

平成20年度 戦略的基盤技術高度化支援事業

「食の安全・安心を実現化する味噌用酵母培養技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成21年3月

委託者 中 国 経 済 産 業 局

委託先 財団法人 ひろしま産業振興機構

目 次

第 1 章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制 (研究組織・管理体制, 研究者氏名, 協力者)	6
1-3 成果概要	9
1-4 当該プロジェクトの連絡窓口	9
第 2 章 味噌醸造用酵母の検索及び小発酵試験による性能評価	11
第 3 章 培養基材の選定・分析、培地の調整	14
第 4 章 培養装置の設計・製作・据付け・試運転・調整・改造	17
第 5 章 種酵母の前培養・培養液の菌数測定	22
第 6 章 培養酵母の味噌添加試験・味噌の成分分析	27
第 7 章 微生物利用技術及び味噌の市場動向に関する情報収集	30
最終章 全体総括	31

第 1 章 研究開発の概要

1－1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1－1－1 研究開発の背景

味噌の醸造において、仕込み原料を酵母によって発酵することは根幹技術であり、通常は別に培養した優良酵母を仕込み工程で添加する。従来から、味噌用酵母の培養には生揚げ醤油を主な培養基材とし、これに粉末ブドウ糖を加えて組成バランスを調整した培地が用いられてきた。さらに、培養過程で発生する泡はシリコン(食品添加物)添加により消泡し、培養効率の低下を防いでいる。ここで、生揚げ醤油から食物アレルギー発症相当量の小麦成分が味噌に移行（キャリアオーバー）する。又、粉末ブドウ糖には GMO 原料（遺伝子組み替え農産物）の混入が懸念され、シリコンについても食品への使用適否が検討課題となっている。

最近、食の安全や安心を訴求する消費者の意識が一層高まり、これを受けて消費者利益の保護を一義に販売活動を展開する各生活共同組合や量販店は、早急に危害や疑惑のない原材料に切り替えることを要請している。(株)ますやみそを含めて業界では、小麦を含まない培養基材として純正味噌の抽出物を用いた培養技術の開発と実用化を進めている。その際、常に活性のある酵母を収率良く得るために、培地の栄養バランス（窒素及び糖）を適正にするとともに、人的に無害な（物理的手段）消泡技術を確立することが急がれる。

一方、味噌は地域特性が強く、各地で多様な原料配合や醸造方法が採用されている。広島地方では伝統的に麴を比較的多く使用したソフト（甘口）な味噌が消費者に支持されている。(株)ますやみそでは地域の代表的メーカーとして、広島県内のほかに中国・四国地方、京阪神地方及び関東地方の市場を中心に年間約 7,000 t を出荷している。

味噌は仕込み時の糖濃度が適正な範囲にあれば酵母が正常に生育・発酵する。麴を多く使用する広島型味噌は、糖濃度が適正範囲の上限もしくはそれを超えることがあり、酵母の活動が抑制される。発酵が不十分な味噌は製品化後に二次汚染を受け、異常発酵（フクレ）を起こして、味覚や消費者の安心を損なう場合がある。これらを回避するために、耐糖性を有し、広島型味噌に適した菌株を検索するとともに活性及び菌体収量を高める培養技術を確立する必要がある。

1－1－2 研究目的及び目標

1) 研究の目的

味噌は、日本人の食生活の中で古くから米・麦とともに非常に重要な役割を果たしてきた。味噌の製法や品質は多様であり、各地のメーカーは豊かな地域特性を基盤として企業活動を展開している。近年、味噌が体調調整や病気予防（ガンや生活習慣病の抑制）の機能を発揮していることと、それらが微生物を利用した発酵・熟成と強く関連することが科学的に解明されてきた。

味噌の醸造には、主として麴菌、耐塩性乳酸菌、耐塩性酵母（以下酵母）の 3 種類の微生物が関与する。なかでも酵母は、味噌の香気醸成に重要な役割を果たすほか、坑変異原性物質の生成にも寄与している。酵母は品質設計に即したものを選択・使用するべきであるが、一部の大手企業を除いて、ほとんどの味噌製造企業は共同で培養した酵母を利用する現状にある。中小メーカーでも独自の酵母を獲得し、その培養技術を保有することで、製

品の差別化・個性化及び高品質化をさらに進展することが可能となる。

酵母の利用にあたって、別に培養した培養液を味噌仕込み時に添加することが常法とされる。その際、酵母は培養液中で菌体密度が 2×10^8 cells/mL 以上に増殖し、活性のある状態で存在している必要がある。従来から、主培養基材として生揚げ醤油を用いることでこの必要条件を満足してきた。熟成した生揚げ醤油には酵母の増殖を促進する栄養成分がバランス良く含まれているためと考えられる。最近、味噌の機能性に対する注目度が増すにつれて、安全や安心を訴求する消費者の意識も高まっている。その現れとして、食物アレルギー体質の消費者が症状を発症するレベル（数 $\mu\text{g/g}$ ）以上の小麦成分が酵母培養液（＝生揚げ醤油）から味噌に移行することに強い警戒感を持っている。さらに、培養効率の向上を目的として消泡シリコン（食品添加物）を添加することに拒否感を示し、副資材として培地に加える粉末ブドウ糖についても原料穀物に遺伝子を組み替えたものが混入することを懸念している。

食物アレルギーには、生揚げ醤油を味噌抽出液に置き換えることで対処できるが、安定した培養結果が得られず、時には菌体密度が 1×10^8 cell/mL 以下になることもある。このような場合には、顕微鏡観察的に酵母の菌体形状が小ぶりで活性不足のため、味噌に添加しても発酵が微弱になる。培養基材とする味噌の品種や熟成度に応じて、栄養バランスや溶存酸素量を適切に制御する技術を確立することで安定的な培養液が得られる。また、消泡は薬剤によらない物理的方法を採用するとともに、粉末ブドウ糖を米麹消化物に置き換えることで消費者の信頼が獲得できる。

以上の観点から、本研究開発では、味噌醸造の根幹となる酵母の培養において、広島産味噌に適した「酵母の選定」と培養工学的な「制御技術の確立」を図るとともに、実規模の高性能培養装置を用いて「健康危害要因の排除」と「高活性・高濃度培養液の獲得」を実現化することを目的とし、次の研究項目を設定した。

2) 研究の概要

区 分	19年度（1年目）	20年度（2年目）
1 味噌醸造用酵母の 検索及び小発酵試 験による性能評価	予備選抜が終了した耐塩性酵母につ いて、優良菌株を選定する。	県内外で生味噌をサンプリングし、酵 母のスクリーニング及び小仕込み試 験による性能評価を行い、実用化の後 継対象となる酵母を選定する。
2-1 培養基材の選定・分 析、培地の調整	酵母の培養基材となる純正米味噌 （特定原材料フリー）について、最 適熟成度（期間）判定の指標を数値化 する。 米麴消化について、加水量、温度、 時間に関する適正糖化条件を設定す る。	特定原材料フリーの味噌懸濁液及び 米麴消化液を主要基材とし、それらの 固液分離の効率化及び実用的回収率 を向上させる条件を設定する。その 後、培地中の直接還元糖及び窒素成分 の比の差違が酵母の増殖に与える影 響を検討する。
2-2 培養装置の運転・調 整・改造	培養容器は材質、形状、攪拌方式、 操作性、雑菌汚染対策実績のある ものを選定し、通気・物理的消泡・ 温度制御等各装置を加工・付加する。 これらの機能をバランスさせるた め、培養工学的に合理性のある制御 システムを設計・構築する。 装置は別に設計する試験棟に据え付 け、微生物的な二次汚染を最小限に できる環境を確保する。	1 及び 2-1 において選定した酵母 及び培地による試験培養を繰り返 し、通気・物理的消泡・温度制御等 各装置の機能の効率化に必要な培養 工学的調整と改造を加える。
2-3 種酵母の前培養・培 養液の菌数測定	保存した酵母を液体培地に接種し、 本培養のスターターとして必要とな る拡大培養条件を設定する。	実規模の試験培養を実施し、培養液 の菌体密度及び活性を直接測定する 手法を確立する。又、培養過程の途中 で培養液に糖を補給し、菌体収率を向 上させる。
3 培養酵母の味噌添 加試験・味噌の成分 分析	実験室的な仕込み規模で、菌体密度 が 1.0^5 cell/t レベルの培養液を添 加・混合し 1.0～1.5% の目標ア バアルコールを生成させる培養条件を 設定する。	工場試験規模で酵母添加仕込みを実 施し、アルコール生成量及び香気成分 の経時変化の測定と性能評価を行う。
4 微生物利用技術及 び味噌の市場動向 に関する情報収集	アドバイザー、マスコミ、各種研究 会・講習会を通じて消費者の意識や 商品の動向を調査・分析する。	アドバイザー、マスコミ、各種研究 会・講習会を通じて消費者の意識や商 品の動向及び先端的培養技術の開発 動向を調査・分析する。

以上の目標達成により、食物アレルギーの発症原因となる特定原材料を一切含まない培地を用い、味噌醸造特性が優れた酵母を高菌体密度・高活性で培養し、味噌の品質向上が実現化できる技術を開発することを目指す。

3) 研究の目標

① 1

味噌醸造用酵母の検索及び小発酵試験による性能評価

担当試験実施者	実施場所	実施内容	20年度達成目標
広島県立総合研究所食品工業技術センター	生物利用研究部	保存している耐塩性酵母について小規模発酵試験により増殖・発酵能力の評価・確認を行う。	菌株の低温保存技術の研修及び酵母の性能が評価できる小規模発酵試験の基準手法を設定する。
株式会社ますやみそ	株式会社ますや食品研究所	選定した優良酵母及び実用化が見込まれる酵母を－80℃付近で保存し、カルチャーリストを構築する。	

② 2-1

培養基材の選定・分析、培地の調整

担当試験実施者	実施場所	実施内容	20年度達成目標
株式会社ますやみそ	株式会社ますや食品研究所	熟成度（期間）の異なる米味噌抽出液について、窒素、直接還元糖及び屈折糖度計示度を測定し、それらの相関を数値化する。米麹消化について、加水量、温度、時間に関する適正糖化条件を設定する。	味噌抽出液及び米麹消化液について、屈折糖度計示度を測定するだけで、成分濃度が予測できる関係式を構築する。培地中の窒素と糖の量はそれぞれ0.2～0.5%及び5～10%の適正範囲に設定する。

