

## 学位論文要約

# 第1部 麹菌の生態学的研究 焼酎麹菌の接合型と醸造特性の関連について

## 【研究の背景と目的】

日本の醸造産業に利用されている麹菌（黄麹菌 *A. oryzae* や、焼酎麹菌 *A. luchuensis*）は使用目的に適した性質の株が選抜されて使用されている。著者はこれまで醸造用麹菌種の自然界での生態について研究を進めてきており、醸造用黄麹菌の起源を推定する目的で、自然界から分離した野生黄麹菌における種々の醸造特性を比較解析し、野生黄麹菌中には醸造用として利用可能な特性を有する株が存在することを明らかにした<sup>1)</sup>。また、焼酎麹菌についても、自然界から分離した株と醸造用焼酎麹菌の醸造特性について比較解析を行った<sup>2)</sup>。黄麹菌、焼酎麹菌の生態として、ともに有性世代が見いだされていないことがある。2005年に黄麹菌、2016年に焼酎麹菌の全ゲノム解析がなされ、両菌株とも有性生殖に関わる接合型遺伝子を有することが明らかにされた。黄麹菌では、それぞれ MAT1-1 と MAT1-2 の接合型遺伝子を有する菌株が見いだされ<sup>3)</sup>、両株間での有性生殖の研究が進められているが、子嚢胞子の形成の確認までには至っていない<sup>4)</sup>。一方、焼酎麹菌については、醸造用株も含めて片方の接合型遺伝子（MAT1-2）を有する菌株しか見いだされていなかった<sup>5)</sup>。しかし、最近になり MAT1-1 を有する菌株が発見されたことにより、焼酎麹菌の有性生殖の研究が可能となった。また、醸造用株が MAT1-2 しか有していないことが醸造特性と関連するの否かについても課題となっている。そこで、複数の研究機関の研究者で構成されるコンソーシアムによりこれらの研究を進めることとなった。著者もこのコンソーシアムに加わり、接合型と醸造特性の関連についての研究を分担することとなった。本研究第1部では、接合型の異なる菌株で麹を製造し酵素生産性や活性の比較、それぞれの麹を用いた焼酎もろみにおける発酵性や生成成分の比較により、焼酎麹菌における接合型と醸造特性の関連について明らかにすることを目的とした。

## 【実験方法】

使用菌株は独立行政法人酒類総合研究所および㈱ビオックからの分譲株である23株を用いた。表1-1に菌株と分離源等を示した。

表1-1 焼酎麹菌 MAT1-1, MAT1-2 株

MAT1-1			MAT1-2		
菌株名	分離源	分離地	菌株名	詳細	分与機関等
雷1	バタバ茶	富山県	ゲノム	ゲノム解析済株RIB2604	(独)酒類総合研究所
ハ1	空気	東京都八丈島	醸1	醸造用白麹菌( <i>A.Luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> )	市販種麹1
青1	土壌	東京都青ヶ島	醸2	醸造用黒麹菌	市販種麹2
青2	空気	東京都青ヶ島	醸3	醸造用黒麹菌ISH1( <i>A.Luchuensis</i> var. <i>awamori</i> )	(株)ビオック
青3	空気	東京都青ヶ島	醸4	醸造用黒麹菌ISH2( <i>A.Luchuensis</i> var. <i>saitoi</i> )	(株)ビオック
青4	空気	東京都青ヶ島			
青5	空気	東京都青ヶ島			
青6	麹	東京都青ヶ島			
青7	麹	東京都青ヶ島			
青8	麹	東京都青ヶ島			
青9	麹	東京都青ヶ島			
			菌株名	分離源	採取地
			喜界	黒糖焼酎麹	鹿児島県喜界島
			奄岐	麦焼酎麹	長崎県奄岐島
			雷2	バタバ茶	富山県
			青10	麹	東京都青ヶ島
			ミャンマー	緑茶	ミャンマー
			ベトナム	コーヒー豆	ベトナム
			中国	プーアル茶	中国雲南省

## 1. 麴の製造と菌体量、酸度の分析

焼酎麴はタイ米の砕米を蒸米にし、各麴菌の分生子懸濁液を植菌した後、恒温器内で本格焼酎製造技術<sup>6)</sup>に従って温度管理し 42 時間製麴した。麴菌菌体量の測定は藤井らの方法<sup>7)</sup>で行った。酸度は国税庁所定分析法<sup>8)</sup>に従って測定した。

## 2. 酵素活性測定

粗酵素液の調整は国税庁所定分析法<sup>8)</sup>に従って実施した。 $\alpha$ -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。グルコアミラーゼおよび、耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ活性は国税庁所定分析法によって測定した。酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ活性の測定は醸造・食品学実験書記載の方法<sup>9)</sup>に従って行った。

## 3. 小規模焼酎仕込み試験

米麴、汲み水、酵母を一度に加える一次仕込みとした。出麴酸度のばらつきがあったためクエン酸による補酸を実施した。25℃恒温水槽中で 14 日間発酵した。15 日目にもろみを遠心分離により固液分離し、液部をろ過した試料の酸度、有機酸分析、アルコール分析、香気成分分析を実施した。

### 【結果および考察】

#### 1. 菌体量と酸度結果

麴の生育状態を示す菌体量は、MAT1-1、MAT1-2 に 5%の危険率で有意差があり MAT1-1 が多かった (図 1-1)。しかし MAT1-2 の中で醸造用以外の菌株では極端に生育状態の悪いものもあり、分離源の違い (焼酎醸造用か否か) が影響したと考えられた。焼酎醸造用である青ヶ島の麴由来の菌株 (青 6~9) と醸造用菌株 (ゲノム、醸 1~4) との間に有意差はなかった。黄麴菌では製造用途に合わせ、米麴や醤油麴といった原料を含む各環境で生育が良く扱いやすい菌株が選抜されていることから、焼酎醸造用の菌株においても麴製造時の生育が良好な菌株が選抜されてきたと想定される。麴の酸度は MAT1-1 が MAT1-2 に比較して有意に高かった (図 1-2)。

