

包装食品の微生物変敗防止に関する研究（第28報）

ヒドロキザム酸生産菌による包装生中華麺の着色化現象について

内藤茂三

包装生中華麺は、クチナシ色素又はリボフラビンを添加して着色しているが、今回、夏期（7月）において製造後2～3日で赤褐色斑点が生成する生中華麺が見られた。この赤褐色斑点は保存期間の延長に伴い、徐々に大きく、濃くなつた。

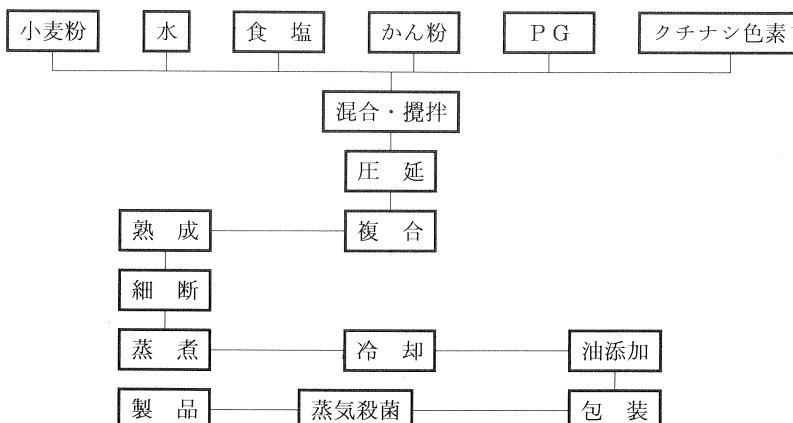
また包装生中華麺を完全に加熱殺菌すると全く発生しないことが認められた。更にこの赤褐色斑点部分には多くの鉄分が検出された。以上のことより本現象は製造工程中に汚染された微生物による着色現象であると考えられた。これまでに包装生中華麺の着色現象は黄変(*Corynebacterium michiganense*)¹⁾、褐変(*Pseudomonas sp.*)²⁾が認められているが、今回の赤褐色斑点生成現象は上記現象と生成状況が全く異なつていたので、その着色機構を解明するために若干の検討を行つた。

実験方法

1. 試料

愛知県下の包装生中華麺製造工場で製造された半製品、製品で、赤褐色斑点の生成したものおよび正常品を用いた。

その製造工程を第1図に示した。



第1図 包装生中華麺の製造工程

なお原材料として小麦粉、クチナシ色素、P G（プロピレングリコール）、食塩、かん粉を用いた。かん粉に水を加えてかん水を作り、これにクチナシ色素、P G、食塩を溶解し小麦粉を練る。なおかん水は前夜に調整する。

かん粉の組成は炭酸カリウム18%，炭酸ナトリウム23%，リン酸第2ナトリウム1.0%，ピロリン酸ナトリウム1.0%，ポリリン酸ナトリウム2.0%，リン酸第3カリウム55%である。

混合、攪拌した上記小麦粉を圧延、複合、熟成、細断、蒸煮後、冷却し、油を添加して包装する。次いで蒸気殺菌を行った後に出荷する。

なおモデル実験に用いた包装生中華麺は塩化第二鉄を2～500ppm添加して製造した。

2. 包装フィルム

高密度ポリエチレン（H D P E, 50 μ m）の袋に入れてシールした。

酸素透過度は $1000\text{cc/m}^2/24\text{hr. atm}$ (25°C, dry), 透湿度は $5.2\text{g/m}^2/24\text{hr.}$ (40°C, 90% RH) であった。

3. 微生物菌数の測定

微生物測定試料は滅菌したミンチを用いて生中華麺を均一に磨碎した後、25 gを採取し、滅菌生理的食塩水225mlを加えてホモジナイザーで10分間処理して試料原液とした。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ペック寒天培地を用いてそれぞれ希釀平板培養法で行った。

4. 微生物の同定

既報^{3)～5)}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芽胞の有無を確認し、生理的性質を調べた。標準菌株は*B. megaterium* IFO 12108, 13498, 3970, 12068, *B. subtilis* ATCC 6454, *B. cereus* ATCC 11778, *B. licheniformis* ATCC 14580, *Micrococcus flavus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080, *Chromobacterium violaceum* IFO 12614を用いた。

