

包装食品の微生物変敗防止に関する研究 (4)

誌名	愛知県食品工業試験所年報
ISSN	03887758
巻/号	22
掲載ページ	p. 86-93
発行年月	1982年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



包装食品の微生物変敗防止に関する研究(第4報)

燻製さきいかからの耐塩性酵母の分離・同定

内藤茂三

食品が腐敗した場合、有害な物質が生成されるのが普通である。しかし腐敗するまでに至らなくても微生物の発育によって食品としての価値が減ずる場合がしばしばある。すなわち食品の変敗あるいは劣化である。酵母もまた食品の変敗あるいは劣化に関係する。

酵母は醸造工業において極めて有用であるが、食品の品質を低下させる有害な酵母が多数存在している。食品保存中に酵母が繁殖するとガス発生、酸生成、菌増殖による斑点生成及び白濁、アルコール酸酵などを生じ食品は変敗する。今回、対象とした燻製さきいか(製品の水分生活0.80, 水分40%前後)は、保存中(室温2週間)に白斑点が生じ、時には薄かつ色の斑点が一面に広がることから酵母によるものと考えられた。そこでこの変敗原因菌を分離・同定したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料 KOP/PE包装の燻製さきいか(以後さきいかと略す)の白斑点生成品及び正常品。

燻製さきいかの製造方法は次のとおりである。頭部、内蔵およびひれを取り去り、胴部のみとなし、これを水槽に入れ残存する内蔵をよくかき出しながら、十分洗浄する。次に表皮の剥離作業を行う。50~50℃の温湯に胴肉を入れ、かきまぜながら体をたがいに摩擦しあい表皮を取り去る。次に80℃の熱湯中にて2~3分煮熟し、風乾する。そして一次調味を行う。食塩、砂糖、グルタミン酸ナトリウムを混合したものを煮熟肉によくまぶし、容器につめ、軽く圧を加えて一夜放置し、燻煙処理を行う。燻煙処理の終わったものは、切断した後、2次調味を行う。食塩、砂糖、グルタミン酸ナトリウム、アルコール、グリセリン、PEG、乳酸等の混液に浸漬後、製品としたものである。なお変敗品と正常品の性状を第1表に示した。

2. 栄養細胞の形態観察培地及び分離同定用培地 変敗さきいかから共存する細菌、カビを除き、酵母を分離するために以下の選択培地を用いた。

① Haydack 培地 ショ糖100g, アスパラギン2.5g, リン酸ニカルウム1.0g, 硫酸マグネシウム3.0g, 蒸留水1ℓ, pH 5.0

② YM培地 ペプトン5g, 酵母エキス3g, 麦芽エキス3g, ブドウ糖10g, 蒸留水1ℓ, pH 5.0

③ ポテトデキストロース培地 (PD培地)

バレイシヨ 200 g に蒸留水 1 ℓ を加え、沸トウ水中で約 20 分煮沸し、ガーゼでバレイシヨの残渣を除き、ブドウ糖 20 g, 寒天 20 g を pH 5.0 に調整した。

④ クロラムフェニコール加糖ブイヨン培地 (CV培地) 加糖ブイヨン培地にクロラムフェニコール 30 μg/ml を添加後、滅菌10%酒石酸液を加えて pH 6.0 に調整した。

第1表 変敗製品及び正常製品の性状

	変敗製品	正常製品
pH	5.60	5.00
滴定酸度 (mg, 酢酸として)	0.56	0.88
水分活生 (Aw)	0.82	0.78
食塩 (%)	6.0	6.0
水分 (%)	40	38
酵母数 (個/g)	2.5×10^6	1.0×10^2

3. 子のう胞子の形成 前培養をYM培地で行った後、改良Gorodkova培地¹⁾およびFowell培地²⁾の胞子形成培地で25℃, 1~4週間培養して観察した。なお胞子染色はマカライトグリーン法により行った。

