

博士論文

食品製造における微生物管理に関する研究

平成11年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能科学専攻

深尾 正

目 次

第1章 序論	P. 1
第2章 蒲鉾の <i>Pseudomonas</i> sp. 汚染について	7
第1節 蛍光性軟化変敗原因菌の分離と同定	7
1. 変敗菌の分離と同定	7
2. 分離株の世代交代時間と増殖温度	9
第2節 分離株の蒲鉾軟化再現実験	21
第3節 市販蒲鉾の微生物汚染状況	25
1. 市販蒲鉾の保存試験と変敗菌の分離同定	25
2. 分離菌による蒲鉾軟化再現実験	29
第4節 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> sp. 簡易試験用培地の検討	30
1. 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> sp. 簡易試験用培地の処方決定	30
1-1. 糖源の検討	30
1-2. 窒素源の検討	34
1-3. 無機塩類の検討	38
1-4. 処方決定	40
2. 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> sp. 簡易試験用培地の精度検定	40
3. 考察	43
第5節 蒲鉾製造工程の微生物汚染状況	44
1. 蒲鉾製造工程の拭き取り試験と検出菌の同定	44
2. 検出菌による蒲鉾軟化の再現実験	47
第6節 包装蒲鉾の汚染メカニズム	47
第7節 蒲鉾および製造行程より分離された <i>Pseudomonas</i> sp. のプロテアーゼ産生能	50

第3章 蒲鉾表面での <i>Pseudomonas</i> sp. の増殖について -----	P.56
第1節 低分子N源が増殖に及ぼす影響 -----	56
第2節 プロテアーゼ処理が増殖に及ぼす影響 -----	58
第3節 各種粉末たん白が増殖に及ぼす影響 -----	60
1.粉末たん白ゲル上での増殖	60
2.蒲鉾上での増殖	62
3.ポークゲル上での増殖	63
4.ロースハム上での増殖	64
5.牛血漿たん白が <i>P. fluorescens</i> の増殖に及ぼす影響	67
6.考察	67
第4節 K-1株が産生する菌体外プロテアーゼの性質 -----	69
1.各種化合物が活性に及ぼす影響	69
2.食品添加物が活性に及ぼす影響	73
3.トリポリリン酸ナトリウムがK-1株の増殖に及ぼす影響	73
4.考察	77
第4章 ホップの抗菌効果について -----	78
第1節 ホップエキスの抗菌力 -----	78
第2節 ホップエキスと制菌素材の併用による大腸菌への抗菌効果 -----	81
第3節 ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用による大腸菌 -----	83
への抗菌効果	
1.大腸菌への抗菌効果	83
1-1.単独時の抗菌効果	83
1-2.併用時の抗菌効果	85
2.併用系での各試料濃度の影響	87
3.併用系での試料の添加時期の影響	88

3-1.誘導期における添加効果	P. 88
3-2.対数増殖期における添加効果	90
4.併用系での試料の添加順序と濃度の影響	94
4-1.試料の添加順序について	94
4-2.添加順序と濃度の影響	95
5.試料接触処理菌の増殖能	98
6.試料接触処理による菌体成分の漏洩	101
7.マッシュポテトでの併用効果	101
8.考察	104
第4節 ホップエキスと制菌素材の併用によるグラム陰性菌への 抗菌効果	----- 106
1.ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用効果	106
2.ホップエキスと酢酸ナトリウムの併用効果	109
3.ホップエキスとグリシンの併用効果	110
4.考察	112
第5節 微生物の耐熱性に及ぼすホップエキスの影響	----- 114
1.セレウス菌芽胞の耐熱性に及ぼす影響	114
2.大腸菌の耐熱性に及ぼす影響	114
3.考察	116
第6節 大腸菌の凍結・解凍耐性に及ぼすホップエキスの影響	----- 119
1.インビトロ系での凍結耐性に及ぼす影響	119
2.豚ミンチ肉系での凍結耐性に及ぼす影響	125
3.蒲鉾での凍結耐性に及ぼす影響	127
4.考察	130
第7節 ホップエキスの熱安定性	----- 131
1.ホップエキスの抗菌力に及ぼす加熱温度の影響	131

2.オートクレーブ処理がホップエキスの抗菌力に及ぼす影響	P.133
第8節 ホップエキスの抗菌力に及ぼす各種成分の影響 -----	135
1.代表的な食品成分の影響	135
2.金属イオンの影響	138
3.考察	140
第9節 水素添加ホップエキスの抗菌効果 -----	140
1.水素添加ホップエキスの抗菌スペクトル	140
1-1.細菌に対する効果	140
1-2.酵母に対する効果	143
1-3.黴に対する効果	143
2.水素添加ホップエキスと制菌素材との併用によるグラム陰性菌 への抗菌効果	148
3.考察	152
第10節 ホップエキスのアルコール製剤および洗浄除菌剤への配合 -----	153
1.殺菌力への影響	153
1-1.アルコール製剤へのホップエキスの配合	153
1-2.洗浄除菌剤へのホップエキスの配合	154
2.ホップエキス配合アルコール製剤の食品への利用	156
2-1.蒲鉾でのネット発生防止効果	157
2-2.ソーセージでのネット発生防止効果	161
2-3.蒲鉾でのネット発生防止効果に及ぼすホップエキス濃度の影響	163
3.考察	164
第11節 食品での保存性向上効果 -----	167
1.ホップエキスの粉末化	167
2.ホップエキス粉末の抗菌力	171
3.食品ホモジネイト系での保存性向上効果	172

3-1.竹輪ホモジネイトでの保存性向上効果	P.172
3-2.ウインナーホモジネイトでの保存性向上効果	175
4.食品での保存性向上効果	179
4-1.蒲鉾での保存性向上効果	179
4-1-1.K101へのホップエキスの配合	179
4-1-2.ホップエキス製剤の保存効果	180
4-2.マッシュポテトでの保存性向上効果	185
5.考察	186
第5章 総合考察 -----	189
謝辞 -----	200
引用文献 -----	201

第1章 序論

私達は、第二次世界大戦後の高度経済成長に伴って、種々の文明の利器に囲まれ、また、生鮮食品、加工食品が豊富に出回る飽食の時代を迎え、快適で衛生的な生活を送っている。しかし、いったん食中毒に目を向けると意外な事実気づく。図1-1¹⁾は食中毒の発生件数および患者数を年次別に示したグラフであるが、厚生省が公式に食中毒統計を発表した1952年(昭和27年)以降現在に至るまでの約50年間、年によって変動はあるものの、発生件数や患者数にほとんど減少の傾向はみられない。平成9年の原因別食中毒発生状況を表1-1¹⁾に示す。相変わらず、1年間に約4万人の食中毒患者が発生しており、病因物質の判明したものについてみると、細菌性の事例が圧倒的に多く、発生件数では80%以上、患者数でも70%以上という高い比率を占めており、食中毒の主原因となっている。

これらの食中毒が減少しないことは、深刻な問題ととらえなければならない。近年、消費者動向、社会情勢の大きな変動がみられ、我が国の食糧自給率は40%前半にまで落ち込み、輸入食品や加工食品が増加し、新しい食品流通様式が次々と出現して新しいタイプの食中毒発生の可能性が推測される。また、弁当や学校給食を原因とする集団食中毒の発生および暖房等の普及による冬季の食中毒事例などもみられるようになってきている。このように、近年の食中毒の発生は、さまざまな要因が複雑に重なり、複合汚染的な発生と考えられる。

このような食中毒の心配のない安全な食品の確保が望まれるが、近年、食品の安全性確保についての関心が国際的にも高まり、我が国でも、1995年7月にPL法の施行、1996年5月に総合衛生管理製造過程承認制度の施行、1997年4月より食品の期限表示開始と、食品製造業者に食品の品質・安全性を保證する責任があることを明確にした制度が次々とスタートした。これらによって、より安全性確保がなされた高い品質の製品を使用者に提供する品質保證を実施していくことが求められるようになった。このような中で、今後、さらに、食品業界の微生物制御に対する認識は、一段と深まっていくと思われる。自主管理を徹底すると同時に、食品の日持ちの保證や延長も確約しなければならない。そこで、食品の品質保證を進めていく上で、製品安全対策からも製造現場における微生物管理が重要となり、新しく開発されたHACCP方式(Hazard

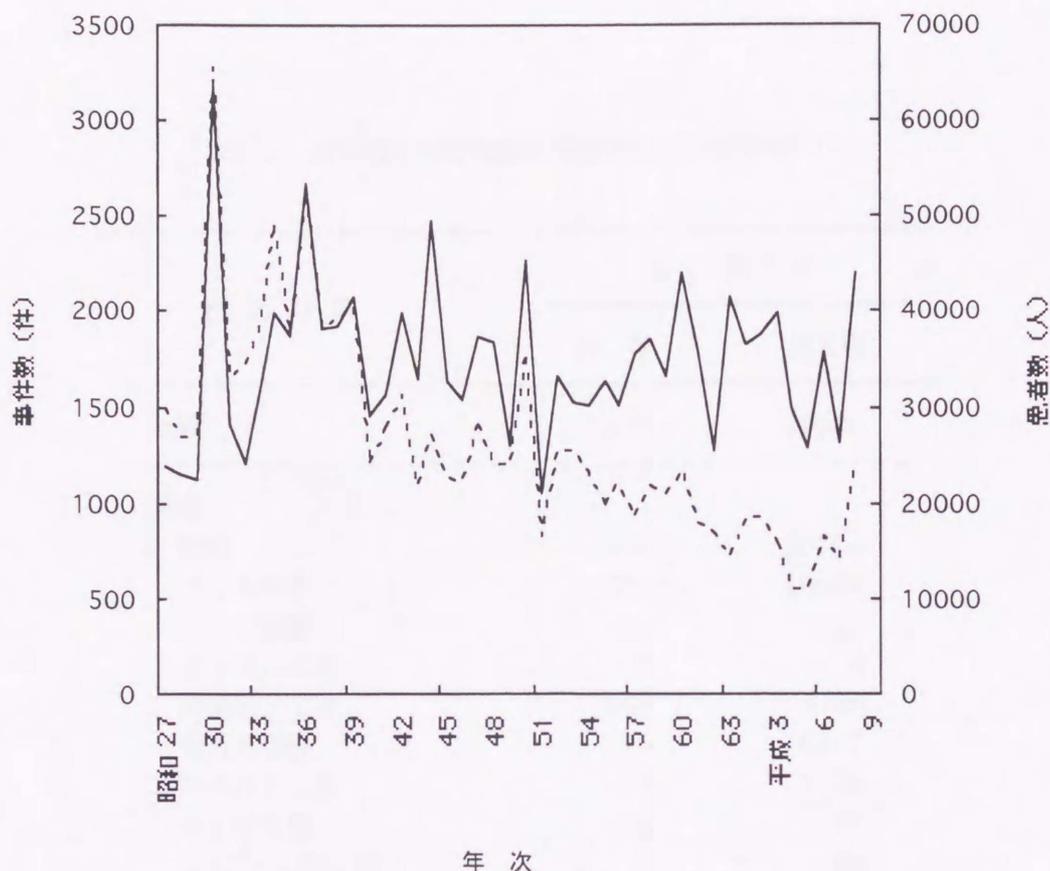


図1-1. 年次別食中毒発生状況¹⁾

----- : 事件数
 ————— : 患者数

Analysis Critical Control Point (危害分析・重要管理点方式)での重要管理点の一つであるトータルサニテーションの採用などの対策がとられ始めている。

