



Title	職人の常識を科学する : 日本酒造りの種切りにおける麹菌接種量が麹の酵素活性に与える影響
Author(s)	
Citation	令和6 (2024) 年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101297">https://hdl.handle.net/11094/101297</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	こだま わかな 児玉 和奏	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	楠本 憲一	所属	工学研究科		
研究課題名	職人の常識を科学する ～日本酒造りの種切りにおける麹菌接種量が麹の酵素活性に与える影響～				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
<b>【研究目的】</b>					
本研究では「麹菌の接種密度による麹の仕上がりの違い」を明らかにすることを目的とする。本研究を通して、職人らが経験則的に把握していた事象に科学による裏付けがされることが期待される。麹の酵素活性力は発酵食品の品質に関わる重要な要素のひとつである。特に $\alpha$ -アミラーゼと酸性カルボキシペプチターゼが品質に大きく影響する。本研究では麹菌の米への接種密度が麹の出来に影響するのか、酵素活性力を測定して評価した。さらに醤油、味噌、焼酎に使われる菌株を用いることで菌株ごとの特徴についても考えたい。					
<b>【研究方法】</b>					
種麹の摂取密度を変えたサンプルで麹の出来が変わるか検証する。麹の出来は麹の酵素活性力により評価する。酵素活性力は酵素活性検査キットを用いて測定する。					
<b>準備物</b>					
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math> 化米 (徳島製麹株式会社 阿波工場 AA-70、精米歩合 70%以下)</li> <li>• 粉状種麹 A (種麹 旨味 (醤油作り用))</li> <li>• 粉状種麹 B (種麹 麦用)</li> <li>• 粉状種麹 C (麹屋三左衛門 種麹 黒麹菌)</li> <li>• kikkoman 醸造分析キット <math>\alpha</math>-アミラーゼ測定キット</li> <li>• kikkoman 醸造分析キット 酸性カルボキシペプチターゼ測定キット</li> </ul>					
<b>製麹方法</b>					
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100mL の三角フラスコ (綿栓付き) に <math>\alpha</math> 化米を 5g 測り取る。</li> <li>• <math>\alpha</math> 化米 5g に対して水 2.5 mL (目標水分約 34%) 散水し、栓をして 2 時間ほど吸水。米が固まるので時々スパテルで混ぜる。ある程度水を吸ったら米をまとめる。</li> <li>• 吸水後オートクレーブで 121°C、20 分間加圧殺菌。このとき植菌の際に使用するスパテル 18 個も一緒に滅菌する。(約 2 時間)</li> </ul>					

- 室内で粉状種麴 A、B、C をそれぞれ 1mg、10mg、100mg ずつチューブに計り取る。
- 殺菌後の原料を冷却後、キャビネット内で粉状種麴を添加し攪拌（スパーテルで崩す）。このときチューブに種麴が残らないように米をチューブに入れて容器に残った種麴をとる。
- 接種後試料を三角フラスコの半分に固め、恒温機で培養。30℃, 20 時間。
- 接種後 20 時間目に 1 回目の手入れを行う。三角フラスコを振って混合後三角フラスコの一面に広げる（崩れない場合はスパーテルで崩す）33℃, 5 時間。
- 接種後 25 時間目に 2 回目の手入れを行う。三角フラスコを振って混合後三角フラスコの一面に広げる。35℃, 17 時間。
- 42 時間後出麴、状ぼうや香りをチェック。

### 酵素活性測定方法

- ほぐした麴 4g に酵素抽出用 buffer 20 mL を加えて抽出する。
- kikkoman 醸造分析キットを用いて、抽出液から  $\alpha$ -アミラーゼと酸性カルボキシペプチターゼの酵素活性を測定する。

### 【研究経過】

#### Aspergillus oryzae TK32 の接種密度と麴の酵素活性について

事前の実験として Aspergillus oryzae TK32 を用いて摂取密度の違いと酵素活性の違いについて確かめた。Aspergillus oryzae TK32 は固体培地で培養したものの胞子を回収し、製麴に使用した。製麴の際には胞子の個数によって接種密度を変えた。各密度に対して 3 つずつサンプルを作成し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性及び酸性カルボキシペプチターゼ活性の平均値を図 1 のグラフに表した。

