

〔醸工 第43巻, 第11号, p.814~821, 1965〕

ソルビン酸によるみその防湧防かびについて

(第1報) みそ酵母に対するソルビン酸の効果

加藤 熙・好井 久雄

(愛知県食品工業試験所)

Studies on Sorbic Acid as a Preservative of Miso

(I) Effect of Sorbic Acid on the Growth of Miso-yeasts

Hiroshi Kato and Hisao Yoshii

(Institute of Food Technology, Aichi Prefecture, Shinpukuji-cho, Nishiku, Nagoya)

The influence of sorbic acid on the growth of miso-yeasts was studied. The results obtained were as follows :

- 1) At the level of 10^5 /ml of viable cells, each yeast was inhibited by addition of 1 : 1000~1500 sorbic acid at pH 5.0 in 5% NaCl broth media.
- 2) The effectiveness of sorbic acid was enhanced as the NaCl concentration of a media was increased or as the pH of a media was lowered. Calculated from the concentration of sorbic acid which can inhibit the growth of *Saccharomyces rouxii* and *Torulopsis miso* at each pH, ca. 25 mg of undissociated sorbic acid in 100 ml of 5% NaCl broth media was required to suppress the growth.
- 3) However, sorbic acid was not effective at the inoculum size more than 10^6 /ml, even though ca. 25mg of undissociated sorbic acid was added to 100ml of culture media.
- 4) CO_2 -production of *S. rouxii* suspended in pH 5.0 phosphate buffer was measured with the Warburg manometer. Sorbic acid was not effective for inhibiting CO_2 -production, but CO_2 -production of viable cells less than 10^5 /ml was negligible.

緒 言

みその小袋詰は、保存中“発かび”、“膨れ”を生じ商品価値が低下する。従来は、デハイドロ酢酸の添加、加熱処理およびそれらの併用が実施されていたが、完全な防止法ではなかった。

昨年7月にみそへの添加物としてソルビン酸が許可された。ソルビン酸による信州みそなどの防湧試験の結果は、すでに佐藤¹⁾、堂本²⁾、松山³⁾、山本⁴⁾、大竹⁵⁾らにより報告されているが、みその種類および状態がそれぞれことなるためソルビン酸の有効量に若干の違いが出ている。

著者らは、ソルビン酸のみそへの応用の前提として、“発かび”、“膨れ”の原因となるみそ酵母に対するソルビン酸の効力を調べ、その効力に影響する要因について実験した結果を報告する。

実 験 方 法

使用培地：既報⁶⁾ のたまり希釈培地 (T.N. 0.2%, グルコース 6%, NaCl 5%, pH 5.0) を基本とし, 食塩濃度および pH の影響を実験する時にはそれぞれを適当に変えた. また接種菌数の影響を実験する時は培地を 250 ml 三角フラスコに 100 ml, それ以外は試験管に 5 ml ずつ分注し, 10 lbs, 10 分間加圧殺菌した.

ソルビン酸の添加：ソルビン酸 (S.A.) として, 使用上便利なソルビン酸カリ (S.A.K., 台糖ファイザー (株) 製) を用い, 培地に添加後 pH を修正し殺菌した. S.A.K. の添加量は S.A. としての希釈倍率で示した.

菌の接種：上記培地で 30°C 2 日間前培養した菌体を遠心分離し, 殺菌 5% 食塩水に懸濁させ, 初発菌数の実験以外は 10^5 /ml のレベルになるよう接種し 30°C で培養した.

菌体増殖量の測定：初発菌数の実験では経時的に, それ以外は 1 週間後の培養液 2 ml をとり水で 5 ml に希釈し, 培地の同様な希釈液を対照として, 日立製光電光度計 EPO-B 型を用い 660 m μ での透過率を測定し, 菌体量を $-\log. T$ で示した.

生菌数の測定：上記組成に寒天 2% を添加した培地を用い希釈平板培養法により測定し, 培養液 1 ml 中の生菌数を算出した.

CO₂ 発生量の測定：培養液および菌体の緩衝液に懸濁させたもの各 3 ml での CO₂ 発生量を, ワールブルグ検圧計により 30°C, 120 rpm で経時的に測定した. 緩衝液として, 5% NaCl を含む pH 5.0 の M/15 KH₂PO₄, Na₂HPO₄·2H₂O 緩衝液を用い, 菌体は緩衝液で 3 回洗滌後懸濁させ, グルコースは 600 μ M/ml, S.A.K. は所定の 3 倍濃度になるよう緩衝液に溶解し, それぞれ 1 ml ずつをとり CO₂ 発生量を測定した.

