に示すごとく内部は二分割されており、一方は固体培養のため、他方は炭酸ガス吸収剤と調湿剤を兼ねた苛性ソーダを入れるように改良されている。この培養容器には通常 α 米を 1~2 g、他方は 6.5% の苛性ソーダ 5 ml を入れることによって、相対湿度を 95% に保ち、静置培養によって酸素吸収量を測定することが可能である。培養管法とシャーレ法は炭酸ガス発生量を、ワールブルグ改良容器法によって酸素吸収量を測定することができる。測定結果の一例を Table 2 に示すが、製麹中の呼吸商はほぼ 1 であり、^{16, 23)} 炭酸ガス発生

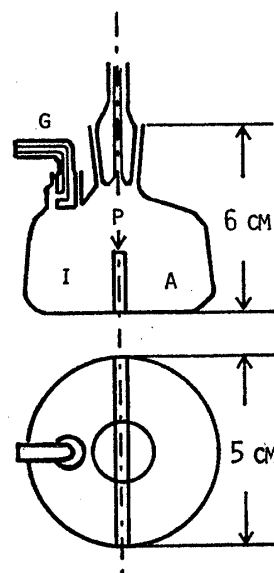


Fig. 3. Improved Warburg vessel (45 ml) for the determination of O_2 consumption during solid state culture.¹⁶⁾

- A = alkali (or acid) tray
G = stopper with gas vent
I = incubation chamber
P = partition

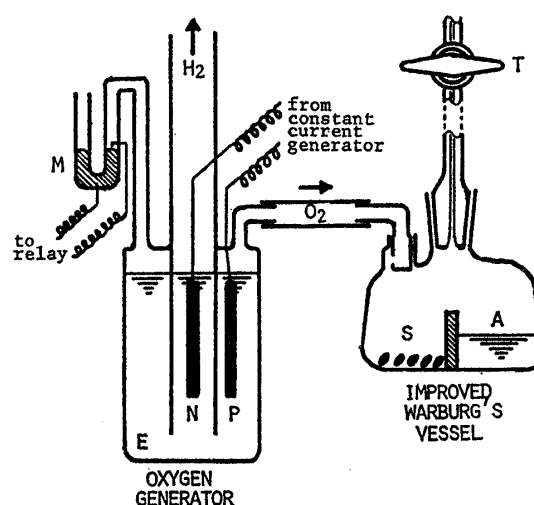
Table 1. Equilibrium relative humidity adjusted with NaOH or H₂SO₄ solutions (see Fig. 2).

Relative humidity (%)	Concentration (%)	
	NaOH	H ₂ SO ₄
100	0	0
99	1.4	2.0
98	2.8	3.9
97	4.2	5.8
96	5.4	7.7
95	6.5	9.5
94	7.6	11.2
92	9.6	14.5
90	11.5	17.3
88	13.3	19.8

たは酸素吸収のいずれかを測定することによって培養経過にともなう呼吸活性を測定しようと考えてよい。

3. 自動増殖測定装置¹⁶⁾の開発

先に述べた3種類の培養方法のうち酸素吸収速度を測定するにはワールブルグ改良法が簡便でかつ再現性も良好であるが、この方法の欠点は培養容器を密べいして測定するため、培養中に容器内の酸素濃度が順次低下すること、その結果長時間後における測定値の信頼度が問題となる。そこで、Fig. 4, 5 に示す自動増殖測定装置を試作した。培養容器は前述のワールブルグ

Fig. 4. Equipment for oxygen supply for solid state culture.¹⁶⁾

- A = 6.5% NaOH aqueous soln.
 E = electrolyte (9.5% H₂SO₄ aqueous soln.)
 M = mercury manometer
 N = cathode
 P = anode
 S = steamed rice grains
 T = two-way stopcock

改良容器を用い、容器を酸素発生装置に連結し、呼吸によって消費される酸素を補給する仕組みとした。すなわち、麹菌の増殖にともない発生する炭酸ガスは調湿液を兼ねた苛性ソーダに吸収されるので、培養容器

Table 2. Respiratory quotient of *A. oryzae* grown on the surface of steamed rice grains.

Incubation period (h)	O ₂ consumption per hour (μl)	CO ₂ evolution per hour (μl)	RQ
16	221	234	1.06
17	270	273	1.01
18	443	403	0.91
19	503	525	1.04
20	661	635	0.96
21	803	762	0.95
22	946	903	0.95
Average 0.98			

1.5 g of inoculated steamed rice grains were incubated in improved Warburg vessels at 35°C under 95% relative humidity. Oxygen consumption was estimated by addition of 6.5% NaOH in the vessel and overall change of gas volume was estimated by addition of 9.5% H₂SO₄.

Therefore, carbondioxide evolution was calculated to subtract the overall change of gas volume from the oxygen consumption.

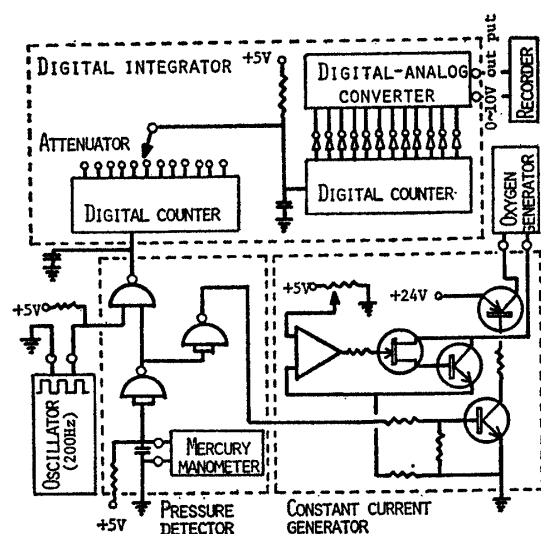


Fig. 5. Schematic diagram of the apparatus for oxygen supply to compensate oxygen consumption in solid state culture (related to Fig. 4).¹⁶⁾

内は酸素の吸収に相当する圧力低下が生ずる。圧力低下は Fig. 4 の水銀マノメーターで検出され、オン・オフ信号を Fig. 5 の定電流装置に送り、50 mA の定電流を酸素発生装置の電気分解槽に通電し、発生した酸素を培養容器に補給する。Fig. 5 のデジタルインテグレーターによって定電流装置の作動した時間を積算することによって、通電量からクーロメトリーにより酸素発生量を算出し、経時的に自動記録した。この方法によ