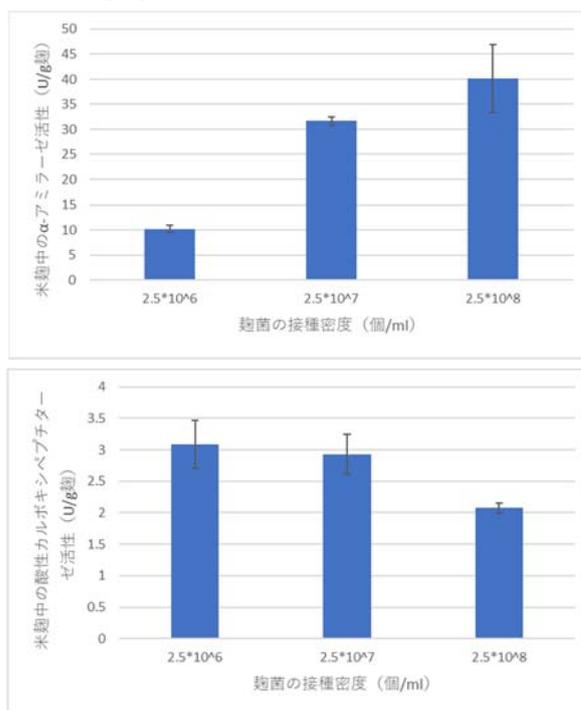
#### 接種密度について

事前の実験で、粉状種麴に主に含まれるデンプンから麴菌のみを取り出すことを試みたものの、図 2 に示すいずれの方法もデンプンが糊状になり、麴菌のみとりだすことはできなかった。今回の実験では、粉状種麴に麴菌が均一に含まれているものとし、**粉状種麴を接種する質量を変える**ことで、胞子の摂取密度の違う 3 つのサンプルを作成した。

#### 麴菌接種密度と麴の酵素活性について

3 種類の麴菌に対して、胞子の接種密度を 3 段階に調製し、製麴を行った。製麴は計 3 回行い、実験結果をそれぞれ図 3 に示す。数値が得られなかったものについては 0U/g 麴表記にしている。A が醤油作り用に用いられる粉状種麴で Aspergillus oryzae の胞子が含まれるもの、B が主に味噌作りに使われる粉状種麴で A と異なる株の Aspergillus oryzae の胞子が含まれるもの、C が A、B とは異なる Aspergillus luchuensis の胞子が含まれる粉状種麴で焼酎に使われるものである。

図 1 Aspergillus oryzae TK32 の接種密度と麴の酵素活性



## 【研究成果】

図1から接種密度が大きくなるにしたがって、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が大きくなっていることがわかる。また、 $2.5 \times 10^6$  個/ml から  $2.5 \times 10^7$  個/ml の増加率が  $2.5 \times 10^7$  個/ml から  $2.5 \times 10^8$  個/ml の増加率が小さくなっている。この傾向は図3の $\alpha$ -アミラーゼ活性においてもみられる。菌種や株に関わらず、 $\alpha$ -アミラーゼ活性は接種密度が大きくなるほど、活性力が大きくなり、次第に増加率が緩やかになると考えられる。

また図1から酸性カルボキシペプチターゼは接種密度が大きくなるほど活性力が小さくなる傾向にあることがわかる。この傾向は図3においては見られなかった。酒造において、酸性カルボキシペプチターゼ活性は小さい方がいいが、その他の食品についてはその限りではないためかと考えられる。

図3から *Aspergillus oryzae* の異なる株や *Aspergillus luchuensis* においても、接種密度が大きくなるにしたがって、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が大きくなっていることがわかる。また、データにばらつきはあるものの酸性カルボキシペプチターゼ活性においても近しい傾向がみられる。

このことから摂取密度を変えることにより $\alpha$ -アミラーゼ活性及び酸性カルボキシペプチターゼ活性が変化することがわかる。

$\alpha$ -アミラーゼについてはCの値がかなり小さい。これは精米歩合70%のアルファ化米が *Aspergillus luchuensis* の生育に適していないことを示唆していると考えた。外皮のタンパク質を残した方が、生育しやすいのではないかと考える。同じ *Aspergillus* であっても種により生育に必須の栄養が異なるといえる。これがそれぞれの食品の製法や製麹方法に影響しているのだろう。

