本実験に供試した菌株の分譲を願った財団法人醸酵研究所, 長谷川武治博士, 並びに香川大学農学部内藤中人教授, 山中 啓助教授, 及び 9 α -hydroxy-4-androstene-3, 17-dione の標準品を送付頂いた G. D. Searle and Co. の Dr. R. M. Dodson の各位に謝意を表します。なお, 本研究の遂行にあたり終始鞭撻指導を頂いた当研究所増尾栄太郎研究員, 並びに本研究の発表を許可された研究所長武田健一博士に感謝いたします。

(1) G. M. Shull, D. A. Kita : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 763 (1955).	(6) R. B. Burton, A. Zaffaroni, E. H. Keutmann : <i>J. Biol. Chem.</i> , 188, 763 (1951).
(2) G. M. Shull, R. Heights, D. A. Kita et al. : U. S. Patent, 2, 658, 023 (1953).	(7) S. H. Eppstein, P. D. Meister, D. H. Peterson et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 80, 3382 (1958).
(3) G. M. Shull, H. Station, D. A. Kita et al. : <i>ibid.</i> , 2, 745, 784 (1956).	(8) R. M. Dodson, R. D. Muir : <i>ibid.</i> , 80, 6148 (1958).
(4) G. M. Shull, H. Station, D. A. Kita et al. : <i>ibid.</i> , 2, 783, 255 (1957).	(9) 近藤栄二, 他 : 未発表.
(5) A. Zaffaroni, R. B. Burton, E. H. Keutmann : <i>Science</i> , 111, 6 (1950).	(10) 早川昌平, 他 : 日本生化学会中国四国部会講演 (1960 年 5 月).

〔農化 第 35 卷, 第 6 号, p. 528~533, 1961〕

味噌および醤油の γ 線照射 (その1)*

味噌の湧きに対する照射効果

並木満夫, 岡沢精茂 (理化学研究所)

松山 晃 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 35 年 11 月 5 日 受理

原子力平和利用の重要な一分野として, 放射線照射による食品の保存法が注目されており, わが国でも最近この分野の研究が活潑に行われている。著者らも従来よりこの問題について, 基礎的ならびに応用的見地から諸研究を行ってきたが, その一環として主としてわが国で広く用いられている食品, とくに醸造食品について放射線照射の効果をいろいろの面から検討してきた。本研究はこれらのうち味噌および醤油に対する γ 線照射の効果を, 湧きの防止, 微生物の動態, 色, 香味などに及ぼす影響などの面から検討したもので, これについて順次報告する。

本報ではまず味噌の湧きにおよぼす γ 線照射の効果についてのべる。味噌の湧きは後醸酵によりガスを発生し味噌が膨れる現象で, 従来より樽詰の場合でも商品価値を低下させる点で問題になっていたことであるが, 最近包装材料の進歩に伴ない味噌を合成樹脂製の小袋に密封して販売することが可能になったので, とくにこの湧きによるガス発生防止が重要視されている。この現象に関する研究報告は少ないが, 茂木⁽¹⁾によりこれが主として好気性の酵母類による後醸酵であることが報告されている。しかしその定量的な測定結果は報告されていないので, 著者らはまず湧きにより発生するガスをマンネトリックに測定する方法を検討し, 湧きガスの発生量に対する γ 線照射の効果を観察すると同時に, 湧きガスの化学分析, 赤外分析などを行ない, また統報⁽²⁾にのべる微生物の動態との関連を検討した。

実験には少糖多塩型の味噌として信州味噌および仙台味噌を, 多糖少塩型の味噌として江戸甘味噌を選んで試料として用いたが, 個々の問題に関してはとくにその目的の研究に好適なものを選んで使用した。例えば湧きについては少糖多塩型の味噌は湧き難く実験に日時を要するので, 最も湧き易い江戸味噌を主に試料とした。

実験方法

1. 試料および採取方法 本実験に用いた味噌は信州速醸味噌 (醸造期間 3 か月程度のもの) および天然味

* Gamma Irradiation of Miso and Soy Sauce. Part I. Radiation Effects on "Waki" of Miso.
By Mitsuo NAMIKI and Yoshishige OKAZAWA (The Institute of Physical and Chemical Research),
Akira MATSUYAMA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University
of Tokyo)

噌(醸造期間約1か年のもの), 仙台味噌, 江戸甘味噌の3種であり, 製造直後のものを用いた.