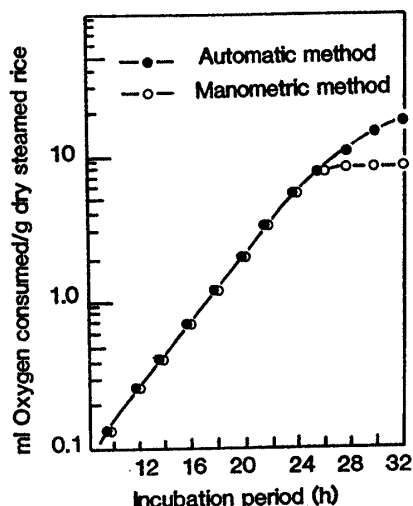


Fig. 6. Oxygen consumption measured by automatic (see Figs. 4, 5) and manometric methods (see Fig. 3) during solid state culture.¹⁶⁾ 1.5 g of steamed rice (0.583 g water/g dry matter) inoculated with 3×10^5 spores of *A. oryzae* RIB 128 was incubated at 35°C under 95% relative humidity.

って自動的に、増殖にともなう酸素吸収量が測定でき、また常に消費された酸素が補給されるので、一定酸素濃度条件下で長時間の培養が可能となった。Fig. 6 にマノメトリックな方法と自動増殖測定装置を用いた酸素吸収量の経時変化を示したが、マノメトリック法において容器中の全酸素(約 9 ml)が消費される時点まで両者の経時変化が完全に一致していることがわかる。

4. 増殖モデル¹⁸⁾と増殖特性値¹⁹⁾

一般に菌体増殖量と基質消費量の間には一定の関係があるが、基質の種類、その濃度あるいは微生物の種類などによって異なる。麴菌は偏性好気性であり、基質は主としてグルコースであり、かつ製麴中の呼吸商がほぼ 1.0 であるので、固体培養のための扱いにくさはあるけれども、モデル化し易い系であると考えられる。Table 3 は、炭酸ガス発生量に対する菌体増殖量の関係を示したもので、ほぼ一定値を示すものの、培養が進むに従って増大する傾向が認められた。そこで、自動増殖測定装置により酸素吸収経過を測定し、菌体増殖量との関係を調べた。

酸素吸収経過と菌体増殖量の関係¹⁸⁾ Fig. 7 に麴菌の蒸し米(75%精白米)上における酸素吸収速度および菌体増殖量の指標として、グルコサミン量⁸⁾の経時変化を示した。特徴的なことは、培養24時間前後まで対数的な菌体増殖が認められること、酸素吸収速度と菌体増殖経過が最大値に達するのに数時間のずれはあるものの同一経過を示すこと、両者とも最大値に達した以後その値を維持すること、である。このことは、麴を用いた場合でも同様に認められたが(Fig. 7)、麴の場合は最大に達した以後、75%精白米に比し基質の消費が著しいためか酸素吸収速度は徐々に低下した。Table 4 に最大酸素吸収速度と最大菌体増殖量の関係を示したが、精白米と麴の両者において両者の比がよく一致し、最大酸素吸収速度が菌体増殖量のよい指標となることが認められた。

Logistic 増殖モデル¹⁸⁾ 増殖にともなって消費される酸素量は、菌体の増殖のためのエネルギー生成と菌体維持に必要なそれとの合計で表される。ここでは、logistic な増殖モデルを仮定し、酸素吸収速度および酸素吸収量と、増殖に関する定式化を試みた。

A : 酸素吸収量 [ml- O_2 /g-乾物]

a : 内生呼吸による酸素吸収量 [ml- O_2 /g-乾物]

m_0 : 初発菌体量 [mg-乾燥菌体/g-乾物]

Table 3. Effect of culture conditions on carbon dioxide evolution per unit mycelium of *A. oryzae*.

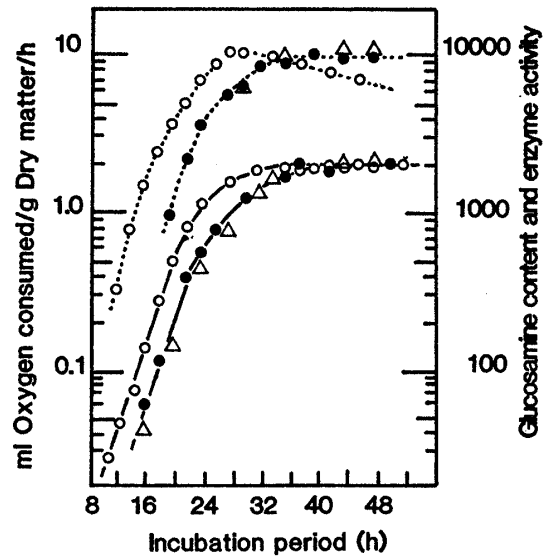
Culture conditions	Incubation period (h)		
	18	24	36
A) On rice flour medium ¹⁵⁾			
1) Strains used			
RIB 128	1.00	1.10	1.15
RIB 127	0.81	0.86	1.07
RIB 142	0.76	1.06	1.15
2) Incubation temperature(°C)			
30	0.95	0.95	1.39
35	1.08	1.15	1.25
3) Varieties of rice used			
<i>Koshijiwase</i>	0.99	0.98	1.04
<i>Nihonbare</i>	0.82	1.09	1.13
<i>Shiokari</i>	0.95	0.95	1.39
4) Polishing rates of rice (%)			
95	0.89	1.12	1.53
85	1.02	0.97	1.06
75	0.82	1.09	1.13
65	1.19	1.33	1.27
B) On steamed rice grains			
Polishing rates of rice (%)			
95	—	—	1.16
85	—	—	1.08
75	0.94	1.05	1.29
65	—	—	1.04

The table shows mg carbon dioxide evolved per mg dry mycelial weight.
For B, mycelial weights were corrected by multiplication by 1.27. Culture conditions were as follows: strain, *A. oryzae* RIB 128; incubation temperature, 30°C, atmospheric relative humidity, 95%; variety of rice, *Koshihikari*; degree of polishing of rice, 75%.

Table 4. Relationship between carbon dioxide evolution rate and mycelial weight grown.