5. 貯蔵試験

温度30°C、相対湿度80%RHの恒温恒湿器中で14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. 鉄の定量

フェナントロリン比色法⁶⁾により測定した。

7. 薄層クロマトグラフィー

Merck社製 TLC plate cellulose precoated(without fluorescent indicator)を用い、n-ブチルアルコール：酢酸：水（60：15：25）の溶媒系で展開後、ヒドロキザム酸の検出を1%塩化第2鉄水溶液で行った。

8. ペーパークロマトグラフィー（P P C）

東洋ろ紙No.50を用い、イソプロパノール：水（4：1）、n-ブチルアルコール：酢酸：水（60：15：25）の溶媒系で展開後、ヒドロキザム酸の検出を1%塩化第2鉄水溶液で行った。

9. ヒドロキザム酸の比色法

C. L. Atkin等⁷⁾の方法および佐藤ら⁸⁾の方法によった。

10. ヒドロキシアミンの定量

T. Z. Csaky⁹⁾の方法により分析した。なお加水分解は6N塩酸を用いて106°Cで12時間行った。標準としてヒドロキシアミン塩酸塩（関東化学株製）を用いた。

11. 赤外吸収スペクトルの測定

試料1mgにKB-r100mgを混合して、KB-r錠剤成型器3型を用いて錠剤を作成して、赤外吸収スペクトル試料とした。なお測定には回折格子赤外分光光度計（日本分光工業㈱ I R A - 2型）を用いた。

12. 細菌の増殖の測定

微生物増殖曲線自記装置（BT-6、大竹製作所製）を用いて、定常期の各種細菌を約10³/mlになるように接種し、30°Cで培養した。

13. ヒドロキザム酸の生産菌の培養方法

供試微生物を上記ヒドロキザム酸生産用培地に接種し、ロータリーシェーカー（トーマス機械製）を用いて100rpm、30°Cで7日間培養した。

14. ヒドロキザム酸生産用培地

ショクロース：10g、(NH₄)₂HPO₄：1.0g、K₂HPO₄：2.5g、KH₂PO₄：2.5g、MgSO₄·7H₂O：0.2g、Fe₂SO₄·7H₂O：0.01g、MnSO₄·H₂O：0.007gを1000mlの蒸留水に加えてpH7.0に調製して使用した。なお上記培地の作成方法は以下のようにして行った。

MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O以外を970mlの蒸留水に溶解し、この容器を1N KOHを用いてpH7.0に調製し、滅菌0.45μmのメンブランフィルターに通して除菌した（基礎培地）。

MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂Oは30mlの蒸留水に溶解し、滅菌0.45μmのメンブランフィルターに通して除菌後上記培地に無菌的に加えた。

15. ヒドロキザム酸生産用培地に供試した鉄分

なおヒドロキザム酸生産用培地に供試した鉄分は基礎培地にFeCl₃·6H₂Oを10⁻⁵M添加することによった。

実験結果

1. 原材料および製造工程中のミクロフローラと菌数の変化

原材料および製造工程中の菌数の消長について検討した結果を第1表に示した。

原材料の小麦粉の生菌数は2.2×10³/g、耐熱性芽胞菌数は3.0×10以下/gであった。またクチナ

第1表 原材料および製造工程中の菌数の消長

製造工程および原材料	菌数 ($/ g$)	
	生菌数	耐熱性芽胞菌数
原材料		
小麦粉	2.2×10^3	3.0×10^2 以下
クチナシ色素	2.3×10^3	3.0×10^2 以下
かん水	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
食塩	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
PEG	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
水	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
混合	5.1×10^3	3.0×10^2 以下
複合	6.9×10^3	3.0×10^2 以下
圧延	5.7×10^4	3.0×10^2 以下
細断	1.5×10^5	3.0×10^2 以下
麵帶調製（蒸気処理4～5分）	6.1×10^3	3.0×10^2 以下
冷却	6.6×10^5	3.0×10^2 以下
油添加	1.2×10^6	3.0×10^2 以下
包装	3.2×10^6	3.0×10^2 以下
殺菌（蒸気処理30分）	5.5×10^5	3.0×10^2 以下

