

包装食品の微生物変敗防止に関する研究 (第34報) 包装ストレートつゆの乳酸菌による膨張現象について

内藤茂三

最近の消費者の簡便志向・高品質志向によりストレートつゆや2倍希釈タイプといった低希釈倍率のつゆ製品が多く市販されるようになってきた。これらのつゆ製品は食塩濃度2~4%と非常に低く、微生物の汚染を受けると変敗しやすい品質である。したがって、これらのつゆ製品は高温短時間殺菌を行い、クリーンルームの中でホット充填が行われている。

既報¹⁾においてストレートスープが白濁する現象は原材料に由来する*Bacillus circulans*の増殖であることを報告した。

今回、全く異なる3社(A, B, C)の包装ストレートつゆが夏期において2~3日で膨張し、さらにpHが著しく低下する現象が生じた。製造直後は正常であり、保存中に上記現象が生じるところから、微生物特に乳

酸菌による変敗が予測された。そこで、この原因菌の分離・同定・汚染源の検索及び殺菌方法について検討したので報告する。

実験方法

1. 供試試料

試料は愛知県下の包装ストレートつゆ製造事業所3社で製造された半製品、製品(膨張品及び正常品)及び原材料を用いた。

原材料はいずれの事業所もほぼ共通しており、かつおパウダー、グルタミン酸ソーダ、コハク酸ソーダ、砂糖、醤油である。

包装ストレートつゆの製造方法の概略を第1図に示



第1図 小袋詰ストレートつゆの製造工程

した。原材料を混合・攪拌し、余熱機で加熱後プレート式熱交換機で殺菌し、ホット充填するシステムである。

2. 包装容器及び包装方法

製品はナイロン15 μ m/低密度ポリエチレン20 μ m/エチレン酢酸ビニル共重合体40 μ m (以下Ny15/LDPE20/EVA40)の小袋(縦10cm,横8cm)に10gを入れた。

酸素ガス透過度は105cc/m²/24hr.,atm (25℃, Dry), 透湿度は15g/m²/24hr., (40℃, 90%RH)であった。

2. 使用培地及び希釈水

(1) BCP加プレートカウント寒天培地 酵母エキス2.5g, ポリペプトン5g, グルコース1g, ツイーン80 11g, L-システイン0.1g, プロムクレゾールパーブル (BCP) 0.06g, 寒天15g, 脱イオン水1,000ml, pH7.0

(2) GYP白亜寒天培地

組成1

グルコース10g, 酵母エキス10g, ペプトン5g, 肉エキス2g, 酢酸ナトリウム・3水和物2g, 塩類溶液5ml, ツイーン80溶液10ml, 蒸留水1,000ml, pH6.8

組成2

炭酸カルシウム(180℃で30分間乾熱滅菌)5g, 寒天12g

培地調製法: 組成1を初めに調製し, そこへ組成2を加える。121℃, 15分滅菌

塩類溶液: 硫酸マグネシウム7水和物4g, 硫酸マンガ4水和物0.2g, 硫酸第一鉄7水和物0.2g, 食塩0.2g/100g

ツイーン80溶液: 5g/100ml水溶液

(3) MRS培地 ポリペプトン10g, 肉エキス10g, 酵母エキス5g, リン酸2カリウム2g, クエン酸2アンモニウム2g, グルコース20g, ツイーン80 1g, 酢酸ナトリウム5g, 硫酸マグネシウム7水和物0.58g, 硫酸マンガ4水和物0.28g, 脱イオン水1,000ml, pH6.5

(4) Briggsのトマトジュース培地 トマトジュース400ml, ポリペプトン15g, グルコース20g, 食塩5g, ツイーン80 1g, 酵母エキス6g, 可溶性でんぷん0.5g, 脱イオン水1,000ml, pH6.8

