

調味大豆もやし加工品の変敗および防止対策について

宮尾茂雄・沼田邦雄・佐藤 匡

Studies on the Deterioration of Seasoned Products of Soybean Sprouts and their Counterplan

Shigeo MIYAO, Kunio NUMATA, Tadashi SATOH

Summary

The seasoned soybean sprouts on the market are occasionally caused microbial deterioration. Two types of microbial deterioration were recognized. One of them was detected the lowering pH of the liquid part of the product, another was the swelling of the wrapping bag with gas production.

In this work, the spoilage organisms and the counterplan against the deterioration were studied. Results obtained were as follows.

1) Investigating the deteriorated products, the viable counts of the pH lowering and swelling specimens were 4.0×10^5 , 6.8×10^7 and pH of them were 4.32, 5.69 respectively, though the normal were below 300 and pH 5.0. The spoilage bacteria isolated were identified as *Bacillus coagulans* and *B. licheniformis*.

2) Bacterial counts of the material at each stage of the manufacturing were investigated. Counts from the soybeans, soybean sprouts and secondary materials were $10^2 - 10^5$, $10^6 - 10^7$, $10 - 10^6$ respectively. As for the microflora, Gram positives such as *Micrococcus* and *Bacillus* on the soybeans, Gram negatives such as *Pseudomonas* and *Flavobacterium* on the soybean sprouts were dominant.

Furthermore, investigating the heat resistant bacterial number of soybeans and spices, counts of them were $10 - 10^2$, $10^2 - 10^3$ respectively.

3) Bacteriostatic effects of glycine and lysozyme on the growth of *B. coagulans* and *B. licheniformis* were studied. Consequently, addition of over 2.8, 2.0% of glycine and 0.4, 3.0 $\mu\text{g/ml}$ inhibited the growth of *B. coagulans* and *B. licheniformis* respectively.

Investigating the heat resistance of lysozyme, the bacteriostatic activity remained after heating for an hour at 90°C .

4) Inhibitory effects of the combined use of glycine and lysozyme on the growth of the spoilage bacteria were investigated. It became apparent that the combined use was effective in the range of the concentration not affecting the seasoning.

I 緒 言

調味大豆もやし加工品は、通常、製造された大豆もやしに調味液を混合し、ロケット包装された後、約90℃で加熱殺菌処理が施され、市販されている。製品は、包装後加熱殺菌されることから、微生物によって変敗に至る例はあまりないが、時たま、変敗が生ずることがある。

著者らは調味大豆もやし加工品に関する試験を実施中、流通過程において加工品が微生物的変敗を生じた例に遭遇した。それらの変敗例としては、二種類のものが見出されたが、一例は調味液が混濁するとともにpHの低下を生じる場合で、もう一例は混濁はそれほどでもないがガスが発生し、ロケット包装製品が膨張を生じる場合である。

そこで、著者らは、調味大豆もやし加工品の変敗防止対策を講じる目的から、大豆もやしの製造における微生物の挙動について検討を加えるとともに、変敗原因菌の分離を試み、それらの形状および性状について調べ、製造作業上の対策について検討を加えた結果、若干の知見を得たので報告する。

II 実験材料および方法

対象とした調味大豆もやし加工品の変敗試料は、pHの低下と混濁がみられた製品およびガス膨張のみられた製品で、それぞれの製品より細菌の分離を試みた。分離した細菌は常法に従い純粋化した後、東¹⁾、およびBergey's Manual²⁾を参考にし、分離菌株の同定をおこなった。

大豆もやし製造過程における細菌数ならびに細菌濃の変化を調べるにあたっては、一般細菌数は標準寒天を用い、30℃、48時間、グラム陽性菌は0.25%フェネチルアルコール加標準寒天で、30℃、48時間、グラム陰性菌はCVT寒天で25℃、48時間、大腸菌群はデソキシコーレート培地を用い、37℃、24時間培養後、それぞれ特徴あるコロニーを計数し、菌数を算定した。また、細菌叢はそれぞれの選択培地を用いて、コロニーの性状をもとに大まかに分けた後、Cowan³⁾の成書を参考に属レベルでの分類を行った。