試料はなるべく条件を一定にするために, 同一工場の同一仕込方法の製品を用いたが, その分析結果の1例をあげると第1表の如くである.

第1表 試料味噌の成分分析

	食塩	全糖	還元糖	pH	水分
信州味噌(速醸)	13.34		12.71	5.50	52 %
" (天然)	13.97		15.94	5.55	48
仙 台 味 噌	15.23	15.99	12.86	5.20	48.5
江 戸 甘 味 噌	5.77	25.35	18.18	5.60	48.5

試料は約 19 kg 入の樽詰から, その中心部のみを採取して良く混じったものを無菌セロファンチューブ (ディフコ社製, 幅 30mm) に特殊な注射筒で詰めて照射を行った. またなるべく空気に触れないように樽中から直接採取する場合は, 第1図Aに示した試料管を用いて採取し, これをそのまま照射に用いた.

2. 照射方法 試料の照射は, 主として理化学研究所抗生物質研究室所属の生物用 ^{60}Co γ 線照射装置⁽²⁾を用いて行なった. 線源は ^{60}Co コイン型約 270 c, 線量率は $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ r/hr で, 主として $6 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ r/hr を用いた.

試料は前述のように透析用セロファンチューブに詰めて直径約 2cm のソーセージ状としたもの, または第1図の試料管に詰めたものを線源より同一距離の板上に並べて照射を行なった. 照射中の温度は大体 $10 \sim 20^\circ$ の室温である. ただし夏期の室温の高いときは冷却して照射を行なった.

照射線量は $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$ 溶液による化学的線量測定法および Victreen γ -meter による物理的測定法を用い, 試料の照射と同じ条件における線量率を測定して算出した.

3. 味噌湧きガス測定方法 味噌の湧きガスをマンOMETリックに測定するために, 試料の量に応じて適当なガス測定装置を用いたが, そのうちセロファンチューブで照射したものを詰めまたは試料管で照射したものを直接測定するために使用したものを第1図に示した.

試料Dを入れる試料管(A)の部分は, 直径が 2.5cm 程度, 長さ 10cm 程度の普通の塩化カルシウム管のような容器で, これを予め滅菌したものに試料を約 20~25 g 採取し, 広口部をゴム栓で密栓して, 他端を装置に付ける. B の部分は内容約 150 ml のメスシリンダーで, これに水銀を入れるか, 或いは上面を 3cm 位の厚さの流動パラフィンでおおった 5% 希硫酸を入れた*. 以上の装置全体を $30 \sim 32^\circ$ の恒温室内に入れるか, または試料部Aを恒温水槽内に浸して B, C の水準を合せてガスの発生量を経時的に測定した. ガス量が 100 ml を越えるときは, 三方コックによってガスを追出して水準を戻し(ガス量を積算して)観測を続けた.

4. 湧きガスの成分分析 味噌の湧きガスの成分分析には第1図に示した装置の大型のものを使用してガスを採取した. すなわちA部は大型広口瓶に江戸甘味噌 500 g を入れ, B 部は水銀を入れて発生ガスを留め, これよりガスを 100 ml 宛分取して Orsat-Lunge のガス分析器により 25% KOH 溶液, 発煙硫酸, アルカリ性ピロガロール液の各液により吸収される容量を測った. また赤外スペクトルの測定は東京応用光研製 Koken DS 301 型赤外分光分析器により, ガス用セルを用いて行なった.

また, A~B 部の間に蛇管をつなぎ, この蛇管を固型炭酸-アセトン浴中に入れて冷却し, 発生ガスのうちこの温度で凝縮する部分を集め, 得られた液体についてガスクロマトグラフィー及び化学分析を行なった. ガスクロマトグラフィーは Perkin Elmer Model 154-C 型ガスクロマト装置により tetraethylene glycol-2-methyl ether 充填管を用いて He ガスを carrier として温度 62° , 圧力 20 mm で分析した.

