

味噌・醤油及びその加工品の微生物に対する安全性評価に関する研究

林田安生*・松田茂樹*

* 微生物応用部

Growth suppression of micro-organisms isolated from Miso in Miso extract media which have different water activities

Yasuo HAYASHIDA* and Shigeki MATSUDA*

味噌から分離したバチルス属細菌、麹黴、及び耐塩性酵母について、味噌エキスをを用いて調製した水分活性などの異なる培地での生育試験を行った。バチルス属細菌が pH5.2 及び 6.2 の味噌エキスをを用いて調製した培地では水分活性 0.95 以上の条件で増殖するなど、味噌・醤油及びその加工品の微生物に対する安全性評価を行うための知見が得られた。

1. はじめに

麦味噌及び醤油は、熊本県の重要な産品であるが、その消費は消費者の生活スタイルや嗜好の変化によって全体的に漸減する傾向にある。このため、近年では、消費者に合わせた味噌・醤油加工品等の生産が盛んになっている。

味噌・醤油の微生物に対する安全性が高いことは、歴史的に証明されているが、その加工品については塩分やその他保存性に係る成分の濃度低下によって必ずしも微生物の生育を抑えきれない。また、微生物の生育を抑制する保存料等は添加物を嫌う近年の消費者志向に合わず、その添加は商品力を低下させてしまう。

人は食品の保存性を高めるために食塩や糖類、アルコールや有機酸といった物質を長い間活用してきた。このような歴史的に長い間使用されてきた物質群はたとえ食品添加物であっても、消費者に対し比較的悪いイメージを与えにくい。

そこで、食塩や糖類による水分活性の低下、アルコールや酢酸といった保存性を高める物質の添加によって、味噌加工品の耐微生物性がどのように変化するかに関する知見を得るために、味噌から分離した微生物の味噌エキスをを用いて調製した水分活性の異なる培地等での生育について検討したので報告する。

2. 方法

2.1 水分活性測定

試料 3g を専用の容器に入れ、水分活性測定装置 MS-1(Novasina, Switzerland) により、水分活性を測定した。

2.2 Bx 測定

液体試料については、そのまま、糖度計 PAL-1 または

PAL-2(株式会社アタゴ)により糖度を測定した。固体試料については、水希釈物のろ液の糖度を上記方法により測定した後、希釈率を乗じて糖度とした。

2.3 塩分測定

液体試料の場合はそのまま、または、塩分が 2w/v%以下の濃度になるように希釈し、塩分分析計 SAT-500(東亜デューケーター(株))により塩分を測定し、希釈した場合はその希釈率を乗じて、塩分とした。固体試料の場合は水希釈物のろ液の塩分を分析し、その希釈率を乗じて塩分とした。

2.4 培地

味噌からの細菌分離には普通寒天培地、酵母、黴の分離には、ポテトデキストロース培地、または、食塩添加 YPD 培地を用いた。食塩添加 YPD 培地は、酵母エキス 10g、ペプトン 20g、グルコース 20g、塩化ナトリウム 100g、寒天 15g を蒸留水 1L に加え、121℃で 15 分間滅菌した後試験に供した。

2.5 カタラーゼ試験

プレートに増殖したコロニーに 3%過酸化水素水を注ぎ、気泡の発生を観察した。

2.6 グラム染色試験

新鮮な菌体をプレパラート上に火炎固定し、10w/v%クリスタルバイオレットエタノール液による染色、水洗、0.3w/v%ヨウ素-0.6w/v%ヨウ化カリウム水溶液による媒染、水洗、エタノールによる脱色の後、1w/v%シュウ酸アンモニウム水溶液液で後染色し水洗乾燥させた。そして、乾燥させたプレパラート上の菌体を顕微鏡で観察した。

3. 結果

3.1 市販味噌からの微生物分離

任意に選んだ市販淡色米麦合わせ味噌1点を滅菌生理食塩水で希釈し普通寒天培地、ポテトデキストロース培

地、食塩添加 YPD 培地に塗布した。

普通寒天培地を 37℃ で 48 時間放置したところ、粘性のある不定形のコロニーが多数出現した。顕微鏡で観察したところ、細菌桿菌がみとめられた。この菌を同培地に分離し、37℃ で 7 日間培養し顕微鏡で観察したところ、芽胞が桿菌の中央部に形成された菌体が多く見られた。

