

(348) (好井, 中野) 味噌の微生物に関する研究 (第1報)

酵中, 糸状菌, 果汁の存在に於てメタノールが生じるのは, 酵母の作用は関係がないことが明らかになった。

終りに本実験を御指導下さった友田師, 基礎実験を行つた田中滋, 西尾偵氏並びに菌種の世話をして下さった諸兄に深謝致します。

文 献

- 1) 2) 著者他: 工化, 57, 585~7 (1954). 3) 日本工業規格: K8101 (1951). 4) 古市誠, 岡本辰夫: 農化, 28, 703~7 (1954). 5) H. LINEWEARER 他: Arch. Biochem., 6, 373 (1945). 6) Z. I. KERTESZ: J. Biol., Chem., 121, 589 (1937). (昭和 31, 3, 31 受理)

味噌の微生物に関する研究 (第1報) 仕込後の Microflora の動態

好井久雄・中野政弘 (農林省食糧研究所)

緒 言

味噌の微生物, 就中味噌から分離される細菌, 酵母については, 西村氏¹⁾, 松本氏^{2)~5)}, 茂木氏^{6)~7)}, 深井氏⁸⁾等によつて既に幾多の研究が行われ, 又実際の醸造において微生物の添加, 応用を計ろうとする試みも, 松本氏等^{9)~10)}によつて行われている。

著者は, 味噌醸造中の各種微生物の消長, 増殖, 即ち Microflora の動態を調査し, 之と成分変化, 味噌の品質との関連性, 或は各微生物の酵素作用や, 味噌醸造においてになう役割の解明を目的として, 一連の研究を進めているが, 今回は仕込後の Microflora の動態について報告する。

実 験 の 部

I. 実験方法

(1.) 微生物の分離方法

仕込桶の各部位 (周辺, 中央の上, 中, 下の部分) から, 味噌試料採取用器具¹¹⁾を用いて, 約100gの味噌を採取する。

その10gを殺菌した150 ml 容の共栓付稀釈瓶¹²⁾中に秤量し, 殺菌食塩水 (NaCl 濃度は0.85%) を加えて, 全容を100 ml とし, 約3分間手にてよく振盪して試料の微生物を食塩水中に均一に懸垂させる。

これより, 殺菌した1 ml 容ピペット, 及び食塩水を用いて10倍, 100倍稀釈を行う Dilution plate 法を採用した。

1つの稀釈段階について, 4~5枚のシャーレに plate 法を行い, 集落発生数が30~200 個位の範囲には入るシャーレを選んで, 集落数の算術平均をとり, 稀釈倍数を乗じて, 原試料1g中の viable cell 数を算出した。

(2.) Selective media

味噌の微生物は, その種類が多岐に亘り, 単一培地では菌の判別が煩雑となり, 且つ仕込後の相当期間は麹菌 (おそらく孢子) が圧倒的に多数生存して分離の障害となるので, 大西氏¹³⁾, 坂口氏¹⁴⁾ の報告を参考とし, Table 1 に示す如き Selective media を作製して, 酵母, 細菌, 乳酸菌を夫々異つた培地上に別々に分離する様

Table 1. Composition of the selective medium

Bacteria		<i>Lactobacteriaceae</i>		Yeasts	
Base components (per 1000 ml)					
Poly peptone	10 g	Poly peptone	10 g	「Miso-extracts」 200 g miso	
Yeast extract (powder)	4 //	Yeast extract (powder)	4 //	(products) + 400 ml H ₂ O,	
Glucose	3 //	Glucose	10 //	50~60°C 2 hr extract, filtrate,	
NaCl	10 //	NaCl	5 //	fillup to 1000 ml	
CaCO ₃	2 //	CaCO ₃	2 //	Glucose	40 g
Agar	20 //	or B. C. P.	trace	NaCl	40 //
pH	6.8~7.2	Na-thiogly.	1 //	pH	4.6
		Agar	20 //		
		pH	6.8~7.2		

Selective agents (final concentration)		
Eurocidin (in alkali solution) 3~6/10 ⁵	Eurocidin (〃) 3/10 ⁵	Na-propionate 1/500
Culture		
25~30°C, 7 days in aerobic condition	30°C, 7~10 days in anaerobic condition (20~30 mm, pyro- gallol-KOH added)	30°C, 10~14 days

に工夫した。

(3.) 味噌 Microflora の Grouping

味噌中の多岐に亘る微生物を Grouping (群分け) するに当つては、上記の Selective media を用い、更に菌の性状の違いから相互間の識別が比較的容易なものは集落数を数える際に行つた。この分離技法上採用した Grouping は、各微生物が味噌醸造中に果たすと考えられる役割を基準とした区分とも大体合致すると思われるので、一応現段階においてはこの区分を採用する。