4. 栄養細胞の形態 Haydack培地, YM培地で25℃, 5日間培養を行い観察した。

5. 偽菌糸の形成 ポテトデキトロース寒天培地 (PD培地) で25℃, 6~8日間培養を行い観察した。

6. 液体, 斜面培地における生育状態 YM培地を使用し, 液体培養は25℃, 7~12日間培養, 斜面培養は25℃, 30日間培養を行った。生育pH, 生育温度の検討は前報^{3~4)}と同じ。

7. 発酵性 ダーラム管発酵試験培地に糖を添加し, ダーラム管発酵法により25℃, 24日間培養後ガス発生を観察した。

8. 炭素源の資化性 液体YM培地で前培養した活性の高い菌体を滅菌生理食塩水 3 ml に懸濁し, 接種用菌体とした。⁵⁾ 10倍濃度のWickerhamの炭素化合物同化試験用合成培地 100 ml に炭素化合物 5 g を溶解し, この 0.5 ml を滅菌水 4.5 ml に加え, そして酵母菌体を約 1.0×10^4 / ml になるように接種し 25℃ で約 4 週間まで培養して生育の有害を観察した。

9. 栄養増殖形式 YM寒天培地を使用し, ガラススライド培養法で25℃, 5日間培養し観察した。

10. デンプン類似物質の生産性 液体培養法⁶⁾及び固体培養法⁶⁾により行った。

11. 耐塩性試験 液体YM培地に, 食塩を2%から2%おきに増量して26%になるまで添加した。なお観察は25℃, 4週間培養して行った。

12. 耐アルコール性試験 液体YM培地にエチルアルコールを1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15%となるように添加した。なお観察は耐塩性試験と同様に行った。

10. T. T. C. 重層法 下層用培地としてブドウ糖 10 g, ポリペpton 2 g, 酵母エキス 1.5 g, リン酸-カリウム 1.0 g, 硫酸マグネシウム 0.4 g, 水 1 ℓ, pH 5.5, プロピオン酸ナトリウム 0.2

%（最終濃度）の培地組成を用いた。酵母の出現数は1プレート中に約100程度のコロニーとなるように希釈し、25℃で3日間培養を行った。次に出現したコロニー上へ予め上層培地グルコース0.5g、T. T. C. 0.05g、寒天1.5%、水100ml組成のものを溶解後、培地が45℃程度になってから静かに重層し、固った後30℃、2～5時間保ち色素の還元性の相違によりRed Colony (R)、White Colony (W)、中間型のPink Colony (P)に大別した。

14. 硝酸塩の資化性 オキサノグラフ法⁷⁾により判定を行った。

15. 分離菌の同定 Lodder¹⁾の分類にしたがって行った。

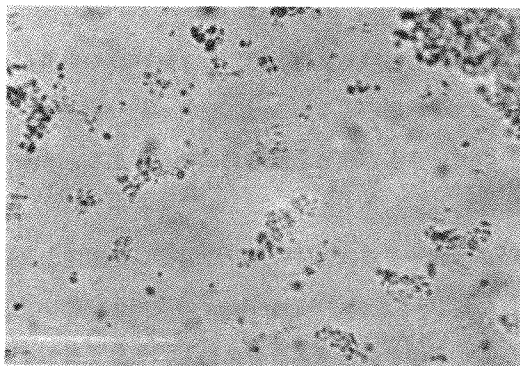
16. 水分活性の測定 シーナ社の水分活生測定器及びコンウェイのユニットを用いる塩類の飽和を用いて行った。

実験結果および考察

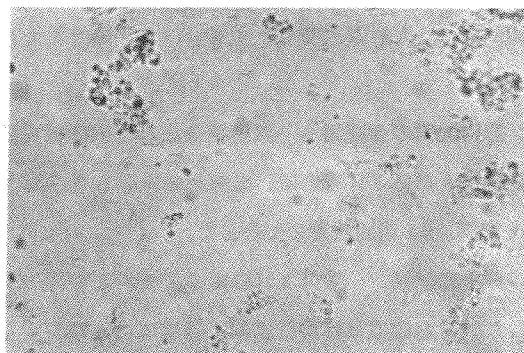
1. 変敗原因酵母の同定 1-1 形態的特徴 分離酵母5菌株（No.1～No.5）の形態的特徴を第2表に示した。いずれの菌株も細胞の形状並びに大きさは、だ円形から卵形の1.5～3.0μ×3～4μである小さな酵母であった。No.1、No.3の菌株の顕微鏡写真を第1図に示した。Haydack培地