シ色素から $2.3 \times 10^3 / g$ の生菌数が検出された。なお水、かん粉、食塩、PEGには微生物はほとんど検出されなかった。原材料を混合したときの生菌数は $5.1 \times 10^3 / g$ であるが、複合、圧延および細断する過程で $1.5 \times 10^5 / g$ まで増加した。この増加する微生物は大部分が耐熱性のないMicrococcusであるため95～98℃の蒸気中で4～5分間行う次の麵帶調製工程ではほとんど死滅し、生菌数は $6.1 \times 10^3 / g$ となった。

最初に麵帶を水槽に入れて冷却し、次にかん水を添加してpHを7.0～8.0に調製した液を入れた水槽に20～30秒間浸漬して静菌処理を行っているが、この過程で生菌数は $6.6 \times 10^5 / g$ と増加し、油（大豆白絞油）を添加後の包装工程では更に微生物の二次汚染を受けて $3.2 \times 10^6 / g$ となった。小袋に詰めてシールを行い、85℃、30分間蒸気殺菌を行った後の生菌数は $5.5 \times 10^5 / g$ であった。

2. 包装生中華麺製造工場の空中浮遊微生物

包装生中華麺は製造工程に、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、原料である小麦粉、クチナシ色素の微生物及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、蒸気殺菌されずに変敗の原因となる場合もある。

製造工程中の二次汚染微生物を検討するために、各工程の雰囲気中の微生物菌数を測定した結果を第2表に示した。工場は各工程が仕切られておらず、原材料の混合、複合、圧延、細断、麵帶調製、冷却、油添加、包装、蒸気殺菌工程に至るまですべて同一空間内で行われているため、いずれの工程にお

いても大きな差異は認められなかつたが、原材料の混合工程において細菌および糸状菌が多くなる傾向が見られた。

第2表 包装生中華麺の製造工場の空中浮遊微生物

製造工程	ピンホールサンプラー法			落下法		
	細菌	酵母	糸状菌	細菌	酵母	糸状菌
原材料置場	110	21	10	35	8	5
混合	123	28	13	51	12	7
複合	112	16	16	37	5	4
圧延	104	14	11	41	6	8
細断	115	19	17	38	8	6
麵帶調製	108	21	10	36	7	9
冷却	117	17	15	45	3	3
油添加	89	15	16	38	8	2
包装	81	12	13	32	3	2
殺菌	90	11	18	31	2	3

ピンホールサンプラー法：空気53L当たりの菌数

落下法：細菌；5分間シャーレ開放，酵母，糸状菌；シャーレ開放

第3表 包装生中華麺貯蔵中における微生物菌数および菌叢の変化

貯蔵日数 (日)	菌数(×g)			
	グラム陰性桿菌	Bacillus sp.	Micrococcus sp.	その他
5℃貯蔵				
1	6.7×10 ²	2.7×10 ²	2.1×10 ²	4.5×10 ²
2	4.7×10 ²	4.1×10 ³	7.3×10 ²	8.1×10 ²
3	5.1×10 ³	1.5×10 ³	3.3×10 ³	4.1×10 ³
4	8.9×10 ³	6.3×10 ³	8.1×10 ³	7.4×10 ³
5	1.4×10 ⁴	9.1×10 ³	1.0×10 ⁴	9.6×10 ³
15℃貯蔵				
1	4.1×10 ³	3.6×10 ³	1.2×10 ³	2.5×10 ²
2	8.5×10 ³	7.8×10 ³	3.7×10 ³	8.1×10 ²
3	3.7×10 ⁴	2.3×10 ⁴	7.3×10 ³	3.2×10 ³
4	5.4×10 ⁴	1.2×10 ⁵	3.6×10 ⁴	7.9×10 ³
5	2.4×10 ⁵	6.3×10 ⁵	8.5×10 ⁴	2.7×10 ⁴
30℃貯蔵				
1	1.2×10 ²	5.7×10 ⁶	4.1×10 ⁵	5.8×10 ³
2	8.5×10 ²	6.1×10 ⁶	6.3×10 ⁵	7.2×10 ³
3	3.7×10 ³	6.5×10 ⁶	5.9×10 ⁶	2.9×10 ⁴
4	4.4×10 ⁴	1.7×10 ⁷	2.1×10 ⁶	4.8×10 ⁵
5	5.7×10 ⁴	7.1×10 ⁷	4.1×10 ⁷	6.2×10 ⁵

