

(566)

(松山) 種麴菌製造と細菌の問題

種麴菌製造と細菌の問題

樋口松之助商店研究室 松 山 正 宣

(I) 緒 言

我国における種麴の製造は独得のものであるが、いはば原始的工業で製造に当つて幾多の問題がある。種麴製造方法の概略は已に述べた¹⁾ので省略するが、最も重要な問題は菌株の保存と選択で、次に混在する細菌類の駆除及びその是非ではないかと考える。

前2者は夫々の分野で今日迄多くの報告²⁾があり、我々もそれ等を理解し応用する段階に進みつつあるが、種麴中の細菌についての報告³⁾は極めて少い。

今回はこのシンポジウムの趣旨と少し離れているおそれがあるが種麴中の細菌並びにその抑制について少しく検討した結果について諸賢の御批判と御討議を得れば幸と存じます。

種麴菌の工業的製造方法は麴蓋を用い、蒸米放冷後約100時間の培養、20~30時間の乾燥に至る間、空中

菌芽の侵害を受けることは当然である。

醸酵工業の内、酒精製造の場合は細菌群の必要はないが、清酒醸造⁴⁾、味噌⁵⁾、醤油⁶⁾の醸造には細菌群の働が相当関与しているものゝ、無制限に混在する種麴中の細菌は一考を要する問題と考える。

本研究は以上の事から一応種麴菌中の細菌を調査し、この抑制方法を検討するため行つたが、今日迄の実験の結果抗菌性物質の応用により細菌の少い種麴の製造方法の可能性も考えられたので、ここに報告すると共に御討議を得れば幸と存じます。

(II) 実 験

(1) 種麴菌中の細菌数について

種麴菌中の細菌の分離は好井氏⁷⁾の方法に従つた。唯分離培養基は緒方氏⁸⁾等による Kabicidin 添加細菌分離培養基を用いた。

第1表 種麴菌中の細菌数(1g中)

No.	品 名	好気性細菌 (万)	嫌気性細菌*2 (万)	麴菌芽胞子 (万)	芽胞子生存率 (%)	芽胞子生存数 (万)	細菌数 (%) 麴菌芽胞子
1	清酒用*1	16~23	—	—	—	—	—
2	〃	12~17	—	—	71.0	—	—
3	〃	5~7	3	—	72.1	—	—
4	〃	64~75	11~14	11560	63.3	7317	1.16
5	〃	2.7~5.2	1.7	6440	61.3	3947	0.13
6	味噌用*3	20~21	14	—	72.2	—	—
7	〃	51~55	9	15640	72.0	11260	0.56
8	〃	37~43	5~8	6520	88.3	5757	0.87
9	〃	9.2	1	5280	61.7	3258	0.28
10	〃	1.8~2.4	0.35	7280	65.0	4734	0.05
11	味噌用	6.5~7.2	—	6400	63.0	4032	0.18
12	焼酎用(黄)	4~7	2	10720	90.8	9733	0.07
13	〃(黒)	1.1~12	—	—	—	—	—
14	醤油用	54~60	26	23040	85.0	19584	0.5
15	溜 用	16~20	12	10320	84.0	8668	0.23
最大~最小		75~1.1	26~0.35	6400~23040	61.3~90.8	3258~19584	1.16~0.05
平均		22.6	8.2	10320	73.0	7829	0.403

* 1. 清酒用は総て昭和30末~31始のもの、31. 7. 試験

* 2. ピロガロール、脱気法によつたが完全な嫌気状態でなかつた。

* 3. No. 6, 7は粉末製品、他は総て粒子(米)一部麦、及び脱脂大豆、麦、穀混合(No. 14)もあり。

即ち種麴菌 1g を可及的無菌下に 100 cc の滅菌生理食塩水に移し、振盪分散せしめた後之を適宜稀釈し、前記細菌分離培養基約 10cc を用いて平板培養し、35°C に 4~6 日間培養し発生 Colonie を計数、嫌気培養は初め KOH ピロガロール、脱気法を用いたが、後 ROSENTHALE 法によつた。

