# 酢酸添加等による製麹中の芽胞菌増殖抑制

林田安生*
＊ 微生物応用部

## *Bacillus* species growth supression in KOJI making process by acetic acid addition

Yasuo HAYASHIDA*

麹中の芽胞菌数を低減するため、酢酸を混合した蒸煮米で製麹を行う製造方法を検討した。ビーカースケールの製麹試験で、酢酸を蒸煮米に添加した試験区は酢酸を添加しなかった試験区に比べて、一般生菌数が低くなった。製麹中、麹菌の生育に伴いグルコースが生成し細菌が増殖し易くなるが、その後の水分低下及びグルコース等の濃度上昇により水分活性が低下し細菌が増殖し難くなった。酢酸を蒸煮米に添加すると、製麹前期において、芽胞菌の増殖が容易な時間が短くなり、結果として麹中の一般生菌数が減少するのではないかと思われた。

## 1.　はじめに

味噌は日本を代表する発酵食品の１つである。その製造に麹菌や酵母、乳酸菌といった微生物が使用される。また、味噌から細菌などの多くの微生物が分離されている。そして、これらの微生物が味噌の風味形成に大きく寄与していることは古くからよく知られている。

*Bacillus* 属細菌は味噌から分離される主な細菌の１つである。この菌は、芽胞または栄養細胞として米や大豆等に付着して味噌製造工場に入る。この芽胞は加圧釜での処理など原料処理で完全に死滅することはない。また、気温が高い時期に増殖し易く、製麹中の麹の品温が下がりにくくなると、麹中で増殖した菌が高い濃度を保ったまま味噌に移行して芽胞を形成する。

熊本県では淡色系味噌が多く製造されている。このタイプの味噌の熟成期間は１～３ヶ月と短く、8 月や 12 月の繁忙期に商品を市場に提供するためには夏季にも製造しなければならない。この夏季に製造される味噌に *Bacillus* 属菌が高い濃度で含まれる場合がある。

味噌に主に含まれる *Bacillus* 属細菌は納豆菌と同じ属種の微生物であり安全であると思われる。そして、日本の食の歴史はこれを肯定している。しかし、近年、流通業者によっては、一般加工食品と同じ基準で味噌の品質基準を決めることもあり、一般生菌数として検出される芽胞菌が多いことは流通上の問題になることがある。

そのような流通業者には、味噌の風味が細菌も含め味噌の中の微生物によって醸し出されること、そして、味噌の安全性を啓蒙していかなければならないが、食の安全安心への消費者の意識の高まりもあり、衛生管理により一般生菌数を品質基準に合わせて低減させる努力もしなければならない。

ナイシン生産乳酸菌による麹中の細菌数低減法は、この要望に応えたものであった。しかし、ナイシンが食品添加物として認定されれば、耳慣れない添加物の使用に敏感な消費者が商品を敬遠するのではないかという懸念もある。

人は、食品の保存性を塩分や糖分、酒精、有機酸などにより向上させる方法を古くから使用してきた。このような古典的な添加物の使用については消費者はあまり敬遠しないのではないかと思われる。そこで、添加物の使用に敏感な消費者に対応するための手法として、有機酸、特に酢酸、を用いた製麹中の芽胞菌増殖抑制法について検討したので報告する。

## 2. 方　　法

### 2.1 米の処理

熊本県産ヒノヒカリ（2005 年産）を精米歩合 90 で精米した。精米は１晩水に浸漬し、30 分水切りした後、30 分間蒸煮した。蒸煮した米は通風して 40℃以下まで冷却し、以後の試験に供した。

### 2.2 製麹

所定量(1g/1kg 蒸煮米)の種麹（麦白、ビオック、愛知県）を混合した蒸米 5kg を小型製麹器に引き込み、次の条件で製麹した。

| | | |
|---|---|---|
| １日目 | 正午 | 引き込み |
| | | 前期保温工程　設定温度 37℃ |
| ２日目 | 9:00 | 後期冷却工程　設定温度 35℃ |
| | 16:00 | 手入れ　設定温度 32℃ |
| | 24:00 | 手入れ |
| ３日目 | 9:00 | 手入れ |
| | 正午 | 出麹 |

