

塩蔵魚の品質に関する研究—VI.

うす塩魚の耐塩性腐敗菌および醸造用乳酸菌の
各種培養条件における発育比較*

稲 益 猷 二

Studies on Quality Improvement of Salted Fish—VI.
Relation of Growth Between the Salt Tolerant Bacteria Isolated from
a Putrid Matter of Mild Cured Sardine and Lactic Acid Bacteria Associated
with Soy Sauce Brewing in the Media Varying Conditions

By
Yūji INAMASU

The growth of the salt tolerant bacteria relating to spoilage were compared with the growth of three strains of the salt tolerant lactic acid bacteria in the media varying conditions for purpose of storing mild cured fish.

The results obtained may be summarized as follows:

- 1) Three strains of bacteria were anaerobically isolated from a putrid matter of mild cured sardine, but these were all facultative anaerobic bacteria.
- 2) Aerobic bacteria relating to spoilage grew a little in media containing 10 per cent salt and 5 per cent glucose of concentrations at lower pH value than 5 under shaking culture. But facultative anaerobic bacteria relating to spoilage and lactic acid bacteria grew more than these in the same medium. Especially, *Tetracoccus soya* F₂ of lactic acid bacteria showed the best growth of the employed bacteria.
- 3) Effect of antiseptic added in the broth media containing 10 per cent salt and 5 per cent glucose of concentrations at pH 5 under shaking culture was observed slightly stronger in the order, sorbic acid, sodium nitrite, and butyl hydroxy anisol (B H A).

* 水産大学校研究業績 第627号, 1971年1月18日 受理.
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 627.
Received Jan. 18, 1971.

* 昭和45年5月30日, 日本水産学会中四国支部例会において発表した。

4) On the mixed culture of each strain of the bacteria group relating to spoilage and each one of the lactic acid bacteria group, it was seen that *Tetracoccus soyaе* F₂ nearly inhibited the growth of each strain of the bacteria group relating to spoilage in the agar plate medium of the above (Clause 3) condition.

緒 言

変質うす塩魚から嫌氣的培養条件で検出した耐塩性腐敗細菌，前報¹⁾の好氣的培養条件での検出菌，および醸造用耐塩性乳酸菌について，グルコース，酸化防止剤，発色剤および保存剤などの塩づけ剤を添加した食塩含有培地における，これらの発育度を比較し，また，うす塩魚腐敗細菌に対する醸造用乳酸菌の発育抑制効果を検討したので，その結果を報告する。

I：うす塩魚肉の嫌氣性腐敗細菌

I - 1. 試 料

市販の新鮮マイワシの頭および内臓を除き，水道水で洗浄，水切りしたのち，細切した。これに15%重量の精製食塩を添加混合したものを，滅菌広口試料瓶に詰め，25°Cで30日間放置し，酸敗臭を発したものの遊離液汁を試料とした。

I - 2. 実験方法

(1) 培地：肉エキス培地（肉エキス，およびポリペプトン各1%）にチオグリコール酸ナトリウム0.1%，および食塩0.5，5，10，15および20%をそれぞれ加え，pHを6.0に調整し，滅菌した。

(2) 菌数の測定法：試料の各1mlを0.5，5，10，15および20%の滅菌食塩水9mlに注ぎ，10倍希釈法によって，それぞれの食塩濃度の寒天培地菌液として，これをワインベルグ氏管²⁾に採菌し，30°Cで7日間培養したのち，菌数を計測した。

(3) 分離菌の性状観察：上記の計数培地に発育したコロニーから釣菌し，同一食塩濃度の平板または斜面培地に混和，あるいは画線して，ノーバイ法³⁾により嫌氣培養を繰り返して，純粹分離した菌株について，常法による形態および生理的性質を調べた。

I - 3. 実験結果および考察

変質うす塩魚肉からの嫌氣的条件における検出菌数を，培地の食塩濃度別に計測した結果を第1表に示した。すなわち，供試食塩濃度範囲では菌数に大きな差異は見られず， $10^5 \sim 10^6$ であったが，高食塩濃度側

Table 1. Total viable counts of anaerobic bacteria from a putrid matter of mild cured sardine in the media containing different concentrations of salt.