其の結果の一部を第 1 表に示した。

即ち第 1 表に示す如く市販種麴菌 1g 中には 1.8 万~75 万の細菌が存在し、麴菌の生存芽胞子数と対比するに 0.05~1.16% の数字が示される。

今此の中の 1 つの種麴菌を用いて米麴を作る時種麴中の細菌数はどの様な数を示すかを試験してみた。

(2) 米麴製麴中の細菌の動勢

使用した種麴は第 1 表 No. 9 で、米は約 2 割搗精、種麴使用量は石当り換算 80 匁である。経過は第 2 表に示す如く普通と高温の両経過をとつてみた。

第 2 表に見る如く相当著しい細菌の増加が認められ、種麴中の細菌の影響の大きいことも考え得るものである。

(3) 種麴中の細菌の抑制

第 2 表 製麴中における細菌の動勢

操 作	品温 °C	経過 時間 Hr	室温 °C	細菌数 万/g	菌株 No. 39	菌株 No. 40~41	未* 確認	品温	経過 時間	室温	細菌数 万/g
引 込	36		27					36		26	
床 揉	32		〃	0.28~0.3	0%	25%	75%	33			0.1~0.31
切 返	33	22	26								
切 返 後	31		28								
盛	36	27	31.5	2~3.02	9	20	71	37	22.5	27	5.04~12.6~20.3
盛 後	35		31.5					34			
仲	41	29	32	6.37~7.5	0	19	81	37	29.5	28	1.87~1.55~1.83
仲 後	38		29.5					35			
仕 舞	43	32.5	31	3.8~4.8	5.5	19	75.5	40	33.5	28.5	0.8~1.35~2.16
仕 舞 後	41		30					37.5			
最 高	46	35.5	30	4.5~5.2	0.3	17	82.7	43	36	29.5	0.52~0.8~0.85
出 麴	43.5	46	28.5	4.2~4.9	0	20	80	40	47	28	1.07~1.4~1.9

* 未確認は寒天内の白斑状 Colonie で 2~3 種あるものゝ様であるが、確認しなかつたもの。

第 3 表 細菌の性状

菌株 No.	形 状	大 小 μ	グラム 染色	リトマス 牛乳 培 養	中 性 ブイ ヨ ン 培 養			麴汁*1 寒天の 発 育	*2 培 養 所 見
					皮 膜	濁 濁	沈 渣		
1	短 桿	0.9~1.2×2~3	+	微 酸 性	+++	+	+	+	K, 汚白色, 光沢, 拡張型. 平滑
5	〃	〃	+	変 化 な し	-	+++	+	+	K, 鮮橙黄色, 光沢平滑拡張型
6	球	1~1.5~2	+	〃	-	+++	+	-	B, 淡黄白色, 無光沢, チリメン状, 線状
7	短 桿	〃	-	〃	-	-	+++	+	K, 淡赤褐, 光沢チリメン状, 拡張型
15	球	1~1.5~2	+	〃	+++	-	+	+	K, 褐黄色, 光色, 平滑, 拡張型
22	短 桿	〃	-	酸 性	+++	+	(+)	+	K, 淡黄白色, 半透明, 光沢, 小刺毛状
25	〃	1.9×2.8	-	変 化 な し	-	+++	+	(±)	B, 白色, 半透明, 光沢, 平滑, 拡張型
26	〃	1.9×3	-	〃	-	-	+++	〃	B, 汚白色, 光沢, 平滑. 小刺毛状
32	球	〃	+	微 酸 性	+++	±	+	+	K, 淡黄白色, 線状, 無光沢, 平滑
36	短桿連	1.7~2.5×2.3~4.7	-	変 化 な し	+++	-	+	+	K, 淡黄白色, 光沢, やゝ拡張型

*1, 麴汁 5%Bg に 1% ペプトン入 *2, K は ペプトン 麴汁, B は ブイヨン 寒天 斜面

以上に示した如く市販種麴菌中の細菌は最大~最小の巾が極めて広く、これは第 1 に空中菌芽の Contamination によるものが主であると推察されるが、全

面的に種麴菌中の細菌を消滅する事の是非は別として或る程度抑制する事も一応研究すべき事柄と考えられる。

工業的に種麴菌を製造するに当り、細菌群の発育を抑制するには抗菌性物質の応用が考えられる。

抗菌性物質としては麴菌即ちカビ類に作用せず細菌を抑制するものとして Aureomycin, Choloramphenicol, Dextromycin, Streptomycin, Terramycin 等が考えられる。