実 験 結 果 お よ び 考 察

菌株による効力差 Table 1 は, 非産膜性酵母 13 菌株 (愛知県下みそ工場の熟成諸味その他から分離した 7 菌株を含む) に対する S.A.K. の効力を示す. S.A. 2000 \times 以下の添加では全菌株が生育し, 1500 \times 添加では 13 菌株中 7 菌株が微弱な増殖を示し, 1000 \times 添加ではまったく増殖がみられなかった. 増殖阻止濃度は 1000~1500 \times であり菌株により大きな差がみられない.

また, 産膜性酵母 8 菌株について, 液内培養および agar streak 法により同様の実験を行なったが, Table 2 および Table 3 に示すように S.A. 1000~1500 \times 添加により増殖は阻止された.

Bell ら⁷⁾ は各種酵母について, S.A. 1000 \times 添加で増殖を阻止する pH 値を求め, *Hansenura*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces* に属する菌は pH 5.0~5.5 で S.A. は有効であるとのべている. また, 芝崎ら⁸⁾ は *Rhodotorura*, *Candida* を除き他の酵母は 1000 \times ~2000 \times 添加物で発育が阻止されるとのべ, 相磯ら⁹⁾ によっても酵母に対する阻止効果は 1000 \times で示されている.

これらの結果とあわせて, みそ酵母に対する S.A.K. の増殖阻止効果は, 非産膜性および産膜性を問わず菌株

Table 1. Effect of sorbic acid on growth* of Miso-yeasts at pH 5.0 in broth media**.

Strain	Sorbic acid			
	1000 \times	1500 \times	2000 \times	3000 \times
Type culture				
<i>T. miso</i>	—	—	±	##
<i>S. rouxii</i>	—	±	+	##
<i>Zyg. soya</i>	—	—	+	##
<i>Shoyu Hefe Kikkoman</i>	—	±	+	##
<i>Zyg. major Takahashi et Yukawa</i>	—	±	+	##
<i>Zyg. major</i>	—	—	+	##

Isolated from Miso					
No.	1	-	-	++	###
	2	-	-	±	++
	3	-	-	±	###
	4	-	±	+	++
	7	-	±	+	++
	9	-	±	+	++
	12	-	±	+	++

* Growth : incubated for 7 days at 30°C.

- ; O.D.=0.000, ± ; O.D.<0.005, + ; O.D.=0.025

** Component of media : Tamari (total nitrogen 0.2%), glucose 6%, NaCl 5%, pH 5.0

Table 2. Effect of sorbic acid on growth of film forming yeasts at pH 5.0 in broth media.

Strain No.	Sorbic acid				
	0	1000×	1500×	2000×	3000×
1	3*				6
2	3				6
3	3				6
4	3				6
5	3				6
6	3			10	5
7	3			8	5
8	3			9	5

* Incubated days when film of yeast was formed in media.

Table 3. Effect of sorbic acid on growth of film forming yeasts at pH 5.0 in agar streak method.

Strain No.	Sorbic acid				
	0	1000×	1500×	2000×	3000×
1	3*			6	3
2	3				6
3	3			6	6
4	3			7	6
5	3				6
6	3				6
7	3			9	9
8	3				6

* cf Table 2.

によりあまり大きな差はないと考えられる。

そこで以下の実験では、非産膜性みそ酵母として *S. rouxii*, *T. miso* の 2 菌株をえらんで実験を行なった。
食塩濃度の影響 各種みその食塩量は 7~13% と考えられるので、食塩濃度を 5, 10, 15% の 3 段階に変えて S.A.K. の効力との関係をしらべた。

Table 4 のように、*S. rouxii* では食塩濃度の増加にしたがい菌体増殖量は低下している。増殖を阻止する S.A. の濃度も、食塩濃度が高くなるにしたがって小さくなり、5% では 1000×, 10% では 1500×, 15% では 2000× となった。

