

醤油麹の酵素活性を高める製麹方法の開発

岡本 雄二^{*1)}, 首藤 明子^{*2)}, 藤岡 靖弘^{*3)}, 大橋 正孝^{*2)}, 都築 正男^{*2)}, 清水 浩美^{*2)}

Development of Method for Producing Koji

which Raises an Enzyme Activities of Soy Sauce Koji

OKAMOTO Yuji ^{*1)}, SHUTO Akiko ^{*2)}, FUJIOKA Yasuhiro ^{*3)},
OHASHI Masataka^{*2)}, TSUDUKI Masao ^{*2)}, SHIMIZU Hiromi ^{*2)}

市販されている種麹菌 8 種を使用して、麹及び古代ひしおを製造し、そのプロテアーゼ活性及び味覚について評価した。その結果、種麹菌の違いにより活性や味覚が異なることが確認された。次に黒豆麹の製麹について温度条件の検討を行った結果、タンパク質の分解に関わる酵素活性は 20℃で製麹したとき活性が最も高く、デンプン等の分解に関わる酵素活性は 30℃で製麹した時に活性が最も高いことが分かったが、出麹までの時間を考慮すると、各酵素活性を高める製麹方法としては 30℃で製麹するのが適していると考えられた。

1. 緒言

日本人の味覚形成に大きな影響を与えている醤油や味噌などの調味料は、奈良時代に中国から製法が伝来し、その基礎が作られたといわれている。古代に都が置かれた奈良は多くの食品の発祥の地といわれ、醤油や味噌の原型である「ひしお」も奈良が発祥といっても過言ではない。

平成 21 年に奈良県醤油工業協同組合及び NPO『なら食』研究会と当センターの三者で立ち上げた「ひしおの会」では、中国の農業技術書「齊民要術」などの古文書を参考に奈良時代の製法を推察し、ひしおを復元し、「古代ひしお」として商標登録を行った。現在までに商品化に至ったが、手作り商品であることに加え、製造ごとに使用する種麹菌が異なること、また原料の黒豆や麦を麹にする際の条件も若干異なっていたことから、熟成過程で働く麹の分解酵素の活性に差が生じ、品質にバラツキが見られることが課題となっている。

そこで本研究では、古代ひしおの味覚改善及び品質安定を目標に、どの種麹菌が最も古代ひしおに適しているかを検討するとともに、製麹時の温度条件についても検討を行い、酵素活性を高める製麹方法の開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 供試種麹

一般に醤油に使用する種麹には *Aspergillus sojae*(以下 *A.sojae* と記す)と *Aspergillus oryzae*(*A.oryzae* と記す) の 2 種類がある。いずれも黄麹菌で、種麹を専門に製造する業者から用途別に多種類の製品が販売されている。

製麹に際し、市販されている醤油用の種麹菌 8 種を用いた (表 1)。

表 1 供試種麹

種麹	菌種	形状	種麹	菌種	形状
黄麹 1	<i>A.oryzae</i>	粉状	黄麹 5	<i>A.sojae</i>	粉状
黄麹 2	<i>A.sojae</i>	米状	黄麹 6	<i>A.sojae</i>	粉状
黄麹 3	<i>A.sojae</i>	米状	黄麹 7	<i>A.sojae</i>	粉状
黄麹 4	<i>A.oryzae</i>	粉状	黄麹 8	<i>A.oryzae</i>	粉状

2.2 麹の製麹

麹原料には黒豆と麦を用い、それぞれ吸水を行った後、蒸したものを麹原料とした。それぞれの原料に種麹菌及びはったい粉を混合し、恒温恒湿器で 2~3 日間培養後、出麹とした (表 2 及び表 3)。終点は、目視により菌糸の状況を確認し、全体に菌糸が覆われた時点とした。