著者は Aureomycin 並びに Dextromycin を用い、種麴菌中より分離した細菌を用いて抵抗試験を行った。

前述の如くして種麴菌中より分離した細菌菌株中より10株を用い中性フイヨン液10cc入試験管に夫々 Aureomycin, Dextromycin, を添加して抵抗試験を行

つた。

供試細菌の性状の概略は第3表に示し、抵抗試験は第4表に示した。

第4表に示す如く大体抗菌性物質 $\frac{1}{10}$ 万で細菌の発育を抑制するので次に種麴菌製造に応用してみた。

(4) 種麴菌製造における抗菌性物質の応用

約2分搗精米を常法に依り蒸餾後、木灰を吸着せしめ、特に長時間放冷して空中菌芽の侵入を招き麴菌原菌株を接種して均一に混合せるもの50g 宛を5寸シャーレーに入れ、之に Aureomycin 溶液(1 mg/cc)を加えて出来る丈け均一に混合し、約30°Cに100時間培養した。

第4表 種麴菌中の細菌の抗菌性物質による抵抗性

菌株 No.	Aureomycin						Dextromycin					
	1/万	5/10万	1/10万	5/100万	2/100万	0	1/万	5/10万	1/10万	5/100万	2/100万	0
1	—	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
5	—	—	—	卅	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
6	—	—	—	卅	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
7	—	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
15	—	—	—	+	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
22	—	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
25	—	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
26	—	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
32	—	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅
36	—	—	—	—	卅	卅	—	—	—	卅	卅	卅

(註) 培養35°C 4日培養所見

第5表 種麴菌製造における Aureomycin 添加の影響

No.	Aureomycin 量	細菌数万/g	麴菌芽胞子数万/g	細菌数/芽胞子数%
1	0	15~22	7224~8800	0.25
2	1/10万	2.5~3.3	7584~10792	0.03
3	2/10万	0.5~0.66	8208~10184	0.006
4	4/10万	1~1.05	8128~9152	0.01
5	1/万	1.05~1.1	6512~10064	0.01

出発時原料中の細菌は3.8~5.1~5.3万であつた。実験結果は第5表に示す通りである。

この結果 Aureomycin 無添加は Start の4倍に増殖し、 $\frac{1}{10}$ 万添加では30~40%の減少を示した。 $\frac{2}{10}$ 万以上は大した相異認めず Start より80%程度の減少をみた(写真参照)。

麴菌芽胞子に対する細菌数の比を、種麴菌の純粋度と仮定すると、Aureomycin 無添加は99.75%と云う事が出来、 $\frac{1}{10}$ 万添加では99.97%、 $\frac{2}{10}$ 万以上では

99.99%と云い得べく精度は著しく高くなる。

Aureomycin 添加区より発生した細菌は大体3種と思われ、特に抵抗性が強いわけではなく、第6表に示す如く今迄に得た株と似ており十分 Aureo. の接触を受けなかつたものであろう。

又一般に Aureo. 添加区の方が対照より麴菌芽胞子数は多い様である。この種麴菌を用いて製麴試験をするに今の処別に変つた点は認められない。

Dextromycin 添加の影響は第7表に示す通りである。

第6表 Aureomycin 添加種麴菌より分離せる細菌の Aureomycin 抵抗性

No.	菌 株	Aureomycin γ /cc	100 1/万	50 5/10万	10 1/10万	5 5/100万	2 2/100万	0
1	A. No. 1		—	—	(+)	+	+	+++
2	A. No. 2		—	—	(+)	+	+	+++
3	A. No. 3		—	—	+	+	+	+++
4	A. No. 4		—	—	+	+	+	+++
5	A. No. 5		—	—	++	+	+	++
6	No. 22		—	—	—	+	+++	+++
7	No. 25		—	—	+	+	+	+++