この菌のカタラーゼ試験及びグラム染色試験を行ったところ、いずれも陽性であり、これらの結果から、この菌をバチルス属細菌と同定した。

ポテトデキストロース培地を 25℃ で 1 週間放置したところ、白色の黴のコロニーが多数みられた。形成された分生子は球形で逆フラスコ型の分生子柄といったアスペルギルス属の特徴を備えていた。これらのことから分離された黴はアスペルギルス属であり、熊本県で製造されている味噌の熟成期間が短いことから、麴の分生子が味噌においても不活化せずに残存しているものと思われた。

食塩添加 YPD 培地を 30℃ で 1 週間放置したところ、クリーム状の白色のコロニーが検出された。顕微鏡で観察すると酵母様のものが見られた。このことから検出された微生物は味噌の熟成中に増殖する耐塩性酵母と思われた。

同様の分離を複数の県産米味噌、麦味噌について実施したが、同様の微生物が分離できた。

3.2 味噌の成分組成

微生物分離に使用した味噌の水分、Bx、pH、及び塩分は、それぞれ、42.3w/w%、63.1°、5.4、11.2w/w%であった。また、その水分活性を測定したところ、0.75 であった。この味噌を等量の超純水とよく混合したものの pH は 5.6、水分活性は 0.93 であった。

3.3 味噌エキス及びそれを用いた培地の調製

微生物分離に使用した味噌 500g を 2l の超純水とよく混合し、5 分間煮沸した。冷水中で冷却し濾過して得られた清澄液 1L をロータリーエバポレーター(柴田科学(株))で 150mL まで濃縮し味噌エキスとした。味噌エキスの pH と水分活性は、それぞれ、4.2、0.75 であった。味噌エキスの色は調製中の加熱処理により暗赤色になった。

味噌エキス 25mL に 10N 水酸化ナトリウム水溶液を 0.2mL、または、0.3mL 加えると、pH は 5.2、6.2 になった。水分活性はいずれも 0.75 であった。pH5.2 の味噌エキスをそのまま、または、20、40、60、80v/v% になるように希釈した液体を、超純水、20w/v% グルコース水溶液、40w/v% グルコース水溶液と等容量で混合し 121℃ で 15 分間滅菌して培地を調製した。調製した培地の水分活性を表 1 に示す。これらの培地の pH の範囲は 5.4~5.7 で味噌エキスの含量が低下する程高くなった。また、添加したグルコースによる糖濃度変化の影響は受けなかった。

表1 味噌エキス(pH5.2)を用いた培地の水分活性

	超純水	グルコース水溶液	
		20w/v%	40w/v%
味噌エキス	0.93	0.91	0.89
80v/v%味噌エキス	0.94	0.92	0.91
60v/v%味噌エキス	0.95	0.94	0.92
40v/v%味噌エキス	0.97	0.95	0.93
20v/v%味噌エキス	0.99	0.97	0.95

pH5.2 の味噌エキスを 20~100v/v%含む水希釈物を調製し、超純水、20、40w/v%グルコース水溶液と等容量で混合した。そして、121℃で 15 分間滅菌し培地とした。

pH4.2 及び pH6.2 の味噌エキスを用いて培地を調製し、味噌エキスと超純水または 40w/v%グルコース水溶液を等容量混合した培地、及び 20v/v%味噌エキスと超純水または 40w/v%グルコース水溶液を等容量混合した培地について水分活性を測定したところ、pH5.2 の味噌エキスを用いて調製した培地の値と一致した。このことから、10N 水酸化ナトリウム添加が水分活性に与える影響は無視できると思われた。

pH4.2 の味噌エキスを用いて調製した培地の pH は 4.1~4.4、pH6.2 の味噌エキスを用いて調製した培地の pH は、6.2~6.6 であり、味噌エキスの含量が低下する程高くなった。また、添加したグルコースによる糖濃度の影響は受けなかった。

