

## 包装食品の微生物変敗防止に関する研究（第27報）

### 白斑点の生成した包装昆布巻から分離した微生物の同定

内藤茂三

つくだ煮は、魚、貝類、海草類などの水産物および農産物、畜産物またはそれらの加工品を原料として、これにしょう油、水あめ、砂糖などの調味料を使用し、煮つめて濃厚な調味をほどこし、夏期においても、少なくとも20日程度の保存性を付与した調理加工食品である。つくだ煮の貯蔵効果としては、浸透圧、脱水作用などの物理的な原理を応用したものである。

塩分あるいは調味液の濃淡により製品の味や保存性が左右され、特に生鮮原料の場合は水産物、農産物を問わず、水分75%以上を含有しているため細菌をはじめ、糸状菌、酵母などの作用によって変質や腐敗を起こしやすく、またこれらの原料の鮮度の低下によっても製品の価値が失われやすい。

昆布巻の場合、最近は従来の煮熟法に代わり、浸漬法によって製造されることが多くなってきた。このような製法のものは、極めて短時間に消費される場合は別として、貯蔵性に乏しいことから、これをプラスチック製の袋に詰め十分殺菌しないと広範囲には流通しにくい。

また煮熟工程を省略しているので本来のつくだ煮とはやや異なり、若炊きつくだ煮とか、浅煮つくだ煮といって区別される場合もある。

今回はこの方法で製造した小袋詰昆布巻に白斑点が生成し、さらに膨張する現象が生じ、この原因を検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

愛知県下の包装昆布巻き製造工場で製造された半製品、製品を用いた。試料は白斑点の生成したもの、膨張したものおよび正常品を用いた。なお原材料としては昆布、カンピョウ、しょう油、砂糖、異性化糖、カラメル、アミノ酸液、食塩、だし、みりん、酢酸、グルタミン酸ナトリウム、水あめを用いた。

#### 2. 包装フィルム

ポリプロピレンカップ（PP、直径5cm、深さ5cm）にコンブ巻を入れ、ポリ塩化ビニリデン（PVC）をコートしたポリプロピレン（PP）とポリエチレン（PE）をラミネートしたフィルム（KOP／P-

E) で上部をシールした。

ポリプロピレンカップの厚さは500 $\mu$ mで酸素ガス透過度は125cc/m<sup>2</sup>/24h., atm (25°C, Dry), 透湿度は1.5g/m<sup>2</sup>/24h. (40°C, 90%RH) であった。

KOP/PEの厚さはKOP20 $\mu$ m, PE40 $\mu$ mで酸素ガス透過率は8.0cc/m<sup>2</sup>24h., atm (25°C, Dry), 透湿度は3.1g/m<sup>2</sup>/24h. (40°C, 90%RH) であった。

### 3. 微生物菌数の測定

微生物測定用試料は滅菌したミンチを用いて昆布巻を均一に磨碎した後, 25gを採取し, 滅菌生理食塩水225gを加えてホモゲナイザーで均一にした。細菌数の測定は, 標準寒天培地, 酵母菌数の測定はクロラムフェニコール入りYM寒天培地, 糸状菌の測定はクロラムフェニコール入りツアベック寒天培地を用いてそれぞれ平板希釀培養法を行った。

### 4. 微生物の同定

既報<sup>1)~3)</sup>と同様に, 平板培地に発育した菌の形態を観察するとともに胞子の有無を確認し, 生理的性質を調べた。

### 5. 貯蔵試験

温度25°C, 相対湿度(RH)80%の恒温恒湿器中に30日間貯蔵し, 一定期間ごとに順次試料を取り出して, 菌数およびミクロフローラを測定した。

### 6. 酸素ガス量の測定

フィルムカップ内の酸素ガス量の測定は, カップの上部のフィルムにゴム板を張り, マイクロシリジで3~5mlの気体を採取し, 酸素分析計(東レ株製, 形式LC-700F)により測定した。

### 7. 炭酸ガス量の測定

フィルムカップ内の炭酸ガス量はマイクロシリジで1mlのガスを採取し, ガスクロマトグラフ(株柳本製作所製, G-80-TPF型)により測定した。測定条件は, 検出器:TCD, 検出温度:90°C, カラム:φ3mm×2.25mステンレスカラム, 充填剤:アクチブカーボン, カラム温度:70°C, キャリヤーガス:He(50ml/分)で行った。