食品における微生物制御としては、表1-2²⁾に示すような技術が知られているが、実際の食品には複数の技術を組合せて実施されることが多い。これら微生物制御の方法を大きく分けると、物理的方法と化学的方法の2つになる。物理的方法は、熱エネルギーや放射線エネルギーによって微生物の構成たん白質を変性させたり、細胞膜の溶解やDNAの損傷を引き起こしたりして、微生物を死滅させるのが基本的な原理である。加熱、紫外線および超高压などによる殺菌やろ過などによる除菌がその主な例で

表1-1. 食中毒の病因物質別発生状況（平成9年）¹⁾

病因物質	総数（人）	
	件数	患者数
総数	1960	39989

細菌		
総数	1630	29104
サルモネラ	521	10926
ブドウ球菌	51	611
ボツリヌス菌	2	4
腸炎ビブリオ	568	6786
病原大腸菌	176	5407
ウエルシュ菌	23	2378
セレウス菌	10	89
エルシア・エンテロリカ	3	68
カンピロバクター・ジエジエ/コリ	257	2648
ナグビブリオ	3	14
その他の細菌	16	173
化学物質		
総数	5	216
メタノール	—	—
その他	5	216
自然毒		
総数	88	305
植物性	56	211
動物性	32	94
不明	237	10364

表1-2. 微生物制御法の分類²⁾

殺菌	加熱殺菌	高温殺菌、低温殺菌、乾熱殺菌 高周波加熱、赤外線加熱
	冷殺菌	薬剤殺菌、ガス殺菌、放射線殺菌 紫外線、電子線、 γ 線、X線
	その他	超高圧、超音波
静菌	低温保持	冷蔵、冷凍
	水分低下	乾燥、濃縮
	酸素除去	真空、脱酸素、ガス置換
	化学物質添加	アルコール、塩、糖、酸、抗菌性物質
	微生物利用	発酵
除菌	ろ過、沈降、洗浄	
遮断	包装、コーティング、クリーンルーム	

ある。一方、化学的方法は、いわゆる抗菌性物質を用いる方法で、物理的方法に比べて大がかりな装置や設備などを必要とせずに、あらゆる食品に適應できる。食品中の微生物の増殖を阻止するための代表的な考えとしてLeistner 博士らによって提唱されているハードル理論³⁾が有名である。食品中での汚染微生物が増殖するためには、いくつかの条件がそろわなくてはならない。微生物が増殖するための条件を陸上競技のハードルにたとえ、なるべく多くのハードルを用意して増殖というゴールにたどり着けないように食品の加工および保存を行うという考え方である。ハードルとして、温度、水分活性、酸化還元電位、pHおよび抗菌性物質などが挙げられている。

最近の食品業界を取り巻く情勢の変化によって、食品用制菌剤の利用が進む傾向にある。塩分の多い食品を多く摂取する地方では、高血圧や脳卒中などの生活習慣病の発生率が高いという疫学調査結果により減塩が叫ばれている。また、一億総グルメ時

代といわれるように、消費者の舌が敏感になり、塩分の多い食品が敬遠されるようになってきている。その結果、漬物や塩蔵品などの塩味の強い商品は、低塩化され保存性が低下しているため、制菌剤などに頼らざるを得なくなっている。また、先に述べた賞味期限表示では、製造業者は、消費者に対して、賞味期限まで商品の品質を保証する義務が生じることになる。しかし、流通段階での保管温度の上昇など、賞味期限を設定した際に予想できない事態も起りうるので、安全率を大きく取った商品設計が行われている。その結果として、微生物の増殖による事故を確実に防止するため、制菌剤の需要が増えている。さらに、コンビニエンスストアやスーパーマーケット等では、調理済み弁当や惣菜類が売れ筋商品となっている。これらの食品は、販売時あるいは飲食時に微生物汚染が進行していた場合には、食中毒等の危険が高まる。また、一ヶ所で大量に製造した加工食品を、各ストアへ配送する流通期間中の品質も保持する必要があるため、制菌剤が使用されている。以上のように、食品製造業者は、食品に必要以上の保存性を付与する傾向にあり、加工食品に対する制菌剤の添加が一般的になっている。

現在、厚生大臣が認可した以外の物質は、食品への添加物として使用することができない。保存性向上を目的とした添加物(制菌剤)には、保存料や日持向上剤などがある。この制菌剤に対する消費者の意識について、近年変化がみられる。かつては合成保存料と呼ばれていたソルビン酸や安息香酸等が練り製品、漬物、しょう油などに盛んに使用されていた。しかし、合成保存料は、いつしか消費者より悪玉扱いされるようになり、それらを使用した食品が敬遠されるようになった。それに代わる制菌剤として、日持向上剤の使用が増加している。特に、消費者イメージがよい天然物由来の抗菌物質が脚光を浴びている。

食品の保存性向上を目的に、新しい抗菌性物質の検索をはじめ、種々の微生物制御技術が研究・開発され、食品製造に活用されている。その一方で、過剰の微生物制御により、食品のおいしさ、栄養価といった食品本来の機能が損なわれる可能性がある。また、グルメブームや本物志向により食品の低糖化や未加熱食品が増加し、さらにコールドチェーンや包装技術の進歩によって、従来にない新しいタイプの食品変敗が発生している。われわれは、低温流通蒲鉾のマイクロフローラについて研究したところ、今までに報告されていない新しい変敗形態(黄緑色蛍光色素を伴う軟化変敗)を発

見した。この変敗原因菌の分類学的位置、生理学的小よび培養学的諸性状を検討したところ、*Pseudomonas fluorescens* Biovar V K-1と同定され、増殖至適温度は30~31℃であるが、-2℃でも増殖が可能ないわゆる低温細菌であった⁴⁾。そこで、市販低温流通蒲鉾での低温変敗の実態を探るため、新たに考案した培地を用いて、市販蒲鉾および蒲鉾製造工程における蛍光色素を産生する*Pseudomonas* sp. の分布調査を実施し、市販蒲鉾および蒲鉾製造工程に本菌が広く分布していることを明らかにした⁵⁾。さらに、変敗の拡大防止を目的に汚染メカニズムの究明を試みた⁵⁾。また、蒲鉾における変敗要因についても併せて検討し、蒲鉾上での蛍光性*Pseudomonas* sp. の増殖には菌のプロテアーゼ活性が拘わっていることを明らかにした^{6, 7)}。一方、微生物制御において、ますます重要な位置づけとなる抗菌性物質として、最近の消費者の天然志向に応じた天然物成分であるホップエキスに注目し、食品用制菌素材としての可能性を追求した⁸⁾。その中で、一部食品添加物との併用により、ホップエキスの抗菌スペクトルをグラム陰性菌にまで拡大することに成功した。また、ホップエキスには、大腸菌の凍結耐性低下作用や、アルコールおよび洗浄除菌剤の殺菌力向上作用なども認められ、制菌素材として有望であると考えられた。以上、これらの検討によって、食品の保存性向上に寄与できると考える。

第2章 蒲鉾の*Pseudomonas* sp. 汚染について

食品を低温に保持することは、食中毒を未然に防ぎ、シェルフライフを延長するためには大変重要な手段である。近年、チルド流通や冷蔵流通等の低温保持技術が発達し、生鮮食品や保存性の悪い加工食品の賞味期限の延長が図られるようになってきた。しかし、このような低温保存期間の延長は、常温流通とは異なり、いわゆる低温細菌による変敗を引き起こす可能性があると予想される。そこで、低温流通蒲鉾のミクロフローラについて研究した。その結果、ある板つき包装蒸し蒲鉾において、包装紙の折り込み部分の浸出液から蒲鉾変敗部にかけて蛍光を発し、あたかも消化したように液状軟化を起こしている製品を認めた。この変敗形態は、現在までに報告されている木俣による軟化変敗⁹⁾、茂木らによるケーシング蒲鉾の変敗¹⁰⁾、森らによる内部軟化¹¹⁾、横関らによる表面ネット形成¹²⁾ および森ら¹³⁾、小川ら¹⁴⁾、金山ら¹⁵⁾、藤田ら¹⁶⁾ の報告している褐変変敗とも異なる新しい変敗と考えられた。そこで、本変敗の原因菌を分離し、分類学上の位置や生理学および培養学的諸性状の検討を実施した。

その結果、変敗原因菌が蛍光色素を産生する蛍光性*Pseudomonas* sp. であったことより、市販低温流通蒲鉾での低温変敗の可能性を探るため、蛍光性*Pseudomonas* sp. 検出用として新たに考案した試験培地を用いて、市販蒲鉾の低温保存品および蒲鉾製造工程における蛍光性*Pseudomonas* sp. の分布を調べた。さらに、検出菌による蒲鉾の軟化再現実験を行い、本*Pseudomonas* sp. による蒲鉾への汚染のメカニズムについても検討を加えた。

第1節 蛍光性軟化変敗原因菌の分離と同定

黄緑色の蛍光を伴う軟化変敗が発生している板つき包装蒸し蒲鉾の変敗原因菌の分離と同定を実施した。

1. 変敗菌の分離と同定

[実験方法]

[原因菌の分離]

製造後20日以上経過し変敗の発生した市場低温流通蒲鉾(板つき包装蒸し蒲鉾；株)

紀文食品製)から、黄緑色の蛍光を発し液状軟化を起こしている部分を白金耳にて採取した。これを、標準寒天培地(日水製薬株)平板に画線塗抹した後、30℃で2日間培養し、孤立コロニーを形成させた。そして、得られたコロニーを標準寒天培地にてさらに数回純粋培養して得られた単一菌叢のコロニーを原因菌とした。また、上記の変敗部分をサンプリングし、標準寒天培地を用いた混釈法によって一般生菌数を求めた。つまり、標準寒天培地を30℃で48時間培養して、形成されたコロニー数を計測した。

〔分離菌の同定〕

以下に示した形態学的観察、各種生理試験およびDNA塩基組成分析の結果より、「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8th ed., Vol. 1」¹⁷⁾(以下、Bergey's Manual)および「臨床材料より分離されるグラム陰性桿菌同定への手引き」¹⁸⁾(以下、GNRコード)を参考にして、分離菌の分類学上の位置について検討した。なお、対照菌株として、*Pseudomonas fluorescens* IFO3081 および *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080 を供試した。