3.4 味噌エキス培地での微生物の生育試験

味噌エキス培地 2mL を入れたネジ付き試験管に、味噌から分離したバチルス属細菌、麴黴、耐塩性酵母を 1 白金耳植菌し、それぞれ 37℃、25℃、30℃ で 1 週間放置した。試験管は 1 日に 1 度よくミキシングすると共にキャップを緩めて微生物増殖により生じるガスによる内部圧の上昇を防いだ。

バチルス属細菌(結果表2)は、pH 5.2 及び pH 6.2 の味噌エキスを用いた培地では、水分活性 0.95 以上の培地で増殖した。pH 4.2 の味噌エキスを用いた培地では全ての培地で増殖できなかった。麴黴(表3)は、水分活性 0.92(pH6.2 の味噌エキス使用)、0.93 (pH5.2)、0.95 (pH4.2)以上で増殖した。酵母(表4)は、水分活性の高い培地で増殖が弱まるものの、全ての培地で増殖した。

試験は 2 回繰り返したが、同じ結果が得られた。

表2 バチルス属細菌の味噌エキス培地での生育

	超純水	グルコース水溶液	
		20w/v%	40w/v%
pH4.2			
味噌エキス	×	×	×
80v/v%味噌エキス	×	×	×

60v/v%味噌エキス	×	×	×	60v/v%味噌エキス	○	○	○
40v/v%味噌エキス	×	×	×	40v/v%味噌エキス	○	○	○
20v/v%味噌エキス	×	×	×	20v/v%味噌エキス	○	○	○
pH5.2				pH5.2			
味噌エキス	×	×	×	味噌エキス	○	△	△
80v/v%味噌エキス	×	×	×	80v/v%味噌エキス	○	○	△
60v/v%味噌エキス	×	×	×	60v/v%味噌エキス	○	○	○
40v/v%味噌エキス	○	×	×	40v/v%味噌エキス	○	○	○
20v/v%味噌エキス	○	○	○	20v/v%味噌エキス	○	○	○
pH6.2				pH6.2			
味噌エキス	×	×	×	味噌エキス	○	△	△
80v/v%味噌エキス	×	×	×	80v/v%味噌エキス	○	○	△
60v/v%味噌エキス	×	×	×	60v/v%味噌エキス	○	○	○
40v/v%味噌エキス	○	○	×	40v/v%味噌エキス	○	○	○
20v/v%味噌エキス	○	○	○	20v/v%味噌エキス	○	○	○

pH4.2, pH5.2, pH6.2 の味噌エキスを 20~100v/v%含む水希釈物を調製し、超純水、20,40w/v%グルコース水溶液と等容量で混合した。そして、121°Cで15分間滅菌し培地とした。これらの培地2mLに1白金耳の菌体を植菌し37°Cで7日間放置した。増殖:○、増殖弱い:△、非増殖:×

表2 注釈と同じ。但し培養温度は30°C

表3 麹黴の味噌エキス培地での生育

	超純水	グルコース水溶液	
		20w/v%	40w/v%
pH4.2			
味噌エキス	×	×	×
80v/v%味噌エキス	×	×	×
60v/v%味噌エキス	×	×	×
40v/v%味噌エキス	○	○	×
20v/v%味噌エキス	○	○	○
pH5.2			
味噌エキス	×	×	×
80v/v%味噌エキス	○	×	×
60v/v%味噌エキス	○	○	×
40v/v%味噌エキス	○	○	○
20v/v%味噌エキス	○	○	○
pH6.2			
味噌エキス	×	×	×
80v/v%味噌エキス	○	○	×
60v/v%味噌エキス	○	○	○
40v/v%味噌エキス	○	○	○
20v/v%味噌エキス	○	○	○