Concentration of salt (%)	0.5	5	10	15	20
Viable count (Bacteria/ml)	1.7×10^5	5.4×10^5	3.5×10^6	4.1×10^6	2.7×10^6

の菌数がわずかに多かった。これは試料の食塩含有量が 15% であったためであろう。なお、培地の食塩濃度が低いほど、コロニーが大きく、20% 食塩濃度培地では微小であった。

つぎに、これらコロニーから分離した 23 菌株について、培養所見、形態および生理的諸性質を調べた結果、第 2 表に示す 3 菌株に大別することができた。これらは、いずれも通性嫌気性であり、芽胞形成能はな

Table 2. Morphological and physiological characteristics of anaerobic bacteria isolated from a putrid matter of mild cured sardine.

Strain	K 1	K 2	K 3
Form	Sphere	Rod	Sphere
Size (μ)	1.2	4.0×1.0	0.8
Arrangement	Irregular masses	Single	Pair
Gram stain	—	+	—
Spore stain	—	—	—
Motility	—	—	—
Relation to oxygen	F. A. *	F. A. *	F. A. *
Nitrate reduction	+	++	+
Catalase reaction	+	+	—
Glucose fermentation	—	+	—
Gas formation	—	—	—
Optimum pH	7.0	7.0	6.0
Salt tolerance (%)	20	20	20

*F. A. Facultative Anaerobic

いが、なかにはゼラチン液化力の強大な桿菌もあるので、塩づけ魚の品質低下に関与する細菌として、注目すべきであろう。

II：うす塩魚塩づけ条件における耐塩性腐敗細菌および醸造用乳酸菌の発育

II-1. 供試菌

うす塩魚耐塩性腐敗細菌

好気性菌 16 菌株¹⁾

通性嫌気性菌 3 菌株 (第 2 表)

醸造用耐塩性乳酸菌 (通性嫌気性)

Tetracoccus soyae F₂ } 大阪府立大学醸酵学教室分株菌
Tetracoccus soyae F₈ }

Pediococcus soyae 日本醸造工業 K K 製品

II-2. 実験方法

(1) 培地：つぎの 2 種類の培地を用いた。

a) 基礎培地 (肉エキス 1%, ポリペプトン 1%, 食塩 10% およびコハク酸ナトリウム 2%) にグルコースを 0 または、5% 加えて、それぞれの pH を 4, 5, 6 および 7 に調整した。

b) 基礎培地にソルビン酸カリウム (ソルビン酸として 0.2%), 亜硝酸ナトリウム 0.5% またはブチルヒドロキシアニソール (BHA) 乳液 (BHA として 0.01%) を加え、pH を 5 に調整した。