### 8. pHおよび一般成分の測定

pHの測定は10倍希釀した微生物測定用試料を用いて, pHメーターで行った。なお一般成分の分析は所定の方法<sup>4)</sup>に従って行った。

### 9. 空中浮遊微生物の測定

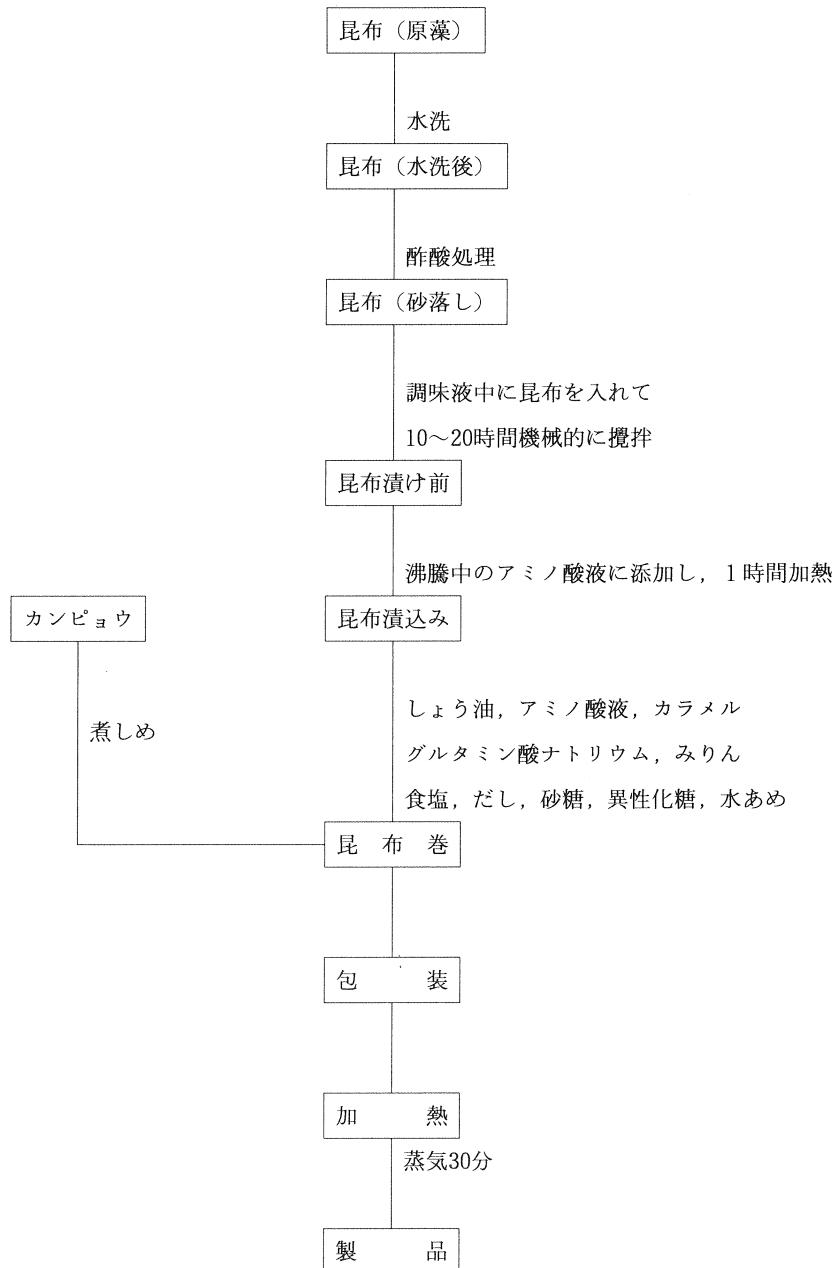
空中浮遊微生物はピンホールサンプラー(三基科学株製)により毎分26.5Lの速度で空気を2分間吸引し, 標準寒天培地, クロラムフェニコール(30 $\mu$ g/L)を加えたYM寒天培地, クロラムフェニコール(30 $\mu$ g/L)を加えたツアベック寒天培地の3種類の微生物測定用平板培地に捕集した。

また同時に5分間に上記平板を開放するシャーレ開放法についても行った。

## 実験結果および考察

## 1. 原材料および製造工程中の半製品、製品の微生物変化

昆布巻の製造方法を第1図に示した。昆布の水洗は、昆布の表面に付着している海水成分、ゴミなどを洗い落とすために行うものであり、水洗の時間は極めて短い。



第1図 昆布巻の製造工程

この工程中においても昆布は吸水し膨潤するが、水洗による増重は約2倍となる。昆布の砂落としは、昆布の表面に付着する大小無数の土砂の除去のために行う。脱落しやすい大きな砂は水洗によりかなり除去できるが、微細な砂は簡単に除去できない。このため、砂落とし工程を別に設ける必要がある。砂落としは7~12° Be'の調味液中で円筒状容器に電動式カイ型攪拌機を取り付けた装置で機械的に行う。短時間で砂落としするには、調味液の温度を高くすればよく、それは温度が高いほど、昆布が膨化し、微細な砂を除去しやすくなるためである。次の昆布漬け前は、直接蒸気吹込法により沸騰中のアミノ酸液に入れ、その後1時間加熱した後、そのまま放置する。

昆布の漬込みはしょう油、アミノ酸液、カラメル、グルタミン酸ナトリウム、みりん、食塩、だし、砂糖、異性化糖、水あめ等を混合した調味液中に一夜漬け、煮しめたカンピョウを用いて昆布巻を製造する。

これらの原材料の微生物菌数を測定した結果を第1表に示した。

第1表 昆布巻の原材料の微生物菌数

原 材 料	菌数/g		
	細菌	酵母	糸状菌
昆布(原藻)	$5.7 \times 10^5$	$1.2 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下
昆布(水洗後)	$2.1 \times 10^4$	$5.4 \times 10$	$3.0 \times 10$ 以下
昆布(砂落し後)	$1.5 \times 10^4$	$6.1 \times 10$	$3.0 \times 10$ 以下
調味液(砂落し用)	$3.6 \times 10^2$	$5.1 \times 10$	$3.0 \times 10$ 以下
調味液(漬込み用)	$7.5 \times 10^2$	$8.7 \times 10$	$3.0 \times 10$ 以下
しょう油	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
アミノ酸液	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
カラメル	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
グルタミン酸ナトリウム	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
みりん	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
食 塩	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
だ し	$5.1 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
砂 糖	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
異性化糖	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
水あめ	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
カンピョウ(煮しめた後)	$1.7 \times 10^3$	$7.5 \times 10$	$3.0 \times 10$ 以下

砂落し用の調味液と漬込み用の調味液は成分は同じであるが、砂落し用の調味液はブリックス10度、漬込み用の調味液はブリックス15度である。

昆布の原藻には、 $5.7 \times 10^5 / g$  の細菌と $1.2 \times 10^2 / g$  の酵母が付着しているが、いずれも水洗、砂落とし処理により約 $1/10$ に減少した。

また砂落とし用の $10^\circ Be'$ の調味液および $15^\circ Be'$ の漬込用調味液の細菌数は $3.6 \sim 7.5 \times 10^2 / g$ であり、酵母菌数は $5.1 \sim 8.7 \times 10 / g$ であった。また調味液の原料の中ではだしに細菌数が $5.1 \times 10^2 / g$ 検出された。また煮しめたカンピョウからは細菌数 $1.7 \times 10^3 / g$ 、酵母菌数 $7.5 \times 10 / g$ を検出した。

製造工程における微生物の消長を第2表に示した。昆布漬け前開始においては、細菌、酵母、糸状菌がそれぞれ $1.2 \times 10^5$ 、 $5.1 \times 10^2$ 、 $5.7 \times 10 / g$ 検出されたが、昆布漬込終了後には細菌、酵母、糸状菌がそれぞれ $8.2 \times 10^4$ 、 $3.7 \times 10^2$ 、 $3.0 \times 10$ 以下/gとなり、やや減少した。また加熱後の出荷時においては、細菌、酵母、糸状菌がそれぞれ $7.5 \times 10^3$ 、 $5.2 \times 10$ 、 $3.0 \times 10$ 以下/gとなりかなり減少した。

