

多水分系包装食品の変敗防止技術に関する研究

— 包装生麺の変敗菌の同定 —

辻 政雄・恩田 匠・小宮山美弘

Development of Preservation Technology of Packaged Food

— Identification of Acid Producing Bacteria Isolated from Japanese Raw Noodles Packed with Oxygen Absorbent —

Masao TSUJI, Takumi ONDA and Yoshihiro KOMIYAMA

要 約

酸素吸収剤を封入して包装した「ほうとう」を酸敗させる変敗菌の分離、同定を行った。その結果、pediococci, leuconostocs, streptococci 及び lactobacilli の各属の乳酸菌が同定され、さらに種決定を実施したところ、*P.pentosaceus*, *Leu.mesenteroides*, *Leu.gelidum*, *Leu.paramesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus raffinolactis* 及び *L.acidophilus* が同定された。これらのなかでは *P.pentosaceus* が最も多かった。さらにこの菌の起源について調査したところ、原料の小麦粉に由来していることがわかった。

1. 諸 言

山梨県には地域特産品で、生麺の一種である「ほうとう」がある。この麺は、きしめんのような形状をしているが、食塩や水分含量が少なく、調理法が湯でこぼしをせず、野菜とともに味噌で煮込むことを特徴としている。しかし、この「ほうとう」は生麺の一種であるため、保存及び流通上、微生物による変敗が認められる。現在、麺類を含めた多くの食品には、カビなどの好気性菌を抑制するために酸素吸収剤が使われているが、これのみでは短期間に「ほうとう」が酸敗し、長期保存はむずかしい。そのため、前報¹⁾で、「ほうとう」の品質保持について検討したところ、小麦粉に対してグリシンを2%添加し、加水率を26%で製造した麺を酸素吸収剤とともに密封包装することにより、25℃の温度下でも1ヶ月以上品質を良好に保持できることを報告した。

今回は、酸素吸収剤使用下で「ほうとう」を酸敗させる変敗菌を明らかにするため、その菌の分離、同定を行った。

2. 実験方法

2-1 製麺方法

小麦粉は(株)はくばく製中力粉「甲斐駒」を使用

し、粉1kgに食塩10gを加え、水を加水率が35%となるように添加し、小型ミキサーで10分混合攪はん後、圧延、切断して麺線とした。

2-2 保存方法

麺60gを酸素吸収剤(三菱瓦斯化学(株)エージレスFX100)とともにガスバリアー性のフィルム袋(KON/PE)に入れて密封後、25℃の恒温器に保存した。

2-3 変敗菌の分離、同定

2-3-1 分離菌株

麺が変敗した時点で標準寒天培地に生育した23株を無作為に釣菌し、純粋分離平板培養を繰り返して、分離菌株を得た。

2-3-2 乳酸菌の同定用培地及び培養法

供試菌は、表1のGYP培地に一白金耳量接種し、30℃で約18時間静置培養した。平板培地は、GYP培地組成に寒天粉末1.5%を添加して調整した。なお、同定試験はバイオアッセイの手法によるため、供試菌株の高い生理活性が必要となる。そこで、継代培養を繰り返し供試菌の活性を十分に高めた。

2-3-3 乳酸菌の同定試験

乳酸菌の同定試験は、乳酸菌実験マニュアル²⁾やその他の細菌学実験書³⁾に従って、以下の同定項目を検討した。実験により得られた結果をBergey's Manual⁴⁾に照らし合わせ、同定した。