結果並びに考察

1. 湧き 湧きによるガスの発生量を経時的に測定し, ガス発生量の積算量を試料 1 g 当りに換算した値を示したものが第2図~第4図である.

各実験とも試料を大体 20~30 g ずつ取り, 各照射線量とも2連または3連分析で, 2回ないし4回繰返し測

* ここに入れる液体は水銀が望ましいが, 予備実験の結果, 流動パラフィンと水または希硫酸でもほとんど変わらなかった.

第1図 味噌湧きガス測定器

A: 試料管 B, C: ガス溜
D: 味噌試料

第2図 γ 線照射による湧きガス発生量の変化(その1)
江戸甘味噌
(1) 非照射, (2) $5 \times 10^5 r$, (3) $1 \times 10^6 r$, (4) $1.3 \times 10^6 r$

第3図 γ 線照射による湧きガス発生量の変化(その2)
信州速醸味噌
(1) 非照射, (2) $2.5 \times 10^5 r$, (3) $5 \times 10^5 r$

第4図 γ 線照射による湧きガス発生量の変化(その3)
(A) 仙台味噌, (B) 信州天然味噌
(1) 非照射, (2) $2.5 \times 10^5 r$, (3) $5 \times 10^5 r$

以上の結果, 多塩型の味噌では $5 \times 10^5 r$ の照射で湧き防止の目的を大体達しえられる。多糖少塩型の味噌では $1 \times 10^6 r$ の照射でも必ずしも湧きを防止することができず, $1.5 \times 10^6 r$ 以上を必要としている。

3. 味噌湧きガスの成分分析: 味噌の湧きで発生したガスを水銀を入れたマンオメータで捕集し, その 100 ml を Orsat-Lunge 式の簡易ガス成分分析器で分析した結果は, 25% 苛性カリ溶液に速やかに吸収される部分

定した結果, 大体一致した結果を与えたものを示したものである。

1) 少塩多糖型味噌: 第2図は少塩多糖型の江戸甘味噌の場合で, この味噌は最も湧き易く, 非照射の対照区では数時間後より湧き始め, 大体3日間位激しいガス発生が続き, 停止状態になる。対照区のガス発生量は1g当り12~15mlであった。 γ 線照射区は第2図に示した如く $5 \times 10^5 r$ では誘導期が多少伸びガスの発生は7~8 ml/gに, $1 \times 10^6 r$ では4~5 ml/g以下に抑えられる。これらの図に見られるように誘導期に大体直線に近い比較的弱いガスの発生が見られること, 及び発生ガス総量が照射線量に比例して抑えられていることは, 次の微生物の動態と関連して興味ある問題点であろう。すなわち前者の原因については照射により微生物の不活性化と著者等が呼んでいるところの, 増殖はできないが呼吸はしている状態の微生物による現象と考えられる。照射によりガス発生量が減っていくことは, 次報で報告する各種微生物の生菌数を測定した結果と照合してみると, 湧きの原因についての問題を提起していると考えられる。

なお江戸甘味噌の湧きガス測定において, 対照群の味噌の湧きガス発生が飽和に達した後, そのまま放置すると発生したガスは漸次吸収されて器内は減圧になっていくことが観察された(第2図参照)。この現象は発生したガスがほとんど炭酸ガスであることから, これが中和されて吸収されるのではないかと考えられるが, この原因については検討中である。

2) 多塩型味噌: 食塩含量13~15%程度の味噌として信州味噌及び仙台味噌について行なった結果を第3図, 第4図にそれぞれ示した。この型の味噌はこれらの結果に示したように, 信州系の速醸味噌で7日頃より, 天然味噌では10日頃よりガスが発生し始め, 40日目で2.0~5.0 ml/gのガス量が発生し恒量に達している。これに対して照射したものは $2.5 \times 10^5 r$ で約半量に減じ, $5.0 \times 10^5 r$ では20日目頃まで完全にガスの発生が抑えられており, その後幾分ガスの発生が見られる。

第 5 図 味噌湧きガスの赤外吸収スペクトル (試料: 江戸甘味噌)