### 2.3 分析法

#### 2.3.1 水分

麹を 105℃で 2 時間放置し、減少した質量を水分として測定した。

#### 2.3.2 酵素活性

αアミラーゼ及び糖化力はαアミラーゼ測定キット（キッコーマン（株））及び糖化力測定キット（キッコーマン（株））を用いて測定した。中性プロテアーゼは標準味噌分析法により測定した。

#### 2.3.3 一般生菌数

標準味噌分析法により測定した。

#### 2.3.4 水分活性

水分活性測定装置 ms1-aw（日本シーベルヘグナー社）を用い、室温で 50 分放置して測定した。

#### 2.3.5 グルコース

Ｆキット　グルコース（J.K.インターナショナル）を用いて測定した。

#### 2.3.6 酢酸

Ｆキット　酢酸（J.K.インターナショナル）を用いて測定した。

## 3.結　　果

### 3.1 ビーカースケール製麹試験

所定量の種麹を混合した蒸米 100g に、10, 7.5, 5, 2.5 v/v%の酢酸水溶液を 1mL 加えて 30℃で 40 時間放置した。比較のため、酢酸水溶液の代わりに 1mL の超純水を加え、同様の操作を行ったものも調製した。

40 時間後、5v/v%以下の濃度の酢酸水溶液を加えてた蒸米では麹菌が旺盛に繁茂していたが、10 及び 7.5v/v%の酢酸水溶液を加えた蒸米上で麹菌の繁茂は見られなかった。これらの試料について、水分、αアミラーゼ、糖化力、中性プロテアーゼ、そして一般生菌数を測定した。その結果を表 1 に示す。

水分は 28～33w/w%の値を示した。酵素活性は麹菌の繁茂が見られた試料のみ活性が認められた。糖化酵素力価については、5、2.5v/v%の酢酸水溶液を加えたものと超純水を加えたものに活性の差は見られなかった。中性プロテアーゼについては、5v/v%酢酸水溶液を加えた試料は若干低い値を示したが、2.5v/v%酢酸水溶液、または、超純水を加えた試料の約 8 割の活性を保持していた。

一般生菌数は、酢酸濃度が高くなると低下し、7.5v/v%の酢酸水溶液を添加した試験区では 30 個未満、10v/v%の酢酸水溶液を添加した試験区で不検出になった。

### 3.2 通常製麹における水分、グルコース濃度、水分活性の経時変化

所定量の種麹を混合した蒸米 5kg を小型製麹器に引き込み製麹した。

表１ ビーカースケールで試作した麹の菌糸の伸長、水分、及び酵素活性

| 添加した酢酸液中の酢酸濃度 v/v% | 10.0 | 7.5 | 5.0 | 2.5 | Control（純水添加） |
|---|---|---|---|---|---|
| 菌糸の伸長 | × | × | ○ | ○ | ○ |
| 水分 w/w% | 32.5 | 28.2 | 30.9 | 32.1 | 30.8 |
| αｱﾐﾗｰｾﾞ U/g 麹 | 0.3 | 0.7 | 77.0 | 72.0 | 76.1 |
| 糖化力 U/g 麹 | ND | ND | 1.6 | 1.5 | 1.7 |
| 中性ﾌﾟﾛﾃｱｰｾﾞ U/g 麹 | ND | ND | 44.8 | 50.3 | 64.4 |
| 一般生菌数 CFU/g 麹 | ND | | 30＜ | $6.8\times10^4$ | $1.4\times10^5$ |

ND：不検出

蒸米はさばけよく順調に製麹器内に引き込めた。引き込み温度は 34℃であった。製麹 21 時間後には麹の香りがして順調に麹菌が生育し始めたことが示唆されたので後期冷却工程に移行した。製麹 28 時間後には麹菌糸の伸長が見られ製麹器のファンが間欠的に稼働し、麹菌の繁茂による発熱が旺盛に生じていた。製麹 48 時間後出麹した。菌糸の米へのハゼ込みがよく香味良好な麹が調製されていた。