しかし調味液は継続して用いるため、原料からの溶出物の多量蓄積により、液および原料の菌数が増加するので、フィルタープレスなどで濾過しないと製品の品質低下となる。

また原料を処理するごとに調味液の濃度が希薄になるから、毎回、原濃度に復元することが必要である。

さらに浸漬（漬込）時間が長く、液温も高まるために工場の二次汚染菌を受ける可能性がある。

## 2. 包装昆布巻製造工場の空中浮遊微生物

昆布巻は製造工程に、包装後蒸気殺菌する工程があるため真菌による変敗は比較的少ないと考えられる。しかし、原料である昆布、カンピョウの微生物および製造工程中の二次汚染微生物がそのまま最終製品に移行し、蒸気殺菌で殺菌されず変敗の原因となる場合もある。水分が55～60%と比較的高く、水分活性も0.90～0.95であるため、昆布巻は非常に変敗しやすい食品である。

第2表 昆布巻製造工程における微生物の消長

製造工程	菌数/g		
	細菌	酵母	糸状菌
昆布漬け前	$1.2 \times 10^5$	$5.1 \times 10^2$	$5.7 \times 10$
昆布漬込み開始	$5.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下
昆布漬込み終了	$8.2 \times 10^4$	$3.7 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下
昆布巻（カンピョウ巻）	$1.3 \times 10^5$	$5.8 \times 10^2$	$7.6 \times 10$
包装	$2.1 \times 10^5$	$7.2 \times 10^2$	$8.2 \times 10$
加熱	$3.8 \times 10^3$	$3.5 \times 10$	$3.0 \times 10$ 以下
製造（出荷時）	$7.5 \times 10^3$	$5.2 \times 10$	$3.0 \times 10$ 以下

製造工程中の二次汚染微生物を検討するために、工程雰囲気中の微生物菌数を測定した結果を第3表に示した。工場は各工程が仕切られておらず、昆布の水洗、砂落とし、漬け前、漬込、カンピョウ煮しめ、昆布巻、包装、加熱工程に至るまですべて同一空間内で行われているためか、いずれの工程においても大きな差異は認められなかったが、昆布漬込工程において細菌数がやや多くなるような傾向が見られた。

第3表 包装昆布巻製造工場の空中浮遊微生物

製造工程	菌 数					
	ピンホールサンプラー法			シャーレ開放法		
	細菌	酵母	糸状菌	細菌	酵母	糸状菌
昆布水洗	85	20	8	31	7	3
昆布品落し	80	15	6	26	5	2
昆布漬け前	90	18	10	37	3	2
昆布漬込み	110	16	8	41	8	4
カンピョウ煮しめ	75	15	6	25	4	2
昆布巻	80	22	10	32	5	3
包装	85	18	4	28	2	2
加熱	80	16	2	32	2	1

ピンホールサンプラー法の菌数：空気53L当たりの菌数

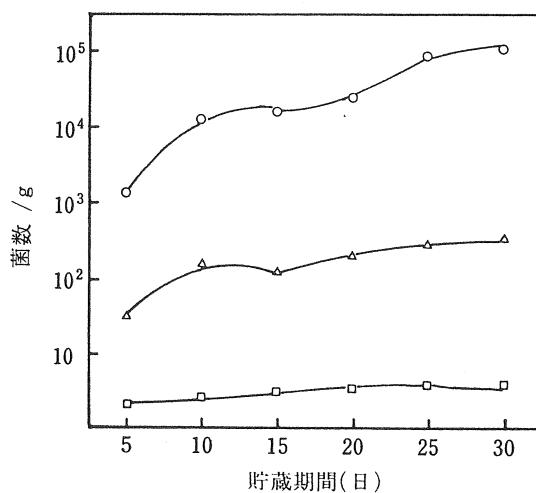
シャーレ開放法の菌数：シャーレ5分間開放時の菌数

### 3. 包装昆布巻の貯蔵中の変化

3.1 微生物菌数の変化 包装昆布巻を25°C, 80%RHで30日間貯蔵し、一定期間ごとに順次試料を取り出し、菌数およびミクロフローラを測定した結果を第2図に示した。製造直後の細菌、酵母、糸状菌はそれぞれ $7.8 \times 10^2$ ,  $3.0 \times 10$ 以下,  $3.0 \times 10$ 以下/gであった。貯蔵5日目で細菌、酵母、糸状菌はそれぞれ $2.1 \times 10^3$ ,  $5.0 \times 10$ ,  $3.0 \times 10$ 以下/gとなり、細菌と酵母がやや増加する傾向を示した。

貯蔵20日目で細菌、酵母、糸状菌はそれぞれ $7.5 \times 10^4$ ,  $3.0 \times 10$ 以下/gとなり、貯蔵30日目には細菌、酵母、糸状菌はそれぞれ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^2$ ,  $3.0 \times 10$ 以下/gとなった。

貯蔵期間の延長とともに細菌、酵母は増加したが、糸状菌はそのような傾向は示さなかった。これは貯蔵期間の延長に伴い包装袋内の酸素が減少してくるためと考えられる。しかし糸状菌は、非常に低酸素濃度でも繁殖することが知られており<sup>5)</sup>, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium*などの中には0.2%程度でかなりの生育を示すものがある。



第2図 昆布巻の貯蔵中の微生物の変化

○——○細菌, △——△酵母, □——□糸状菌  
25°C, 80%RH貯蔵

第4表 包装昆布巻の貯蔵中における包装内の酸素および炭酸ガスの変化

保存期間(日)	酸素濃度(%)	炭酸ガス濃度(%)
0	20.9	0.03
1	20.7	0.31
2	19.5	0.45
3	18.6	0.96
4	18.0	1.21
5	15.7	3.21
6	12.0	5.11
7	11.5	6.12
8	7.2	7.21
9	2.1	7.50
10	0.2	8.06
15	0.0	9.12
20	0.0	10.00
25	0.0	10.12
30	0.0	10.51

3. 2 酸素および炭酸ガス濃度の変化 昆布巻貯蔵中における包装袋内の酸素および炭酸ガス濃度を測定した結果を第4表に示した。昆布巻は水分が多く、多孔質であり極めて脱酸素しにくい食品の一つであるが、微生物の増殖により徐々に酸素が減少し、貯蔵10日においては0.2%となり、貯蔵15日目にはゼロとなった。

また炭酸ガスは微生物の増殖と共に徐々に増加し、貯蔵10日目で8.60%，貯蔵30日目で10.51%となった。炭酸ガスは水溶性で、昆布巻に吸収される割合が高いため、ヘッドスペースガス中の濃度は低く抑えられたと考えられる。以上の状態を考えると長期間貯蔵による昆布巻の変敗の原因菌は酵母又は細菌であると推定される。