〈主要性状〉

グラム染色、戸田法による鞭毛染色および顕微鏡による形態観察を実施した。各種生理試験の内、リパーゼ、アミラーゼおよびプロテアーゼの各活性、ゼラチン液化能、グルコン酸酸化能および尿素分解能は藪内の方法¹⁹⁾にそれぞれ従い、レバン生成能試験は森らの方法²⁰⁾に準じて行った。また、TSI培地における糖類の資化性、硫化水素およびガス産生能、SIM培地による硫化水素およびインドール産生能、さらに、キングA、キングBおよびNACの各培地における蛍光色素産生能については栄研化学株から市販されている生培地を用いてそれぞれ試験した。その他の生理試験は、GNRコードの方法に準じて実施した。

〈DNA塩基組成分析〉

普通ブイヨン(栄研化学株、東京)を用いて、30℃で24時間振とう培養した培養菌体から、SaitoおよびMiura²¹⁾による方法を基礎にした図2-1の方法に従いDNAを分離した。得られたDNA溶液を沸騰水中で、5分間加熱処理した後、アイスボックス中で急冷した。これに等量のヌクレアーゼP1溶液(ヤマサ醤油株、東京)を加え50℃にて1時間放置した後、生成したヌクレオチドをコスモシール5 C18(ナカライテスク株、京都)を用いて塩基組成を求めた。溶離液として0.05%リン酸二水素アンモニウムを

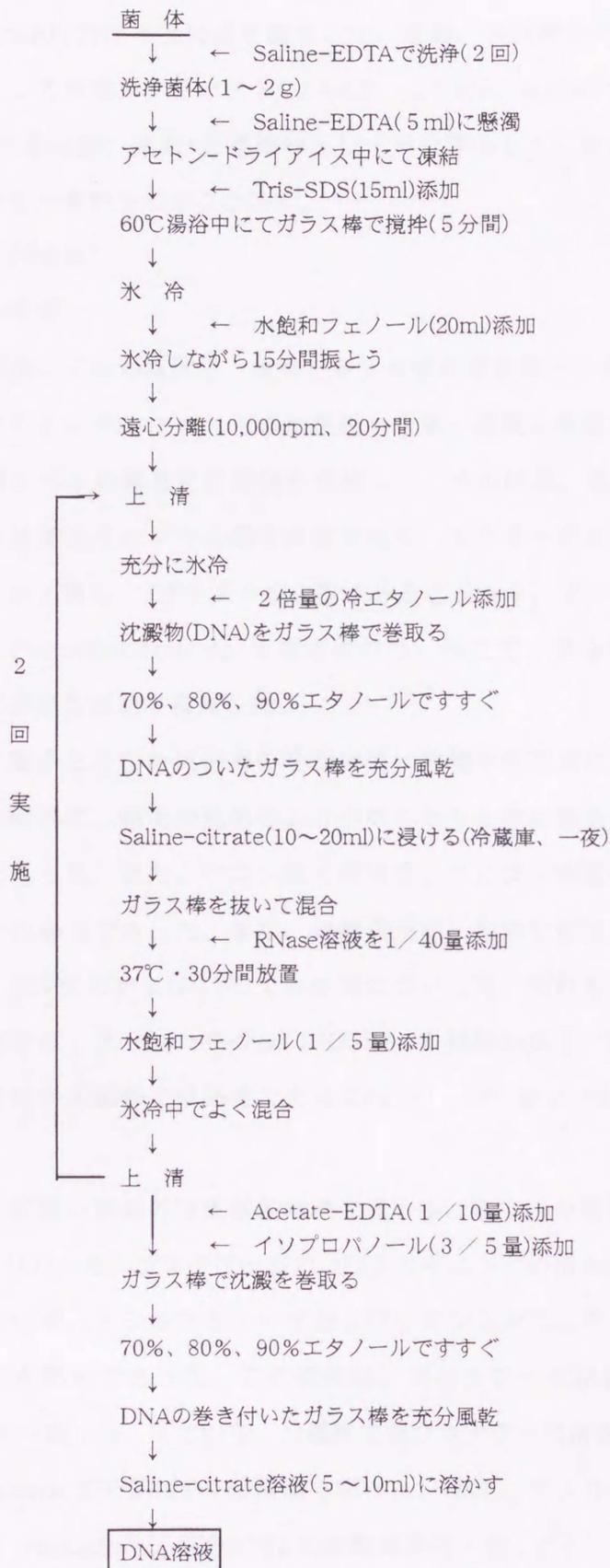


図2-1. DNA溶液の調製方法

用い、265nmにおける吸光度を測定した。なお、供試菌株のG+C含量(mole%)は、標準物質として構成ヌクレオチド(dAMP、dGMP、dCMPおよびdCTP)の等モル混合物(ヤマサ醤油(株)、東京)を標準物として用い算出した。なお、高速液体クロマトグラフィーの分析条件を図2-3に示す。

[結果および考察]

[分離菌の同定]

市場に流通している蒲鉾で、蛍光を発する軟化変敗部分から 5.4×10^8 cfu/gの生菌数が検出された。そのコロニーの形態等から単一菌叢と推定されたので、本菌を純粋培養して属レベルの簡易同定試験を実施した。その結果、表2-1に示すように、運動性を有する無芽胞性のグラム陰性桿菌であり、カタラーゼおよびオキシダーゼの両酵素活性がともに陽性、OFテストがO型であることより、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に属する*Pseudomonas* sp.と推定された。そこで、さらに種レベルまで同定を進めるために詳細な試験を実施した。

まず、分離株および対照菌株の形態学的、生理学的性質に関する試験結果を表2-2に示す。分離株は、鞭毛染色像等より少なくとも2本の鞭毛を有するグラム陰性の無芽胞桿菌であった。また、クエン酸の利用性、グルコン酸酸化能および4℃での生育能はそれぞれ陽性であった。また、硝酸還元能、尿素分解能、インドール産生、硫化水素産生、IPA反応および41℃での生育については、何れも陰性であった。分離株のこれらの性状は、*P. fluorescens* IFO3081の試験結果と一致していた。しかし、ゼラチン液化能が分離株では陽性であるのに対し、*P. fluorescens* IFO3081は陰性となった。

次に、供試菌の酵素的特性試験結果を表2-3に示す。分離株は、カタラーゼ、オキシダーゼ、リパーゼ、プロテアーゼおよびアルギニンジの加水分解能が陽性で、DNエース、アミラーゼ、アシルアミラーゼおよびリジンとオルニチンの脱炭酸酵素活性については何れも陰性であった。この結果は、プロテアーゼ活性を除き*P. fluorescens* IFO3081と一致した。すなわち、分離株ではプロテアーゼ活性が陽性であるのに対し、*P. fluorescens* IFO3081のは陰性であった。また、アシルアミラーゼ活性以外は、分離株と*P. aeruginosa* IFO3080の試験結果は一致した。

各炭素源からの酸生成状況を表2-4に示す。分離株は、グルコース、キシロース、

表2-1. 分離菌の簡易同定試験結果

試験項目	分離株
形態	桿菌
グラム染色	-
芽胞形成	-
運動性	+
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	+
O/Fテスト	O型

+ : 陽性、- : 陰性

表2-2. 供試菌の形態学および生理学的性質

試験項目	分離株	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. aeruginosa</i> ^b
細胞の長さ(μm)	2.3~2.8	2.5~12.5	2.3~3.0
細胞の幅(μm)	0.8	0.8	0.6
鞭毛	+	+	+
クエン酸の利用	+	+	-
グルコン酸酸化能	+	+	-
硝酸還元能	-	-	-
尿素分解能	-	-	+
インドールの産生	-	-	-
硫化水素の産生	-	-	-
ガスの産生	-	-	-
IPA反応	-	-	-
ゼラチン液化能	+	-	+
4℃での生育	+	+	-
41℃での生育	-	-	+

+ : 陽性、- : 陰性

a : *P. fluorescens* IFO3081

b : *P. aeruginosa* IFO3080

表2-3. 供試菌の酵素的性質

試験項目	分離株	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. aeruginosa</i> ^b
カタラーゼ	+	+	+
オキシダーゼ	+	+	+
デオキシリボヌクレアーゼ	-	-	-
リパーゼ	+	+	+
アミラーゼ	-	-	-
プロテアーゼ	+	-	-
アシルアミラーゼ	-	-	+
アルギニン加水分解酵素	+	±	+
リジン脱炭酸酵素	-	-	-
オルニチン脱炭酸酵素	-	-	-

+ : 陽性、- : 陰性、± : 疑陽性

a : *P. fluorescens* IFO3081

b : *P. aeruginosa* IFO3080

表2-4. 供試菌の各種炭素源からの酸生成試験

試験項目	分離株	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. aeruginosa</i> ^b
グルコース	+ ^c	+	+
マルトース	-	-	-
キシロース	+	+	+
スークロース	+	+	-
ラクトース	-	-	-
アドニトール	+	+	-
マンニトール	+	+	+
イノシトール	+	+	-
アラビノース	+	+	+
ソルビトール	+	+	-
フラクトース	+	+	+
メリビオース	+	+	+
ラムノース	-	-	-
マンノース	+	+	+
トレハロース	+	+	-

+ : 陽性、- : 陰性

a : *P. fluorescens* IFO3081

b : *P. aeruginosa* IFO3080

c : 嫌氣的分解は陰性

スクロース、アドニトール、マンニトール、イノシトール、アラビノース、ソルビトール、フラクトース、メリビオース、マンノース、トレハオースが陽性で、マルトース、ラクトース、ラムノースが陰性となり、*P. fluorescens* IFO3081の性状と完全に一致した。

供試菌の色素産生能について表2-5に示す。分離株は、試験を実施した何れの培地においても蛍光性の色素を産生した。すなわち、キングA培地では蛍光を発する淡青色色素を、キングB培地およびNAC寒天培地では、図2-2に示すようなピオベルジンと推定される黄緑色素を産生し、紫外線照射下で、鮮やかな蛍光を発することを確認した。

以上の試験結果より、Bergey's Manualを参考に分離株の分類学上の位置を推定すると*Pseudomonas fluorescens* と考えられた。分離株と*P. fluorescens* IFO3081の試験結果を比較すると、プロテアーゼ活性とゼラチン液化能について、分離株がともに陽性、*P. fluorescens* IFO3081はともに陰性であり異なった結果となったが、Bergey's Manual では両項目とも*P. fluorescens* は陽性と記載されており分離株と一致した。

つぎに、*P. fluorescens* には、5つのバイオタイプが存在するので、さらに詳細な検討を実施した。まず、バイオタイプの推定に重要なレバン生成能試験の結果を表2-6に示す。粘度が23.0mPa・sであるスクロース添加培地に分離株を植菌し、30℃で3日間振とう培養を行った時の培地の粘度は26.0mPa・sであり有意な上昇はみられなかった。また、他の糖質についても培養前後における粘度の差は僅かであり、さらに、糖による差もほとんど認められないことより、分離菌のレバン生成能は陰性と考えられた。