(5) PDA寒天培地 栄研化学(株)の既製品培地にクロラムフェニコール(100mgをエタノール5mlに溶解)を培地1,000ml当たり2.5ml添加したもの

(6) 標準寒天培地 栄研化学(株)の既製品培地

(7) 希釈水 食塩8.5gを脱イオン水1,000mlに溶解

3. 微生物菌数の計数及び分離

細菌の計数及び分離には標準寒天培地を用い, 酵母の計数及び分離にはPDA寒天培地を用い, 試料の10倍段階希釈を作製し, 混釈法により30℃, 2日間培養後に出現したコロニーを計数及び分離した。

乳酸菌の計数及び分離にはBCP加プレートカウント寒天培地とGYP白亜寒天培地を用い, 同様に試料の10倍段階希釈を作製し, 塗抹法により寒天平板を作製した。培養は, ガスパック嫌気システム(BBL社製)を用い, 30℃, 3日間行い, BCP加プレートカウント寒天培地では黄変したコロニーを計数し, GYP白亜寒天培地では炭酸カルシウムを溶解したコロニーを計数した。また出現したコロニーを釣菌し, 上記寒天平板への塗抹法により純化した。

4. 微生物の同定

細菌については形態的な観察を行うとともに生化学的性状を検討して同定を行った²⁾。

一応簡易に分類するために桿菌でカタラーゼ反応陽性で芽胞を形成するグラム陽性菌を*Bacillus*とした。また均一の大きさの単状, 2連状, 4連状又は小房状の球菌でカタラーゼ反応陽性, ブドウ糖を酸化的に分解し, 芽胞を形成しないグラム陽性菌を*Micrococcus*とした。

乳酸菌の同定のための諸性質の検討には, 乳酸菌実験マニュアル³⁾の記載に準じるとともにBergey's Manual of Systematic Bacteriology⁴⁾記載の方法に準じ, MRS培地を基本培地として行った。すなわち, ガス生産性, 5℃から45℃における増殖の検討, 食塩, アルコール存在下における増殖の検討には, 0.05%クロロフェノールレッドを含むMRS培地を用い, 7日間まで培養を行った。糖等の発酵性は, 0.05%クロロフェノールレッドと1%の各種糖濃度を含むグルコースと肉エキスを含まないMRS培地を用い, 30℃, 7日間まで培養を行い, 指示薬の変色を観察した。乳酸, アルコールの生産性の検討にはグルコース, 肉エキスを含むMRS培地, 乳酸の光学異性体の検討には, 酢酸を含まないGYP培地を用い, 30℃で3日間の培養後の培養液を用いた。

細胞壁のペプチドグリカン含量の測定にはトマトジュース培地で30℃, 7日間静置培養して得た菌体を用いた。

得られた結果を, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁴⁾に照らし合わせて, 菌名を同定した。

5. 落下菌及び空中浮遊菌の測定

製造工場(A)に設定した12地点において年間4回にわたって落下菌及び空中浮遊菌を測定した。用いた培地は細菌の測定用には標準寒天培地、酵母及びカビの測定用にはPDA寒天培地、乳酸菌の測定用にはBCP加プレートカウント寒天培地を用いた。落下菌はシャーレ(直径9 cm)を細菌では5分間、真菌では20分間解放して試験を行った。

空中浮遊菌の捕集はピンホールサンプラー(三基科学工業(株)製)により、毎分26.5 Lの速度で2分間空気を吸引した、この際、サンプラーのターンテーブルの上に標準寒天培地、PDA寒天培地及びBCP加プレートカウント寒天培地を置き、この平板に出現したコロニー数を空気53 L当たりの菌数として示した。

6. 一般成分分析

一般成分分析及びグルタミン酸はしょう油試験法に準じ、色度は試料を適宜希釈して450nmにおける吸光度を測定し、希釈率を乗じた。

7. 有機酸の分析

変敗品及び正常品100gを硫酸でpH2.0に調製し、ソックスレー液体抽出器で120時間連続抽出を行い、エーテルを完全に除去後定容(50ml)とした。その1 mlについてカルボン酸分析計(日本分光(株)製)により分析した。

