

## 研究論文

## 麹菌と納豆菌を併用した豆味噌の試醸

小野奈津子\*1、間野博信\*1、長谷川摂\*2、山本晃司\*1

Trial Production of Fermented Soybean Paste (*miso*) Using *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis natto*

Natsuko ONO\*1, Hironobu MANO\*1, Osamu HASEGAWA\*2 and Koji YAMAMOTO\*1

Food Research Center\*1\*2

従来とは異なるタイプの豆味噌の開発を目的として、麹菌と納豆菌を併用した「納豆麹」の調製条件を検討し、豆味噌の試醸を行った。大豆吸水率、温度、湿度の異なる試験区で製麹し、豆味噌を試醸した。大豆の吸水率 200%、湿度 90%、30℃で製麹した納豆麹を用いた豆味噌は、遊離アミノ酸量が増大した。大豆の吸水率 200%、加湿なし、35℃で製麹した納豆麹を用いた豆味噌は、健康機能性を有するポリアミンのプトレシンとスペルミジンを両方多く含んでいた。

## 1. はじめに

愛知県は、八丁味噌を始めとする豆味噌の主要産地であり、全国の豆味噌の約 8 割を醸造している。近年は、つゆ・たれ類などへの加工用原料としての用途が増大し、塩分濃度が下がることによる *Bacillus* 属細菌の発芽に起因する製品の品質劣化が問題化した。そこで、食品工業技術センターでは、抗菌性乳酸菌（ナイシン生産菌）の利用による豆味噌用麹中の *Bacillus* 属細菌数を低減化する技術を開発した<sup>1)</sup>。しかし、抗菌性乳酸菌を利用した豆味噌は、味がおとなしく深みが無いなどの意見が製造現場から寄せられた。一方、*Bacillus* 属細菌の一種である納豆菌を利用して製造する納豆には、ポリアミンの細胞の増殖・分化促進能、抗酸化作用および炎症抑制効果<sup>2)~4)</sup>などの健康機能性がある。そこで、豆味噌の製造に使用される麹菌と納豆菌をバランスよく増殖させた「納豆麹」を造れば、両微生物の発酵物が含まれた、旨味に富み、かつ高い機能性を有する豆味噌を醸造できると考えた。本研究では、納豆菌を利用して調製した納豆麹を用いて豆味噌を試醸し、遊離アミノ酸分析・ポリアミン分析を行ったので報告する。

## 2. 実験方法

## 2.1 実験材料

大豆は北海道産「つるの子」大豆、納豆菌は粉末納豆菌（成瀬醗酵化学研究所）、種麹は豆味噌用種麹（株）ピオックを使用した。香煎（尾張製粉（株））は 100℃で 2 時間乾熱滅菌して使用した。

## 2.2 納豆麹の調製

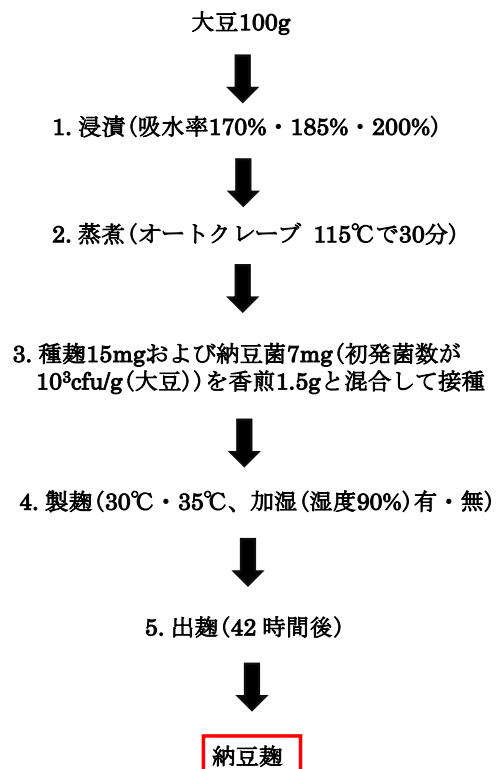


図1 納豆麹の調製方法

納豆麹は図1のフローに従って調製を行った。なお、18 時間後に一番手入れ（混合）を、24 時間後に二番手入れ（混合）を行った。同時に対照として大豆麹および納豆を調製した。試験区を表1に示す。大豆の吸水率（大豆重量の 170%、185%、200%）、製麹温度（30℃、35℃）、加湿（湿度 90%）の有無からなる 12 試験区の納豆麹（NK）に、2 試験区の大豆麹（K）および 4 試

\*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 \*2 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室（現分析加工技術室）