	Rice koji	Wheat bran koji
Maximum O ₂ consumption rate [ml/g dry steamed rice or wheat bran/h]	2.00	11.10
Maximum CO ₂ evolution rate [mg/ //]	3.93	21.80
Maximum glucosamine content [mg/g dry steamed rice or wheat bran]	2.23	10.66
Maximum mycelial weight [mg/ //]	29.7	142.1
Max. O ₂ consumption rate/Max. mycelial weight grown	0.0673	0.0781

Maximum oxygen consumption rate and maximum glucosamine content are from Fig. 7. Maximum carbon dioxide evolution rate is calculated from the maximum oxygen consumption rate of $RQ=1.0$, and maximum mycelial weight is calculated from maximum glucosamine content using the conversion rate of 0.075.¹⁵⁾

Fig. 7. Changes of glucosamine content, enzyme activity and oxygen consumption rate during the growth of mold.¹⁸⁾

— : rice grains, ---- : wheat bran

△ : glucosamine content [$\mu\text{g/g}$ dry steamed rice or wheat bran]

● : α -amylase activity [unit/g dry steamed rice or wheat bran]

○ : oxygen consumption rate [ml/g dry steamed rice or wheat bran/h]

m : 菌体量 [mg-乾燥菌体/g-乾物]

μ : 対数期における比増殖速度定数 [h^{-1}]

K_1 : 酸素吸収量の菌体増殖量換算係数 [$\text{ml-O}_2/\text{mg-乾燥菌体}$]

K_2 : 内生呼吸速度 [$\text{ml-O}_2/\text{mg-乾燥菌体/h}$]

N : 菌体増殖量の最大値 [mg-乾燥菌体/g-乾物]

とすれば,

$$\frac{dA}{dt} = \frac{d(A-a)}{dt} + \frac{da}{dt} \quad (1)$$

$$\frac{d(A-a)}{dt} = K_1 \frac{dm}{dt} \quad (2)$$

$$\frac{da}{dt} = K_2 m \quad (3)$$

対数増殖期において,

$$\frac{dm}{dt} = \mu m \quad (4)$$

$$m = m_0 e^{\mu t} \quad (5)$$

$$\frac{dm}{dt} = \mu m_0 e^{\mu t} \quad (6)$$

(1)式および(5)式から,

$$A = m_0 \left(K_1 + \frac{K_2}{\mu} \right) (e^{\mu t} - 1) \quad (7)$$

$e^{\mu t} \gg 1$ の時

$$A = m \left(K_1 + \frac{K_2}{\mu} \right) \quad (8)$$

(8) 式は対数期が十分進行し, かつ比増殖速度が大きく異ならなければ, 対数期において酸素吸収量が菌体増殖量の指標となることを示している.

次に, logistic な増殖を仮定すると(4)式は,

$$\frac{dm}{dt} = \mu m \left(1 - \frac{m}{N} \right) \quad (9)$$

(9)式を積分すると,

$$m = \frac{N}{1 + ke^{-\mu t}} \quad (10)$$

ここで

$$k = \frac{N}{m_0} - 1 \quad (11)$$

(1), (2), (3), (9)および(10)式から,

$$\frac{dA}{dt} = \frac{K_1 N \mu}{1 + ke^{-\mu t}} \cdot \frac{ke^{-\mu t}}{1 + ke^{-\mu t}} + \frac{K_2 N}{1 + ke^{-\mu t}} \quad (12)$$

(12)式を積分して,

$$A = \frac{K_1 N}{1 + ke^{-\mu t}} + \frac{K_2 N}{\mu} \ln \frac{e^{\mu t} + k}{1 + k} - \frac{K_1 N}{1 + k} \quad (13)$$

t が十分大きい場合(8)式は,

$$\frac{dA}{dt} = K_2 N \quad (14)$$

logistic な増殖を仮定して導いた酸素吸収 ((13)式), および酸素吸収速度 ((12)式) についての計算値と実測値の比較を Fig. 8 に示す. 精白米および麩いずれの場合も両者はよく一致した. ただし, 麩については前述のとおり最大酸素吸収速度に達した後, 実測値の低下のため理論値との間にずれが生ずる.

(12)式において, 右辺の第1項は菌体増殖のための酸素吸収を第2項は菌体維持のための酸素吸収(内生呼吸)を表しており, 第2項は(3)式で示されるとおり時間 t における菌体量に比例する. 従って, 菌体増殖にともなう酸素吸収速度の経時変化は, (12)式の右辺の第2項で表される. (12)式の右辺2項の理論値と菌体増殖経過(グルコサミン量)を Fig. 9 に示したが, 理論値と各データポイントはよく一致した. すなわち,

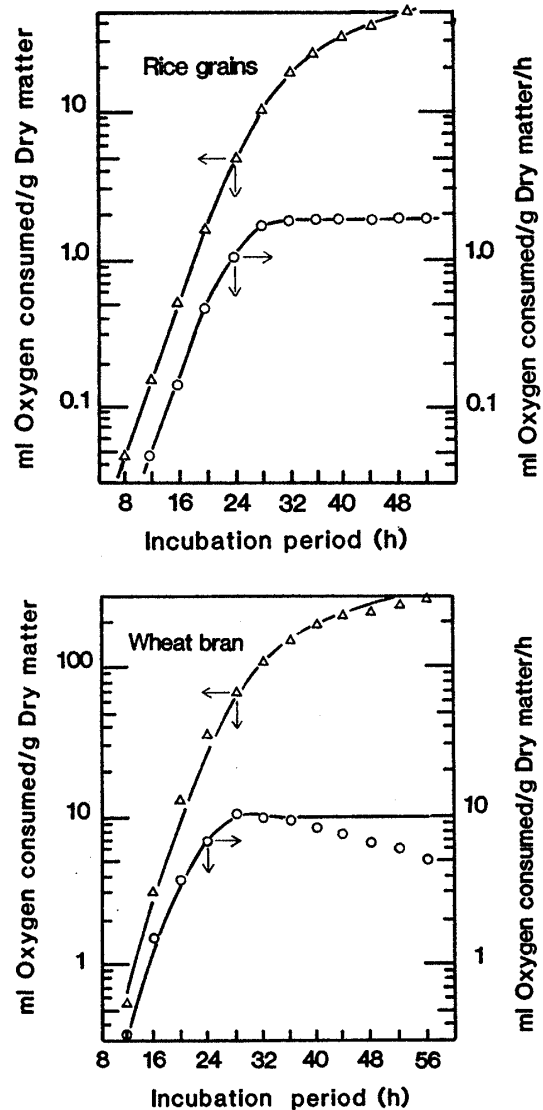


Fig. 8. Oxygen consumed and oxygen consumption rate during the growth of mold.