表2注釈と同じ。但し、培養温度は25°C。

表4 耐塩性酵母の味噌エキス培地での生育

	超純水	グルコース水溶液	
		20w/v%	40w/v%
pH4.2			
味噌エキス	△	△	△
80v/v%味噌エキス	△	△	△

3.5 エタノール、酢酸添加試験

pH5.2 の味噌エキスを 20~60v/v%含む水希釈液を調製し121°Cで15分間滅菌した。これに、0.22 μm フィルターで除菌した2, 4, 6, 8, 10v/v%のエタノール水溶液、または、0.1, 0.2, 0.3v/v%の酢酸水溶液を等容量混合して培地とした。

これらの培地2mLを入れたネジ付き試験管に、味噌から分離したバチルス属細菌、麹黴、耐塩性酵母を1白金耳植菌し、それぞれ37°C、25°C、30°Cで1週間放置した。試験管は1日に1度よくミキシングすると共にキャップを緩めて微生物増殖により生じるガスによる内部圧の上昇を防いだ。

エタノール添加試験(結果表5)において、バチルス属細菌及び麹黴は、味噌エキスの含量が高い程、低濃度のエタノールで増殖を阻止した。耐塩性酵母は、この実験条件では全ての培地で増殖した。

酢酸添加試験(結果表6)において、バチルス属細菌は試験した全ての培地で増殖しなかった。麹黴は60v/v%味噌エキスに0.3v/v%酢酸水溶液を等容量加えた培地以外で増殖可能であった。酵母は試験した全ての培地で増殖した。

試験は2回繰り返したが同じ結果が得られた。

表5 エタノール添加味噌エキス培地での微生物生育

	エタノール水溶液(v/v%)				
	2	4	6	8	10
バチルス属細菌					
60v/v%味噌エキス	×	×	×	×	×
40v/v%味噌エキス	○	×	×	×	×

20v/v%味噌エキス	○	○	○	○	×
麹黴					
60v/v%味噌エキス	△	△	△	×	×
40v/v%味噌エキス	○	△	△	△	×
20v/v%味噌エキス	○	○	○	△	△
耐塩性酵母					
60v/v%味噌エキス	○	○	○	○	○
40v/v%味噌エキス	○	○	○	○	○
20v/v%味噌エキス	○	○	○	○	○

pH5.2 の味噌エキスを 20~60v/v%含む水希釈物を調製し 121°C で滅菌した。これに、0.22 μm フィルターで除菌した 2~10v/v%エタノール水溶液を等容量で混合し培地とした。これらの培地 2mL に 1 白金耳の菌体を植菌しバチルス属細菌は 37°C で、麹黴は 25°C で、耐塩性酵母は 30°C で 7 日間放置した。増殖：○、増殖弱い：△、非増殖：×

表6 酢酸添加味噌エキス培地での微生物生育

	酢酸水溶液 (v/v%)		
	0.1	0.2	0.3
バチルス属細菌			
60v/v%味噌エキス	×	×	×
40v/v%味噌エキス	×	×	×
20v/v%味噌エキス	×	×	×
麹黴			
60v/v%味噌エキス	△	△	×
40v/v%味噌エキス	○	△	△
20v/v%味噌エキス	○	△	△
耐塩性酵母			
60v/v%味噌エキス	○	○	○
40v/v%味噌エキス	○	○	○
20v/v%味噌エキス	○	○	○

pH5.2 の味噌エキスを 20~60v/v%含む水希釈物を調製し 121°C で滅菌した。これに、0.22 μm フィルターで除菌した 0.1~0.3v/v%酢酸水溶液を等容量で混合し培地とした。これらの培地 2mL に 1 白金耳の菌体を植菌しバチルス属細菌は 37°C で、麹黴は 25°C で、耐塩性酵母は 30°C で 7 日間放置した。増殖：○、増殖弱い：△、非増殖：×