験区の納豆 (N) の計 18 試験区を調製した。

表 1 試験区一覧

試験区	吸水率 (%)	温度 (°C)	麹菌	納豆菌	加湿
170-30K	170	30	○	—	—
170-35K	170	35	○	—	—
185-30N	185	30	—	○	—
170-30NK	170	30	○	○	—
185-30NK	185	30	○	○	—
200-30NK	200	30	○	○	—
185-35N	185	35	—	○	—
170-35NK	170	35	○	○	—
185-35NK	185	35	○	○	—
200-35NK	200	35	○	○	—
185-30NK90	185	30	—	○	○
170-30NK90	170	30	○	○	○
185-30NK90	185	30	○	○	○
200-30NK90	200	30	○	○	○
185-35NK90	185	35	—	○	○
170-35NK90	170	35	○	○	○
185-35NK90	185	35	○	○	○
200-35NK90	200	35	○	○	○

N: 納豆, K: 大豆麹, NK: 納豆麹

### 2.3 走査電子顕微鏡による納豆麹の観察

納豆麹をグルタルアルデヒド溶液 (4%グルタルアルデヒド/0.2M リン酸緩衝液、pH7.2) に室温で 3 時間浸漬し、固定した。洗浄後、ステンレス剃刀で約 5mm 角に切断した試料片をオスミウム溶液 (1%四酸化オスミウム/0.1M リン酸緩衝液、pH7.2) に室温で 2 時間浸漬し、固定した。洗浄後、50、70、80、90、95、100% エタノールで順次脱水し、エタノールを t-ブチルアルコールに置換した。一晚凍結乾燥を行った後、試料台に固定した。表面をイオンスパッタリング (白金/パラジウム、SFC-1100 型、日本電子 (株)) し、走査電子顕微鏡 (JSM-6010PLUS/LA In Touch Scope、日本電子 (株)) にて加速電圧 10kV で微細構造を観察した。

### 2.4 納豆麹の評価

納豆麹の菌数は、カビサイジン (終濃度 100µg/ml) を添加したニュートリエント寒天培地を使用し、35°C で 48 時間培養後の菌数を計測した。納豆麹のプロテアーゼ活性 (pH6.0) の測定は、基準みそ分析法<sup>5)</sup>に準じて行った。

### 2.5 豆味噌の試醸

大豆麹の出麹重量および出麹水分の値から水分 47% かつ食塩濃度 11%となるように仕込配合を計算し、調製した納豆麹に加水、加塩した後、均一化し、25°C において 3 か月間発酵・熟成を行った。

### 2.6 豆味噌の遊離アミノ酸とポリアミンの定量

豆味噌の遊離アミノ酸の分析は、基準みそ分析法<sup>5)</sup>に従って熱水抽出した浸出液を用いて行った。浸出液を水

で希釈し、孔径 0.22µm のセルロースアセテートフィルターでろ過した後、超高速液体クロマトグラフ「Nexera X2」(島津製作所 (株)) による自動プレカラム誘導体化アミノ酸分析法で分析した。

ポリアミン (プトレシン、スペルミジン、スペルミン) の分析は、食品衛生検査指針<sup>6)</sup>に記載のダンシルクロライド蛍光誘導体化法を一部改良して行った。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 納豆麹の調製

調製した麹および納豆の外観観察写真を図 2 に示す。納豆菌と種麹を接種したすべての試験区 (NK) について、麹菌の菌糸で覆われ且つ納豆菌の糸が引く納豆麹が調製できた (図 2 B)。

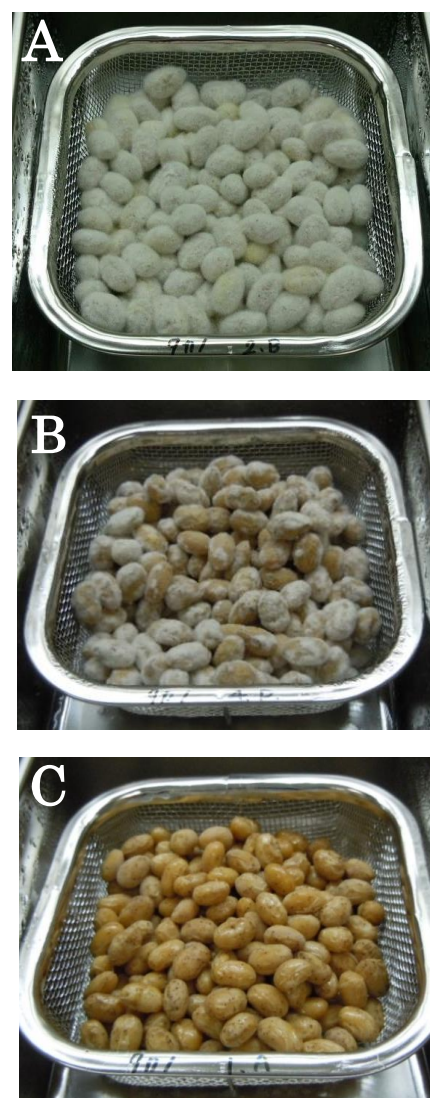


図 2 麹および納豆の外観観察写真

A: 大豆麹 (170-35K)

