

泡盛種麴の製造技術に関する研究（第1報）

——種麴の孢子量ならびに発芽率の測定法の検討——

化学室 照屋比呂子

1. 緒言

種麴製造法や麴菌の孢子形成に関する研究は、*Asp.oryzae* を対象とした黒野ら¹⁾や中野ら²⁾、根平³⁾などの一連の報告があるが、黒麴菌による種麴製造に関する組織的研究はほとんどないようである。黒麴菌は、その孢子形成の条件や孢子発芽の生理などについても *Asp.oryzae* 系とは、かなり異った特徴を持つことが予想され、黒麴菌による種麴の製造にあたっては、それなりの検討が必要と考えられる。

本報では、黒麴菌による種麴の製造に関する諸試験の実施に先だて、種麴の品質基準として最も基本的な要素である孢子量と発芽率を測定する方法について検討したので、その結果について報告する。

2. 実験方法

2・1 供試種麴の製造

原料米は、ごく軽く精米機にかけた98%搗米の玄米 100 g を、浸漬水34mlで5時間限定吸水を行い、120℃、15分蒸きょう後、放冷して供試黒麴菌株の孢子けん濁水を混合接種して、36℃で20時間培養し、手入れして後半は30℃で培養、27時間、42時間目に手入れを行い、90時間で出麴とした。

供試黒麴菌株は、泡盛工場の麴試料から分離したもので⁴⁾沖工試 2201 株 (*Asp.awamori* タイプ) と沖工試 2401 株 (*Asy.saitoi* タイプ) の2菌株を用いた。

2・2 孢子量の測定法の検討

黒麴菌 2401 株で製麴した種麴を用いて次の検討を行った。

2・2・1 振盪方法と孢子の離脱

孢子の離脱用界面活性剤は秋山ら⁵⁾と同様Tween 80 を用いた。

100ml三角フラスコ及び25×200mm試験管にそれぞれ0.5gの種麴を秤量し、振盪溶液として2% Tween 80 溶液20mlを加え、三角フラスコはスポンジ、キャップのフラット振盪子付、タッチ式ミキサー（フラッシュ、ミキサー：MRK）で、また試験管は硬質ゴム振盪子付タッチ式ミキサー（サーモ・ミキサー：THERMONCS CO.）で5分間、10分間の振盪攪拌後、麴米を金あみでろろ液の孢子けん濁液について、トーマ氏血球計数器4枚で孢子数を数え、4枚の平均値から種麴1g当りの孢子量を算出した。なお、孢子の離脱残を見るために、攪拌ろ別した麴米をいま1度、5分間、2回目の振盪を行い、同様に孢子量を算出した。

2・2・2 界面活性剤濃度と孢子の分散

25×200mm試験管に0.5gの種麴を秤量し、Tween 80濃度1%、2%、5%の20mlをそれぞれ加え、5分間振盪し、トーマ氏血球計数器の50マス上に出現する単離孢子数および2個以上の連結孢子の群数を数えた。

2・2・3 振盪時間と孢子量および孢子の界面活性剤泡沫への集積の有無

25×200mm試験管に種麹0.5gを秤量し、5%Tween 80の20mlを加え、1、2、3、5分間それぞれ振盪し、孢子量を測定した。また、それぞれの振盪液に消泡剤（シリコーン樹脂製剤KM-82の10倍希釈液）2滴を加えて消泡後の孢子量を測定した。

さらに、孢子の離脱残を見るために、前記振盪ろ別麹米の2分間の2回目振盪を行い、孢子量を測定した。

2・3 発芽率測定法の検討

黒麹菌 2201 株、2401 株の2菌株で造った種麹を用いて、次の試験を行った。

2・3・1 培地の選択

麹汁培地（タイ碎米原料の泡盛出麹による・Bx. 5）、麦芽エキス培地⁶⁾、Czapek 培地、柳田の合成培地⁷⁾をpH 4、5、6、7に調整し、これらの培地それぞれについて発芽率を測定した。

