

# 塩蔵魚の品質に関する研究—V

## 含糖うす塩魚の腐敗細菌について\*

稲 益 猷 二

Studies on Quality Improvement of Salted Fish-V.  
Some Characteristics of Bacteria Associated with the Spoilage  
of Mild-Cured Fish

By

Yūji INAMASU

Sixteen strains of bacteria were isolated from fresh and mild-cured sardine of which the latter had been cured with salt and sugar amounting to 10 and 2 per cent respectively on the weight of fish. And, it was sampled for bacterial isolation when it disclosed spoilage.

The isolated strains were inoculated in the broth media varying their pH value and salt content, and the bacterial growth and amine formations in media have been followed after the incubation for different intervals.

The results obtained may be summarized as follows:

1) Most of the isolates were spherical in shape, and grew in the media buffered at higher pH values than 5. The maximum growth were displayed in the media adjusted at pH 6, but no growth was observed in the ones at pH 4.

2) The bacterial growth in the media varying their salt concentrations from 0.5 to 15 per cent decreased with the ascendance of the concentrations.

3) On the experiment of amine formations, three of six strains isolated showed a little productivity with histamine and volatile amines, and the remains disclosed the production of volatile amines alone in a small amount. As for the histamine-forming strains, it was found that the amounts produced were less than 100 $\mu$ g/ml in the media used which contained more than 10 per cent of salt.

---

\*水産大学校研究業績, 第584号 1969年6月30日 受理.  
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries. No. 584.  
Received June 30, 1969.

## 緒 言

近年、うす塩魚の需要が多く、従来の高塩濃度の塩蔵魚は、ほとんどかえりみられなくなった。畜産品製造においては、含糖うす塩づけが行なわれているが、水産製造においては、含糖塩漬法はあまり研究されていない。したがって、多獲魚種のアジ、サバの貯蔵法として、乳酸菌を利用した、うす塩魚の保存法を開発するため、含糖うす塩魚肉の腐敗細菌の発育条件を調べた。また、赤身魚肉に多量に含有されるヒスチジンは、塩づけ液が酸性であるため、脱炭酸酵素の作用を受け、アレルギー様食中毒原因物質と見なされているヒスタミンとなるので、上述の腐敗細菌のヒスタミン生成能、その他を検討した。

## 実 験

### 実験 I : 含糖うす塩魚肉の腐敗細菌の発育条件

I-1. 試料 市販の新鮮マイワシ88.2gを、滅菌3%食塩水 500 mlに入れて、振とうし、魚体に付着した菌を洗い落した液を、新鮮魚供試菌液とした。つぎに、前記魚体の肉部だけを、すりつぶして、その20gをとり、これに食塩10%および砂糖2%を加え、よく混合して、滅菌シャーレに入れ、25°Cに20日間放置し、酸敗臭が発生した時の遊離液汁 (pH 5.2) を腐敗供試菌液とした。

#### I-2. 実験方法

##### (1) 培地

a) 計数培地: C.S.G. 培地<sup>1)</sup>を改変し、pH 7.3としたもの(カザミノ酸0.75%, 酵母エキス1%, クエン酸ナトリウム0.3%, 塩化カリウム0.2%, 硫酸マグネシウム2%, 硫酸第一鉄1mg%, 塩化マンガン0.01mg%, グルコース0.1%, および食塩0.5, 5, 10, または15%)。

b) 分離および測定用基礎培地: 肉エキス培地(肉エキス1%, ペプトン1%, および食塩0.5, 5, 10, または15%) pH 7.3。

##### (2) 菌の計数

新鮮および腐敗魚試料液の各1 mlを0.5, 5, 10, および15%食塩水で、10倍希釈法によって希釈し、その各0.1 mlを、上記各食塩濃度の修正C.S.G.寒天平板培地にそれぞれ塗りつけ、乾燥を防ぎながら、25°Cで2日間培養した後、その集落数を計測した。また、同時にM.P.N.法も実施した。

##### (3) 菌の純粋分離

計数平板培地より、明らかな集落を釣菌し、計数培地と同じ食塩濃度の肉エキス寒天培地を用いて、混和平板培養を繰り返して、純粋分離を行ない、常法による培養上、また形態的および生理的諸性質より、同種と認められる16菌株を供試菌とした。