1. 酵母—産膜酵母は別にする。2. 細菌総数—細菌用培地に普通培養 (好气的条件下) で発育するすべての細菌。3. *Bacillus* group—細菌総数中、集落の形状、検鏡で識別した *Bacillus subtilis* を主菌とする細菌。4. 乳酸菌—生酸性を認め、カタラーゼ (-) の集落、酸素要求が、Microaerophiles~Facultative anaerobes に属する事から、通常は減圧培養で分離された数を採るが、細菌用培地に普通培養で併発する場合もある。

I. 実験結果

(1.) 天然醸造中の Microflora の動態

「味噌A」丸大豆、米、強化味噌 (仕込明細、醸造中の管理等は既報⁵⁾の通り) (12月仕込、翌年9月迄天然醸造) 醸造中の細菌類の動態を Fig. 1-(A) に、酵母類の動態を Fig. 1-(B) に、又成分変化の分析値を Fig. 1-(C) に示す。

「味噌B」脱脂大豆、米、強化味噌 (「味噌A」と同一時期に仕込、醸造したもの⁵⁾) 醸造中の細菌類、酵母類の動態を夫々 Fig. 2-(A, B) に、又成分変化を Fig. 2-(C) に示す。

「味噌C」又、別の時期に仕込を行つた、丸大豆、米、Ca 強化味噌 (丸大豆180.4 kg, 外碎米100.0 kg, 食塩78.9 kg, CaCO₃ 2.7 kg, 仕込総量540.6 kg) (10月仕込、翌年6月迄天然醸造) 及び、

「味噌D」脱脂大豆、麦、Ca 強化味噌 (脱大102 kg, 丸麦60.7 kg, 押麦20.0 kg, 食塩52.0 kg, 種水2.0 kg, CaCO₃ 1.9 kg, 仕込、醸造期間は同一) 醸造中の Microflora の動態を Fig. 3, Fig. 4 に夫々示す。此の仕込では桶の容量が小さいので、試料の採取は桶の中央部の上、下の2箇所のみ限定した。

此等4つの味噌について経時的に調査した結果から、天然醸造中の Microflora の動態を、各 Group の微生物について概説すれば次の如くである。

(1) 酵母は、醸造中漸次増殖を示し、醸造末期においては、何れも一定数 (10⁵ の桁) に達したが、増殖は温度 (即ち気温) に支配される。又、温度が適当になつても、桶の部位によつて増殖の遅速がみられ、特に桶の周辺部、或は上部程速かであるが、これは桶の部位によつて酸素供給 (味噌が空気にふれる度合) の差がある為と思われる。

(2) 産膜酵母も気温の上昇と共に、多少の増加がみられるが、著しい増殖は桶の表面に稀に起るだけであつて、桶内部の増殖はごく僅かである。

(3) 細菌総数は醸造全期間を通じて、殆んど増減はみられない。仕込直後の時期に、多少の減少があるが、これは仕込時に既に味噌中に含有される細菌類の一部が、味噌という環境に適応出来ず (おそらく耐塩性が弱い等の性質が原因となつて)、衰弱、死滅する為と考えられる。(仕込時の Microflora については、別の報告で詳述する予定である) 此の一部細菌の減少が行われて、味噌という環境における一応の安定がみられた後は、総細菌数は一定の数が分離され、酵母の如く気温が上昇しても、増殖はみられない。又、桶の部位による菌数の差はなく、何れの部分からも近似した数が分離された。

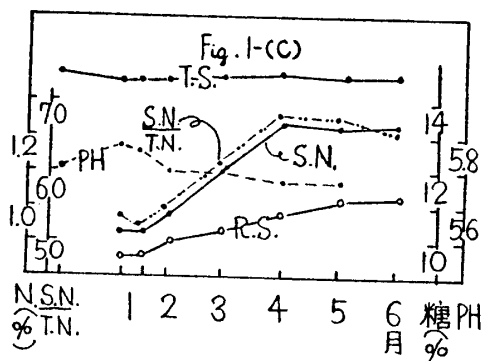
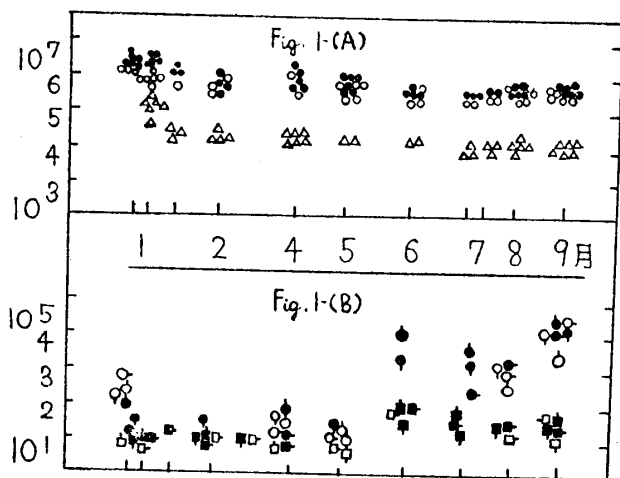