A 非照射味噌の湧きガス B 5×10^5 r 照射味噌の湧きガス

が照射, 非照射いずれの場合でも 99.5~99.7% であって, 主として炭酸ガスより成るものと考えられる. 湧きガスの赤外吸収スペクトルには第 5 図に示すように CO_2 の吸収以外に CH および OH にもとづく吸収が見られ, アルコールガスの含有も推定される. 事実前述のように「湧き」で発生したガスの中, 固型炭酸で液化する部分を集めガスクロマトグラフィーを行った結果, そのクロマトグラムは対照の純エチルアルコールと同一であることからエチルアルコールの存在が認められる. また凝縮液体の 1 部 1.0 ml をとり, 3,5-dinitrobenzoyl-chloride 0.3 g と暫時加温して反応させ, 冷後, 沈殿物を 5% 炭酸ナトリウム溶液で処理して不溶部をとり, 希メタノール溶液より再結晶して m. p. 93° の無色針状結晶を得た. これは 3,5-dinitrobenzoic acid ethyl-ester の標品と混融して融点の低下を示さなかった. これらの事実からエチルアルコールの存在が確認された.

なお湧きガスは非照射試料により採取したものと, 照射した試料より採取したものとの間に上記のいずれの方法によっても分析結果の差異は認められなかった.

4) 照射と加熱の協力効果: 照射を受けた微生物, 酵素は加熱に対する抵抗性が弱くなり, 加熱殺菌あるいは熱失活をうけ易くなることが報告されている⁽⁸⁾ので, 著者らは照射による味噌の湧き防止に際し, 加熱の協力効果を検討した.

第 6 図 γ 線照射および加熱による湧きガス発生量の変化 (試料: 江戸甘味噌)

照射	加熱 30°, 10分	照射	加熱 30°, 10分
(1) 0	—	(4) 1×10^6 r	—
(2) 0	+	(5) 5×10^5 r	+
(3) 5×10^5 r	—	(6) 1×10^6 r	+

実験の材料は少塩多糖型の江戸甘味噌を使用し, 照射条件等は前記の場合と同様である. 加熱は照射区同様に味噌をセロファンチューブに詰めたものをビニール袋に入れ, 湯浴中に浸して品温 60° , 10 分間の加熱を行なった. 非照射, 5×10^5 r 照射のおおのについて加熱処理の有無の区を作り, 湧きガスの発生状態を経時的に測定した結果を第 6 図に示した.

照射のみによる湧き抑制効果は第 2 図の結果と同様に, 5×10^5 r, 1×10^6 r ではいずれも完全でない. 完全に抑制するためにはこれ以上の線量を要するが, その場合統報で述べるように照射臭の発生が著しくなる. 一方加熱処理も 60° , 10 分では 5.0×10^5 r 照射と同様, ガスの発生量を半量程度に抑えるだけで完全ではない. しかし照射後に加熱を行なったものはそのいずれよりも有効であり, 明らかな協力効果が見られ

第 2 表 江戸甘味噌の「湧き」と微生物生菌数
(本実験における湧きは 30~32° の室温において判定したもの)

No.	試料	試料中の微生物数 (g)		
		酵 母	好気性細菌	嫌気性細菌
1	ほとんど湧いていないもの	1.7×10^5	3.3×10^7	3.3×10^5
2	{ No. 1 を 4 日間おいてさかん に湧くようになったもの	1.9×10^7	6.2×10^7	3.8×10^5
3	さかんに湧いているもの	1.4×10^7	8.8×10^6	6×10^5
4	{ No. 3 を 60°, 50 分火入れし て湧かなくなったもの	1.5×10^5	8.5×10^6	4×10^5
5	わずかに湧いているもの	1.3×10^6	3.1×10^7	9.1×10^5
6	{ No. 5 を 30 時間おいてさかん に湧くようになったもの	3.0×10^6	6.2×10^7	9.8×10^5
7	湧いているもの	9.5×10^5	—	6.0×10^5
8	{ No. 7 を 4 日間おいてガス 発生がおわったもの	2.5×10^7	—	1.5×10^6
9	{ No. 7 を 50 万 r 照射したもの			
	照 射 直 後*	2.8×10^4	—	2.7×10^4
	2 日 後**	3.0×10^5	—	3.2×10^4
10	{ No. 7 を 100 万 r 照射したもの			
	照 射 直 後*	9.0×10^2	—	1.0×10^3
	3~4 日 後**	$2 \sim 3 \times 10^5$	—	$\sim 1.5 \times 10^3$
11	{ 長期間保存してほとんど湧か なくなったもの			
	8 日 後***	3.8×10^7	—	1.6×10^4
11	{ 長期間保存してほとんど湧か なくなったもの	1.4×10^6	7.5×10^7	1.4×10^5