##### (4) 分離菌の発育最適条件の測定

各分離菌を25°Cで2日間、継代培養した寒天斜面培地より、1白金耳量を、pH 4, 5, 6, および7(ガラス電極pHメーターによる)に対し、食塩濃度をそれぞれ0.5, 5, 10, および15%とした、計16種の滅菌肉エキス液体培地10 mlにおのおの接種して、25°Cで振とう(毎分60回)培養した。すなわち、pH 4では24時間、pH 5および6では12時間、また、pH 7では10時間ごとに、光電光度計(東京光電製)により、菌の発育混濁度を吸光度(660 m $\mu$ )で測定して、各菌のそれぞれの条件における、増殖曲線を作成した。

#### I-3. 実験結果および考察

新鮮魚ならびに含糖うす塩魚肉の腐敗細菌数を、培養食塩濃度別に平板法により、計数した結果を第1表

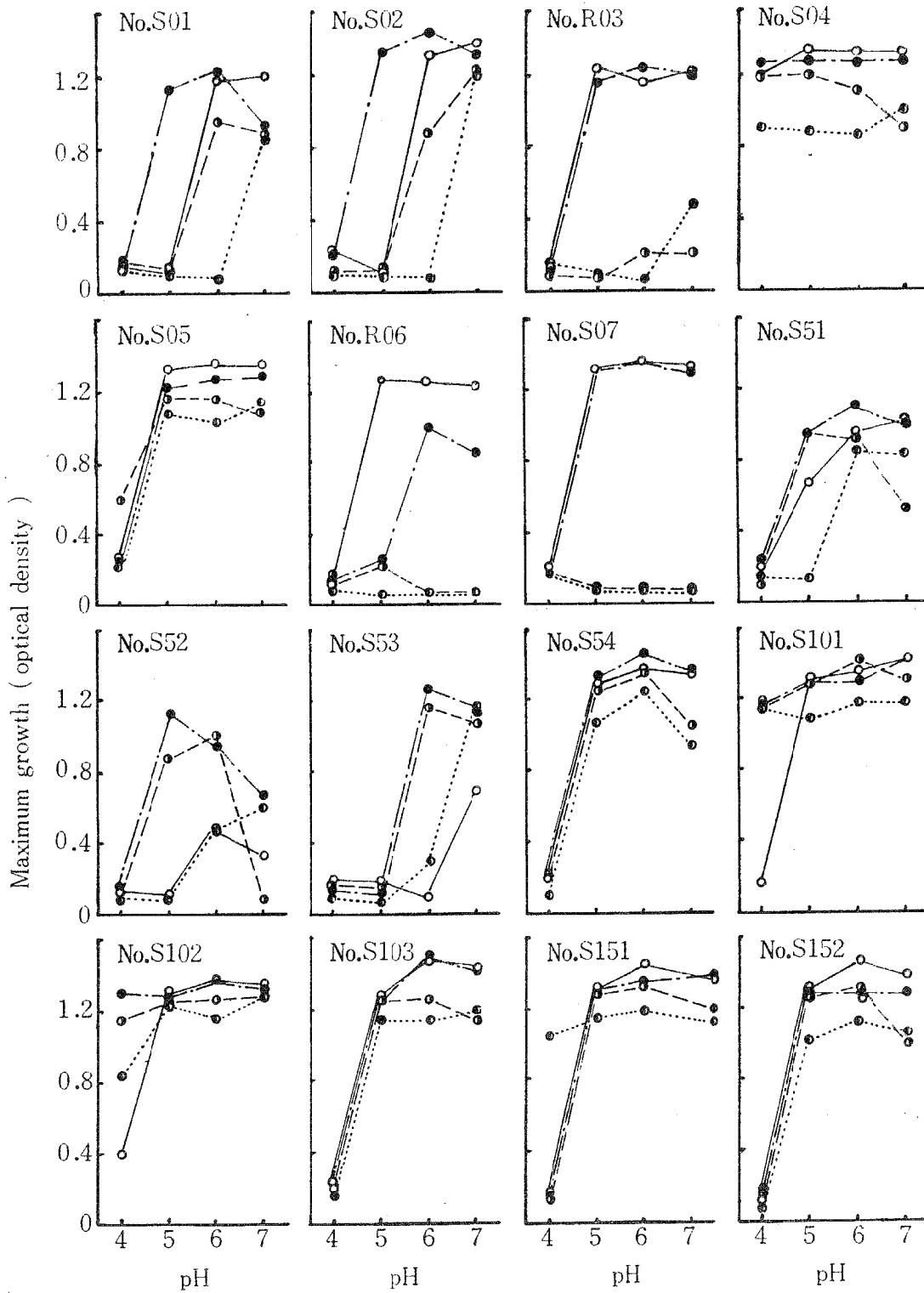


Fig. 1. Effect of different salt concentrations and pH value of broth media on the maximum growth of strains inoculated.

○——○ 0.5% NaCl      ●———● 5% NaCl  
 ●- - - -● 10% NaCl      ●·····● 15% NaCl

Table 1. Growth of bacteria from fresh and mild-cured sardine in the media containing different concentrations of salt.

Salt concentration (%)	Bacterial count	
	Sampled from fresh sardine	Sampled from cured sardine
0.5	$5.4 \times 10^3$	$2.7 \times 10^8$
5	$8.2 \times 10^2$	$1.5 \times 10^9$
10	$7.8 \times 10^1$	$2.5 \times 10^8$
15	$1.7 \times 10^1$	$3.0 \times 10^8$