Fig. 1-(A, B) The change of microflora in miso-brewing (miso-A)

Fig. 1-(C) The change of components in miso-brewing (miso-A)¹⁵⁾

● Total bacteria, ○ *Bacillus* group, △ *Lactobacteriaceae*, Yeast: ● upper central part in brewing-tank, ● middle central //, ● lower central //, ○ upper side //, ○ middle side //, ○ lower side //, Film yeast: ■ upper central //, ■ middle central //, ■ lower central //, □ upper side //, □ middle side //, □ lower side //, (viable cellnumber in 1g miso sample)
 T. S. (total sugar %), R. S. (reducing sugar %), S.N. (soluble N%), S.N./T.N. (protein solubility %)

(4) *Bacillus* group の細菌は、醸造全期間を通じ、殆んど増減はなく、桶のどの部分からも一定数が分離される。*Bacillus* group の細菌はすべての味噌に普遍的に分布され、且つ味噌の総細菌中で数においても主要部分をしめる場合が多いので、上記の総細菌数が醸造期間中一定数を示す素因となる訳である。

(5) 乳酸菌の醸造中の動態は、細菌総数のそれと類似している。即ち、仕込直後の時期に相当量の減

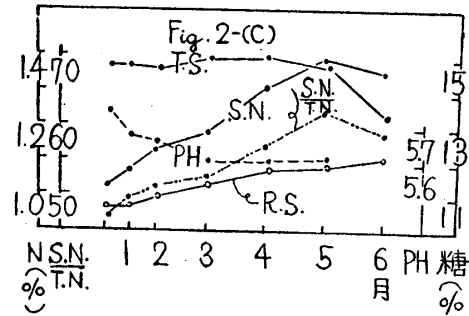
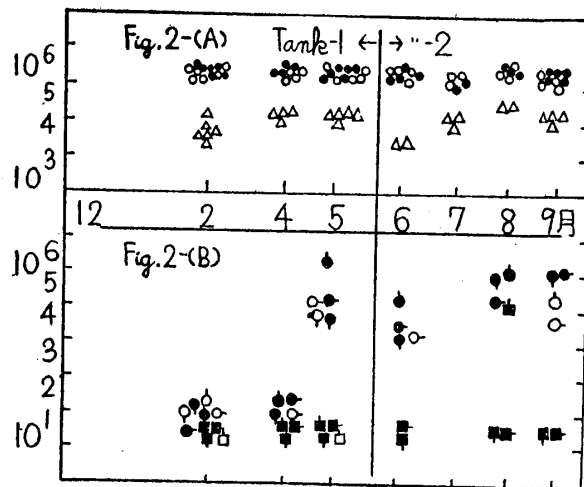


Fig. 2-(A, B) The change of microflora in miso-brewing (miso-B)

Fig. 2-(C) The change of components in miso-brewing (miso B)¹⁵⁾

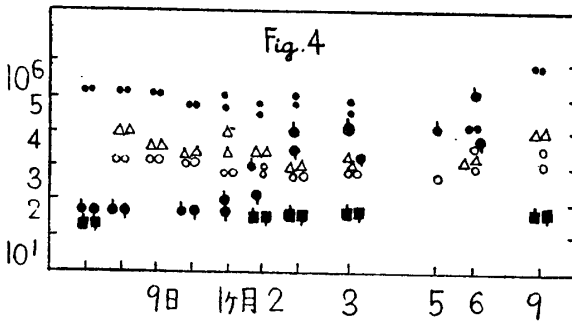
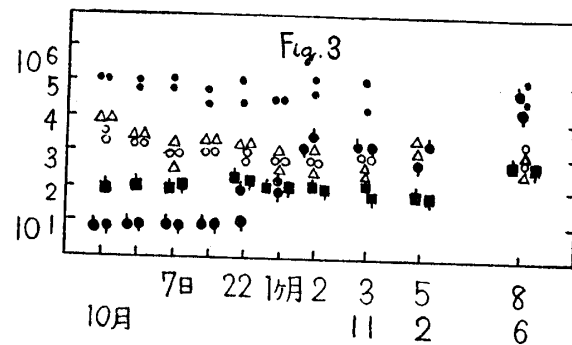