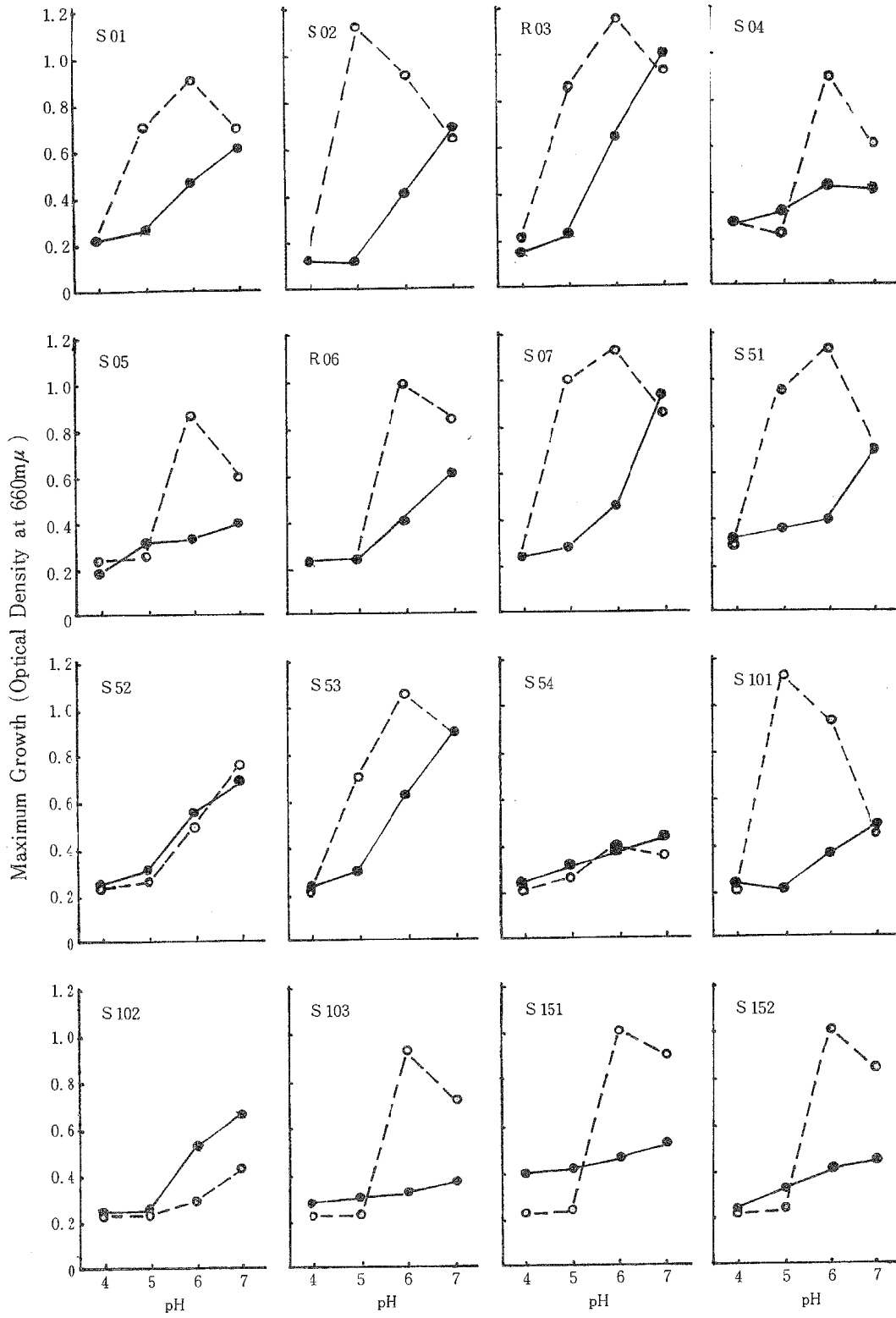


Fig. 1. Influence of glucose and pH value in broth media containing 10% salt on the maximum growth of the salt tolerant bacteria isolated from a putrid matter of mild cured sardine at 25°C under shaking culture.
 —●— 5% Glucose, ○- - - - 0% Glucose

(2) 菌の発育度の測定法：10% 食塩含有寒天斜面培地で 30°C，2 日間前培養した菌の 1 白金耳を滅菌供試培地 10 ml に接種し，25°C で 3 日間振とう培養し，その間経時的に菌の発育による混濁度を光電光度計の吸光度 (660 m μ) により測定し，それぞれの発育曲線をえがいた。

II - 3. 実験結果および考察

耐塩性のうす塩魚腐敗細菌および醸造用乳酸菌の発育に及ぼす培地のグルコースおよび pH の影響を見た。すなわち，食塩を 10% 含有する培地の，グルコース含有の有無による，各 pH ごとの好気性腐敗菌および通性嫌気性の腐敗菌ならびに醸造用乳酸菌の発育曲線における最高発育値 (吸光度) をそれぞれ第 1 および 2 図に示した。