③ 2-2

培養装置の運転・調整・改造

担当試験実施者	実施場所	実施内容	20 年度達成目標
広島国際学院大学	工学部	酵母の培養に関して基本的な培養パラメーターを立案し，効率化が可能となる基本的運転条件を構築する。	超音波発振子及び各種センサ（泡感知，DO，温度）を後付けで装着し，組立，試運転を行う。 （加圧タイプでないため床に固定する法的規制を受けない）
株式会社濱田製作所	呉工場	蒸気殺菌条件を適正化するとともに物理的消泡条件を確立する。	
株式会社ますやみそ	東広島工場		

④ 2-3

種酵母の前培養・培養液の菌数測定

担当試験実施者	実施場所	実施内容	20年度達成目標
広島県立総合研究所食品工業技術センター	生物利用研究部	1により，選定した菌株を供試用に分譲する。 菌株の冷凍保存について技術指導を行う。	液体培地用スターターを静置く法，振とう法及び通気法により拡大培養を行う手法を確立し，菌体密度及び生存率を確認した後本培養に移す。
株式会社ますやみそ	東広島工場 株式会社 ますや食品研究所	2-1により，特定原材料を含有しない液体培地を調製し，斜面培養酵母の前培養試験を行う。	
広島国際学院大学	工学部	耐塩性酵母に適応する流加培養条件を設定し，高菌体密度培養液を得る。	

⑤ 3

培養酵母の味噌添加試験・味噌の成分分析

担当試験実施者	実施場所	実施内容	20年度達成目標
株式会社ますやみそ	東広島工場	2-3によるスターターを使用して実規模の拡大培養を行う。その際，通気・攪拌及び流加培養条件が菌体収量や活性に与える効果を検討する。その後，培養した酵母を味噌に添加し，発酵・熟成中の菌数及び成分変化を経時適に追跡・調査し，性能評価を行う。	半固体状の味噌について，バラツキを生じないサンプリング方法と分析試料の調整方法を検討し，実規模で酵母の性能評価を行う。

⑥ 4

微生物利用技術及び味噌の市場動向に関する情報収集

担当試験実施者	実施場所	実施内容	20年度達成目標
株式会社ますやみそ	株式会社 ますや食品研究所	アドバイザー，マスコミ等の情報収集及び各種研究会・講習会に参加する。	先端的微生物利用技術及び味噌の市場動向に関する情報を調査・分析する。

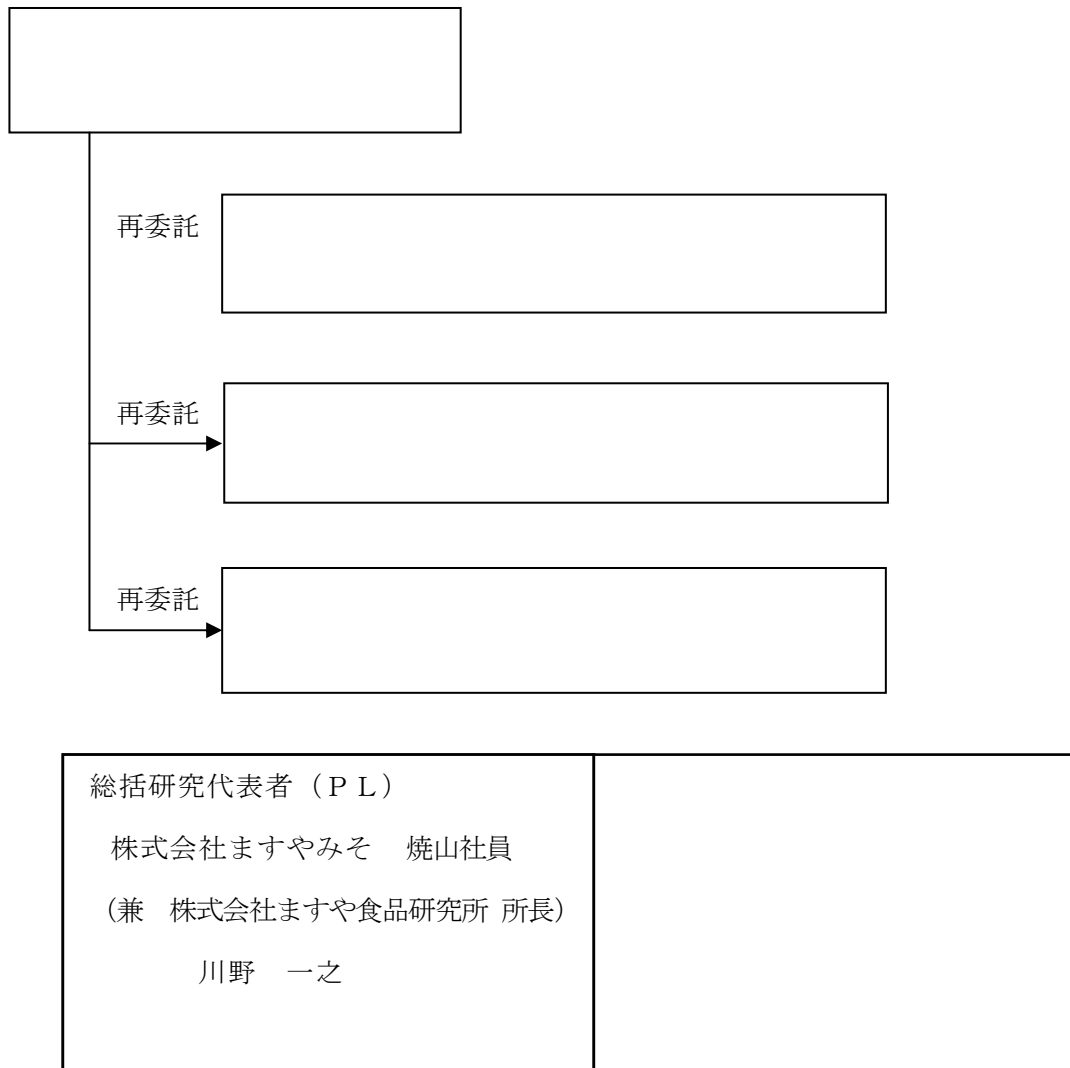
⑦ プロジェクトの運営・管理

本研究の円滑な推進を図るため，委員会等の運営により，各研究開発項目の課題抽出，検討，研究開発の工程管理，研究成果の評価及び事業化等について審議・評価を行う。

(実施担当：財団法人ひろしま産業振興機構)

1－2 研究体制（研究組織・管理体制・研究者氏名・協力者）

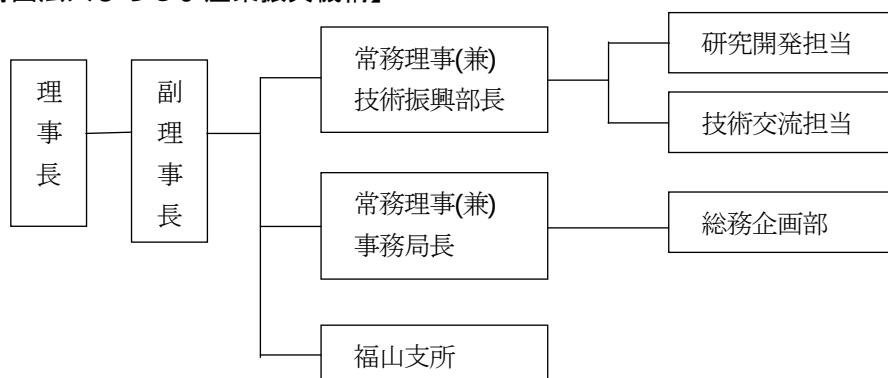
1－2－1 研究目的及び目標



1－2－2 管理体制

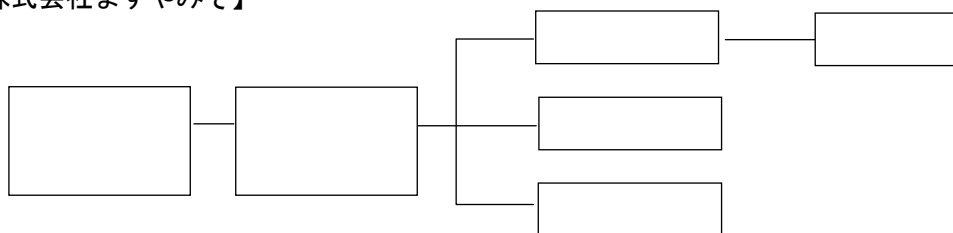
1) 事業管理者

【財団法人ひろしま産業振興機構】

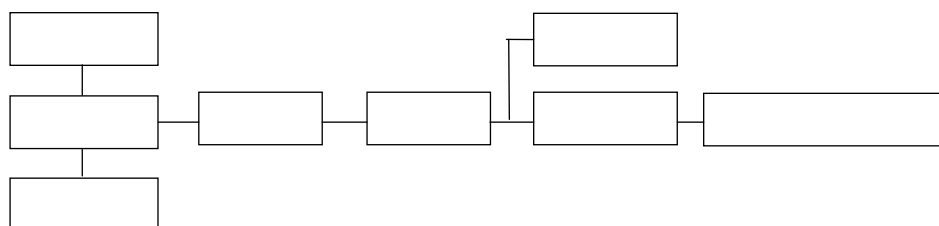


2) 再委託先

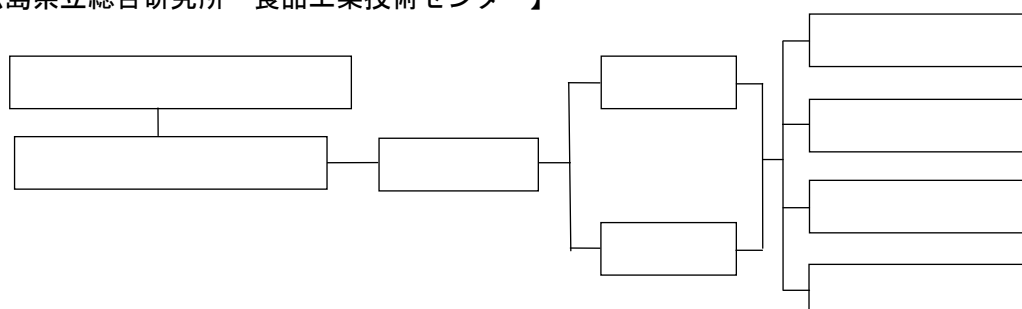
【株式会社ますやみそ】



【学校法人広島国際学院大学】



【広島県立総合研究所 食品工業技術センター】



1-2-3 管理員及び研究員氏名

1) 事業管理者

【財団法人ひろしま産業振興機構】

管理員

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
桑 田 洋	常務理事(兼)技術振興部長	⑦
山 縣 一 郎	技術振興部 研究開発推進担当 担当部長	⑦
池 田 修	技術振興部 研究開発推進担当 担当課長	⑦
森 川 祐 司	技術振興部 研究開発推進担当 担当課長	⑦
新 田 宏 樹	技術振興部 研究開発推進担当 主査	⑦
橋 本 貴 史	技術振興部 研究開発推進担当 主任	⑦
佐々木 正 勝	技術振興部 産業クラスター・コーディネータ	⑦