3. 3 pHおよび一般成分の変化 25°Cで30日間貯蔵中におけるpHおよび一般成分の経時的变化を第5表に示した。

pHは貯蔵期間とともに低下する傾向を示した。これは微生物の増殖に伴い、生成される炭酸ガスが吸収されて低下したものと考えられる。

また水分は、貯蔵期間の経過に伴い徐々に減少した。これは水分含量が多いため包装容器内で飽和水蒸気が充満し、包材を通して水分が徐々に揮散したものと推定される。

#### 4. 包装昆布巻きの斑点生成と膨張現象

4. 1 変敗の生成状況 製造後（夏期）、3～6日で昆布およびカンピョウに白色の斑点が生成し、包装容器が膨張した。その生成状況を写真1、2に示した。

開封してみると、腐敗臭はなく強力な有機酸臭を含むエステル臭がしたことから、加熱殺菌不足にもとづく酵母による変敗と考えられた。

第5表 包装昆布巻の貯蔵中におけるpHおよび一般成分の変化

保存期間 (日)	pH	一般成分 (%)				
		水分	灰分	脂質	たんぱく質	炭水化物
0	5.20	61.0	4.0	0.3	2.9	31.8
1	5.20	60.5	4.1	0.4	2.5	32.5
5	5.10	59.2	4.2	0.3	2.6	33.7
10	5.00	58.1	3.9	0.2	2.5	35.3
15	4.95	57.0	4.1	0.4	2.4	36.1
20	4.90	56.7	4.0	0.3	2.3	36.7
25	4.88	55.5	3.8	0.3	2.7	37.7
30	4.83	55.0	4.0	0.2	2.2	38.6



写真1 白斑点が生成した昆巻

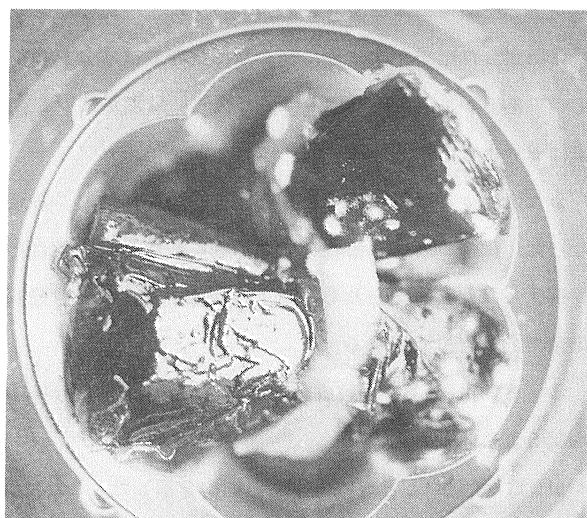


写真2 白斑点が生成し膨張した包装昆布巻

4. 2 微生物の分離・同定 25°Cで30日間貯蔵後、白斑点が生成し膨張した包装昆布巻より10菌株の細菌 (No. 1~10, 細菌数 $5.0 \times 10^4/g$ ), 2菌株の酵母 (No. 11~12, 酵母菌数 $2.6 \times 10^6/g$ ), 3菌株の糸状菌 (No. 13~15, 糸状菌数 $1.5 \times 10^3/g$ ) を分離した。

また25°Cで30日間貯蔵後の正常品より5菌株の細菌 (No. 1~3, No. 6, No. 8, 細菌数 $1.1 \times 10^4/g$ ), 1菌株の酵母 (No. 11, 酵母菌数 $5.2 \times 10^2/g$ ), 3菌株の糸状菌 (No. 13~15, 糸状菌数 $6.5 \times 10^2/g$ ) を分離した。

これらの変敗および正常昆布巻から分離した微生物の結果を第6表に示した。

4. 2. 1 細菌 白斑点が生成し、さらに膨張した包装昆布巻より10菌株の細菌を分離したが、そのうち球菌は1菌株 (No. 6), 桿菌は9菌株であった。これらの細菌は、いずれも菌数は少なく白斑点部分からはほとんど検出されないことから、直接的な変敗原因菌ではないと思われる。これら10菌株の形態的性質を第7表に、顕微鏡写真を写真3, 4に示した。No. 1は大型の菌であり、No. 2, 3は小型の菌であった。また胞子の形状はいずれも橢円形であり、その大きさは $0.7 \sim 0.8 \times 0.8 \sim 0.9 \mu\text{m}$ であった。

分離した細菌の生理的性質を第8表に示した。表のようにNo. 1は*Bacillus cereus*, No. 2, 3は*B. subtilis*, No. 4は*B. macerans*, No. 5は*B. polymyxa*, No. 6は*Micrococcus halodenitrificans*, No. 7は*B. licheniformis*, No. 8, 9は*B. coagulans*と同定した。No. 10は未同定である。

No. 4の*B. macerans*とNo. 5の*B. polymyxa*はグルコースから酸とガスの生成を認めた。正常品からはNo. 4の*B. macerans*とNo. 5の*B. polymyxa*は検出されず、これらの菌が膨張現象の1つの原因になったことも考えられる。

第6表 変敗および正常昆布巻からの微生物の分離

分離菌No.	標準寒天平板上での形態	菌数/g		菌種
		正常品	変敗品	
1	灰白粘度あり	$1.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	細菌
2	灰白広がる	$2.1 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$	細菌
3	白色広がる	$1.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	細菌
4	灰白広がる		$1.2 \times 10^3$	細菌
5	白色粘度あり		$2.5 \times 10^3$	細菌
6	茶褐色	$2.7 \times 10^3$	$3.1 \times 10^4$	細菌
7	灰白盛り上がる		$2.1 \times 10^3$	細菌
8	白色盛り上がる	$3.6 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	細菌
9	灰白しづわあり		$4.8 \times 10^2$	細菌
10	灰白小コロニー		$6.3 \times 10^2$	細菌
11	白色盛り上がる	$5.2 \times 10^2$	$2.6 \times 10^6$	酵母
12	白色粘度あり		$3.1 \times 10^3$	酵母
13	白色粉状	$1.7 \times 10^2$	$5.7 \times 10^2$	糸状菌
14	白色羊毛状	$2.1 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2$	糸状菌
15	白色緻密	$2.7 \times 10^2$	$5.1 \times 10^2$	糸状菌
総菌数		$2.5 \times 10^4$	$2.7 \times 10^7$	