8. ストレートつゆの膨張の再現試験

供試菌株として、変敗品及び正常品より分離した23菌株を培養後、ストレートつゆ1袋にそれぞれ $1.5 \times 10^4 \sim 2.1 \times 10^5$ の菌数の菌株を接種し、それを7日間保存し、膨張の有無について観察した。

9. エタノールの分析

市販キット(商品名): Fキット/エタノール(ペリ

ンガー・マンハイム山之内(株)製)で測定した。

10. 乳酸施光性試験

30℃、8日間培養して、培養液を3,000rpm、10分間遠心分離し、上澄液のみを75℃、15分間加熱して酵素を失活させた。この上澄液について市販キット(商品名): Fキット/D乳酸L乳酸(ペリンガー・マンハイム山之内(株)製)で測定した。

11. ペプチドグリカンタイプの測定試験

30℃、7日間培養して、培養液を10,000rpm、10分間遠心分離により集菌し、さらに菌体を蒸留水で2回洗浄した。ペプチドグリカンは乳酸菌実験マニュアル³⁾により調製し、凍結乾燥した。4 N塩酸中100℃、20時間加水分解後の試料のアミノ酸を薄層クロマトグラフィ及びアミノ酸分析計(日立(株)製L-8500)で分析した。

実験結果

1. 原材料及び製造工程中の半製品、製品の微生物変化

A社の製造工程中の微生物の消長を第1表に示した。かつおパウダーに 6.7×10^2 /g、グルタミン酸ソーダに300以下/g、コハク酸ソーダに300以下/g、砂糖に300以下/g、醤油に 3.8×10^2 /g、ミリンに30以下/gの細菌が検出された。原材料をパステライザーに投入後、混合・攪拌して85℃まで蒸気加熱、その後スチームを止め90℃に達温後に 6.2×10^3 /g、20分間保持して90℃に保温したサブタンクに移した後に 3.1×10^2 /g、次にプレート式熱交換機(120~125℃)に3~5秒通した後30以下/gとなり、90℃に保温されたレシーブタンクへ移行させた後に 3.5×10 /gとなった。

第1表 ストレートつゆの製造工程中における微生物の消長

製造工程中の試料	菌数 (/g)		
	細菌	酵母	カビ
かつおパウダー	6.7×10^2	300以下	300以下
グルタミン酸ソーダ	300以下	300以下	300以下
コハク酸ソーダ	300以下	300以下	300以下
砂糖	300以下	300以下	300以下
醤油	3.8×10^2	30以下	30以下
ミリン	30以下	30以下	30以下
混合・攪拌(達温90℃)	6.2×10^3	30以下	30以下
サブタンク(90℃、20分保持)	3.1×10^2	30以下	30以下
熱交換機(121℃、3~5秒)	30以下	30以下	30以下
レシーブタンク(90℃保持)	3.5×10	30以下	30以下
充填直後(80℃)	2.8×10^2	30以下	30以下
包装後(70~75℃)	6.3×10^3	30以下	30以下

次の工程の充填・包装はクラス10,000レベルのクリーンルームの中で行っているが充填直後で $2.8 \times 10^2/g$ 、包装後で $6.3 \times 10^3/g$ となった。そこでこれらの各工程の乳酸菌の分布状況を検討した結果を第2表に示した。乳酸菌はレシーブタンク（貯蔵）以降の工程で検出され、充填・包装工程で増殖したものと考えられる。製品の汚染の原因は上記工程からの二次汚染であると考えられたため、製造工程別に落下菌の種類と菌数を測定した結果を第3表に示した。工場全体に落下細菌が10～50CFU（コロニー形成単位）/シャーレ5分間解放と比較的多く、特に混合・攪拌工程に多く認められ、それらのうち約25%が乳酸菌であった。充填を行っているクリーンルームの中においても落下菌として乳酸菌が検出された。B社及びC社においてもほぼ同様であり落下菌として乳酸菌が検出された。

第4表に各社のストレートつゆの変敗品と正常品の微生物菌数及び菌叢を測定した結果を示した。

各社の変敗製品より $6.5 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7/g$ 、正常品より $2.2 \times 10^2 \sim 3.1 \times 10^2/g$ の乳酸菌を検出した。その