に示した。すなわち、新鮮魚付着菌数は培地食塩濃度の増加により減少するが、わずかながら、耐塩性菌と見られるものが存在した。腐敗魚肉の菌数は供試培地の食塩濃度範囲では、いずれも、ほぼ同数の大きな値であった。これは、食塩を10%混合した魚肉のために、耐塩性菌が発育したことを示している。つぎに、これら培地から純粋分離した16菌株につき、各種培養条件における、各菌の発育曲線を求め、培地各 pH および食塩濃度における、それぞれの最高発育値を第1図に示した。この時の発育状況を、培地 pH についてみると、いずれの食塩濃度においても、わずか3菌株 (No. S04, No. S101, No. S102) のみが pH 4 でかなりの発育を示したにすぎない。高塩濃度 (10 または 15 %) においては、大半のものが、pH 5 になると発育が活発となり、pH 6 で最高値を示し、pH 7 で発育がややおとろえる傾向があった。また、培地の食塩濃度についてみても、低塩濃度 (0.5 または 5 %) では、pH 5 以上で、すべての分離菌の発育度が急増したが、高塩濃度培地からの分離菌 (菌株 No. S101~No. S152) も高塩濃度培地では、低塩濃度培地におけるより、発育がわずかにわかった。

低塩濃度培地でのみ分離された、新鮮魚の付着菌株 (No. S01~No. S04, No. S51~No. S53) では、pH 5 以下および食塩濃度 10 % 以上の培地に発育できるものは、ほとんどなかった。腐敗魚肉からの分離菌は高 pH で、発育良好であるが、pH 5 以下および食塩濃度 10 % 以上の培地では発育誘導期が長くなる。したがって、この条件下で耐塩性乳酸菌を発育させれば、腐敗細菌の発育を抑制する可能性もあると考えられる。

## 実験 II : 含糖うす塩魚肉の腐敗細菌のヒスタミンおよび揮発性塩基窒素の生成

### I-1. 供試菌

I-2-(3) の分離菌のうち、分離培地の食塩濃度別に、つぎの第2表のように、無作為に各3菌株を選んで、供試した。

Table 2. Source and nature of strains employed in the experiment of amine formations.

