

調味液漬食品の細菌による腐敗

誌名	香川県発酵食品試験場報告
ISSN	03685640
著者	宮代, 龍次
巻/号	79号
掲載ページ	p. 39-46
発行年月	1987年9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



調味液漬食品の細菌による腐敗

宮代 龍次

Bacterial Spoilage of Foods Soaked in Condiment

Ryuji MIYASHIRO

Seven strains of spoilage bacteria were isolated from foods soaked in condiment, and were identified as *Clostridium* spp., *Lactobacillus* sp., and *Bacillus* spp. It was considered that these microbes came from soy sauce. The spores of *Bacillus* spp. were resistant to heat treatment, and D100°C values were 113.4-198.0 and 56.9-57.8 minutes in 0.01 M phosphate buffer at pH 7.0 and in the condiment, respectively. Thus, it seemed to be difficult to maintain the desirable food quality by inactivating the microbes solely by heat treatment. The filter sterilization through the diatomaceous earth or the sterilization by ultraviolet ray of the spores of *Bacillus* spp. in soy sauce was effective for prevention from the spoilage.

緒言

調味液漬食品とは貝肉類を薄味の調味液と等量ずつ混合し包装、びん詰したものであり、塩分2~3%, Aw 0.97以上の成分組成の食品である。今回、夏期に本品の腐敗が続出したので腐敗防止方法について調査・検討したので結果を報告する。

実験方法

1. 微生物数の測定

一般生菌数、耐熱性菌数は標準寒天培地、生酸性菌数はBCP加標準寒天培地、嫌気性菌数はGAM寒天培地、真菌数はクロラムフェニコールを添加したポテトデキストロース寒天培地を用いて、耐熱性菌数は85°C、10分間加熱後の菌数を、嫌気性菌数はGas-Pack法によってそれぞれ測定した。

表1 調味液培地の一般成分組成

pH	5.01
塩分	3.10 %
酸度	3.60 ml
T. N.	0.76 %
F. N.	0.24 %
T. S.	5.70 %
D. S.	4.68 %
Aw	0.97
	% ; w/v %

また、混合調味液原液を水で60%濃度になるように希釈したものを調味液培地として用いた。表1に調味液培地の一般成分分析値を示した。

培養は細菌は35°C、真菌は30°Cで行った。

2. 成分分析

糖はジニトロサリチル酸による比色法、有機酸はHPLC法¹⁾、Mg、Caは原子吸光法によってそれぞれ測定した。

3. 耐熱性試験

(1) 孢子懸濁液の調製

1%ブドウ糖肉汁寒天培地上で35°C、10日間培養後、滅菌0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で数回洗浄し、同緩衝液に懸濁後85°C、15分間加熱し、使用時まで2°Cに保存した。

(2) 加熱処理

孢子をリン酸緩衝液または調味液培地10mlに添加し、煮沸湯浴上で所定時間処理後生残菌数を測定した。

4. 醤油の汙過除菌および紫外線殺菌方法

(1) 汙過除菌

250 ml容メンブランホルダーにNo.2ろ紙をセットし、滅菌水に懸濁した各種粒径のケイソウ土1~3gを5回循環してろ紙上に層を形成した後、孢子を添加した醤油をろ過し、ろ液中の残存孢子数を測定した。

(2) 紫外線殺菌

孢子を添加した醤油20mlを9cmφシャーレに入れ(液層約4mm)、スターラーで攪拌(約100~200ppm)した

から15W紫外線ランプを液面より約5 cmの距離から所定時間照射し、生残孢子数を測定した。

結果及び考察

1. 腐敗品の性状

腐敗品として2種類のタイプを観察し、それらの性状と微生物数を調べた。腐敗品中の微生物数を表2に示した。

表2 腐敗品中の微生物数

	腐敗タイプ	
	A	B
一般生菌	2.4×10^7	6.5×10^6
耐熱性菌	< 10	1.3×10
生酸性菌	3.4×10^7	7.0×10^4
嫌気性菌	5.6×10^7	< 10
真菌	< 10	< 10

(cfu/g)