他の微生物では*Micrococcus* を変敗品及び正常品のいずれからも $1.2 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^2/g$ 検出した。またB社とC社の変敗品より $2.5 \times 10^2 \sim 5.2 \times 10^3/g$ の酵母を検出した。

2. ストレートつゆの成分の変化

A, B, C, 3社のストレートつゆの変敗品及び正常品の成分の変化を測定した結果を第5表に示した。

製品のpHは正常品で5.30～5.60であり、変敗品は4.30～4.50と著しく低下していることが認められた。

食塩濃度は正常品及び変敗品のいずれも3.2～3.7%であり、全糖濃度は正常品で6.0～6.8%であり、変敗品は2.3～3.4%に低下することが認められた。さらに変敗品は乳酸、酢酸、コハク酸、ピログルタミン酸が多く検出されたところからストレートつゆの変敗は乳酸菌の増殖に起因することが考えられた。

各社の製造直後のストレートつゆ10袋を5, 10, 20, 30, 35, 45℃で2週間保存後の微生物菌数を測定した結果を第6表に示した。各社とも5～35℃保存後の製品に乳酸菌が検出され、20～35℃保存で膨脹した。

第2表 ストレートつゆの製造工程中における乳酸菌の消長

製造工程中の試料	菌数 (/g)		
	嫌気性細菌	乳酸桿菌	乳酸球菌
かつおパウダー	300以下	300以下	300以下
グルタミン酸ソーダ	300以下	300以下	300以下
コハク酸ソーダ	300以下	300以下	300以下
砂糖	300以下	300以下	300以下
醤油	30以下	30以下	30以下
ミリン	30以下	30以下	30以下
混合・攪拌 (達温80℃)	30以下	30以下	30以下
サブタンク (80℃、20分保持)	30以下	30以下	30以下
熱交換機 (121℃、3～5秒)	30以下	30以下	30以下
レシーブタンク (80℃保持)	5.5×10^3	4.6×10^3	30以下
充填直後 (80℃)	6.9×10^3	6.2×10^3	30以下
包装後 (70～75℃)	1.2×10^4	1.1×10^4	30以下

第3表 ストレートつゆ製造工場の落下菌および空中浮遊菌

製造工程	落下法*1				ピンホールサンブラー法*2			
	好気性細菌	乳酸菌	酵母	カビ	好気性細菌	乳酸菌	酵母	カビ
原材料置場	10	0	1	1	55	2	3	5
混合・攪拌工程	35	15	4	6	80	27	8	9
サブタンク周辺	15	5	2	2	37	12	5	7
熱交換機周辺	18	3	1	2	31	10	4	8
レシーブタンク周辺	21	10	2	1	48	20	5	8
充填・包装工程 (クリーンルーム内)	10	2	1	1	21	12	2	2

*1 落下法：細菌、CFU (Colony Forming Unit) /シャーレ5分間解放
酵母およびカビ、CFU/シャーレ5分間解放

*2 ピンホールサンブラー法：CFU/空気53L

第4表 変敗したストレートつゆの微生物菌数および菌叢

ストレートつゆ	細菌 (/g)			酵母 (/g)	カビ (/g)
	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	乳酸菌		
A社製品					
変敗品	30以下	2.5×10^2	7.6×10^6	30以下	30以下
正常品	30以下	1.2×10^2	3.1×10^2	30以下	30以下
B社製品					
変敗品	30以下	1.5×10^2	1.2×10^7	2.5×10^2	30以下
正常品	30以下	3.2×10^2	2.2×10^2	30以下	30以下
C社製品					
変敗品	30以下	3.6×10^2	6.5×10^6	5.2×10^3	30以下
正常品	30以下	2.5×10^2	2.5×10^2	30以下	30以下

