

微生物活用実験 ー酵素反応実験ー

こうじ菌による簡易酵素実験

ーみそ製造で使用する原料こうじ菌の特性と役割を理解するー



I みその製造

みそ製造においてこうじ作り（製麹・せいきく）が最も重要であり、みそ製造の基礎・基本である。

こうじ菌を蒸し米に繁殖させるのは、こうじ菌を活性化させ、こうじ菌の特性である酵素をより多く生産させるためである。その酵素は、発酵・熟成過程において原料の分解に大きく関与し、甘み、うま味といった、みそ独特の風味を与え最も重要である。



床もみ(ともみ)



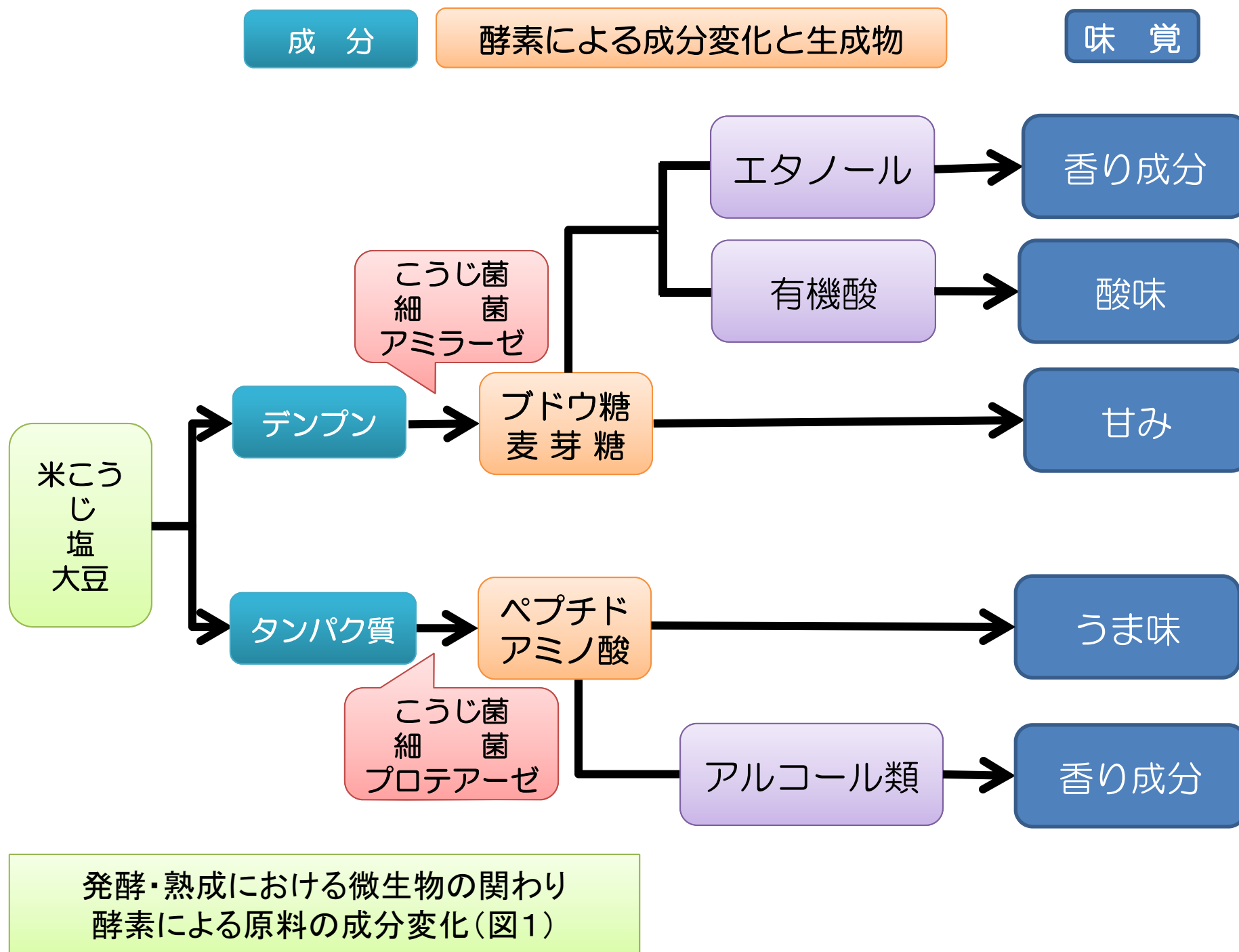
仕舞仕事(しまいしごと)