Δ : oxygen consumed,

○ : oxygen consumption rate.

A and dA/dt were calculated by Eqs. (13) and (12) (see solid lines) provided that $\mu = 0.295$, $N = 29.7$, $m_0 = 0.00909$, $K_1 = 0.322$ and $K_2 = 0.0673$ for rice grains and $\mu = 0.347$, $N = 142.1$, $m_0 = 0.0182$, $K_1 = 0.325$ and $K_2 = 0.0781$ for wheat bran.

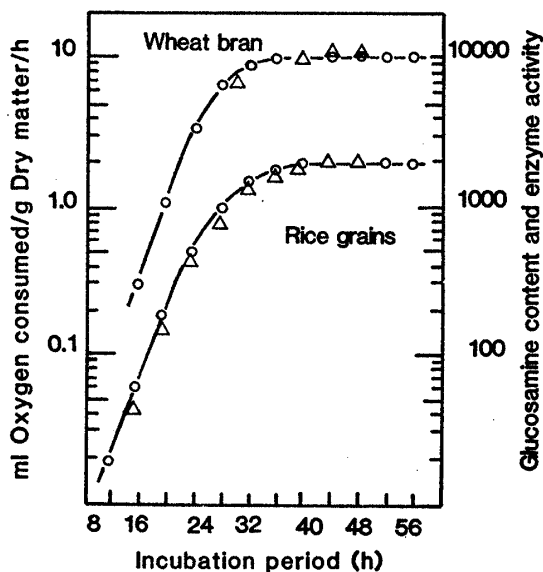


Fig. 9. Calculated endogenous oxygen consumption rate, glucosamine content and enzyme activity during the growth of mold.

△: glucosamine content [$\mu\text{g/g}$ dry steamed rice or wheat bran]

○: α -amylase activity [unit/g dry steamed rice or wheat bran]

—: calculated endogenous oxygen consumption rate

Solid lines were calculated by the second term in Eq. 12.

Fig. 7 で示された酸素吸収速度経過と菌体増殖経過の数時間のずれは、(12)式右辺の第1項が上乘せされた結果である。

増殖に関する特性値 前項で得られた結果から、蒸し米上における麹菌の増殖に関する特性値、すなわち対数増殖期における比増殖速度定数 (μ)、酸素吸収量が 1.0 ml/g-乾物 に達する時間 ($T_{1.0}$)、および最大酸素吸収速度 ($O_{2\max}$) を算出した。ここで $T_{1.0}$ は比増殖速度が大きく異なる2つの酸素吸収経過があった場合、 $T_{1.0}$ 値が小さいほど発芽の誘導期間が短いことを表す。また最大酸素吸収速度、 $O_{2\max}$ は(14)式で示されるように最大菌体増殖量の指標となる。以後、 μ , $T_{1.0}$, $O_{2\max}$ の3つの増殖特性値に及ぼす種々の要因について検討を加える。その他 (8) 式で示されるように、対数増殖期の後期においては酸素吸収量が菌体増殖量の指標になるので、酸素吸収量が 10 ml/g-乾物 に達した時点で出麹し、各種培養条件下での同一菌体量における酵素生産性などの比較を行った。

5. 増殖と酵素生産^{14,19)}

清酒醸造に関連の深い酵素として、 α -amylase, glucoamylase, acid protease および acid carboxypeptidase を測定した。布川ら¹⁰⁻¹²⁾ は、清酒醪の溶解に直接関与するのは α -amylase であるが、acid protease によって米粒への α -amylase の無効吸着が解除されることが

Table 5. Changes of enzyme activities during the growth of *A. oryzae* on the steamed rice grains at 35 and 40°C.

O ₂ consumption		Enzyme activities and its ratio					
ml O ₂ /g	dry matter	α -Amyl	Glc	APase	ACPase	Glc/APase	Glc/ACPase
at 30°C	15	990	257	2790	13300	0.092	0.019
	23	1160	334	3410	14900	0.098	0.022
	30	1090	362	3560	14700	0.102	0.025
	35	1230	407	3610	19900	0.113	0.020
	40	1490	437	3870	17900	0.113	0.024
	46	1330	377	3720	14600	0.101	0.026
at 40°C	25	1790	441	3590	10900	0.123	0.041
	30	1930	516	3470	10200	0.149	0.050
	35	2120	452	3610	10800	0.125	0.042
	40	2030	488	3710	11400	0.132	0.046
	50	2530	552	4160	12100	0.133	0.043

α -amyl: α -amylase, unit/g-dry matter; glc: glucoamylase, mg-glucose/h/g-dry matter, APase: acid protease, μg -tyrosine/h/g-dry matter; ACPase: acid carboxypeptidase, μg -tyrosine/h/g-dry matter, DF: deferriferrichrome, μg -DF/g-dry matter.

必要であり、醗においては acid protease が蒸し米の溶解を律速していること, glucoamylase がアルコール発酵を律速していること, および acid carboxypeptidase 活性がアミノ酸の生成に関係していることを明らかにしている。

また、清酒の鉄による着色に関与する麹菌によって生産される deferriferrichrome²⁴⁾ を定量した。

Fig. 7 に α -amylase と菌体増殖の経時変化を示したが、 α -amylase が増殖と連動して生産されることがわかる。この傾向は、Table 5 に示されるように他の酵素についても同様で、各酵素間の組成比は培養時間によってほとんど変わらない。従って、酵素生産を目的とする場合は、最大増殖量に達した時点で出麹とすることが、製麹管理のポイントになる。²⁰⁾

6. 環境要因の影響

培養温度の影響¹⁷⁾ 培養温度が酵素生産に影響を与えることはすでに報告されている²⁵⁾が、ここでは増殖との関連で検討を加えた。Fig. 10 には、30~40°C の一定温度に保って培養した時の増殖経過を示す。比増殖速度は 37.5°C で最大で、それ以外では低下した。一方、Fig. 10 において、対数期の直線部分を培養0時間に外挿した酸素吸収量がほぼ1点に収束することから、発芽に対する温度の影響は少ないと考えられる。各温度における酵素生産について、同一菌体量および最大増殖量に達した時点で比較し、Table 6 に示す。同一菌体量（酸素吸収量 10 ml/g-乾物）で比較した場合、増殖の最適温度（37.5°C）で α -amylase, glucoamylase および deferriferrichrome の生産がよく、一方 acid protease および acid carboxypeptidase は 35°C 以下でよく生産される。最大菌体増殖量 (O_{2max}) は 35~40°C では大差ないので、最大増殖における酵素生産は同一菌体量で比較した場合と同じ傾向を示した。