2) 再委託先

【株式会社ますやみそ】

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
川 野 一 之	焼山社員	①②③④⑤⑥
川 野 隆 史	焼山社員	①②③④⑤⑥
岡 本 洋史子	焼山社員	①②④⑤⑥
樋 口 喜久寿	東広島工場社員	①②④⑤
南 友 和	主任	①③④⑤
太 田 弘 子	サポート社員	②④⑤
森 脇 明 恵	サポート社員	②④⑤
長谷川 留 美	サポート社員	②④⑤

【学校法人広島国際学院大学】

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
佐々木 健	工学部 ^バ イオ・リサイクル学科 教授	③④

【広島県立総合研究所 食品工業技術センター】

氏 名	所属・役職	実施内容（番号）
河 村 大 造	生物利用研究部 部長	①④
渡 部 緑	生物利用研究部 副主任研究員	①④
長 尾 かおり	生物利用研究部 副主任研究員	①④

1-2-4 他からの指導・協力者及び指導・協力事項

〔共同研究推進委員会〕

本研究開発を円滑に推進するため研究開発課題，事業会に係る重要な事項を総合審議し決定する。

氏 名	所 属 ・ 役 職	区 分
川 野 一 之	株式会社ますやみそ 焼山社員 (株式会社ますや食品研究所 所長)	委 員 長 (P L)
川 野 隆 史	株式会社ますやみそ 焼山社員 (株式会社ますや食品研究所 執行役員開発部長)	副委員長 (S L)
舩 本 康 隆	株式会社ますやみそ 相談役	委 員
井手口 要	株式会社濱田製作所 設計部 次長	委 員
佐々木 健	広島国際学院大学 工学部 ^バ イオ・リサイクル学科 教授	委 員
河 村 大 造	広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター 生物利用研究部 部長	委 員
藤 岡 良 朗	株式会社スーパーふじおか 代表取締役社長	委 員 (アドバイザー)

1-3 成果概要

区 分	研究項目	研究成果の概要
1	味噌醸造用酵母の検索及び小発酵試験による性能評価	地域特性を有する市販生味噌（米，麦）から酵母をスクリーニングし，液体培地を用いた発酵試験及び味噌の小仕込み試験によって実用化の後継対象となる酵母数株を選定した。
2-1	培養基材の選定・分析、培地の調整	特定原材料を含まない味噌懸濁液及び米麹消化液を主要基材とし，それらを圧搾により固液分離を行った。又，未殺菌圧搾液の食塩濃度を18%以上に調整し室温保存を可能とした。
2-2	培養装置の設計・製作・据付け・試運転・調整・改造	400ℓ規模の培養試験を繰り返し，広島国際学院大学の助言を得て通気・物理的消泡・温度制御等各装置の機能に必要な培養工学的調整と改造を加えた。
2-3	種酵母の前培養・培養液の菌数測定	広島県立総合技術研究所食品工業技術センターの指導により種酵母の冷凍保存技術を修得した。実規模の試験培養において，目標を上回る菌体密度で高活性の培養液を得た。
3	培養酵母の味噌添加試験・味噌の成分分析	実規模の酵母添加仕込みを実施し，アルコール生成量及び香気成分を測定し，性能評価を行った。広島県立総合技術研究所食品工業技術センターにおいて，培養酵母の味噌添加小試験を実施し，発酵・熟成過程の香気成分の分析を行った。
4	市場における情報収集	量販店が主催した味噌講習会において消費者の意識や商品の動向を調査・分析する。

1-4 当該プロジェクトの連絡窓口

1) 事業管理者

【財団法人ひろしま産業振興機構】

(TEL 082-240-7712 FAX 082-504-7317)

(経理担当者) 技術振興部 研究開発推進担当 担当課長 池田 修

(業務管理者) 常務理事(兼)技術振興部長 桑田 洋

2) 再委託先

【株式会社ますやみそ】

(TEL 0823-21-6633 FAX 0823-21-6636)

(経理担当者) 総務部 部長 岡田 卓治

(業務管理者) 副会長 舩本 信弘

【学校法人広島国際学院大学】

(TEL 082-820-2345 FAX 082-820-2526)

(経理担当者) 事務部部长

今田 能之

(業務管理者) 工学部部长

遠藤 敏郎

【広島県立総合研究所 食品工業技術センター】

(TEL 082-251-7431 FAX 082-251-6087)

(経理担当者) 総務担当 主任専門員

松島 寿史

(業務管理者) センター長

土屋 義信

第2章 味噌醸造用酵母の検索及び小発酵試験による性能評価

【研究項目】（1）味噌醸造用酵母の検索及び小発酵試験による性能評価

研究内容及び成果：

- 1 広島市，愛媛県（今治市，松山市，宇和島市），愛知県（豊橋市）の量販店で市販されていた生味噌（米，麦）7点を購入した。これらは全国展開しているものや地域特性を有する商品である。購入した生味噌約1gに米麹エキスイ液体培地10mlを加え，30℃で数日間集積培養を行った。米麹エキスイ培地の調製方法を図.1に示した。

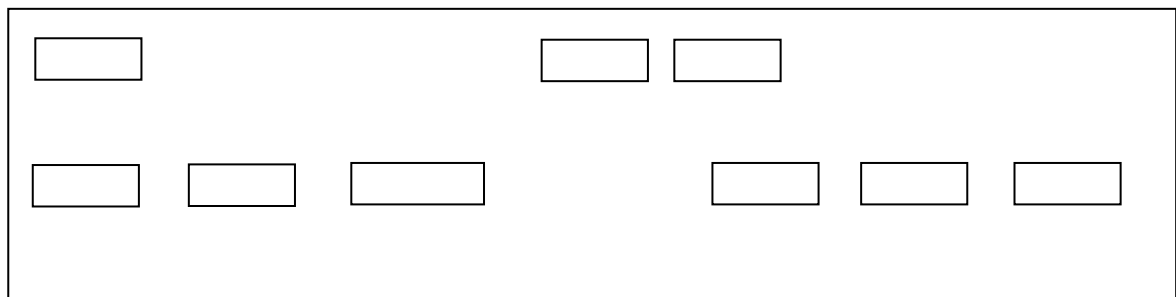


図.1 米麹エキスイ液体培地の調製方法

- 2 集積培養の結果，培養液に濁りを認めたものを10%食塩水で希釈し，その1白金耳を無菌シャーレ内の米麹エキスイ寒天培地に塗り，30℃で平板培養を行って単一のコロニーを得た。これら約30株を試験管培養し，冷蔵庫に保存した。
- 3 保存した酵母のなかから，麴歩合が高い（炭水化物量が多い）広島県地方の味噌醸造に適合できる後継酵母を選択するため，別に考案した小発酵試験装置により味噌発酵能を検討している。現段階で，少なくとも数株の後継対象酵母を得ている。