腐敗品の2種類のタイプをそれぞれA, Bとすると、全腐敗品中に占めるA及びBの比率は腐敗タイプAが約10%, Bが約90%であった。腐敗タイプAはガスの発生により容器の蓋が膨張し、調味液は白濁し酸臭を呈しており、pHが低下して4.4(正常品でpH 5.6), 乳酸、酢酸がそれぞれ正常品の約8倍(1.01%), 約2倍(0.12%)であった。また、微生物数は一般生菌数、生酸性菌数および嫌気性菌数を圧倒的に多く検出した。腐敗タイプBは調味液が顕著に白濁し、腐敗臭を呈したが、ガスの発生、pHの低下および乳酸、酢酸含量の増加のいずれもみられなかった。また、微生物数は一般生菌数と生酸性菌数を多く検出した。

これらの結果から腐敗はいずれも細菌の増殖に起因し、それぞれの腐敗には複数の細菌が関与していると考えられた。

2. 汚染源の解明

腐敗起因菌の由来を明らかにするため、原料中の微生物数を調べた。結果を表3に示した。

一般生菌数は貝肉、醤油および水に多く、95°C, 30分間の加熱殺菌後もわずかに残存した。耐熱性菌数は醤油に多く、殺菌後も残存した。生酸性菌数と嫌気性菌数はいずれも醤油に多かったが、殺菌後には検出しなかった。

集落形状の観察から腐敗起因菌と同様の細菌は醤油に多くみられ、腐敗菌はいずれも原料に用いた醤油に由来すると考えられた。

3. 腐敗菌の性状

各タイプの腐敗品から集落形状の異なる菌株としてAタイプから4株, Bタイプから3株をそれぞれ分離し、形態的、生理的および培養的な性状を調べた。結果をそれぞれ表4, 5に示した。

これらの結果から各菌株を同定すると、A4, A5株は*Clostridium*属, A6株は不明, A7株は*Lactobacillus*属, B1, B2およびB3株は*Bacillus*属に属していた。B1, B2およびB3株は同定結果から*Bacillus subtilis*に属すると考えられたが、さらに性状を検討したところ、集落が粘性を帯び、グルタミン酸培地でよく粘質物を生成し、生育にビオチンを要求したことから*Bacillus natto*に属すると考えられた²⁾。

また、A4, A5株は糖から強くガスを発生し、A7株は糖から比較的多く酸を生成し、Aタイプの腐敗がこれらの菌の作用によるものであったと考えられた。A6, B1, B2およびB3株は特に目立った代謝産物を生成せず、これらの菌はその増殖に伴う調味液の白濁と腐敗臭によって腐敗に関与していたと考えられた。

4. 腐敗菌の増殖特性

腐敗菌の増殖に及ぼす塩分濃度、初発pHおよび調味液濃度の影響について調べた。結果を図1, 2および3に示した。

A4, A5, A7株は塩分濃度の増加とともに生育は低下し、初発pH 5~8の範囲でよく生育した。A6株は塩分濃度に対してはA4株等とほぼ同様の生育特性を示したが、初発pHに対する挙動は特異的でアルカリ側

表3 原料および工程中の微生物数

			一般生菌	耐熱性菌	生酸性菌	嫌気性菌	真菌
貝肉	(1)		1.9×10^2	5.4×10	< 10	1.1×10	1.4×10^2
		(2)	3.3×10	< 10	< 10	< 10	2.8×10
醤油	濃口		9.6×10^3	9.2×10^3	8.5×10^3	1.3×10^3	< 10
		淡口	7.4×10^2	2.2×10^2	6.3×10^2	6.0×10^2	< 10
みり	おだし		< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
			< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
水			2.5×10^3	< 10	< 10	< 10	< 10
			2.9×10^2	2.7×10^2	4.1×10^2	1.2×10	7.2×10
殺菌	後	1.2×10	1.0×10	< 10	< 10	< 10	

(cfu/ml or g)