#### 2. 酵素活性測定結果

麴 1 g あたりの酵素活性比較では、測定した酵素のうち糖質分解系の酵素活性および中性プロテアーゼ (NP) 活性は MAT1-1、MAT1-2 両者間の差はなかった。一方、酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) 活性、酸性プロテアーゼ (AP) 活性では MAT1-1、MAT1-2 両者間で差があり ( $p<0.01$ )、MAT1-1 が高値であった。これらの性質は MAT1-1 の麴の菌体量の多さに由来する可能性がある。そこで菌体 1 mg あたりの酵素活性を比較した。ACP 活性は菌体 1 mg あたりの結果も MAT1-1 が MAT1-2 に比較して有意 ( $p<0.05$ ) に高かった (図 1-3)。MAT1-1 菌株の出麴酸度の高さや、酵素活性特性が接合型に起因するものであるかは不明であるが、これらの特性は焼酎製造にあたって望ましい性質である。また、菌体 1 mg あたりの酵素活性結果では、AP 活性は MAT1-1、1-2 の両者間に有意差はなかった。このことから麴 1 g あたりの MAT1-1 の AP 活性の高さは菌体量の多さが影響したと考えられる。一方、菌体 1 mg あたりの  $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha A$ ) 活性では、焼酎醸造用株を含む MAT1-2 が MAT1-1 より有意 ( $p<0.05$ ) に高かった (図 1-4)。焼酎醸造用には  $\alpha A$  活性が高い菌株が選抜されているものと考えられた。このような酵素活性の MAT1-1 と MAT1-2 の各菌株で製造した麴で焼酎仕込み試験を実施した。

### 3. 焼酎仕込み試験結果

MAT1-1 の菌株のもろみは発酵が順調に進んだ。MAT1-2 のうち海外由来の 2 株（ミャンマー，中国）の発酵が遅れた。この 2 株以外の菌株は全て 14 日で発酵終了し，15 日目に上槽した。ミャンマーは発酵不良となったため以後の試験から外した。

### 4. もろみ上槽液の分析結果

もろみ上槽液のアルコール%，クエン酸量を測定した結果，いずれも MAT1-1 と MAT1-2 で差は認められなかった。香気成分は MAT1-2 と MAT1-1 に差があるものがあつた。

#### 【要約】

接合型の異なる菌株 23 株で製造した各麹の菌体量と酸度，酵素活性を測定した。MAT1-1 は国内で分離された全 11 株，MAT1-2 は焼酎醸造用と醸造用以外の菌株 12 株を用いた。麹菌の生育を示す菌体量は，MAT1-2 より MAT1-1 が多かった ( $p < 0.05$ )。しかし，MAT1-1 の焼酎麹由来株と，MAT1-2 の焼酎醸造用株との比較では有意差はなかった。焼酎醸造用株には，麹での生育が良好な菌株が選抜されてきたと想定される。麹の酸度は MAT1-1 が MAT1-2 に比較して有意に高かった ( $p < 0.01$ )。菌体 1 mg あたりの酵素活性では ACP 活性は MAT1-1 が MAT1-2 に比較して有意に高かった ( $p < 0.05$ )。αA 活性は，焼酎醸造用株を含む MAT1-2 が MAT1-1 より有意に高かった ( $p < 0.05$ )。MAT1-2 醸造用株は，αA 活性が高い菌株が選抜されているものと考えられた。製造した麹で焼酎仕込み試験を行った。MAT1-1 と，海外由来の 2 株を除いた MAT1-2 ではもろみの発酵は順調に進行した。もろみ上槽液のアルコール度数，クエン酸量は MAT1-1 と MAT1-2 で差は認められなかった。香気成分には若干の差が認められた。以上の結果より，接合型の異なる MAT1-1 と MAT1-2 両菌株の間には菌の生育，麹の酸度と酵素活性特性，もろみの香気成分に若干の差がみられた。

