

市販塩麴製品と自家製塩麴中の酵素活性比較

阿部真紀・小針清子・秋田 修

食生活科学科 食品加工学研究室

Comparison of Enzyme Activities of Commercial Salted-koji and Homemade Salted-koji.

Maki ABE, Sayako KOBARI and Osamu AKITA

Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

Many kinds of salted-koji (rice-koji soaked in salted water) for pickle preparation have come to be sold in market recently. We assayed salt and alcohol concentrations of five commercial salted-koji. Salt concentrations were 10.2% to 13.2% and alcohol concentrations distributed from 2.2% to 5.7%.

In addition we assayed germination ability of koji-mold (*Aspergillus oryzae*) and enzyme activities remaining in five commercial salted-koji and homemade salted-koji. Homemade salted-koji maintained the germination ability, but no commercial salted-koji showed the germination ability.

Most of the saccharifying enzyme activities of commercial salted-koji were lower than the activities of homemade salted-koji. On the other hand, commercial salted-koji E and D had the highest acid protease and neutral protease activities respectively in all samples. We examined the effect of pasteurization and ethanol on enzyme activities by using homemade salted-koji.

Key words : Salted-koji (塩麴), conidia (分生子), germination ability (発芽能), germination rate (発芽率), pasteurization (低温殺菌)

1. はじめに

塩麴は、米麴に塩と水を加え、常温で1週間程度発酵させたものである。日本では古くから漬物などに利用されていたが¹⁾、調味料としての利用が2011年ごろから新聞等のマスメディアで取り上げられるようになり²⁾、急速に周知されるようになった。現在では味噌メーカーを中心に塩麴製品が製造販売されている。一方で塩麴は自家製、市販製品に関わらず、その酵素の働きがうま味に影響を与えるといわれるが、酵素の働きを調査したデータはまだほとんどない。そこで本研究では塩麴の特性を調べる目的で市販塩麴5種と自家製塩麴について酵素活性等の測定を行った。さらに塩麴の性質上、酵素を失活させずに商品の保存性の向上を考える必要がある。このため塩麴製品の保存性向上に対する知見を得ることも目的とした。

2. 実験方法

2-1. 自家製塩麴製造法および試料の調製法

市販の米麴(みやこ麴 株式会社伊勢惣) 200g、塩(赤穂の天塩 株式会社天塩) 60g、水(南アルプス天然水 サントリー) 280ccを用い、塩麴製造法³⁾を参考に、塩と麴を混ぜあわせ、水を加え室温(25℃)で1日1回程度攪拌し、1週間発酵させた。この自家製塩麴をミラクロスでろ過したろ液を試料Aとした。この試料を低温殺菌処理(65℃30分間)した試料(A')と、エタノールを濃度4%となるように添加した試料(A'')を調製した。

2-2. 市販塩麴試料調製法およびアルコール濃度、塩分濃度測定法

メーカーの異なる5種類の市販塩麴を調査に用いた(表1)。塩麴をミラクロスでろ過したろ液を分析用試

料とした。アルコール濃度は内部標準法によるガスクロマトグラフィーで測定した。キャピラリーカラム (J&W DB-WAX、0.32mm × 30m、液相 PEG) を装着した SHIMADZU GC-14B を使い、カラムオープン温度 100℃、注入口温度 200℃、FID 検出器温度 250℃ とした。市販塩麴ろ液 1 ml と内部標準液 (5% 1-ブタノール) 1 ml を混合したものを約 1 μl 注入した。塩分濃度はデジタル塩分計 ES-421 (株式会社アタゴ) で測定した。

表 1 市販塩麴の詳細

| 試料名 | 商品名 | 製造会社 | 原材料 | 測定塩分 (%) | 表示塩分 (%) | アルコール濃度 (%) |
|-----|--------|------|---------|----------|----------|-------------|
| B | 塩麴 | A社 | 麴、食塩、酒精 | 11.5 | 11.0 | 2.6 |
| C | 塩麴 | F社 | 麴、食塩、酒精 | 11.8 | 12.4 | 2.2 |
| D | 生塩麴 | MK社 | 麴、食塩、酒精 | 10.2 | 10.0 | 5.9 |
| E | 塩麴 | H社 | 麴、食塩、酒精 | 13.2 | 13.0 | 4.0 |
| F | 玄米入り塩麴 | MA社 | 麴、食塩、酒精 | 11.8 | 11.2 | 4.2 |