1) グラム染色及び形態観察

グラム染色は、グラム染色キット(フェイバー・Gセット「ニッスイ」, 日水製薬(株))を使用した。グラム染色を行った後、光学顕微鏡を用いて形態観察を行った。

表1 GYP培地

グルコース (関東化学)	1 %
酵母エキス (OxOID Unipath LTD.)	1 %
ペプトン (Bacto Pepton, DIFCO)	1 %
酢酸ナトリウム	1 %
無機塩溶液 ¹⁾	0.5%(w/v)
ツィーン溶液 ²⁾	0.5%(w/v)
1) MgSO ₄ ・7H ₂ O	40mg/ml
MnSO ₄ ・4H ₂ O	2mg/ml
NaCl	2mg/ml
FeSO ₄ ・7H ₂ O	2mg/ml
conc.HCl	1ml/200ml
2) 1ml/200ml溶液	

pHを7.0に調整後、121°C, 15分間滅菌を実施

2) 発酵生産物の同定及び定量

糖からの発酵生産物の検討は、高速液体クロマトグラフを用いて行った。すなわち、GYP培地で30°C 3日間培養した培養液を遠心分離(3,500rpm—20分)後、上澄液1mlを陰イオン交換樹脂(Dowex WGR Muromachi kagaku kogyo)を充填したカラムに通して有機酸(乳酸)を吸着させた。その後蒸留水50mlを用いて担体を洗浄後、2Nアンモニア水50mlで溶出させ、得られた試料を3mlに減圧濃縮した。この濃縮した試料を、高速液体クロマトグラフ(Hitachi 635型)を用いて、発酵生産物の検出、同定および定量を行った。

3) 運動性試験

GYP培地組成に寒天を0.15%添加した軟寒天培地を作成し、供試菌前培養液を穿刺培養した。培養後、肉眼観察により運動性の有無の判定を行った。

4) カタラーゼ試験

供試菌培養液を遠心分離(3,500rpm—20分)後、沈澱として集めた菌株に3%過酸化水素水を

1ml添加し、発泡の有無を観察した。発泡が認められた菌株は、100ppmアジ化ナトリウムを1ml添加して発泡が停止するか否かを確認した。

5) 孢子形成試験

供試菌培養溶液を80°Cで10分間加熱処理後、培地中の菌の生残を検討した。

6) 糖からのガス発生試験

供試菌株の発酵形式を簡便的に検討するため、糖(グルコース)からガス(炭酸ガス)が発生するか否かを検討した。すなわち、GYP液体培地の組成を2%グルコースとし、ダーラム管を入れ、供試菌前培養液を30μl接種した。3日間培養後、ダーラム管にガスが認められるか否かを観察した。

7) 糖発酵性試験

GYP培地の糖源(グルコース)の代わりに各種の糖類を糖源とし、酵母エキス及びペプトンを0.5%とした試験培地を作成した。なお、五単糖はオートクレーブ滅菌によりアミノカルボニル反応を起こし易いので、4/3濃度のGYP培地に4%五単糖溶液を無菌的に添加した。試験培地に供試菌前培養液を30μl接種し、30°Cで培養した。3日間培養後、生育の強弱を肉眼観察により判定した。検討した糖類は、アラビノース、D-リボース、D-キシロース、グルコネート、フルクトース、ガラクトース、マンノース、ラムノース、セロビオース、ラクトース、マルトース、シュクロース、ラフィノース、サリシン、トレハロース、マンニトール、ソルビトール及びブスターチである。

8) 生育温度試験

GYP培地5mlに供試菌前培養液を30μl接種し、任意の各種温度で培養を行った。3日間培養後、生育の有無を肉眼で判定した。

9) 生育pH試験

4/3濃度のGYP培地3mlに任意のpHの緩衝液(アルカリ側は炭酸緩衝液、酸性側は酢酸緩衝液)を1ml添加して、試験培地を作成した。試験培地に供試菌前培養液を30μl接種し、30°Cで培養を行った。3日間培養後、生育の有無を肉眼で判定した。

10) 耐塩性試験

4/3濃度のGYP培地3mlに任意の濃度(4×a%NaCl)の食塩水1mlを添加して、試験培地(a%NaCl)を作成した。試験培地に供試菌前培養液を30μl接種し、30°Cで培養を行った。3日