こうじ菌とみその風味（甘み・うま味）

こうじ菌が発酵過程で生産する酵素は主にアミラーゼとプロテアーゼである。酵素アミラーゼはデンプンをブドウ糖、麦芽糖に分解してみそに甘みを与え、酵素プロテアーゼにおいては、タンパク質をアミノ酸に分解しうま味を与える（図1）。

デンプンをブドウ糖、麦芽糖へと分解している。

- ・ こうじ菌がプロテアーゼを生産し、タンパク質をペプチド、アミノ酸へと分解している。
- ・ こうじ菌以外に酵母や細菌が発酵熟成に関与していることもわかる。



こうじ菌による簡易発酵実験

みそ製造で利用する原料こうじ菌の特性と役割を理解する

I. 試料の採取(米こうじ)

米こうじの培養(製麹)。

原料 種こうじ 100g
白 米 100Kg

1. 床もみ(1日目)

- ①蒸し米を広げて種麹をこすりつけるようにもむ(図1、2)。
- ②丘上積んで保温する(図3)。



図3



図1



図2



図4



図5

2. 切返し(2日目)

- ①麹カビの胞子が発芽し、蒸し米の光沢がなくなると切返しを行い米こうじの温度を下げ空気を含ませる。
- ②厚めに広げて溝を作り、保温する(図4)。品温は35℃前後が適温である。(図5)。

3. 仲仕事(3日目)

- ①菌糸が4～5分になる。こうじの菌糸が全体に行き渡る事を「はぜ回り」と呼ぶ。(図7)。切返しの行程を行い薄めに広げて溝をつくり保温する(図6)。

※ 品温は35℃前後が適温である。

※ こうじ菌の菌糸の様子(図8)。



図6

4. 仕舞仕事(4,5日目)

- ①はぜ回りが6～7分まで進むと、こうじ菌の菌糸が米の内部に入り込む、はぜ込みが進む。薄めに広げて溝を作り、切返しの行程を行う(図6)。

※ 品温は35℃前後が適温である。

※ 白みそ用の米こうじとして、使用される。



図7



図8

5. 出麹(6,7日目)

- ①赤みそ用の米こうじとして、使用される。

試料採取

- ※ 米こうじは10日目まで発酵させ、実験用のサンプルとして採取する(図8,9,10)。採取したサンプルは冷凍庫へ保管する。

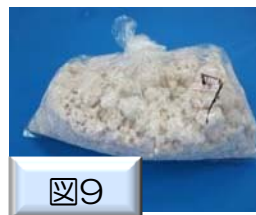


図9



図10



図11

Ⅱ. 実験内容

酵素実験① 分解酵素アミラーゼ

こうじ菌が発酵の過程で生産する分解酵素アミラーゼが、その原料を分解し、甘みをもたらすと同時に、みその種類は酵素活性に影響されることを理解させる。

1. ねらい

こうじ菌が発酵過程で生産する酵素アミラーゼを経時ごとに抽出し、酵素アミラーゼの活性が最も高い発酵日数を調査し、酵素活性とみその種類をわからせる。

2. 学習目標

- ① こうじ菌が酵素アミラーゼを生産することがわかる。
- ② 酵素活性が経時的に変化することがわかる。
- ③ 酵素活性が製造するみその種類ことがわかる。

3. こうじ液(酵素液)の抽出

- ① 経時的(日ごと)に採取した米こうじを10～5g計量。
- ② 10倍の希釈液になるように蒸留水を調整し、10分間程度混ぜ合わせる (図12、13、14)。