つぎに、DNA塩基組成分析における分離株のDNA構成ヌクレオチドのクロマトグラムを図2-3に示す。デオキシシチジル酸、デオキシチミジル酸、デオキシグアニル酸およびデオキシアデニル酸の順に溶出する4つのピークが認められた。この測定結果と、標準物質として用いた構成ヌクレオチドの等モル混合物の測定値よりG+C mole %を算出したところ、60.76となった。

P. fluorescens にはBiovar I～Vまでの5種類のバイオタイプが存在する。各バイオタイプの推定のために必要なBergey's Manual の記載値と供試菌の試験結果を

表2-5. 供試菌の色素産生能試験

使用培地	項目 ^a	分離株	<i>P. fluorescens</i> ^b	<i>P. aeruginosa</i> ^c
キングA培地	蛍光	+	+	+
	色素	淡青	淡青	深青
キングB培地	蛍光	+	+	+
	色素	黄緑	黄緑	黄～青
NAC寒天培地	蛍光	+	+	+
	色素	黄緑	黄緑	黄緑

+ : 陽性、- : 陰性

a : 蛍光は紫外線照射下にて観察した

b : *P. fluorescens* IFO3081

c : *P. aeruginosa* IFO3080

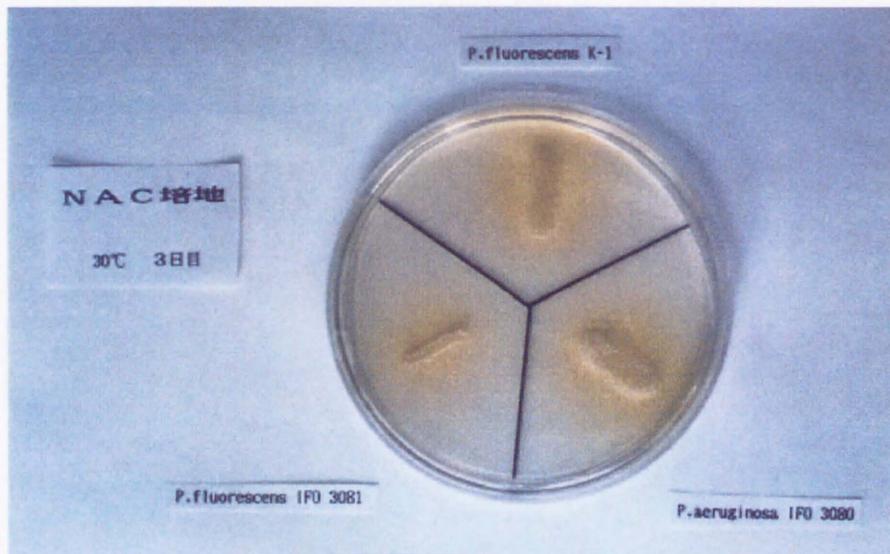


図2-2. 供試菌のNAC寒天培地での色素産生状況 (30℃・3日目)

表2-6. 供試菌による各糖源からの粘性物質の生成試験結果

糖 源	粘 度 ^a (mPa・s)	
	分離株	<i>P. fluorescens</i> IFO3081
スクロース	26.0 ^b	25.7
グルコース	27.3 ^c	25.7
キシロース	26.3	25.7
フラクトース	25.3	26.3
可溶性澱粉	28.0	26.3

a : 基礎培地(グルタミン酸Na : 0.5%、リン酸二K : 0.32%、リン酸一K : 0.25%、塩化Na : 0.1%、硫酸Mg : 0.07%、硫酸第一鉄 : 0.001%、pH 6.8)に各糖源を1%添加し供試菌を植菌後、30℃で3日間振とう培養を行った培地の粘度を測定した。尚、測定は、B型粘度計(東京計器株)を用い、液温30℃にて測定した。

b : 供試菌未植菌のスクロース添加培地の粘度 ; 23.0mPa・s

c : 供試菌未植菌のグルコース添加培地の粘度 ; 24.0mPa・s

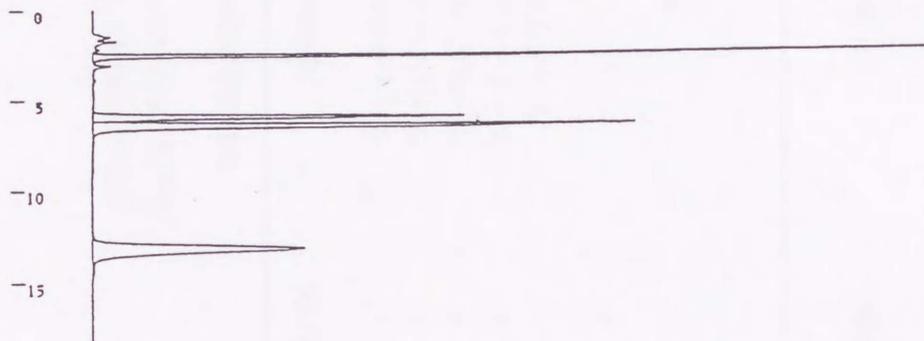


図2-3. 分離株のDNA構成ヌクレオチドのHPLCクロマトグラム

DNA構成ヌクレオチドは、デオキシチミジル酸、デオキシチミジル酸、デオキシグアニル酸およびデオキシアデニル酸の順に溶出した。

分析条件：サンプル；100 μ l DNA溶液 \rightarrow 100 $^{\circ}$ C \cdot 5分間 \rightarrow 冷却 \rightarrow
 等量のヌクレアーゼP1添加 \rightarrow 50 $^{\circ}$ C \cdot 1時間 \rightarrow
 10 μ l を分析

HPLC ; 本体	シマズ LC-6A
検出器	シマズ SPD-6A
カラム	Cosmosil 5 C18、10cm
溶離液	0.05% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、1 ml/min

表2-7. 分離株と*P. fluorescens* の特性比較

比較項目	分離株	<i>P. f.^a</i>	<i>P. a.^b</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
				Bio. I	Bio. II	Bio. III	Bio. IV	Bio. V
硝酸還元能	-	-	-	-	+	+	+	-
レバニン生成能	-	-	-	+	+	-	+	-
リバーゼ	+	+	+	d	-	d	d	d
酸の産生	ラムノース	-	-	-	d	d	-	d
	アラビノース	+	+	+	+	d	+	d
	スクロース	+	+	-	+	+	+	d
	アトニトール	+	+	-	+	d	-	d
ソルビトール	+	+	-	+	+	d	+	d
G+C 含量 (Mol%)	60.76	61.06	67.60	60.5	61.3	60.6	59.4	60.5

d : 11~89%の株が陽性

a : *P. fluorescens* IFO3081

b : *P. aeruginosa* IFO3080

表2-7に示す。分離株は、硝酸還元能、レバン生成能およびラムノース分解能が陰性であり、リパーゼ活性および糖の分解能としてアラビノース、スクロース、アドニトール、ソルビトールが陽性であることより、Bergey's Manual 記載のBiovar Vと一致した。さらに、G+C含量についても、分離株が60.76%とBiovarVの60.5とほぼ一致していることより、分離株は*P. fluorescens* Biovar Vと推定され、*P. fluorescens* Biovar V K-1(以下、本章ではK-1株とする)と命名した。

2. 分離株の世代交代時間と増殖温度

前項、1.にて、蒲鉾の軟化変敗原因菌は*P. fluorescens* Biovar V K-1(K-1株)と同定されたが、本菌の特性をさらに検討するため、世代交代時間および増殖可能温度域について調べた。

2-1. 世代交代時間

[実験方法]

[供試菌]

P. fluorescens Biovar V K-1(K-1株)

[試験方法]

肉エキス1.0%、ポリペプトン1.0%、塩化ナトリウム0.5%を含み、pHを10%炭酸ナトリウムにて7.0に調整した肉エキス液体培地に供試菌培養液を接種した。そして、微生物自動増殖測定装置バイオスキャナー(大岳製作所(株)、東京)を用いて温度別に振とう培養を実施した。そして、650nmにおける吸光度を測定することによって作成された増殖曲線から、吸光度が0.1から0.2に達するまでに要する時間を求め、これを世代交代時間とした。なお、供試菌培養液は、本菌を肉エキス液体培地にて30℃で24時間振とう培養した培養液を用い、この0.02mlを培地10mlに添加した。

[結果]

650nmにおけるOD値が0.1から0.2になるのに要する時間を縦軸にとり、その時の培養温度との関係を図2-4に示す。これより、K-1株の増殖至適温度は30℃~31℃の間と考えられ、最短世代交代時間は約38分と推定された。また、増殖可能な最大温度は38℃であり、38.5℃では増殖不可能であった。

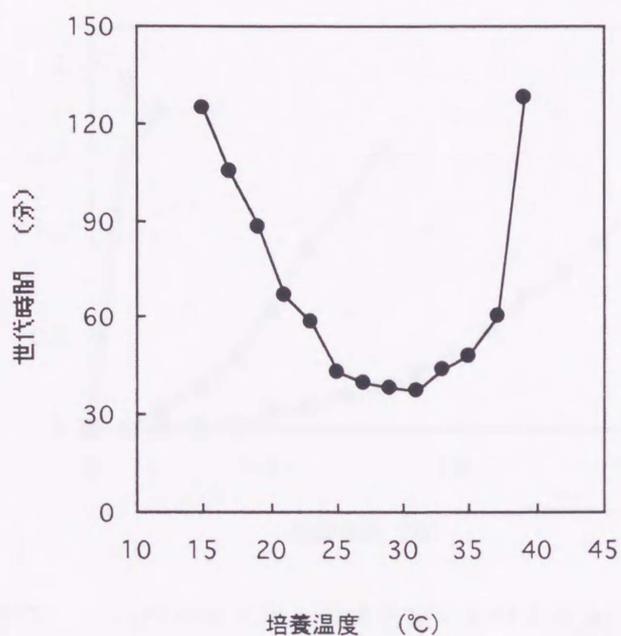


図2-4. K-1株の培養温度と世代交代時間との関係

2-2. 温度別増殖能

[実験方法]

[供試菌]

P. fluorescens Biovar V K-1(K-1株)

[試験方法]

肉エキス液体培地に供試菌培養液を接種し、所定の温度にて振とう培養を実施し、660nmにおける吸光度を測定することにより増殖を観察した。なお、供試菌培養液は、本菌を肉エキス液体培地にて30℃で24時間振とう培養した培養液を用い、この0.02mlを培地10mlに添加した。

[結果および考察]

K-1株を-2、0、10および20℃にて培養した時の増殖曲線を図2-5に示す。K-1株は、20℃および10℃では培養開始1日後には吸光度が1.0以上となり活発な増殖が認められた。また、0℃培養においても、6日目には吸光度が1.0に達し、さらに-2℃でも培養開始14日目には1.0以上となり、強い低温増殖性が示された。