での生育は中程度から微弱でNo.1～No.5とも灰白色から白色で円錐状に広がり（長さ3～5mm）、コロニーの表面は平滑で、やや乾燥状であった。

YM培地での生育は良好でNo.1～No.5とも乳白色から白色となり円錐状に広がり（長さ5～10mm）コロニーの表面は平滑で、やや粘稠状であった。液体培養での生育はNo.1、No.2、No.3は生育良好で著しく濁り、沈殿物の性状は粒状であった。なおNo.4、No.5は生育やや不良で少し濁る程度であった。



No. 1



No. 3

第1図 分離菌（No.1、No.3）の顕微鏡写真（X 300）

第2表 分離菌の形態的特徴

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
栄養細胞の大きさ	1.5~2.5 μ × 3.0~4.0 μ	1.0~2.0 μ × 3.0~4.0 μ	1.5~2.0 μ × 2.5~3.0 μ	1.0~2.0 μ × 3.0~4.0 μ	1.5~2.0 μ × 2.5~3.0 μ
栄養細胞の形	卵形	だ円形	だ円形	だ円形	卵形
栄養増殖形式	出芽	出芽	出芽	出芽	出芽
孢子形成	—	—	—	—	—
偽菌糸形成	—	—	—	—	—
皮膜形成	—	—	—	—	—
液体培養	強く濁る	やや濁る	強く濁る	やや濁る	強く濁る
斜面培養	生育良好 粘稠	生育良好 平滑	生育良好 粘稠	生育良好 平滑	生育良好 粘稠
T.T.C. 重層法	白	白	白	白	白
平板上での形態					
Haydack 培地					
生育の程度	生育中程度	生育微弱	生育中程度	生育微弱	生育中程度
コロニー表面	平滑	平滑	平滑	平滑	平滑
コロニーの光沢	鈍光	鈍光	鈍光	鈍光	鈍光
コロニーの性状	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥
コロニーの色調	灰白色	灰白色	灰白色	灰白色	灰白色
YM培地					
生育の程度	生育良好	生育良好	生育良好	生育良好	生育良好
コロニー表面	平滑	平滑	平滑	平滑	平滑
コロニーの光沢	鈍光	鈍光	鈍光	鈍光	鈍光
コロニーの性状	粘稠	粘稠	粘稠	粘稠	粘稠
コロニーの色調	白色	乳白色	白色	乳白色	白色

いずれの菌株も皮膜及び胞子は形成せず、さらに偽菌系も形成しなかった。栄養増殖形式はいずれも出芽であった。T.T.C. 重層法による色素の還元性を検討した結果、いずれもWhite Colony（白色コロニー）となった。

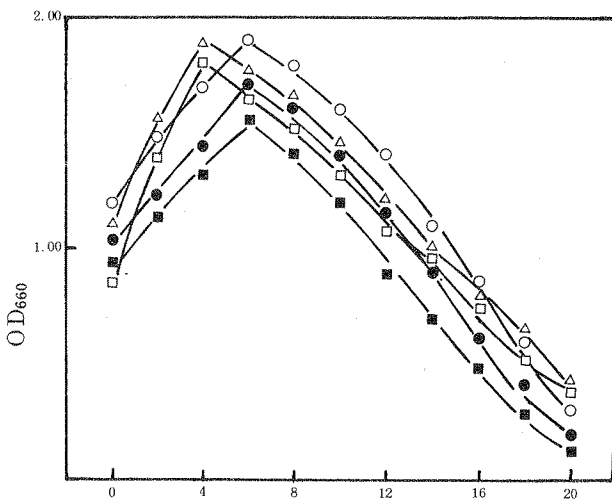
1-2 生理的特徴 分菌菌、5菌株の生理的特徴を検討した結果を第3表に示した。すべての菌株がマルトース、ガラクトース、ラクトース、ラフィノースを資化しなかったが、グルコース、シュクロースは資化した。またいずれの菌株も、マルトース、ガラクトース、ラクトース、ラフィノースは発酵しなかったが、グルコース、シュクロースを発酵した。オキサノグラフ法により硝酸塩の資化性を検討した結果、すべての菌株が資化することを認め、またデンプン類似物質は生産しないことを認めた。