表 2 黒豆麹の製麹条件

供試種麹	黄麹 1	黄麹 2	黄麹 3	黄麹 4	黄麹 5	黄麹 6	黄麹 7	黄麹 8
黒豆 (g)	315			158	105			
種麹 (g)	0.3			0.15	0.1			
はったい粉 (g)	15			10	5			
吸水時間 (min)	85	150	180					
蒸し時間 (min)	60			30	60			
製麹時間 (day)	3	2	2	3	3	2	2	4
設定温度 (℃)	35				27-33	27-32	27-32	27-35
設定湿度 (%RH)	80							

表 3 麦麹の製麹条件

供試種麹	黄麹 1	黄麹 2	黄麹 3	黄麹 4	黄麹 5	黄麹 6	黄麹 7	黄麹 8
麦 (g)	110	55	55	55	55	55	55	55
種麹 (g)	0.13	0.73		0.08	0.07			
はったい粉 (g)	4	2.6	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5
吸水時間 (min)	180							
蒸し時間 (min)	120							
製麹時間 (day)	2							
設定温度 (℃)	30							
設定湿度 (%RH)	50-80	80						

*1) リビングサイエンス先導的研究開発グループ *2) バイオ・食品グループ *3) ライフマテリアルグループ

2.3 古代ひしおの製造

2.2の各麴を用いて古代ひしおを製造した(表4)。古代ひしおは100日間熟成させた後、測定時まで冷凍保存した。

表4 古代ひしおの仕込

	黄麹1	黄麹2	黄麹3	黄麹4	黄麹5	黄麹6	黄麹7	黄麹8
黒豆麹(g)	100				80		100	70
麦麹(g)	50				40		50	35
食塩水(ml)	250-330	260-310				190-240	260-310	173

2.4 酵素活性の測定

各麴及び古代ひしおの酵素活性を測定した。全プロテアーゼ活性、アルカリプロテアーゼ活性及び酸性プロテアーゼ活性はしょうゆ試験法¹⁾に従って測定した。また、それぞれの酵素活性は固形分当たりの値で示した。

2.5 味覚センサーによる古代ひしおの測定

古代ひしお5gを秤量し、蒸留水45mlを加え5h攪拌後、遠心分離し、ろ紙(2C)でろ過したろ液40mlを5倍希釈した液を測定試料とした。測定には味覚センサー(味認識装置TS-5000Z)((株)インテリジェントセンサーテクノロジー製)を用い、酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味、苦味、渋味、旨味コク及び甘味の9種の味覚を測定した。また、基準サンプルには、大手食品メーカーのこいくちしょうゆ(本醸造)を用いた。

2.6 古代ひしおの官能試験

ひしおの会のパネル8名が試醸した古代ひしおの「味」及び「香り」について「◎」「○」「△」「×」の4段階で評価する方法で官能試験を行った。

2.7 製麴時の温度条件の検討

黒豆麴の製麴温度を20℃から40℃までの範囲で黄麹4を用いて表5のとおり製麴し、その酵素活性を測定した。

表5 製麴条件

	Lot1	Lot2	Lot3	Lot4	Lot5
黒豆(g)	100				
黄麹4(g)	0.1				
はったい粉(g)	10				
吸水時間(min)	60				
蒸し時間(min)	60				
製麴時間(h)	48			116	140
製麴温度(℃)	40	35	30	25	20
設定湿度(%RH)	80				

製麴温度が低かったLot4及びLot5は、48時間では麴菌の発育が不十分だったため、半量は麴になるまで製麴時間を延長した。またα-アミラーゼ活性はα-アミラーゼ測定キット、グルコアミラーゼ活性及びα-グルコシダーゼ活性は糖化力分別定量キット、酸性カルボキシペプチダーゼ活

性は酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット(いずれもキッコーマンバイオケミファ(株)製)を用いて測定した。全プロテアーゼ活性、アルカリプロテアーゼ活性、中性プロテアーゼ活性及び酸性プロテアーゼ活性は基準みそ分析法²⁾に従って測定した。