耐熱性芽胞菌数は菌数測定用の希釈水を沸騰水中で5分間加熱し、他の細菌および*Bacillus*の栄養細胞を死滅させた後、計数を行った。

分離菌株の生育に及ぼすグリシンおよび溶菌酵素リゾチームの阻害作用および生育特性を調べる際は液体培地(ペプトン0.5g、酵母エキス0.25g、ブドウ糖0.1g、蒸留水100ml、pH6.8)を用い、無菌ろ過(フィルターポアサイズ0.22μm)を行ったグリシン、リゾチーム溶液を目的濃度になるよう添加した。

リゾチームの活性におよぼす加熱の影響を調べる際はリゾチームを含有する上記培地を90℃、30分間加熱したものに被験菌を接種し、その後の増殖の経過を観察することで加熱の影響を調べた。

なお、菌の培養は被験菌の一夜培養液をそれぞれ 10^4 /mlとなるよう無菌的に接種し、30℃における生育の程度を経時的に目視および濁度変化により判定した。

III 実験結果および考察

1. 変敗品および変敗原因菌の性状

調味大豆もやし加工品の変敗試料について、外観、pH、生菌数を調べた結果をTable 1に示した。正常品はpH5.0前後で、生菌数は10/g以下のものが普通であるが、調味液が白濁を呈した変敗試料(以後、Tとする。)は、pHが4.32と低下し、生菌数は 4.0×10^5 /mlであった。また、ガス膨張のみられた変敗試料(以後、Gとする。)は、pHが5.69とややアルカリ側に傾き、生菌数は 6.8×10^7 /mlに達していた。

そこで、それぞれの変敗試料より細菌の分離を行ったところ、いずれの試料もほとんど単一菌によって構成されており、コロニーの特徴から*Bacillus*属に含まれる菌株であることが推定されたので、各分離菌株を純粋化した後、同定を行った。Table 2は変敗原因菌の形状および生化学的性状の結果をまとめたものである。いずれの菌株もグラム陽性の芽胞形成細菌で、嫌気下での生育、OFテスト、硝酸塩の還元性、ゼラチンの分解性などの結果から、白濁原因菌であるT株は、*B. coagulans*、ガス膨張原因菌であるG株は、*B. licheniformis*と同定した。

この結果については、包装後、加熱殺菌の工程があることから十分に予想されたことではあるが、それらは、いずれの菌も耐熱性芽胞菌であり、汚染源は原料大豆、香辛料であることが推定された。

Table 1. Characteristics of denatured specimens

	Normal	T	G
Appearance	—	Turbid	Gas swelling
p H	5.0	4.32	5.69
Viable cell count (/ml)	<10	4.0×10^5	6.8×10^7

Table 2. Characteristics of T and G bacteria isolated from spoiled specimens

	T	G
Gram stain	+	+
Form	Rod	Rod
Spore	+	+
Motility	+	+
Aerobic growth	+	+
Anaerobic growth	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
OF	F	F ^g
Citrate	+	+
Red. of Nitrate	—	+
Gelatin hydrolysis	—	+
Starch hydrolysis	+	+
VP	+	+