間培養後、生育の有無を肉眼で判定した。

11) アルギニンからのアンモニア生成試験

streptococciは、アルギニンからのアンモニア生成試験を行った。すなわち、試験培地（グルコース0.1%、酵母エキス0.1%、ペプトン1.0%、食塩1.0%、L-アルギニン0.3%（pH7.0））に供試菌前培養液を30 μ l接種し、3日間培養後ネスラー試薬を添加して、黄褐色の沈澱が形成されるか否かを観察した。

12) シュークローズからのデキストラン生成試験

leuconostocsは、シュークローズからのデキストラン生成実験を行った。すなわち、GYP培地の糖源（グルコース）をシュークローズとし、寒天粉末1.5%を添加して作成した平板培地上に、供試菌前培養液を一白金耳量接種し、30 $^{\circ}$ Cで培養した。3日間培養後、粘性のあるデキストリンの形成の有無を観察した。

3. 結果及び考察

3-1 「ほうとう」から分離した乳酸菌の諸性質および同定

分離菌23株の結果を表2に示したが、すべての菌株ともグルコースから発酵的に乳酸を50%以上生産し、運動性を示さず、カタラーゼ陰性、さらに孢子形成能を持たないことから、乳酸菌であると判断した。23株のうち、20株は球菌であり、3株は桿菌であった。

表2 分離菌の性質

	H1~13	H14~17	H18~20	H21~23
形態	球	球	球	桿
細胞配列	四聯状	連鎖状	連鎖状	
グラム染色	+	+	+	+
カタラーゼ	-	-	-	-
乳酸生成	+	+	+	+
ガス生成	-	+	-	-
運動性	-	-	-	-
孢子形成能	-	-	-	-

3-1-1 乳酸球菌の諸性質および同定

乳酸球菌のうち、13株は四聯状（あるいは二聯状）の細胞配列を示し、グルコースから乳酸を約50%と生成したので、pediococciと同定した（strains; H1~H13）。他の7株は連鎖状の細胞配列を示した。連鎖状球菌のうち4株はグルコースか

ら乳酸を約50%生産し、ガス発生がみられたため、leuconostocs (H14~H17)、3株はグルコースから乳酸を約100%生成したことから、streptococci (H18~H20) であると同定した。

次に種決定のために生育温度、生育pH、糖発酵性試験などを行った。はじめにpediococciの結果を表3に示した。Pediococcus pentosaceus R1 FY5031^TおよびP.acidilactici RIFY5030^Tを対象菌株としてBergey's Manual¹⁾のPediococcus属の分類に従い検討した。糖類の発酵性パターンを比較するとH1~H13は、P.pentosaceusあるいはP.acidilacticiによく類似した。特にアラビノースおよびリボースの両方を資化し、キシロースを資化できない菌種が優位に存在し、さらにマルトースおよびトレハロースを資化したことから、P.pentosaceusに比較的よく一致する結果が得られた。

表3 pediococciの生理的諸性質

	H1~10	H11~13
生育温度		
40 $^{\circ}$ C	++	++
50 $^{\circ}$ C	-	-
生育pH		
pH4.2	++	++
pH8.5	++	-
5%NaCl	+	+
糖類発酵性		
アラビノース	+	+
D-リボース	+	+
D-キシロース	±	±
フラクトース	++	++
ガラクトース	++	++
マンノース	++	++
ラムノース	=	-
セロビオース	++	++
ラクトース	++	++
マルトース	+	+
シュークローズ	±	±
ラフィノース	±	±
サリシン	++	++
トレハロース	++	++
マンニトール	-	-
ソルビトール	-	-
スターチ	-	-