2-3. 分生子の発芽試験方法

自家製試料、その低温殺菌試料、アルコール添加試料および市販塩麴試料のろ液を以下の実験に用いた。ろ液を滅菌水で希釈してトーマ氏血球計数器で分生子数を計数した。発芽試験は PDA (Potato Dextrose Agar 日水) に分生子約 10^6 個を植菌し室温で 1 週間培養し、麴菌の増殖の有無で発芽能を判定した。麴菌の生育が認められた試料については、PDA 培地に分生子を 10^2 個植菌し、室温で 1 週間培養後に出現したコロニー数から発芽率を求めた。

2-4. 酵素活性測定法

(1) 試料

酵素活性測定は、市販塩麴、自家製塩麴、低温殺菌自家製塩麴、アルコール添加自家製塩麴をミラクロスでろ過したろ液を粗酵素液として行った。また、自家製塩麴に使用した米麴の粗酵素抽出液を国税庁所定分析法⁴⁾に従って調製した。

(2) 酵素活性測定法

糖化力、 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性の測定にはキッ

コーマン醸造分析キットを用いた。糖化力は基質として用いた 4-ニトロフェニル β -マルトシドを分解するグルコアミラーゼと α -グルコシダーゼの両酵素の和である。これらにより 1 分間に分解され生じた α -グルコシドをさらに共役酵素により分解して生じた 4-ニトロフェノール (PNP) を 1 U とし、ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表した。 α -アミラーゼ活性は、1 分間に N3-G5- β -CNP (2-クロロ-4-ニトロフェニル 6⁵-アジド-6⁵-デオキシ- β -マルトペンタオシド) から 1 μ mol の CNP (2-クロロ 4-ニトロフェノール) を遊離する力価を 1 U とし、ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表した。グルコアミラーゼ活性は、1 分間に G2- β -PNP (4-ニトロフェニル- β -マルトシド) から 1 μ mol の PNP (*p*-ニトロフェノール) を遊離する力価を 1 U とし、ろ液 1 ml の酵素活性値として表した。酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、1 分間に Cbz-Tyr-Ala (カルボベンゾキシ-L-チロシル-L-アラニン) から 1 μ mol の L-Ala (L-アラニン) を遊離する力価を 1 U とし、ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表した。

酸性プロテアーゼ (pH3.0)、中性プロテアーゼ (pH6.0) 活性の測定は醸造・食品学実験書記載の方法⁵⁾に従い、それぞれ pH3.0、pH6.0 の McIlvaine 緩衝液を用いた 1% カゼイン溶液を基質として使用した。1 分間にカゼインから 1 μ g のチロシンを生じる力価を 1 U とし、ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表した。

3. 実験結果および考察

3-1. 使用した試料について

使用した市販の塩麴商品の詳細を表 1 に示す。すべての塩麴商品の原材料表示に酒精 (アルコール) が記載されていたので、各試料のアルコール濃度を測定した。アルコール濃度は 2.2% から 5.9% の範囲であり、商品により添加量が異なっていた (表 1)。

塩分濃度の測定値と商品表示に記載されていた塩分濃度はほぼ一致しており 10.2% から 13.2% の範囲であった。なお今回実験に用いた自家製塩麴の塩分濃度は 11.0% であった。商品名を「生塩麴」および「玄米入り塩麴」としたものがあつたが、表示からは具体的な製造方法や加熱殺菌の有無についての情報は得られなかった。塩麴 E については発売時の商品情報に

「非加熱」の記載がみられた。

3-2. 分生子の発芽能の確認試験

塩麴中の麹菌分生子の発芽能確認試験を行った。市販品 5 製品すべてで麹菌の生育は認められず、麴由来の分生子の発芽能は失われているものと思われた。

自家製塩麴とアルコール添加自家製塩麴では、麹菌の旺盛な生育が認められ発芽能が残存していることが確認された。自家製塩麴の低温殺菌試料では 2 個のコロニーが出現したが、植菌分生子数が 10^6 個であることから発芽能は失われているものと判定した。さらにこれらの 3 試料の発芽率の測定を行った結果、自家製塩麴では発芽率 4%、アルコール添加試料の発芽率は 7% であった。低温殺菌試料ではコロニーの出現は認められず発芽率 0% と評価した。