Fig. 3. The change of microflora in miso-brewing (miso-C)

Fig. 4. The change of microflora in miso-brewing (miso-D)

少があるが、以後はさして増減がなく、一定数が分離される。桶の部位による菌数の差違もない。

(6) かび類(麹菌孢子の生存期間)の動態については、使用した Selective media においては、かび類の生育を選択的に阻止してあるので、別に麹汁寒天培地を用いて分離を行った結果によれば、醸造末期(例えば、「味噌A、及びB」においては翌年の7月)において、少数の麹菌は尚生存する事から、麹菌菌子は仕込後相当長期間生存すると推定される。

(2.) 味噌温醸中の Microflora の動態

前記の「味噌A、及びB」(12月仕込)の中、75kgを採り、4斗樽に詰めて、1月中旬から約1ヶ月間温醸を行った際の Microflora の動態、及び成分変化の分析結果を Fig. 5-(A~C), Fig. 6-(A, B) に夫々示す。(「味噌B」の成分変化は「味噌A」のそれと類似したものであつたから、特に掲載しない。)

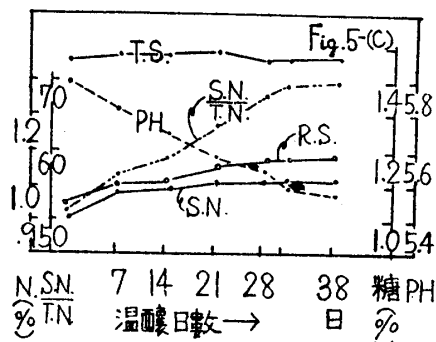
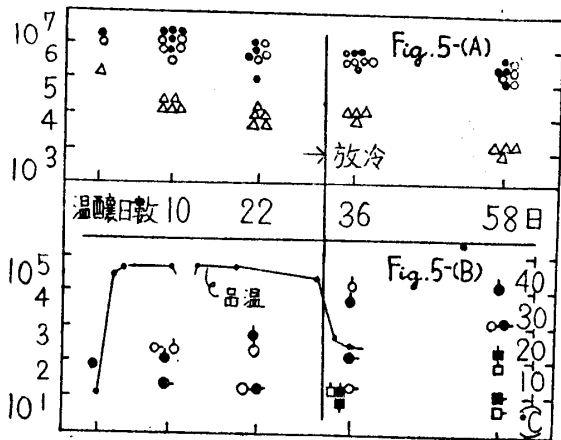


Fig. 5-(A, B) The change of microflora in miso-brewing (miso-A, warmed conditions)

Fig. 5-(C) The change of components in miso-brewing (miso-A, warmed conditions)

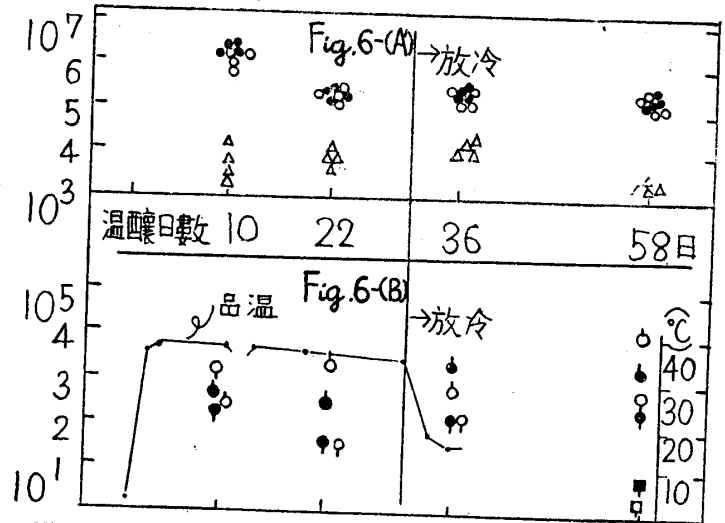


Fig. 6-(A, B) The change of microflora in miso-brewing (miso-B, warmed conditions)

温醸中の Microflora の動態は、各 Group の微生物について、何れも天然醸造と類似した傾向をとる事を見出した。即ち、醸造中増殖を示すのは酵母に限られ、細菌類、乳酸菌は殆んど増減がなく、一定数が分離される。(天然醸造でみられた仕込直後の一部の微生物の減少は、仕込後40日を経た中途から温醸を始めたので、明らかでない。)但し、酵母の増殖は、品温が35°C以上の温度経過を採つたので、温醸中は微弱であつて、放冷後の後熟期間とも称すべき時期になつて急激に行われている事が分る。