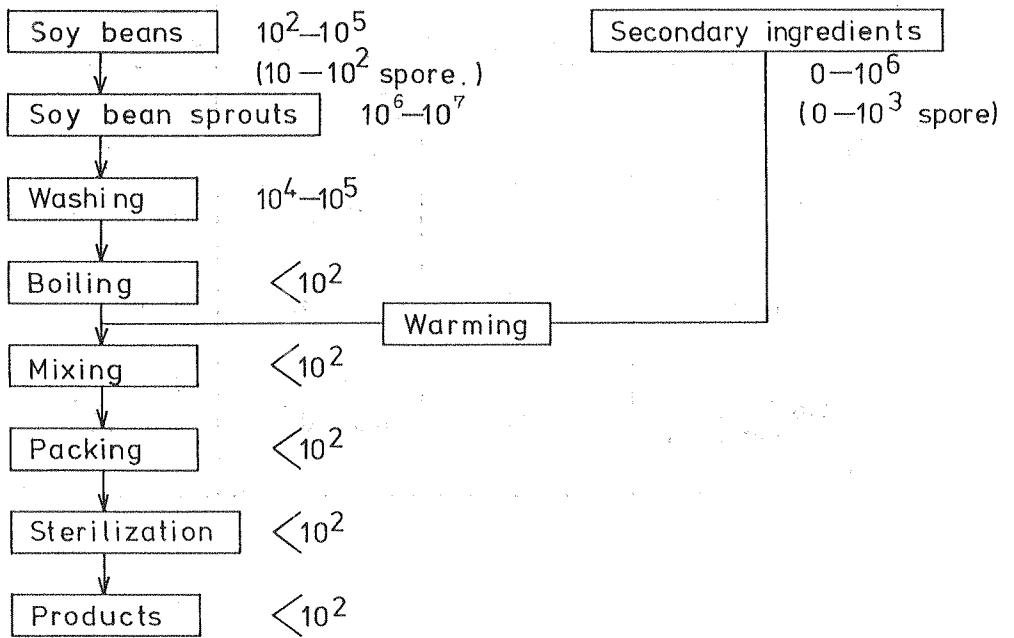


Fig. 1. Proces of seasoned soy bean sprouts and viable cell counts

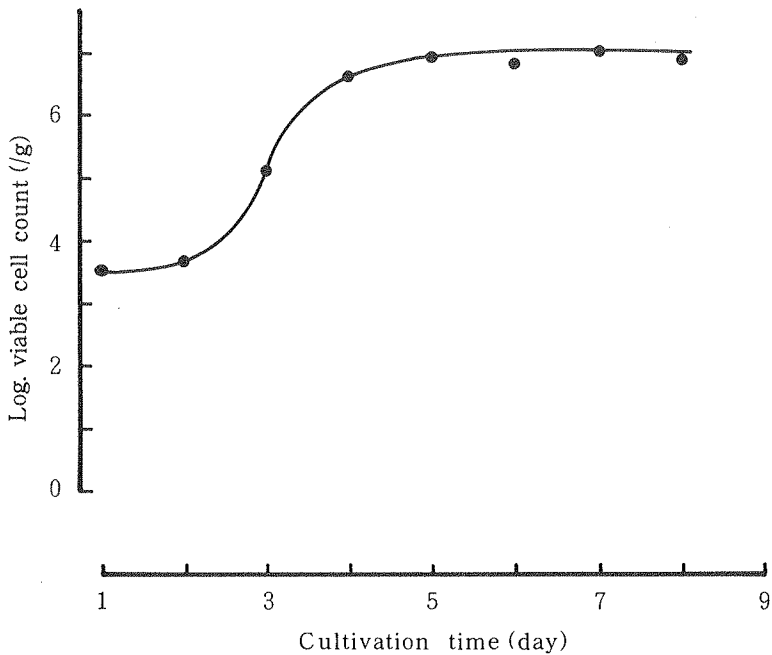


Fig. 2. Changes of viable cell counts in the soy bean sprouts during the cultivation

2. 大豆もやしの製造，加工工程における菌数および菌叢変化

変敗原因菌が判明したので，これらの菌の汚染源を明らかにする目的から，原料大豆，副原料および大豆もやしの製造，加工工程における菌数ならびに菌叢変化について，検討を加えた。

調味大豆もやし加工品の一般的な製造工程における生菌数について調べ，その結果を図示したものが Fig. 1 である。

乾燥原料大豆は $10^2 \sim 10^5$ / g の微生物によって汚染されているものが多く，そのうち耐熱性芽胞菌は $10 \sim 10^2$ / g 存在していた。大豆もやしの製造は気温の変化に応じて，7～10日間を要するが，製造直後の生菌数は $10^6 \sim 10^7$ / g に達するのが一般的であった。なお，病変部のみられる部分は特に生菌数が多く， 10^{10} / g に達する場合もみられた。次に，洗浄殺菌工程に移るが，大豆もやしの洗浄殺菌は次亜塩素酸ナトリウムや酢酸を用いて行われているのが一般的であり，洗浄殺菌後は生菌数は $10^4 \sim 10^5$ / g に減少していた。洗浄大豆もやしは約5分間ボイルされた後，各種調味料および香辛料を用いて製造された調味液と混合し，ロケット包装後，加熱殺菌され，製品となるが，ボイル工程後の生菌数は通常， 100 / g 以下であった。