発芽能の確認試験において、自家製試料と 65℃、30 分の低温殺菌試料では培地上に麹菌以外の多数の細菌の生育がみられたが、アルコール添加試料では細菌の生育は認められなかった。アルコール濃度 4% とした塩麴では、麹菌の分生子は発芽能を維持しているが、細菌数は低下しているものと推定される。市販塩麴の発芽能確認試験の細菌の生育は、アルコール濃度が 4.0% 以上の試料では、アルコール濃度が 2.2% の試料に比較してコロニー数が 20% 程度であった。これらの結果から、細菌の抑制には低温殺菌よりも酒精（アルコール）の添加が効果的であることがわかった。

3-3. 自家製塩麴と原料米麴の酵素活性の比較

国税庁所定分析法⁴⁾による原料米麴の粗酵素抽出液と自家製塩麴のろ液の酵素活性を麴 1g あたりの活性値で比較した。その結果、自家製塩麴中の各種酵素活性は原料麴の酵素活性からの予測値とほぼ同じであった。このことから、塩麴としても麴の酵素活性は大幅に低下しないことが確認できた。しかし、塩麴調製後の日数が経過していない時点での測定であり、保存期間の経過とともに酵素活性がどのように低下していくかは不明である。

3-4. 低温殺菌とアルコール添加による酵素活性への影響

自家製試料の酵素活性を 100 としたときの低温殺菌

試料およびアルコール添加試料の残存酵素活性を図 1 に示す。低温殺菌試料では、 α -アミラーゼが 2% と最も低くなり、酸性カルボキシペプチダーゼが 93% と最も高かった。酸性プロテアーゼ、糖化力、グルコアミラーゼ、中性プロテアーゼは 26% から 49% と中間程度の活性を示した。一方アルコール添加は酵素活性にほとんど影響しなかった。

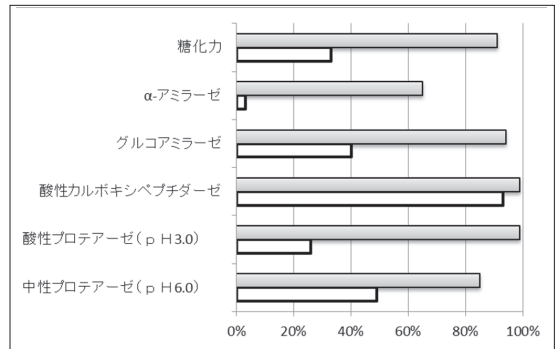


図 1 低温殺菌とアルコール添加による各酵素活性への影響
自家製塩麴試料の酵素活性を 100 としたときの低温殺菌試料 (65℃ 30 分) およびアルコール添加試料 (エタノール 4%) の相対活性。グラフの白抜きが低温殺菌試料、グレーがエタノール添加試料。

3-5. 糖質分解系の酵素活性測定結果

糖化力の測定結果を図 2 に示す。自家製塩麴 (A) とそのアルコール添加試料 (A[〃]) の活性が高く、市販品ではいずれも低活性であった。低温殺菌処理した自家製試料 (A[〃]) では非処理の 1/3 程度まで活性が低下していたが、市販塩麴はそれよりもさらに低い活性であった。

α -アミラーゼ (図 3) は、自家製塩麴 (A) が最も高い活性を示したが、市販品にも自家製の 60% 程度で、アルコール添加自家製試料 (A[〃]) とはほぼ同程度の活性を示すものがあつた (塩麴 E)。低温殺菌自家製試料 (A[〃]) の残存活性は 3% と著しく低下していた。 α -アミラーゼは熱感受性が高いとされ、今回の 65℃、30 分の加熱処理による失活の程度は、既報の結果^{6, 7)} と合致していた。市販品の塩麴 C は低温殺菌自家製塩麴試料と同程度の活性であることから加熱処理をしている可能性が考えられる。