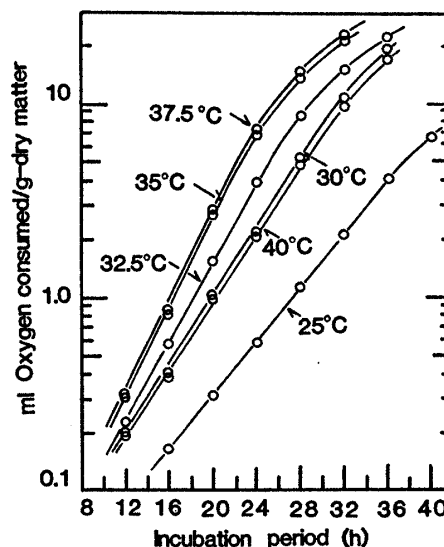


Fig. 10. Influence of incubation temperature on the growth of *A. oryzae* RIB 128.

The culture conditions are the same as Fig. 6 except for incubation temperature.

蒸し米水分¹⁷⁾ 蒸し米水分を調整し、増殖および酵素生産への影響を調べた。増殖に関して蒸し米吸水率が33%を超えると比増殖速度は変化しないが、 $T_{1.0}$ が小さくなり発芽の誘導期が短縮される。24%以下になると、比増殖速度に影響が現れる (Table 7)。酵素生産に関しては Table 7 に見られるように、水分が少ないほど単位菌体当たりの酵素活性が著しく高くなる傾向を増して最大菌体増殖量は蒸し米水分が42.2%までは増加したが、それ以上ではむしろ低下する傾向が認められたが、この原因は不明である。

酸素濃度¹⁶⁾ 自動増殖測定装置を用いれば、常に初発の酸素濃度で培養できるので、その影響を調べた (Fig. 11)。酸素濃度が1%以下でも比増殖速度は低下しない興味ある現象が観察された。このことは密閉容

Table 6. Influence of incubation temperature on the enzyme activities.

Incubation temp. °C	μ	O_{2max}	Enzyme activities ^a					Enzyme activities ^b			
			α -Amyl	Glc	APase	ACPase	DF	α -Amyl	Glc	APase	ACPase
30.0	0.22	1.52	375	104	1290	3240	137	1360	412	5990	17200
32.5	0.24	—	822	221	2100	5960	220	—	—	—	—
35.0	0.28	1.98	857	207	1900	6410	258	1490	437	3870	17900
37.5	0.28	—	923	237	1680	4790	265	—	—	—	—
40.0	0.20	2.00	750	189	1220	3520	254	2030	488	3710	11400

^a at 10 ml O_2 consumption.

^b at maximum mycelial growth.

Table 7. Influence of water content on the growth and enzyme activities.¹⁷⁾

Quantity of water H ₂ O addition (ml)	content (%)	Growth character- istic values			Enzyme activities ^a					Enzyme activities ^b				
		μ	$T_{1.0}$	O_{2max}	α -Amyl	Glc	APase	ACPase	DF	α -Amyl	Glc	APase	ACPase	DF
0.3	15.6	0.18	24.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.4	24.4	0.24	21.2	—	845	244	2440	8120	210	—	—	—	—	—
0.5	33.3	0.29	19.0	1.85	920	198	1930	6040	258	1500	537	5100	15300	467
0.6	42.2	0.28	18.1	1.87	723	122	1270	4170	227	1470	397	3560	9550	443
0.7	51.1	0.29	16.9	1.77	743	100	770	4730	309	1060	241	2390	6310	563
0.8	59.9	0.29	16.6	1.42	—	—	—	—	—	625	137	1300	4610	570
1.0	77.6	—	—	1.27	—	—	—	—	—	329	48	340	3020	299

Addition of water: The definite quantity of water (ml-H₂O/g dry rice) containing spores of *A. oryzae* was added to one g of dry rice (α -rice). Water content after addition was calculated by previous method in chapter 2 assuming the rice water content of 14.0%.

^a at 10 ml O₂ consumption.

^b at maximum mycelial growth.

器中の酸素が消費されるまで増殖が低下しなかった結果と一致している (Fig. 6). しかし、酸素濃度が低いと $T_{1.0}$ は大きくなり、発芽の誘導期間は酸素濃度が高いほど短縮されることを示す。最大増殖量と酵素生産には、酸素濃度の影響は認められなかった。

炭酸ガス濃度²⁶⁾ 自動増殖測定装置の培養容器中には通常 6.5% の苛性ソーダが用いられているので、容器中の炭酸ガス濃度はほとんど 0 である。そこで、

増殖にともなって発生する炭酸ガスが貯留しないことを確認したうえで、苛性ソーダの代わりに炭酸カリ-炭酸水素カリ緩衝液を用いて容器中の炭酸ガス濃度を一定に保って、炭酸ガスの影響を調べた。炭酸ガス濃度 0, 0.04, 0.14, 1.0% における $T_{1.0}$ の値は、それぞれ 18.5, 17.7, 17.1, 17.1 時間となり、0% に比し炭酸ガスが 0.1% 程度存在した方が発芽が促進されることがわかる。このことは、Yanagita²⁷⁾ が *A. niger* を用いた実験結果と一致している。さらに長期間にわたって培養を続けると、容器中の炭酸ガス濃度を緩衝化できなくなるので、炭酸ガスの増殖や酵素生産への影響については今後装置を改良して検討したい。

胞子接種濃度²⁸⁾ 製麹には通常、白米 100 kg 当たり粒状種麹 100 g が使用される。粒状種麹 1 g 当たり約 10^8 個の分生胞子が含まれるので、白米 1 g 当たり 10^5 個、白米 1 粒当たり約 2000 個が接種されることになる。この胞子接種量の増殖と酵素生産への影響を調べた。一般に見られるように、接種量を増すと見掛けの誘導期の短縮が観察された (Fig. 12). Fig. 12 について世代時間は約 2.5 時間であるので、10 倍量の胞子を接種すれば約 8.3 時間の lag time の短縮があってよいことになるが、実際には 4~5 時間の短縮しか観察されない。このことは、接種した胞子量が増加するほど蒸し米上で発芽しない無効胞子数の割合が増えるためと考えている。増殖に関しては以上のことが認められたが、接種濃度が異なると、同一菌体量に達した時点における麹に肉眼的に著しい状態の違いが観察される。すなわち、胞子接種量が 5×10^3 /g-乾物 以下で