3. 結果及び考察

3.1 各麴の酵素活性

黒豆麴及び麦麹の全プロテアーゼ活性、アルカリプロテアーゼ活性及び酸性プロテアーゼを測定した。その結果を図1及び図2に示す。麴別では、全プロテアーゼ活性及びアルカリプロテアーゼ活性は黒豆麴が高かった。酸性プロテアーゼ活性は麦麹が高い活性を示した種麴菌もあったが、黒豆麴の全プロテアーゼ活性やアルカリプロテアーゼ活性に比べるとその活性は低かった。これは、麦麹の製麴状態があまり良くなかったことも原因の一つとして考えられる。また、活性の高かった黒豆麴の全プロテアーゼ活性について種麴菌別に比べると、黄麹5が1200 units/gと最も高く、黄麹2が167 units/gと最も低かった。その他の種麴菌は261~478 units/gであった。

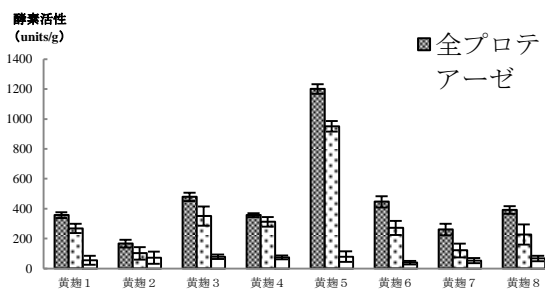


図1 黒豆麴の酵素活性

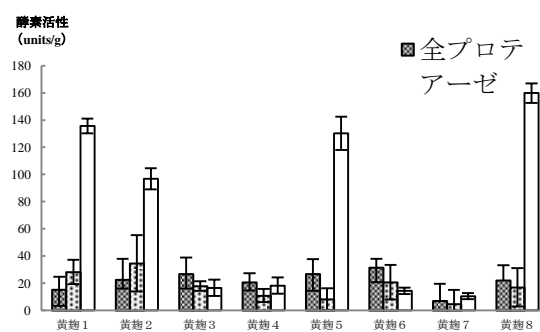


図2 麦麹の酵素活性

3.2 古代ひしおの酵素活性

各麴を用いて製造した古代ひしおの全プロテアーゼ活性、アルカリプロテアーゼ活性及び酸性プロテアーゼを測定した。その結果を図3に示す。古代ひしおの全プロテアーゼ活性についても、黄麹5の活性が330 units/gと最も高く、黄麹2が65 units/gと最も低かった。

また、古代ひしおのプロテアーゼ活性は、酸性プロテアー

ゼ活性を除いて黒豆麹のプロテアーゼ活性と強い相関がみられた。ひしおの熟成には 100 日程度かかることから、黒豆麹の活性を測ることで、製品となる古代ひしおの活性が推測でき迅速な対応が可能となると考えられる。

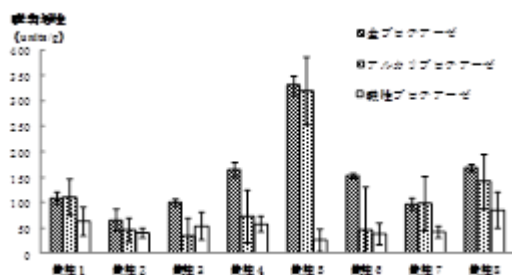


図 3 古代ひしおの酵素活性

3.3 味覚センサーによる測定結果

味覚センサーによる評価結果を表 6 に、一部を抜粋したチャートを図 4 に示す。評価値における 1 目盛の違いは、人が味の違いを認識できる差であることを目安に定められている³⁾が、古代ひしお 8 種の最大値と最小値で 1 以上の差がついた評価項目は、酸味、塩味、甘味及び苦味雑味であった。

旨味は、黄麹 5 が最大、黄麹 2 が最小でその差は 0.93 と 1 以下であったが、3.2 で示した古代ひしおの全プロテアーゼ活性との相関をとると、相関係数 0.92 と強い相関がみられた (図 5)。旨味以外の評価項目については全プロテアーゼ活性との間に相関はなく、プロテアーゼ活性の違いがひしおの旨味に影響することが示唆された。