グルコアミラーゼは自家製塩麴と比べて、市販品はいずれも活性が低く、特に塩麴 B と塩麴 D では、自家製塩麴の活性の 2% であつた (図 4)。アルコール

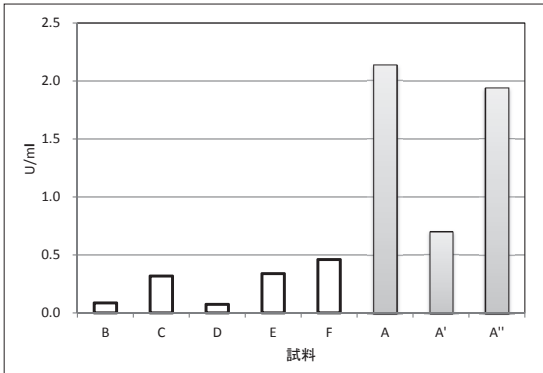


図2 塩麴ろ液の糖化力

塩麴ろ液 1 ml あたりの活性値として表す。棒グラフの白抜きは市販塩麴、グレーは対照の自家製塩麴試料を示す。A は自家製試料、A' は自家製試料を 65℃ 30 分間低温殺菌した試料、A'' は自家製試料にエタノール (4%) を添加し調製した試料。B から F は表 1 に示した市販塩麴製品試料。試料区分は図 3 から図 7 についても同様。

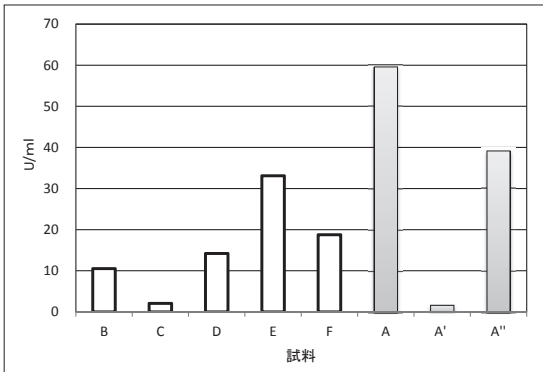


図3 塩麴ろ液の α -アミラーゼ活性

塩麴ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表す。試料区分は図 2 と同じ。

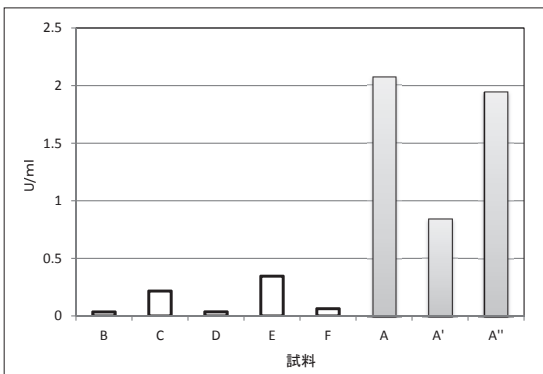


図4 塩麴ろ液のグルコアミラーゼ活性

塩麴ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表す。試料区分は図 2 と同じ。

添加自家製試料 (A'') の残存活性は 94% であった。低温殺菌自家製試料 (A') の残存活性は 40% であり、 α -アミラーゼよりも残存活性が高かった。岩野ら⁶⁾ は 10 分間放置後 90% 以上の活性が残存する温度を熱安定性の指標とした場合、グルコアミラーゼの熱安定性は α -アミラーゼより 10℃ 高いと報告している。低温殺菌試料の α -アミラーゼとグルコアミラーゼの残存活性の違いは、両酵素の熱安定性の違いを反映したものと考えられる。

3-6. タンパク質分解系の酵素活性測定結果

酸性カルボキシペプチダーゼは、市販塩麴 E が自家製塩麴 (A) と同等の活性であった (図 5)。他の市販品は、自家製塩麴の 16% から 54% の活性であった。また、アルコール添加自家製試料 (A'') で 100%、低温殺菌自家製試料 (A') の残存活性は 93% であった。酸性カルボキシペプチダーゼの熱安定性は、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼよりも高いという報告⁷⁾ があり、低温殺菌条件ではほとんど失活しなかったものと思われる。