第5表 変敗したストレートつゆの成分の変化

	A社		B社		C社	
	正常品	変敗品	正常品	変敗品	正常品	変敗品
pH	5.60	4.30	5.40	4.35	5.30	4.50
食塩 (%)	3.50	3.20	3.70	3.50	3.40	3.20
全糖 (%)	6.80	2.80	6.20	2.30	6.00	3.40
全窒素 (%)	0.25	0.20	0.24	0.18	0.22	0.14
E ₄₅₀	3.70	2.96	3.50	2.86	3.35	2.75
乳酸 (mg/100ml)	270	751	220	680	205	650
酢酸 (mg/100ml)	33	95	31	82	29	78
コハク酸 (mg/100ml)	11	25	9	19	10	22
ピログルタミン酸 (mg/100ml)	65	85	57	92	61	97
グルタミン酸 (%)	0.58	0.72	0.62	0.80	0.67	0.87
アルコール (%)	0.45	0.55	0.65	0.73	0.40	0.63

第6表 変敗したストレートつゆ保存中における微生物の変化

	保存温度 (°C)					
	5	10	20	30	35	45
A社						
<i>Bacillus</i>	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下
<i>Micrococcus</i>	30以下	30以下	1.5×10^2	2.5×10^2	2.1×10^2	30以下
乳酸菌	1.1×10^2	3.5×10^2	6.5×10^4	1.7×10^4	2.5×10^5	30以下
酵母	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下
カビ	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下
B社						
<i>Bacillus</i>	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下
<i>Micrococcus</i>	1.7×10^2	2.1×10^2	6.5×10^2	3.1×10^3	2.1×10^3	30以下
乳酸菌	3.5×10^2	2.0×10^2	5.4×10^4	4.3×10^4	2.5×10^5	30以下
酵母	1.6×10^2	1.2×10^2	2.1×10^3	4.7×10^3	3.1×10^3	30以下
カビ	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下
C社						
<i>Bacillus</i>	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下
<i>Micrococcus</i>	1.1×10^2	1.0×10^2	1.6×10^2	2.7×10^3	3.1×10^3	30以下
乳酸菌	3.1×10	2.1×10^2	3.8×10^4	3.3×10^4	5.7×10^5	30以下
酵母	3.1×10	4.6×10^2	5.1×10^3	4.2×10^3	1.8×10^3	30以下
カビ	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下	30以下

菌数: /g

乳酸菌の菌数はいずれの会社のストレートつゆでも20～35℃保存で最大 ($1.7 \times 10^4 \sim 5.7 \times 10^5/g$) となった。

Micrococcus は各社の製品から、またいずれの保存温度においても検出された。

B社とC社のストレートつゆからは、5～35℃保存で $3.1 \times 10 \sim 5.1 \times 10^3/g$ の酵母を検出した。

3. 分離微生物による膨張現象について

変敗ストレートつゆより *Bacillus* 3菌株 (A社: No. 1, B社: No. 2, C社: No. 3), *Micrococcus* 4菌株 (A社: No. 4～5, B社: No. 6, C社: No. 7～8), 3菌株の乳酸菌 (A社: No. 9, B社: No. 10, C社: No. 11) さらに2菌株の酵母 (B社: No. 12, C社: No. 13) が検出された。

正常ストレートつゆより *Bacillus* 3菌株 (A社: No. 14, B社: No. 15, C社: No. 16), *Micrococcus* 4菌株 (A社: No. 17～18, B社: No. 19, C社: No. 20), 3菌株の乳酸菌 (A社: No. 21, B社: No. 22, C社: No. 23) が検出された。なお工場の落下菌から乳酸菌

(A社: No. 24, B社: No. 25, C社: No. 26) が検出された。

これらの分離した微生物を殺菌したストレートつゆに添加して、膨張経過を観測した結果を第7表に示した。膨張現象が生じたのはNo. 9～11, No. 21～23, No. 24～26の乳酸菌を添加した製品のみであった。

4. 乳酸菌の同定

分離した乳酸菌の形態学的、生理学的性状を検討した結果を第8表に示した。分離した9菌株の形態はすべて桿菌であり、No. 9～11の3菌株の顕微鏡写真を写真1～3に示した。