次に耐塩性試験結果を第2図に示した。No.1, No.2, No.3は食塩濃度6%で、またNo.4, No.5は食塩濃度4%で最大に増殖し、食塩濃度の増加につれて発育は劣ってくるが食塩濃度20%まで生育した。またいずれの菌株も食塩6%培地より生育は劣ったが食塩無添加でも十分生育した。アルコール耐性試験結果を第3図に示した。いずれの菌株もアルコール耐性は弱く、3%アルコール濃度までは生育したが、それ以上の濃度では生育は認められなかった。

第3表 分離菌の生理的特徴

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
糖の発酵性					
グルコース	+	+	+	+	+
マルトース	-	-	-	-	-
ガラクトース	-	-	-	-	-
シュクロース	+	+	+	+	+
ラフィノース	-	-	-	-	-
ラクトース	-	-	-	-	-
糖の資化性					
グルコース	+	+	+	+	+
マルトース	-	-	-	-	-
ガラクトース	-	-	-	-	-
シュクロース	+	+	+	+	+
ラフィノース	-	-	-	-	-
ラクトース	-	-	-	-	-
硝酸塩の資化性	+	+	+	+	+
澱粉様物質の生産性	-	-	-	-	-

陽性 +, 陰性 -



第2図 分離菌の耐塩性試験
 食塩濃度 (%)
 ○—○ No. 1 ●—● No. 2 △—△ No. 4
 ■—■ No. 3 □—□ No. 5
 25°C, 7日間培養

1-3 菌株の同定について 分離され

た酵母は、いずれも硝酸塩を資化し、孢子、偽菌糸、皮膜を形成しない。また糖類の発酵性及び資化性はグルコース、シュクロースのみに認められたこと及びT.T.C. 重層法により白色コロニーであることから、*Torulopsis* 属に属する。さらに食塩の存在なしでも十分生産し、食塩濃度20%まで生育するところから通性好塩性菌である。

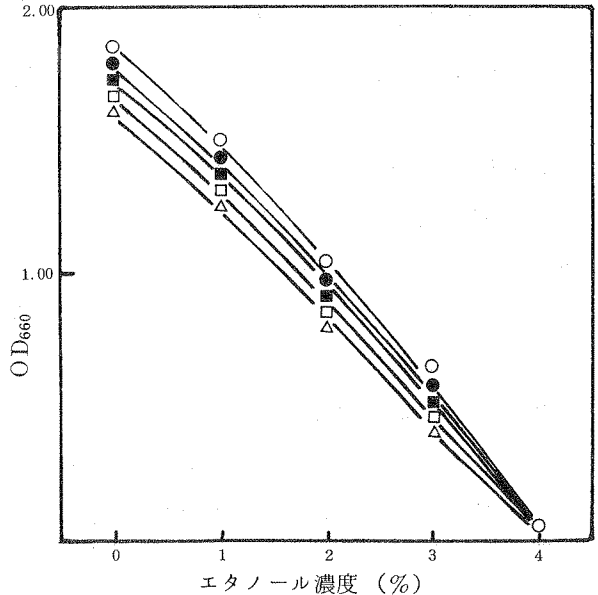
栄養細胞の増殖形式は出芽であり、形はだ円形又は卵形で、大きさは1.5~3.0 μ ×3.0~4.0 μ と酵母としては非常に小さく、澱粉様物質を生産しない点、エタノール耐性が弱いところから、*Torulopsis lactis-condensi* と推定した。微生物は通常、高浸透圧の条件下では生育が抑制されるが、その