なお，集積培養・平板培養の結果及び味噌小発酵試験装置の概観を写真で示した。

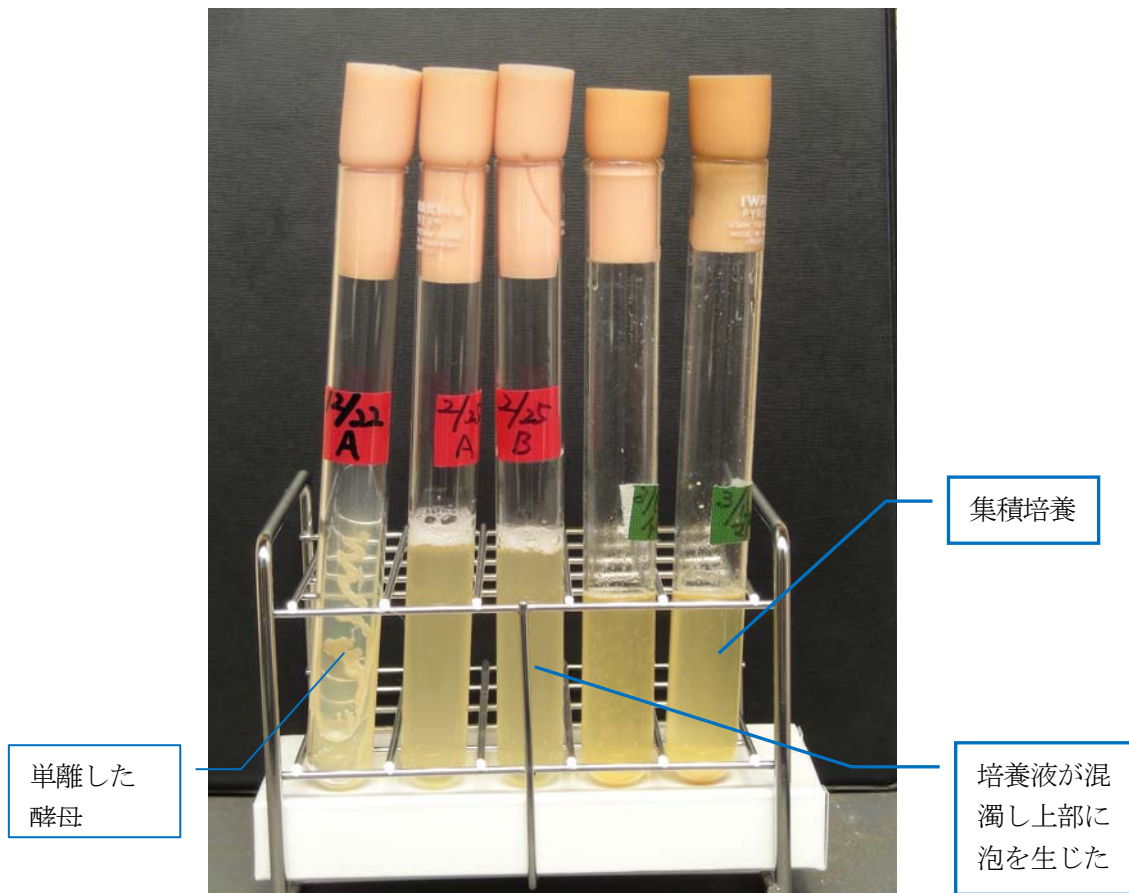


写真 酵母の単離



写真 平板培養で出現した酵母のコロニー

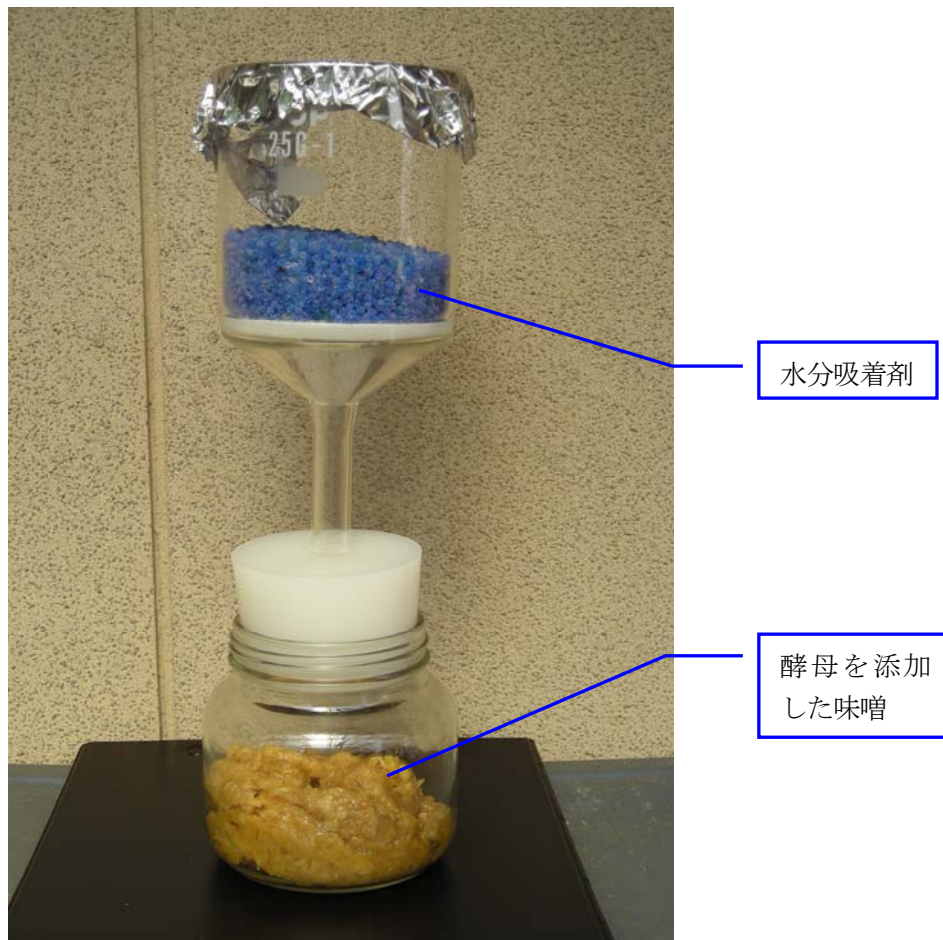


写真 考案した小型試験発光装置

発酵に伴い発生する炭酸ガスは放出し、
水分は吸着される

第3章 培養基材の選定・分析、培地の調整

【研究項目】（2－1）培養基材の選定・分析、培地の調整

研究内容及び成果：

- 1 培養試験にあたって、主要基材として特定原材料（＝小麦）を一切含まない純正米味噌、米麴及び食塩を選択し、培地を調製した。すなわち、米味噌及び米麴（消化物）は水道水で懸濁し、プラスチック製ザル及びステンレス製金網を用いて自然ろ過により固液分離を行った。ろ液は時間をおくことなく培養槽に移し、加熱殺菌を行った。

培養液1000あたり主要基材の使用量は

米 味 噌	1 0 . 0 k g
米麴消化物	3 . 5 k g
食 塩	8 . 9 k g

とした。この培養液の成分は

窒 素	0 . 4 ～ 0 . 9 %
グルコース	1 . 0 ～ 1 . 5 %
食 塩	9 ～ 1 0 %

であり、適正範囲にあった。

- 2 固液分離操作は培養液を味噌に添加する際に固形物によるポンプの目詰まりを回避するうえで必須であるが、この作業には3～4時間を要した。酵母培養のタイムスケジュールに関して、本培養の前後に装置の洗浄・組立・分解・殺菌・冷却等の作業が必要となる。本培養は通常40時間が必要で、付随する作業ほかに固液分離操作時間が加わると通常の勤務時間内に培養の全工程を終了することが困難となる。そこで、吟醸酒圧搾装置を利用して本培養とは別の日に集中して数回分の培地を調製した。すなわち、米味噌及び米麴消化物の濃厚な懸濁液を3日間かけて圧搾し、作業者は1日に数回の点検と加圧（10分間以内）を行うこととした。得られた未殺菌圧搾液は清澄であり（計算上の液汁回収率約85%）、食塩濃度を18%以上に調整すれば室温保存を行ってもpHの変化（変敗）を認めなかった。