なお，調味料などの副原料について，それらの生菌数について調べたところ， $0 \sim 10^6$ / g で，なかでも香辛料には多数存在しており，耐熱性芽胞菌は $0 \sim 10^3$ / g 存在していた。

大豆もやしの製造過程において，菌数がどのように変化していくかをみたものが Fig. 2 で，乾燥原料大豆の状態では約 10^4 / g 付着しているが，製造の進行にしたがい，急速に細菌の増殖がみられ，4日目には 10^6 / g に達した。つぎに，乾燥原料大豆と大豆もやしの細菌叢について検討を加えるために，それぞれの試料から無作為に菌株を釣菌し，144菌株に整理し，まとめてめたところ，Table 3 で示す結果を得た。すなわち，乾燥原料大

豆では，*Bacillus*，*Micrococcus* が主要菌で，その他にコリネ菌やカビが多く検出されたが，大豆もやしでは，グラム陰性菌が圧倒的に多く，なかでも *Pseudomonas*，*Enterobacteriaceae* に属する細菌が多く検出された。その他の菌としては，*Acinetobacter - Moraxella*，*Flavobacterium*，*Xanthomonas*，*Alcaligenes*，*Micrococcus* が検出された。このことから原料である乾燥大豆においては変敗原因菌となりうる *Bacillus* は比較的多く存在しているが，大豆もやしにおいてはそれらの汚染は少量であることが推定された。

3. 乾燥大豆および香辛料（唐辛子粉末）における耐熱性芽胞菌の分布

試験の結果，香辛料に多くの耐熱性芽胞菌が検出されたことから，乾燥大豆および調味大豆もやしの香辛料として多用される唐辛子粉末の生菌数および耐熱性芽胞菌数の分布状態について調べ，まとめたのが Table 4 である。

5検体の結果であるが，乾燥大豆の生菌数は $10^2 \sim 10^4$ / g で，耐熱性芽胞菌数は $10 \sim 10^2$ / g 存在していた。一方，唐辛子粉末においては，乾燥大豆よりも生菌数，耐熱性芽胞菌数ともに多く，それぞれ $10^5 \sim 10^6$ / g， $10^2 \sim 10^3$ / g 存在していた。

つぎに，それぞれの耐熱性芽胞菌の菌種について調べ乾燥大豆については Table 6 にその結果を示した。乾燥大豆から分離した *Bacillus* のうち *B. subtilis* は約半数を占め，*B. licheniformis* が21%，*B. cereus* が11%で，その他に *B. megaterium* が分離された。同様に唐辛子の粉末から分離した *Bacillus* では，*B. subtilis* が約41%を占め，*B. licheniformis* が35%で，その他に *B. cereus*，*B. megaterium*，*B. coagulans* が分離され，乾燥大豆とはほぼ同じ傾向がみられた。

したがって，以上の結果から変敗原因菌は香辛料の唐辛子粉末や乾燥大豆に由来するものと推定された。

Table 3. Major microorganisms in soy bean sprouts

Soy beans		Soy bean sprouts	
<i>Bacillus</i>	19	<i>Pseudomonas</i>	58
<i>Micrococcus</i>	13	Enterobacteriaceae	38
Coryne forms	7	<i>Acinetobacter</i>) 23
		<i>Moraxella</i>	
Molds	3	<i>Flavobacterium</i>	16
		<i>Xanthomonas</i>	3
		<i>Alcaligenes</i>	3
		<i>Micrococcus</i>	3
Total	42	Total	144

Table 4. Viable cell counts and spore forming bacteria counts in Soy beans and Red pepper