考 察

(1) 以上の Microflora の調査は、何れも当研究所において試醸を行った味噌について行ったものであつて、醸造場が異なり、或は味噌の原料配合割合や、仕込後の管理が違つた場合についても、一般妥当性があるや否やについては、尚検討の余地があるであろう。特に温醸味噌については、その規模が小さい事と、採用した温度経過は温醸の一型式を示したに過ぎない事を考慮すべきである。

(2) Microflora の変動があれば、当然そこには対応する成分変化がみられる筈であるが、本調査で得られた各 Group の変動と、一般分析結果に表わされる成分変化との間に、直接的な関連性を見出す迄には至らなかつた。一例をあげれば、最も変動の著しかつた(増殖を示した)酵母と、酵母の増殖があれば、当然消費、減少があると予想される糖分との間にも直接的な関係を、必ずしも常時見出す事は困難である。

又、味噌細菌中の主要部分をしめる *Bacillus* group が味噌醸造過程において、いかなる役割を果すかについ

(352) (好井, 中野) 味噌の微生物に関する研究 (第1報)

ては、此等細菌の酵素作用についての解明をまたなくては、結論を下す事が出来ないと思う。

更に、乳酸菌については、醸造期間中増減は殆どなく、一定数が分離される事を見出したが、味噌の香味に大きな役割をになうと考えられる有機酸(主として乳酸)生成の面から、その活動、生理に更に解析を加える必要がある。

(3) 味噌の Microflora は多岐に亘り、その作用の場である味噌の環境(物理化学性、膠質性)は又複雑である。したがって採用した Selective media による plate 法の生菌数だけから、Microflora を論じる事は、他に存在するかも知れぬ重要なものを見落している危険がある。plate 法以外の何らかの方法を併用し、総合的に判断して、Microflora を論ずる必要もあるであろう。

総 括

(1) Selective media を用い、味噌の仕込後熟成に到る迄の Microflora の動態を Dilution plate 法によつて経時的に調査した。

(2) 天然醸造、温醸両者において、Microflora の動態は類似した型式をとり、差違はみられなかつた。

(3) 味噌醸造中、酵母は漸次増殖を示すが、その増殖度は温度に規整され、又桶の部位によつて差違を生ずる。

(4) 細菌総数は、仕込直後の時期に多少減少があるが、その後は殆んど増減がみられず、桶のどの部位からも近似した一定数が分離される。

(5) *Bacillus* group は、醸造全期間を通じて、殆んど増減はなく、味噌細菌の主要部分をしめる。

(6) 乳酸菌は、仕込直後の時期に、相当数の減少があるが、以後は大體一定数が分離される。

(7) したがって、味噌醸造中の Microflora、特に細菌類、乳酸菌については、仕込時の構成が、大きな意義を有することを見出した。

(8) 麹菌(孢子)の味噌中における仕込後の生存期間は、かなり長期に亘る。

(9) 各 Group 菌の分類、生理については、機会を改めて報告する予定である。

終りに臨み、本実験に対して御懇切なる御指導を賜わつた尾崎所長に深謝する。(尚本稿は昭30年秋の大阪醸造学会大会において発表した。)

文 献

- 1) 西村: 農学会報, 106, 107, 108, 115, 116, 内国税彙纂, 47 (明43), 50, 53 (明44). 2) 松本: 醸試報, 119, 71 (昭9). 3) 松本, 小松: Ibid., 128, 109 (昭14). 4) 松本, 成瀬: Ibid., 129, 93 (昭15). 5) 松本, 中川: 醸協, 50, 58, 175 (昭30). 6) 茂木: 農化, 10, 983 (昭9), 12, 367 (昭11), 14, 951, 1175, 1297 (昭13), 15, 921, 1023, 1221 (昭14), 16, 7 (昭15), 18, 543, 733, 940 (昭17). 7) 茂木, 中島: 本誌, 20, 107, 159, 259, 749 (昭17). 8) 深井, 稻森: 醸試報, 129, 139 (昭15). 9) 松本, et al.: Ibid., 119, 369 (昭9), 128, 381, 389, 397 (昭14). 10) 松本, et al.: 醸協, 50, 231, 363 (昭30). 11) 稻森: 紫西会誌, 14, 1 (昭29). 12) 厚生省: 食品衛生検査指針, Ⅱ (1950). 13) 大西: 農化, 28, 134 (昭29). 14) 坂口: Ibid., 23, 758 (昭29). 15) 海老根, et al.: 食研報, 10, 133 (昭30). (昭和31, 4, 11 受理)