Strain	Source	Salt concentration (%)	Productivity	
			Histamine	Volatile-amine
No. S02	Fresh sardine	0.5	-	+
No. R03	"	"	-	+
No. S07	Cured sardine	"	+	+
No. S101	"	10	+	+
No. S102	"	"	+	+
No. S103	"	"	-	+

II-2 実験方法

(1) 菌の培養

a) 基礎培地: I-2-(1)-b) の培地に, L-ヒスタジジン-塩酸塩 0.05% を加えた。

b) 試料の調製: 基礎培地の食塩濃度を 10% とし pH を 4, 5, 6, 7, および 8 に, また, pH を 7 とし食塩濃度を 0.5, 10, および 15% とした液体培地を用いた。なお, pH は希塩酸または水酸化ナトリウムで調整した。

c) 培養方法: 各食塩濃度の寒天斜面培地で 30°C, 2 日間継代培養した, 供試菌株各 1 白金耳量を, 供試条件に調製した培地 10 ml にそれぞれ接種し, 5°, 15°, 25°, および 35°C に 5 日間静置培養した。この間, 毎日無菌的に試料液を採取した。

(2) 定量法

a) ヒスタミン: 瀬戸<sup>2)</sup> のペーパー・クロマトグラムのスポット面積測定法によった。

b) 揮発性塩基窒素: 田川<sup>3)</sup> の微量ガス拡散検測器および光電比色計 (ネスラー試薬による発色—平間製 420 m $\mu$ ) を用いる方法によった。

II-3. 実験結果

新鮮魚および腐敗魚肉から分離した, 供試菌のヒスタミンおよび揮発性塩基窒素生成能を見たところ, 新鮮魚から分離した No. S02 および R03 菌株は, 供試条件内では検出できるほどのヒスタミンを生成せず, また, 腐敗魚肉から分離した No. S103 菌株は pH 7, 食塩濃度 0.5%, 培養温度 25°C の場合だけ, ヒスタミンを 84  $\mu\text{g/ml}$  生成した。腐敗魚肉から分離した, No. S07, S101, および S102 菌株の, (a) pH 7

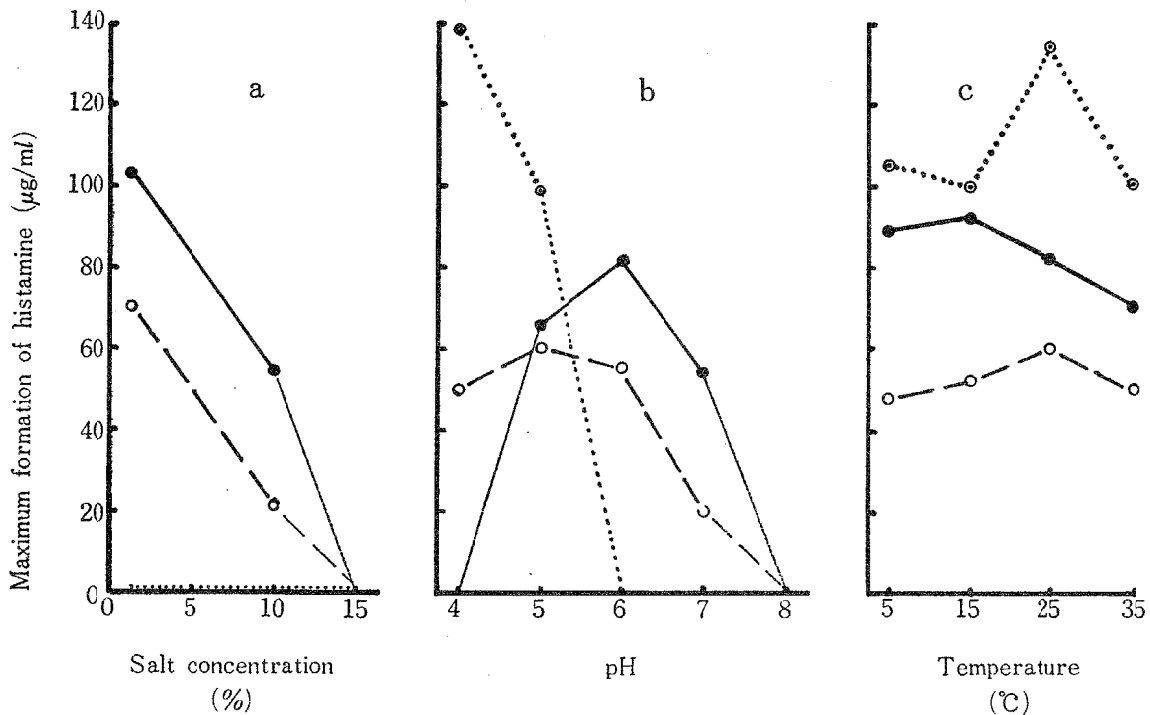


Fig. 2. Maximum formation of histamine in broth media.