第7表 昆布巻から分離した細菌の形態的特徴

菌株No.	栄養細胞		胞子	
	形状	大きさ ( $\mu\text{m}$ )	形状	大きさ ( $\mu\text{m}$ )
1	桿状	$1.5 \sim 6.5 \times 1.0 \sim 1.2$	橢円形	$0.7 \times 0.8$
2	桿状	$1.2 \sim 2.0 \times 0.6 \sim 0.8$	橢円形	$0.7 \times 0.8$
3	桿状	$1.2 \sim 2.5 \times 0.6 \sim 0.8$	橢円形	$0.7 \times 0.8$
4	桿状	$1.5 \sim 2.5 \times 0.6 \sim 0.8$	橢円形	$0.7 \times 0.8$
5	桿状	$1.5 \sim 5.5 \times 0.6 \sim 0.8$	橢円形	$0.7 \times 0.8$
6	球状	1.0	—	—
7	桿状	$1.5 \sim 3.0 \times 0.6 \sim 0.8$	橢円形	$0.8 \times 0.9$
8	桿状	$2.0 \sim 4.0 \times 0.6 \sim 0.8$	橢円形	$0.8 \times 0.9$
9	桿状	$2.0 \sim 5.5 \times 0.8 \sim 1.0$	橢円形	$0.8 \times 0.9$
10	桿状	$2.5 \sim 7.5 \times 0.6 \sim 0.8$	橢円形	$0.8 \times 0.9$

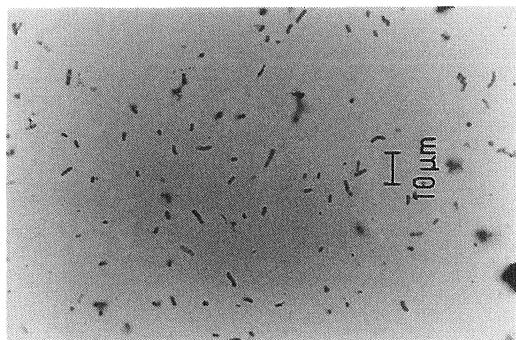
第8表 昆布巻から分離した細菌の生理的性質

	菌株No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
グラム染色	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
カタラーゼ反応	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸銀還元	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V-P反応	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
MR反応	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
クエン酸資化性	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
ゼラチン溶解性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ウレアーゼ活性	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
スターチ加水分解性	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
硫化水素の生成	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
カゼイン凝固性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45℃での生育	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
糖の資化性										
グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ショクロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ラクトース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ソルビトール	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
アラビノース	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
マンニトール	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
キシロース	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
グリセリン	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+

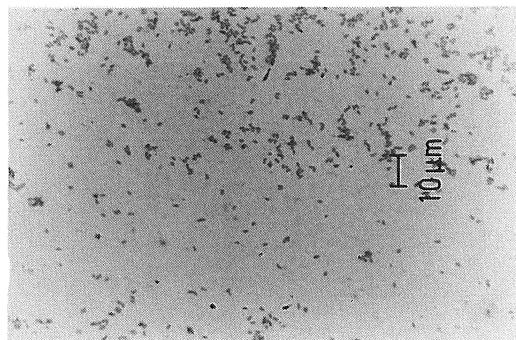
+ : 陽性, - : 陰性

なお正常品からは *B. cereus* (No. 1), *B. subtilis* (No. 2 と 3), *M. halodenitrificans* (No. 6), *B. coagulans* (No. 8) を検出した。

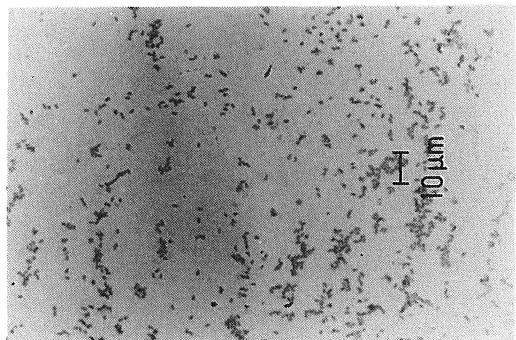
4.2.2 酵母 白斑点が生成し、さらに膨張した包装昆布巻より 2 菌株の酵母を分離した。これらの酵母は白斑点部分より多量に検出されたことから変敗の主原因菌と考えられた。これら 2 菌株の形態的性質を第 9 表に示した。いずれの菌株も橢円形、卵形、長橢円形が混在し、偽菌糸を形成し、山



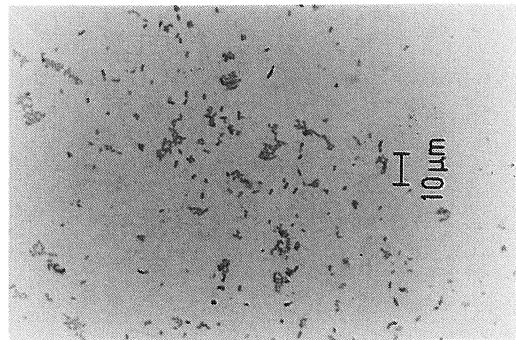
No. 1



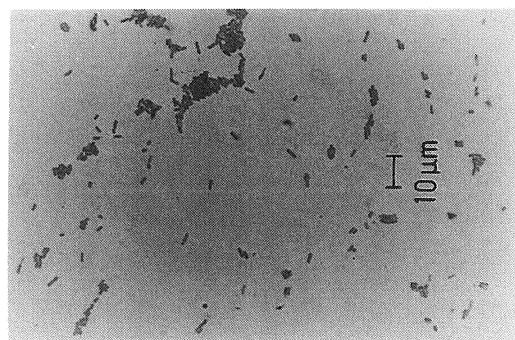
No. 2



No. 3



No. 4



No. 5

写真3 昆布巻から分離した細菌の顕微鏡写真 (No. 1 ~ No. 5)

