

沖縄黒麹もろみ酢の製造方法に関する研究 (I)

— 製麹条件の検討 —

比嘉賢一

黒麹もろみ酢の品質安定化に資する基礎データの集積を目的として、泡盛製造の製麹工程について条件の検討を行った。アミノ酸生成の指標となる酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) 活性と γ -アミノ酪酸生成の指標となるグルタミン酸脱炭酸 (GAD) 活性は製麹 15 時間目から 27 時間目 (盛時) における製麹工程が重要な管理ポイントであり、さらにクエン酸生成に関しては盛の工程に加えて、製麹 27 時間目以降 (仕舞仕事以降) も加えて重要な管理ポイントであることを確認した。クエン酸生成は、製麹前半において麹菌の生育を促し、製麹後半で低温経過を取るなど、麹菌の生育が困難な環境において高生産された。本研究で得られたデータは、今後のもろみ酢製造並びに泡盛製造の品質安定化における重要な基礎データとなる。

1 緒言

泡盛製造副産物を原料とするもろみ酢の売上げは健康志向の市場を反映し、メーカー売り上げ約 40 億円、市場規模約 130 億円と、本業である泡盛 (売上げ 200 億円) の 25 % の売上げを示すほど好調を維持していたが、平成 16 年度以降その売上げは大きく低迷している。その要因のひとつとして、明確な製造技術が未だ確立されておらず、品質の安定化が困難な状況ならびにもろみ酢規格基準が明確にされていない点があげられる。

もろみ酢には平成 16 年に特定保健用食品の有効成分となった血圧降下作用を有する γ -アミノ酪酸 (GABA) が含まれている。発酵物における GABA は主に微生物の持つグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) によりグルタミン酸を原料として GABA へ変換生成されることが報告されている¹⁾。

本研究では、もろみ酢の品質安定化に資する基礎データの集積を目的として、もろみ酢のクエン酸含有量、アミノ酸含有量および γ -アミノ酪酸 (GABA) 含有量を指標として製麹条件の検討を行った。

2 実験方法

2-1 製麹方法

原料米としてタイ国産インディカ系粳精米を用いた。製麹は岡崎ら²⁾の方法に準じて、熱風乾燥法で製造した α 化米 10g を製麹原料として行った。種麹は県内で利用されている 3 社の種麹 (石川種麹店、榊河内源一郎商店および榊ビオック) を用い、胞子を添加後の α 化米水分含有率が 28%、31%、34%、37%、及び 40% になるように、0.05% Tween 80 で分散して添加した。添加胞子数は 1×10^5 (個/g- α 化米) とした。胞子添加後、恒温恒湿器 (榊日立製作所、EC-43HHP) に入れ、所定の温度条件で 42 時間製麹を行い出麹とした。製麹の温度経過

は種付以降盛工程前までを 38 °C (18 時間)、盛工程を 36 °C (8 時間)、仕舞仕事以降出麹までを 32 °C (16 時間) を基本条件として設定した。以後、製麹温度の表示は各工程の温度を示した 38 °C、36 °C、32 °C の表現を用いた。また、盛後以降仕舞仕事までの温度を 34 °C、36 °C、38 °C および 40 °C に設定した条件ならびに仕舞仕事以降出麹までを 30 °C、32 °C および 34 °C に設定した条件で製麹を行った。また製麹温度一定条件として 32 °C、34 °C、36 °C、38 °C および 40 °C の条件で 42 時間製麹を行った。

2-1 成分分析

出麹の一部を凍結乾燥機 (EYELA 社、FDU-2000) にて乾燥後、粉砕器 (Janke & Kunkel 社、A10S) を用いて粉砕して、クエン酸含有量および麹菌体量の測定に供した。

クエン酸含有量は 5 倍量の超純水にて 3 時間振とう抽出後、0.45 μ m のフィルターにて濾過して測定を行った。測定装置にイオンクロマトグラフ (ダイオネクス社、DX-120) を用い、分離カラムに IonPac ICE-AS1 (ダイオネクス社製) 使用し、分析条件は溶離液 2.0mM オクタンスルホン酸溶液、流量 0.5ml/min の条件で測定を行った。また、麹菌体量は麹菌量測定キット (キッコーマン株) を用いて測定した。

酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) の酵素力価は出麹から国税庁所定分析法注解³⁾に準じて酵素液を調製し、酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット (キッコーマン株) を用いて測定した。

GAD 活性は土谷ら¹⁾の方法を参考に以下の方法で測定を行った。L-グルタミン酸ナトリウム 50mM、ピロドキサルリン酸を 50 μ M となるように 100mM リン酸緩衝液 (pH5.5) に加えて 10ml とし、100mg の乾燥粉

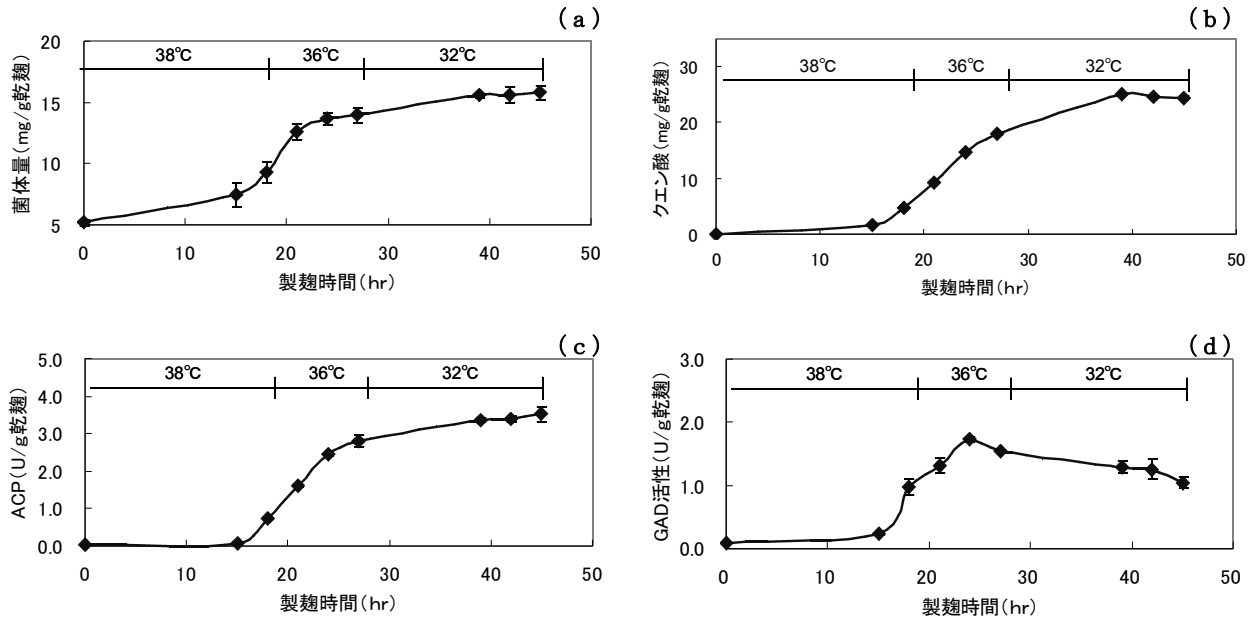


図1 麹菌体量、クエン酸濃度および酵素活性の経時変化

a : 麹菌体量、b : クエン酸濃度、c : ACP活性、d : GAD活性

C社種麹、蒸米水分34%

砕麹を加えて 37 °C、60 分間反応させた。反応液をフィルターで濾過後 GABA の定量に供した。酵素活性は 1 分間に 1 μ mol の GABA を生成する酵素量を 1U とし、乾燥麹グラムあたりの酵素活性として示した。麹のアミノ酸生成量は 2g の麹に10mlの水を加え、上層にトルエン2mlを重層して、25°Cの温度で7日間自己消化を行った後、生成したアミノ酸を分析した。GABA の定量ならびにアミノ酸の定量は 5%トリクロロ酢酸にて除タンパク後、高速アミノ酸分析計(日立製作所社製、L-8800)で測定した。