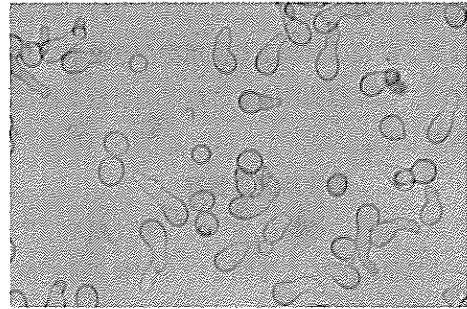
発芽率の測定は、25×200mm試験管に種麹2粒（約0.05g）を採取し、これに培地9ml、20% Tween80溶液1mlを加え、3分間振盪した孢子けん濁液をパスツールピペットで2滴、ホールスライドグラスに滴下し、水で湿らせたろ紙入りシャーレ中に静置して、36℃で5時間培養後、検鏡により方眼マイクロメーターの100マス中の全孢子数と発芽孢子数を計数して発芽率を算出した。なおこのとき計数する全孢子数は90～140個程度で、孢子が重ならず、よく分散しているところを視野内でさがし、2ヶ所計数して平均した。

なお発芽の始発時間を揃える目的で前処理時の使用培地の温度は3～5℃とし、培地が麹孢子と混合振盪してから恒温機内に設置するまでの時間は5分以内に行うように留意した。

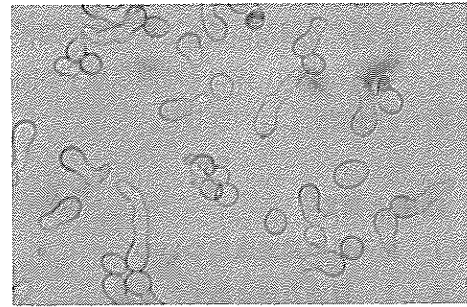
また、発芽させたホールスライドグラスをシャーレ中の約2%ホルマリン液で湿潤したろ紙上に1時間放置の処理を行った。本方法によると、写真1で見ると、発芽孢子を変形させることなく、的確に発芽を止めることができた。

2・3・2 培地のpHと発芽率

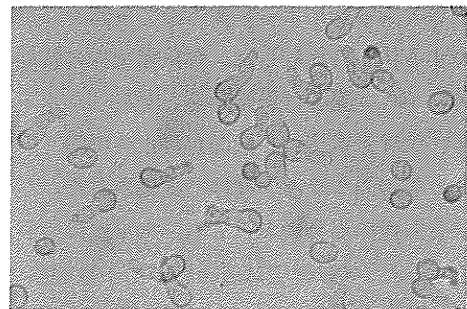
麹汁（Bx. 5）のpH 2、3、4、5の培地を調整し、それぞれで2201株、2401株の種麹の発芽率を前項と同様に測定した。ただし、孢子の計数は、発芽状態の観察もかねて、1試験区あて2枚



1-1 固定処理前



1-2 ホルマリン処理後1時間経過



1-3 ホルマリン処理後18時間経過

写真1 発芽の固定

ずつ写したボラロイド写真（一視野、方眼マイクロメーター70マス相当）によって行った。

2・3・3 培養温度と発芽率

温度勾配バイオフォートレコーダー（東洋科学産業TN-1120）で20~50℃の12段階の温度を設定し、麴汁斜面培地（Bx. 5、pH 4）に、2201、2401 両菌株を植菌し、20時間目の菌糸の発育、44時間目の孢子着生が最も良かった4試験区、30℃、32.5℃、35℃、37.5℃を本試験の条件として採用した。それぞれの温度を送風付恒温機に設定し、供試両菌株の種麴の発芽率を測定した。

2・3・4 培地の濃度と発芽率

麴汁培地（pH = 4）の濃度をBx. 3、5、7、9と設定して、供試2菌株の種麴を35℃で培養し発芽率を測定した。

なお、前項の試験より送風機付定温機で培養し、恒温到達が早いいためか、発芽速度の速い2201株では、菌糸が伸びすぎて孢子の計数がかなり困難だったので、本菌株については、4時間の培養で測定した。

2・3・5 発芽時間の観察

供試2菌株の種麴について、麴汁培地（Bx. 7、pH 4）を用いて、35℃で培養し、培養2時間目から1時間ごとに6時間まで5回発芽率を測定した。

また、発芽にともなって伸長する菌糸の長さは、方眼マイクロメーターにより1試験区ごとに最長菌糸6個を測定し、平均値で示した。

なお、伸長する菌糸の長さや発芽率の関係については、2菌株について、それぞれの菌糸の最伸長期とみられる2201株の4時間以降1時間の20分ごとの3回、2401株の5時間以降の20分ごとの3回を追加測定し、観察した。