糖類発酵性試験では、9菌株すべてが同一の発酵性を示した。つまり、全菌株がフラクトース、グルコース、シュクロース、リボース及びマルトースを資化し、アラビノース、キシロース、ラムノース、セロビオース、ガラクトース、ラクトース、マンノース、マンニトール、メリビオース、ラフィノース、スターチは資化しなかった。

生育温度試験では糖類発酵性試験と同様に全菌株が

第7表 ストレートつゆの膨張に関与する微生物

分離菌株No.	膨張	pH	分離源
1 (<i>Bacillus</i>)	—	5.3	変敗品 (A社)
2 (<i>Bacillus</i>)	—	5.2	変敗品 (B社)
3 (<i>Bacillus</i>)	—	5.3	変敗品 (B社)
4 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.4	変敗品 (A社)
5 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.3	変敗品 (A社)
6 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.3	変敗品 (B社)
7 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.2	変敗品 (C社)
8 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.1	変敗品 (C社)
9 (乳酸菌)	+	4.5	変敗品 (A社)
10 (乳酸菌)	+	4.4	変敗品 (B社)
11 (乳酸菌)	+	4.5	変敗品 (C社)
12 (酵母)	—	5.5	変敗品 (B社)
13 (酵母)	—	5.2	変敗品 (C社)
14 (<i>Bacillus</i>)	—	5.2	正常品 (A社)
15 (<i>Bacillus</i>)	—	5.1	正常品 (B社)
16 (<i>Bacillus</i>)	—	5.2	正常品 (B社)
17 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.3	正常品 (A社)
18 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.4	正常品 (A社)
19 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.3	正常品 (B社)
20 (<i>Micrococcus</i>)	—	5.1	正常品 (C社)
21 (乳酸菌)	+	4.5	正常品 (A社)
22 (乳酸菌)	+	4.6	正常品 (B社)
23 (乳酸菌)	+	4.3	正常品 (C社)
24 (乳酸菌)	+	4.4	工場落下菌 (A社)
25 (乳酸菌)	+	4.3	工場落下菌 (B社)
26 (乳酸菌)	+	4.5	工場落下菌 (C社)

+: 膨張、—: 膨張せず
 添加菌数: $6.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5/1$ 袋
 保存温度: 30℃、保存期間: 7日間

第8表 ストレートつゆより分離した乳酸菌の形態学および生理学的性質

	分離菌株No.									
	9	10	11	21	22	23	24	25	26	
形態	桿状	桿状	桿状	桿状	桿状	桿状	桿状	桿状	桿状	桿状
大きさ (μm)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	1.5	3.5	1.5	3.0	1.5	2.0	2.5	1.8	2.0	
グラム染色	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
カタラーゼ反応	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
胞子形成	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
生育温度 (°C)										
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
糖の発酵性										
アラビノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
リボース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
キシロース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
フルクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ガラクトース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
マンノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
マンニトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ラクトース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
セロビオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
シュクロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
メリビオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ラフィノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
スターチ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
食塩5%下生育	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
エタノール5%下生育	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
発酵のタイプ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	

+: 陽性、-: 陰性

ヘテロ型: 乳酸、酢酸、エタノール生成

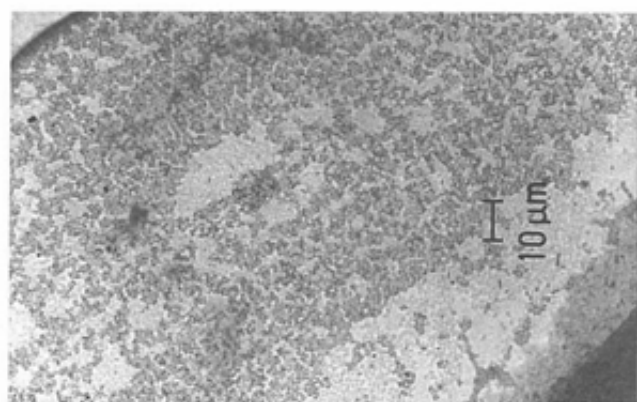


写真1 変敗したストレートつゆより分離した乳酸菌 (No.9)