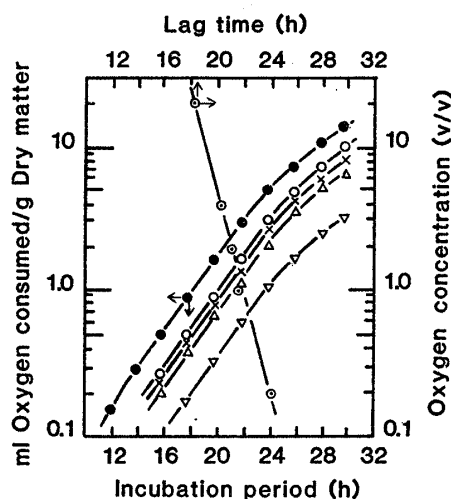


Fig. 11. Effect of oxygen concentration on the growth of *A. oryzae* RIB 128.

Oxygen concentration: —●—, 20%; —○—, 4%; —×—, 2%; —△—, 1%; —▽—, 0.2%. The curve of oxygen concentration vs time required for uptake of 1 ml of oxygen is plotted as ⊙.

The culture conditions are the same as Fig. 6 except for oxygen concentration.

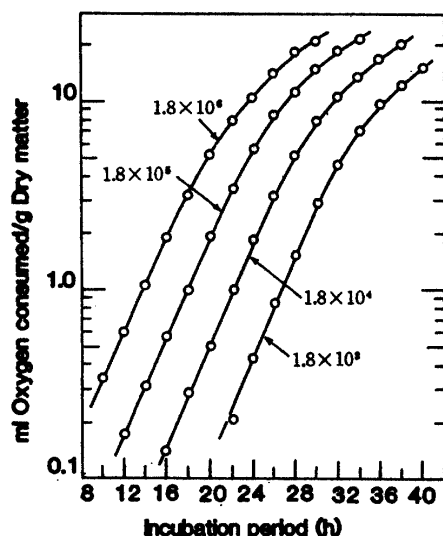


Fig. 12. Influence of inoculum size on the mold growth.²⁸⁾

The culture conditions are the same as Fig. 6 except for inoculum size.

いわゆる突破精型の麹になることが認められた。吟醸麹としてはこの突破精型が好まれ、その製造条件として蒸し米水分を少なくし、麹室内で蒸し米を乾燥させるとよいとされている。しかし検討の結果、突破精麹になる最大の要因が孢子接種量であり、蒸し米水分や製麹中の相対湿度にはほとんど関係しないことが明らかになった。Fig. 13 は孢子接種量を 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 /g-乾物とし、それぞれ酸素吸収量が 5 ml/g-乾物の時点の麹の外観写真（黒く写っている部分が麹菌の繁殖したいわゆる破精）である。いずれも同一菌体増殖量における写真であるので、表面にあまり増殖していない麹（孢子接種量 5×10^3 ）では蒸し米の中心部へ深く増殖しているはずであり、実際に麹を切断してみると菌糸が深く入り込んでいる様子が観察された。しかし、各接種条件における同一菌体量で出麹した麹の酵素力については、大差は認められなかった。

7. 白米成分の影響²⁹⁾

野白ら²⁹⁾ は掛け流しによるカリウムの流出が麹菌の増殖と酵素生産を低下させることを認めた。片倉と畑中²⁹⁾ は精米歩合の低下にともなって酵素生産が低下するが、低下の度合いがアミラーゼでは小さく、酸性プロテアーゼで大きいことを指摘している。筆者らは、精米歩合の異なる 9 品種、20 種類の白米試料について各白米の化学成分を定量し、各白米上における麹菌の増殖特性値と麹の酵素力価を測定した。増殖特性値お

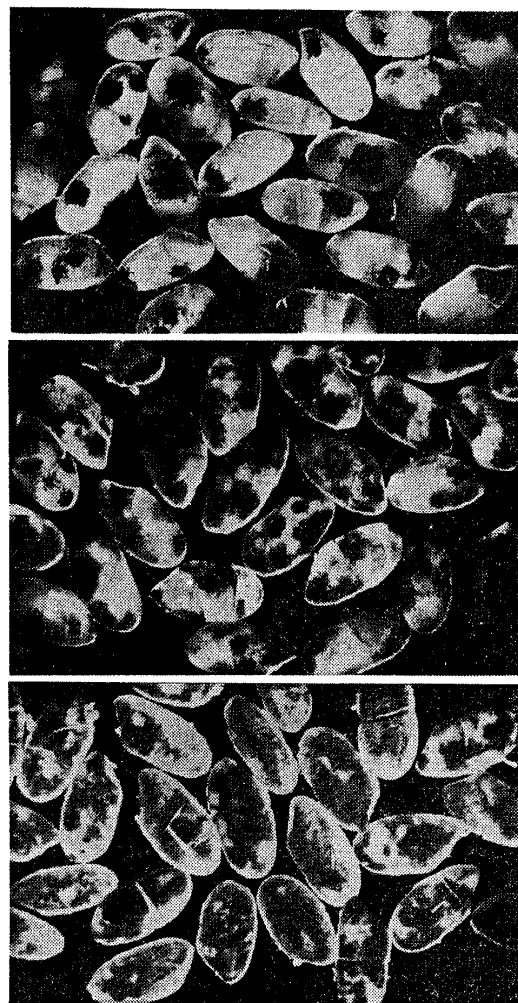


Fig. 13. Influence of inoculum size on aspect of koji.²⁸⁾

The culture conditions are the same as Fig. 6.
Photograph: upper 5×10^3 /g dry matter
middle 5×10^2 /g dry matter
lower 5×10^1 /g dry matter

よび酵素力価を目的変数とし、化学成分分析値を説明変数とする重回帰分析を行い、目的変数と関連の深い化学成分を見出し、見出された成分の水溶液を製麹水として白米に添加してその影響を確認した。増殖および酵素生産への影響が確認された成分とその結果を Table 8 に示した。