また、S.A. 3000× 添加において、食塩 5, 10, 15% での菌体増殖量は、各食塩濃度下での S.A. 無添加時の増殖量に対しそれぞれ約 14.5, 8.2, 3.7% となり、S.A. による増殖阻害度は食塩濃度の増加により高められるものと考えられる。

T. miso についても *S. rouxii* と同様な傾向がえられた。

pH の影響 みその pH は 5.0 を中心に分布するものと考えられるので、pH を 4.5, 5.0, 5.4 の 3 段階に分け S.A.K. の効力との関係をしらべた。

S. rouxii, *T. miso* とともに Table 5 に示すように、pH 5.4 と 5.0 では菌体増殖量にそれほど大きな差はみら

Table 4. Effect of sorbic acid on growth of *S. rouxii* and *T. miso* at different NaCl levels.

Strain	<i>S. rouxii</i>			<i>T. miso</i>		
	5	10	15	5	10	15
S.A. 0	0.469	0.382	0.297	0.854	0.770	0.569
4000×			0.0246			0.0088
3000×	0.0680	0.0315	0.0110	0.1397	0.0246	±
2000×	0.0246	±	—	0.0066	±	—
1500×	±	—	—	—	—	—
1000×	—	—	—	—	—	—

Basal media : Tamari (T.N. 0.2%), glucose 6%, pH 5.0

Table 5. Effect of sorbic acid on growth of *S. rouxii* and *T. miso* at different pH levels.

Strain	<i>S. rouxii</i>			<i>T. miso</i>		
	4.5	5.0	5.4	4.5	5.0	5.4
S.A. 0	0.444	0.462	0.469	0.699	0.770	0.810
6000×	0.1024			0.0315		
5000×	0.0757			0.0110		
4000×	0.0269			±		
3000×	—			—		
2500×		0.0505	0.0757		0.0177	0.1427
2000×		0.0246	0.0555		0.0088	0.0269
1500×		—	0.0269		—	0.0223
1000×		—	0.0110		—	0.0132

Basal media : Tamari (T.N. 0.2%), glucose 6%, NaCl 5%

れないが, pH 4.5では S.A.K. 添加により増殖量がかなり低下した. pH 5.4 では S.A. 1000×の添加でも微量だが明らかに増殖がみとめられ, pH 5.0 では 1500×, pH 4.5 では2500×の添加で増殖が阻止された.

Hoffmann ら¹⁰⁾ は脂肪酸の抗菌性と pH との関係をしらべ, Cowles¹¹⁾, Spoehr¹²⁾ らも低級脂肪酸の抗菌力は pH により差があり, 抗菌力は溶液中の非解離型分子に起因することを指摘している. S.A. についても, Beneke ら¹³⁾ はある種のかびに対し pH 4.0 以下で有効であるとのべ, 芝崎ら⁸⁾ は各種微生物に対する静菌力が pH 低下とともに増加することを報告している. また Bell ら⁷⁾ は酵母の増殖を阻止するには S.A. の非解離型分子が溶液 100 ml 中に 30~40 mg 存在する必要があるとのべている.

本実験で増殖を阻止する S.A. 濃度での非解離型分子の量を計算すると, pH 5.0, 1500×添加では 24.6 mg/100 ml, pH 4.5, 2500×添加では 26.4 mg/100 ml となり, みそ酵母の増殖を抑制するには 25mg/100 ml 以上の非解離型 S.A. 分子を必要とすると考えられる. したがって, pH 5.4 では 750×以上添加しなければならぬ.

初発菌数の影響 以上の実験では接種菌数を 10^5 /ml のレベルで行なったが, みそ中の酵母数は $10^3 \sim 10^5$ /g で多いものでは 10^6 /g 以上を示す場合もある. 菌数により S.A.K. の効力も当然影響されると考えられるので, *S. rouxii* および *T. miso* について, 10^4 , 10^5 , 10^6 /ml のレベルで接種した時の生菌数および菌体増殖量の経時的变化を測定した.