表 6 味覚センサーによる評価結果

	酸味	苦味雑味	渋味刺激	旨味	塩味	苦味	渋味	旨味コク	甘味
こいくちしょうゆ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
黄麹1	-6.06	1.42	0.65	1.89	-1.65	-0.03	0.03	-0.21	4.24
黄麹2	-5.32	0.90	0.32	1.69	-1.87	0.07	0.00	-0.29	3.49
黄麹3	-5.38	1.60	0.69	1.82	-1.69	0.08	0.06	-0.26	3.08
黄麹4	-6.68	2.32	1.16	2.24	-0.91	0.01	0.06	-0.09	2.79
黄麹5	-7.66	0.95	0.36	2.63	-1.35	0.01	-0.05	-0.37	5.37
黄麹6	-4.85	0.78	0.19	1.80	-2.12	0.17	0.00	-0.21	2.56
黄麹7	-5.26	2.84	0.77	1.70	-1.60	0.92	0.05	-0.27	2.15
黄麹8	-5.27	1.91	0.76	1.88	-1.83	0.22	0.04	0.04	2.13

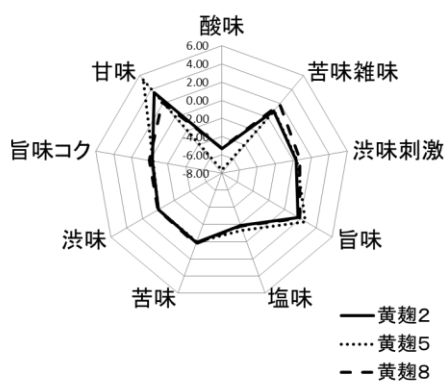


図 4 味覚センサーによる評価結果 (チャート)

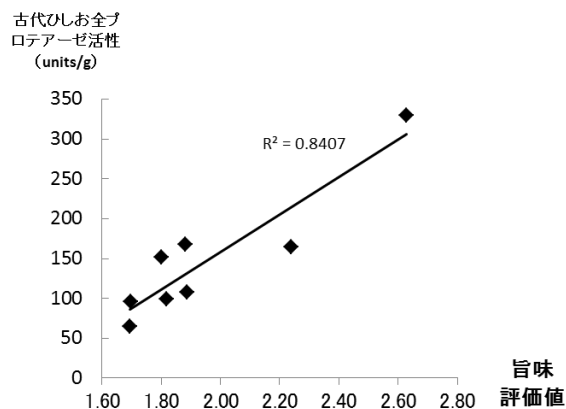


図 5 全プロテアーゼ活性と旨味の関係

3.4 官能試験結果

官能評価結果を表 7 及び表 8 に示す。表中の数字は回答したパネル数を示し、合計点は「◎」: 3 点, 「○」: 2 点, 「△」: 1 点, 「×」: 0 点として算出した。「味」及び「香り」ともに黄麹 2 を用いた古代ひしおの評価が高く、黄麹 4 の評価が低かった。また、「味」と「香り」の合計点には相関係数 0.87 と強い相関が見られた。黄麹 5 は豆の溶けが良いなど食感にも差が出ており、これらの要因も味の評価に影響したと考えられる。

表 7 「味」の官能評価

	◎	○	△	×	合計点
黄麹1	2	4	1	1	15点
黄麹2	4	4	0	0	20点
黄麹3	4	3	1	0	19点
黄麹4	0	6	1	1	13点
黄麹5	1	5	2	0	15点
黄麹6	1	6	1	0	16点
黄麹7	1	6	0	1	15点
黄麹8	1	5	2	0	15点

表 8 「香り」の官能評価

	◎	○	△	×	合計点
黄麹1	0	6	2	0	14点
黄麹2	4	4	0	0	20点
黄麹3	2	5	1	0	17点
黄麹4	0	5	3	0	13点
黄麹5	3	3	2	0	17点
黄麹6	1	6	1	0	16点
黄麹7	1	4	3	0	14点
黄麹8	1	5	2	0	15点