表4 腐敗菌の性状

	A 4	A 5	A 6	A 7	B 1	B 2	B 3
1. 形態							
栄養細胞							
大きさ(幅×長さ μm)	0.5×5~20	0.5×5~50	0.25×5~8	0.25×5~10	0.5×5~15	0.5×5~10	0.5×5~15
運動性	+	+	-	-	+	+	+
形態	R	R	R	R	R	R	R
胞子							
大きさ	0.5×0.5~1	0.5×0.5~1	・	・	0.25× 0.25~0.5	0.25× 0.25~0.5	0.25× 0.25~0.5
胞子のうの膨大	-	-	・	・	-	-	-
形成部位	T	T	・	・	T	T	T
2. 生理性状							
グラム染色	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	-	-	+	-	+	+	+
生育 5℃	-	-	-	-	-	-	-
15℃	+	+	-	-	±	±	±
45℃	-	-	-	-	+	+	+
好気性	-	-	+	±	+	+	+
嫌気性	+	+	-	+	-	-	-
無糖培地	-	-	+	±	+	+	+
7% NaCl	-	-	+	-	+	+	+
分解							
でんぷん	+	+	-	-	+	+	+
ゼラチン	-	-	+	-	+	+	+
V-P反応	-	-	+	-	-	+	+
M-R試験	-	-	-	+	-	-	-
硝酸塩還元	-	-	+	+	+	+	+
クエン酸資化性	NG	NG	+	+	+	+	+
H ₂ S産生	+	+	-	-	-	-	-
ガス産生	+	+	-	-	-	-	-
酸生成							
グルコース	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	+	+	+	+	-	-	+
シュクロース	+	+	-	+	+	+	+
ラクトース	-	+	-	+	+	+	+
溶性でんぷん	+	+	-	-	+	+	+
キシロース	+	+	-	+	+	+	+
アラビノース	+	+	-	+	+	+	+
リボース	+	+	+	+	+	+	+
マンニット	+	+	-	-	+	+	+
ソルビット	-	-	-	-	+	+	+

R ; Rod, NG ; 不生育, + ; 陽性, - ; 陰性

表5 腐敗菌培養液の成分組成

	A 4	A 5	A 6	A 7	B 1	B 2	B 3
生菌数 (cfu/ml)	3.7×10^7	4.0×10^7	2.1×10^4	1.7×10^2	3.5×10^7	1.1×10^7	3.2×10^7
pH	4.85	4.84	5.01	4.00	4.74	4.69	4.80
残存糖 (%)	4.31	4.13	4.56	4.28	3.95	3.97	3.75
酸度 (ml)	2.71	2.79	2.07	5.09	1.90	1.90	1.81
有機酸 (%)							
乳酸	0.06	0.04	0.20	0.28	0.07	0.08	0.07
酢酸	0.06	0.05	0.06	0.09	0.03	0.03	0.03

5% glucose 培地 (pH 7.0) 35℃, 10日間培養

に至適域があり pH 11まで生育した。

B 1, B 2, B 3株は好塩性を示し, 塩分濃度 0~12%の範囲で増殖し 8%に至適域があり, 初発 pH は 5~6の酸性側で最もよく生育した。

腐敗菌 7株をそれぞれ調味液原液に接種しても生育は

微弱かほとんどみられなかった。そこで調味液濃度を変えて生育性を調べたところ, Aタイプの腐敗菌株は調味液濃度の増加に伴って生育は低下し, Bタイプの腐敗菌株は40~80%の濃度範囲でよく生育した。