* ゆるやかに湧いており, ガス発生率はほぼ一定のもの。

** さかんにガス発生がみられるもの。

*** ガス発生量が一定値に達したもの。

な機構も考えられる。

以上にのべた実験結果は, 湧きにアルコール醗酵を含む後醗酵が関与することを明らかに示しており, また $5 \times 10^5 \text{ r} \sim 1 \times 10^6 \text{ r}$ 程度の照射によってガスの発生が殆んどみられなくなるが, この程度の線量では化学反応によるガスの発生が抑制されるとは考えがたく, 一方統報のように微生物の動態にはかなりの変化が認められることから, 湧きガス発生に微生物とくに酵母が主要な役割を演じていると考えられる。

事実, 江戸甘味噌の湧いているものと, 湧いていないものとの微生物生菌数を比較したところ, 第 2 表に示す湧きと好気性細菌もしくは嫌気性細菌の数の間には相関関係は認められないが, 湧いている味噌ではおおむね $10^6/\text{g}$ 以上の酵母生菌数が見いだされた。ただし特殊な例として No. 11 の長期間保存 (低温室で) したもので, ほとんど湧かなくなった味噌に $10^6/\text{g}$ 程度の酵母生菌数が見られた。しかし湧きが酵母のみによるかどうかは検討を要する。たとえば, 統報にのべるように酵母類は照射後の生菌数が急速に増大して非照射のものと同じになることが観察されているが⁽⁵⁾, 湧きガスの発生総量は第 2 および第 6 図のように照射線量に応じて減じており, この対比から必ずしも酵母類の後醗酵にのみよるものであるとはいえないと考えられる。

要 約

以上著者らが味噌, 醤油に対する γ 線照射の効果に関して研究を行なったうち, 本報においては味噌の湧きに対する効果を検討した結果を報告したが, これを要約すれば次の如くである。

(1) まず, 味噌湧きガス測定装置を用いて, 各種の味噌の非照射対照試料についてガス発生状態を測定した。その結果 30~32° で多糖少塩型の味噌では数時間後よりガスを発生し, 3 日間位激しいガスの発生が続いたのち恒量に達する。ガス発生量は 12~15 ml/g であった。多塩型の味噌では 7 日目頃よりガスが発生し, 40 日位で 2~5 ml/g のガスを発生して恒量になる。

(2) 味噌を γ 線照射した場合, 多糖少塩型の味噌では $5 \times 10^5 \text{ r}$ でガス発生量が約半量に減じ, $1 \times 10^6 \text{ r}$ では 1/3 以下に抑えられる。多塩型の味噌では $2.5 \times 10^5 \text{ r}$ で約半量に減じ, $5 \times 10^5 \text{ r}$ でほとんど抑制された。

(3) 湧きガスを採取して化学分析, 赤外分析, ガスクロマトグラフィーを行った結果, その 99.5% 以上が苛性アルカリ可溶で, 主として炭酸ガスを含むほかエチルアルコールの存在が確認された。発生したガスの組成については, 照射, 非照射の間に差異はみとめられなかった。

る。ただしこの協力効果はガス発生量に関する限り相乗的なものでなく相加的であり, この点酵母への線量効果が大体相加的なのと対応している。このような他の物理的手段併用の有効性は照射による微生物致死効果に対し協力作用をもつ化学薬剤の研究及び薬品類による照射臭発生その他の副反応防止に関する研究とあいまって, 放射線による食品保存実用化の最も重要な手段, 方向を示唆するものであらう。