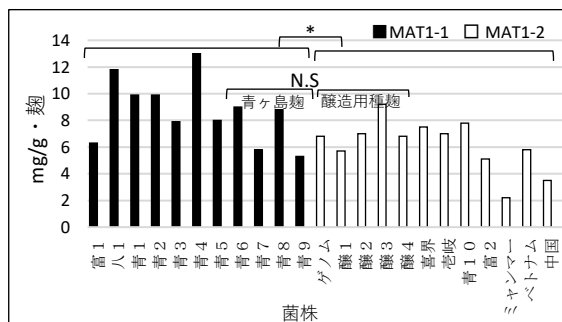


図 1-1 麹菌菌体量

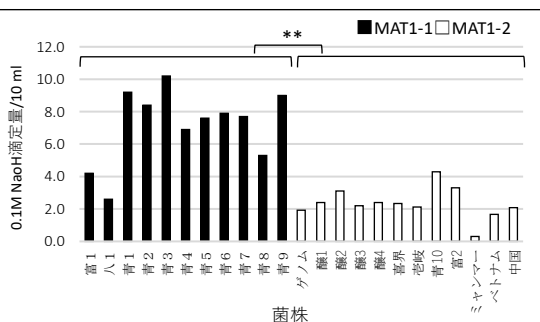


図 1-2 麹の酸度

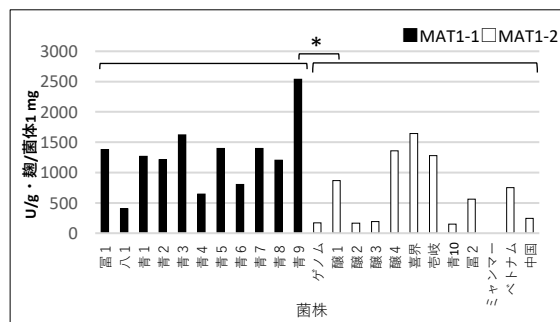


図 1-3 酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) 活性

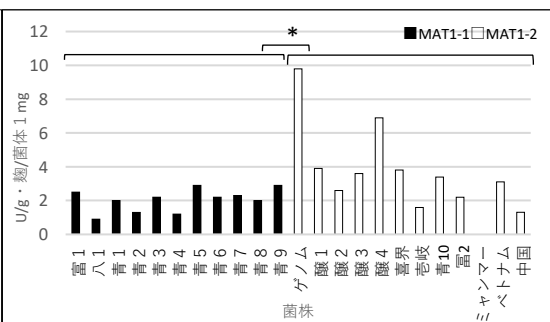


図 1-4 α-アミラーゼ (αA) 活性

## 第2部 麹菌酵素の食品分野における効果に関する研究 塩麹漬け調理が豚ロース肉に与える影響

### 【研究の背景と目的】

麹菌が日本の醸造産業に利用される最大の理由は、その旺盛な酵素生産力にあり、穀類に麹菌を繁殖させる麹製造過程で生産される各種酵素が醸造に利用される。さらに麹菌の安全性は世界的に確認されていることから、麹菌が生産する各種酵素は食品添加物としても利用されている。麹は伝統的醸造産業への利用だけでなく近年は塩麹や甘酒が調理に利用されている。著者は塩麹の研究を2012年から開始し、市販塩麹の酵素活性等について報告した<sup>1)</sup>。塩麹は麹と食塩水を混合し熟成させて調製する調味料である。使用される食材は様々であるが食肉への利用が多い。塩麹に食肉を漬け込むことで、肉が「やわらかくなる」「うまみが増す」といった効果があるとされている<sup>2, 3)</sup>。しかし、塩麹の調理効果について詳細な調理科学的解析をした報告は少ない。鶏肉を用いた研究<sup>3)</sup>では、肉がやわらかくなるのは麹由来の酵素の効果であると考察されているが確定的な解明には至っていない。また、市販塩麹の中には加熱殺菌処理をしたと推定される酵素活性の低い製品も存在しており<sup>1, 4, 5)</sup>、酵素による食味改善効果については定かではなかった。本研究の第2部では、豚肉を試料とし、塩麹中の酵素や食塩成分が食肉の食味向上に寄与しているのかを明らかにすることを目的とした。

### 【材料と方法】

#### 1. 漬け込み用試料の調整方法

食肉の漬け込みに用いた試料を表2-1に示した。漬け込みをしない区分を対照とし、便宜上試料Aとした。塩麹試料Bは、自家製塩麹の製法を参考に製造した<sup>6)</sup>。米麹200gに食塩（並塩）60g、水（硬度30mg/l）280gを加え攪拌し、25℃に静置し1日1回攪拌する操作を7日間実施した。酵素失括塩麹Cの調製は、試料B（25℃7日間熟成）を恒温水槽中で中心部75℃1時間加熱処理した。酵素添加塩麹試料C①、C②は試料Cの酵素失括塩麹100gに麹菌由来の酵素剤（プロテアーゼMSD アマノエンザイム（株））をそれぞれ0.235g（添加量0.2%）、1.175g（添加量1.2%）添加した。無塩塩麹（甘酒）試料Dは、米麹と水を混合し、55℃の恒温水槽中で6時間加熱熟成した。食塩水試料Eは塩麹調整用食塩で塩濃度10%に調整した。塩麹調製用の水（硬度30mg/l）を試料Fとした。

Sample	Composition	Material and detail	pH	Salinity content (%)	Sugar content (%)
A	control		—	—	—
B	Shio-koji	ricekoji, water, salt (25 °C, 7 days)	5.2	10.0	37.0
C	heat inactivation shio-koji	heat(75 °C, 1 hour)sample B	5.2	10.2	39.0
C①	C with enzyme 0.2%	sample C, protease 0.2%	5.1	10.1	40.0
C②	C with enzyme 1.2%	sample C, protease 1.2%	5.0	10.1	41.0
D	amazake	ricekoji, water (55 °C, 6 hours)	6.0	0.0	37.0
E	sodium chloride solution	water, salt	6.9	10.0	—
F	water	water (hardness 30 mg/l)	7.0	—	—

表 2-1 漬け試料の詳細

## 2. 漬け込み用試料の酵素活性測定

### 1) 粗酵素溶液の調製

試料を 10 倍希釈後 1 時間抽出し、ろ過、遠心 (3,000 rpm, 15 分間) 後の上澄み液を酵素活性測定に用いた。

### 2) 酵素活性測定法

$\alpha$ -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。分析キット取扱説明書記載の換算係数を用いて塩麴 1 g あたりの酵素活性値を算出した。酸性プロテアーゼ (pH 3.0), 中性プロテアーゼ (pH 6.0) の測定は醸造・食品学実験書記載の方法<sup>7)</sup>に従って行った。

## 3. 肉試料と漬け込み方法

### 1) 試料肉の調製

精肉店で同一産地の国産豚ロース肉を実験当日に購入した。肉 1 枚 (約 100 g) に肉の重量の 10% の漬け試料を均一に塗布してプラスチック製袋へ封入後、4 °C 冷蔵庫で一晩 (18 時間) 漬け込んだ。

### 2) 肉試料区分

漬け込みをしない肉を試料 a とした。各漬け試料 B, C, C ①, C ②, D, E, F でそれぞれ漬け込みをした肉試料をそれぞれ試料 b, c, c ①, c ②, d, e, f として表した。

## 4. 遊離アミノ酸分析

アミノ酸分析計 L-8900 形 ((株) 日立ハイテクノロジーズ社製) で分析した。漬け込み後の肉試料のアミノ酸分析用試料の調製は、トリクロロ酢酸 (TCA) を用いた千国らの方法<sup>8)</sup>で行った。塩麴などの漬け試料のアミノ酸分析用試料の調製は、漬け試料を蒸留水で 50 倍希釈し、4 M 塩酸で 2 倍希釈後、孔径 0.2  $\mu$ m フィルターでろ過したものを分析用試料とした。

## 5. 破断強度測定用試料および官能評価用試料の調製

加熱試料の調製方法は農林水産省「豚肉の肉質改善に関する研究実施要領」<sup>9)</sup>に従って行った。漬け込み処理後の試料肉の表面の漬け試料をキムタオルで軽く拭き取り、脂肪部分を取り除き、赤身部分から正確に幅 2 cm×長さ 4~5 cm の小片 3 本を切り出した。これを分析用肉試料とした。プラスチック製袋に上記の肉試料 3 本を入れ、空気を抜いて密封した。密封袋ごと 70°C 恒温水槽中で 1 時間加熱処理後、流水中で 30 分間冷却した。尚、この加熱条件は食品衛生法上必要な豚肉の殺菌条件 (中心部 63°C 30 分) を十分上回ることを確認している。加熱後の肉試料は 1 cm(W)×4 cm(L)×1 cm(H) に整形し、破断強度測定用試料とした。官能評価用には同様の試料を一口大 (1 cm 角) に整形したものをを用いた。