	Soy beans		Red pepper	
	viable cell	spore	viable cell	spore
1	8.1×10^2	2.1×10	7.9×10^5	2.2×10^2
2	5.3×10^3	9.7×10	1.9×10^6	4.8×10^3
3	7.1×10^4	4.3×10^2	5.6×10^5	3.6×10^2
4	1.4×10^4	5.4×10^2	2.1×10^5	2.7×10^2
5	7.8×10^4	1.3×10^2	4.8×10^6	1.3×10^3

(/g)

Table 5. Distribution of Bacilli isolated from Soy beans

Species	Number of isolates
	%
<i>B. subtilis</i>	43 (53.1)
<i>B. licheniformis</i>	17 (21.0)
<i>B. cereus</i>	9 (11.1)
<i>B. megaterium</i>	4 (4.9)
Non identified	8 (9.9)

number of sample=10

Table 6. Distribution of Bacilli isolated from Red pepper (powder)

Species	Number of isolates %
<i>B. subtilis</i>	34 (41.0)
<i>B. licheniformis</i> is	29 (34.9)
<i>B. cereus</i>	7 (8.4)
<i>B. megaterium</i>	5 (6.0)
<i>B. coagulans</i>	2 (2.4)
Non identified	6 (7.2)

number of sample=10

4. グリシンおよびリゾチームによる変敗原因菌に対する増殖阻害効果

変敗原因菌が明らかになったので、つぎに変敗防止対策について一連の試験を行った。

Bacillus の増殖抑制剤のなかでは安全性が高いという理由から脂肪酸モノグリセライド^{4,5)}、アミノ酸のグリシン^{6,7)}、溶菌酵素リゾチーム^{8,9)}などが使用されている。そこで、調味大豆もやし加工品の特性を考慮し本試験においてグリシンおよびリゾチームの制菌効果について検討を加えた。

(i) グリシン

変敗原因菌である *B. coagulans* および *B. licheniformis* の増殖に対するグリシンの抑制効果について調べたものが Table 7 である。*B. coagulans* はグリシンが 2.0% 以上存在すると増殖が抑制され、2.8% 以上になると増殖は認められなくなった。また、*B. licheniformis* の

場合は、*B. coagulans* よりもグリシンによる増殖抑制効果を受けやすい傾向が認められ、2.0% で増殖は阻害された。

Fig. 3 および Fig. 4 はグリシン存在下における *B. coagulans* および *B. licheniformis* の増殖曲線を示したものである。この結果、*B. coagulans* の場合は 0.8% 程度まではそれほどグリシンの増殖阻害作用は現れていないが、1.0% 以上になると阻害作用を受けるようになり 2.0% では 20 時間経過後も増殖は認められなかった。また、その阻害作用は誘導期の延長によるものであることがわかった。*B. licheniformis* の場合は *B. coagulans* と同様、0.8% 程度まではそれほどグリシンの増殖阻害作用は現れていないが、1.0% 以上になるとやや阻害作用を受けるようになり、1.6% では 20 時間経過後も増殖は認められなかった。