5) 照射による湧き防止と微生物動態について 湧きの原因については酵母類の後醗酵によるという見解⁽¹⁾が支持されているが, またいわゆるアミノカルボニル反応による炭酸ガスの発生⁽⁴⁾というような非微生物的

(4) 照射とその後の弱い加熱処理の併用は, そのいずれの単独処理の場合よりも湧きガスの発生を抑制し, 相加的な効果が認められた。

(5) 上記の分析結果及び湧いている味噌, 湧いていない味噌の微生物の生菌数測定結果からも, 湧きの現象がアルコール発酵を含む後発酵にもとづくと考えられる。しかし, 続報の微生物の動態と比較考察した場合, 酵母類では照射後減少した生菌数が急速に回復して非照射の対照と同じになるが発生ガス量が少いので湧きが酵母類の後発酵のみに起因するかどうかは検討を要する。

終りに, 本研究に関して終始御指導を戴いた東京大学教授, 理化学研究所主任研究員住木諭介先生に厚く感謝の意を表します。また, 赤外分析を担当された相沢一行氏, 実験に協力された斎藤 隆君, 試料その他に種々御援助を頂いた山印信州味噌株式会社, 株式会社油又商店, 日本味噌株式会社, 東京味噌技術協会など関係方面に感謝いたします。また研究費の一部は文部省科学試験研究費によった。

(本報告の内容に関しては昭和 33 年 5 月, 日本農芸化学会年次大会において講演発表した。)

(1) 茂木正利, 中島茂次: 醸造学誌, 20, 107, 155, 258 (1942).	der: <i>J. Bact.</i> , 70, 7 (1955).
(2) Y. Okazawa, M. Namiki, S. Yamashita, A. Matsuyama: <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.</i> , 24, 235 (1960).	(4) A. Schönberg, R. Moubasher, A. Mostafa: <i>J. C. S.</i> , 1948, 176.
(3) G. E. Stapleton, A. J. Sbarra, A. Hollander: <i>J. Bact.</i> , 70, 7 (1955).	(5) 岡沢精茂, 並木満夫, 松山 晃: 本誌, 35, 6, 533 (1961).

[農化 第 35 卷, 第 6 号, p.533~540, 1961]

味噌および醤油の γ 線照射 (その 2)*

微生物に対する照射効果

岡沢精茂, 並木満夫 (理化学研究所)

松山 晃 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 35 年 11 月 5 日 受理

1. ま え が き

著者らは食品に対する放射線照射の効果に関する研究の一環として, 味噌および醤油に対する γ 線照射の効果について研究を行ってきた。そのうち前報⁽¹⁾において味噌の湧きに対する照射効果についてのべたが, 本報では味噌および醤油のなかの微生物に対する γ 線照射の効果について報告する。

味噌, 醤油では, 微生物の作用に起因するとみられるいくつかの保存上の問題がある。味噌では前報でのべたように酵母類の増殖・発酵にもとづくといわれる「湧き」の現象があり, 醤油ではカビと俗称されている表面酵母の発育阻止および醤油の湧きの防止が必要である。放射線の微生物に対する殺菌もしくは不活性化作用は, はやくから知られており, また著者らは *Z. soya*, *E. coli* はじめ種々の微生物の放射線による不活性化を研究してきたが^(2~6), これら主として純粋培養系とことなり, 味噌, 醤油という食品中でそれらの種々の食品成分にかまれて各種微生物が共存する複合系に対し, 放射線がどのような効果を示すかということは応用的見地からのみならず微生物の放射線感受性の研究上からも興味深い問題である。なお本報では照射臭の発生その他の副反応を考慮して著しい大線量照射は行わなかった。

2. 実験方法

1) γ 線照射 照射線源としては理化学研究所抗生物質研究室所属の半地下式線源水平移動方式 ^{60}Co γ 線

* Gamma Irradiation of Miso and Soy Sauce. Part II. Radiation Effects on Microorganisms.
By Yoshishige OKAZAWA and Mitsuo NAMIKI (The Institute of Physical and Chemical Research),
Akira MATSUYAMA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)