3. 包装生中華麺の貯蔵中の変化

3. 1 微生物菌数の変化 包装生中華麺を 5, 15, 30°C, 80% RH で 5 日間貯蔵し、一定期間ごとに順次試料を取り出し、菌数、菌叢を測定した結果を第 3 表に示した。製造直後の生菌数は $1.7 \times 10^5 / g$ であり、ほとんど細菌であった。主な菌叢はグラム陰性桿菌 $5.0 \times 10^4 / g$, *Bacillus* $1.3 \times 10^5 / g$, *Micrococcus* 3.7×10^4 であった。

30°C 貯蔵 1 日後での主な菌叢はグラム陰性桿菌、*Bacillus*, *Micrococcus* がそれぞれ $1.2 \times 10^2 / g$, $5.7 \times 10^6 / g$, $4.1 \times 10^5 / g$ となり、貯蔵 3 日後でそれぞれ $3.7 \times 10^3 / g$, $6.5 \times 10^6 / g$, $5.9 \times 10^6 / g$ 、貯蔵 5 日後でそれぞれ $5.7 \times 10^4 / g$, $7.1 \times 10^7 / g$, $4.1 \times 10^7 / g$ となった。なお 5, 15°C 貯蔵では、30°C 貯蔵に比較していずれの菌も増殖速度は抑制された。

3. 2 鉄含量の変化 生中華麺に生成する赤褐色斑点は、鉄の集積により生成したと予想されたので、生中華麺の貯蔵中における鉄含量の変化を測定した結果を第 4 表に示した。

その結果、正常部では $4.46 \sim 6.10 \text{ ppm}$ 、赤褐色部では $16.37 \sim 20.61 \text{ ppm}$ の鉄が検出された。微生物菌数の増加にともない、赤褐色斑点が生成したところから、微生物の生産物質が鉄の集積に関与していると考えられた。

第 4 表 包装生中華麺貯蔵中における赤褐色斑点生成と鉄含量の変化

貯蔵日数 (日)	鉄含量 (ppm)	
	正常部	赤褐色部
5°C 貯蔵		
1	4.46	赤褐色斑点生成せず
2	4.87	赤褐色斑点生成せず
3	5.12	赤褐色斑点生成せず
4	5.21	赤褐色斑点生成せず
5	5.24	赤褐色斑点生成せず
15°C 貯蔵		
1	4.66	赤褐色斑点生成せず
2	4.97	赤褐色斑点生成せず
3	5.34	赤褐色斑点生成せず
4	5.89	赤褐色斑点生成せず
5	6.10	16.37
20°C 貯蔵		
1	4.93	赤褐色斑点生成せず
2	5.87	赤褐色斑点生成せず
3	5.92	18.86
4	6.06	19.35
5	6.10	20.61

4. 包装生中華麺の赤褐色斑点生成現象

4.1 赤褐色斑点生成状況 製造後（夏期），3～5日で生中華麺に赤褐色の斑点が生成した。製造直後の製品5袋を15°Cと30°Cで5日間貯蔵して赤褐色斑点状況を検討した結果を第5表に示した。15

第5表 包装生中華麺貯蔵中における赤褐色斑点生成と微生物菌数

貯蔵日数 (日)	菌数 (/g)		
	正常部	主要菌種	赤褐色部
15°C貯蔵			
1	1.0×10^4	グラム陰性菌	赤褐色斑点生成せず
2	2.5×10^4	グラム陰性菌	赤褐色斑点生成せず
3	6.7×10^4	グラム陰性菌	赤褐色斑点生成せず
4	2.8×10^5	グラム陰性菌	赤褐色斑点生成せず
5	9.8×10^5	<i>Bacillus sp.</i>	6.8×10^5 <i>Bacillus sp.</i>
30°C貯蔵			
1	6.6×10^6	<i>Micrococcus sp.</i>	赤褐色斑点生成せず
2	8.2×10^6	<i>Micrococcus sp.</i>	赤褐色斑点生成せず
3	2.8×10^7	<i>Micrococcus sp.</i>	1.1×10^5 <i>Bacillus sp.</i>
4	3.3×10^7	<i>Micrococcus sp.</i>	5.8×10^6 <i>Bacillus sp.</i>
5	8.7×10^7	<i>Micrococcus sp.</i>	8.7×10^6 <i>Bacillus sp.</i>