3 実験結果と考察

3-1 製麹における各成分および酵素活性の経時変化

図1に製麹時の麹菌体量、クエン酸濃度および酵素活性の経時変化を示した。種麹散布後、麹菌は蒸米表面上に菌糸を伸ばし、製麹開始 15 時間後には、蒸米全体が白色を呈した。製麹 15 時間目から 24 時間目にかけて麹菌体量は大きく増加する対数増殖期を示した。製麹 24 時間目以降菌体は緩やかに増殖を続け製麹 40 時間目以降菌体生育は安定期を示した。クエン酸含有量は、菌体の対数増殖期と連動するように製麹 18 時間目から含有量が増加し、製麹 27 時間目までには最終的な生成量の約 70%がこの期間で生成された。製麹時間 27 時間目以降、生成速度はやや低下するが、製麹 39 時間目までクエン酸含有量は増加した。

アミノ酸生成の指標となる ACP 活性は、麹菌体量と

同様な経時変化を示し、対数増殖期に大きくその活性量が増加し製麹 27 時間目から出麹にかけて緩やかな増加を示した。

GAD 活性は、麹菌体量および ACP 活性と同様に対数増殖期に活性量が増加するが、製麹 24 時間目に最大値を示し、以降出麹までの期間に活性値は最大値（製麹 24 時間目）の約 70%まで減少した。

以上の結果より、ACP 活性と GAD 活性を増加させるためには製麹 15 時間目から 27 時間目（盛工程）における製麹工程が重要な管理ポイントであり、さらにクエン酸生成に関しては盛の工程に加えて、現場の経験で知られている製麹 27 時間目以降（仕舞仕事以降）も重要な管理ポイントであることが確認された。

3-2 盛工程（製麹時間15時間目から27時間目）における温度の影響

図2に盛工程における製麹温度が麹菌体量に及ぼす影響を示した。C社の種麹菌は製麹温度の影響を強く受け、38 °Cにおける麹菌体量が高い値を示したが、他の2社は盛工程における温度の影響は低い傾向を示した。岡崎ら⁴⁾は黄麹菌における最適生育温度は 37.5 °C前後であることを報告している。今回使用した種麹菌の麹菌体量も 36 °Cから 38 °Cにおいて高い傾向を示し、黒麹菌も黄麹菌と同様に 37 °C前後が最適生育温度であると推測された。