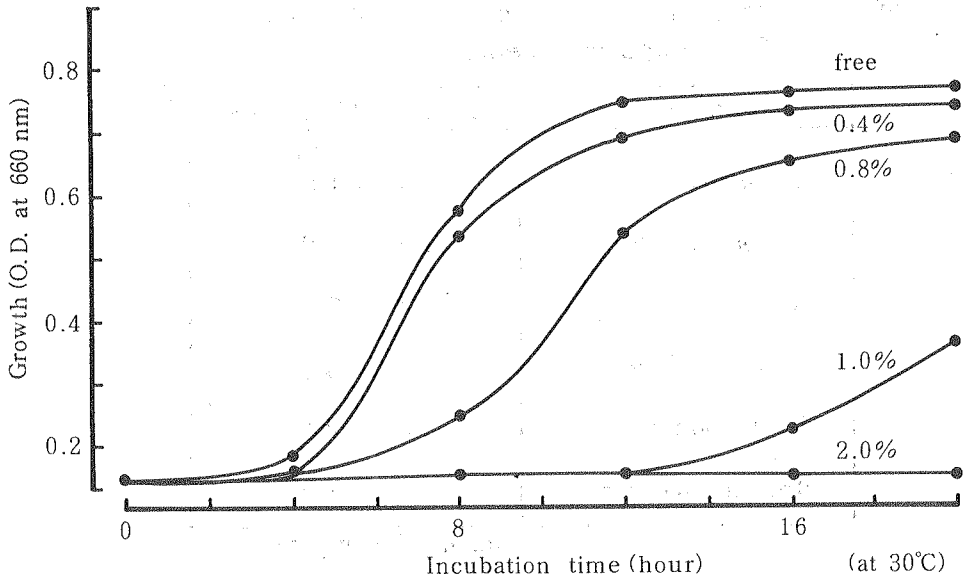


Fig. 3. Growth curve of *B. coagulans* in the presence of glycine

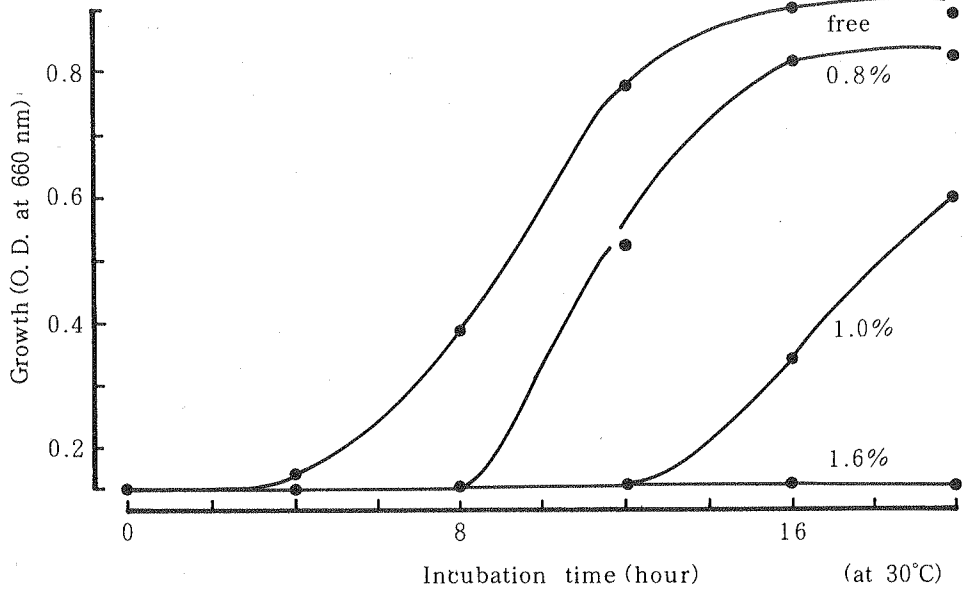


Fig. 4. Growth curve of *B. licheniformis* in the presence of glycine

Table 7. Inhibitory effect of glycine on the growth of *B. coagulans* and *B. licheniformis*

Glycine (%)	<i>B. coagulans</i>	<i>B. licheniformis</i>
0	≡	≡
0.4	≡	≡
0.8	≡	≡
1.2	≡	≡
1.6	≡	±
2.0	+	—
2.4	±	—
2.8	—	—
3.2	—	—

≡ Remarkably growth ≡ Smoothly growth
 + Slightly growth ± Non determinant
 — No growth

Table 8. Inhibitory effect of lysozyme on the growth of *B. coagulans* and *B. licheniformis*

Lysozyme(μg/ml)	<i>B. coagulans</i>	<i>B. licheniformis</i>
0	≡	≡
0.4	—	≡
0.8	—	≡
1.2	—	≡
1.6	—	≡
2.0	—	≡
2.4	—	+
2.8	—	±
3.2	—	—

≡ Remarkably growth ≡ Smoothly growth
 + Slightly growth — Non determinant
 — No growth

Table 9. Effect of heating on the activity of lysozyme on the growth of *B. coagulans* and *B. licheniformis*