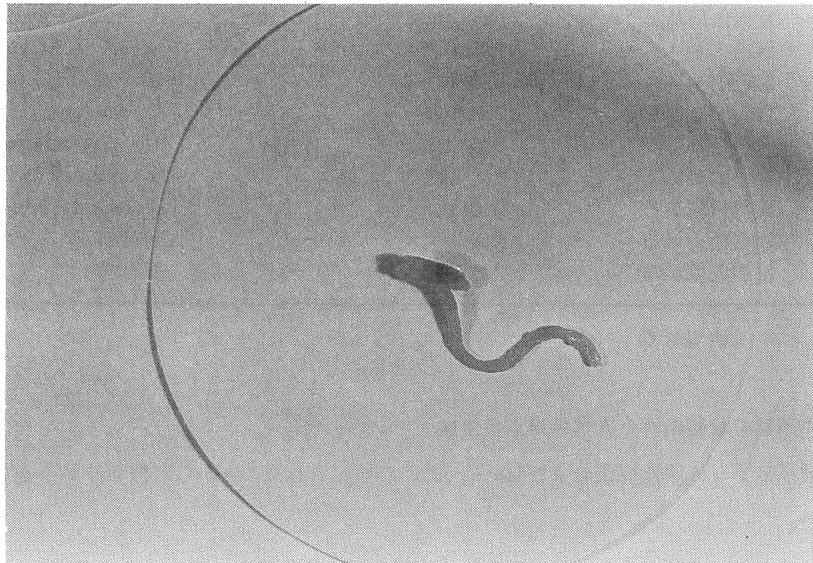


写真1 赤褐色斑点が生成した生中華麺

℃貯蔵ではいずれの製品においても5日後に赤褐色斑点が生成し、その時の赤褐色部の菌数は $6.8 \times 10^5 / g$ であった。また30℃貯蔵ではいずれの製品においても3日後に赤褐色斑点が生成し、その時の赤褐色部の菌数は $1.1 \times 10^5 \sim 8.7 \times 10^6 / g$ であった。

その生成状況を写真1に示した。

4. 2 微生物の分離・同定 30℃で5日間貯蔵後、赤褐色斑点が生成した包装生中華麺より12菌株の細菌を分離した（No.1～12、細菌数 $7.2 \times 10^8 / g$ ）。また製造直後の包装生中華麺より8菌株の細菌を分離した（No.1～8、細菌数 $1.7 \times 10^5 / g$ ）。

これらの変敗および製造直後の生中華麺から分離した細菌を同定した結果を第6表に示した。No.1, 9, 10は*B. megaterium*, No.2は*B. subtilis*, No.3は*B. cereus*, No.4は*B. licheniformis*, No.5, 6は*Micrococcus sp.*, No.7は*Pseudomonas sp.*, No.8は*Chromobacterium sp.*, No.11, 12は未同定であった。赤褐色斑点部分より*B. megaterium*が多く検出された。

第6表 赤褐色斑点生成および正常中華麺からの微生物の分離

分離菌No.	標準寒天平板培地上		菌数（/g）	同定名
	での形態	赤褐色斑点生成品		
1.	赤褐色広がる	2.8×10^7	5.2×10^2	<i>B. megaterium</i>
2.	灰白色広がる	3.7×10^6	3.1×10^2	<i>B. subtilis</i>
3.	暗灰色広がる	4.8×10^3	3.5×10^3	<i>B. cereus</i>
4.	茶褐色粘ちょう	6.3×10^4	2.8×10^3	<i>B. licheniformis</i>
5.	灰白小コロニー	6.7×10^5	6.2×10^3	<i>Micrococcus sp.</i>
6.	白色小コロニー	4.7×10^3	3.7×10^3	<i>Micrococcus sp.</i>
7.	白色盛り上がる	7.9×10^5	7.3×10^4	<i>Pseudomonas sp.</i>
8.	黄色盛り上がる	3.6×10^5	4.1×10^4	<i>Chromobacterium sp.</i>
9.	褐色広がる	1.7×10^6	—	<i>B. megaterium</i>
10.	茶褐色広がる	3.2×10^5	—	<i>B. megaterium</i>
11.	灰白色広がる	2.6×10^3	—	未同定
12.	灰白色広がる	4.5×10^3	—	未同定