ような条件下でも生育し得る酵母があり、*Debaryomyces*, *Torulopsis* 属には耐塩性を示す種属が多く、その中には一定濃度以上の食塩を要求する真性好塩性の *Torulopsis halonitrotrophila* のような菌株もある。味噌、しょう油の醸造において主発酵を行なう *Saccharomyces rouxii* は、*Saccharomyces* 属の中では特異な耐塩性酵母であると同時に、ハチミツ、ジャムのような高濃度の糖を含有する食品を汚染する耐糖性酵母でもある。今回のさきいかの場合、食塩が5~6%で水分が40%もあるのに水分活性が0.80前後と低いのは各種の調味料の添加が多いためである。また今回、さきいかの変敗菌として分離された *Torulopsis lactis-condensi* は漬物(キューリ)⁸⁾、加糖濃縮ミルク^{9~10)}より変敗菌として分離されている。この菌の特徴は細胞がきわめて小さく、だ円形から卵形を有し、食塩濃度0%から20%まで生育可能なことである。

2. 分離菌 (*Torulopsis lactis-condensi*) の性質 2-1 水分活性による生育度の検討

分離菌を接種したさきいかを、水分活性0.6~0.95、25℃の条件で1~4週間保存して菌の生育の有無を検討した(第4表)。

水分活性0.85~0.90の時、最も良く生育したが0.80以下ではすべての分離菌は生育しなかった。また水分活性が低くなると生育誘導期間は長くなった。さきいかに *T. lactis-condensi* が生育したのは製品の食塩濃度5~6%、水分活性0.80~0.85であり本菌の最適食塩濃度(4~6%)、最適水分活性(0.85)と一致したためである。したがって本菌の急激な増殖を防ぐには、最適食塩濃度(4



第3図 分離菌のアルコール耐性試験

○—○ No. 1 ■—■ No. 3 □—□ No. 5
●—● No. 2 △—△ No. 4
25℃, 7日間培養

～6%）から少しずらすか、または調味料をさらに添加して水分活性を0.80以下に調整することである。

2-2 生育pHの検討 液体YM培地を使用し、希塩酸又は希水酸化ナトリウムでpHを2～9の範囲に調整して検討した結果は第4図のとおりで、生育pH範囲は3.0～7.0で、最適pHは5～6であった。

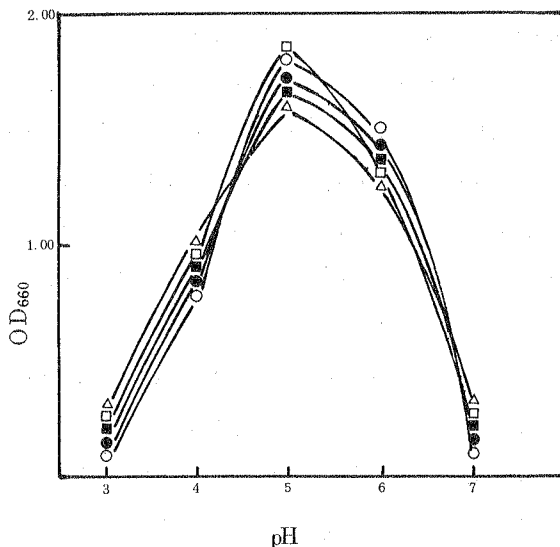
2-3. 生育温度の検討 あらかじめ培地を培養温度を同温にした後接種し、15℃～45℃で1～2週間培養した。その結果を第5図に示した。15℃から35℃までは生育可能であり、20～25℃が生育最適温度となった。

3. 変敗防止対策 さきいかの場合、調味料を多量に使用しているため水分活性(0.80前後)が低く、細菌、カビによる変敗はほとんどなく、耐塩性酵母による変敗が中心である。本菌はアルコール耐性が弱いので、製品の最終アルコール濃度を3～5%程度に調整すれば白斑点生成(*T.lac-tis-condensi* $2.5 \times 10^6 / g$)を防止することができると考えられる。また同時に前にも述べたが本菌の最適食塩濃度(4～6%)最適pH(5～6)、最適水分活性(0.85～0.90)、最適温度(20～25℃)よりずらす工夫も必要と思われる。