写真2 変敗したストレートつゆより分離した乳酸菌 (No.10)

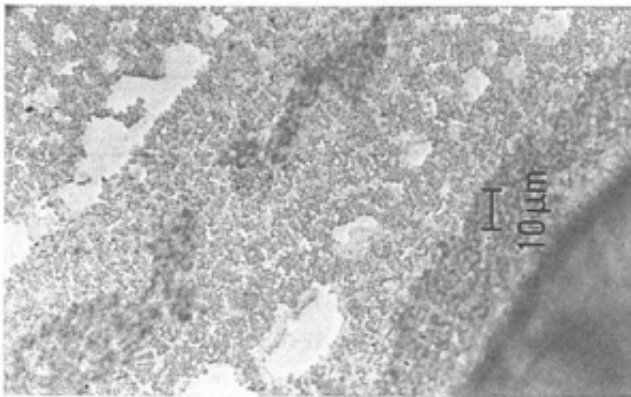


写真3 変敗したストレートつゆより分離した乳酸菌 (No.11)

同一の生育温度を示した。すなわち5℃から35℃までは生育したが、45℃では生育しなかった。これらの菌はすべて乳酸以外に酢酸を生産したところからヘテロ型であった。

以上により、9菌株とも同じ種と推定されたので、以下からはNo.9菌株について行った。

ガス発生が認められたグルコースを炭素源としたMRS培地の培養液上清中には0.8%の乳酸と0.5%のアルコールが検出された。

精製後の乳酸のD乳酸は0.36g/L、L乳酸は0.45mg/Lであったので、生成乳酸はDL型と判定した。ペプチドグリカンタイプ(DAP/非DAP)の判定を行ったところRf値が0.32であること、発色が紫色であることから細胞壁は非DAP型であった。また加水分解後のペプチドグリカンのアミノ酸組成はLys : Glu : Ala : Aspは1 : 1 : 1.8 : 0.6であったので、ペプチドグリカンのタイプはLys-D-Asp型と判定した³⁾。

No.9菌株は、グルコースからガスとともに乳酸、アルコールをほぼ等モル生成したことからヘテロ発酵型の*Lactobacillus*と考えられた。

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹⁾に従って同定した結果、*Lactobacillus fructivorans*と判定した。

なお標準菌株*Lactobacillus fructivorans* IFO 13118と比較した結果、形態学的及び生理学的性質がほぼ一致した。

5. 工場の殺菌

従来、A、B、C社は工場の殺菌に次亜塩素酸ナトリウム液を200～300ppm散布してきたが、*Lactobacillus fructivorans*は生育してきた。

このため塩素系と全く殺菌メカニズムが異なるオゾ

ンを夜間のみ約0.60～1.2ppmの濃度で3ヵ月散布(強制対流型ランプ式オゾン発生器、D社製)した。その結果、*Lactobacillus fructivorans*は全く検出されなくなった。

考 察

最近、乳酸菌による変敗は多発しており、その変敗現象の主なものは次のとおりである⁵⁾。

変色(充填豆腐：*Leuconostoc*、タレ：*Leuconostoc*)、酸敗(スープ：*Lactobacillus*、饅頭：*Lactobacillus*、あん：*Enterococcus*、水煮タケノコ：*Enterococcus*)、膨脹(漬物：*Lactobacillus*、乾燥果実：*Lactobacillus*)がある。

今回、同時に3つの会社より生産された包装ストレートつゆが膨脹し、返品が多発した。

低食塩濃度のしょうゆでは、ホモ型発酵菌である*Lactobacillus*が、アミノ酸を脱炭酸して炭酸ガスを発生させることにより膨脹が起きることが報告されている^{6)~9)}。そしてこれらの膨脹試料は正常試料と比較して、遊離のアスパラギン酸、アラニン、グルタミン酸、γ-アミノ酪酸、リンゴ酸が変化していることを明らかにしている。しかし、これらの現象は膨脹は起きるがpHは低下していない。