## 6. 加熱損失率

加熱前後で肉試料の重量を測定し、加熱による減少重量を元の肉片重量で割った値を 100 倍したものを加熱損失率とした<sup>9)</sup>。

## 7. 加熱肉試料の破断強度測定

破断強度測定にはレオメータ（(株)山電 RE2-3305B）を用いた。プランジャーは楔型（No. 49）を使用し、圧縮速度 1.0 mm/sec の定速測定を行った。試料を筋線維に垂直方向にプランジャーが貫入するよう設置し、圧縮率 80%，クリアランス 2 mm の条件とした。試料ごとに歪率中間点（40%）の荷重（N）を 1 試料につき各 9 回ずつ測定し、上下の外れ値を除き 7 回の平均値と標準偏差を求めた。前述した肉の漬け込み操作から整形し加熱，破断測定までを全試料実施するまでを 1 回分の測定とし，同じ測定を独立に 3 回実施した。

## 8. 官能評価

実践女子大学生生活科学部食品加工学研究室の学生および教員 7 名で，評価基準について予備試験実施後に官能評価を実施した。評価項目は 7 項目（①やわらかさ，②噛み切りやすさ，③ジューシーさ，④なめらかさ，⑤付着性（付着しにくい），⑥飲み込みやすさ，⑦口腔内への残留物の無さ）で実施した。①，②，③，④，⑥の評価項目については各特性が顕著なほどプラス値が高い評価とし，漬けなし肉を基準（0）として，+ 3 から - 3 の 7 段階評価で採点した。例として①やわらかさでは，「非常にやわらかい（+ 3）」から「非常にかたい（- 3）」，②噛み切りやすさでは「非常に噛み切りやすい（+ 3）」から「非常に噛み切りにくい（- 3）」などの 7 段階とした。尚，付着性（⑤），残留物（⑦）については「付着しない」，「残留物が少ない」ほど，プラス値が高い評価とした。評価はおもにテクスチャーについての分析型評価であるが，評価項目以外の風味，味などの試料の特徴は自由に記述してもらった。疲労効果を防ぐため一度に評価する試料は基準を含む 3～5 試料までとし，試料の組み合わせを変えて 3 回実施した。統計解析は Excel 統計ソフト ver. 6（(株) 社会情報サービス）を用いた。分散分析後 tukey の多重比較を実施した。相関分析は Excel 表計算ソフトを用いた。

## 9. 豚肉組織の観察

### 1) レーザー顕微鏡観察

3D 測定レーザー顕微鏡（OLS4100，島津製作所（株）製）を用いた。解析ソフトウェアは，OLYMPUS Stream を用いた。観察用の試料は漬け込みをしない肉試料 a，漬け込み後の塩麹漬け肉試料 b，酵素 1.2% 添加試料 c②，甘酒試料 d の 4 試料とした。赤身部分を 1 cm 角に処理後，肉表面をカッターでスライスした。切片を観察用試料とした。

### 【結果および考察】

#### 1. 漬け込み用試料の酵素活性測定結果

各漬け試料の組成等を表 2-1 に示した。塩分濃度は市販塩麹の塩分濃度<sup>1, 4)</sup>が平均 11% 程度であり，同等の結果であった。塩麹の糖度は 20～30% 程度とされる<sup>5)</sup>。今回の結果はそれよりも高値（糖度 37～41%）であるが著者らが測定した市販塩麹の糖度（40%）と同程度の結果であった。漬け試料の酵素活性測定結果を図 2-1 に示した。肉への影響があると推定されるタンパク質分解系の酵素については，酸性プロテアーゼ（AP）では，酵素失活塩麹試料 C に酵素剤を 0.2% 添加した試料 C ①が塩麹試料 B に対して約 1.6 倍，酵素剤を 1.2% 添加した試料 C②では塩麹試料 B の約 5.6 倍の活性値を示した。添加した酵素剤はプロテアーゼを主体としたものであるこ

とから酵素添加量に応じて AP 活性が高くなる傾向を示した。中性プロテアーゼ (NP) と酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) では、B に対して試料 C①はほとんど差がなかったが、C②では有意に活性が高く、NP は 6.1 倍、ACP は 1.5 倍であった。糖質分解系の酵素では  $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ A) では、酵素 0.2% 添加試料 C①は塩麴試料 B の 1.5 倍、酵素 1.2% 添加試料 C②は約 2.7 倍の活性値であった。グルコアミラーゼ (GA) は塩麴試料 B に対し酵素 0.2% 添加試料 C①が約 1/5、酵素 1.2% 添加試料 C②が 1/4 と、どちらの試料も低活性であることから、添加した酵素剤の GA は麴中の酵素と比べて含量は低いと考えられる。

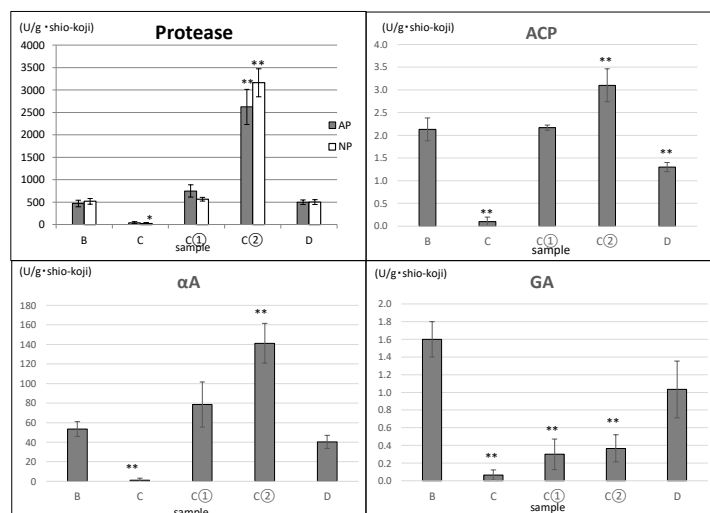


図 2-1 漬け試料の酵素活性測定結果

試料名 B: 塩麴 (25°C, 7 日間), C: 殺菌塩麴, C①: 試料 C+酵素 0.2%, C②: 試料 C+酵素 1.2%, D: 甘酒 (55°C, 6 時間)

酵素活性は試料ごとに n=3 の平均値で表した。有意差は試料 B との比較。

プロテアーゼ類では 55°C 程度の加温熟成では大きく失活しないと報告<sup>4, 10)</sup> されている。甘酒試料 D のプロテアーゼ (AP, NP) 活性は、55°C 6 時間の加熱処理では失活が認められず、これらの報告と一致した。以上のように酵素活性、特にタンパク質分解系の酵素活性の異なる漬け試料を調製することができた。これらの測定試料で肉の漬け込みを実施した。