—：検出せず

5. 包装生中華麺の殺菌条件と赤褐色斑点の生成

製造直後の製品にグラム陰性桿菌および*Micrococcus*が検出されたことから殺菌条件が不適切であったと考えられた。

そこで包装生中華麺の殺菌条件と30℃で貯蔵後の赤褐色斑点の生成との関係について検討した結果を第7表に示した。

90℃で30分間蒸気殺菌した製品では3日後に菌数が $3.5 \times 10^7 / g$ となり、赤褐色斑点が生成した。ま

た90℃, 60分間蒸気殺菌した製品では3日後に菌数が $2.1 \times 10^7 / g$ となり, 赤褐色斑点が生成した。90℃, 30分間湯殺菌製品では4日後に菌数が $5.1 \times 10^7 / g$ となり, 90℃, 60分間湯殺菌した製品は5日後に菌数が $1.7 \times 10^7 / g$ となり, 赤褐色斑点が生成した。

以上のことより, 耐熱性の微生物により赤褐色斑点が生成されたものと考えられた。

第7表 包装生中華麺の殺菌条件と赤褐色斑点の生成

殺菌条件	殺菌直後の菌数 (/g)	貯蔵日数および貯蔵後の菌数 (/g)					赤褐色斑点 生成日数
		1	2	3	4	5	
90℃, 30分間 蒸気殺菌	1.7×10^5	7.5×10^6	1.0×10^7	3.5×10^7	1.2×10^8	5.8×10^8	3日後
90℃, 60分間 蒸気殺菌	4.6×10^4	2.7×10^5	6.6×10^5	2.1×10^6	2.1×10^7	4.1×10^8	4日後
90℃, 30分間 湯殺菌	3.7×10^4	1.5×10^5	5.1×10^5	3.2×10^6	5.1×10^7	3.9×10^8	4日後
90℃, 60分間 湯殺菌	6.5×10^3	5.5×10^4	1.7×10^5	7.8×10^5	3.8×10^6	1.7×10^7	5日後

第8表 包装生中華麺より分離した細菌による寒天平板上の赤褐色コロニーの生成

分離菌No.	肉エキス寒天 培地上での形態	塩化第2鉄 (Fe) 含量 (ppm)					赤褐色斑点の 生成状況 (鉄含有培地)
		0.5	5.0	50	500	5000	
1.	褐色盛り上がる	+	+	+	+	+	赤褐色コロニー
2.	灰白色広がる	-	-	-	-	-	暗灰色広がる
3.	暗灰色広がる	-	-	-	-	-	暗灰色粘ちょう
4.	茶褐色粘ちょう	-	-	-	-	-	茶褐色粘ちょう
5.	灰白色小コロニー	-	-	-	-	-	暗灰白色小コロニー
6.	灰白色小コロニー	-	-	-	-	-	暗灰白色小コロニー
7.	灰白色盛り上がる	-	-	-	-	-	暗灰白色広がる
8.	黄色盛り上がる	-	-	-	-	-	黄色盛り上がる
9.	褐色広がる	+	+	+	+	+	赤褐色コロニー
10.	褐色盛り上がる	+	+	+	+	+	赤褐色コロニー
11.	灰白色広がる	-	-	-	-	-	暗灰色粘ちょう
12.	灰白色広がる	-	-	-	-	-	暗灰色粘ちょう

+ : 赤褐色コロニー生成, - : 赤褐色コロニー生成せず

塩化第2鉄を肉エキス寒天培地に添加して鉄含有エキス寒天培地を調製した。

6. 包装生中華麺より分離した細菌による赤褐色斑点の生成

赤褐色斑点生成生中華麺より分離した12菌株を用いて寒天平板上で赤褐色集落生成について検討し

た。0.5, 5, 50, 500, 5000ppmの鉄 (Fe^{3+}) 含有肉エキス寒天培地に上記分離菌を接種し、赤褐色斑点の生成について検討を行った結果を第8表に示した。