3.6 膨湧した醤油加工品からの乳酸菌分離と培養試験

技術相談の試料である膨湧した醤油加工品を顕微鏡で観察したところ、桿菌が多く見られた。また、その pH は正常品よりも低く酸味を感じた。このことから、膨湧の原因は乳酸桿菌の増殖によるものと考え、BCP 添加寒天培地を用いて乳酸菌の分離を試みた。BCP 添加寒天培地に希釈した試料を塗布したところ、酸産生の桿菌が分離できた。この菌をアスパラギン、グルタミン酸ナトリウム、メバロン酸、塩化マグネシウム添加味噌培地、生揚培地を用い、20°C から 37°C の温度で生育試験を試みたが、速やかに増殖する条件を見いだせなかったことから、この分離菌を用いた生育試験は行わなかった。

4. 考察

味噌から分離されたバチルス属細菌は、味噌に高濃度で含まれている。この菌は納豆菌の近縁種で芽胞菌であり、塩濃度が高く増殖できない味噌中では芽胞として残存しているが、味噌加工品においては塩濃度の低下により再増殖し問題を生じる可能性がある。ヒトが本菌が多く含まれる味噌を摂取したことによる危害は生じていないことから、この菌は安全性には問題はないと思われるが、この微生物の増殖が激しければ異臭の発生により商業的な問題は生じるとと思われる。

ポテトデキストロース培地や食塩添加 YPD 培地により分離された、麹黴及び耐塩性酵母も味噌の常在菌であり、ある種の菌については有用菌として味噌の製造に使用されている。よって、その安全性は歴史的に証明されているが、バチルス属細菌と同様に、加工品においては、黴の発生やエタノール発酵による炭酸ガスの生成といった現象によって商業的な問題を生じるとと思われる。

これらの微生物の醤油加工品での生育は中村ら^{1,2)}によって検討されている。本研究において、味噌とほぼ同じ pH の味噌エキス (pH5.2) を用いた培地でのバチルス属細菌及び麹黴の生育限界水分活性は、それぞれ、0.95 及び 0.93 であったが、これは、中村らが示したバチルス属細菌 *Bacillus subtilis* 及び麹黴 *Aspergillus oryzae* の生育限界水分活性 (0.95 及び 0.90) とほぼ一致する。また、中村らは、アルコール及び酢酸添加濃度についても検討しているが、水分活性が低くなると生育限界アルコール、酢酸濃度が低下する傾向があったと報告しており、このことも本報の結果と一致する。なお、中村らは、味噌醤油の主発酵酵母である耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の生育限界水分活性を 0.80 としている。

一般食品での *Bacillus subtilis* の生育限界水分活性 (0.95)³⁾ は、本研究の結果と一致するが、麹菌 *Aspergillus oryzae* の近縁種であり泡盛麹菌として知られている *Aspergillus niger* の生育限界水分活性 (0.89~0.88)³⁾ は本研究の結果より低い。また、*Zygosaccharomyces rouxii* の生育限界水分活性も 0.60~0.61³⁾ と中村らが示した値 (0.8) より低い。醤油加工品では文献が示す微生物の生育範囲よりはるかに生育に適した成分組成でも微生物の増殖が起こらないことが経験的に知られている。製法の類似から味噌加工品の成分組成は醤油加工品と似ていると思われる。よって、味噌加工品においても、一般的に報告されている微生物生育限界水分活性より高い値でも微生物増殖が生じないことが考えられる。これらのことから、味噌加工品の保存性は、一般的な値に加え本研究で得られた知見を考慮しながら検討すべきではないかと思われる。

る。

なお、膨湧した醤油加工品から分離した乳酸桿菌については速やかに増殖させる条件を見いだせなかった。このため、この菌の生育条件を本研究では明らかにできなかったため、今後も引き続き検討していきたい。

文 献

- 1) 中村成寿, 鈴木暁子, 小早川智子, 築山良一, 篠部恭三, 西山健治, 醤油関連調味料における微生物学的安全性評価法について, 日本醤油研究所雑誌, Vol.23, pp.1-9, 1997.
- 2) 中村成寿, 小早川智子, 篠部恭三, 醤油関連調味料における微生物学的安全性評価法について(第2報), 日本醤油研究所雑誌, Vol.27, pp.59-65, 2001.
- 3) 石井泰造 監修, 微生物制御実用辞典, フジ・テクノシステム, 東京都, p.73, 1993.