また, B 1株の各調味液濃度に対する増殖曲線を調べ

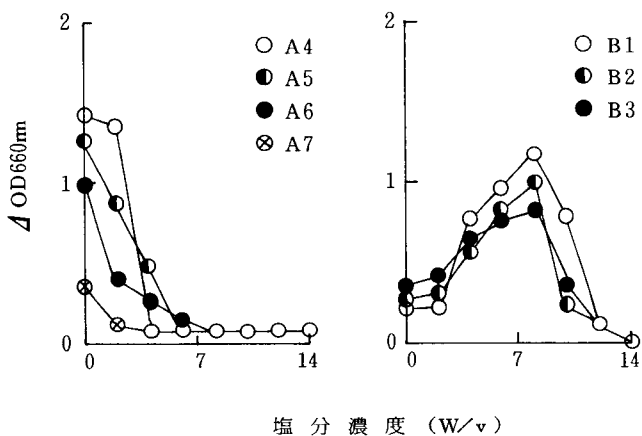


図1 腐敗菌の増殖に及ぼす塩分濃度の影響

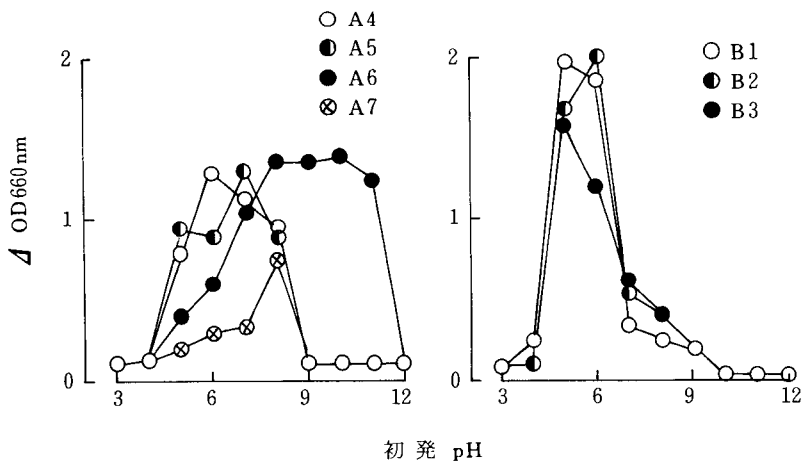


図2 腐敗菌の増殖に及ぼす初発 pH の影響

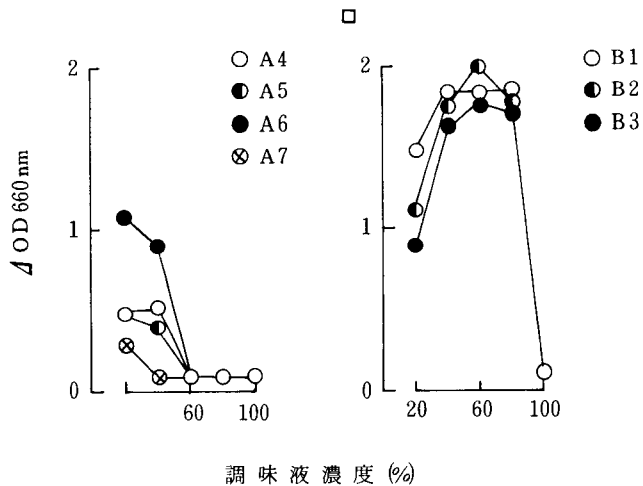


図3 腐敗菌の増殖に及ぼす調味液濃度の影響

たところ、図4に示したように調味液濃度の増加に伴って lag phase の期間が長くなり60%濃度で最も速く最高菌濃度に達することがわかった。

これらのことから醤油由来の腐敗菌は各種調味料と配合され、調味液原液となった時点ではその塩分濃度(約5~6%)等の影響により生育しないが、ここに等量の貝肉が配合されると貝肉中の水分(約70~80%)によって調味液が希釈され、腐敗菌の増殖に適した濃度と