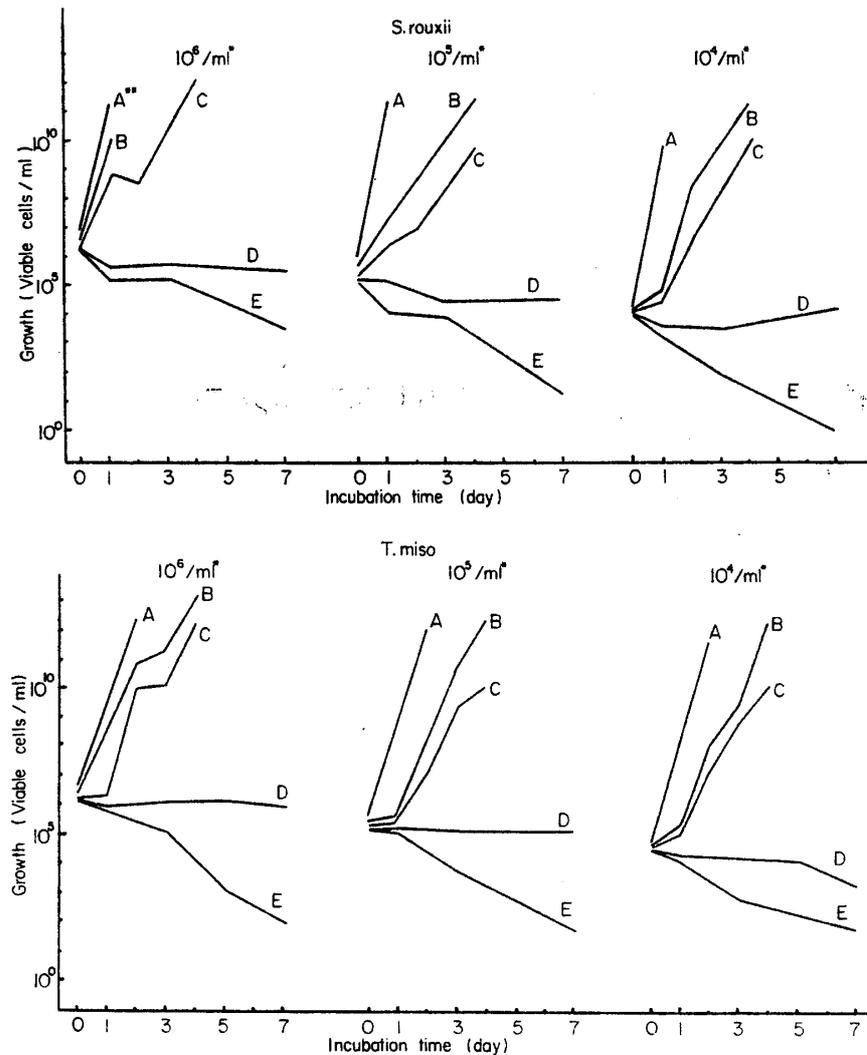


Fig. 1. Effect of sorbic acid on growth (viable cells) of *S. rouxii* and *T. miso* at different inoculum size.

S.A. concentration: A 0, B 4000×, C 3000×, D 2000×, E 1000×.

Fig. 1 に示すように、生菌数の変化は接種菌数と関係なく同じような傾向となった。すなわち、S.A.K. 添加培地では接種直後において S.A.K. 添加量に応じ生菌数は $\frac{1}{2}$ 位まで減少した。のち、 $4000\times$ 、 $3000\times$ 添加では無添加に比し時間的なおくれはあるものの、無添加の場合と同じレベルまで増加した。また、 $2000\times$ 添加では 7 日間ほぼ同じレベルにあって変わらず、 $1000\times$ 添加では漸次減少の傾向を示した。

菌体増殖量の変化は、Fig. 2 に示すように、 $4000\times$ および $3000\times$ 添加では無添加に比し、見かけ上の lag time が長くなるとともに定常期の菌体量も S.A. 添加量の増加により減少し、S.A. により増殖が阻害されたことを示している。また、 10^4 および 10^5 /ml 接種の場合には、 $1000\times$ 添加により増殖は完全に阻止され、 $2000\times$ 添加でも 7~9 日間で非常に微弱な増殖しか示さなかった。しかし、 10^6 /ml 接種の場合には、 $2000\times$ 添加で明らかな増殖がみられ、 $1000\times$ 添加でもわずかながら増殖がみられた。