供試した12菌株中で赤褐色斑点が生成したのはNo.1, 9, 10の3菌株であった。これらはいずれも*B. megaterium*に属する菌株であった。

なお上記3菌株は0.5~5000ppmのいずれの塩化第2鉄の含量においても赤褐色斑点を生成した。

7. *B. megaterium*によるヒドロキザム酸の生産

赤褐色生中華麺より分離した*B. megaterium* 3菌株 (No.1, 9, 10) および*B. megaterium*標準菌株4菌株 (IFO 12108, 13498, 3970, 12068) の7菌株をヒドロキザム酸生産用培地で7日間振とう培養して増殖度およびヒドロキザム酸の生成について検討した結果を第9表に示した。培養液のOD₆₆₀が5.0を越えた菌は3菌株 (No.1, 9, 10) であった。このうち1株 (No.1) のみが培養液の上澄液 (3,000rpm10分間遠心分離) がヒドロキザム酸の呈色を示し (OD₄₈₀=1.5), 多量のヒドロキザム酸を分泌していることがわかった。このNo.1菌は赤褐色生中華麺より分離した*B. megaterium*であった。なお、アルカリおよび熱水を用いてNo.1菌の菌体からヒドロキザム酸の抽出を試みたが、両者とも培養上澄液に比べるとほとんど無視できる程度の抽出量であった。

第9表 *B. megaterium*によるヒドロキザム酸の生産

供試菌株	増殖度		ヒドロキザム酸の生産 OD ₄₈₀ (呈色)
	OD ₆₆₀	OD ₄₈₀	
分離菌株			
No. 1	7. 75		1. 50
No. 9	6. 28		0. 25
No. 10	5. 36		0. 32
標準菌株			
IFO 12108	2. 21		0. 03
IFO 13498	3. 57		0. 06
IFO 3970	2. 78		0. 05
IFO 12068	1. 36		0. 08

30°C, 5日培養

8. *B. megaterium* (No.1) の生産物

B. megaterium (No.1) の生産物がどのような物質かを調べるために、鉄欠乏培地で30°C, 2日間前培養した*B. megaterium* (No.1) の培養液 1mlを同培地100mlに添加し、300ml容三角フラスコで30°C, 14日間振とう培養し、5000rpm, 10分間遠心分離し、その上澄液を約1/10になるまでロータリーエバボレーターで減圧濃縮した。その濃縮物を5°Cで3日間放置して得た結晶をろ別し、沸騰水から再結晶した結

果2 ℓの培地から8.1 gのかすかに着色した結晶を得た。

この結晶をPPCを用いて分離した結果、展開溶媒がイソプロパノール・水(4:1)ではRf 0.67となり、n-ブタノール・酢酸・水(60:15:25)ではRf 0.70となった。また鉄を添加してキレートさせた結晶(10~14% Fe)のRfは上記のそれぞれの溶媒で0.30, 0.35となった。ヒドロキシアミンの測定(試料の加水分解前後)、赤外吸収スペクトル、薄層クロマトグラフ分析等の結果を文献値¹⁰⁾と比較した結果、*B. megaterium*が生産するヒドロキザム酸として知られているシゾキネン¹⁰⁾と一致した。

以上の結果より*B. megaterium*(No.1)の生産するヒドロキザム酸は第1図の構造を有するジゾキネンと考えられた。



第2図 シゾキネン(Schzokinenn)の構造式

考 察

包装生中華麺中の生菌数は製造直後すでに $1.7 \times 10^5 / g$ 存在し、そのうち*Bacillus*は $1.3 \times 10^5 / g$ であった。このため貯蔵中に徐々に増殖してヒドロキザム酸を生成して多くの鉄を吸着して着色物質を生成したと思われる。赤褐色部の鉄の含量は16.37~20.61 ppmであり、正常部の4.46~6.10 ppmより約4~5倍多いことからもわかる。