ここで、自然ろ過による固液分離方法を図. 2に、圧搾による固液分離方法を図. 3に示

した。又、固液分離装置及び作業の様子を写真で示す。



図. 2 自然ろ過による固液分離フローシート（培養液100ℓあたり）



写真 自然ろ過による固液分離作業

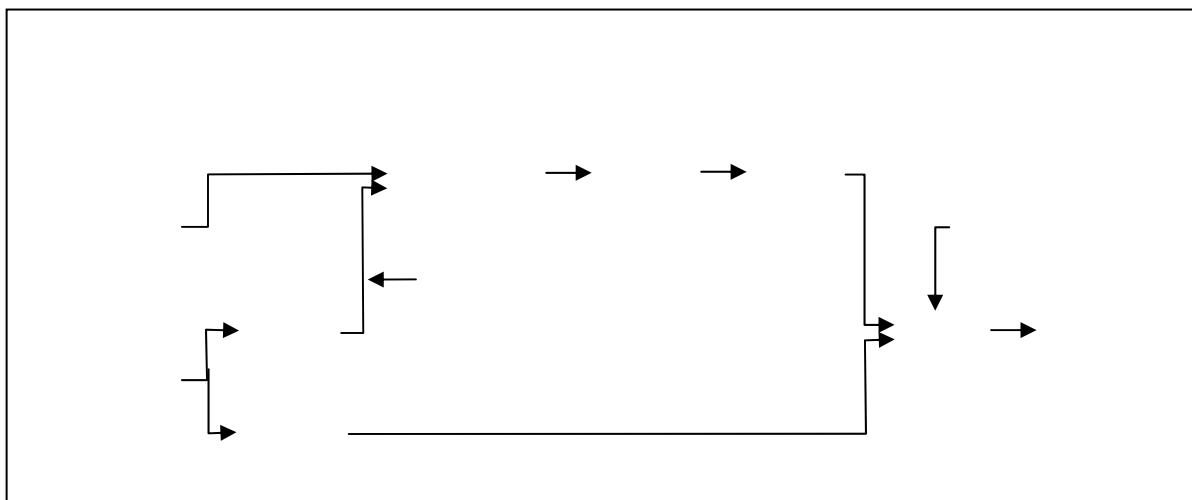


図. 3 压榨による固液分離フローシート（培養液 100ℓあたり）

压榨による液汁回収率を 85%と見込んだ

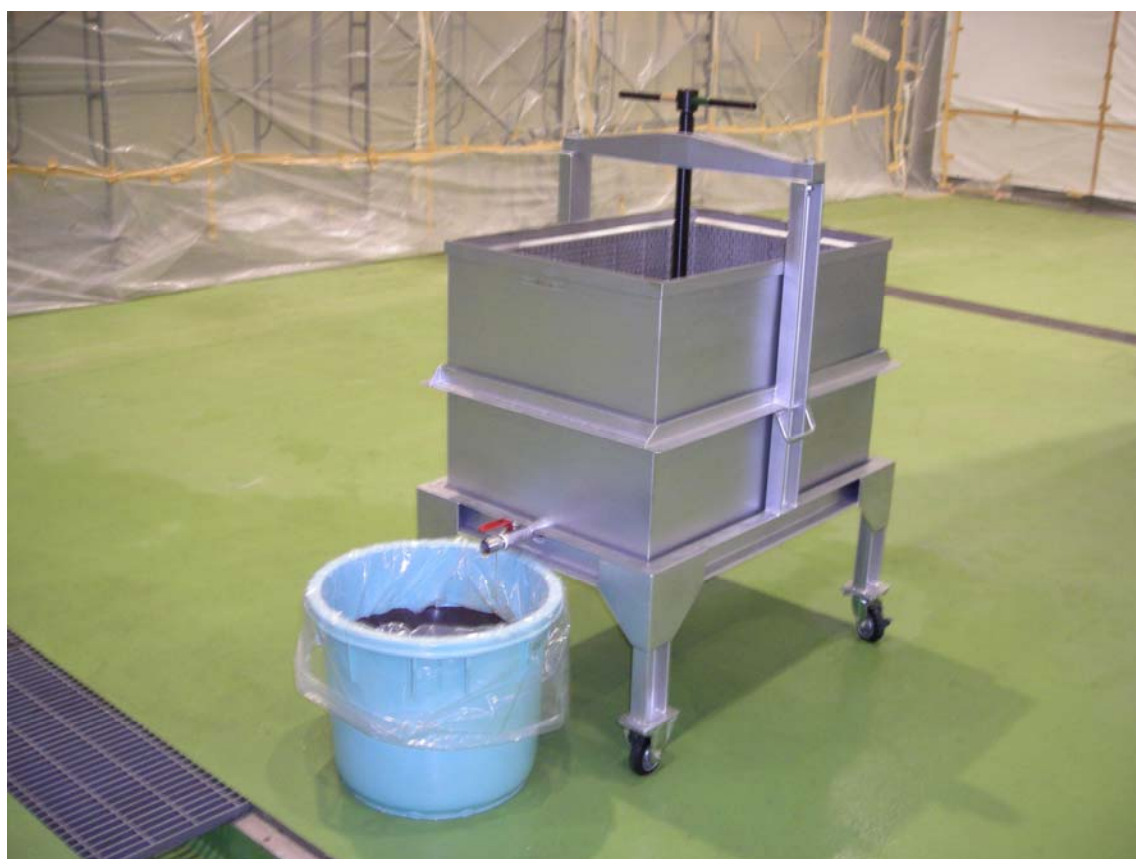


写真 压榨装置（吟醸酒用を転用）

第4章 培養装置の設計・製作・据付け・試運転・調整・改造

【研究項目】（2－2）培養装置の設計・製作・据付け・試運転・調整・改造

研究内容及び成果：

- 1 据付けが完了した培養槽について水張り試験を実施した。その結果、タンクや配管のシール及び継ぎ手部分の液漏れがないことを確認した。また、通気・攪拌機能が正常に作動することを確認した。そのうえで気泡の分散や液面の波立ち状態を目視し、通気量を80ℓ/分、攪拌を600rpmに調節した。さらに、ジャケットに蒸気（0.8kg/cm²）及び冷却水を通じ、加温・冷却機能の確認を行った。その結果、水量500ℓにおいて1℃/30～36秒の速度で昇温し、最終液温は98℃に達した。冷却は加温よりやや遅かったが、おおよそ40分で30℃まで下降し、その後±0.5℃の範囲で液温を維持できた。

これらから、本培養装置は設計目標を達成できる基本的な制御機能を有すると判断した。

- 2 水張り試験及び実際の培養試験を通して、培養装置本体及び付帯部位に表. 1のような調整と改造を加えた。なお、これには広島国際学院大学の培養工学的な助言を参考とした。

表. 1 酵母培養装置の調整・改造

部 位	調整・改造の内容	目 的
本体蓋部	取付け金具の交換とガイドバー（４本）の付設 ◎ ボルト（１６本）⇒ ワンタッチランプ（６カ所） ◎ ⇒ 蓋取付けの位置決めガイドバー（４本）を溶接 ◎ パッキン（ネオプレンゴム）の交換 板状⇒ 中空パイプ状	開閉操作時間を短縮し、培養時間を確保 雑菌汚染防止
本体底部	培養液取出し部の改造 ◎ 直菅⇒ ステンレス製曲菅（サニリーバルブ付） ジャケット排水部の改造 ◎ 直菅⇒ ステンレス製曲菅	雑菌汚染防止，作業性向上 作業環境の汚染防止
通気経路	フローメーターの交換 ◎ 50～500 ml ⇒ 20～200ml ◎ 排気側除菌フィルターの改造 ⇒ 追加設置	通気精度の向上 雑菌汚染防止
物理的消泡装置	発信ホーンの長さ改造 ◎ 20 cm ⇒ 50 cm	先端を液面に近づけることによる効果的な消泡
温度制御経路	ラインポンプの水抜き配管 ◎ ⇒ 追加設置	冬期凍結による破損防止
蒸気配管経路	蒸気取り出し口の増設 ◎ ⇒ 追加設置 安全弁の組み込み ◎ ⇒ 追加設置	培養液保管容器の殺菌 事故防止