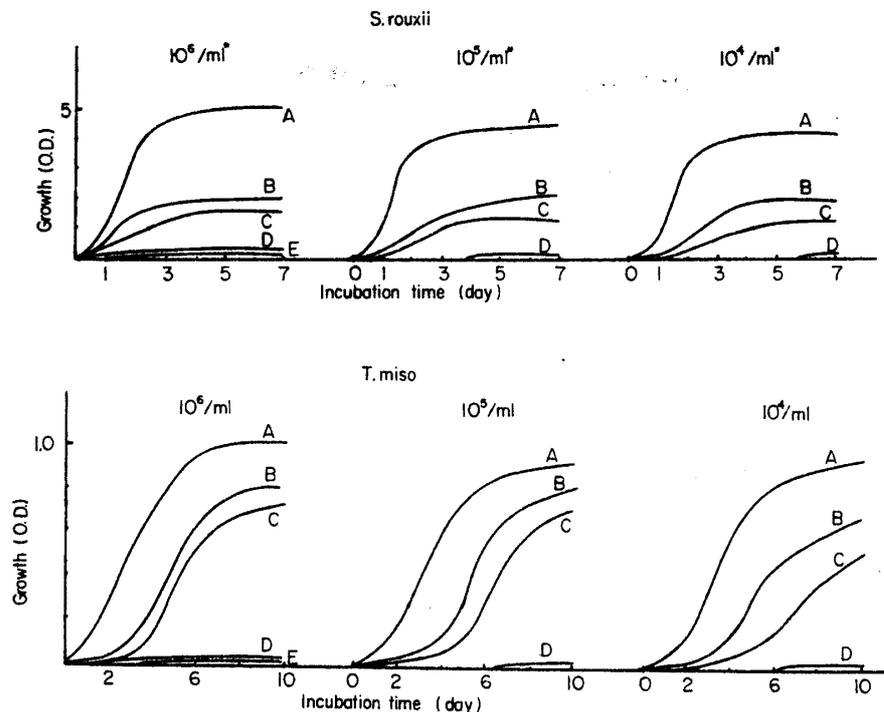


Fig. 2. Effect of sorbic acid on growth (O.D.) of *S. rouxii* and *T. miso* at different inoculum size.

Marks are similar to that of Fig. 1.

pH 5.0 で S.A. $1000\times$ の添加により、初発菌数のレベル以上に菌数が増加しない状態でも、その菌数が 10^6 /ml 以上の場合には菌体蓄積が測定可能な量まですすむと考えられる。実際にみそへ添加する際、みそ中の酵母数が 10^6 /g 以上のものでは、pH 5.0 で許容量 $1000\times$ 添加によっても防湧防かびの不完全な場合があるものと推定される。

培地での CO_2 発生 S.A. 無添加、 $1000\times$ 、 $2000\times$ 添加培地に *S. rouxii* を 10^6 /ml のレベルで接種し、 CO_2 発生量を経時的に測定した結果が Fig. 3 である。接種後 90 分間の CO_2 発生量は、無添加で約 $43 \mu\text{l}$ となり、S.A.K. 添加により約 $\frac{1}{2}$ になったがそれほど大きな差ではない。また、 30°C 18 時間培養後の CO_2 発生は、無添加の場合 2 分間で $130 \mu\text{l}$ となったが、 $2000\times$ および $1000\times$ 添加では 90 分間の CO_2 発生量は接種直後の場合とあまり大きな差はなく、 $2000\times$ でやや増加、 $1000\times$ ではやや減少の傾向がみられた。

前実験で明らかのように、S.A. 無添加の場合菌数の増加がいちじるしく、それにともない CO_2 発生量も培養時間の経過とともに増加したと考えられ、また、 $2000\times$ および $1000\times$ 添加の場合も生菌数変化の傾向と一致している。したがって、以上のような酵母の増殖を併う条件での実験結果から、S.A. が酵母による CO_2 発生を阻害していると結論することはできない。

菌数とCO₂発生量 増殖を併わない条件下で酵母の醸酵による CO₂ 発生を観察するため, *S. rouxii* の菌体を pH 5.0 の M/15 磷酸緩衝液に懸濁させて以下の実験に供した.

Fig. 4 は, 測定時の菌数が 10⁸/ml のレベルになるような菌液を調製し, それを2, 10, 100倍に希釈した時のそれぞれの CO₂ 発生量を測定した結果である.