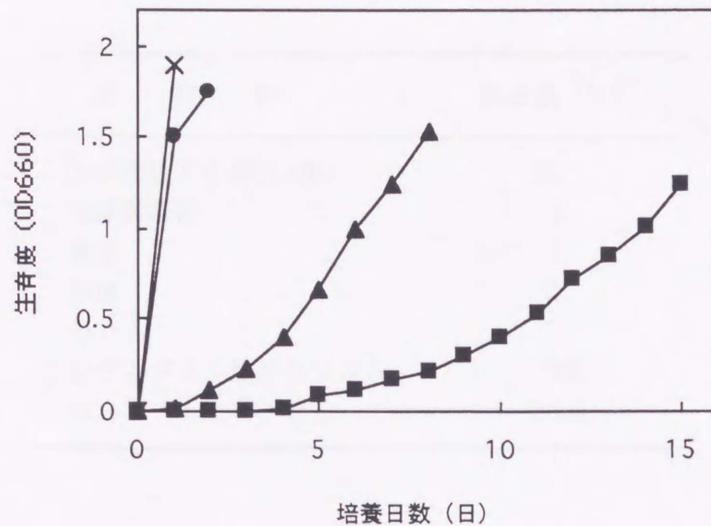


図2-5. K-1株の肉エキス液体培地における温度別増殖能

× : 20℃、● : 10℃、▲ : 0℃、■ : -2℃

このようにK-1株は、-2℃でも増殖は可能であるが、増殖至適温度は30℃付近にあることより、低温細菌(耐冷細菌)の定義²²⁾、すなわち「増殖至適温度が20℃を越え、かつ0℃前後の低温でも増殖可能」という性質に合致する菌と考えられる。

第2節 分離株の蒲鉾軟化の再現実験

K-1株は軟化蒲鉾の原因菌であるので、調製した蒲鉾に本菌を植菌した後、低温に保存し、軟化の再現実験を実施した。

〔実験方法〕

〔供試菌〕

軟化蒲鉾の変敗原因菌として分離同定した *P. fluorescens* Biovar V K-1(K-1株)を用い、また、対照として、*P. fluorescens* IFO3081および *P. aeruginosa* IFO3080を供試した。

〔試験方法〕

表2-8に示す原材料からサイレントカッターを用いて練肉を調製し、折径7cmの塩

表2-8. 軟化の再現実験に用いた蒲鉾の配合処方

原 材 料	配合量 (%)
助宗無塩すり身(SA級)	55
馬鈴薯澱粉	3
食塩	2
砂糖	2
みりん	1
L-グルタミン酸ナトリウム	0.6
水	36.4

化ビニリデン系ケーシングに充填した。これを、40℃で1時間坐らせた後、90℃で1時間加熱して蒲鉾に仕上げた。冷却後、ケーシングを取り除き、厚さ6mmに無菌的にスライスし、これを無菌シャーレに入れた。このスライス片面に、供試菌懸濁液0.1mlを滴下し、コンラージ棒で十文字に塗布してテープにて封入した。そして、0、5および10℃に保存し、保存中の生菌数の変化を測定した。同時に、軟化変敗の発生状況についても観察した。生菌数は、標準寒天培地を用いて混釈法により求めた。つまり、混釈した培地を30℃で48時間培養した時に形成されたコロニー数を計測した。なお、供試菌懸濁液は、供試菌を肉エキス液体培地を用いて、30℃で24時間振とう培養した培養液を無菌水で 10^5 倍希釈して用いた。

[結果および考察]

0、5および10℃に保存した蒲鉾における各供試菌の生菌数変化を図2-6に示す。また、0℃で保存した30日目の蒲鉾のネット発生状況を図2-7に、10℃保存区の場合を図2-8に示す。K-1株は、10℃保存では6日目に、5℃保存区では10日目には生菌数が 10^8 オーダー/gを越え、0℃保存でも20日過ぎには 10^8 オーダー/gに達し、塗布部分に沿って紫外線照射下で蛍光を発生し、軟化の発生が認められた。一方、*P. fluorescens* IFO3081は、経日的に生菌数が減少し、保存開始6日目より生菌数が検出されなくなり、軟化の発生は保存期間を通じて認められなかった。また、*P. aeruginosa* IFO3080については、0℃および5℃保存では増殖が認められなかったが、10℃では

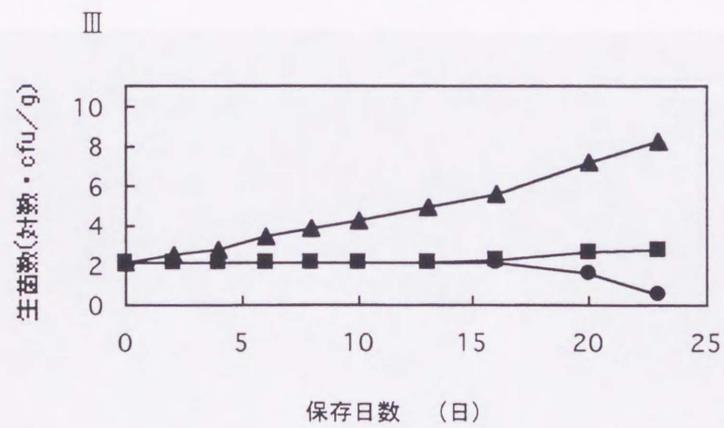
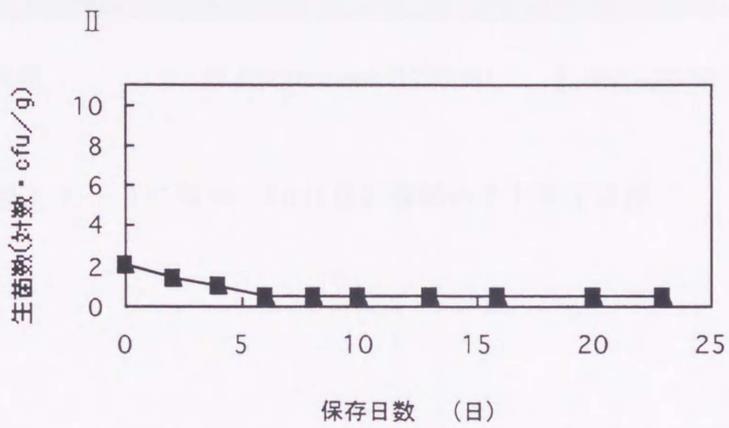
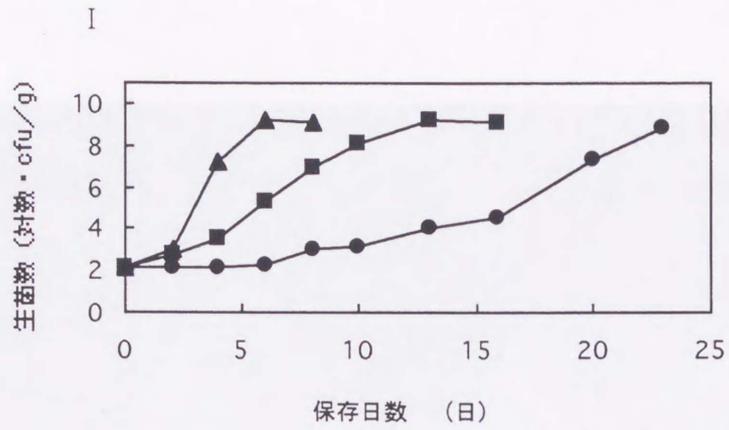


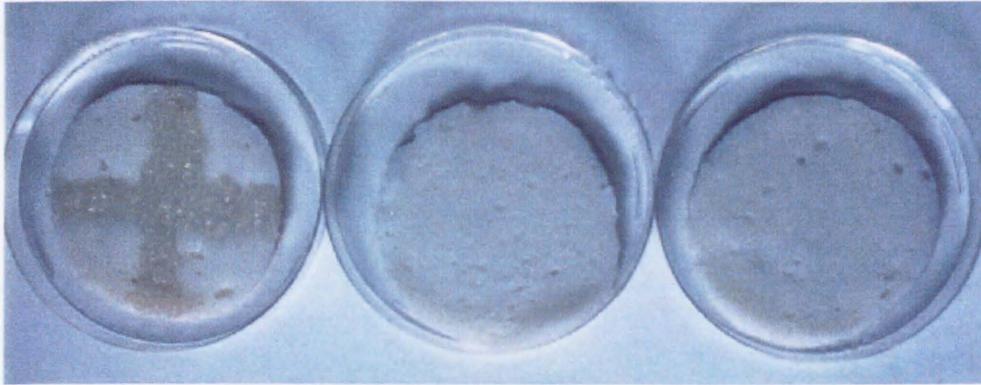
図2-6. 0、5および10℃保存中における蒲鉾表面での供試*Pseudomonas* sp.の生菌数変化

● : 0℃、■ : 5℃、▲ : 10℃

I : *P. fluorescens* Biovar V K-1 (K-1株)

II : *P. fluorescens* IFO3081

III : *P. aeruginosa* IFO3080

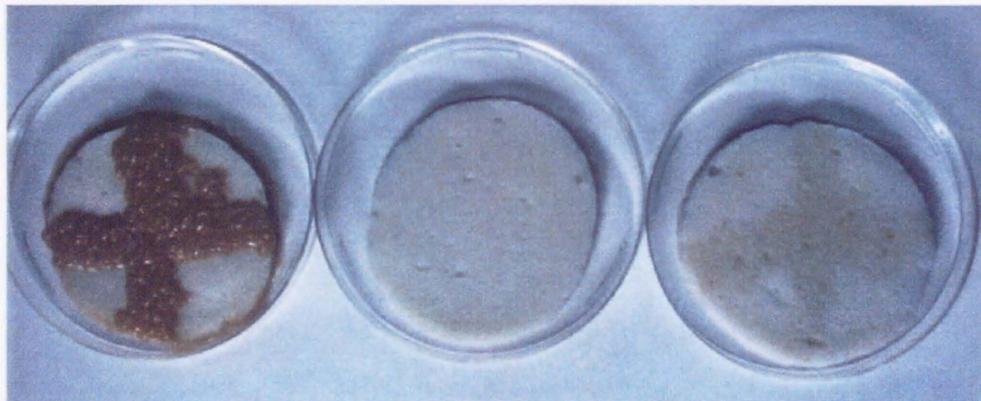


K-1株

P. fluorescens IFO3081

P. aeruginosa IFO3080

図2-7. 0℃保存・30日目の蒲鉾のネット発生状況



K-1株

P. fluorescens IFO3081

P. aeruginosa IFO3080

図2-8. 10℃保存・30日目の蒲鉾のネット発生状況

除々に増殖し、保存20日過ぎには生菌数が 10^8 オーダー/gに達し、塗布部にネット状の変敗が観察された。

以上の結果より、K-1株と*P. fluorescens* IFO3081は蒲鉾表面での増殖能、すなわち変敗起因性が全く異なることが判明した。K-1株の変敗形態は強力なプロテアーゼを推定させる消化型軟化である。また、他の生理学的性質が一致しているものの、K-1株はプロテアーゼ活性およびゼラチン液化能ともに陽性であるのに対し、*P. fluorescens* IFO3081は何れも陰性である。さらに、*P. fluorescens* IFO3081は肉エキス培地や普通ブイヨンのようなN源が豊富に存在する液体培地では、0℃および5℃の低温でもK-1株と同様に増殖が可能であることを確認している。このような事実から考えると、蒲鉾のように低分子N源が必ずしも豊富に含まれていない固形食品の表面での増殖にはプロテアーゼが重要な因子となっており、増殖に必要なN源の供給を菌自身が産生するプロテアーゼに依存していると推察され、これが両株の変敗起因性に違いが生じる原因と考えられる。茂木ら¹⁰⁾は、ケーシング詰め蒲鉾の内部軟化変敗起因性について、原因菌である*Bacillus* sp.の澱粉加水分解能との関連を指摘している。しかし、プロテアーゼ活性すなわち蛋白質分解能によって、低温保存蒲鉾での増殖性に違いが生じる点は、軟化変敗防止対策を講じるにあたって、参考になると考えられる。