図12

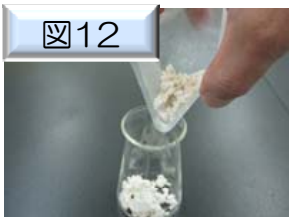


図13

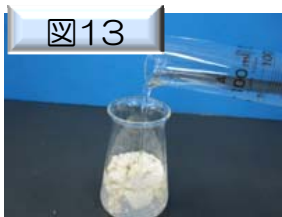


図14



- ③ 濾紙で濾過を行い、酵素液とする(図15、16、17)。

図15

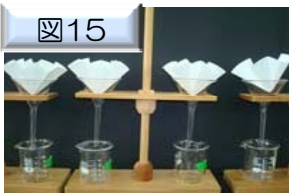


図16



図17



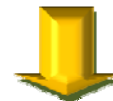
※ 米こうじ液から抽出した液を酵素液として使用する。

4. 実験方法

- ① 日ごとに抽出したこうじ液を分解酵素とし、日ごとに採取したサンプルを実験区として設定する(図18)。



- ② 10%デンプン水溶液にヨウ素液を2～3滴加え、デンプン溶液を反応させ、ヨウ素デンプン反応液とする。(図19)。



- ③ ヨウ素デンプン反応液に酵素液を加え色調の変化を見る。色調の変化でこうじ菌が酵素アミラーゼを生産することをわからすと同時に、アミラーゼの基質を理解させる。(図20)。



- ④ 結果を基に、分解酵素アミラーゼ活性が最も高くなる発酵日数を調査すると同時に、アミラーゼ活性の違いで製造されるみその種類を考察させる。(図21)。

図18

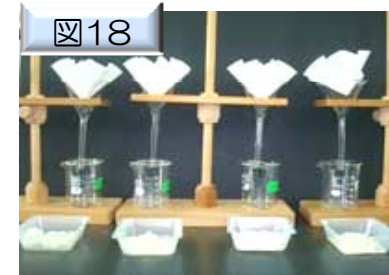


図19

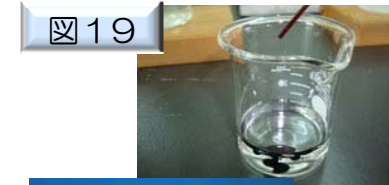


図20



図21



Ⅲ. 実験内容

酵素実験② 分解酵素プロテアーゼ実験

こうじ菌が発酵の過程で生産する分解酵素プロテアーゼがみその原料を分解し、うま味をもたらすと同時に、みその種類は酵素活性に影響されることを理解させる。

1. ねらい

こうじ菌が発酵過程で生産する酵素プロテアーゼを経時ごとに抽出し、酵素プロテアーゼの活性が最も高い発酵日数を調査し、酵素活性とみその種類をわからせる。

2. 学習目標

- ①こうじ菌が酵素プロテアーゼを生産することがわかる。
- ②酵素活性が経時的に変化することがわかる。
- ③酵素活性が製造するみその種類ことがわかる。

3. こうじ液(酵素液)の抽出

- ①酵素実験① 分解酵素アミラーゼ実験と同様に行う

4. 試薬の調整

- ①0.1%ニンヒドリン溶液の作り方

試薬：ニンヒドリン 1g (図1)
蒸留水 100ml (図2)

上記の試薬を混合・溶解し、0.1%ニンヒドリン溶液とする。



※ ニンヒドリン溶液はアミノ酸に反応を示す。

5. 実験方法

- ①日ごとに抽出したこうじ液を分解酵素とし、サンプルを採取した日ごとに実験区を設定する (図3)。



- ②2%卵白水溶液を10ml、実験区の酵素液1mlを試験管に加えよく撹拌する(図4)。



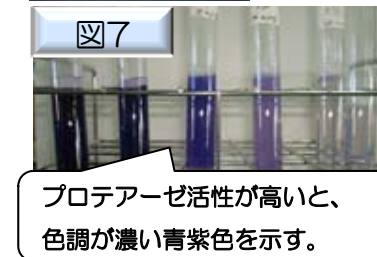
- ③②に、0.1%ニンヒドリン溶液を1ml加え、よく撹拌する(図5)。



- ④試験管ばさみで安全を確認し、ガスバーナーで加熱する。沸騰し始めたら、火から下ろす。次第に色が青紫に変色する(図6)。色調が濃いほど、タンパク質がアミノ酸に分解されたことになり、プロテアーゼ活性が高いことを示す。実験結果によって酵素液の量を変更することが望ましい



- ④各実験区を④同様に行い、色調の変化を調査・観察・記録する(図8)。アミラーゼ活性の違いで製造されるみその種類を考察をさせる。



プロテアーゼ活性が高いと、色調が濃い青紫色を示す。