pH試験の結果、H11, H12, H13の3株はpH 8.5の培地に生育せず、pH4.2の培地に生育した。他の10株はpH8.5およびpH4.2の培地に生育した。温度試験の結果、40℃で良好に生育し、50℃では生育が認められないか、非常に微弱であった。さらに、耐塩性試験では、全ての菌株が5%NaClの培地に生育が認められた。以上のことから、分離されたすべてのpediococciは、生育至適pHが中性から酸性側にあり、中温性菌であったことから、H1~H13の13株は*P.pentosaceus*と同定した。なお、麺の原料はでん粉質の穀物であり、*P.dextrinicum*の存在も予想されたが、スターチを全く資化していないことから、この菌株とは判定できなかった。

leuconostocsの結果は表4に示した。4株とも、すべてシュークロースから酸を生成し、H17はデキストランを生成したが、他の3株は生成しなかった。H17はアラビノースを資化し、キシロースを資化できなかったことから、*Leuconostoc mesenteroides* subspecies *mesenteroides*と同定した。H14はアラビノースおよびキシロースを資化し、

表4 leuconostocsの生理的諸性質

	H14	H15	H16	H17
生育温度 37℃	±	±	±	±
デキストラン生成	-	-	-	+
糖類発酵性				
アラビノース	++	-	++	++
D-リボース	++	++	-	++
D-キシロース	++	-	+	-
フラクトース	++	+	++	++
ガラクトース	++	++	-	++
マンノース	++	++	++	++
ラムノース	-	-	-	-
セロビオース	++	++	++	++
ラクトース	-	++	+	-
マルトース	++	++	++	-
シュークロース	++	++	++	++
ラフィノース	++	++	++	++
サリシン	-	-	+	-
トレハロース	++	++	++	++
マンニトール	+	++	-	-
ソルビトール	-	-	-	-

またラフィノースを資化したことから、*Leu.gelidum*と同定した。H15株はアラビノース及びキシロースを資化できないが、トレハロースを資化したことから*Leu.paramesenteroides*と同定した。また、H16はデキストランの生成がなく、アラビノースを資化したことから、*Leu.paramesenteroides*と同定した。

次にstreptococciの結果を表5に示した。H18とH19が類似した糖の発酵性パターンを示し、10℃及び45℃で生育し、pH9.6の培地や6.5%NaCl培地に生育した。さらに、アルギニンを分解してアンモニアを生成し、アラビノースを資化しないことから、*Enterococcus faecalis*と同定した。H20は10℃では生育したが、45℃で生育が認められず、pH9.6で生育せず、ラクトース、ラフィノースを資化したことから、*Lactococcus raffinolactis*と同定した。

表5 streptococciの生理的諸性質

	H18	H19	H20
生育温度 10℃	++	++	++
45℃	++	++	-
生育pH pH9.6	+	+	-
6.5%NaCl	+	+	+
アンモニア生成	+	+	-
糖類発酵性			
アラビノース	-	-	+
D-リボース	+	+	++
D-キシロース	-	-	-
フラクトース	++	++	+++
ガラクトース	++	++	+++
マンノース	++	++	+++
ラムノース	-	-	-
セロビオース	++	++	++
ラクトース	++	++	+++
マルトース	++	++	+++
シュークロース	++	++	+++
ラフィノース	++	++	+++
サリシン	++	++	+++
トレハロース	++	++	+++
マンニトール	++	++	+++
ソルビトール	++	++	+++

3-1-2 乳酸桿菌の諸性質および同定

糖発酵性試験, 生育温度, 生育pHなどの結果を表6に示した. lactobacilliは, 3株ともグルコースから約100%の乳酸を生成し, ガスを生成しなかった. また15°Cでの生育は微弱で, 45°Cで良好に生育した. アラビノース, キシロースおよびグルコネートを資化できず, フラクトース, マンノースおよびシュクロースをよく資化した. 今回の実験では, 乳酸の施光性, 細胞壁ペプチドグリカンタイプについて検討を行っていないので, 詳細な同定を行うことはできないが, *L.acidophilus*あるいはその類縁菌であると考えられた.