第3節 市販蒲鉾の微生物汚染状況

低温流通蒲鉾における微生物汚染状況の把握の一環として、市販の蒲鉾を購入した後10℃に1ヶ月間保存し、変敗形態を観察するとともに、変敗原因菌を分離同定した。さらに、得られた分離菌を用いて、蒲鉾の軟化変敗再現実験を実施した。

1. 市販蒲鉾の保存試験と変敗菌の分離同定

〔実験方法〕

〔市販蒲鉾の保存試験〕

平成元年1月に関東および関西地区の百貨店やスーパーマーケットなどの店頭から、製造日より3日以内の製品を購入し、10℃に30日間保存して変敗形態を調べた。なお、蒲鉾は、包装形態や製法(加熱方法)の違いなどを考慮して表2-9に示す15銘柄を選ん

表2-9. 供試した市販蒲鉾の加熱方法および包装形態

メーカー	加熱方法	包装形態	ソルビン酸 ^a
A	蒸し	密着生包装／化粧包装	+
B	蒸し	密着生包装／化粧包装	-
C	蒸し	密着生包装／化粧包装	-
D	蒸し	密着生包装／化粧包装	-
E	蒸し	密着生包装／化粧包装	-
F	蒸し	含気包装	-
G	蒸し	密着生包装／シュリンク包装	+
H	蒸し	含気包装	+
I	蒸し	含気包装	+
J	蒸し	密着生包装／シュリンク包装	-
K	蒸し（リテーナ成形）	リテーナ成形	+
L	蒸し（リテーナ成形）	リテーナ成形	-
M	蒸し（リテーナ成形）	リテーナ成形	-
N	蒸し（リテーナ成形）	リテーナ成形	-
O	焼き通し	三重包装	+

a：ソルビン酸およびソルビン酸カリウムの使用状況；+：使用、-：未使用

だ。すなわち、包装形態からは、密着生包装／化粧包装、密着生包装／シュリンク包装、含気包装、リテーナ成形および三重包装の5種類に、加熱方法では、蒸し（リテーナ成形蒲鉾を含む）と焼き通しの2種類に分類された。

〔変敗原因菌の同定〕

保存試験後、変敗の認められた蒲鉾を試料とし、変敗原因菌の分離同定試験を以下の通り実施した。まず、蒲鉾の変敗部位を白金耳にて採取し、標準寒天培地とBCP加プレートカウント寒天培地(日水製薬株、東京)平板に画線塗抹し、30℃で2日間培養して孤立コロニーを分離した。得られた分離菌について、顕微鏡下での形態観察を行い、真菌類と確認した以外の株について、駒形の方法²³⁾に従って属レベルの同定を実施した。さらに、乳酸菌と推定された株については、光岡の乳酸菌分類表²⁴⁾に従い同定を行った。

〔結果および考察〕

購入した蒲鉾を10℃にて30日間保存した時の変敗状況と変敗原因菌の同定結果を表-2-10に示す。15銘柄中9銘柄の蒲鉾に変敗が認められたが、変敗形態としては、蒲鉾表面に無色から黄色のネト等が形成されるケース、表面から内部にかけて軟化が発生しているケースおよび黴発生ケースの3つの群に大別された。これらの変敗形態と菌種の関係については、蒲鉾表面に点在する黄色からヤマブキ色のコロニー状のネトは*Micrococcus* sp. および *Staphylococcus* sp. であり、白色から淡黄色のネトは*Corynebacterium* sp. と同定された細菌に由来した。酵母は白色の表面ネトを形成した。また、包装フィルムと蒲鉾表面の間に透明な粘質物が広がっているケースがみられたが、何れも乳酸菌である*Leuconostoc* sp. が検出されており、本菌が産生するデキストランであると推定された。一方、表面から内部にかけて軟化を起こしている部位からは、おもに蛍光色素を産生する*Pseudomonas* sp. が検出され、B社の蒲鉾からはEnterobacteriaceaeが認められた。このB社製の蒲鉾について、大腸菌群の推定および確定試験を実施した。その結果、ともに陽性となり工場内での大腸菌群汚染が推定された。本菌もプロテアーゼ活性が陽性であることや蒲鉾に軟化の兆候が認められることから、軟化変敗への進行の可能性が示された。

今回実施した10℃・30日間の保存試験では、たびたび蒲鉾の変敗菌として分離される*Bacillus* sp.による変敗²⁵⁾は認められなかった。これは、10℃保存という低温では*Bacillus* sp.の増殖速度が非常に遅く、かつ*Pseudomonas* sp. および*Leuconostoc* sp.などは低温での増殖が比較的速いことに起因していると考えられる。

本実験で分離同定された菌は、全て非耐熱性菌であり、加熱工程以降の二次汚染が原因と考えられる。従来、リテーナ成形蒲鉾については、その密封性の高さから加熱後の二次汚染はなく、加熱残存した主として原材料に由来する*Bacillus* sp.が変敗の中心と考えられていた。しかし、N社製のリテーナ成形蒲鉾には、明らかに*Pseudomonas* sp.による軟化変敗が発生している。また、他の変敗に関しても、必ずしも単なる製造工程における落下菌汚染とは言い切れず、保存対策を講じるうえで、このような汚染メカニズムの解明は重要と考えられる。

以上の実験結果より、市販蒲鉾も広く*Pseudomonas* sp.によって汚染され、低温変敗、特に軟化変敗の原因になっていることが確認された。

表2-10. 市販蒲鉾の変敗形態および変敗原因菌

ヌーカー	変敗形式 ^a			変敗原因菌
	スライム	軟化	カビ	
A	+	+	+	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. ^b , Yeast, Mold <i>Leuconostoc</i> sp., Enterobacteriaceae, Yeast, Mold Yeast, Mold
B	+	±	+	
C	+	-	+	
D	-	-	-	<i>Leuconostoc</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., Yeast <i>Micrococcus</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Vibrio</i> sp.
E	+	-	-	
F	+	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp. ^b <i>Pseudomonas</i> sp. ^b <i>Pseudomonas</i> sp. ^b
G	-	-	-	
H	+	+	-	
I	+	±	-	<i>Pseudomonas</i> sp. ^b , Mold
J	+	+	-	
K	-	-	-	
L	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp. ^b , Mold
M	-	-	-	
N	+	+	+	
O	-	-	-	

^a : スライム; 蒲鉾表面にネト状粘質物が産生されているタイプ

軟化; 蒲鉾の表面から内部にかけて組織に軟化がみられるタイプ

カビ; カビが発生しているタイプ

凡例; +: 発生、±: 僅かに発生、-: 発生せず

^b : 蛍光性 *Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地(本章、第4節参照)にて、蛍光の産生が認められた。

2. 分離菌による蒲鉾軟化の再現実験

[実験方法]

[蒲鉾軟化の再現実験]

前項、1.にて市販蒲鉾より分離した*Pseudomonas* sp. を用いて、本章、第2節と同様にスライス蒲鉾に分離菌液を塗布した後、0℃に保存し生菌数変化および軟化変敗の発生状況を観察した。

[結果および考察]

市販蒲鉾から分離された*Pseudomonas* sp. 5株(A、H、I、JおよびN社)による蒲鉾の軟化変敗再現試験結果を図2-9に示す。供試した5菌株中で4株(A、H、J

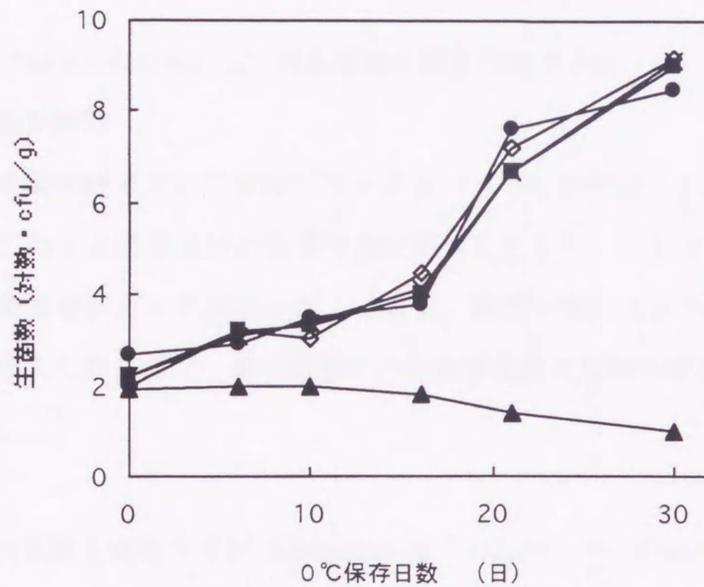


図2-9. 市販蒲鉾より分離した*Pseudomonas* sp. による蒲鉾軟化の再現試験：0℃保存中における蒲鉾での生菌数変化

- ：A社製蒲鉾からの分離菌
- ：H社製蒲鉾からの分離菌
- ▲：I社製蒲鉾からの分離菌
- ×：J社製蒲鉾からの分離菌
- ◇：N社製蒲鉾からの分離菌

およびN社)の*Pseudomonas* sp. については、蒲鉾表面で増殖し10℃保存・30日目には生菌数が 10^8 個/gを越え軟化を起した。一方、軟化変敗の進行レベルが低かったI社製蒲鉾からの分離株については、保存期間中に生菌数の増加は認められなかった。従って、同じ*Pseudomonas* sp. であっても、蒲鉾表面での軟化変敗起因性に差があることが再確認された。