3. 結果と考察

3・1 孢子量の測定法について

3・1・1 振盪方法と孢子の離脱

タッチ振盪式ミキサーを用いて、三角フラスコ、試験管の両容器による振盪方法で種麴から孢子が離脱する状態を比較した。両振盪搅拌の状態は、三角フラスコ振盪は微振動をともなった水平遠心搅拌、試験管振盪は、液面が静止時の約2倍となるような強力なラセン搅拌で実施された。なお、試験管振盪の場合においても、水平搅拌や液面が上下するような振盪では連結孢子が多数観察され、

表-1 振盪方法と孢子の離脱

振盪方法 振盪時間	孢子量 (10 ⁸ /g)			
	試験管		三角フラスコ	
	1回目	2回目 (5分)	1回目	2回目 (5分)
5分	9.1	0.3	6.4	1.8
10分	9.4	0.2	6.2	1.5

孢子の分散が悪かったので、所定振盪時間は終始液面が静止時の約2倍を保つよう、支柱クランプやその加重に留意した。

両振盪方法による孢子量の測定結果を表1に示す。結果でみるように、三角フラスコ振盪では、10分間の振盪でも孢子の離脱が悪く、孢子がまだ麴米に残っていることがわかる。これに対し、試験管振盪では、5分間の振盪で孢子の離脱は十分で、以後の試験には、試験管によるラセン振盪を

採用することにした。

3・1・2 界面活性剤濃度と胞子の分散

種麹胞子の分散が悪く、連結胞子が多いと、計数器による胞子の計測が困難なので Tween 80濃度を変えて胞子の分散状態を観察した。結果は表2に示すように Tween 80濃度5%の方が5個以上の連結胞子群が少なく、このことは、秋山ら⁵⁾の結果と一致した。以上の結果から、以後の試験には、胞子けん濁液として、5% Tween 80溶液を用いることにした。

表-2 Tween 80濃度と胞子の分散

連結胞子数(個) Tween 80	胞子の分散(群数)					
	1	2	3	4	5	6以上
1 %	240	27	2	1		2 ⑥
	259	24	5	2	1	
	262	23	5	1	1	
	252	29	4	1		2 ⑧
2 %	252	22	5	1		1 ⑥
	242	25	8	2		2 ⑦
	250	24	2	1	1	1 ⑥
	252	32	7		1	1 ⑥
5 %	288	14	3		2	
	250	35	6	3	1	
	249	34	5	3	1	
	253	30		2	1	

○内は連結胞子数

3・1・3 振盪時間と胞子量の関係、及び界面活性剤泡沫への胞子の集積

種麹から胞子を離脱する振盪時間は5分間では麴米の破片が多く見られて、過剰と推察されたので、振盪時間について検討した。

結果は図1に見るように振盪時間2分以上では胞子の離脱は十分で、以後の実験の振盪時間は、3分間行うこととした。

また、振盪搅拌で形成される界面活性剤泡沫への胞子の集積を懸念して、同一試験試料の消泡後の胞子量を測定した。結果は図1に見るように、消泡前と、ほとんど変わらず、消泡剤使用の必要は認められなかった。

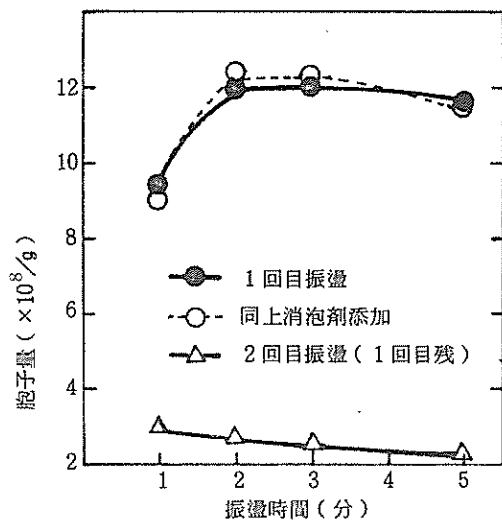


図-1 振盪時間と胞子量及び消泡剤添加の影響

3・2 発芽率の測定法について

3・2・1 培地の選定

中野ら⁶⁾は、カバーガラスに薄く Czapek 寒天培地を固定させた培地による直接検鏡法で黒種麴の発芽率を測定し、黒麴の平均発芽率が4.3%で、黄麴のそれより極端に低いことを報告し、その原因として菌種の違いによる発芽条件の差を示唆している。また、柳田⁷⁾は *Asp. niger* の発芽を検討し Czapek 培地のような簡単な培地では、ほとんど発芽せず、カビの発芽は、ぜいたくな栄養要求があると述べ、*Asp. niger* の発芽培地として、アミノ酸を含む合成培地⁷⁾を検索し報告している。