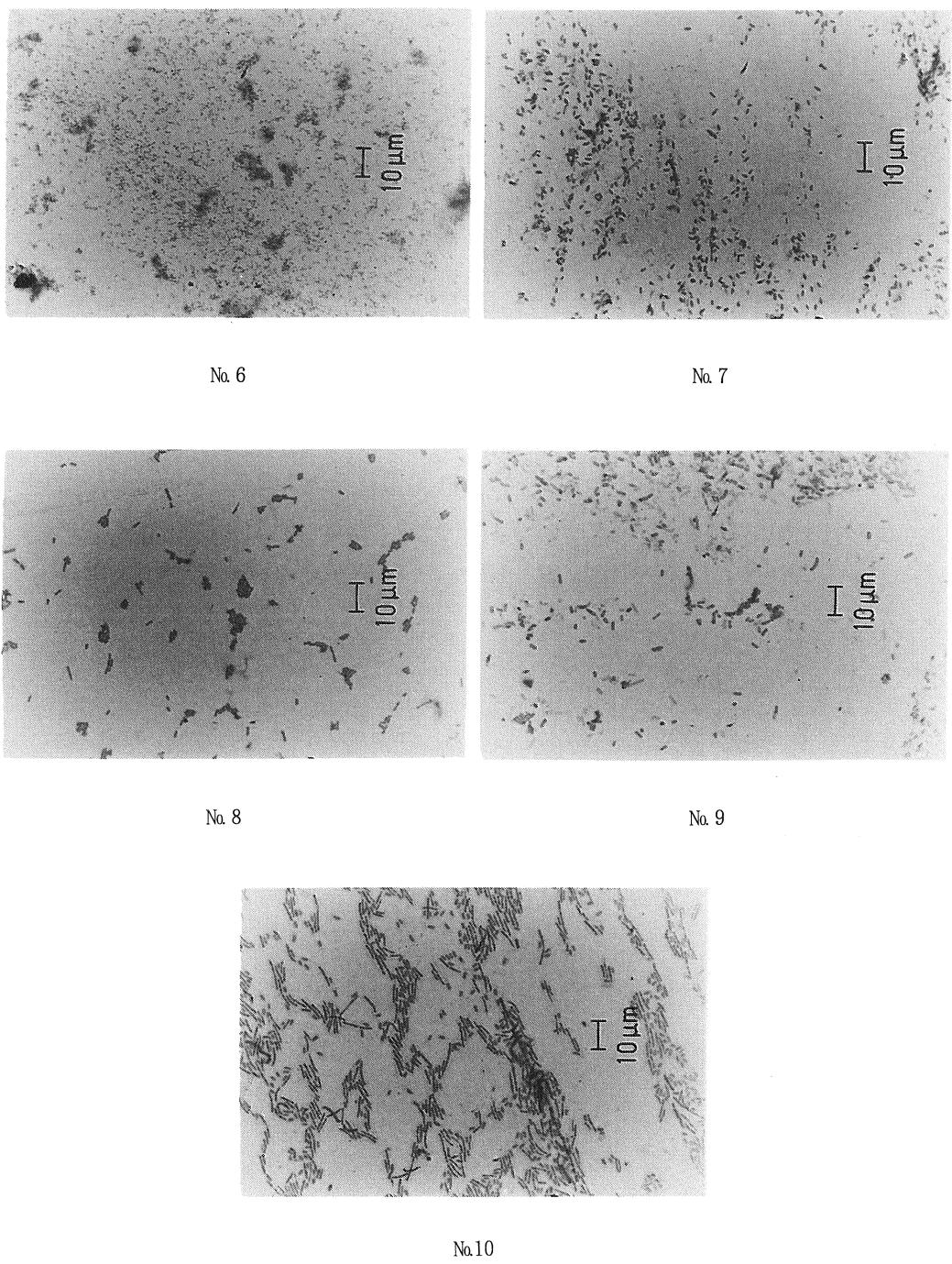
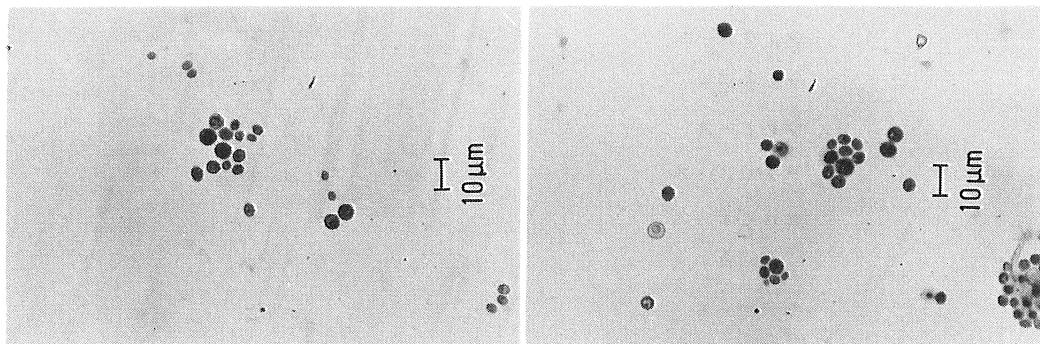


写真4 昆布巻から分離した細菌の顕微鏡写真 (No. 6～No.10)

第9表 昆布巻から分離した酵母の形態的性質

	菌株No.	
	11	12
細胞		
形態	円形, 卵形, 長橢円形混在	円形, 卵形, 長橢円形混在
大きさ ( $\mu\text{m}$ )	2.5~4.0 × 2.5~6.5	3.0~4.5 × 2.5~6.5
偽菌糸	形成	形成
胞子		
形態	山高帽子型	山高帽子型
大きさ ( $\mu\text{m}$ )	1.2~2.0 × 1.5~3.0	1.2~2.0 × 1.5~3.0
皮膜	形成	形成
麦芽寒天培地での生育	白色から淡黄色の滑らかな 盛り上がる集落	白色から淡黄色のやや乾燥 した盛り上がる集落
YM寒天培地での生育	白色から淡黄色の艶のある 盛り上がる集落	白色から淡黄色のやや乾燥 した盛り上がる集落



No.11

No.12

写真5 昆布巻から分離した酵母の顕微鏡写真

高帽子状の胞子を形成した。これらの酵母の顕微鏡写真を写真5に示した。

またこれらの菌株は皮膜を形成し、麦芽寒天培地での生育は白色からクリーム色を呈し、滑らかな盛り上がる集落を形成した。

分離した酵母の生理的性質を第10表に示したが、いずれの菌株も *Hansenula* 属に属する。

*Hansenula* 属は硝酸塩の利用で *Pichia* と異なる。両属とも胞子の壁は滑らかである。もし硝酸塩を利用し、胞子壁が粗面であれば、その菌種は *Citeromyces* 属に、硝酸塩が利用されず胞子壁が粗面であれ