60分間の CO₂ 発生量は, それぞれ69, 44, 11, 3 μl となり菌数と比例関係はないが, 菌数を少なくするとともに大きく減少した. 100倍希釈液すなわち菌数が 10⁶/ml のレベルでは CO₂ 発生量が非常に少ないので, みそ中の酵母数が 10⁵/g 以下でその増殖を完全に阻止した場合には, CO₂ 発生にもとづく袋の“膨れ”はほとんど問題にならないものと考えられる.

CO₂ 発生に対する S.A. の効力 *S. rouxii* について, 10⁸/ml の菌数レベルで CO₂ 発生に対する S.A. の効果を実験した結果が Fig. 5 である. 60分間の CO₂ 発生量は, 3000×添加では無添加とほとんど差はみられなかったが, 2000×および1000×添加ではやや減少したけれど大きな差はえられなかった. また, 500×および100×添加では, それぞれ無添加の約 $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{6}$ の CO₂ 発生量を示すのみで, かなり大きな抑制効果がみられた. しかし, この時の S.A. 濃度は基質グルコース濃度の約30, 150倍と非常に高濃度になり, S.A. が酵母による CO₂ 発生に対して阻害剤の作用をなししているとは考えられない.

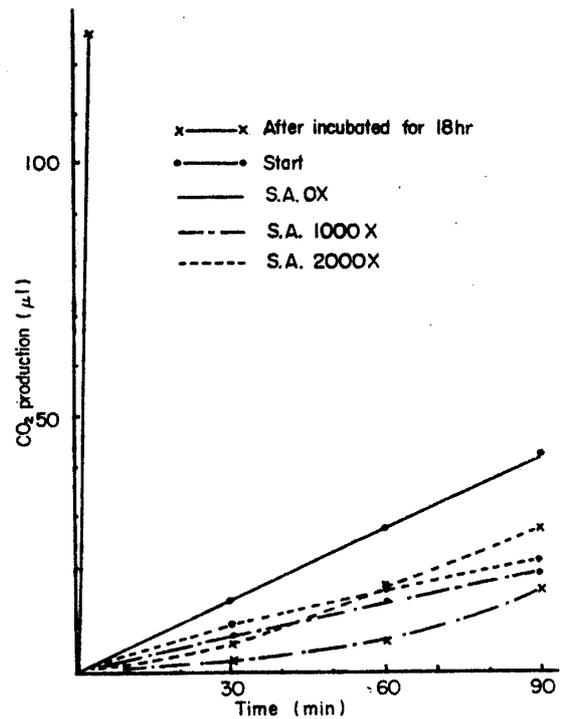


Fig. 3. Effect of S. A. on CO₂-production* of *S. rouxii* in pH 5.0 broth media. CO₂-production of 3ml culture media (10⁸/ml) was measured with the Warburg manometer (30°C, 120 rpm).

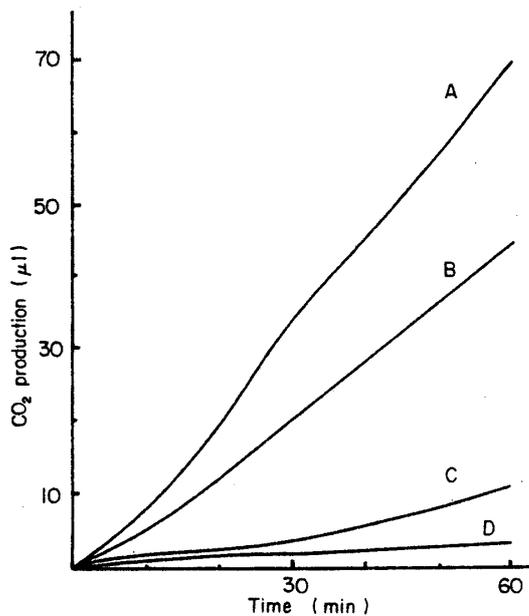


Fig. 4. CO₂-production by *S. rouxii* suspended in pH 5.0 phosphate buffer at different viable yeasts levels.