- No. S07    ○-----○ No. S101    ⊙.....⊙ No. S102
- a .....in media varying salt concentrations at a definite pH value (pH 7); incubation temperature, 25°C.
- b .....in media varying pH value in a definite salt concentration (10 per cent); incubation temperature, 25°C.
- c .....in media containing 10 per cent of salt and adjusted at the pH value showing maximum formation of histamine; incubation temperature, 5~35°C.

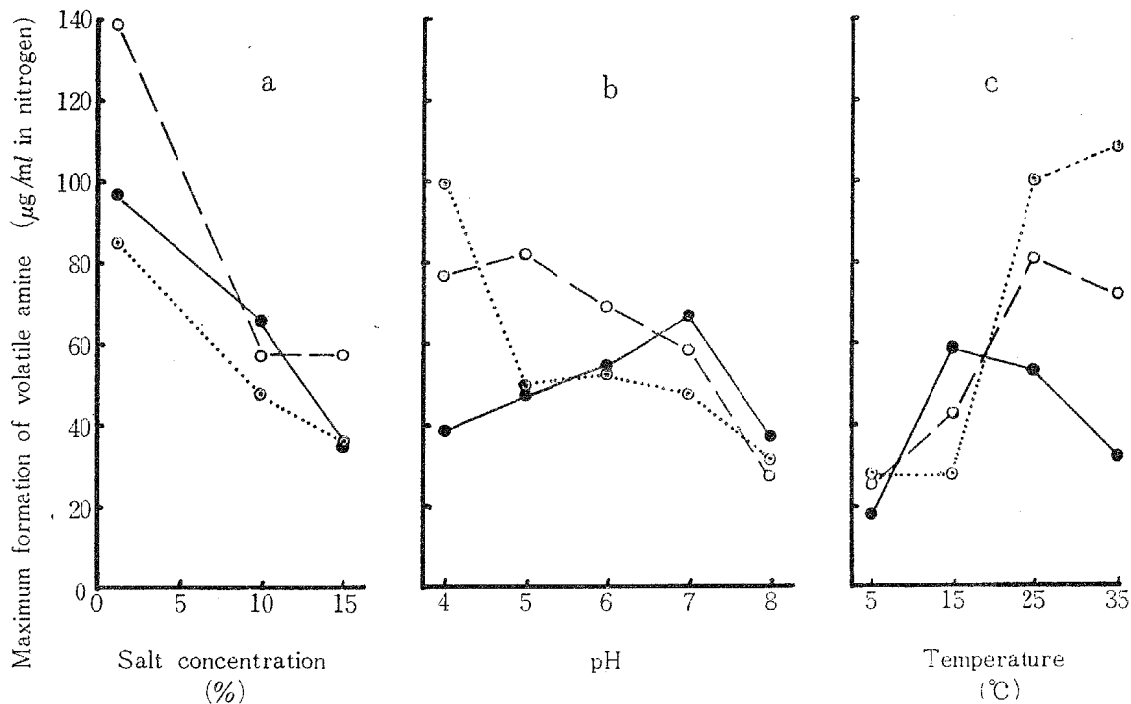


Fig. 3. Maximum amounts of volatile amines formed by the histamine-producing strains in different media.

●——● No. S07    ○-----○ No. S101    ●.....● No. S102  
 Legend as in Fig. 2.