第10表 昆布巻から分離した酵母の生理的性質

	菌株No.	
	11	12
アルブチン分解	+	+
硝酸塩資化性	+	+
エタノール資化性	+	+
ビタミンフリー培地での生育	-	+
糖の発酵性		
グルコース	+	+
マルトース	+	+
ガラクトース	-	+
ラクトース	-	-
ショクロース	+	+
糖の資化性		
グルコース	+	+
ショクロース	+	+
マルトース	+	+
ラクトース	-	-
ラフィノース	+	+
セロビオース	+	+
トレハロース	+	+
キシロース	+	+
アラビノース	+	+
ラムノース	-	-

- : 陰性, + : 陽性

ば、その菌種は*Issatchenkia*属か*Torulaspora*属に属する。

No.11は*Hansenula subpelluculosa*, No.12は*Hansenula anomala*と同定した。

なお正常品からは*Hansenula subpelluculosa*のみを検出した。

4. 2. 3 糸状菌 白斑点が生成し、さらに膨張した包装昆布巻より3菌株の糸状菌を分離した。

これらの糸状菌は白斑点部分より検出されたことから、変敗の原因菌の1つと考えられる。

分離した3菌株 (No.13~15) は白色もしくは着色し、高さは3~5mm程度である。胞子のう柄は分岐し、多数の胞子を内蔵する胞子のうを形成する。胞子のうの大きさは60~70 $\mu$ mであり、柱軸はよく発達する。

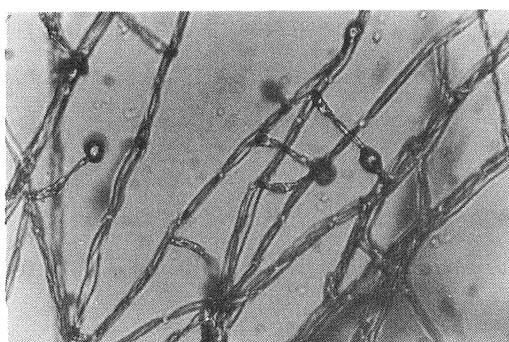
胞子のう胞子は橢円形もしくはいくぶん腎臓形で、5.0~8.0×2.0~4.5 $\mu$ mである (No.13)。

これらの菌株の形態的性質を第11表に、分離菌株No.13, 14の顕微鏡写真を写真6に示した。以上の結果より分離した3菌株はいずれも*Mucor hiemalis*と同定した。

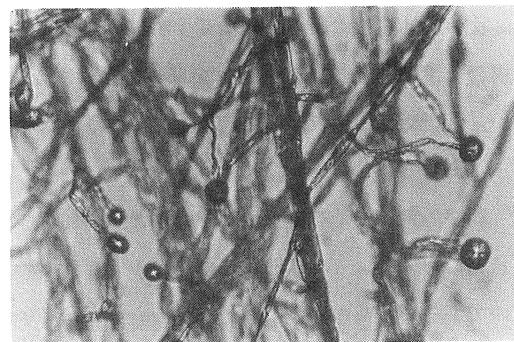
なお正常品においても同程度の*Mucor hiemalis*が分離された。同定した分離微生物を第12表に示した。

第11表 昆布巻から分離した糸状菌の形態的性質

	菌株No.		
	13	14	15
胞子のう柄の形態	単生又は分岐	単生又は分岐	単生又は分岐
胞子のう柄の大きさ ( $\mu$ m)	10~12	10~12	10~12
胞子のうの色調	黄色	淡黄色	黄色
胞子のうの大きさ ( $\mu$ m)	50~60	50~60	50~60
胞子の形態	橢円形	橢円形	橢円形
胞子の大きさ ( $\mu$ m)	5.0 ~ 8.0 × 2.0 ~ 4.5	4.5 ~ 7.0 × 2.5 ~ 3.0	4.5 ~ 8.0 × 3.4 ~ 4.0
厚膜胞子	形成せず	形成せず	形成せず
麦芽エキス寒天培地上での生育 (20°C, 10日後)	淡黄色から灰色 の刺状突起	灰色の刺状突起	黄色の刺状突起



No.13



No.14

写真6 昆布巻から分離した糸状菌の顕微鏡写真

第12表 分離微生物の同定

分離菌株No.	同定名
1	<i>Bacillus cereus</i>
2	<i>Bacillus subtilis</i>
3	<i>Bacillus subtilis</i>
4	<i>Bacillus macerans</i>
5	<i>Bacillus polymixa</i>
6	<i>Micrococcus halodenitrificans</i>
7	<i>Bacillus licheniformis</i>
8	<i>Bacillus coagulans</i>
9	<i>Bacillus coagulans</i>
10	未同定
11	<i>Hansenula subpericulosa</i>
12	<i>Hansenula anomala</i>
13	<i>Mucor hiemalis</i>
14	<i>Mucor hiemalis</i>
15	<i>Mucor hiemalis</i>

## 考 察

つくだ煮原料の大部分は、乾燥水産原料である。昆布つくだ煮の原料とされるのは真昆布、利尻昆布、細目昆布、長昆布などであるが、とりわけ長昆布と利尻昆布とが最も多く利用されている。この原藻である昆布には $5.7 \times 10^5 / g$  の細菌と $1.2 \times 10^2 / g$  の酵母が付着している。水洗あるいは酢酸処理により菌数は若干減少するが、次の昆布巻工程や包装工程において二次汚染を受け菌数は増加する。

次の加熱工程により菌数は減少するが、加熱工程以前の菌数により残存菌数は決定される。昆布巻の場合は、pHが5.00～5.20、水分55～60%，水分活性0.92～0.95であるため通常著しい変質はみられない。ただ物理的現象として、親水性多糖類が構成成分であるため周囲の湿度により吸脱湿して、外観が損なわれることがある。

従来、昆布つくだ煮、するめつくだ煮、混合つくだ煮、でんぶといった濃口つくだ煮は、概して、糸状菌の作用によって変敗することが多い。*Aspergillus glaucus*, *Catenularia*属, *Penicillium*属が主なものであるが、このほか*Aspergillus niger*, *Rhizopus*属, *Mucor*属もみられる。

濃口つくだ煮でも、吸湿が著しく、液汁の貯留する部分に酵母の発育が認められる。また浅炊きつくだ煮の腐敗は主として細菌、酵母によるが表面乾燥が起こった部分には糸状菌が発生する場合も多い。