増殖に影響する成分 比増殖速度定数は無機態、有機態を問わず、窒素成分の増加にともない増大する。発芽の誘導期 ($T_{1.0}$) に関しては、白米中のアミノ態窒素とカリウムが多いほど小さくなり、これらの成分が発芽を促進していることがわかる。最大菌体増殖量 (O_{max}) はリン酸とカリウムが多いほど増大し、白米中のこれらの成分が菌体増殖量を律速していることが

Table 8. Effect of added chemical compounds on growth and enzyme activity in *koji* production.¹⁹⁾

Addition	Quantity of addition (per g-dry matter)	Growth characteristic values			Enzyme activities ^a					Enzyme activities ^b			
		μ	$T_{1.0}$	O_{2max}	α -Amyl	Glc	APase	ACPase	DF	α -Amyl	Glc	APase	ACPase
Control	0	0.297	18.4	1.99	792	176	1990	7620	246	1530	408	3960	12600
KCl	0.05 mM	0.301	17.0	2.31	627	205	2190	7100	282	733	587	3830	13800
MgCl ₂	//	0.297	17.0	1.87	396	168	2330	6210	221	742	491	4310	14300
CaCl ₂	//	0.297	17.2	1.84	638	169	2280	6250	168	1170	440	3870	12300
NaH ₂ PO ₄	//	0.301	17.4	2.35	798	86	2770	6590	208	1480	411	5420	15000
KH ₂ PO ₄	//	0.301	16.8	2.72	654	132	2810	7450	218	404	498	7010	18300
(NH ₄) ₂ HPO ₄	//	0.347	17.2	2.29	—	—	—	—	—	256	396	4290	16100
NH ₄ H ₂ PO ₄	//	0.330	17.0	2.26	—	—	—	—	—	199	342	3610	15500
(NH ₄) ₂ CO	//	0.365	16.4	1.96	835	193	1180	5820	305	1580	432	2970	12400
NH ₄ Cl	//	0.365	17.3	1.29	<200	91	1050	3470	80	105	131	1720	9000
NH ₄ NO ₃	//	0.385	14.2	1.99	866	180	2030	7710	276	1340	386	2750	11400
KNO ₃	//	0.347	16.8	2.37	—	—	—	—	—	713	667	4470	15300
NaNO ₃	//	0.365	15.6	2.00	587	140	1310	3630	263	—	—	—	—
Na-glutamate	//	0.347	14.2	1.98	857	234	1310	5830	210	—	—	—	—
Casamino acid	10 mg	0.385	13.0	2.00	833	161	2070	5860	158	1620	428	2840	12300
FeCl ₃	0.5×10 ⁻⁴ mM	0.297	18.2	—	718	156	2120	6240	155	—	—	—	—
//	0.5×10 ⁻³ mM	0.297	18.4	—	780	167	2170	6510	103	—	—	—	—
//	0.5×10 ⁻² mM	0.297	18.0	—	586	175	2220	6220	76	—	—	—	—

^a at 10 ml O₂ consumption.^b at maximum mycelial growth.

確認できた。

増殖と酵素生産の関係 前述のとおり、蒸し米上における麹菌の酵素生産は増殖連動型であり、酵素活性と O_{2max} の相関係数は大きい (Table 9), 酵素活性の全変動をすべて増殖量で説明することはできない。acid protease と acid carboxypeptidase は増殖量とよく比例して生産されるが、 α -amylase と glucoamylase

の説明度合は低く、他に変動要因があると思われる。

酵素生産と白米成分の関係 acid protease と acid carboxypeptidase は前述のように菌体増殖量と比例して生産されるので、菌体増殖量に影響するリン酸とカリウムが多いほど活性が高くなる。従って、精米歩合が低くなってリン、カリウムが低下すると、acid protease と acid carboxypeptidase 活性は低下する。これに対

Table 9. Correlation coefficient matrix of growth characteristic values and enzyme activities (n=20).¹⁹⁾

	μ	$T_{1.0}$	O_{2max}	α -Amyl	Glc	APase	ACPase	DF
μ	1.00							
$T_{1.0}$	-0.97**	1.00						
O_{2max}	-0.73**	-0.80**	1.00					
α -Amyl	0.81	-0.01	0.43	1.00				
Glc	0.22	-0.53*	0.53*	0.10	1.00			
APase	0.70**	-0.88**	0.93**	0.15	0.58**	1.00		
ACPase	0.74**	-0.87**	0.87**	0.26	0.66**	0.88**	1.00	
DF	0.07	-0.14	0.07	0.25	0.51*	0.03	0.31	1.00

* r (18, 0.05) = 0.444

** r (18, 0.01) = 0.561

Table 10. Influence of polishing ratio on the mold growth and enzyme activities.¹⁹⁾

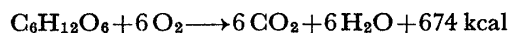
Sample no.	Variety	Polishing ratio (%)	Growth characteristic values			Enzyme activities ^a					Enzyme activities ^b				
			μ	$T_{1.0}$	O_{2max}	α -Amyl	Glc	APase	ACPase	DF	α -Amyl	Glc	APase	ACPase	DF
1	<i>Matsumae</i>	95	0.330	15.8	3.11	723	167	3740	7050	105	1640	475	9100	21500	584
2	//	85	0.310	16.8	2.15	712	225	3220	6240	268	1480	448	5830	22300	855
3	//	75	0.274	17.9	1.63	602	277	3200	7100	337	1070	393	5000	15200	598
4	//	65	0.267	18.0	1.27	368	239	2670	8150	295	641	413	4230	13800	512
5	<i>Nihonbare</i>	95	0.343	15.9	2.90	800	117	3880	6820	72	1420	370	8920	21700	295
6	//	85	0.324	17.4	2.01	713	170	3010	6850	246	1480	404	4330	17100	677
7	//	75	0.302	18.8	1.60	630	238	2620	6370	332	1450	249	2920	13500	491
8	//	65	0.315	18.8	1.52	584	226	2780	5910	342	1340	350	3670	12800	739
9	<i>Yamadanishiki</i>	95	0.330	16.1	2.88	729	138	4040	8810	105	1510	445	8090	21200	471
10	//	85	0.302	17.9	2.10	735	178	3580	8130	163	1480	423	4670	15500	460
11	//	75	0.283	18.3	1.67	657	235	3320	6270	179	1390	421	4380	14400	457
12	//	65	0.292	18.5	1.43	409	228	1720	7340	122	928	348	3950	12100	275

^a at 10 ml O_2 consumption.^b at maximum mycelial growth.