B: 納豆麹 (200-35NK)

C: 納豆 (185-35N)

これら納豆麴を走査電子顕微鏡で観察したところ、麴菌菌糸の間に桿菌である納豆菌が多数観察され、麴菌と納豆菌が双方共に良好に生育する様子が観察された。そのうちの 1 試験区を図 3 に示す。本調製方法により、麴菌と納豆菌が双方共に良好に生育する納豆麴が得られることが示された。

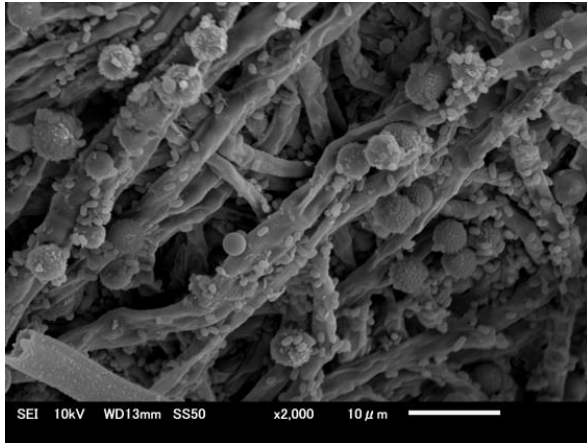


図 3 納豆麴(200-35NK)の SEM 観察写真 (2,000 倍)

### 3.2 麴の評価

調製した麴および対照となる納豆の納豆菌数と豆味噌製造で麴の品質評価の指標の一つとして用いているプロテアーゼ活性 (pH6.0) を測定した (表 2)。

表 2 麴・納豆の納豆菌数とプロテアーゼ活性

試験区	納豆菌数 (cfu/g)	プロテアーゼ活性 (U/dry麴)
170-30K	N.D.	50
170-35K	N.D.	41
185-30N	$1.2 \times 10^9$	67
170-30NK	$1.9 \times 10^8$	61
185-30NK	$4.3 \times 10^8$	38
200-30NK	$9.7 \times 10^7$	39
185-35N	$5.3 \times 10^8$	87
170-35NK	$7.2 \times 10^7$	43
185-35NK	$3.1 \times 10^8$	87
200-35NK	$1.1 \times 10^8$	102
185-30N90	$1.5 \times 10^9$	99
170-30NK90	$1.3 \times 10^7$	66
185-30NK90	$3.4 \times 10^7$	59
200-30NK90	$5.3 \times 10^8$	43
185-35N90	$3.7 \times 10^9$	135
170-35NK90	$7.2 \times 10^8$	41
185-35NK90	$7.1 \times 10^8$	39
200-35NK90	$1.6 \times 10^9$	57

N.D.; Not Detected (不検出)

納豆菌を接種したすべての試験区 (N および NK) において、納豆菌数は  $10^7 \sim 10^9$  cfu/g と初発の  $10^3$  cfu/g に比べて増大していた。一部の試験区を除いて、吸水率が

きいほど納豆菌数が多い傾向にあった。加湿の有無による納豆菌数の差は認められなかった。

プロテアーゼ活性を測定した結果、対照の大豆麴 170-30K 試験区を上回る活性を示した納豆麴 (NK) は、170-30NK、185-35NK、200-35NK、170-30NK90、185-30NK90、200-35NK90 の 6 試験区であった。そのうち、200-35NK 試験区の活性が最も高かった。また、納豆 (N) のプロテアーゼ活性は、200-35NK の試験区を除いて、吸水率以外について同じ条件で製麴された納豆麴以上の値となった。

### 3.3 試醸豆味噌の分析

プロテアーゼ活性の測定結果からは、納豆菌の高いプロテアーゼ活性の働きに起因する豆味噌の遊離アミノ酸量の増加が期待されたため、これらの麴および納豆を用いて豆味噌を試醸し、遊離アミノ酸分析を行った。また納豆菌による機能性成分の付与を調べるために、試醸した豆味噌のポリアミン分析を行った。

#### 3.3.1 試醸豆味噌の遊離アミノ酸分析

試醸した豆味噌の旨味の指標となる遊離アミノ酸を分析した結果を表 3 に示す。

表 3 試醸豆味噌の遊離アミノ酸(mg/100g)