第4節 蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の検討

K-1株の同定試験の一環として実施したレバン生成能試験(本章、第1節、1)の過程で、レバン生成能試験用培地に*Pseudomonas* sp. の黄緑色蛍光色素(ピオベルジン)産生能が若干ながら存在することを偶然見出した。そこで、この培地処方を改良し、蛍光性*Pseudomonas* sp. 検出用の簡易試験培地を検討した。

1. 蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の処方決定

1-1. 糖源の検討

レバン生成能試験培地にて糖源をスクロースとした時は、*Pseudomonas* sp. のコロニーのまわりに黄緑色蛍光色素の産生がみられたが、グルコースを糖源とした場合、色素の産生は認められなかった。そこで、糖源の違いにより蛍光色素の産生能に差があると考えられたので、糖の種類による黄緑色蛍光色素の産生能を調べた。

[実験方法]

[供試菌]

黄緑色蛍光色素を産生する*P. aeruginosa* IFO3080、*P. fluorescens* IFO3081および*P. fluorescens* Biovar V K-1(K-1株)を用いた。

[試験方法]

黄緑色蛍光色素であるピオベルジンは、鉄欠乏状態で産生されやすい²⁶⁾ので、レバン生成能試験培地から硫酸第一鉄を除いた培地を基本組成として、表2-11に示す16種類の糖を配合して試験培地とした。この培地に供試菌培養液(白金耳)を接種し、30℃での培養を行い供試菌の増殖と黄緑色蛍光色素の産生を観察した。なお、供試菌培養液は、供試菌を肉エキス液体培地にて30℃で24時間振とう培養した培養液を用いた。

表2-11. 蛍光性 *Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の処方検討：糖源の検討

原 材 料	配合量 ^b
糖 ^a	10.0
グルタミン酸ナトリウム	5.0
リン酸水素二カリウム	3.2
リン酸二水素カリウム	0.6
塩化ナトリウム	1.0
硫酸マグネシウム	0.7

pH : 7.4

a : 供試した糖の種類

アラビノース	キシロース
ラムノース	グルコース
フルクトース	マンノース
スクロース	トレハロース
マルトース	メリピオース
ラクトース	アドニット
イノシット	ソルビット
マンニット	ラフィノース

b : 単位 ; g/蒸留水 1L

[結果]

各培地を30℃にて振とうおよび静置培養した場合の供試菌の増殖と黄緑色蛍光色素の産生状況を表2-12に示す。30℃で2日間の振とう培養により *P. aeruginosa* IFO3080および *P. fluorescens* IFO3081は全ての培地で増殖が可能であった。しかし、K-1株はアラビノース、グルコースおよびマンノースを糖源とする培地では増殖できなかった。黄緑色蛍光色素の産生能については、*P. aeruginosa* IFO3080ではグルコース、マンノースおよびメリピオース以外で、*P. fluorescens* IFO3081はグルコースとマンノース以外の培地で産生がみられ、K-1株の場合は菌が増殖した全ての培地で黄緑色蛍光色素の産生も認められた。一方、静置培養では、当然のことながら、振とう培養より菌の増殖および色素の産生ともに遅かったが、5日間静置培養すると

表2-12. 糖源が増殖および黄緑色蛍光色素の産生に及ぼす影響

糖の種類	振とう培養			静置培養		
	A	B	C	A	B	C
	1 2	1 2	1 2	1 2 5	1 2 5	1 2 5 ← a
アラビノース	++	++	--	±++	±++	---
キシロース	++	++	-+	±±+	±±±	--±
ラムノース	++	++	±+	±++	±±+	±++
グルコース	-±	-±	--	--±	--±	---
フルクトース	++	++	±+	±++	±++	±++
マンノース	-±	-±	--	-±±	--±	---
スクロース	++	++	++	±++	±±+	±±+
トレハロース	++	++	-+	+++	±++	--±
マルトース	-+	++	++	-±+	±++	±++
メリビオース	-±	-+	++	-±+	-++	±++
ラクトース	++	++	±+	+++	±++	±±+
アドニット	++	++	±+	±++	±++	±±+
イノシット	++	++	±+	±++	±±+	±±+
ソルビット	++	++	±+	±++	±++	±±+
マンニット	++	++	++	±++	±++	±±+
ラフィノース	++	++	±+	±++	±++	±±+

a : 数字は30℃での培養日数

- ・供試菌 A ; *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080
B ; *Pseudomonas fluorescens* IFO3081
C ; *Pseudomonas fluorescens* Biovar V K-1

- ・供試菌の生育状況および黄緑色蛍光色素の産生状況を-、±、+であらわした。
- ; 増殖および色素の産生認めず
± ; 増殖のみ認める
+ ; 増殖および黄緑色蛍光色素の産生ともに認める

表2-13. 糖源が黄緑色蛍光色素の産生能に及ぼす影響

糖の種類	自然光下 ^a			紫外線照射下 ^b		
	A	B	C	A	B	C
アラビノース	3	1	0	2	2*	2*
キシロース	1	1	1	2*	2*	2*
ラムノース	3	3	2	3	3	3
グルコース	0	0	0	2*	2*	1*
フルクトース	3	3	1	3	2	2
マンノース	0	0	0	2*	2*	1*
スークロース	3	2	2	2	2	2
トレハロース	3	3	1	3	3	2*
マルトース	3	3	2	2	3	3
メリビオース	0	1	2	1*	1*	3
ラクトース	3	3	1	3	2	2*
アドニット	3	3	1	2	3	2*
イノシット	3	3	2	2	2	2
ソルビット	3	3	1	2	2	2*
マンニット	3	3	2	3	3	3
ラフィノース	3	3	1	2	2	2

a : 産生された蛍光色素の強度を 1 (弱い)、2 (中間)、3 (強い) の三段階であらわした。なお、蛍光色素が産生されない時は 0 とした。

b : 蛍光色素の強度は、自然光下と同様の方法であらわした。
また、産生された蛍光色素の色調が概ね青色の時は * 印で、概ね黄緑色の時は無印とした。

- ・ 供試菌 A ; *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080
- B ; *Pseudomonas fluorescens* IFO3081
- C ; *Pseudomonas fluorescens* Biovar V K-1

振とう培養 2 日目の増殖および色素産生レベルとほぼ同等であると考えられた。

つぎに、供試菌の蛍光色素産生能をより明確にするために、30℃・振とう培養 2 日目の培養液について、産生された蛍光色素の強度を自然光下および紫外線照射下で観察した結果を表 2-13 に示す。自然光下では蛍光色素が認められなかった糖源についても、紫外線を照射して観察すると、蛍光色素の産生が確認された。糖源の違いによる蛍光色素の産生レベルについては、糖の種類により差があるものの、総じて高級アルコール類では良好な蛍光色素の産生が認められた。自然光下および紫外線照射下で観察された蛍光色素の強度を総合的に判断すると、糖源としてはマンニットおよびラムノースが好ましいと考えられた。

1-2. 窒素源の検討

Pseudomonas sp. の黄緑色蛍光色素の産生に及ぼす窒素源の影響について検討した。

[実験方法]

[供試菌]

前項、1-1.と同じ

[試験方法]

レバン生成能試験用培地から硫化第一鉄を除き、糖源として蛍光色素の産生能が好ましかったマンニットを使用した培地を基本組成として、表 2-14 に示す 15 種類の窒素源を添加し試験培地とした。これに、前項と同様に供試菌を植菌して 30℃ 振とう培養し増殖および蛍光色素の産生を観察した。

[結果]

各培地を 30℃ で振とう培養した場合の供試菌の増殖と黄緑色蛍光色素の産生状況を表 2-15 に示す。何れの菌株についても、窒素源として L-アスパラギン、L-アルギニンおよび L-シスチンを用いると生育できなかつた。しかし、カザミノ酸、グルタミン酸ナトリウムおよびアスパラギン酸ナトリウムでは、良好な生育および蛍光色素の産生が認められた。他のアミノ酸では、生育は可能であるが蛍光色素が産生されない場合が多かつた。

つぎに、30℃ 振とう培養 2 日目の培養液について、産生された蛍光色素の強度を自

表2-14. 蛍光性 *Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の処方検討：窒素源の検討

原 材 料	配合量 ^b
窒素源 ^a	5.0
マンニット	10.0
リン酸水素二カリウム	3.2
リン酸二水素カリウム	0.6
塩化ナトリウム	1.0
硫酸マグネシウム	0.7

pH : 7.4

a : 供試した窒素源の種類

L-グルタミン	L-アスパラギン
L-アルギニン	L-オルニチン塩酸塩
L-バリン	L-イソロイシン
L-シスチン	L-システイン
L-チロシン	L-フェニルアラニン
L-トリプトファン	L-プロリン
カザミノ酸	
グルタミン酸ナトリウム	
アスパラギン酸ナトリウム	

b : 単位 ; g / 蒸留水 1 L

然光下および紫外線照射下で観察した結果を表2-16に示す。カザミノ酸、グルタミン酸ナトリウムおよびアスパラギン酸ナトリウムを窒素源とした場合、自然光下および紫外線照射下ともに良好な黄緑色蛍光色素の産生が認められ、中でもグルタミン酸ナトリウムを用いた培地での産生能が最も良好であった。一方、それら以外のアミノ酸では、供試菌の蛍光色素産生レベルは低く、観察された蛍光色素は何れもピオシアニンと推定される青色色素であった。

表2-15. 窒素源が増殖および黄緑色蛍光色素の産生に及ぼす影響

糖の種類	振とう培養						←a
	A		B		C		
	1	2	1	2	1	2	
L-グルタミン	-	±	-	-	-	-	
L-アスパラギン	-	-	-	-	-	-	
L-アルギニン	-	-	-	-	-	-	
L-オルニチン塩酸塩	+	+	±	+	±	±	
L-バリン	±	±	-	-	±	±	
L-イソロイシン	±	+	-	-	±	±	
L-シスチン	±	±	±	±	±	±	
L-システイン	-	-	-	-	-	-	
L-チロシン	±	±	-	±	±	±	
L-フェニルアラニン	-	±	-	±	±	±	
L-トリプトファン	-	±	±	+	±	±	
L-プロリン	+	+	±	±	±	±	
カザミノ酸	+	+	+	+	±	+	
グルタミン酸ナトリウム	+	+	+	+	+	+	
アスパラギン酸ナトリウム	+	+	+	+	±	+	

a : 数字は30℃での培養日数

- ・供試菌 A ; *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080
B ; *Pseudomonas fluorescens* IFO3081
C ; *Pseudomonas fluorescens* Biovar V K-1