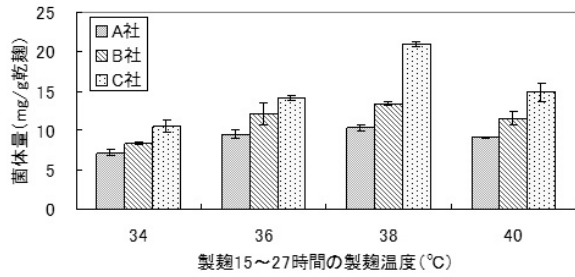


図2 盛工程の製麹温度が麹菌体量に及ぼす影響
蒸米水分34%

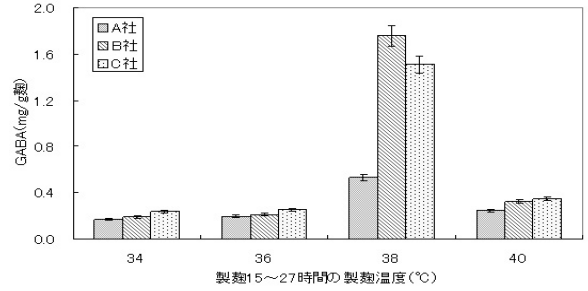


図6 盛工程の製麹温度がGABA生成に及ぼす影響
蒸米水分34%

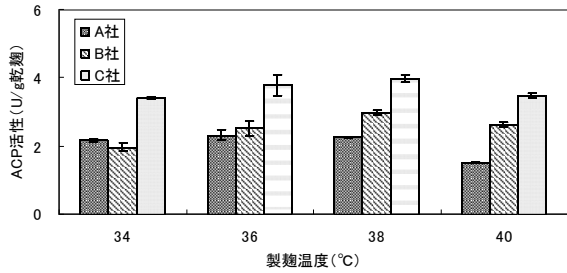


図3 盛工程の製麹温度がACP活性に及ぼす影響
蒸米水分34%

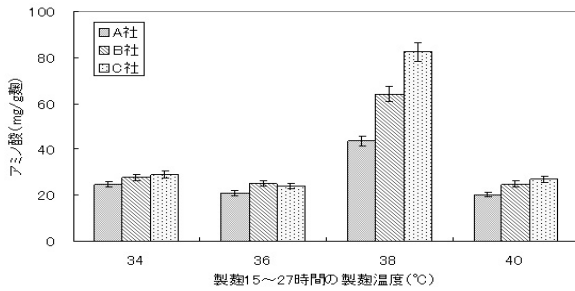


図4 盛工程の製麹温度がアミノ酸生成に及ぼす影響
蒸米水分34%

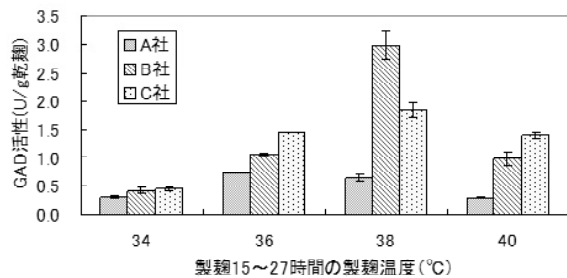


図5 盛工程の製麹温度がGAD活性に及ぼす影響
蒸米水分34%

図3および図4に盛工程における製麹温度がACP活性ならびにアミノ酸生成へ及ぼす影響を示した。種麹間の差は認められるが、盛工程の製麹温度がACP活性へ及ぼす影響は低いことが認められた。岩野ら⁵⁾は白麹菌

において、製麹温度が酵素生産へ及ぼす影響を検討した結果、ACP活性は製麹温度の影響が低いことを報告しており、本研究の黒麹菌ACP活性に対する製麹温度の影響も同様な傾向を示した。一方、出麹のアミノ酸の生成に及ぼす製麹温度の影響は、使用する種麹菌の種類によらず盛工程の製麹温度が38℃の条件で高いアミノ酸生成を示した。三上ら⁶⁾はACPには基質特異性の異なる4種類が存在し、清酒醸造におけるアミノ酸の生成機構は複雑であることを報告している。また、Iemuraら⁷⁾は清酒の酒母において、生もとでは高濃度のグルコースおよびpH4.5の環境下で酸性プロテアーゼ(AP)が活性化していない状況で発酵が進行するためACPによりアミノ酸まで速やかに分解されるが、速醸もとではAP活性の高い状況で発酵が進行するためACPの作用を受けにくい低分子ペプチドを生成し、アミノ酸量が低いことを報告している。今回、ACP活性に違いがないのに、最終的なアミノ酸生成量に違いが認められたのは、基質特異性の異なるACPの影響または発酵環境におけるAP活性に違いがあったのではないかと示唆された。

図5および図6に盛工程における製麹温度がGAD活性およびGABA生成に及ぼす影響を示した。使用する種麹菌の種類によらず盛工程の製麹温度は38℃の条件で高いGAD活性を示した。また、GAD活性を反映してGABA生成量も38℃の条件で高い生成量を示した。

GADは菌体内酵素であるため麹菌の生育と共に産生され、麹菌の最適生育温度でその生成量が高いことが確認された。GAD活性についてはこれまでに土屋ら¹⁾の液体培養麹菌体についての報告があるが、固体培養である製麹工程については報告がないため重要な知見である。