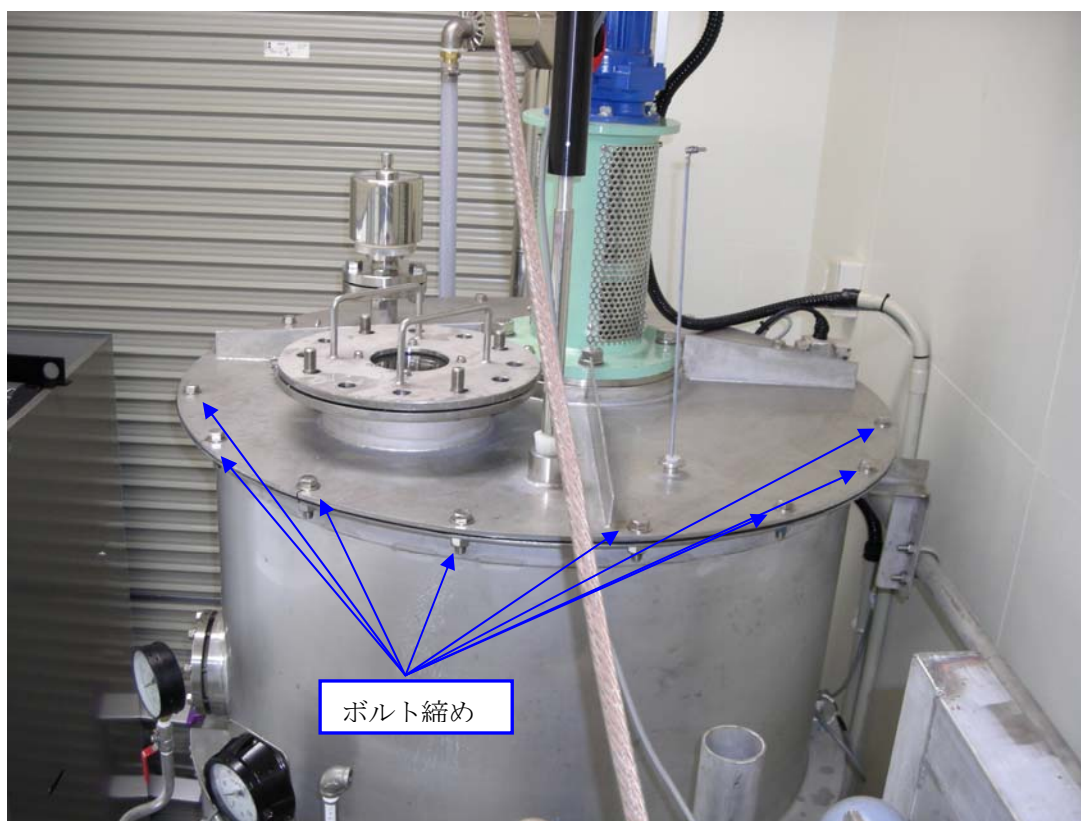


写真 本体蓋部（改造前）

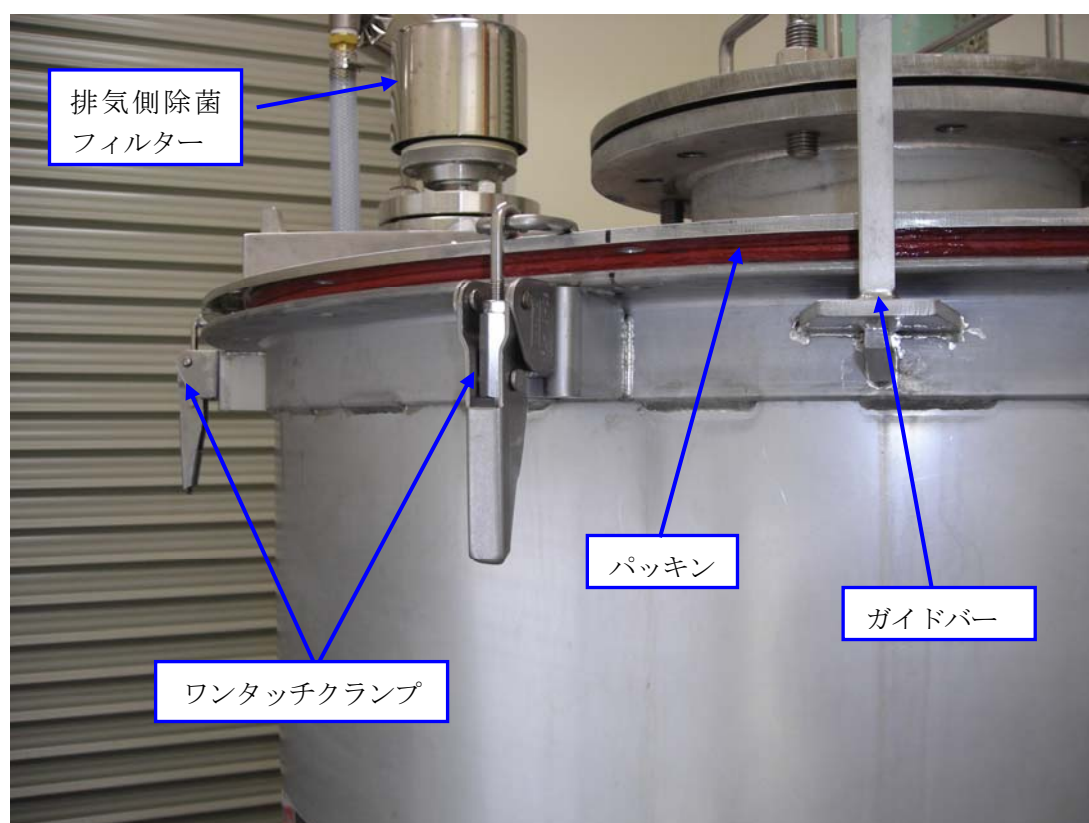


写真 本体蓋部（改造後）

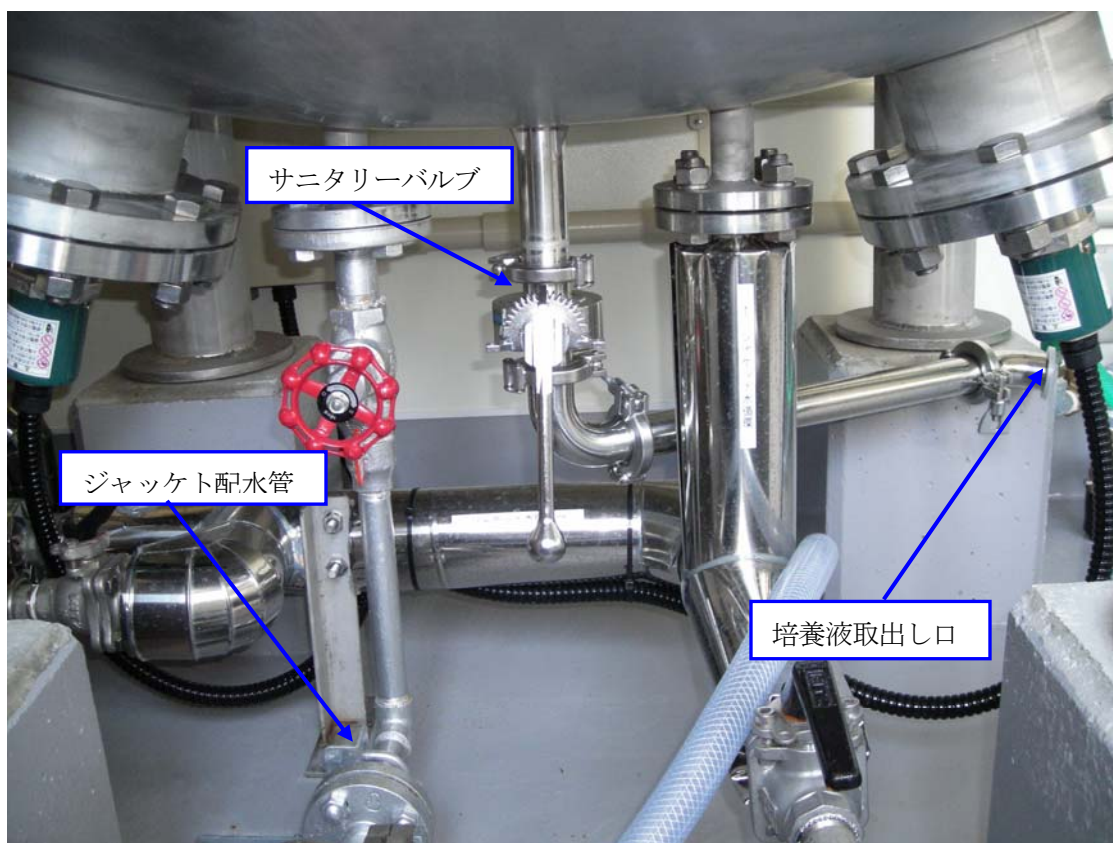


写真 本体底部

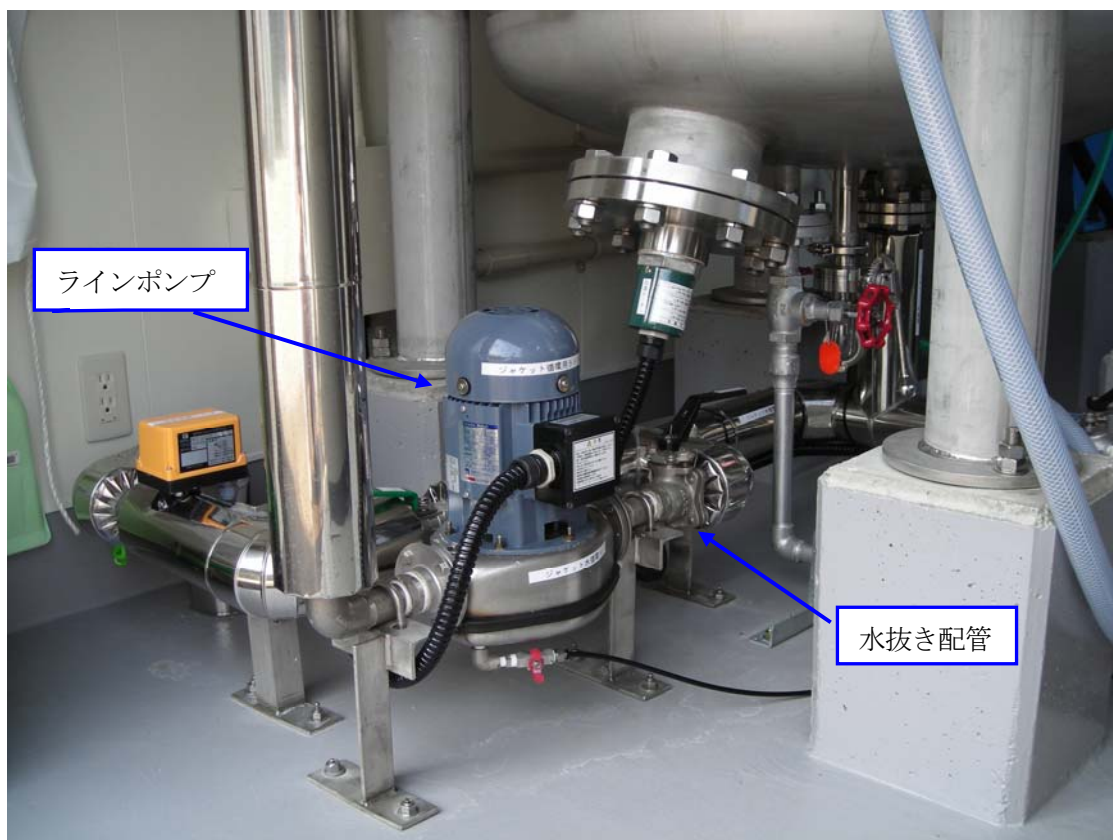


写真 本体底部

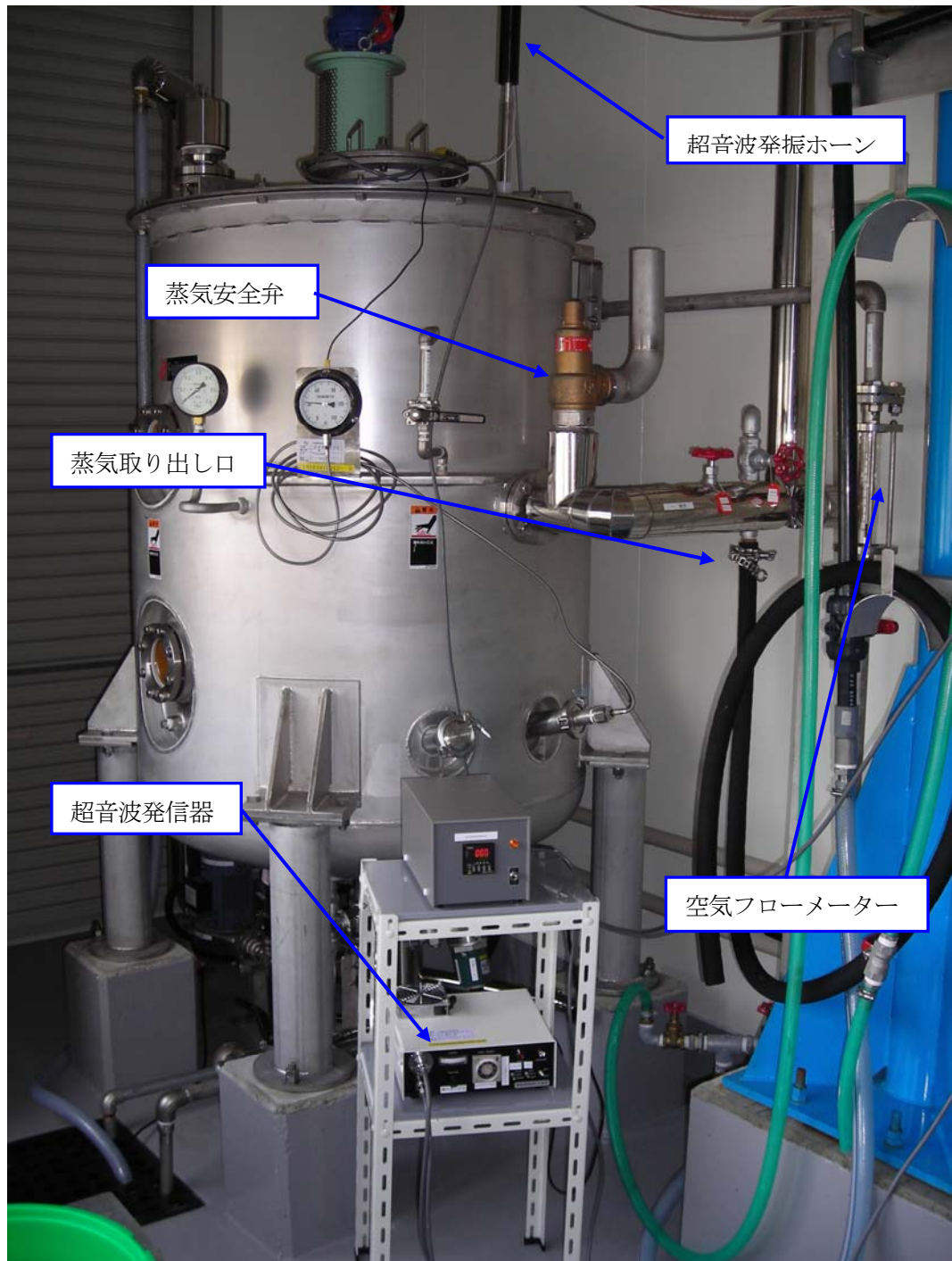


写真 本体正面

第5章 種酵母の前培養・培養液の菌数測定

【研究項目】（2－3）種酵母の前培養・培養液の菌数測定

研究内容及び成果：

- 1 酵母菌は通常平板培養（シャーレ）やスラント培養（試験管）したものを低温（冷蔵庫）で保存する。これらの保存方法では、定期的な植え継ぎ（継代培養）が必要で時間と手間がかかり、雑菌汚染のリスクもある。さらに、継代培養を繰り返すうちに菌株が変異し、優秀な遺伝的形質が消失する。一方、冷凍保存を行えば酵母を、長期間（半永久的に）保存できる利点がある。さらに、保存中の変異はほとんど無いとされ、植え継ぎの手間や汚染リスクは大幅に軽減される。