表6 lactobacilliの生理的諸性質

		H21	H22	H23
生育温度	15°C	±	±	±
	45°C	++	++	++
糖類発酵性				
	アラビノース	—	—	—
	D-リボース	+	+	—
	D-キシロース	—	—	—
	グルコネート	—	—	—
	フラクトース	+++	+++	++
	ガラクトース	+++	+++	++
	マンノース	+++	+++	++
	ラムノース	—	—	—
	セロビオース	++	++	++
	ラクトース	++	++	—
	マルトース	++	++	++
	シュクロース	++	++	++
	ラフィノース	++	++	++
	サリシン	++	++	++
	トレハロース	++	++	++
	マンニトール	++	++	++
	ソルビトール	++	++	++

3-2 「ほうとう」用原料粉からの乳酸菌の分離

「ほうとう」の変敗菌の起源を検討するため, 原料の小麦粉1gをGYF液体培地5mlに添加し, 30°C2日間集積培養を行った. 培養後, GYP平板培地に塗抹して得られた単一コロニーを釣菌した.

小麦粉から30株を無作為に分離して, グラム染

色及び形態観察を行った結果, すべての菌株(P1~P30)が四聯状の球菌であった. そこでP1~P3の3株を用いて詳細な同定実験を行った結果, *P.pentosaceus*と同定された. したがって「ほうとう」の変敗菌の優位を占めていた*P.pentosaceus*は, 原料の小麦粉に由来していることが示唆された. 一方, 変敗した「ほうとう」から分離された *leuconostocs*, *streptococci*及び*lactobacilli*は, 原料粉から*P.pentosaceus*以外の菌株が分離されなかったことから, 空気中や製造者また製麺機械装置から混入した菌株であると思われる.

以上のことから, 酸素吸収剤を封入した「ほうとう」の変敗菌は, *P.pentosaceus*を主体とした乳酸菌であることがわかった. 宮尾ら⁹⁾は炭酸ガス及び窒素ガス置換包装した包装生うどんの変敗菌を調査したところ, 主要な変敗菌は*Streptococcus*属の乳酸菌であると報告している. このように属は異なるが, 嫌気状態下における包装麺の変敗は, 乳酸菌によると思われる. 著者らはさらに*P.pentosaceus*の起源について調査し, 原料の小麦粉に由来していることがわかった. *Pediococcus* sp.は他の乳酸菌に比較して非常に生残率が高い¹⁰⁾とされ, 特に*P.pentosaceus*は水分活性の急激な低下にも耐えることができ, 乳酸桿菌より100倍も生残率が高いこと¹¹⁾が報告されている. このことから, 水分の低い小麦粉のなかで乾燥に耐え得る*P.pentosaceus*が選択的に生き残り, 結果的に腐敗菌として純粋分離されたものと考えられた.

なお, 本報告の一部は日本包装学会第1回年次大会(1992年10月29日, 東京)で発表した.

最後に乳酸菌標準株を分与していただいた山梨大学工学部附属発酵化学研究施設の柳田藤寿博士に感謝します.

文 献

- 1) 辻 政雄・樋川芳仁・乙黒親男・小沢俊治: 山梨県工業技術センター研究報告, 6, 26 (1992)
- 2) 小崎道雄監修: 乳酸菌実験マニュアル, 朝倉書店 (1992)
- 3) 長谷川武治: 微生物の分離と同定(上)(下), 学会出版センター (1985)
- 4) E.GARVIE, O.KANDLER and N.WELSS:

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2 The Williams & Wilkins C o.,
Baltimore (1986)

- 5) 宮尾茂雄・佐藤 匡・谷津富高：日食工誌, 31,
192 (1984)
- 6) 澄川妙子・内村 泰・岡田早苗・小原直広：凍結
及び乾燥研究会会誌, 30, 7 (1984)
- 7) 内村 泰・岡田早苗・小崎道雄：日本醸造協会誌,
86, 55 (1991)