これらの簡易包装品や含氣包装品が腐敗した場合は、腐敗臭を発生しネット生成現象を示す場合も多いが、これらは*Bacillus*属による腐敗である<sup>6)</sup>。脱氣包装後、熱殺菌しないものや殺菌が十分でないものが腐敗した場合、袋が膨張する現象を生じる。この現象が起きた場合にはネット生成現象や腐敗臭はないが、酸敗臭あるいはアルコール臭が発生する。これは主として*Streptococcus*属、*Micrococcus*属あるいは酵母の作用によるものである<sup>6)</sup>。

今回、白斑点が生成し、さらに膨張が生じた包装昆布巻より細菌10菌株、酵母2菌株、糸状菌3菌株を分離した。

腐敗品および正常品のいずれからも分離された細菌はNo.1 (*Bacillus cereus*)、No.2、3 (*B. subtilis*)、No.6 (*Micrococcus halodenitrificans*)、No.8 (*B. coagulans*)であった。

その他のNo.4 (*B. macerans*)、No.5 (*B. polymyxa*)、No.7 (*B. licheniformis*)、No.9 (*B. coagulans*)は今回の変敗に関与している可能性がある。*B. macerans*による糖発酵の生産物はエタノール、アセトン、酢酸、ギ酸、炭酸ガス、水素であり、*B. polymyxa*は2、3ブタンジオール、エタノール、炭酸ガス、水素である<sup>7)</sup>。*B. macerans*と*B. polymyxa*のもう一つの特徴は嫌気的条件下で培養した時の窒素固定能である(包装昆布巻貯蔵15日で酸素ゼロ)。また*B. licheniformis*は強力な脱窒細菌であるため、硝酸塩の存在下では非発酵性の有機基質を消費して嫌気的に生育できる。*Bacillus*属でこの能力をもっているのは、この細菌のみである。

しかし細菌数は $5.0 \times 10^4 / g$ であり、膨張の主原因菌とは考えにくい。これに比べて酵母菌数は $2.6 \times 10^6 / g$ と多いため、膨張の主原因菌は今回分離された*Hansenula*属の酵母と考えられる。*Hansenula*属酵母はサワークラウトやピクルスのような酸性の製品の表面に生育し、有機酸も資化減少させる。本菌はアルコール濃度の比較的高いところにも生育し、アルコールを酸化し、糖からはアルコールを経てエステルを生成する<sup>8)</sup>。

*Hansenula anomala*を麹エキス培地に接種して、25°C、15日間培養後のヘッドスペースガスを分析すると酢酸エチルが72~93%と圧倒的に多く、次いでエチルアルコール(2.2~23.3%)、アセトアルデヒド(0.6~5.8%)、酢酸イソアミル(0.1~2.6%)、酢酸イソブチル(0.1~1.7%)であった<sup>9)</sup>。以上のことより昆布巻の糖を*Hansenula*属酵母が資化しエステルを生成して膨張したものと考えられる。

さらに糸状菌は*Mucor hiemalis*が分離されたが、これは正常品においても同程度の菌数が検出されたことから、白斑点生成および膨張の主原因菌ではないと推察される。

以上のことから変敗品は原料の汚染が著しく(分離される細菌の種類が多い)、二次汚染が多い(細菌および酵母が特に多い)ことと蒸気殺菌が不十分であったためと考えられる。特に酵母が変敗の主要原因菌であり、今回の変敗が一定のロットからのみ発生しているところから、蒸気殺菌が不十分であったためと考えられる(正常品は貯蔵30日後で酵母菌数 $5.0 \times 10^2 / g$ )。

## 要 約

1. 昆布巻の原材料および製造工程中の半製品、製品の微生物菌数を測定した結果、原材料である昆布に $5.7 \times 10^5 / g$  の細菌と $1.2 \times 10^2 / g$  の酵母が付着していた。製造工程中に二次汚染を受けてやや増加するが、加熱後の出荷時においては細菌、酵母、糸状菌がそれぞれ $7.5 \times 10^3$ 、 $5.2 \times 10$ 、 $3.0 \times 10$ 以下/g であった。

2. 包装昆布巻を $25^\circ\text{C}$ 、80%RHで30日間貯蔵した結果、細菌、酵母、糸状菌はそれぞれ $2.5 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^2$ 、 $3.0 \times 10$ 以下/g となった。また酸素は貯蔵15日目にゼロとなり、炭酸ガスは貯蔵30日目で10.51%となった。またpHは貯蔵期間の延長とともに低下し、貯蔵30日目には4.83となった。

3. 白斑点が生成し、膨張した昆布巻より細菌10菌株 (No.1～10)、酵母2菌株 (No.11～12)、糸状菌3菌株 (No.13～15) を分離した。

また正常品より細菌5菌株 (No.1～3, No.6, No.8)、酵母菌1菌株 (No.11)、糸状菌3菌株 (No.13～15) を分離した。変敗品の菌数は $2.7 \times 10^6 / g$  で最も酵母が多く $2.6 \times 10^6 / g$  (No.11) であった。

正常品は $2.5 \times 10^4 / g$  と主として細菌が中心であった。

4. 変敗品より分離した微生物を同定した結果、No.1は*Bacillus cereus*、No.2, 3は*B. subtilis*、No.4は*B. macerans*、No.5は*B. polymyxa*、No.6は*Micrococcus halodenitrificans*、No.7は*B. licheniformis*、No.8, 9は*B. coagulans*、No.10は未同定、No.11は*Hansenula subpericulosa*、No.12は*Hansenula anomala*、No.13, 14, 15は*Mucor heimalis*であった。

5. 白斑点生成および膨張現象は主として酵母 (*Hansenula subpericulosa*) により生成したものと考えられることから、蒸気殺菌が不十分であったためと判断した。

## 文 献

- 1) 内藤：防菌防黴，17, 483 (1989)
- 2) 内藤ら：防菌防黴，17, 517 (1989)
- 3) 内藤ら：日食工誌，34, 788 (1987)
- 4) 永原ら：食品分析法, p.78, 99, 108, 119, 柴田書店 (1976)
- 5) 石谷ら：日食工誌，28, 75 (1981)
- 6) 河端ら：加工食品と食品衛生, p.283, (株)新潮社(1976)
- 7) Stanier R.Y et al: 微生物学 (下), p.275, 株培風館(1980)
- 8) 内藤：愛知食品工試年報, 23, 46 (1982)
- 9) 内藤：愛知食品工試年報, 23, 36 (1982)