そこで、広島県立総合技術研究所食品工業技術センターの指導により種酵母の冷凍保存技術を修得した。

- 2 広島県立総合研究所食品工業技術センターから分譲された味噌醸造用耐塩性酵母（A, B, Cの3株）を供試した。供試菌株をそれぞれシャーレで30℃、3日間平板培養し、生育したコロニーから1白金耳を液体培地に接種して30℃、7日間試験管培養した。次に、培養液1mlを凍結保存用バイアルに取り、滅菌したグリセリン溶液（15％または30％）1mlを加えてよく混合し、密栓したのち－80℃のディープフリーザーで保存した。グリセリン溶液は冷凍保存中に酵母の細胞膜が凍結・破壊することを防止する目的で添加する。試験に用いた培地の組成は次のとおりである。

酵母エキス	1 %
ポリペプトン	2 %
グルコース	2 %
食 塩	1 0 %
（ 寒 天 ）	（ 2 % ）

冷凍保存した供試菌株を解凍し、米麹エキス液体培地に接種して30℃、3日間培養した時点での生育状況を肉眼観察した。その結果、AはB、Cに比べ試験管に沈殿している菌体量や気泡の発生が少なく生育が弱かった。B、Cの増殖は同等であり、旺盛であった。これは平成19年度に広島国際学院大学が行った試験結果と一致する。



写真 ディープフリーザー（－80℃）

3 実規模の試験培養に先だって種菌の調製方法を検討した。試験期間前半においては供試酵母の入手と拡大培養に必要な設備の整備が遅れたため広島県味噌共同組合から購入した培養液10ℓを直接使用した。この培養液には特定原材料は使用されず、菌体密度は 1.1×10^8 cells/mlであった。期間後半には分譲されたA, B, Cの3株を使用して種菌を調製した。すなわち、それぞれの保存スラントから1白金耳を米麴エキス液体培地に接種して30℃, 3日間培養した。培地の量は10mlからスタートし、次に150mlに植継ぎ、最終的には3ℓとし、3段階の拡大培養を行った。最終段階において、ミニジャーファーマンター（丸菱製, 5ℓ容）を用いた通気攪拌培養法及び三角フラスコ（5ℓ容）による静置培養法の採用を比較検討し、要点を表. 2に示した。

表. 2 種菌の培養方法の比較

	通気攪拌培養法	静置培養法
培養制御	○ 通気 攪拌 培養温度 } を条件に応じて 細かく制御可能 △ 装置の運転に専門知識を要する × 培養途中で激しく発泡したため、 培養液量を1ℓに減らした	△ シリコ栓を介して自然通気 手動で攪拌 培養室の設定温度による間接的 温度制御 ○ 普通程度の培養知識で対応可能 △ 緩やかに発泡するが、手動攪拌で 対応可能であった
培養効率	○ 10^8 オーダーの菌体密度が得られた	△ 10^7 オーダーの菌体密度が得られた
培養の準備	△ 相当煩雑であった	○ 比較的簡易であった
装置の価格	△ 高価格	○ 比較的低価格

結果的に、通気攪拌培養法は効率の良い培養が可能であるが、その反面発泡が激しく、必要とする液量の種菌が得られないと判断した。当面、有効な消泡技術が開発されるまで静置培養法を採用し、必要液量を確保するため3ℓ×3本を並立して培養することとした。

- 4 図.2 または図.3 に示したフローシートに従って調製した培地を用い、実規模の試験培養を繰り返しながら装置及び制御方法の改善・変更・調製を行った。

表. 3 培養槽の運転条件

項 目	条 件	備 考
培養規模	培地 400ℓ	
培養温度	$30 \pm 0.5^\circ\text{C}$	
通気量	80ℓ/分	通気管先端にセラミック製散気パイプ（最大気孔径 100～120 μm 、2 本）を装着
消 泡	超音波発信 28 kHz	30秒間隔で15秒間ホーンの先端は培養液面より約30cm上部位置に調製
攪拌速度	600rpm	
培養時間	40時間（目標）	少なくとも38時間

又、培養試験ごとの培養液について菌体密度を顕微鏡下で血球計算盤を用いて直接計測し、その結果を表. 4に示した。

表. 4 培養液の菌体密度

種菌	試験月日	培養液の菌体密度 ($\times 10^8$ cells/ml)	種菌	試験月日	培養液の菌体密度 ($\times 10^8$ cells/ml)
広島県味噌協同組合培養液	① 7月14日	7.1※	組合広島県味噌協同培養液	⑦12月8日	3.5
	② 7月28日	3.6		⑧12月15日	4.1
	③ 8月25日	4.2	A株	⑨ 1月5日	4.0
	④ 9月22日	4.4	B株	⑩ 1月26日	3.2
	⑤10月6日	4.6	C株	⑪ 2月16日	4.2
	⑥11月17日	4.5	B株	⑫ 3月16日	4.2
平 均					4.0

※ : 異常に高い、サンプリングミスか濃縮したことが考えられる

表. 3において、種菌として広島県味噌共同組合から購入した培養液を使用した場合でも広島県立総合研究所食品工業技術センターから分譲された酵母を拡大培養して使用した場合でも予想以上の良好な結果を得た。味噌用酵母を原材料フリーの培地で培養を行った場合、通常は菌体密度が $1.0 \sim 1.6 \times 10^8$ cells/ml程度とされ、よほど注意深く制御するか、または実験室での培養で 3×10^8 cells/mlレベルに達する。本開発試験ではこれを上回っていた。さらにトリバンプルーによる非染色率（≒生存率）はいずれも97%以上であり、活性が高いことが推測された。以上のことより、表. 3に示した条件を基本的培養条件に設定し、酵母の種類や増殖状況に応じて微調整を加えた。

培養を開始して15時間を経過した頃から発泡が激しくなり、泡が培養槽内上部空間に充満する。この泡の上昇は超音波により効果的に抑えられた。しかし、超音波は泡の発生

を止める効果を発揮するものでなく、発生した泡を壊すにすぎない。従って、泡センサーと超音波発振ホーン的位置（高さ）を適正にすることが実用的消泡技術となる。なお、発振の時間間隔を短く設定した場合、発振子が異常に発熱し、出力低下を来して効果を発揮しなかった。