また今回の膨脹ストレートつゆA、B、C各社製品のうち、B、C社製品からは酵母が検出されたが、この分離酵母のみの添加では膨脹しないところから、膨脹の直接的な原因ではない。

このため今回の膨脹現象は、上記の菌とは全く異なると考えられる。今回膨脹を引き起こした乳酸菌はヘテロ型の*Lactobacillus fructivorans*であり、本菌は生育にかなりの糖濃度(1～10%)を必要とし、さらに特定の糖(グルコース、フルクトース等)にのみ生育するため食品中では生育しにくい微生物である。また本菌は乳酸、酢酸、エタノールとともに炭酸ガスを生成するので今回の膨脹現象とpH低下現象が生じた。

変敗品と同様に正常品においても同様の乳酸菌が検出され、工場の落下からも同様の乳酸菌が検出されたところから、典型的な工場の二次汚染により本現象が発生した。

正常品も保存時間が延長するに伴い膨脹現象が生成する。また本菌は5%程度のアルコール添加では良好に生育するため、アルコールのみによる工場の殺菌はむづかしい。

乳酸菌は薬剤に対しては抵抗力を持つ菌株が多いため、薬剤のみに頼らず他の殺菌メカニズムの異なる殺菌剤を併用することが必要である。当該3工場はいずれも工場の殺菌に次亜塩素酸ナトリウム液を散布していたが、長年使用しているために耐性菌等の出現により効果が少なくなったものと考えられる。このため塩素系殺菌剤と殺菌メカニズムの全く異なるオゾンを経間のみ散布することにより乳酸菌は全く検出されなくなった。

要 約

小袋詰ストレートつゆの膨張及びpH低下現象についてその原因を検討し、以下の結果を得た。

- 1) 正常品のpHは5.30～5.60、全糖濃度6.0～6.8%、乳酸濃度205～270mg/100gであったが、膨張品はpHは4.30～4.50、全糖濃度2.3～3.4%、乳酸濃度650～751mg/100gであった。
- 2) 膨張した製品より乳酸菌が $6.5 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7$ /g検出された。これらの膨張製品を製造した3つの工場の落下菌から乳酸菌が検出された。分離した乳酸菌をストレートつゆに添加したところ、膨張現象とpH低下現象が発生した。
- 3) 分離された乳酸菌はすべて*Lactobacillus fructivorans*と同定された。本菌はヘテロ型発酵を行う乳酸菌であり、乳酸、酢酸、エタノールとともに炭酸ガスを生成することが認められた。このためス

トレートつゆの膨張は工場の落下菌に由来する*Lactobacillus fructivorans*により生成したと考えられる。

- 4) 膨張ストレートつゆを製造した工場の殺菌に従来より殺菌剤として使用してきた次亜塩素酸ナトリウムに加えて、夜間のみオゾン処理を行うことにより*Lactobacillus fructivorans*は全く検出されなくなった。

文 献

- 1) 内藤茂三：愛知食品工試年報，25，19-28 (1984)
- 2) 長谷川武治編著：微生物の分類と同定(上)，(株)学会出版 (1984)
- 3) 小崎道雄：乳酸菌実験マニュアル，朝倉書店 (1992)
- 4) Kandler, O. and Weiss, N. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol 2 (Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA), p. 1209 (1986)
- 5) 内藤茂三：未発表
- 6) 浦 哲二，佐々木正治，古屋 武，内田一生：日本醤油研究所雑誌，14，187-192 (1988)
- 7) 浦 哲二，佐々木正治，古屋 武，内田一生：日本醤油研究所雑誌，15，44-49 (1989)
- 8) 浦 哲二，佐々木正治，古屋 武，内田一生：日本醤油研究所雑誌，15，93-100 (1989)
- 9) 田中正夫：日本醤油研究所雑誌，16，4-6 (1990)