製麹中の試料は定期的に採取し、水分、グルコース濃度、そして、水分活性を測定した。分析結果を表２に示す。蒸煮後水分は 37w/w%であった水分は前期保温工程初期の製麹 5 時間後に 37.2w/w%になった。後期冷却工程に入る直前の製麹 21 時間後の水分は 36.5w/w%であり、製麹 5 時間後から 16 時間に低下した水分は 0.7w/w%であった。後期冷却工程においては麹菌糸の伸長による発熱により水分が蒸散し、製麹 21 時間後から製麹 28 時間後までの 7 時間に 2.3w/w%低下した。その後も水分は低下し、製麹 36 時間後に 31.1w/w%、製麹 45 時間後には 30.9w/w%になった。出麹時（48 時間後）の水分は 28.9w/w%で製麹 45 時間後の水分とほぼ同じ値を示した。

グルコースは、蒸煮直後は不検出だったが、製麹 5 時間後には微量検出され製麹 21 時間後には 7.5w/w%まで増加した。そして、製麹 25 時間後には 12.7w/w%になり、その後出麹まで緩やかに増加した。

水分活性は蒸煮直後から製麹 21 時間後までは 0.97 以上の値であったが、その後急激に低下し、28 時間後には 0.95、32 時間後には 0.94 になった。出麹直後の水分活性は 0.91 であった。

なお、出麹時の麹の一般生菌数は 300CFU/g 麹未満であった。

表2　製麹中の麹の水分、水分活性、及び、グルコース含量変化

| 製麹期間 hr | 水分 w/w% | 水分活性 | ｸﾞﾙｺｰｽ w/w% |
|---|---|---|---|
| 0 | 37.0 | 0.98 | 0.0 |
| 5 | 37.2 | 0.98 | 0.1 |
| 21 | 36.5 | 0.97 | 7.5 |
| 25 | 34.7 | 0.97 | 12.7 |
| 28 | 34.2 | 0.95 | 15.4 |
| 32 | 32.8 | 0.94 | 15.3 |
| 36 | 31.1 | 0.93 | 18.2 |
| 45 | 30.9 | 0.91 | 14.8 |
| 48 | 28.9 | 0.91 | 17.3 |

### ３．３　酢酸を添加した蒸煮米の製麹と成分変化

蒸煮米 5kg に高酸度ビネガー（酢酸濃度 15.0v/v%, キューピー醸造（株）（東京都））を 10mL、20mL、及び 30mL 添加して、よく混合した。これに所定量の種麹を加えて均一に混合し小型製麹器に引き込み製麹した。

高酸度ビネガー10mL を混合した試験区は製麹 21 時間後、発芽した麹の香りが感じられ、その後も通常製麹と同様に麹菌糸の伸長が見られた。高酸度ビネガー20mL を添加した試験区では、製麹 21 時間後の麹の香りが弱かったが、製麹 28 時間後においては菌糸の伸長が見られ、出麹時の麹の性状に試験区間の差はなかった。高酸度ビネガー30mL を添加した試験区では、製麹 21 時間後の麹の香りが感じられず、その後も麹菌糸の伸長が他の試験区に比べて著しく遅れた。

高酸度ビネガー10mL 及び 20mL 添加試験区について、それぞれ、製麹 48 時間及び 28 時間まで定期的に試料を採取し水分と酢酸濃度を測定した。結果を表３に示す。

水分について、ビネガー10mL 添加区では製麹 21 時間後までは 36w/w%程度の水分があり、その後冷却工程に入ると減少して 28 時間後には 33.9w/w%、48 時間後には 29.0w/w%と通常製麹とほぼ同じ経時変化をとった。ビネガー20mL 添加区では、冷却工程に入っても水分の減少があまり見られず、製麹 28 時間後でも水分 35.9w/w%であった。

試料中の酢酸は保温工程中は保持され、製麹 21 時間後においても、それぞれ 0.012w/w%（ビネガー10mL 添加区）、0.05w/w%（ビネガー20mL 添加区）の濃度で検出されたが、冷却工程に入ると減少し、製麹 28 時間後にはそれぞれ 0.001w/w%、0.003w/w%となった。