黒麴菌の発芽の生理はきわめて特異らしいことが予想されたので、麴汁、麦芽エキス、Czapek、柳田の4種の培地について、pH別に発芽率を測定した。結果は表-3に見るように、孢子の発芽は、培地により、また菌株によって非常に異り、2201株では Czapek 培地で最大であるのに対し、2401株では、その各pHで発芽率0である。

供試培地の中では、麴汁培地が両菌株にとって安定した傾向を示したので、以下の実験では麴汁培地を用いて検討した。

表-3 培地の種類と発芽率

菌株	培地の種類	pH	発芽率 (%)			
			4	5	6	7
2201	麴汁		82.6	73.7	48.4	41.0
	麦芽エキス		68.0	69.4	51.7	56.1
	Czapek		87.8	79.6	77.4	46.3
	柳田		14.3	21.2	9.4	3.4
2401	麴汁		51.8	38.2	27.2	0.6
	麦芽エキス		58.0	4.9	6.6	9.7
	Czapek		0	0	0	0
	柳田		0.9	0.5	0.7	0

3・2・2 発芽培地のpH

表3の結果から、発芽最適pHはpH4付近と推定されたので、麴汁培地のpH2からpH5の間の各pHで供試2菌株の発芽率を測定した。結果は図2で見ると、両菌株ともにpH4における発芽率が最大で、以下の実験では、培地のpHはpH4に調整した。