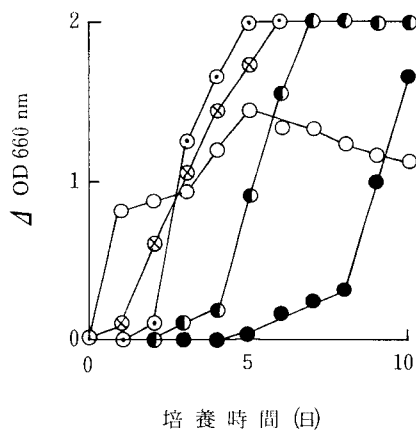


図4 B1株の増殖と調味液濃度との関係

- 20 (%)
- ⊗ 40
- ⊙ 60
- 80
- 100

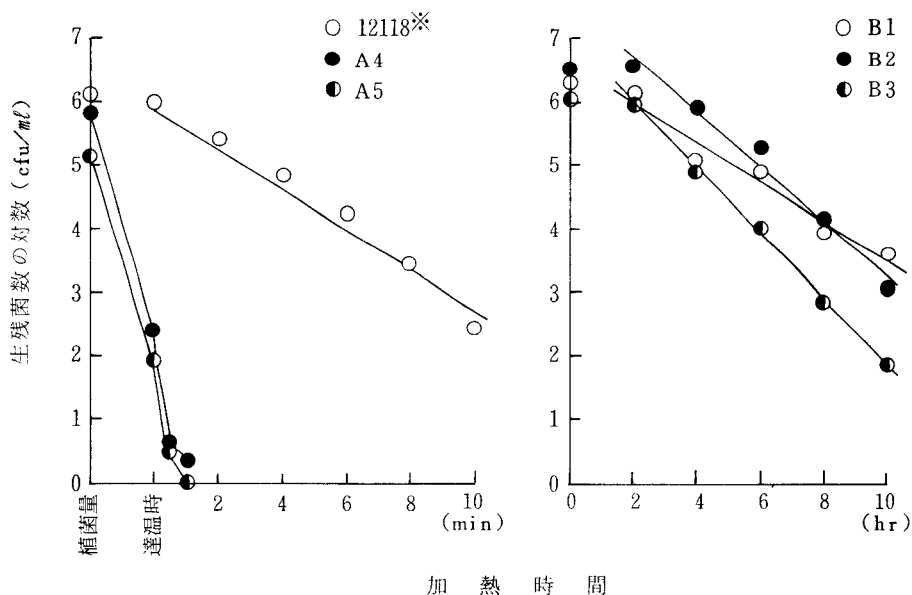


図5 腐敗菌胞子の buffer 中での加熱致死曲線

※ *Bacillus subtilis* IAM 12118

なり腐敗が起ると考えられた。ここで腐敗品の塩分濃度(約3%)から考察すると調味液は原液の約50~60%濃度にまで希釈されていることになった。

5. 胞子の耐熱性

腐敗菌に胞子形成株が多いことおよび製造工程中に加熱殺菌のあることから腐敗菌胞子に高い耐熱性のあることが考えられたので、これらの胞子の耐熱性を調べた。結果を図5、表6に示した。

A4, A5株は耐熱性が低かったが、B1, B2, B3株は耐熱性がかなり高く、D100℃値で標準株の40~70倍であった。また、いずれの株もリン酸緩衝液中より調味液培地中の方が耐熱性は低く、約 $1/2 \sim 1/3$ に低下していた。

そこで、最も耐熱性の高かったB1株を用いて耐熱性に及ぼすpHの影響を調べたところ図6に示したように耐熱性はpH7で最大となり、pH5で約 $1/2$ に低下していた。しかし、pH5の緩衝液中でのD100℃値(85.6分)と調味液培地中でのD100℃値にまだ差のあることから耐熱性に及ぼす溶質の影響が考えられたので、標準株を対照として調べたところ、図7に示したようにB1株が特異的に糖の添加によって耐熱性が低下していた。この時、糖の種類が関与しグルコース、ガラクトース、キシロースの順に耐熱性は低下しており、これはこれらの糖の褐変反応の進行速度の大きさと同じであった。この結果から、B1株が粘性物質としてγ-ポリグルタミン酸(γ-PGA)を生成²⁾することを考えると、B

表6 腐敗菌胞子のD 100℃値

	D 100℃ (min)	
	buffer	調味液培地
12118	2.9	1.1
A 4	0.3	0.2
A 5	0.4	0.2
B 1	198.0	57.1
B 2	136.4	57.8
B 3	113.4	56.9

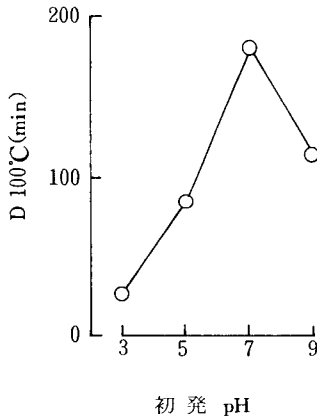


図6 B 1株胞子の耐熱性に及ぼす培地 pH の影響

表7 B 1株と 12118 株の胞子の耐熱性に及ぼす各種溶質の影響

	濃度 (%)	D 100℃ (min)	
		B 1	12118
無添加	—	193.5	3.6
食塩	10	139.2	NT※
ペプトン	1	120.7	NT
ソルビット	10	147.8	NT
グルコース	10	33.3	3.6
ガラクトース	10	22.7	NT
キシロース	10	7.3	3.2

※ Not tested

B 1株は胞子表面に r-PGA を持っており、これと糖が反応して褐変物質を形成し、胞子の発芽を妨げるかまたは死滅を引き起すとも考えられた。

胞子の高耐熱性因子には胞子内の Mg および Ca 含量が関係しているといわれている³⁾ ので、腐敗菌胞子中の Mg, Ca 含量を測定し、表 8 に示した。

Ca 含量は B 3 株を除きいずれもほぼ同様の値であったが、Mg 含量は菌株によって 2~3 倍の差がみられた。しかし、これらの値は繰り返し測定したところ同一菌株でも調製胞子毎に変動し、厳密な比較は困難であると考えられたので Mg/Ca 比で比較したところ、この値は菌株によってほぼ安定であり、耐熱性の高いほど低い値となった。このことから胞子中の Mg/Ca 比が耐熱性と密