## 2. 遊離アミノ酸分析結果

漬け込み後の肉試料 a, b, c, c ①, c ②の遊離アミノ酸分析結果を表 2-2 に示す。今回測定した遊離アミノ酸総量は対照試料 a (141.5 mg/100 g) に比較して塩麴試料 b (335.8 mg/100 g) で 2.3 倍、酵素添加試料 c ② (422.9 mg/100 g) では 3.0 倍増加していた。また、うま味成分のグルタミン酸は対照試料 a (12.4 mg/100 g) に比較して塩麴試料 b (34.8 mg/100 g) で 2.8 倍、酵素添加試料 c ② (26.8 mg/100 g) では 2.2 倍増加していた。漬け込み試料自体に含まれる遊離アミノ酸量を表 2-3 に示した。遊離アミノ酸総量は試料 100 g あたり 536~709 mg, グルタミン酸量は 100~110 mg, うま味に関連する遊離アミノ酸<sup>11)</sup> として知られるアスパラギン酸は 51~64 mg であった。漬け込みには肉重量の 10% の試料を使用しているが、仮に試料中の遊離アミノ酸がすべて肉に移行したとしても漬け込み試料肉中の遊離アミノ酸の増加量には至らない。酵素失活塩麴を用いた試料 c に比べて、酵素を 0.2% 添加した c ①, 酵素を 1.2% 添加した c ②を比較すると酵素添加量に比例してグルタミン酸, アスパラギン酸といった遊離アミノ酸が増加している。これらの結果から、漬け込み中に塩麴中のプロテアーゼが肉中のタンパク質を分解して、グルタミン酸, アスパラギン酸などの遊離アミノ酸を増加させたことは明らかである。



表 2-2 漬け込み後試料肉の遊離アミノ酸分析結果

Meat sample (pork) free amino acid data content(mg/100g meat)					
Free-Amino acid	a	b	c	c①	c②
Lysine	12.9	39.2	16.3	27.0	65.2
Histidine	2.2	5.7	3.0	3.8	6.9
Phenylalanine	6.3	20.8	7.7	13.3	34.8
Tyrosine	7.5	21.1	8.3	13.2	26.7
Leucine	11.7	33.4	13.5	22.3	53.6
Isoleucine	6.3	19.4	7.7	12.4	26.2
Methionine	5.5	15.6	4.8	8.0	20.6
Valine	8.2	23.5	9.9	13.8	28.4
Alanine	27.4	39.5	39.6	37.5	48.1
Glycine	14.8	17.9	15.8	14.6	19.2
Proline	5.5	13.0	10.7	10.8	17.1
Glutamic acid	12.4	34.8	17.7	18.7	26.8
Serine	8.9	20.6	10.4	13.1	20.3
Threonine	6.7	15.6	7.8	10.0	16.3
Aspartic acid	5.2	15.7	8.6	7.5	12.7
Total	141.5	335.8	181.8	226.0	422.9

表 2-3 塩麴試料中の遊離アミノ酸分析結果

Free-Amino acid content (mg/100g shio-koji)	B	C	C①	C②
Lysine	36.7	36.7	39.4	43.5
Histidine	8.6	8.6	10.1	12.1
Phenylalanine	32.7	34.7	40.2	51.9
Tyrosine	32.2	34.9	40.1	51.8
Leucine	52.9	56.2	63.8	76.7
Isoleucine	29.8	30.3	35.2	41.4
Methionine	13.4	14.7	16.2	19.5
Valine	36.5	38.3	44.1	54.9
Alanine	55.0	56.1	59.1	67.5
Glycine	22.6	22.7	24.5	28.9
Proline	0.1	0.1	0.1	0.2
Glutamic acid	103.2	100.7	102.0	110.9
Serine	33.6	33.7	37.5	44.4
Threonine	27.9	28.8	32.5	40.9
Aspartic acid	51.3	53.4	56.5	64.9
Total	536.4	549.8	601.3	709.5

表 2-2 肉試料 a:漬けなし試料, b: 塩麴試料, c: 殺菌塩麴試料, c①: C+酵素 0.2%, c②: C+酵素 1.2%

表 2-3 試料名 B: 塩麴, C: 加熱殺菌塩麴, C①: C+酵素 0.2%, C②: C+酵素 1.2%

### 3. 加熱損失率の測定結果

加熱前後の重量差から求めた加熱損失率 (%) を図 2-2 に示した。最も加熱損失率が少ないのは酵素 1.2% 添加試料 c ②であり、塩麴試料 b との比較で有意差がみられた ( $p < 0.05$ )。食塩が 10% 含まれる漬け試料グループ肉 (塩麴試料 b, 失活塩麴 c, 酵素 0.2% 添加試料 c ①, 酵素 1.2% 添加試料 c ②, 食塩水試料 e) の 5 試料が、食塩を含まない漬け試料グループ肉 (対照試料 a, 甘酒試料 d, 水漬け試料 f) の 3 試料と比較して加熱損失率が平均で約 6 % 低かった。食塩は肉の加熱による損失を抑え、保水性を高めることが知られている<sup>1 2)</sup>。本実験の結果でも食塩の含まれる試料グループでは無塩のグループと比較して加熱による損失が少ない傾向があった。漬け試料中の食塩が肉の加熱損失の低減に効果があったと考えられる。

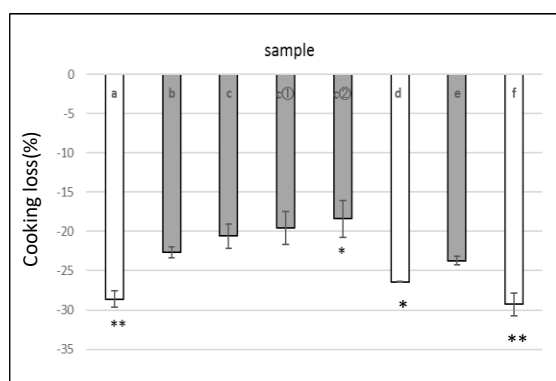


図 2-2 加熱損失率 (%)