第7表 種麴菌製造における Dextromycin 添加の影響

No.	Dextromycin 量	細菌数万/g	麴菌芽胞子数万/g	細菌数/芽胞子数 %
1	0	80	8540	0.93
2	1/10万	9.6	8360	0.11
3	2/10万	7.4	9740	0.07
4	4/10万	6.2	9920	0.06
5	1/万	1.1	11000	0.01
6	1/千	0.13	9800	0.001
7	Dextro:Aureo=1:1 1/10万	12.4	8320	0.14
8	" " 2/10万	5.4	8200	0.06

(註) この細菌分離培地は自製肉エキス 1 L, 葡萄糖 20g, ペプトン, 10g, NaCl, 0.5g, KH_2PO_4 , 0.5g, Kabicidin 150mg (150 γ /cc) NaOHにて pH6.0 に調製, 寒天 2% のものを用いた。

(Ⅱ) 考 察

本実験は途中の段階であるが, 以上の結果から考察するに種麴菌中に存在する細菌群は種麴 1g 中約 1.8~75万を示し, 麴菌芽胞子数に対する細菌数比は 0.05~1.16% を示している。

この種麴中の細菌は主として大気中よりの Contamination と考えられ, 種麴培養中に数倍に増殖するものゝ如くである。

この種麴中の細菌の殆んどは培地である米粒中に存在するものゝ様で, 篩で種麴を篩い芽胞子丈けを利用し, 残渣の米粒を除くことにより其の純粋度は極めて高くなるものである。

一方種麴菌の性状を変えることなく細菌群を抑制出来得れば極めて好都合と考えられる。

実験の結果 Aureomycin 及び Dextromycin の両者についての結果から種麴原料に対し 3 $\times 10^6$ の使用で start のときの細菌数の 80% 程度の減少を示し, 対照区に比し頗る高い精度を示すものである。

今種麴菌を応用する醸造工業中, 清酒, 味噌, 醤油の如き細菌類の働くことの多い分野で, 種麴中に 3 $\times 10^6$

万の Aureomycin が製品中に全然破壊せずに残存するものとして, 40匁の種麴菌を 1 石の原料米に應用する時, $\times 1000$ に dilute され麴中には 3 億となり, 殆んど問題ではないと考えられる。