3・2・3 培養温度

培養温度30℃、32.5℃、35℃、37.5℃における発芽率の測定結果を図3に示した。結果に見るように2201株、2401株の両菌株ともに、35℃の

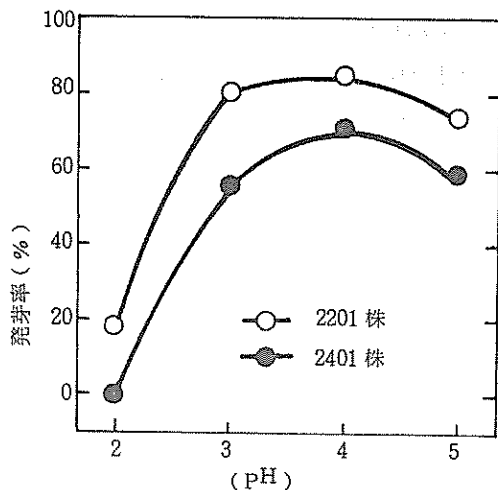


図-2 培地のpHと発芽率

発芽率が最大で、以後の実験では発芽培養温度を35°Cに設定した。

3・2・4 培地の濃度と発芽率

麹汁培地の濃度を変えて発芽率を測定した。結果は、図4に見るように培地の濃度Bx 3~9では両菌株とも大きな差は見られず、培地濃度はBx 5~7で適当と思われた。

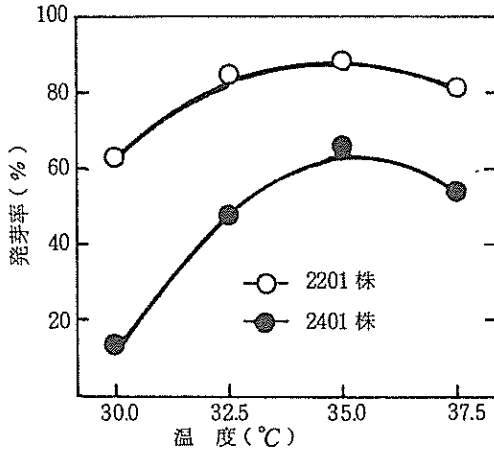


図-3 培養温度と発芽率

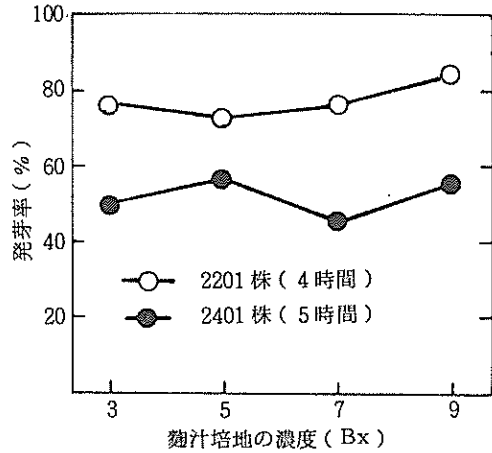


図-4 培地濃度と発芽率

3・2・5 発芽培養時間

2201株と2401株の培養時間の経過とともに発芽率の変化を図5に示した。結果で見ると、両菌株は非常に異った発芽曲線を示している。すなわち、2201株では培養4時間から、発芽率がほぼ平衡に達しているのに対し、2401株では、培養4時間から発芽率の増大期に入っている。5時間の発芽培養において、2401株が2201株より常に低い発芽率を示すことは、これまでの実験で終始観察されたことであるが、2401株も発芽培養6時間では2201株とほぼ同程度の発芽率となる。

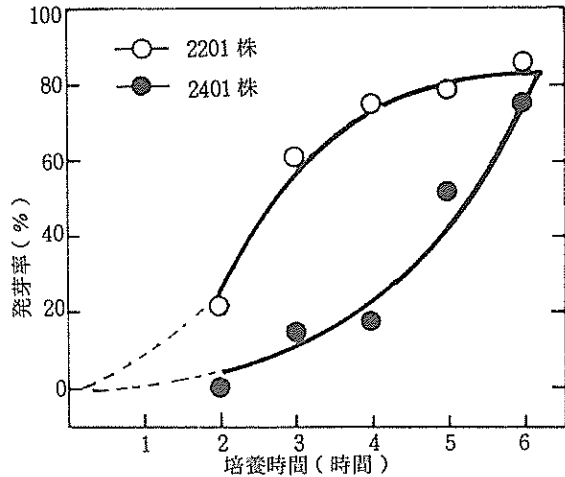


図-5 発芽経過

供試2菌株の発芽経過において同一培養時間における菌糸の伸長にも差が見られたので、

発芽菌糸の長さとの関係を図6に示した。図で見ると菌糸の長さが40μ以上では2201、2401両菌株の発芽率がほぼ同程度となり、また、同一菌株の発芽率の差も小さくなっている。

菌糸の伸長時間については図7に示した。菌糸の伸長時間は、供試2菌株では1時間以上の差があり、菌糸が40μとなるには、2201株で4時間20分、2401株で5時間40分であった。また菌糸

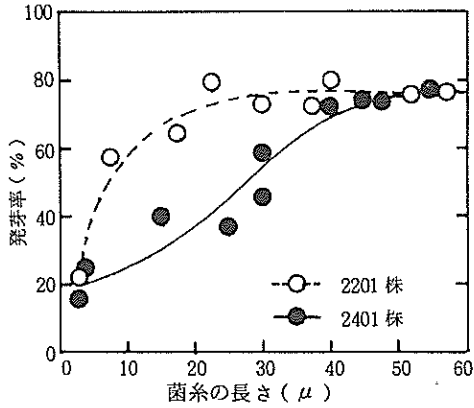


図-6 菌糸の伸長と発芽率

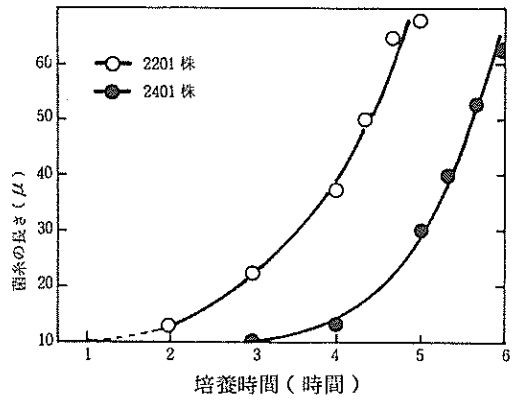
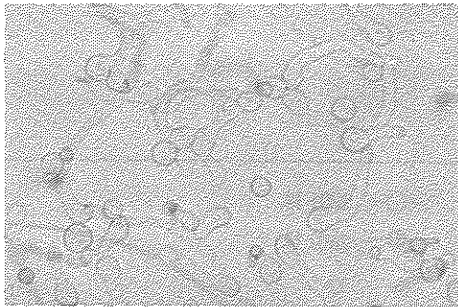