Lysozyme(μg/ml)	<i>B. coagulans</i>	<i>B. licheniformis</i>
0	‡‡‡	‡‡‡
0.6	—	‡‡‡
1.2	—	‡‡‡
1.8	—	‡‡
2.4	—	‡‡
3.0	—	—

‡‡‡ Remarkably growth ‡‡ Smoothly growth
 ‡ Slightly growth ± Non determinant
 — No growth

Table 10. Inhibitory effect of the combination of glycine and lysozyme on the growth of *B. coagulans*

Lysozyme \ Glycine	Glycine							
	0%	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8
0 μg/ml	‡‡‡	‡‡‡	‡‡‡	‡‡	‡‡	‡	±	—
0.1	‡‡‡	—	—	—	—	—	—	—
0.2	‡‡‡	—	—	—	—	—	—	—
0.3	—	—	—	—	—	—	—	—
0.4	—	—	—	—	—	—	—	—

‡‡‡ Remarkably growth ‡‡ Smoothly growth
 ‡ Slightly growth ± Non determinant
 — No growth

Table 11. Inhibitory effect of the combination of glycine and lysozyme on the growth of *B. licheniformis*

Glycine Lysozyme	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
0 $\mu\text{g/ml}$	卍	卍	卍	卍	±	—
0.5	卍	卍	±	—	—	—
1.0	卍	卍	±	—	—	—
1.5	卍	+	—	—	—	—
2.0	卍	±	—	—	—	—
2.5	+	—	—	—	—	—
3.0	—	—	—	—	—	—

卍 Remarkably growth 卍 Smoothly growth
 + Slightly growth ± Non determinant
 — No growth

(ii) リゾチーム

リゾチームはグラム陽性菌の細胞壁を分解する溶菌酵素である¹⁰⁾が、菌種によってかなり差のあることが知られている。そこで、変敗原因菌に対するリゾチームの制菌効果について調べたものが Table 8 である。

その結果、*B. coagulans* と *B. licheniformis* とで著しく効果に差のあることがわかった。すなわち、*B. coagulans* は $0.4 \mu\text{g/ml}$ で阻害され、増殖しなかったが、*B. licheniformis* は $3.2 \mu\text{g/ml}$ でようやく阻害された。

(iii) リゾチームの活性におよぼす加熱の影響

調味大豆もやし加工品はロケット包装後、 90°C で加熱殺菌されることはすでに述べた。したがって、調味液にリゾチームを添加した場合、リゾチームがたんぱく質であることから加熱殺菌工程において熱変性を受け、制菌効果が十分に発揮されないことが考えられるので、リゾチームの活性におよぼす加熱の影響について検討した。その結果、Table 9 で示すように、*B. coagulans* は 0.6, *B. licheniformis* は $3.0 \mu\text{g/ml}$ で増殖が阻害されていることから 90°C 、30 分間の加熱ではリゾチームの活性は

ほとんど低下しないことが明らかとなった。

(iv) グリシンとリゾチームの併用効果

グリシンは甘味を呈するアミノ酸の一つであり、使用量によっては製品の味のバランスを崩すこともあり、その使用にあたっては注意が必要とされる。調味大豆もやし加工品において、グリシンの使用は調味上、制約を受け、一方、リゾチームの必要量は少量であり、調味にはほとんど影響をおよぼさないが、価格が高いことから、グリシンとリゾチームとの併用を考慮し、グリシンとリゾチームの変敗原因菌の増殖阻害に及ぼす併用効果について検討を加えた。その結果は *B. coagulans* については Table 10 に、*B. licheniformis* については Table 11 に示した。*B. coagulans* の場合は、リゾチームが無添加のときには増殖を抑制するためには 2.8% のグリシンが必要であり、逆にグリシンが無添加のときには $0.3 \mu\text{g/ml}$ を必要としたが、併用した場合は、グリシン 0.4%, リゾチーム $0.1 \mu\text{g/ml}$ で *B. coagulans* の増殖を抑制し、併用効果が認められた。同様に、*B. licheniformis* の場合は、リゾチームが無添加のときは増殖を抑制する