最近抗菌性物質の醸造工業への応用として清酒醸造⁹⁾の報告もあり, 種麴菌への応用につき種々御批判を得れば幸と思います。

(Ⅳ) 結 論

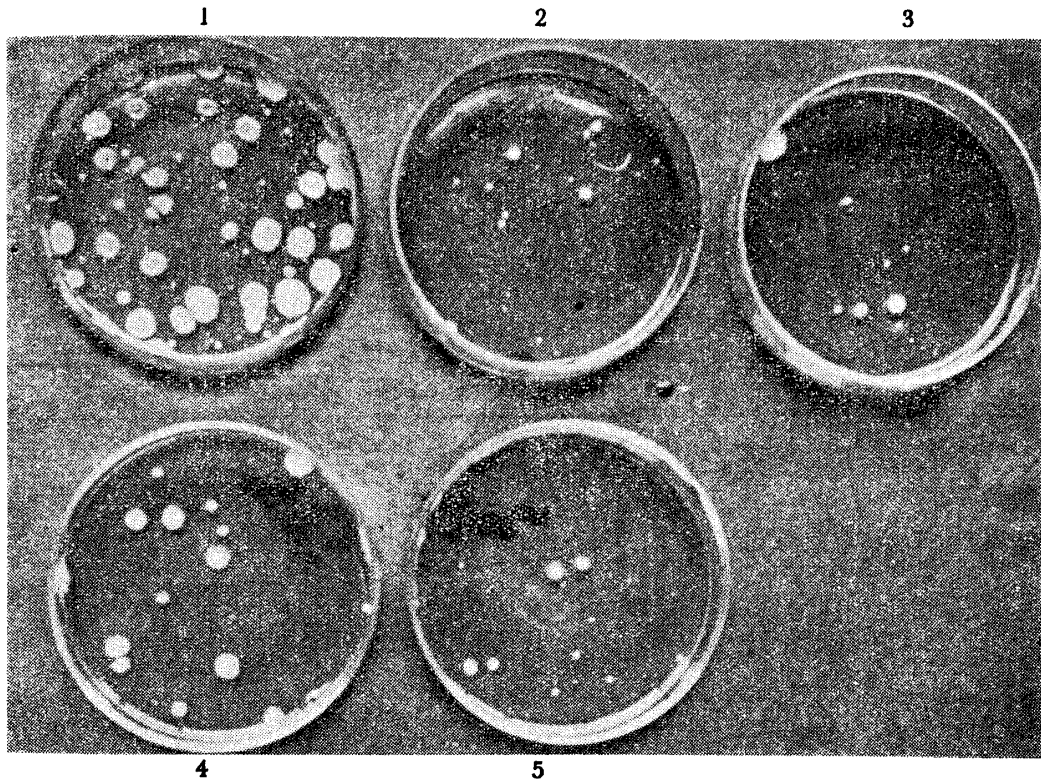
本実験は途上であるが次の如き結果を得た。

1. 種麴菌中には約 1.8~75万/g の細菌を含む。
2. この種麴を用い米麴を作るに出麴時には出発時の 10 数倍の細菌の増加をみた。
3. これ等の細菌は Aureomycin 1/10万 ~ 5/10万 で発育は阻害される。
4. 種麴には Aureomycin の 3 $\times 10^6$ 万で純度 (仮定) 99.99% のものを得た (一般には 99.95~98.84%, 平均 99.5%)。

終りに臨み終始御指導賜わつた京大, 高田教授, 阪大, 小田教授, 又貴重なる試料を賜わり種々御助言下さ

(570)

〔松山〕 麹菌製造と細菌の問題



Aureomycin 応用種麹中の細菌群

Aureomycin	0	15~18~22万/g	Start: 3.8~5.25万/g
1.	0	15~18~22万/g	Start: 3.8~5.25万/g
2.	1/10万	2.5~3.3	
3.	1/10万	0.5~0.66	
4.	1/10万	1~1.05	
5.	1/万	1.05~1.1	

つた武田醸造研究所長, 佐藤博士. 及び緒方浩一博士に深甚の謝意を表ると共に発表を許可された樋口社長, 及専務, に感謝致します.

文 献

1) 樋口楠, 樋口健: 醸造工業の展望, 219 (1952) 大阪醸造学会.
 2) RAPER K.B, ALEXANDER D.F.: Micol., 37, 499 (1945), HASKINS R.H., ANASTASIOU J.: ibid., 45, 523 (1953), 小田, 高田, 小川: 本誌, 32, 102, 145 (1954), 山県, 小田, 安藤: 本誌, 33, 369 (1955), 吉備: 日農化, 12, 885 (1936), 茂木, 井口, 大西: 応用菌学, 3, 105 (1950), 茂木, 中島, 井口等: 本誌, 29, 145, 302 (1951), 31, 199 (1953), 下田: 本誌,

26, 219 (1948), 蔭山, 杉田等: 本誌, 31, 498 (1954), 32, 65, 68 (1955),
 3) 好井: 味噌技術, No.10 (1954).
 4) 斎藤, 小田: 本誌, 13, 629 (1935), 小原: 醸協誌, 50, 226 (1955), 杉田, 国定, 蔭山: 本誌, 34, 138 (1956)
 5) 茂木, 井口, 坂口: 本誌, 34, 233 (1956), 好井, 中野: 本誌, 34, 348, 365 (1956).
 6) 松本: 醸試報, 99, 104, 109, (1928, 29, 30), 石丸: 日農化, 9, 859, 953, 1143 (1933).
 7) 緒方, 五十嵐, 中尾: 農化会, 昭和31 (於高松).
 8) 伊野本, 橋田, 山本: 本誌, 29, 204, (1951), 佐藤: 醸協誌, 14, 136 (1956).

討 論

松浦眞治 (農林省食糧研究所) 1. 種麹の孢子数が第1表によると大体1g中数千万個の単位となつていますが, もう少し多いのではないでしょうか. 私共の結

果では平均5億内外です.

2. 種麹中の細菌の功罪についての御意見は?