における各食塩濃度, (b) 食塩濃度 10% における各 pH, および, (c) 食塩濃度 10% ならびにヒスタミン最大生成 pH における各温度による, ヒスタミンおよび揮発性塩基窒素の最大生成量の変化を, それぞれ第 2 図および第 3 図に示す。なお, No. S102 菌株は pH 6 以上では, いずれの食塩濃度でも, 検出できるほどのヒスタミンを生成しなかった。また, 第 4 図に No. S02, R03 および S103 菌株の揮発性塩基窒素量の変化を, 第 3 図と同様に示す。

供試 6 菌株中, ヒスタミンを生成したのは, そのほぼ半数で, すべて球菌であった。そのヒスタミン生産は, pH 7 の培地で 25°C の場合は, 食塩濃度が低いほど多く, 15% 食塩濃度培地では痕跡程度であった。10% 食塩濃度培地で 25°C の場合, ヒスタミンの最大値を示すのは, pH 4~6 であったが, 高塩濃度培地分離菌 (No. S101 および S102 菌株) のほうが低 pH であった。また, 第 2 図 (c) の 10% 食塩濃度培地で, ヒスタミン生成最適 pH の場合の最適温度は, 高塩濃度培地分離菌 (No. S101 および S102 菌株) のほうが高温側 (25°C) にあった。さらに, 供試 6 菌株の揮発性塩基窒素の最大生成条件も, ヒスタミンのそれと, ほぼ同一であった。なお, 大半の菌株のヒスタミンおよび揮発性塩基窒素の最大生成量が, いずれも 100 µg/ml 以下であった。

#### II-4 考察

木俣および河合ら<sup>4)~7)</sup>は, 鮮魚肉腐敗細菌を 3 大別して, 全菌数に対する割合を, (A) ヒスタミンだけを多量に生産する菌が 5~30%, (B) アンモニヤ (揮発性塩基定量法による) だけを多量に生産する菌が 50~70%, および, (C) それらのいずれをも生産する能力の微弱な菌が 20~40% であったとし, (A) および (B) の区分の一応の目安として, ヒスタミン 200 µg/ml およびアンモニヤ 100 µg/ml を生産するものとしている<sup>4)</sup>。また, それら成分の最適生成条件を, ヒスタミンの場合の脱炭酸酵素は pH 6.2, 20°C

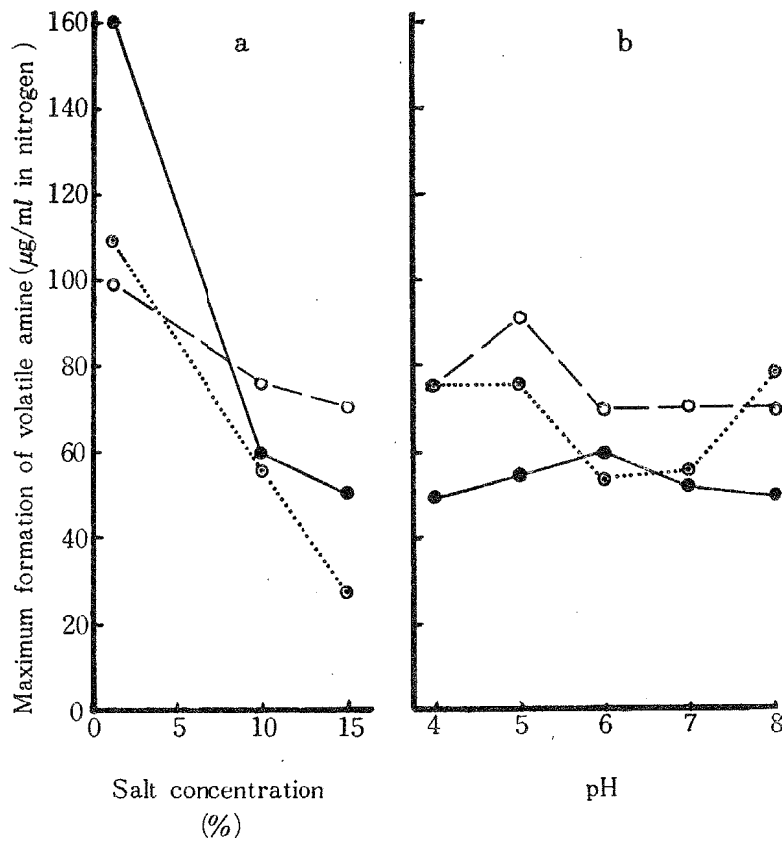


Fig. 4. Maximum amounts of volatile amines formed by the non histamine-producing strains in different media.

○ - - - - ○ No. S02    ○ ····· ····· ○ No. R03  
 ● ——— ● No. S103

Legend as in Fig. 2.