3.5 製麹時の温度条件の検討

40℃で製麹した Lot1 の各酵素活性を 100 としたときの各 Lot の酵素活性 (α-アミラーゼ, グルコアミラーゼ, α-グルコシダーゼ, 酸性カルボキシペプチダーゼ, 各プロテアーゼ) を図 6 及び図 7 に示す。

デンプン等の分解に関わる酵素活性である α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ活性は、30℃で製麴した Lot3 が最も高く、特に糖化力の指標となるグルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ活性は温度条件による活性の差が大きかった。タンパク質の分解に関わる酵素活性である酸性カルボキシペプチダーゼ、酸性プロテアーゼ活性、中性プロテアーゼ活性及びアルカリ性プロテアーゼ活性は、20℃で製麴した Lot2 が最も高く、40℃で製麴した Lot1 と比べ 2 倍以上の活性がみられた。ただし、Lot4 及び Lot5 とともに、麴になっていない 48 時間の時点での各酵素活性は低く、今回目視で行った麴状態の違いが各活性に影響を与えていることも考えられ、出麴までの時間を考慮すると、各酵素活性を高める製麴方法としては 30℃で製麴するのが適していると考えられた。

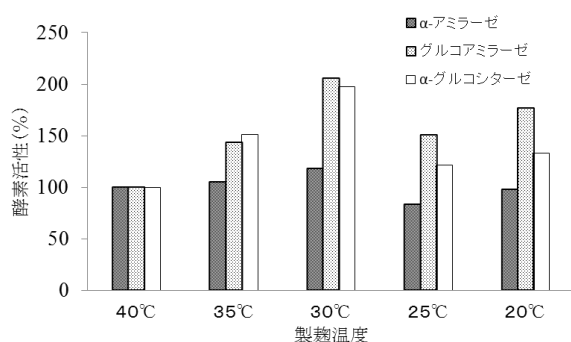


図 6 デンプン等の分解に関わる酵素活性

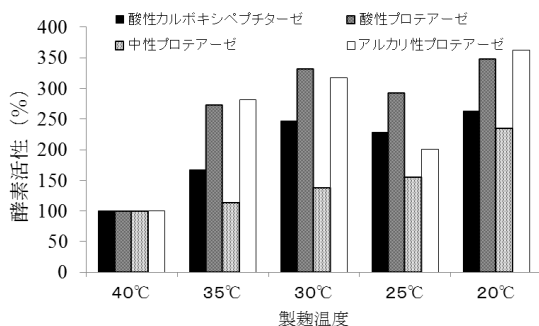


図 7 タンパク質等の分解に関わる酵素活性

4. 結言

8 種類の種麴菌を使用し、麴及び古代ひしおを製造し、酵素活性、味覚評価及び製麴時の温度条件について検討し以下の結果を得た。

- (1)各プロテアーゼ活性は、麦、古代ひしおと比較して黒豆麴が高い活性を示した。また、黒豆麴と古代ひしおの全プロテアーゼ活性には高い相関がみられた。
- (2)種麴菌の違いにより各プロテアーゼ活性に差があり、黄麴 5 が最も高い活性を示した。
- (3)種麴菌の違いにより古代ひしおの酸味、塩味、甘味及び苦味雑味に差が出た。また、旨味とプロテアーゼ活性には高い相関がみられた。
- (4)官能試験では味、香りともに黄麴 2 を用いた古代ひし

おの評価が高かった。

- (5)製麴時温度条件の違いにより各酵素活性に差があり、各酵素活性を高める製麴方法としては 30℃で製麴するのが適していると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、NPO「なら食」研究会横井代表をはじめ、ひしおの会の関係者には、多大な配慮とご協力をいただき、深謝します。

参考文献

- 1) しょうゆ試験法, 287-292, 財団法人日本醤油研究所, 1985
- 2) みそ技術ハンドブック 付 基準みそ分析, 51-53, 全国味噌技術会, 1995
- 3) 食品の味評価のための味覚センサ活用マニュアル (第3版)