松山: 1. 御報告を拝見して大変多い数が出て居

り、私も自分の data が低いので疑問を持っています。一度詳細に検討したいと存じます。

2. 一番むづかしい私自身困っている点で、功もあれば、又罪の場合もあるものと思います各方面の将来の研究に待ちたい。

村井三郎 (KK 靴屋三左衛門老舗) 種麴生産に当り細菌の少なき製品は望ましいが、一方において同時に繁殖する雑糸状菌、酵母の繁殖防止に関しても相応な研究を併せて望む。これ等の繁殖が種麴菌の生産に及ぼす影響が却つて多大なものではないでしょうか。

松山: 種麴の純粹性の問題はなかなかむづかしく、その是非も分らない。御質問の様な糸状菌の Contamination も改良すべき研究課題と思う。

照井竟造 (阪大工. 醸酵) さきほどの御質問に関係した発言だが、Bacteria 数を抗生物質などで減少せしめる事よりも、一般的清潔さ、製造過程の改善などを行う方が本筋だと思ひますがあなたの見解は?

松山: 確かに御話の通りで、私の今の方法はあく迄一つの手段としてやつてみた丈けで、例えば Bacteria も培地である米粒に多いものの様であるが孢子丈けを篩つて用いる簡単なことだけで相当 Bacteria 数の減少を見ることと思われます。

芝崎勳 (阪大工. 醸酵) 種麴中の細菌数は 1.1~75 万/g ありますが、1.1 万/g という例もある訳ですから、実際の製造工程の管理によりこれ位の線迄抑えることが可能でしょう。

松山: 照井先生の御質問と同じと思ひますが、確かに製造管理は最大の Factor であり、又一方細菌の少い種麴菌と多い種麴菌の菌の性状等も検討してみたいと思つています。

好井久雄 (農林省食糧研究所) 1. Aureomycin 添加等によつて作つた細菌数の少い種麴と無添加の試料の間に各酵素力について差違はないか? 酵素的検討によつて、種麴中の細菌の意義 (有用, 有害) の手がかりが得られるものと思ひが如何?

2. 種麴製造行程を通じて、どの段階で細菌数の増大が多いか? 乾燥行程での空中からの混入が相当あると思われるか?

松山: 1. 特に細菌の多い種麴と可及的純粹の種麴菌で製麴して酵素的の検討を是非やつてみたいと思つています。

2. 当然乾燥行程でも入るが、培養中の細菌の増殖の方が大きいでしょう。

塚原寅次 (日本醸造協会) 種麴中の細菌は清酒醸造に有害か又は有効か

松山: 大変重要な問題ではありますが、全然今の処私には判らない。

井口信義 (野田. 産研) 醸造試験所の塚原さんの御質問に関連しますが、醤油の場合は仕込後の細菌の役割はかなり有用ではないかと存じます。このあたり現在検討中ですが例えば麴だけの無菌仕込を行つた結果は全然醤油らしくありません。この点から製造操作又は仕込時に混入する細菌の果す役割はかなり大きいと存じます。

成瀬晴久 (成瀬醸酵化学研究所) 麴室の管理に紫外線殺菌燈の使用の有無、天日乾燥、天日紫外線による細菌数増減の問題。

松山: 麴室に紫外線殺菌燈をつけることの是非は経験がないので判りません。天日乾燥の紫外線の点も疑問であります。種麴菌、細菌に作用する程波長の短いものが多い様でもないし、それとも熱作用に影響が有るか。空気中から侵入する細菌の影響等々考えられる因子が多いので簡単に割切れるとは思われません。

高田信男 (阪大工. 醸酵) 分離された Bacteria の同定は今後の問題だと思いますが、第 3 表に依ると枯草菌らしい株は掲げられてありませんが、種麴中に枯草菌は含まれていませんか。

松山: 実験に使つた細菌は任意に採用した丈けで菌の検索は行つていません。それよりも此実験は細菌をなくすることに専念したので…。御質問の問題は至急に検討する予定である。

杉田登 (竜野醤油協同組合試験場) 分離された細菌の高濃度 (18%) の食塩に対する抵抗性は如何ですか。

松山: 耐塩性の菌があるかどうか醤油、味噌に関し必要な条件ですが、今後検討して報告したいと思ひます。