試料名 a:漬けなし (対照) 肉試料, b: 塩麴漬け試料, c: 酵素失活塩麴漬け試料, c①: C+酵素 0.2% 試料, c②: C+酵素 1.2% 試料, d: 甘酒漬け試料, e: 食塩水漬け試料, f: 水漬け試料

結果は平均値(n=3)で示した。白色は食塩 0% 試料グループ, 灰色は食塩 10% の試料グループを示す。有意差は試料 b との比較。

### 4. 加熱豚肉試料の破断強度測定結果

破断強度試験は、一定速度で圧縮させた際、どのくらいの力がかかったときに変形・破断が生じるかを調べる試験である<sup>1 3)</sup>。今回試験した豚肉試料では破断点荷重が最大荷重の 20 N 付近に集中したことから、歪率中間点 (40%) における各試料にかかる荷重を比較した。歪率 40% 中間点の荷重 (N) の結果を示した (図 2-3)。

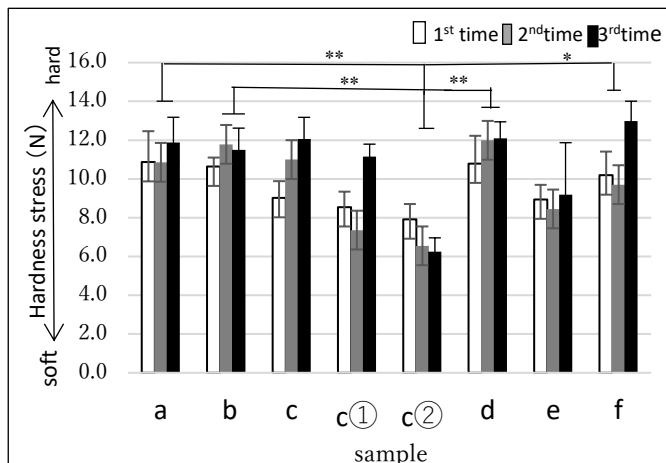


図 2-3 破断強度測定結果（歪率 40%中間点の荷重 (N)）

試料名は図 2-2 と同様。結果は平均値 (n=7) で表した

3 回の測定結果から各試料間の有意差をみると (図 2-3), 歪率 40%中間点の荷重は, 酵素 1.2% 添加試料 c②が 3 試料 (対照試料 a, 塩麴試料 b, 甘酒試料 d) との間で 1 %, 水漬け試料 f との間で 5 %の危険率で有意に低値であった。果実由来のプロテアーゼの添加は肉の筋原線維タンパク質のミオシン, アクチン, 肉基質タンパク質のコラーゲンを分解することが知られ, 鮫島ら<sup>14)</sup> は切断強度の低下を報告している。圓口ら<sup>5)</sup> は自家製塩麴のカゼイン分解活性がキウイフルーツの 1/8 程度と報告している。塩麴試料 b と酵素失活塩麴試料 c の 2 試料間の荷重測定結果に差がなかったことから, 通常塩麴中の酵素活性では今回の測定方法で検出できるまでの影響はでないものと推定される。しかし, 麴菌などの糸状菌由来プロテアーゼを 1.2%添加した試料 c ②では, 本測定方法でも有意差が認められたことから麴中のプロテアーゼが加熱調理後の豚肉を軟化する効果があることが分かった。

## 5. 官能評価結果

官能評価の結果を表 2-4 に示した。塩麴試料 b と調製法は食塩の添加の有無だけが異なる甘酒試料 d と比較した場合, 塩麴試料 b は甘酒試料 d よりも有意にやわらかく (①), 噛み切りやすく (②), ジューシー (③) で, なめらかであり (④), 飲み込みやすい (⑥) 結果であった。さらに食塩水に漬けただけの試料 e においても, 甘酒試料 d よりやわらかく (①), 噛み切りやすく (②), 飲み込みやすい (⑥) という結果であった。食塩のない試料では加熱損失が大きくなること (図 2-2) から, 保水性の低さがこれらの官能評価項目に影響したものと考えられる。したがって塩麴浸漬の豚肉に対するテクスチャーや口中感の向上には食塩の保水効果も寄与しているものと考えられる。食肉の評価において肉のおいしさを決定づけるものとして「食感」は重要な要素である<sup>12, 15)</sup>。肉は味が良いことと同時に「やわらかさ」「ジューシーさ」「なめらかさ (キメが細かい)」などの食感に関する項目の評価が高いものが一般に良質とされる。特に「やわらかさ」は肉の品質評価に大きく影響を与える<sup>15)</sup>。硬い肉をやわらかくするための調理法として古くからパパイナなど果実由来プロテアーゼが利用されてきたが, 一方で肉の食感は極端にやわらかすぎる場合も嗜好性が低下するという報告もある<sup>16)</sup>。

sample	①tenderness	②easy of bite	③juiciness	④smoothness	⑤no adhesion	⑥easy of swallowing	⑦no remaining in the mouth
a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
b	1.43	1.71	2.00	1.57	1.29	1.57	1.00
c	0.14	0.86	0.71	0.71	1.14	0.71	0.71
c①	1.14	1.43	1.29	1.71	0.29	1.14	0.43
c②	2.00	1.14	1.43	2.00	0.29	1.14	0.00
d	-0.71	-0.71	-0.85	-0.43	0.00	-0.57	-0.71
e	1.57	1.57	1.00	1.14	0.42	1.28	0.57
f	0.00	0.43	0.59	0.57	0.57	0.00	0.00