接に関係していることが示唆された。

表8 腐敗菌胞子中の Mg, Ca 含量

	Mg, Ca 含量		
	Mg (%)※	Ca (%)※	Mg/Ca 比
12118	0.29	1.27	0.23
A 4	0.24	1.08	0.22
A 5	0.18	0.78	0.23
B 1	0.10	1.47	0.07
B 2	0.09	1.52	0.06
B 3	0.13	2.41	0.05

※ 乾物重量%

以上の結果から本腐敗事例は A, B いずれの腐敗タイプとも殺菌不十分による腐敗菌の生残が原因であったと考えられた。しかし、B 1, B 2, B 3 株のような高耐熱性株を現状の殺菌条件を強化することによって死滅させることは困難であり、品質保持上からも好ましくなく、加熱以外の対策を講じる必要があると考えられた。

6. 腐敗防止方法の検討

腐敗菌の混入を防止するために汚染源である醤油の除菌・殺菌方法を B 1 株を用いて検討した。

(1) 醤油の汙過除菌

ケイソウ土による過除菌効果を図 7 に示した。

平均粒径 12 μm 以上ではケイソウ土を 3% 濃度まで添加しても胞子を完全に除去することはできなかったが、7.5 μm を用いると 1% 濃度の添加で 10⁶ cfu/ml の胞子を完全に除去することができた。しかし、平均粒径 7.5

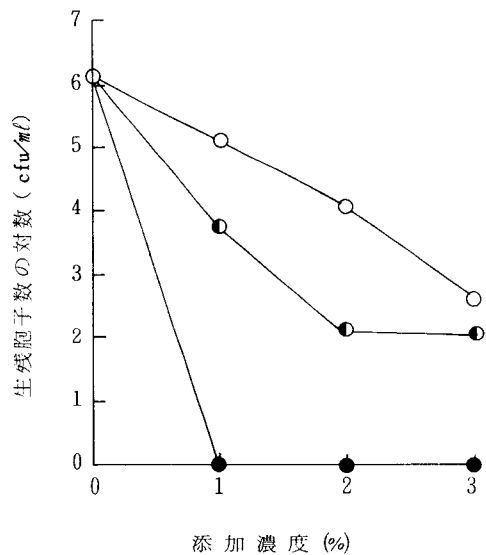


図7 醤油中 B 1 株胞子のケイソウ土による汙過除菌効果

○ : 平均粒径 14 (μm)
 ◐ : " 12
 ● : " 7.5

μm のケイソウ土を用いると透過時間が大幅に長くなり、約9.6 cm^2 の透過面で1%のケイソウ土の添加濃度では100 ml の醤油を透過するために約1時間を要した。

(2) 紫外線殺菌効果

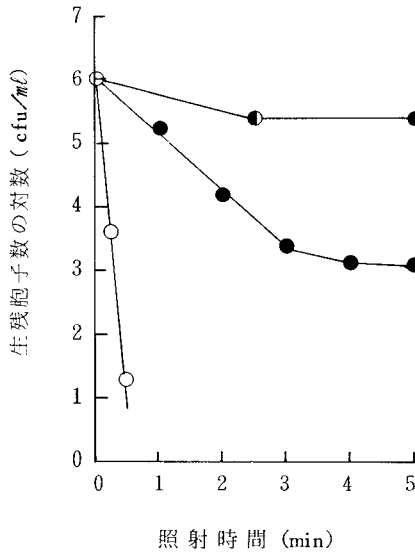


図8 醤油中B1株胞子の紫外線による殺菌効果

- : 生理食塩水静置
- : 静置
- : 攪拌

醤油中胞子の紫外線殺菌効果を調べ、図8に示した。

醤油は紫外線を全く透過しないため、静置状態の照射ではほとんど殺菌効果は期待できないが、醤油を攪拌することによって殺菌効果がある程度上げることができた。しかし、殺菌効果は2段階に分かれた形となり、この場合3分間以上の照射では殺菌効果はほとんどみられなくなった。