して, glucoamylase は Table 8 の添加試験結果にみられるように, リン酸添加によって単位菌体量当たりの活性が低下する。従って, 精米歩合が低くなって菌体増殖量が低下しても, 最大増殖量で出麹した麹の glucoamylase 活性はほぼ一定である (Table 10)。このことは, これまで精米の目的が米粒外層のタンパク質や脂質を除去するためと考えられていたが, ここで示されたように麹の酵素バランスを変えることができる点で興味深い。

8. 増殖特性を利用した製麹管理法²⁰⁻²²⁾

蒸し米上における麹菌の増殖に logistic モデルが適用でき, 増殖の最大値が存在し, この値が酸素吸収速度の最大値に比例することを明らかにした。またグルコースを基質とし呼吸商がほぼ 1.0 であるので次の反応式を利用すれば, 酸素吸収速度の代わりに測定により簡単な発熱速度をもって増殖の指標とすることができる。



一般的な通風製麹装置は Fig. 14 に示すような構造で, 麹菌の増殖にともなう温度上昇を検出し, 通風することにより冷却を行うものである。発熱速度測定の 1 つは, 通風ファンの作動回数が発熱速度に比例する実験事実に着目し, 作動回数から発熱速度の経時変化を予測することができる。この経過から最大発熱速度に達した数時間後に菌体増殖が最大に達するので, こ

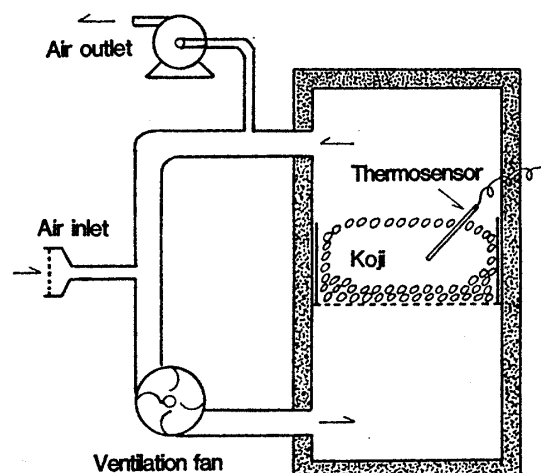


Fig. 14. Koji-making apparatus with forced aeration.

の時点で出麹することによって酵素力を最大にし, かつ基質の消費を最少にすることが可能となる。

9. おわりに

本研究では, 現場における製麹管理や製麹法の理論的裏付けを目的として, 蒸し米上での麹菌の増殖量を指標に酵素生産に及ぼす種々の要因を検討した。また, 製麹中の菌体増殖量を, 呼吸にともなう酸素吸収速度や発熱速度でとらえる管理法を提案した。

現在の清酒の品質目標の一例として, 味の淡麗化や貯蔵中の劣化防止の面から, 清酒中のアミノ酸を少なくする傾向が挙げられる。麹の酵素力を低くすればアミノ酸などの成分も少なくなるが, 粕歩合が高くなり

不経済になる。そこで、 α -amylase や glucoamylase 活性の高い、acid carboxypeptidase 活性の低い麴を得る製麴管理が経験的に行われてきており、これらの管理に対して本研究によりある程度の理論的意味付けができたと考えている。今後、さらに酒質の多様化などに合わせた製麴管理や製麴法の改善、製麴装置の改良などに本研究が少しでも役立てられれば幸いである。

最後に、本研究の推進に当たり絶大なご支援とご指導をいただいた元国税庁醸造試験所長野白喜久雄博士、前所長大塚謙一博士、現所長秋山裕一博士、当所第4研究室田中利雄室長、ならびにご協力いただいた共同研究者各位に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) Bindal, A. N., Sreenivasaya, M.: *J. Sci. & Ind. Research*, **3**, 386 (1945).
- 2) 坂口, 岡崎, 竹内: 農化, **29**, 349 (1955).
- 3) Yamamoto, K.: *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **21**, 308 (1957).
- 4) 藤島, 内田, 吉野: 醸工, **50**, 724 (1972).
- 5) 照井, 森本: 醸工, **39**, 196 (1961).
- 6) Arima, K., Uozumi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 119 (1967).
- 7) 大内, 石戸, 菅間, 野白: 醸協, **62**, 1029 (1967).
- 8) Sakurai, Y., Lee, T. H., Shiota, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 619 (1977).
- 9) 加藤, 小林, 泉, 花園: 農化, **50**, 395 (1976).
- 10) 布川, 山本, 大内: 醸協, **69**, 616 (1974).
- 11) 布川, 岩野, 風間: 醸協, **71**, 650 (1976).
- 12) 岩野, 布川: 醸協, **72**, 78 (1977).
- 13) 菅間, 岡崎, 本郷, 岩田: 醸協, **73**, 397 (1978).
- 14) 岡崎, 弘中, 嶋崎, 菅間: 醸協, **73**, 402 (1978).
- 15) Sugama, S., Okazaki, N.: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 408 (1979).
- 16) Okazaki, N., Sugama, S.: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 413 (1979).
- 17) 岡崎, 竹内, 菅間: 醸協, **74**, 683 (1979).
- 18) Okazaki, N., Sugama, S., Tanaka, T.: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 471 (1980).
- 19) 岡崎, 深谷, 菅間, 田中: 醸酵工学, **59**, 491 (1981).
- 20) 岡崎, 菅間: 公開特許公報 昭56-55194.
- 21) 岡崎, 福田, 菅間, 田中: 醸協, **75**, 91 (1980).
- 22) 岡崎, 西谷, 田中, 大塚: 醸協, **76**, 202 (1981).
- 23) 照井, 森本: 醸工, **34**, 575 (1956).
- 24) Tatenuma, M., Sato, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1482 (1967).
- 25) 鈴木, 布川: 醸協, **51**, 322 (1956).
- 26) 岡崎, 菅間: 未発表データ.
- 27) Yanagita, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 343 (1963).
- 28) 岡崎, 福田, 菅間: 醸協, **74**, 687 (1979).
- 29) 野白, 中川: 醸協, **52**, 900 (1957).
- 30) 片倉, 畑中: 醸協, **54**, 744 (1959).

(昭57. 3. 5受付)