表 2-4 官能評価の結果

結果は平均値 (n=7) で示した。試料名は図 2-2 と同様。

破断強度測定の結果、塩麴試料 **b** の歪率 40% 中間点の荷重は無処理の対照試料 **a** との有意差がなかった。しかし、官能評価では塩麴試料 **b** は「やわらかい」の評価得点が高く、自由記述では「噛み心地が良い」「食べやすい」と評価された。また酵素を 1.2% 添加した試料 **c ②** については、自由記述で「やわらかいが口に残る」との評価があった。そこで、破断強度測定結果と官能評価結果のやわらかさ (①) の相関を算出した (図 2-4)。その結果 5 % の危険率で有意の相関 (相関係数 -0.7832) が認められた。肉の評価では官能評価と併用して様々な機器測定が行われることが多い<sup>17)</sup>、測定機器の選定においては、官能評価とどのような相関があるのかを十分に検討する必要があるとされる<sup>18)</sup>。一方でヒトが咀嚼する際は唾液の介在や咀嚼速度が一定ではないことから、機器測定と官能評価との比較は難しい<sup>19)</sup>とされている。今回は相関が認められたが、肉の「噛み心地の良さ」は機器測定では評価しにくく、破断強度の測定では微妙な“やわらかさ”の差の検出は難しいと思われた。また、肉のおいしさの評価では“ジューシーさ (多汁性)”も重視される。肉の“ジューシーさ (多汁性)”は食肉に約 70% 含まれる水分が加熱により離れることなく、噛んだときにはじめて知覚され、組織と結合して徐々ににじみ出るような状態をいう<sup>12)</sup>。加熱損失率 (%) とジューシーさ (③) の官能評価結果との関係を図 2-5 に示した。5 % 危険率で有意の正の相関 (相関係数 0.7482) がみられた。一般的に食肉は加熱による損失が多いとパサついてジューシーさ (多汁性) が減少し、同時に風味成分とやわらかさの減少も伴うとされる<sup>12)</sup>。今回の結果では、タンパク質分解酵素のプロテアーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性が一定以上の値である塩麴試料 **B** と酵素添加塩麴試料 **C①**、**C②** に漬けた試料肉 (試料 **b**、**c ①**、**c②**) では官能評価の“やわらかさ”“噛み切りやすさ”“ジューシーさ”“なめらかさ”“飲み込みやすさ”の評価が酵素を失活させた塩麴 **C** に漬けた肉 (試料 **c**) に比べて有意差はないものの高くなる傾向があった。以上のことから調理した肉の食感向上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た。今回の官能評価項目にうま味は入れなかったが、自由記述では酵素活性のある塩麴で漬けた肉 (試料 **b**) に対して「うま味を感じる」とする複数の指摘があった。食感についての官能評価では酵素 1.2% 添加試料 **c②** はやわらかさ (①) や、なめらかさ (④) の項目の評価は最も高いが、やわらか過ぎて肉特有の噛み心地を有さない可能性も考えられた。自由記述の評価も加味すると総合的に塩麴試料 **b** が肉としての好ましい食

感があると考えられた。さらに塩麴漬け試料 b はうま味成分のグルタミン酸やアスパラギン酸などの遊離アミノ酸が増加していた。従って、うま味は、食感に対する好感度とグルタミン酸やアスパラギン酸などのうま味成分が相まって評価されているものと推定される。

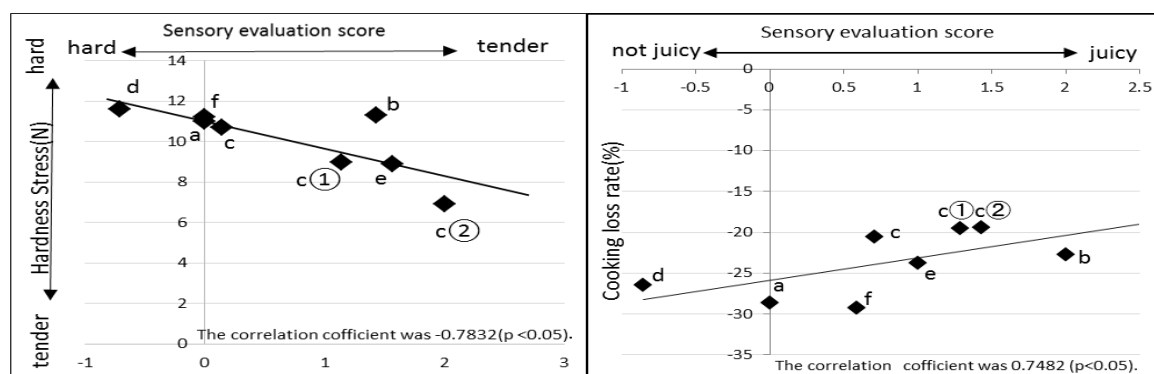


図 2-4 機器測定結果（歪率 40%点荷重）と官能評価のやわらかさ（①）の相関（左図） 試料名は図 2-2 と同様。

図 2-5 加熱損失率（%）と官能評価のジューシーさ（③）の相関（右図） 試料名は図 2-2 と同様。

## 6. 豚肉の組織観察結果

漬け処理後の豚肉組織のレーザー顕微鏡観察結果は、無処理の試料 a に比較して、塩麴試料 b、酵素添加試料 c②では組織構造に「崩れ」が生じている部分が確認できた。食塩を含まない甘酒試料でもこの「崩れ」は生じており、麴由来の酵素により肉組織が分解されたものと考えられた。塩麴漬け込みにより、塩麴試料 b と酵素試料 c②は共通して I 帯部分が狭く（細く）なる「収縮」しているような形状を示していた。これは食塩による影響と考えられた。一般に食肉の収縮現象は死後硬直時に生じ、肉が「硬く」なる傾向を示す<sup>12, 15, 20)</sup>。しかし、今回の官能評価結果では塩麴試料 b も酵素添加試料 c②もやわらかいと評価された。組織構造の崩れは塩麴試料 b も甘酒試料 d も同程度だが、官能評価は塩麴試料 b がやわらかくジューシーであった。この理由として、無塩の試料では加熱損失が大きく、細胞内の水分が多く流出することで食感に負の影響を与えたことが示唆された。

### 【要約】

豚肉の塩麴漬け調理において塩麴に含まれる酵素や食塩の影響を検討した。酵素活性の異なる各試料に漬けた豚肉の遊離アミノ酸は、無処理の対照試料 a に比較して塩麴試料 b では遊離アミノ酸総量が 2.3 倍、酵素 1.2%を添加した試料 c ②では 3.0 倍増加したことによって、塩麴中のタンパク質分解酵素が遊離アミノ酸の増加に寄与していることを明らかにした。加熱後肉の破断強度測定における歪率 40%中間点の荷重の比較結果では、麴菌由来プロテアーゼを約 1.2%添加した試料 c ②が無処理の試料 a や塩麴試料 b より有意に低値となった。官能評価の各項目で高い評価となったのは塩麴試料 b と酵素 1.2%添加試料 c ②であった。破断強度試験と官能評価（やわらかさ）結果とは有意水準 5 %で相関があった。加熱損失率が多いと肉が硬くなる傾向があるが、官能評価での肉のジューシーさと加熱損失率との間には有意水準 5 %の相関がみられた。以上の結果より豚肉への塩麴漬け調理は、うま味成分であるグルタミン酸、アスパラギン酸といった遊離アミノ酸の増加や、官能評価におけるテクスチャーの向上に効果があることが示された。