酸性プロテアーゼは、市販塩麴 E が自家製塩麴よりも高い活性を示した (図 6)。他の市販品は、自家製塩麴の 25% から 68% の活性であった。アルコール添加自家製試料 (A'') の残存活性はほぼ 100% であったが、低温殺菌自家製試料 (A') の残存活性は 26% と失活が認められた。

中性プロテアーゼは市販塩麴 D が自家製塩麴よりも高い活性を示した (図 7)。他の市販品は、自家製塩麴の 25% から 46% の活性であった。アルコール添加自家製試料 (A'') の残存活性は 85% であったが、低温殺菌自家製試料 (A') の残存活性は 49% と半減していた。

自家製塩麴の活性を 100 とした低温殺菌試料の残存活性と各市販製品の酵素活性を比較し、市販品の加熱殺菌の有無を推定した。

塩麴 B と塩麴 C は、ほとんどの酵素で活性が低温殺菌試料と同等または低いことから、加熱処理をしている可能性が考えられる。

塩麴 D と塩麴 F は、グルコアミラーゼが自家製塩麴試料の 2% 程度と極めて低活性であった一方で、その他の酵素では高活性のものもあった。塩麴 D の商品名は「生塩麴」であるが、酵素活性の比較からこ

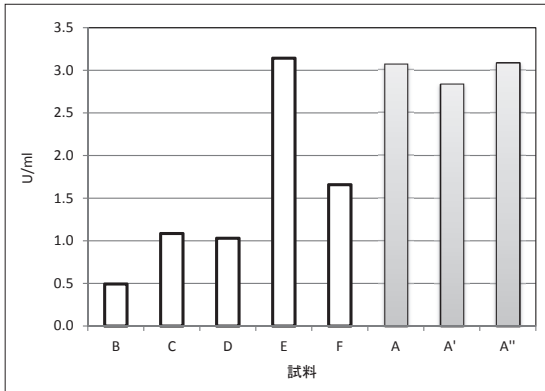


図5 塩麴ろ液の酸性カルボキシペプチダーゼ活性
 塩麴ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表す。試料区分は図2と同じ。

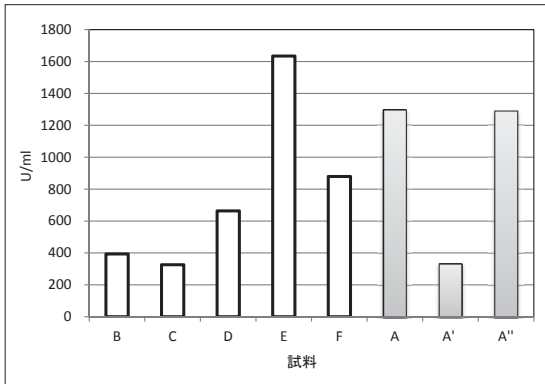


図6 塩麴ろ液の酸性 (pH3.0) プロテアーゼ活性
 塩麴ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表す。試料区分は図2と同じ。

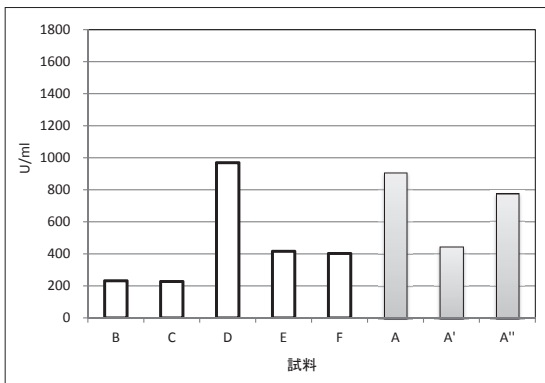


図7 塩麴ろ液の中性 (pH6.0) プロテアーゼ活性
 塩麴ろ液 1 ml あたりの酵素活性値として表す。試料区分は図2と同じ。

の2製品が非加熱であるか否かの判定はできなかった。

塩麴Eは商品情報に「非加熱」と記載があった製品である。酸性プロテアーゼの高活性に加えて、 α -アミラーゼでは自家製試料の60%程度の高い残存活性を有することから非加熱と考えられる。