実験において数値がでなかった点に関しては、実験者の人的課題が大きく影響したと考える。酵素活性測定の手順にあるピペティングが上手くできなかったことが、特に酸性カルボキシペプチターゼでデータが得られなかったことに繋がっていると考えられる。酸性カルボキシペプチターゼの活性測定は $\alpha$ -アミラーゼと比べて工数がかなり多かった。

また、3回の実験で得られた数値にばらつきがあることに関しては、実験に使用したアルファ化米の品質管理や環境的要因が影響していると考えられる。1回目の実験を行った10月上旬と3回目の10月下旬では気温に大きな差があった。また、アルファ化米は10月時点で開封から2~3カ月経過していたこともあり、当初と水分量や硬さに変化があったのではないかと考えられる。今後は、短時間で実験を実施するなど、品質を変化させよう要因をできる限り減らすように務めたい。

杜氏に種切りについての話を聞いた経験からこの研究を始めるにいたったのだが、その際に杜氏は

図2 粉状種麹から麹菌を取り出す実験

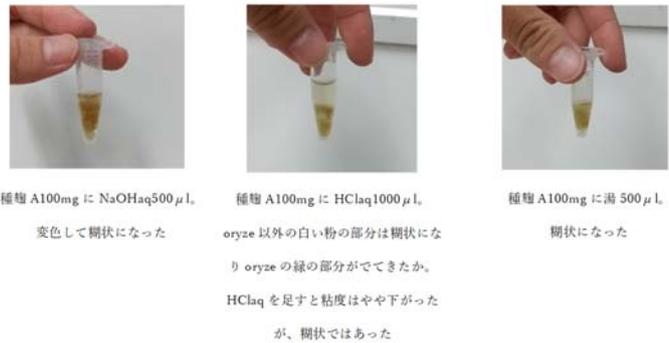
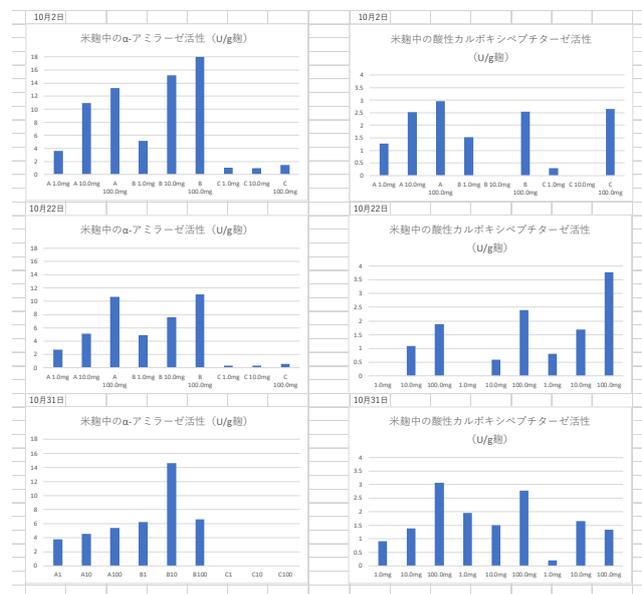


図3 摂取密度と麹の酵素活性



接種密度によって麴の出来が大きく変わることはない、と話していた。今回の結果では接種密度によって麴の酵素活性は変化するといえるが、杜氏の話はより微細な接種密度の変化による酵素活性をみていくことで裏付けできるのではないかと考えた。 $\alpha$ -アミラーゼ活性について、TK32は $10^9$ 以上の接種密度で、粉状種麴は $10^4$ mg以上の接種密度でも酵素活性を測定し、接種密度を大きくしていくといずれ活性力が収束するか、それほどのような値になるのか今後調べていきたい。

**【参考文献】**

岡崎直人・福田典雄・菅間誠之助(1979)「麴の状ぼうと菌体量ならびに酵素力価との関係」『J. Brew. Soc. Japan』 Vol.74, No.10, p.687-691, 日本醸造協会

高堂泰輔・藤原久志・若井芳則(2024)「一般米を届いた麴の破精とグルコアミラーや舌性の相関解析」『J. Brew Soc. Japan』 Vol. 119, No. 5, P. 267-277, 日本醸造協会