以上の結果より、GABAの生成量を高めるためには、麹菌の対数増殖期である盛工程の温度を、麹菌の生育最適温度である、37.5℃付近で製麹を行うことが重要である。

3-3 クエン酸生成に及ぼす製麹温度の影響

クエン酸生成に関しては、ACP 活性、GAD 活性と異なり、盛工程および仕舞仕事以降の2つの増加ポイントがあると確認されている(図2)。図7および図8にクエン酸生成に及ぼす各製麹工程の製麹温度の影響を示した。クエン酸生成に関しては増加ポイントが2カ所あるためアミノ酸や GABA の生成へ及ぼす影響に比較して、製麹温度の大きな影響は認められなかったが、盛工程では最適生育温度より低めの製麹温度でクエン酸生成が高くなる傾向が認められ、仕舞仕事以降の製麹温度も低温経過においてクエン酸生成が高くなる傾向が認められ、岩野ら⁵⁾の結果と一致した。

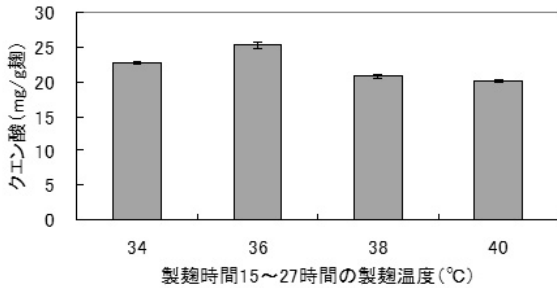


図7 盛工程の製麹温度がクエン酸生成に及ぼす影響
蒸米水分36%

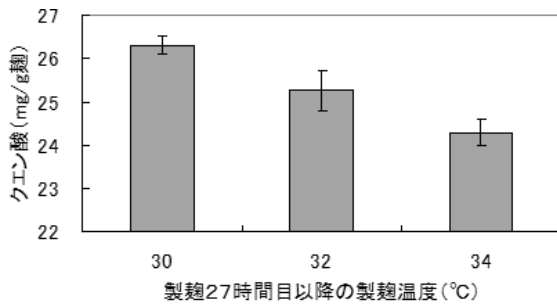
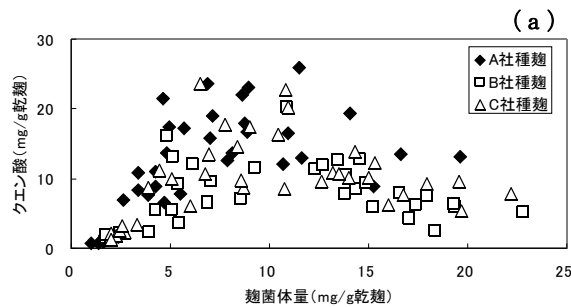


図8 仕舞仕事以降の製麹温度がクエン酸生成に及ぼす影響



3-4 麹菌体量とクエン酸および酵素活性との関係

図9に製麹温度一定の条件と製麹温度を段階的に温度を下げていく条件(例: 38℃ 18時間、36℃ 8時間、32℃ 16時間)で製麹を行った出麹の菌体量およびクエン酸生成量の関係を示した。製麹温度一定の条件では、麹菌体量 10 (mg/g 乾麹) までクエン酸生成量は正の相関関係が認められるが、それ以上の菌体量では負の相関関係が認められた。麹菌体量が高い条件つまり麹菌の生育が良い条件ではクエン酸の生成が活発ではなく、生育が困難な条件においてクエン酸の生成が活発であり、麹菌の生育があまりにも困難な環境(例: 製麹温度 34℃ 一定、蒸米水分 28%) では破精落ちが発生し、麹菌体量およびクエン酸生成量も低い値を示していると考えられた。

一方、段階的に製麹温度を下げていく、現場での製麹方法は麹菌体量の増加と共にクエン酸生成量も増加して麹菌体量 10 (mg/g 乾麹) 以上におけるクエン酸生成量低下の傾向はそれほど大きくないことが認められた。

以上の結果より、クエン酸生成を高めるには製麹前半において麹菌の生育を促し、製麹後半で低温経過を取るなど、麹菌の生育が困難な環境において高生産されることが推測され、現場の製麹方法を反映したデータであることが確認された。