包装生中華麺の赤褐色斑点生成現象は15℃貯蔵では5日後に、30℃貯蔵では3日後に生成し、そのときの赤褐色部の菌数は $1.1 \times 10^5 \sim 8.7 \times 10^6 / g$ であった。これらの菌の多くは耐熱性があり、90℃、30分間の蒸気処理、90℃、60分間の湯殺菌処理後においても貯蔵期間の延長に伴い赤褐色斑点が生成した。

赤褐色斑点生成に関与する細菌を3菌株分離し、いずれも*B. megaterium*であると同定した。これらの菌は鉄を吸収して赤褐色斑点を生成するところからヒドロキザム酸を生成していることが予想された。

*B. megaterium*が生産するヒドロキザム酸として知られているシゾキネンの文献値¹⁰⁾と比較するとよく一致したことから、包装生中華麺より分離した*B. megaterium*が生産するヒドロキザム酸もシゾキネンと考えた。

以上のことから包装生中華麺の赤褐色斑点生成現象は原材料からの一次汚染菌あるいは製造工程からの二次汚染菌である*B. megaterium*がヒドロキザム酸の一種であるシゾキネンを生成し、これが微量の鉄をキレートして着色物質を生成したと考えられた。

鉄により清酒が着色することは、昔から良く知られている。この原因が、大部分麹菌が生産するフェリクリーム類、特にフェリクリシンによることが明らかとなっている。この場合、鉄を含む着色物質であるフェリクリシンは赤褐色結晶であり、また鉄を含まないデフェリクリシンも清酒に存在して

いる¹¹⁾。このように清酒中には必ずデフェリクリシンが存在し、鉄の存在によりすみやかに赤褐色のフェリクローム類に変化する。このフェリクローム類は薬理作用としては抗貧血性を有し、更にデフェリフェリクリシンは鉄とのキレート力が強いことから鉄含有色素の沈着を阻止し、ヘモシデリン沈着症等に有効であるとされている¹²⁾。

今回の包装生中華麺の赤褐色斑点生成現象も清酒の場合とよく似ており、汚染菌が生成するシズキネンが微量の鉄を吸着して着色物質を生成すると考えられる。

このため、シズキネンを生産する*B. megaterium*の汚染を防止することが必要であり、小麦粉の一次汚染および製造工程からの二次汚染を防止する対策をとる必要がある。

要 約

包装生中華麺の赤褐色斑点生成現象を検討し以下の結果を得た。

1. 包装生中華麺製造直後の生菌数はすでに $1.7 \times 10^5 / g$ あり、そのうち*Bacillus*は $1.3 \times 10^5 / g$ であった。この菌は貯蔵中に増殖し、赤褐色斑点も徐々に大きくなる傾向を示した。さらに赤褐色部は多くの鉄を含んでいた。

2. 包装生中華麺より赤褐色斑点生成に関与する細菌を3菌株分離し、いずれも*B. megaterium*であると同定した。これらの菌はいずれもヒドロキザム酸を生産するため鉄をキレートし、赤褐色斑点を生成した。

3. 包装生中華麺の赤褐色斑点生成現象は原材料からの一次汚染菌あるいは製造工程からの二次汚染菌である*B. megaterium*がヒドロキザム酸の一種であるシズキネンを生成し、これが微量の鉄をキレートして着色物質となったと考えられた。

文 献

- 1) 内藤茂三・酒井達也：愛知食品工試年報，21，63-71(1980)
- 2) 内藤茂三：未発表
- 3) 内藤茂三・山沢正勝：防菌防黴，17，111-118(1989)
- 4) 内藤茂三：防菌防黴，17，483-489(1989)
- 5) 内藤茂三・沢田洋一・山口直彦：防菌防黴，17，517-526(1989)
- 6) 永原太郎：食品分析法，P 163-165，柴田書店，東京(1957)
- 7) C. L. Atkin and J. B. Neilands : *Biochemistry*, 7, 3734-3738(1968)
- 8) 佐藤 信：釀協，62，875-880(1967)
- 9) T. Z. Csaky : *Acta Chem Scand.*, 2, 450-459(1948)
- 10) B. R. Byers, M. v. Powell and C. E. Lankford : *J. Bacteriol.* 93, 286-294(1967)

- 11) 佐藤 信：釀協, 62, 1279-1287(1967)
- 12) E. Goyman：特公昭39-27500(1964)