試験区	アスパラギン酸	グルタミン酸	総アミノ酸
170-30K	687	1,143	6,646
170-35K	746	1,281	6,298
185-30N	25	70	587
170-30NK	700	1,176	6,439
185-30NK	742	1,212	6,613
200-30NK	830	1,312	6,805
185-35N	43	105	893
170-35NK	684	1,119	6,176
185-35NK	364	606	4,258
200-35NK	438	656	4,768
185-30N90	46	108	740
170-30NK90	795	1,233	6,840
185-30NK90	789	1,246	6,951
200-30NK90	921	1,460	7,797
185-35N90	86	223	1,777
170-35NK90	815	1,361	7,386
185-35NK90	799	1,291	7,067
200-35NK90	608	1,006	5,904

納豆麴 (NK) を用いて試醸した豆味噌の中で、対照の大豆麴 170-30K 試験区を用いて試醸した豆味噌を上回る遊離アミノ酸量を示した試験区は、200-30NK、170-30NK90、185-30NK90、200-30NK90、170-35NK90、185-35NK90 の 6 試験区であった。そのうち、200-30NK90 試験区の総アミノ酸量が最も多く、旨味アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸が最も多かった。麴の中性プロテアーゼ活性と豆味噌の遊離アミノ酸生成に相関関係は見られなかった。しかし、納

豆麴を用いて試醸した豆味噌試験区 (NK) の半数は対照試験区 (K) に比べて総アミノ酸量が増加したため、納豆菌に由来するタンパク質分解酵素に関連する相乗効果が示唆された。

納豆麴を用いて試醸した豆味噌の総アミノ酸量は、30℃で高く、35℃で低くなる傾向を示した。30℃は納豆菌より麴菌の生育に適した条件である。納豆菌より麴菌の遊離アミノ酸生成への寄与が大きいいため、35℃より高い総アミノ酸量を示したと考えられた。

30℃で製麴した納豆麴を用いて試醸した豆味噌試験区 (30NK) では、大豆吸水率が高くなるほど総アミノ酸量が多かった。これは、30℃なので麴菌の生育は十分であり、そこに加わる納豆菌酵素の効果が、納豆菌の生育に適した高吸水率である方が高くなったためと考えられた。

### 3.3.2 試醸豆味噌のポリアミン分析

試醸した豆味噌のポリアミン (プトレシン、スペルミジン、スペルミン) を分析した結果を表4に示す。

表4 試醸豆味噌のポリアミン(ppm)

試験区	ポリアミン	
	プトレシン	スペルミジン
170-30K	37	5
170-35K	40	2
185-30N	7	61
170-30NK	37	4
185-30NK	41	4
200-30NK	35	4
185-35N	8	82
170-35NK	48	9
185-35NK	37	3
200-35NK	29	23
185-30N90	9	62
170-30NK90	47	4
185-30NK90	42	3
200-30NK90	50	3
185-35N90	7	77
170-35NK90	47	6
185-35NK90	45	6
200-35NK90	41	12

そのうち、スペルミンはダンシルクロライドとの反応率が低く、定量的なデータが得られなかったため、ここでは分析値を示さなかった。麴菌を使用した試験区 (K および NK) でプトレシン量が多く、納豆菌のみの試験区 (N) でスペルミジン量が多くなった。200-35NK 試験区は、従来の豆味噌に多く含まれるプトレシンと、納豆に多く含まれるスペルミジンを両方含んでおり、麴菌と納豆菌とが共に寄与した結果となった。

## 4. 結び

本研究の成果をまとめると、以下のとおりである。

- (1)大豆の吸水率 200%、湿度 90%、30℃で製麴した納豆麴を用いると、従来の豆味噌より遊離アミノ酸が多い豆味噌ができた。
- (2)大豆の吸水率 200%、加湿なし、35℃で製麴した納豆麴を用いると、従来の豆味噌に多く含まれるプトレシンと、納豆に多く含まれるスペルミジンを両方含む豆味噌ができた。

## 付記

本研究は、公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団平成 26 年度研究助成により実施した。

## 文献

- 1) 加藤丈雄：日本食品科学工学会誌，**47**，752-759 (2000)
- 2) Susan, B. , George, G. , David, B., Ralph, A. and Pusztai : *J. Nutr. Biochem.*, **4**, 66-71(1993)
- 3) Nishibori, N. , Fujihara, S. and Akatuki, T. : *Food Chem.* , **100**, 491-497 (2006)
- 4) Soda, K., Kano, Y., Nakamura, T. , Kasono, K. , Kawakami , M. and Konish , F. : *J. Immunol.* , **175**, 237-245 (2005)
- 5) 全国味噌技術会：みそ技術ハンドブック付 基準みそ分析法(1995) , 全国味噌技術会
- 6) 厚生労働省：食品衛生検査指針 理化学編(2005), 社団法人食品衛生協会
- 7) 中野政弘：味噌の醸造技術(1982), 財団法人日本醸造協会