図10に麹菌体量と ACP 活性および GAD 活性の散布図を示した。GAD 活性は麹菌体量と強い相関関係 ($r=0.761$) が認められた。GAD は菌体内酵素⁸⁾であるため麹菌体量と強い相関関係にあると推測された。したがって GAD 活性を高めるには、麹菌の生育が容易な環境においてその活性値が高まると推測され、盛工程において 38℃ の製麹温度で活性値が高いのはその影響と考えられた。ACP 活性と菌体量の関係は GAD 活性ほど明確ではないが、相関関係 ($r=0.479$) が認められた。

しかし麹菌体量 15 (mg/g 乾麹) 以上では ACP 活性は高くないことから、ACP 活性を増加させるために麹菌体量はそれほど高くなくて良い、つまり麹菌がある程度

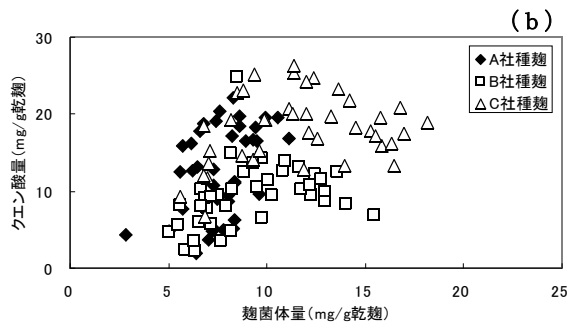


図9 菌体量とクエン酸生成に及ぼす製麹温度の影響

a : 製麹温度一定条件 b : 段階的に製麹温度を変えた条件

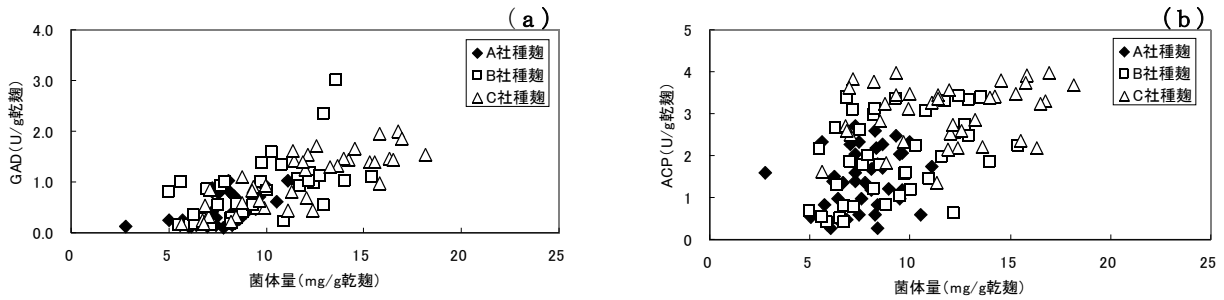


図10 菌体量と各酵素活性の関係

a : GAD活性 b : ACP活性

生育した時点で必要な活性を保持していると推測された。

以上の結果より、高 GAD 活性および高クエン酸含有量を示す製麺条件は製麺前半では GAD 活性を中心とした麺生育に努め製麺後半ではクエン酸生成を中心として行う方法が良いと推測された。

3-5 蒸米水分がクエン酸生成に及ぼす影響

クエン酸生成量が麺菌体量と単純な比例関係にはなく麺菌生育とそれを抑制する製麺条件の設定が必要であることが前節で推測された。

図 11 に蒸米水分が麺菌体量に及ぼす影響について示した。種麺により差は認められるが、蒸米水分が高くなるに従い、麺菌体量も増加する傾向が認められた。岩野ら⁵⁾は破碎精米の製麺において蒸米吸水率と麺菌体量に明確な相関関係がないことを報告しており、異なる結果となった。その原因として、原料米の違い（ジャポニカ米とインディカ米）が考えられるが、製麺温度の条件が岩野ら（40℃ 30 時間、35℃ 18 時間）の条件とは異なっており、製麺温度の与える影響が大きいことが示唆された。図 11 の結果より、蒸米水分の高い状況は麺菌体量が高いことから麺菌が生育しやすい条件であることが推測される。次に図 12 に蒸米水分とクエン酸生成量の関係を示した。製麺温度でクエン酸生成量が異なり、また蒸米水分が高くなるに従いクエン酸生成量も低下する傾向が認められた。したがって、クエン酸の生成を高めるには蒸米の調整はハゼ落ちしない程度に硬蒸しが良いことが明らかとなった。また、蒸米水分量が高い場合、低温経過（34℃）をとり、蒸米水分が低い場合には、高温経過（38℃）を取ることによりクエン酸生成量の低下が抑えられることが確認された。これは現場における経験則を反映するデータであると考えられる。