市販の塩麴の酵素活性を自家製塩麴の酵素活性と比較した場合、糖化系酵素活性に比べタンパク質分解系酵素の活性が相対的に高かった。この理由の一つとして、自家製塩麴に使用した米麴は漬物用や甘酒用の米麴であり糖化系酵素の生産性の高い白麹菌（分生子の色が薄い黄麹菌）が使用されているためと考えられる。また、タンパク質分解系の酵素活性が高かった塩麴Dや塩麴Eは味噌メーカーの商品であることから、タンパク質分解系酵素の活性が高い味噌製造用の麹菌を塩麴製造用に使用している可能性が考えられる。他の商品についても漬け込む食材の旨味を引き出すためにタンパク質分解系酵素活性の高い麹菌株で製造した米麴が使用されていることが考えられる。

3-7. 保存性の向上方法

加工食品の保存性を高める方法としては、加熱処理、食塩の添加やアルコール添加などがある。塩麴の調理特性は各種酵素の効果によるものであることから、酵素が失活する高温での加熱殺菌法は適さないと考えられる。

市販品の酵素活性測定結果から一部の商品については低温殺菌を行っている可能性も推定された。自家製の塩麴製造法には、米麴に塩と60℃のお湯を加え酵素の失活を抑えつつ発酵を促進し、同時に雑菌抑制効果を期待する方法もある⁸⁾。

タンパク質分解系の酵素活性が高かった塩麴Eは、市販品中で最も高い13.2%の塩分濃度と4%のアルコール添加が行われている。また、塩麴Dは、塩分濃度は10.2%と低めであるがアルコール濃度は最も高い5.9%であった。自家製塩麴に4%濃度となるようにアルコール添加した試料では、酵素活性の低下は認められなかった。以上の結果から、酵素活性を低下させずに塩麴の保存性を高める方法としては、食塩の添加効果に加えてアルコールを添加することが効果的であると考えられる。

4. まとめ

市販塩麴では分生子の発芽能がないことから、塩麴使用により他の食材にカビ（麹菌）が生える可能性は低いものと推定できる。

市販塩麴の糖質分解系酵素活性とタンパク質分解系酵素活性のバランスを自家製塩麴の活性と比較した場合、糖質分解系の酵素活性に比べ、相対的にタンパク質分解系の酵素活性が高かった。この理由は、市販塩麴の製造にはタンパク質分解系酵素生産性の高い麹菌株が使用されている可能性や低温殺菌を行っている可能性などが考えられる。

発芽率測定試験において、65℃、30分の低温殺菌では細菌の生育がみられたのに対して、4%アルコール添加試料では麹菌以外の細菌の生育が認められなかった。さらに、低温殺菌試料では酵素活性が低下したが、アルコール添加試料では残存酵素活性が高かった。以上の結果から、酵素活性を維持しつつ雑菌の汚染防止に効果的であるアルコール添加が、塩麴製品の保存性向上方法として適していることがわかった。

以上、塩麴製品の特性の一端を明らかにすることができた。塩麴が食材のうま味に及ぼす効果については、まだ不明な点も多い。一部に塩麴に肉や魚を漬けることでグルタミン酸が増加することを示すデータが掲載されている²⁾。これには、塩麴中のタンパク質分解系酵素が寄与していると考えられる。本報告の市販塩麴の酵素活性特性についての知見は、塩麴とうま味付与の関係を解明するための一助となるものと思われる。

参考文献

- 1) 平野必大著、島田勇雄訳注（1976）：本朝食鑑1、113-142、平凡社
- 2) 朝日新聞（2012）：2012年4月21日付朝刊
- 3) おのみさ（2011）：麴のレシピ、52、池田書店
- 4) 注釈編集委員会編（1993）：第四改正国税庁所定分析法注解、215、（財）日本醸造協会
- 5) 柳田藤治編（1984）：醸造・食品学実験書、71-73、食品研究社
- 6) 岩野君夫、三上重明、福田清治、島田豊明（1986）：醸協、81、490-494
- 7) 谷本昌太、松本英之、藤井一嘉、大土井律之、坂本宏司、出羽信也、山根雄一、下田満哉、箴島豊（2004）：醸協、99、208-214
- 8) 株式会社 伊勢惣 HP
<http://www.isesou.co.jp/kouji/shiokouji.shtml>