塩麴の調理性向上効果における寄与成分としては米麴由来の酵素の働きが大きいものと考えられる。さらに塩麴に含まれる食塩が加熱損失率を小さくする効果を担っていることが示唆された。肉の組織観察の結果から、塩麴漬け後の肉の組織には「崩れ」部分が確認された。

#### 【参考文献】第1部

- 1) 阿部真紀；自然界から分離した黄麴菌 (*Aspergillus oryzae*) と醸造用黄麴菌の比較解析, 実践女子大学大学院修士論文 (2012)
- 2) 秋田修, 大城衣賀, 伏木愛香, 境野佑, 阿部真紀；自然界から分離した黒麴菌と実用焼酎麴菌との特性比較, 実践女子大学生生活科学部紀要, **54**, 37-44 (2017)
- 3) R. Wada, J. Maruyama, H. Yamaguchi et al. ; Presence and Functionality of Mating Type Genes in the Supposedly Asexual Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, (8), 2819-2829 (2012)
- 4) 北本勝ひこ編著；改訂版分子麴菌学, 麴菌にも有性世代がある？ゲノム解析から明らかになったこと, 公益財団法人日本醸造協会, p.217-225 (2012)
- 5) A. Mageswari, J. Kim, K. Cheon, S. Kwon, O.Yamada, S.B.Hong ; Analysis of the MAT1-1 and MAT1-2 gene Ratio in Black Koji Molds Isolated from Meju ,*Mycobiology*, **44**, 269-276 (2016)
- 6) 西谷尚道；本格焼酎製造技術, (財) 日本醸造協会, p.109-110 (1991)
- 7) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎；醸協, **87**, 757-759 (1992)
- 8) 注釈編集委員会編；第四改正国税庁所定分析法注解, (財) 日本醸造協会, p.221-223 (1993)
- 9) 柳田藤治編；醸造・食品学実験書, 食品研究社, p.71-73 (1984)

#### [発表論文] 第1部

1. 阿部真紀, 小針清子, 秋田修；自然界から分離した黄麴菌 (*Aspergillus oryzae*) と醸造用黄麴菌の比較解析, 実践女子大学生生活科学部紀要, **49**, 7-14 (2012)

#### 【参考文献】第2部

- 1) 阿部真紀, 小針清子, 秋田修；市販塩麴製品と自家製塩麴中の酵素活性比較, 実践女子大学生生活科学部紀要, **50**, 171-176 (2013)
- 2) 哥亜紀, 山本直子, 大内和美；塩麴に漬けた鶏肉の官能評価, 日本調理科学会平成 26 年度大会研究発表要旨集, **38** (2014)
- 3) 前橋健二；塩麴が教える麴菌の酵素力とその効果, 温故知新, **51**, 80-88 (2014)
- 4) 前橋健二, 大戸亜梨花, 山本達彦, 浅利妙峰, 柏木豊；塩麴製造時での熟成温度が残存酵素活性に及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌, **62**, 290-296 (2015)
- 5) 圓口智子, 湯川夏子, 中西洋子；自家製塩麴のカゼイン分解活性, 日本調理科学会誌, **49**, 166-171 (2016)
- 6) おのみさ；「麴のレシピ」, 池田書店, p.52 (2011)
- 7) 柳田藤治編；醸造・食品学実験書, 食品研究社, p.71-73 (1984)

- 8) 千国幸一, 佐々木啓介, 江森格, 岩木史之, 谷史雄, 中島郁世, 室谷進, 三津木充, ; 肉風味関連物質の含量に対する加熱処理の影響, 日本養豚学会誌, **39**, 191-198 (2002)
- 9) 農林水産省畜産試験場加工第2研究室; 肉の肉質改善に関する実施要領, 15-17 (1990)
- 10) 長谷川撰, 船越吾郎; 食塩と温度が塩麴の品質に及ぼす影響, あいち産業科学技術総合センター研究報告, **5**, 108-111 (2016)
- 11) 河合美佐子; 味を決めるアミノ酸, 生物工学基礎講座, 生物工学, **89**, 679-681 (2011)
- 12) 沖谷明紘編; 「肉の科学」, 朝倉書店, p.59-87, p.112-127 (1996)
- 13) 高橋智子, 齋藤あゆみ, 川野亜紀, 朝賀一美, 和田佳子, 大越ひろ; 牛肉, 豚肉の硬さおよび官能評価に及ぼす重曹浸漬の影響, 日本家政学会誌, **53**, 347-354 (2002)
- 14) 鮫島邦彦, 崔一信, 石下真人, 早川忠昭; アクチニジン (キウイフルーツタンパク質分解酵素) による筋肉構成タンパク質の分解, 日本食品工業学会誌, **38**, 817-821 (1991)
- 15) 入江正和; 日本食品低温貯蔵学会誌, 総説, 食肉の品質評価, **22**, 103-107 (1996)
- 16) 松隈美紀, 高橋誠, 藤田守, 松隈紀生, 藤田修二, 和田浩二; 鶏肉のテクスチャーおよび嗜好性に及ぼすパパイナ処理の影響, 日本食品保蔵学会誌, **39**, 3-7 (2013)
- 17) 財団法人日本食肉消費総合センター; 「食肉官能評価ガイドライン」, 独立行政法人家畜改良センター, p.132-150 (2005)
- 18) 森友彦, 川端晶子編; 「食品のテクスチャー評価の標準化」, 日本食品科学工学会監修, 株式会社光琳, p.77 (1997)
- 19) 神山かおる; テクスチャー解析によるおいしさの評価, 化学と生物, **47**, 133-137 (2009)
- 20) 田村咲江; 食品・調理・加工の組織学, p.100-118, 株式会社学窓社 (1999)

[発表論文] 第2部

1. 阿部真紀, 小針清子, 秋田修; 市販塩麴製品と自家製塩麴中の酵素活性比較, 実践女子大学生活科学部紀要, **50**, 171-176 (2013)
2. 阿部真紀, 澤山茂, 秋田修; 塩麴漬けが豚ロース肉の調理性に及ぼす影響, 日本調理科学会誌, **51**, (3), 142-150 (2018)