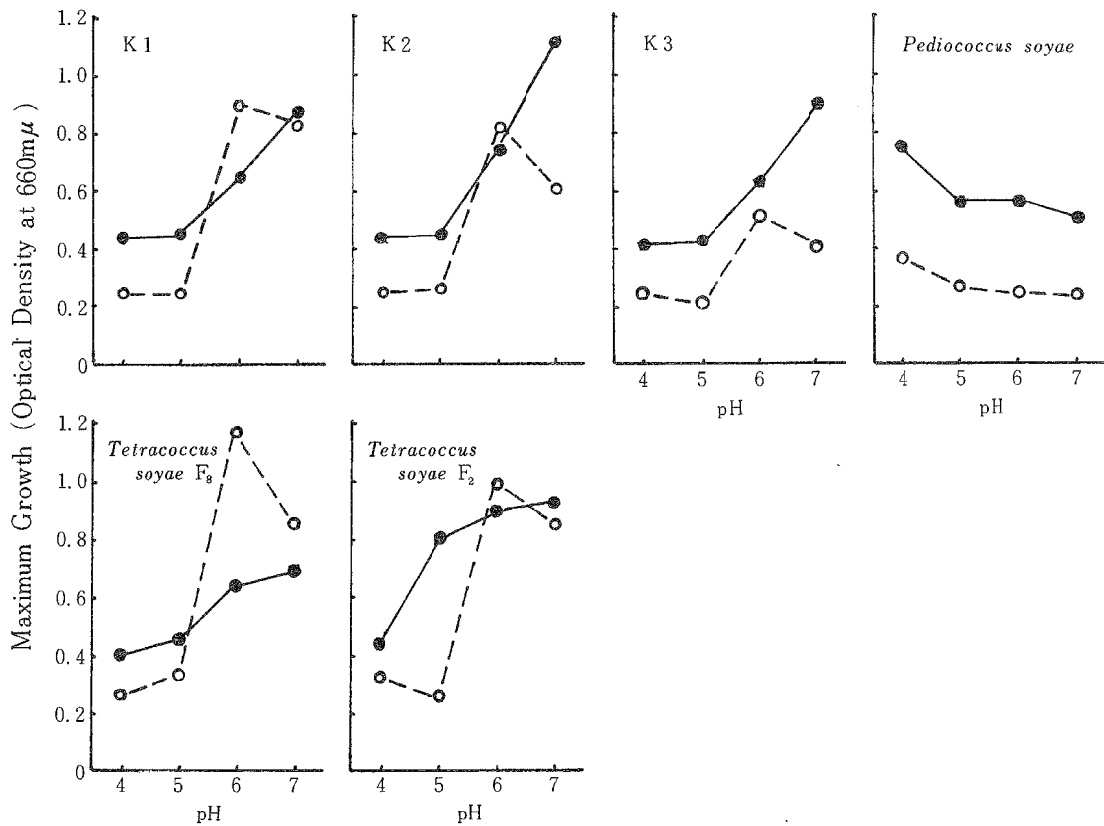


Fig. 2. Influence of glucose and pH value in broth media containing 10% salt on the maximum growth of the facultative anaerobic and salt tolerant bacteria isolated from a putrid matter of mild cured sardine, and lactic acid bacteria associated with soy sauce brewing at 25°C under shaking culture.

● ——— ● 5% Glucose, ○ - - - - - ○ 0% Glucose

この中で，好気性菌のほとんどのものが，グルコース無含有培地でよく発育し，グルコース含有培地，とくに pH 5 以下の場合には発育がわるかった。これに対して，通性嫌気性腐敗菌および醸造用乳酸菌ではグルコース含有培地での発育がよかった。しかし，この場合も醸造用乳酸菌の 2 菌株を除いて，pH 5 での発育はあまりよくなかった。この pH 5 のグルコース含有培地で発育のよい 2 菌株中でも，とくに *Tetracoccus soyae* F₂ は，この条件でほかのすべての菌より，きわめてすぐれた発育を示しているのので，塩づけ魚保存に際して，腐敗菌の発育を抑制する優勢株となる可能性があるかと推定される。