殺菌効果に及ぼす初発菌数の影響について調べたところ、図9に示したように生残曲線は初発菌数に比例しており、生残率は初発菌数に対してほぼ一定で約0.1%となった。検鏡により醤油中胞子の一部が5~6個の塊状となって存在していたことから、塊状胞子の存在が殺菌効果が2段階に分かれる理由であると考えられた。また、生残率から類推して塊状胞子は約0.1%の割合で存在していると考えられ、0.1% Tween 80の添加でも殺菌効果にほとんど影響がなかったことからB1株胞子は比較的強固な結合様式で塊状胞子を形状していると考えられた。

(3) 胞子の発芽後殺菌方法の検討

胞子の発芽、栄養細胞化に伴う耐熱性の低下を利用して加熱殺菌効果を上げる方法について検討した。調味液

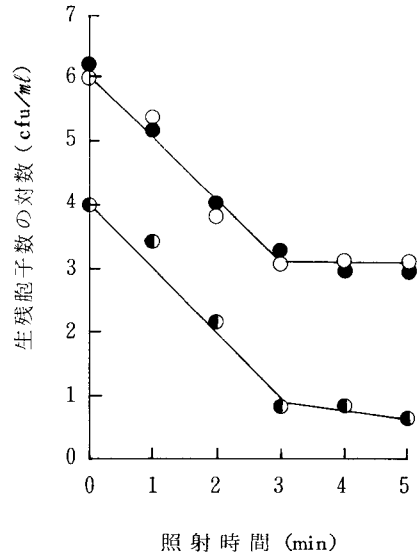


図9 醤油中B1株胞子の紫外線殺菌効果に及ぼす菌濃度の影響

- : 10⁶ cfu/ml
- : 10⁴ cfu/ml
- : 10⁶ cfu/ml (0.1% Tween 80 添加)

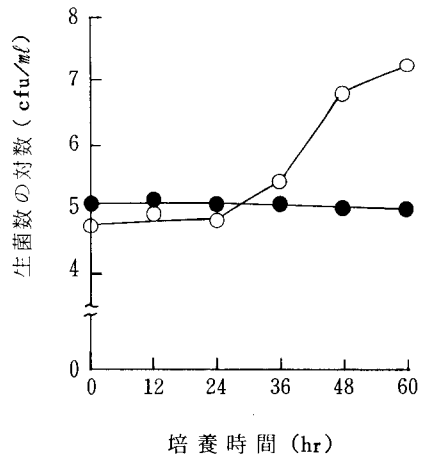


図10 B1株胞子の調味液培地中での発芽

- : 総菌数
- : 胞子数 (85°C, 15分間処理)

培地中でのB1株胞子の発芽状態を図10に示した。

このように胞子の発芽、増殖の指標とした総菌数の増加に対しても胞子数はほとんど変化していなかった。これはB1株が絶対好気性の菌であり、胞子の発芽、増殖が培地の気液界面に存在する一部の胞子によるものであったためと考えられた。本法は豆乳の調製において実用化されている⁴⁾方法であるが、B1株のような産膜性の

強い絶対好気性菌には応用できないことが明らかとなった。なお、B 1 株が絶対好気性の菌であることを利用し、びん詰の際に極力脱気し、中蓋を付けて嫌気度を保つことによってはほぼ完全に B 1 株の食品中での増殖を抑制できたことを付け加えておく。

要 約

腐敗した調味液漬食品から 7 株の細菌を分離し、*Clostridium* 属、*Lactobacillus* 属、*Bacillus* 属等と同定した。これら腐敗菌は原料に用いた醤油に由来すると考えられた。

分離菌中 *Bacillus* 属の孢子には 0.01 M リン酸緩衝液および調味液中で高い耐熱性があった。(D100 °C 値はそれぞれ 113.4 ~ 198.0 分および 56.9 ~ 57.8 分)。このこ

とから、食品の品質を損わずに加熱処理だけで腐敗菌の孢子を死滅させるのは困難であった。

腐敗菌による汚染防止には醤油中の *Bacillus* 属孢子のケイソウ土による汜別、または紫外線照射による殺菌が効果的であった。

文 献

- (1) 山田市二：食品分析法，p 523，光琳(1982)。
- (2) 藤井久雄：農化，**36**，1.000 (1962)。
- (3) 蜂須賀養悦：蛋白質・核酸・酵素，**11**，1217 (1967)。
- (4) 長沢太郎，宮川博，水口建治，加藤良，島村誠一，桑原邦介，川島拓司，小此木成夫：日食工誌，**31**，92 (1984)。