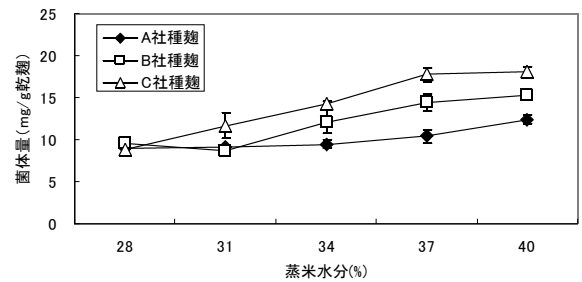


図11 蒸米水分が菌体量に及ぼす影響
製麺温度（38℃、36℃、32℃）

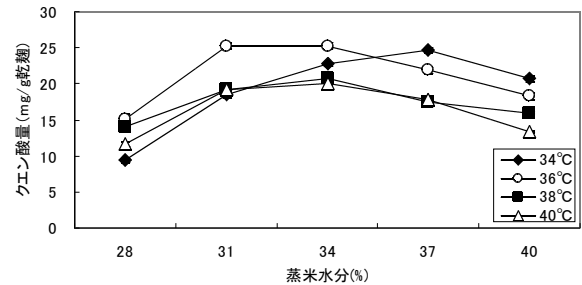


図12 蒸米水分がクエン酸生成量に及ぼす影響

4 まとめ

高 GABA 含有もろみ酢発酵条件を確立するため、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）活性を指標とした製麺条件の検討を行った結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 酸性カルボキシペプチダーゼ（ACP）活性と GAD 活性は製麺 15 時間目から 27 時間目（盛工程）における製麺工程が重要な管理ポイントであり、さらにクエン酸生成に関しては盛の工程以外に、製麺 27 時間目以降（仕舞仕事以降）も加えて重要な管理ポイントであることが判明した。
- 2) アミノ酸および GABA の高生成は、盛工程の製麺温度が麺菌の最適生育温度帯（37.5℃、今回の条件では 38℃）であることが確認された。

- 3) クエン酸生成は、製麹前半において麹菌の生育を促し、製麹後半で低温経過を取るなど、麹菌の生育が困難な環境において高生産された。また、高 GAD 活性および高クエン酸含有量を示す製麹条件は製麹前半では GAD 活性を中心とした製麹条件で行い、製麹後半ではクエン酸生成を中心として行う方法が良いと推測された。

本研究は平成 16 年度から平成 18 年度の健康食品品質向上総合対策事業において、株式会社トロピカルテクノセンターを管理法人として、国立大学法人琉球大学、沖縄もろみ酢製造協議会と共同で行った。

参考文献

- 1) 土屋紀美,西村賢了:醸協,97,382-386(2002).
- 2) 岡崎直人,福田典雄,菅間誠之助:醸協,74,687-691(1979).
- 3) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁分析注解, (財)日本醸造協会(1993).
- 4) 岡崎直人,竹内啓修,菅間誠之助:醸協,74,638-686(1979).
- 5) 岩野君夫,三上重明,福田清治,能勢晶,椎木敏:醸協,82,200-204(1987).
- 6) 三上重明,三浦治,渡辺高年,渡辺健一,岩野君夫,椎木敏,島田豊明:醸工,85,37-43(1987).
- 7) Iemura,Y., Yamada,T., Takahashi,T., Furukawa,K., and Hra,S.:*J.Biosci. Bioeng.*,88,276(1999).
- 8) 家村芳次,片岡浩平,溝上ゆかり,山下智子,原昌道: 醸協,89,9,p754(1994)

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。