つぎに，塩づけ時の添加剤として，ソルビン酸 (保存剤)，亜硝酸ナトリウム (発色剤)；あるいは BHA (酸化防止剤) を食品衛生法に基づく添加基準量として，それぞれ 0.2%，0.05% あるいは 0.01% を含有する培地 (食塩 10%，グルコース 5%，pH 5) によって各供試菌を培養し，それぞれの最高発育度

(吸光度)を第3表に示した。これによれば、培地に添加した各種塩づけ剤の全供試菌に対する発育抑制効果は、おおむね、ソルビン酸、亜硝酸ナトリウム、BHAの順に大きい。なお、ソルビン酸では全供試菌に

Table 3. Influence of various curing chemicals that were added to media containing 10% salt and 5% glucose and adjusted to pH 5 on the maximum growth (optical density at 660 m μ) of salt tolerant bacteria at 25°C under shaking culture.

Strain \ Chemical	Control	BHA	NaNO ₂	Sorbic acid
S 01	0.27	0.27	0.16	0.04
S 02	0.20	0.20	0.17	0.11
R 03	0.24	0.24	0.27	0.04
S 04	0.32	0.29	0.23	0.04
S 05	0.32	0.33	0.20	0.08
R 06	0.22	0.20	0.19	0.07
S 07	0.28	0.27	0.21	0.07
S 51	0.36	0.29	0.30	0.12
S 52	0.29	0.22	0.26	0.07
S 53	0.29	0.23	0.27	0.09
S 54	0.33	0.21	0.26	0.12
S 101	0.20	0.20	0.25	0.09
S 102	0.24	0.26	0.17	0.05
S 103	0.28	0.28	0.19	0.03
S 151	0.42	0.21	0.19	0.05
S 152	0.35	0.23	0.22	0.16
K 1	0.43	0.27	0.14	0.13
K 2	0.43	0.29	0.10	0.09
K 3	0.41	0.17	0.11	0.08
<i>Pediococcus soyae</i>	0.57	0.30	0.15	0.06
<i>Tetracoccus soyae</i> F ₂	0.80	0.17	0.13	0.18
<i>Tetracoccus soyae</i> F ₈	0.43	0.17	0.15	0.17

ほぼ同等の発育抑制力があり、亜硝酸ナトリウムの効果は通性嫌気性の腐敗菌および醸造用乳酸菌に対して、ソルビン酸と同程度認められるが、好気性菌に対してはやや劣る。とくに、BHAは醸造用乳酸菌群、通性嫌気性腐敗菌群、好気性腐敗菌群の順で発育を抑制しているが、その効力は小さい。また、*Tetracoccus soyae* F₂は対照区で良好な発育を示したので、ソルビン酸添加区ではその発育を抑制されてはいるが、それでもなお、供試菌中もっともよく発育した。したがって、腐敗菌の発育抑制菌株として、ソルビン酸含有培地でも、十分有効であろうと考えられる。

Ⅲ：うす塩魚腐敗細菌に対する醸造用耐塩性乳酸菌の発育抑制効果

Ⅲ-1. 供試菌

Ⅱ-1. に同じである。

III - 2. 実験方法

(1) 培地：II - 2 - (1) の基礎培地（食塩 10% 含有）にグルコース 5% および寒天 1.5% を加え、pH を5に調整したもの。

(2) 発育阻止度測定法：本橋⁴⁾の接触培養法に準じて、醸造用乳酸菌 3 菌株の腐敗菌に対する発育阻止度を測定した。すなわち、寒天平板培地全面に供試腐敗菌を、おのおの数白金耳量塗りつけ、その平板中央の直径 10mm の円内に醸造用乳酸菌株をそれぞれ 1 白金耳塗り、30°C で3日間培養して、醸造用乳酸菌の円周に生じた腐敗菌の輪状発育阻止帯の平均幅 (mm) を発育阻止度とした。