A : 10⁸/ml, B : $\frac{1}{2} \times 10^8$ /ml,
C : 10⁷/ml, D : 10⁶/ml

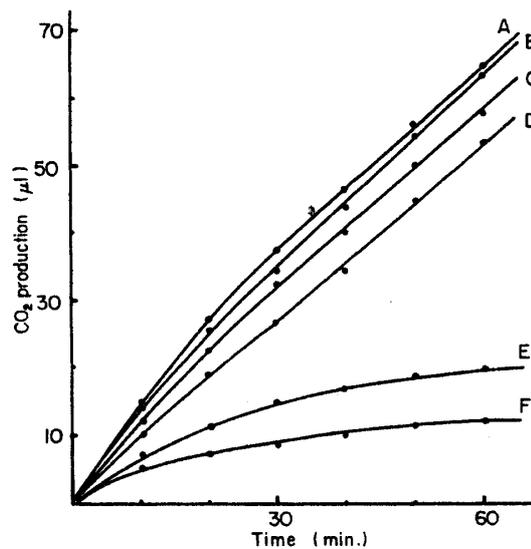


Fig. 5. Effect of S. A. on CO₂-production by *S. rouxii* (10⁸/ml) suspended in pH 5.0 phosphate buffer.

S.A. concentration : A 0, B 3000×,
C 2000×, D 1000×, E 500×, F 100×.

山本は、信州みそに S.A. 0.1~0.2% を添加した場合、添加直後ではガス発生がみられるが 50~24 時間経過後ではまったくガス発生がないと述べている。これは以上の実験結果からみて、S.A. が酵母による CO₂ 発生を阻害したというより、むしろ S.A. 添加によりみそ中の酵母の増殖が抑制されたためと考えられる。

要 約

1. みそ酵母に対する S.A. の効果は菌株により大きな差はみられず、菌数が 10⁵/ml のレベルでは pH 5.0 において 1000~1500× 添加により増殖を阻止できる。
2. 食塩濃度が高くなると S.A. による酵母の増殖の阻害度は大きくなる。また、pH が低くなるほど S.A. の効果は大きくなるが、これは溶液中の S.A. の非解離型分子の量が増加するためと考えられ、食塩 5% では非解離型の S.A. が 25 mg/100 ml 以上あれば酵母の増殖を阻止できるものと推定する。
3. pH 5.0 において、2000× または 1000× 添加により生菌数はほぼ横ばいあるいは減少の傾向を示すが、初発菌数が 10⁶/ml の場合には 1000× 添加でもわずかながらあきらかに菌体の蓄積がみられる。
4. S.A. が酵母の CO₂ 発生を阻害するとは考えられないが、菌数が 10⁵/ml 以下でその増殖が抑制されている場合には CO₂ 発生量は非常に少ないものと考えられる。

したがって、みその防湧防かびを目的として S.A.K. を使用する場合、pH および食塩濃度とともにみそ中の酵母数にも留意する必要がある。

終りに臨み、本実験について終始御指導下さった鳥山史郎所長、および試料の提供などにつき御援助いただいた台糖フアイザー (株) 多賀正明氏に感謝の意を表す。

本報告の概要は昭和 39 年度日本醸酵工学会大会で発表した。

文 献

- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) 佐藤：腐敗研究所報告, 7, 14 (1954). 2) 堂本, 西村, 森永, 小松：広島県食品工試報, 6, 77 (1961). 3) 松山, 立瀬：味噌技術, No. 103 (1963). 4) 山本：信州味噌研報, 3, 17 (1961). 5) 大竹：味噌技術, No. 122, 155 (1964). 6) 好井, 加藤：日醸協, 59, 78 (1964). 7) Bell, T.A., Etchells, J.L., Borg, A.F.: <i>J. Bacteriol.</i>, 77, 573 (1959). 8) 芝崎, 照井：本誌, 33, 216 (1955). 9) 相磯, 柳沢：腐敗研究所報告, 7, 1 (1954). | <ol style="list-style-type: none"> 10) Hoffmann, C., Schweitzer, T.R., Dalby, G.: <i>Food Research</i>, 4, 539 (1939). 11) Cowles, P.B.: <i>Yale J. Biol. Med.</i>, 13, 571 (1941). 12) Spoehr, H.A., Smith, J.H.C., Strain, H. H., Milner, H.W., Hardin, G. J.: <i>Carnegie Inst. of Washington Pub.</i>, No. 586, 67 (1949). 13) Beneke, E.S., Fabian, F.W.: <i>Food Technol.</i>, 9, 486 (1955). |
|---|---|

(昭40. 4. 13 受付)