で<sup>5)</sup>, アンモニアの場合のデアミナーゼは pH 7.5, 35°C と推定した<sup>6)</sup>。なお、両氏はさらに *Staphylococcus*, *Streptococcus* および *Micrococcus* 属の球菌のヒスタミン生成量 (pH 5.8, 25°C, 6日間) が, 200 µg/ml を越えないことを見ている<sup>7)</sup>。

したがって、本実験の供試6菌株を、食塩濃度 0.5% および pH 7 の場合について、上記の区分によって分類すると、(A) のヒスタミン生産菌は存在せず、(B) のアンモニア生産菌として3菌株、および、(C) のヒスタミンおよびアンモニア微量生産菌が3菌株ということになる。ただし、食塩濃度 10% においては、ヒスタミンおよび揮発性塩基窒素の両成分の生成は、それぞれいちじるしく抑制される。その場合でも、低塩濃度培地分離菌の両成分の生成最適条件は、それぞれ前述の木俣らの魚肉の腐敗細菌のそれらと大差がない。高塩濃度培地からの分離菌については、それぞれ木俣らの推定値より低い pH (4~5), およびやや高い温度 (25°C) にある。これら耐塩性細菌のヒスタミンおよび揮発性塩基窒素の生成条件が、実験—I における各菌の発育最適条件とそれぞれほぼ一致し、一般魚肉腐敗細菌の両成分生成条件と相違するのは、含糖塩づけ魚肉試料という環境に支配された結果であると考えられる。以上の結果から、実験—I と同様に、培地条件を食塩濃度 10%, pH 5, 培養温度 25°C とすれば、ヒスタミン生成量を五十嵐<sup>8)</sup> の知覚限界濃度 100 µg/ml 以下、および揮発性塩基窒素量も微量の 80 µg/ml 以下に押えられるといえるが、供試菌が数株の球菌にすぎないので、さらに試料を変えて、追試を行なう予定である。

## 要 約

新鮮魚付着細菌，および食塩 10%，砂糖 2% 混合魚肉腐敗細菌の培地食塩濃度その他の発育条件，ならびにヒスタミン，および揮発性塩基窒素の生成最適条件を調べた。

- 1) 含糖うす塩魚肉腐敗細菌は食塩濃度 0.5, 5, 10 および 15% の培地にはほぼ同数程度 ( $10^8$ ) 生育し，新鮮魚付着細菌にも，ごく少数の耐塩性菌を計数した。
- 2) これらより 16 菌株を分離したが，大部分は球菌であった。分離菌は pH 4 では大半が発育せず，pH 5 ~ 7 でほとんどのものが発育し，pH 6 で最大値を示した。高塩濃度培地では，新鮮魚分離菌を除いて低塩濃度培地分離菌の方が，高塩濃度培地分離菌より発育がわずかによかった。
- 3) 分離培地の食塩濃度別に無作為に選んだ 6 菌株は，アンモニア生産菌 3 菌株，およびヒスタミン・アンモニア微量生産菌 3 菌株であり，ヒスタミン生産菌はなかった。食塩濃度 10%，pH 5，培養温度  $25^{\circ}\text{C}$  では供試菌のヒスタミンおよび揮発性塩基窒素の生成は，いずれも  $100 \mu\text{g/ml}$  以下に抑えられた。

実験に協力を頂いた古賀 隆および小林章二両君に謝意を表する。

## 文 献

- 1) ONISHI H., MARGARET E. MCCANCE and N. E. GIBBONS, 1965: *Can. J. Microbiol.*, **11**, 365.
- 2) 瀬戸寿太郎, 1961: 分析化学, **10**, 29.
- 3) 田川昭治・芳野信夫・宮内敬三郎, 1955: 本報告, **4**, 21.
- 4) 木俣正夫・田中幹二, 1954: 京大食研報告, **14**, 34.
- 5) ———・河合 章, 1952: ———, **10**, 88.
- 6) ———・———, 1951: ———, **6**, 29.
- 7) ———・———, 1953: ———, **12**, 32.
- 8) 五十嵐彦仁, 1949: “魚のプトメインについて”, 函館市役所発行, p. 26.