III - 3. 実験結果と考察

醸造用乳酸菌の腐敗菌に対する発育阻止作用を測定したところ、乳酸菌は平板中央の小円内に灰白色の菌台をつくり、その周囲に2~15mm幅の輪状の腐敗菌発育阻止帯を生成した。すなわち、その外郭には腐敗菌コロニーが密生し、阻止帯内には全くコロニーが見られない、拮抗的発育阻止作用を認めた。その発育阻止帯幅を第4表に示した。総括的に見て、*Tetracoccus soyae* F₂ の発育阻止作用は大きく、*Pediococcus*

Table 4. Changes of width (mm) of zones where the salt tolerant bacteria relating to spoilage of mild cured sardine did not grow owing to the growth of the salt tolerant lactic acid bacteria on the mixed culture at 25°C in the agar plate media containing 10% salt and 5% glucose and adjusted to pH 5.

Strain of bacteria relating to spoilage	Strain of lactic acid bacteria	<i>Tetracoccus soyae</i>		<i>Pediococcus soyae</i>
		F ₂	F ₈	
S 01		2	2	0
S 02		0	0	0
R 03		0	0	0
S 04		8	5	0
S 05		5	5	0
R 06		4	6	0
S 07		8	10	0
S 51		0	0	0
S 52		2	4	0
S 53		0	0	0
S 54		5	0	0
S 101		4	0	2
S 102		2	0	0
S 103		10	2	5
S 151		5	15	0
S 152		3	3	0
K 1		5	5	0
K 2		3	0	0
K 3		8	0	0

soyae は供試条件では腐敗菌の発育に対し無効であった。

以上の結果から、うす塩魚の常温貯蔵に醸造用耐塩性乳酸菌 *Tetracoccus soyae* F₂ を接種しておけば、その発育によって、魚肉の腐敗防止に有効であると考えられる。

要 約

用塩量の少ないうす塩魚貯蔵のために、醸造用耐塩性乳酸菌とうす塩魚腐敗細菌の発育比較試験を行なった。

1) 変質うす塩魚から嫌氣的培養で検出した菌数は、食塩濃度 0.5~20% 培地で $10^5 \sim 10^6$ で、3 菌株が純粋分離されたが、いずれも通性嫌気性菌であった。

2) 食塩濃度 10% 培地で、pH 5 およびグルコース 5% 含有の場合、好気性腐敗菌の発育がわるく、醸造用乳酸菌のある菌株はきわめてよく発育した。

3) 食塩 10%、グルコース 5%、pH 5 の培地に添加した食品添加基準量の塩づけ剤の抗菌力はソルビン酸、亜硝酸ナトリウム、ブチルヒドロオキシアニソール (BHA) の順であった。とくに、醸造用乳酸菌の *Tetracoccus soyae* F₂ は上記の 2) 項で良好な発育を示したので、ソルビン酸で抑制されても供試菌中もっともよい発育を示した。

4) 醸造用乳酸菌の腐敗菌に対する発育阻害作用では *Tetracoccus soyae* F₂ がもっともよかった。

以上の結果から、うす塩魚を pH 5、食塩 10%、グルコース 5% 含有培地の *Tetracoccus soyae* F₂ 培養液に浸せきすれば、腐敗菌の発育を阻止して、常温貯蔵が可能であると考ええる。

終りに、貴重な菌の分株を賜った大阪府立大学農学部教授大亦正次郎博士に深甚な謝意を申し述べます。

文 献

- 1) 稲益猷二, 1969: 本報告, 18, 45.
- 2) 真柄正直, 1947: 嫌気性細菌学, p. 36, (南条書店).
- 3) 好井久雄・中野政弘, 1956: 醸酵工学誌, 34, 361.
- 4) 本橋武夫, 1953: 腐敗研報, 6, 38.