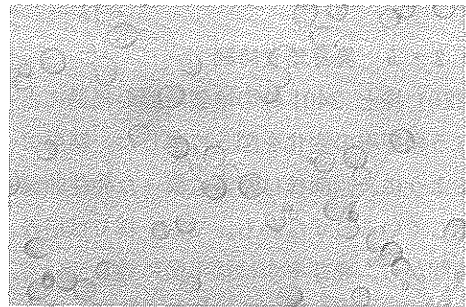
図-7 菌糸の伸長時間

が50 μ 以上、すなわち、2201株の4時間40分以上、2401株の6時間では、菌糸の伸びすぎで発芽胞子の計数は困難となる。

以上の発芽経過の一部は写真2に示した。これらの結果から、発芽時間の設定は該菌株の発芽率が平衡に達し、しかも菌糸が伸びすぎない期間を検索し、決定する。すなわち、供試菌株では、2201株で4時間20分、2401株では5時間40分培養が、微妙な発芽率の変動を比較する時の妥当な手段ではないかと考察した。

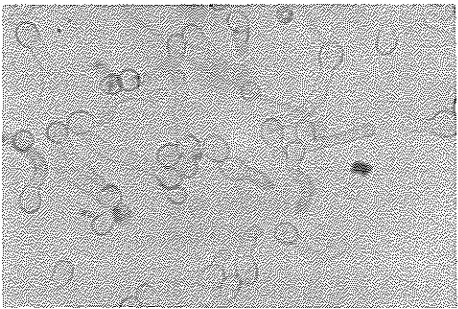


(A) 2201株

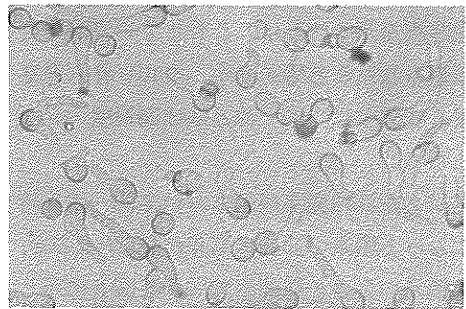


(B) 2401株

2-1 培養5時間の発芽胞子



(A) 2201株 培養4時間20分



(B) 2401株 培養5時間40分

2-2 菌糸の長さが40 μ となる時間

写真2 菌株による発芽経過の差

4. 要 約

黒麹菌 2201 株 (*Asp. awamori* タイプ)、2401 株 (*Asp. sailori* タイプ) で造った種麹を用いて、孢子量と、発芽率の測定法を検討し、今後の試験には次の方法で行うことにした。

(1) 孢子量の測定法

種麹試料 0.5 g を 5% Tween 80 溶液 20 ml に振盪けん濁させて、トーマ氏血球計数器で計数し、孢子量を算出する。

(2) 発芽率の測定法

種麹試料の 2～3 粒 (約 0.05 g) を麹汁培地 (Bx 5、pH 4) 9 ml、20% Tween 80 溶液 1 ml で 3 分間振盪けん濁し、その孢子液 2 滴をホール・スライドグラスに滴下、2201 株は 4 時間 20 分、2401 株は 5 時間 40 分、35℃で培養して、直接検鏡して発芽率を測定する。

終りに孢子量、発芽率の測定に協力下さった湖城竹三郎、孢子の振盪試験の一部を担当した高江洲朝清の両氏に感謝の意を表します。

文 献

- (1) 黒野ほか：醸協、21 51 (1927)
- (2) 中野ほか：農化、43 844 (1969)
- (3) 根平：醸工 33 313 (1955)
- (4) 照屋：沖工試業務報告 25 (1976)
- (5) 秋山ほか：醸協 56 728 (1961)
- (6) 長谷川編：微生物の分類と同定、東京大学出版会 (1975)
- (7) 柳田：蛋白質、核酸、酵素、6 140 (1961)
- (8) 中野ほか：食糧研 6 157 (1952)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。