ためには2.0%のグリシンが必要であり、逆にグリシンが無添加のときにはリゾチームは、 $3.0 \mu g / ml$ を必要としたが、併用した場合は、グリシン0.8%, リゾチーム $1.5 \mu g / ml$ で *B. licheniformis* の増殖を抑制し、併用効果が認められた。

したがって、以上の結果を踏まえ、調味におよぼす影響を考慮した範囲内でグリシンとリゾチームを併用し、加熱殺菌を行うことによって変敗菌の増殖を抑制することが可能となった。

III 摘 要

調味大豆もやし加工品は、包装後、加熱殺菌を行ない市販されているが、流通中に微生物的変敗を生じる例がある。変敗例としては二種類のものが見られ、一つは調味液が混濁するとともにpHの低下を生じるもので、もう一つは混濁はそれほどでもないが、ガスが発生し、包装袋の膨張を生じるものである。そこで、それらの原因菌について調べ、製作用業上の対策について検討を加え、以下の結果を得た。

- 1) 変敗の見られた製品について調べたところ、正常品の生菌数は $300 / ml$ 以下でpHは5.0であったが、混濁およびガス膨張のみられた変敗例の生菌数はそれぞれ 4.0×10^5 , $6.8 \times 10^7 / g$, pHは4.32, 5.69であった。また、変敗原因菌について同定を行ったところ、それぞれ *B. coagulans* *B. licheniformis* であった。
- 2) 製造工程別の生菌数の変化を調べた結果、原料大豆には生菌数として $10^2 \sim 10^5 / g$ 、耐熱性芽胞菌は $10 \sim 10^2 / g$ 存在していたが、もやしの栽培中に細菌の著しい増加が認められ、栽培直後では $10^6 \sim 10^7 / g$ に達した。また、菌叢の変化を見ると、原料大豆の段階では *Micrococcus*, *Bacillus* などのグラム陽性菌やカビが主要菌叢であったが、もやしの栽培中には *Pseudomonas*, *Flavobacterium* や大腸菌群に属する細菌などグラム陰性菌が優勢となった。また、副原料の生菌数は $0 \sim 10^6 / g$ で、なかでも香辛料に多数存在しており、耐熱性芽

胞菌は $10^2 \sim 10^3 / g$ であった。

- 3) グリシンとリゾチームの制菌効果について調べたところ、グリシンは *B. coagulans* に対しては2.8%, *B. licheniformis* に対しては2.0%以上の添加で増殖を阻害した。また、リゾチームは *B. coagulans* は0.4, *B. licheniformis* は $3.0 \mu g / ml$ の添加で増殖が阻止された。さらにリゾチームの耐熱性について調べたところ、 $90^\circ C$ 30分間加熱後も活性を維持していた。
- 4) 変敗原因菌の増殖阻害に及ぼすグリシンとリゾチームの併用効果について検討を加えたところ、調味に及ぼす影響を考慮した範囲内の濃度でグリシンとリゾチームの併用に効果のあることが明かとなった。

IV 謝 辞

本報告の一部は、カネカ食品株式会社食品研究室山本敦芳氏との共同研究によるものであり、実験の遂行にあたっては多大の協力を得た。心から感謝申し上げる。

引用文献

- 1) 東 量三：New Food Industry, 4, (10), 67 (1962)
- 2) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed, Williams & Wilkins Co (1974)
- 3) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Cambridge Univ. Press (1974)
- 4) 古賀友英ら：日食工誌, 15, 13 (1968)
- 5) 古賀友英ら：日食工誌, 15, 26 (1968)
- 6) 駒形和男ら：食衛誌, 9, 289 (1968)
- 7) 原田 清ら：食衛誌, 9, 369 (1968)
- 8) 矢嶋瑞夫ら：醗工誌, 46, 782 (1968)
- 9) 矢嶋瑞夫ら：醗工誌, 49, 693 (1971)
- 10) Salton M. R. J. et al : Biochem. Biophys Acta 39, 398 (1960)