ビネガー10mL 添加区で製麹 45 時間後の酢酸濃度が上昇しているが、製麹後半に酢酸濃度が増加する同様の現象が通常製麹においても見られた。

表３　酢酸添加による製麹試験における麹中の水分、及び、酢酸濃度の経時変化

| 製麹 hr | 水分 w/w% | 酢酸 w/w% |
|---|---|---|
| 高酸度ビネガー10mL 添加試験区 | | |
| 0 | 35.9 | 0.028 |
| 21 | 36.2 | 0.012 |
| 25 | 35.9 | 0.001 |
| 28 | 33.9 | 0.004 |
| 45 | 30.0 | 0.013 |
| 48 | 29.0 | 0.003 |
| 高酸度ビネガー20mL 添加試験区 | | |
| 0 | 36.5 | 0.046 |
| 21 | 36.9 | 0.050 |
| 25 | 36.7 | 0.003 |
| 28 | 35.9 | 0.000 |
| コントロール(純水添加試験区) | | |
| 0 | 37.0 | 0.002 |
| 5 | 37.2 | 0.001 |
| 21 | 36.5 | 0.001 |
| 25 | 34.7 | 0.002 |
| 28 | 34.2 | 0.002 |
| 32 | 32.8 | 0.048 |
| 36 | 31.1 | 0.033 |
| 45 | 30.9 | 0.011 |
| 48 | 28.9 | 0.002 |

### 3.4 工場での製麹試験

夏季に製造される麹の一般生菌数が $1\times10^6$CFU/g 麹以上であった工場１場を対象に、技術指導の一環として、酢酸を添加した製麹（酢酸添加法）試験を実施した。工場で製造される製品の都合により、麦麹を対象とし、冷却した蒸煮麦 540kg に対し 1900mL の高酸度ビネガー（酢酸 15.0v/v%）を加えてよく攪拌し、次いで所定量の種麹を混合した後、製麹器に引き込み製麹を行った。そして、製麹された麹について一般生菌数を測定し、常法により製麹した麹と比較したところ、常法で製造した麹の一般生菌数が $1.6\times10^6$CFU/g 麹であったのに対し、酢酸添加法により製麹された麹のそれは $1.7\times10^4$CFU/g 麹であった。その後、日を違えて同様の試験を行い、それらの麹で製造した味噌の一般生菌数を測定したところ、常法で製造した麹を用いた味噌の一般生菌数が $1.8\times10^6$CFU/g 味噌であったのに対し、酢酸添加法で製造した麹を使用した味噌の一般生菌数は $1.0\times10^4$CFU/g 味噌であった。

酢酸添加法で製造された麹及び味噌の性状は常法で製造されたものと比べて遜色なく、酢酸の蒸散による機材の腐食なども見られなかった。

## 4. 考　　察

ビーカースケール製麹試験において、10、7.5、5、そして2.5v/v%の酢酸水溶液1mLを100gの蒸煮米に混合した。それぞれの水分から、水分中の酢酸濃度は0.31、0.27、0.15、そして0.08v/w%になる。中村ら[1)]は、水分活性がほぼ1.00に近い場合、味噌醤油加工品での*Bacillus* subtilis及び*Aspergillus* oryzaeの増殖限界酢酸濃度をそれぞれ約0.1及び0.18%としている。本試験において、5.0v/v%の酢酸水溶液を加えた試験区（蒸米水分中の酢酸濃度0.15v/w%）では、一般生菌数が30未満になり、7.5v/v%の酢酸水溶液を加えた試験区（蒸米中の酢酸濃度0.27v/w%）では麹菌菌糸の伸長が見られなかったことは、中村らの結果と一致する。2.5 v/v%の酢酸水溶液を加えた試験区では一般生菌が$10^4$CFU/g麹以上検出された。この値は純水を加えた試験区の値（$10^5$CFU/g麹）より低かった。このことは、蒸米の水分中の酢酸濃度が0.1v/w%未満でも、酢酸が一般生菌の生育を抑制していることを示唆している。そして、麹菌菌糸の伸長が見られた試験区の酵素活性と、酵素活性が純水を加えた試験区のそれがほぼ同様の値であったことは、蒸米の水分中に約0.1～0.18v/w%の濃度で酢酸を添加した蒸米を用いると、一般生菌数の増殖を抑えて製麹できることを示している。