第4表 水分活性の及ぼす生育度の影響

水分活性 (Aw)	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
0.60	—	—	—	—	—
0.65	—	—	—	—	—
0.70	—	—	—	—	—
0.75	—	—	—	—	—
0.80	+	+	+	+	+
0.85	++	++	++	++	++
0.90	+	+	+	+	+
0.95	+	+	+	+	+

—：生育せず +：生育 ++：生育大



第4図 分離菌の生育に及ぼすpHの影響

○—○ No. 1 ●—● No. 2 ◻—◻ No. 5
 ●—● No. 2 △—△ No. 4
 25℃, 7日間培養

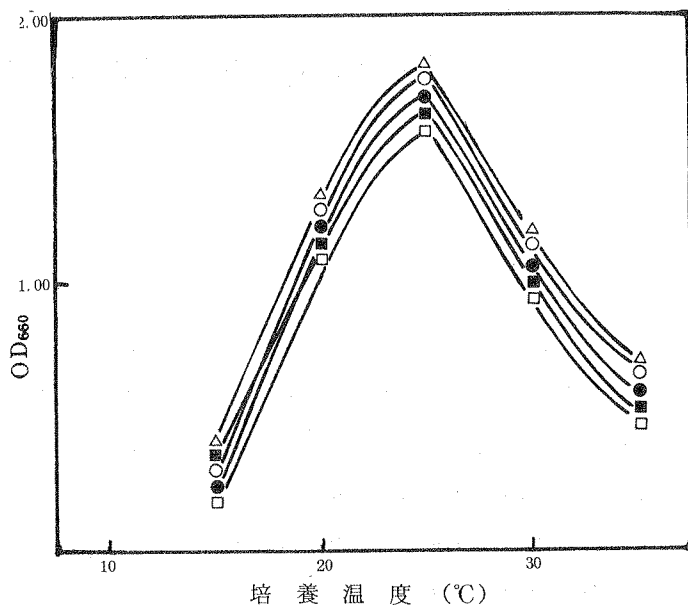
要 約

1. 包装燻製さきいかの白斑点部より5菌株の酵母を分離し、形態的特徴及び生理的特徴を検討した結果、いずれの菌株も*Torulopsis*属に属し、硝酸塩を資化し、グルコース、シュクロースに発酵性

及び資化性がみられ、食塩濃度が20%まで生育することから*Torulopsis-lactis-condensi* と推定した。

2. 分離菌 (5 菌株) は水分活性 0.08 以上でよく生育し、最適 pH は 5 ~ 6 であり、最適生育温度は 20 ~ 25 °C であった。

3. 分離菌 (5 菌株) は耐アルコール性が弱く、製品の最終アルコール濃度を 3 ~ 5 % 程度に調整すれば白斑点生成は防止されると考えられる。



第5図 分離菌の生育に及ぼす温度の影響

○—○ No. 1 ■—■ No. 3 □—□ No. 5
●—● No. 2 △—△ No. 4
25 °C, 7 日間培養

文 献

- 1) Lodder, J. and N. J. W. Kreger - van Rij : The Yeasts (1952)
- 2) Powell, R. R. : *Nature*, **170**, 578 (1952)
- 3) 内藤ら : 愛知食品工試年報, **21**, 54 (1980)
- 4) 内藤ら : 愛知食品工試年報, **21**, 63 (1980)
- 5) 長谷川武治編著 : 微生物の分類と同定, P89 (1979)
- 6) 長谷川武治編著 : 微生物の分類と同定, P93 (1979)
- 7) 長谷川武治編著 : 微生物の分類と同定, P90 (1979)
- 8) Etchells, J. L. and Bell, T. A. : *Farlowia*, **4**, 87 (1950)
- 9) Frasier, W. C. : *Food Microbiology*, P306 (1958)
- 10) Hammer, B. W. : *Iowa state Coll. Agri. Exp. St. Research Bull.*, 54 (1919)