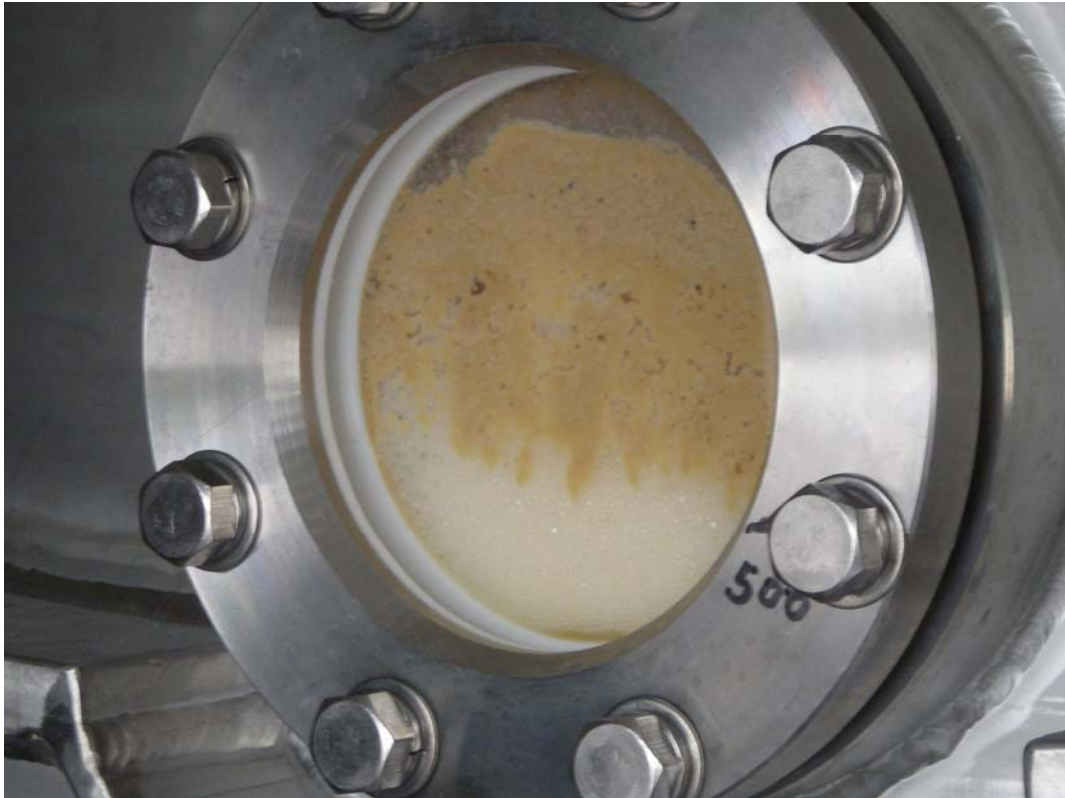


写真 培養開始後 18 時間を経過

本体のぞき窓上端を超えて泡が上昇している

第6章 培養装置の味噌添加試験・味噌の成分分析

【研究項目】（3）培養酵母の味噌添加試験・味噌の成分分析

研究内容及び成果：

試験培養を行った酵母を使用して工場規模の米味噌仕込み試験を実施した。

仕込み条件は、

麹歩合	10割（大豆と米の使用割合が等量）
食塩濃度	11.5%
仕込み単位	1t
酵母培養液	1ℓ
温度管理	工場操作に準じる
期 間	3～4ヶ月

とした。

発酵・熟成の過程において、ガスクロマトグラフィにより味噌中のアルコール生成量を分析した。

試験仕込みの中から、対照として広島県味噌共同組合から購入した培養液を並行的に添加できた

試験区を選択し、それらのアルコール及び酵母数の消長を図. 4及び図. 5に示した。

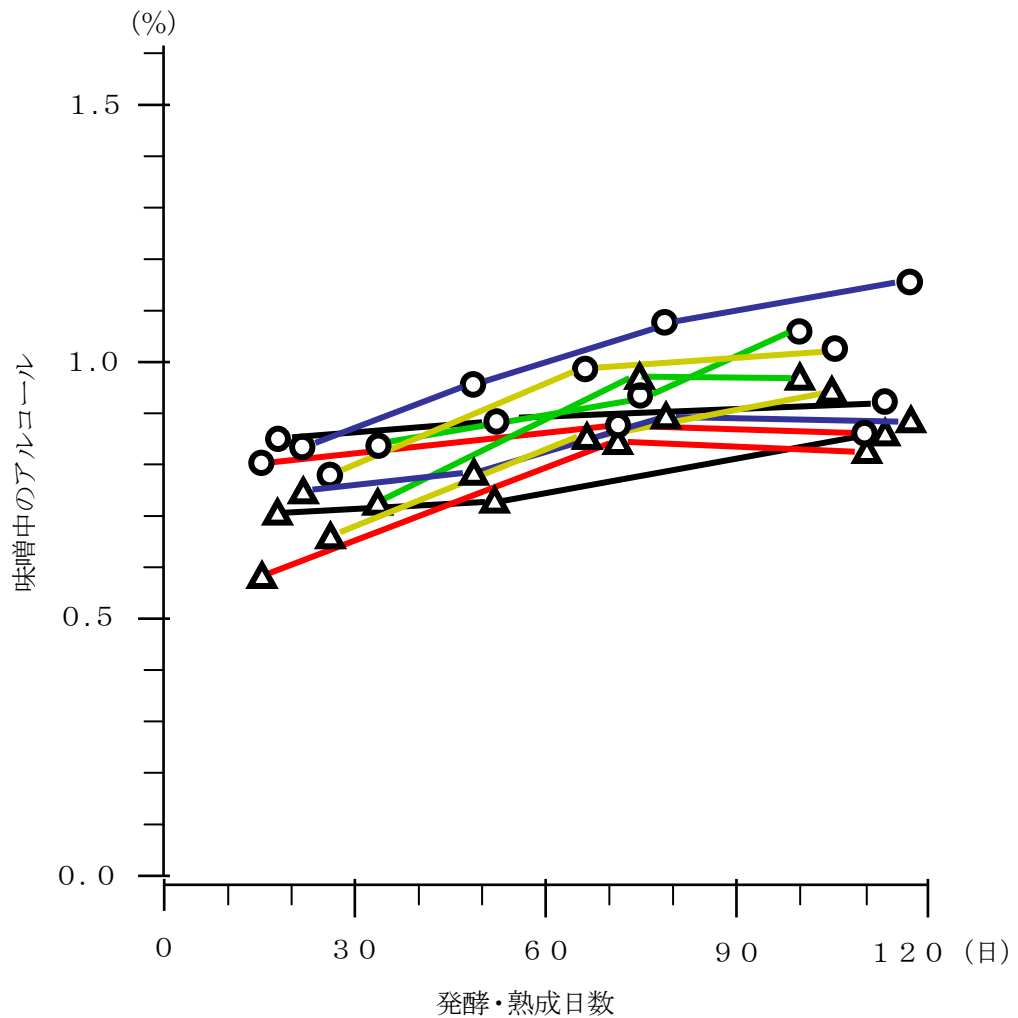


図. 4 発酵・熟成過程のアルコールの変化

- : 試験培養を行った酵母
- △ : 広島県味噌協同組合から購入した酵母
- 7月31日仕込み — 10月10日仕込み
- 8月29日仕込み — 11月20日仕込み
- 9月26日仕込み

図. 4において、酵母培養液を添加した味噌はいずれも正常な発酵を示し、酵母が性能を発揮したことが推測された。90日後のアルコールは購入培養液を添加した場合には0.7～0.9%，試験培養液においては0.8～1.1%であった。さらに、種菌が同一であるのに試験培養液を添加した場合には早い段階から発酵が旺盛になり、アルコールが0.2%以上高く推移したことから本培養技術は酵母の活性を高めることに寄与したと考えた。

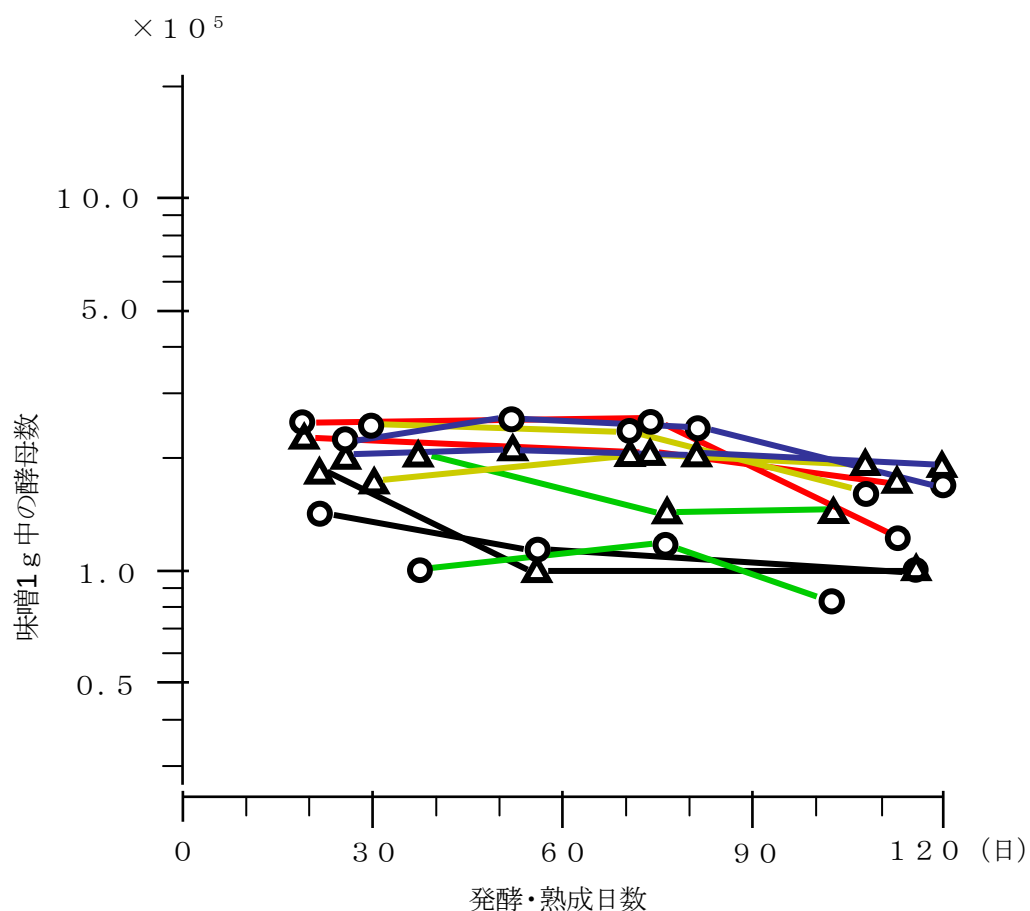


図. 5 発酵・熟成過程の酵母数の変化

- : 試験培養を行った酵母
- △ : 広島県味噌協同組合から購入した酵母
- 7月31日仕込み
- 8月29日仕込み
- 9月26日仕込み
- 10月10日仕込み
- 11月20日仕込み

図. 5において、味噌中の酵母数は正常な範囲内で推移した。

これまで、特定原材料を含まない培地で培養した場合、菌体密度・酵母の活性が低く、アルコール生成量が0.3～0.5%となり、製品化後の品質や保存性に問題を残すことがあった。本培養技術によれば、味噌を実規模で安定的に発酵・熟成できると考えた。

第 7 章 微生物利用技術及び味噌の市場動向に関する情報収集

【研究項目】（４）市場における情報収集

研究内容及び成果：

消費者を対象とした味噌講習会において味噌の機能性や安全性について意識調査と意見交換を行った。

実施名	味噌講習会
日 程	平成 20 年 8 月 21 日
場 所	スーパーサンヨネ本社（豊橋市）

その結果、消費者の食品の安全性を追求する意識は一層強まっていることが窺えた。

最終章 全体総括

【総括】

食品の安全性を追求する消費者の意識が強まる中で、食品製造業界では危険要因を排除できる技術開発は社会的な責任となってきた。安全性が高い味噌の醸造においても、食物アレルギーの原因となる特定原材料の小麦が取り上げられ、発症濃度以上の成分が酵母の培養液から味噌に移行するとして、数年前からその対処方法が検討されてきた。本開発研究では、小麦を一切使用することなく、しかも消費者の不安要因のいくつかを排除した酵母の培養技術開発を目標として実施し、次のような成果を得た。

- 1 酵母の通気攪拌培養に対応できる実規模の培養装置を設計・製作した。

容 量	8 0 0 ℓ （実培養量 5 0 0 ℓ ）
材 質	SUS316（接液部），SUS304（ジャケット部）
機 能	蒸気殺菌，温度制御，ステンレス配管，サニタリーバルブ仕様

- 2 培養装置には散気管及び超音波発信装置を付加して培養効率を向上させた。

散気管	セラミック製，気孔径 2 0 μ m， ϕ 2 4 $\times$ ϕ 9 $\times$ 2 0 0 L 微細な気泡は培養液に滞留する時間が長く，酸素の溶存が助長された
超音波発信	2 8 k Hz， 発生した泡を壊すことで実用に支障のない物理的消泡が可能であった

- 3 主培養基材には米味噌及び米麹消化物の抽出液を用い，培養に適した配合割合を設定した。

米味噌	小麦を一切使用していない
米麹消化物	原料に遺伝子組換え穀物の混入が懸念される粉末ブドウ糖の代替 微生物生育に必須とされるビタミン等の微量成分が含まれる

- 4 種酵母の管理に関して，有用菌株分離技術，拡大培養技術及び冷凍保存技術を習得した。

- 5 温度，通気量，攪拌等を適正に制御することにより，菌体密度が 4×10^8 cells/ml レベルの培養液を得ることが可能であった。これは目標値（ 2×10^8 cells/ml）を上回るものである。

- 6 試験培養液を添加し、実規模で仕込みを行った味噌は良好な発酵・熟成を示した。このことから試験培養方法が酵母の活性を高めたと推測した。

以上の結果から、特定原材料を排除した味噌用酵母培養技術は基本部分が開発され、安全・安心の実現化に向かって事業化する意義とその見通しが得られたものと判断し、今後も研究を継続する。