製麹工程は前期保温工程と後期冷却工程に分かれる。前期保温工程では湿度を高く保ったまま、30℃以上の高い温度で麹菌の発芽を促し、後期冷却工程では麹菌糸の伸長による発熱を通風冷却して適切な温度保ちながら、麹菌の発育、酵素生成、そして麹の乾燥を促す。よって、製麹後期工程では、糖化酵素の生成と働きによって麹中の糖度は高くなり、水分の発散により水分は低下する。水分の低下と糖度の上昇は麹の水分活性を低下させる。水分活性は、微生物の成育に大きく影響を及ぼし、微生物制御に広く活用されている。本試験によれば、通常製麹において、37w/w%で蒸米の水分は前期保温工程中は0.5w/w%程度しか減少しなかったが、後期冷却工程に入ると急激に低下し、前期工程とほぼ同じ時間（21時間）で約5w/w%減少した。グルコースは、製麹5時間後には微量に検出され、時間と共に濃度が増加して出麹時の麹には約15w/w%の濃度で含まれていた。水分活性は、前期保温工程中は0.97以上であったが、後期冷却工程中に急激に低下した。

中村ら[1)]は、*Bacillus* subtilis及び*Aspergillus* oryzaeの増殖限界水分活性をそれぞれ0.95及び0.90、井川[2)]は*Bacillus* subtilisの増殖限界水分活性を0.95としている。麹の出麹時の水分活性が0.90以上であることから麹の状態でも麹菌は繁殖できると考えられる。味噌の製造においても、出麹後、麹を放置すると更に菌糸が伸長して麹が熱を持つため塩切りがなされる。これに対して、*Bacillus* subtilisは水分活性0.95未満では増殖できない。すなわち、水分活性が低下して0.95未満になる製麹28時間後（後期冷却工程に入って7時間後）には*Bacillus* subtilisの増殖は抑制されると思われる。*Bacillus*属細菌が増殖するには糖やアミノ酸などの栄養分が必要であるが、製麹5時間後にはグルコースが微量に検出されたことから、麹は前期保温工程の早い時期から後期冷却工程に入り水分活性が0.95に近づく20数時間がBacillus属細菌の最もよく増殖できる時間域であると考えられる。

この*Bacillus* subtilisがよく増殖できる時間を短くすれば麹中の一般生菌数及び味噌に含まれる芽胞菌数を低減できるはずである。これを行うために、蒸米に高酸度ビネガー（15v/v%）を10、20、そして30mL加え、製麹を行った。蒸米の水分から、これらの蒸米水分中の酢酸濃度は、0.08、0.16、そして0.25w/w%と算出される（ビネガー30mL添加区については蒸米水分を36w/w%とした計算値）。ビネガー30mL添加区は水分中の酢酸濃度が*Aspergillus* oryzaeの増殖限界濃度以上であり、試料での麹菌糸の伸長が著しく遅れた。ビネガー10及び20mL添加区について、前期保温工程終了時の麹水分中の酢酸はそれぞれ0.03及び0.14w/w%の濃度で残存していた。このことから、麹水分中に含まれる酢酸が、前期保温工程中の麹の中で、*Bacillus* subtilisを含めた一般生菌数の増殖を抑制できる濃度で、工程の途中または終期まで存在したことが分かる。なお、この酢酸の濃度は後期冷却工程に入ると4時間以内に1/10未満に低下した。製麹30時間後の麹から酢酸が比較的高い濃度で検出されたが、これは麹菌の生育が最も旺盛に行われる時期と一致することから、麹が生成したものと思われる。

味噌製造工場での製麹試験において、酢酸添加法で製造した麹や味噌の一般生菌数は常法で製造したそれらより低い値を示した。これは、製麹前期保温工程初期において添加された酢酸により*Bacillus*属細菌の増殖が抑制され、*Bacillus*属細菌が良く増殖できる時間域が短くなったためと思われる。なお、製造された味噌は常法で製造されたものに比べ品質的に劣ることはなく、当初危惧された酢酸による設備の腐食も見られないことから、酢酸添加法による製麹中の芽胞菌増殖抑制技術は工業的に使用できるものと思われる。

## 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．　日本醤油研究所雑誌，Vol.23，pp.1-9（1997）
2) 井川房欣．微生物制御実用辞典，フジテクノシステム（東京都）p.73（1993）