・供試菌の生育状況および黄緑色蛍光色素の産生状況を-、±、+であらわした。

- ; 増殖および色素の産生認めず
- ± ; 増殖のみ認める
- + ; 増殖および黄緑色蛍光色素の産生ともに認める

表2-16. 窒素源が黄緑色蛍光色素の産生能に及ぼす影響

糖の種類	自然光下 ^a			紫外線照射下 ^b		
	A	B	C	A	B	C
L-グルタミン	0	0	0	0	0	0
L-アスパラギン	0	0	0	0	0	0
L-アルギニン	0	0	0	0	0	0
L-オルニチン塩酸塩	1	1	0	3*	3*	1*
L-バリン	0	0	0	2*	0	2*
L-イソロイシン	1	0	0	3*	1*	3*
L-シスチン	0	0	0	1	1*	1*
L-システィン	0	0	0	0	0	0
L-チロシン	0	0	0	2*	2*	2*
L-フェニルアラニン	0	0	0	1	3*	1*
L-トリプトファン	0	0	0	1	2*	1*
L-プロリン	1	0	0	2*	2*	2*
カザミノ酸	3	3	2	3	3	2
グルタミン酸ナトリウム	3	3	2	3	3	3
アスパラギン酸ナトリウム	3	3	2	3	3	2

a : 産生された蛍光色素の強度を1(弱い)、2(中間)、3(強い)の三段階で現した。なお、蛍光色素が産生されない時は0とした。

b : 蛍光色素の強度は、自然光下と同様の方法であらわした。
また、産生された蛍光色素の色調が概ね青色の時は*印で、概ね黄緑色の時は無印とした。

- ・ 供試菌 A ; *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080
- B ; *Pseudomonas fluorescens* IFO3081
- C ; *Pseudomonas fluorescens* Biovar V K-1

1-3. 無機塩類の検討

蛍光性 *Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の組成を決定するために、*Pseudomonas* sp. の黄緑色蛍光色素の産生に及ぼす無機塩類の影響を検討した。

[実験方法]

[供試菌]

本節、1-1.と同じ。

[試験方法]

レバン生成能試験養培地から硫化第一鉄を除き、糖類および窒素源として黄緑色蛍光色素の産生が好ましかったマンニットおよびグルタミン酸ナトリウムを用いた培地を基本組成として、表2-17に示すように、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウムおよび塩化ナトリウムの配合量を変え、これを試験培地とした。これに、本節、1-1.と同様に供試菌を植菌し、30℃振とう培養時における増殖および蛍光色素の産生を観察した。

[結果]

各培地を30℃で振とう培養した場合の供試菌の増殖と黄緑色蛍光色素の産生状況を表2-18および表2-19に示す。何れの培地でも、供試菌が活発に増殖し、明瞭な黄緑色蛍光色素の産生が認められた。

表2-17. 蛍光性 *Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の処方検討
：無機塩類の検討

原 材 料	配 合 量 ^a			
	Ex. No. 1	Ex. No. 2	Ex. No. 3	Ex. No. 4
マンニット	10.0	10.0	10.0	10.0
グルタミン酸ナトリウム	5.0	5.0	5.0	5.0
リン酸水素二カリウム	3.2	3.2	0.12	0.12
リン酸二水素カリウム	0.6	0.6	-	-
塩化ナトリウム	1.0	-	1.0	-
硫酸マグネシウム	0.7	0.7	0.7	0.7

pH : 7.4

a : 単位 ; g / 蒸留水 1 L

表2-18. 無機塩類が増殖および黄緑色蛍光色素の産生に及ぼす影響

供試菌	Ex. No. 1		Ex. No. 2		Ex. No. 3		Ex. No. 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2 ← a
<i>P. aeruginosa</i> IFO3080	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> IFO3081	+	+	±	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> Bio.V K-1	+	+	+	+	+	+	+	+

a : 数字は30℃での培養日数

- ・ 供試菌の生育状況および黄緑色蛍光色素の産生状況を－、±、＋であらわした。
 - －；増殖および色素の産生認めず
 - ±；増殖のみ認める
 - ＋；増殖および黄緑色蛍光色素の産生ともに認める

表2-19. 無機塩類が黄緑色蛍光色素の産生能に及ぼす影響

供試菌	自然光下 ^a				紫外線照射下 ^a			
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4 ← b
A	3	3	3	3	3	3	3	3
B	3	3	3	3	3	3	3	3
C	2	2	3	3	3	3	3	3

a : 産生された蛍光色素の強度を1(弱い)、2(中間)、3(強い)の三段階であらわした。なお、蛍光色素が産生されない時は0とした。

b : 数字はEx.No.

- ・ 供試菌 A ; *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080
 B ; *Pseudomonas fluorescens* IFO3081
 C ; *Pseudomonas fluorescens* Biovar V K-1

表2-20. 蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の配合処方

原 材 料	配合量 (g)
マンニトール	10.0
L-グルタミン酸ナトリウム	5.0
塩化ナトリウム	1.0
硫酸マグネシウム	0.7
リン酸水素二カリウム	0.12
寒天	15.0
蒸留水	1.0 L

pHを10%炭酸ナトリウム溶液にて7.4付近に調整。

1-4. 検出培地処方決定

蛍光性*Pseudomonas* sp. を迅速に検出でき、かつ工場での使いやすさの面から低コストでなるべく簡単な処方であることを念頭に、上記1～3の結果を参考にして蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の組成を以下の通り設定した。すなわち、レバン生成能試験用培地を基本組成として、黄緑色蛍光色素の産生を促進する炭素源としてマンニットを、窒素源としてグルタミン産ナトリウムを用い、無機塩類としてリン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムを配合した表2-20に示す培地を蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地とした。なお、寒天培地として使用するときには、本培地に寒天粉末を水1L当たり15g配合して調製することができる。

2. 蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の精度検定

蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地の蛍光性*Pseudomonas* sp. 検出の精度を、従来からの培地と比較することによって検討した。

[実験方法]

蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地と蛍光性*Pseudomonas* sp. の選択培地であるNACブイヨン(栄研化学㈱、東京)との検出精度の比較を以下の方法にて実施した。まず、各培地に表2-21に示す*Pseudomonas* sp. 6株の懸濁液を接種し、30℃で

振とう培養を開始した。そして、48時間後に、各培地における*Pseudomonas* sp. の増殖および蛍光色素産生について比較した。なお、*Pseudomonas* sp. 懸濁液は、肉エキス液体培地にて30℃・24時間振とう培養した培養液を滅菌水にて10⁵倍希釈して調製し、培地10ml当たり0.02mlを植菌した。

つぎに、食品工場から頻繁に検出される10菌株(表2-22)について、簡易試験用寒天培地と*Pseudomonas* sp. 用培地であるキングA、キングBおよびNAC寒天培地(何れも栄研化学(株)、東京)とを比較した。すなわち、供試菌株の中で、乳酸菌にはMRSブイヨンを用い、それ以外の菌株については肉エキス液体培地を用い、30℃で24時間前培養した培養液を各試験培地平板に画線塗抹し、30℃・48時間培養した時の生育状況および蛍光色素産生能を観察した。

[結果]

簡易試験用液体培地とNACブイヨンとの*Pseudomonas* sp. の検出精度について、表2-21に示す。簡易試験用培地では、供試した*Pseudomonas* sp. の全てがよく増殖

表2-21. 蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用液体培地における
Pseudomonas sp. の増殖および蛍光色素の産生能

供 試 菌	試験用液体培地 ^a		NACブイヨン	
	生育	色素 ^b	生育	色素 ^b
<i>P. fluorescens</i> Biovar V K-1	+	+ ^d	+	-
<i>P. aeruginosa</i> IFO3080	+	+ ^d	+	+ ^d
<i>P. fluorescens</i> IFO3081	+	+ ^d	-	- ^e
<i>P. fragi</i> IFO3458	+	-	-	-
<i>P. putida</i> IFO3738	+	-	+	-
<i>P. stutzeri</i> K103 ^c	+	-	-	-

+ : 陽性 - : 陰性

a : 蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用液体培地

b : 肉眼にて確認できる蛍光色素

c : 市販蒲鉾分離菌

d : 黄緑色蛍光色素

e : 30℃培養・4日目には蛍光色素の産生を観察

表2-22. 蛍光性 *Pseudomonas* sp. 検出用寒天培地における *Pseudomonas* sp. の増殖および蛍光色素の産生能

供 試 菌	キングA培地		キングB培地		NAC寒天培地		試験用寒天培地 ^a	
	生育	色素 ^b	生育	色素 ^b	生育	色素 ^b	生育	色素 ^b
<i>Bacillus cereus</i> OJT8032	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> PCI219	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Micrococcus flavus</i> OJT8276	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K-12 IFO3301	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Citrobacter freundii</i> IFO12681	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> IFO12529	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biovar V K-1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3080	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO3081	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>Pseudomonas fragi</i> IFO3458	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas putida</i> IFO3738	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> K103 ^c	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> H28 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO0203	-	-	-	-	-	-	+	-

+: 陽性 -: 陰性

^a: 蛍光性 *Pseudomonas* sp. 簡易試験用寒天培地

^b: 肉眼して確認できる蛍光色素

^c: 蒲鉾分離菌

^d: ロースハム分離菌

し、*P. aeruginosa* および *P. fluorescens* 2 菌株の合計 3 菌株にピオベルジンと推定される黄緑色蛍光色素が観察された。一方、NACブイオンでは、*P. aeruginosa*、K-1株および *P. putida* の 3 菌株のみ増殖し、蛍光色素の産生も *P. aeruginosa* に認められたのみであった。従って、簡易試験用培地は、NACブイオンと比較して、生育程度や蛍光色素であるピオベルジン産生能は優っており、かつ培地の色調が調製時は無色透明(NACブイオンは透明ではあるが褐色を呈している。)であることより、蛍光色素の判定がNACブイオンより観察しやすいことなど簡易試験用培地として優れていると考えられる。

つぎに、キングA、キングBおよびNAC寒天培地との比較結果を表2-22に示す。簡易試験用寒天培地では、供試した16菌株の中で、乳酸菌2株と *S. aureus* 以外の株に増殖が認められた。しかし、蛍光色素の産生が観察されたのは、蛍光色素産生能を有する蛍光性 *Pseudomonas* sp. の 3 菌株のみであり、蛍光性 *Pseudomonas* sp. 以外の *Pseudomonas* sp. および他の菌株では、蛍光色素は認められなかった。従って、簡易試験用寒天培地の蛍光性 *Pseudomonas* sp. を識別する能力は、キングAおよびキングB培地や蛍光性 *Pseudomonas* sp. の選択培地であるNAC寒天培地にも劣らず、優れていると考えられる。

3. 考察

本章、第1節にて *P. fluorescens* の詳細同定の一環として実施したレバン生成能試験の過程で、レバン生成能試験用培地に *P. fluorescens* の黄緑色蛍光色素であるピオベルジン産生能があることを偶然発見した。この際、本培地の糖源をスクロースとした時は鮮やかな黄緑色蛍光色素が観察されたが、糖源にグルコースを用いると色素は産生されなかった。そこで、本培地の糖源や窒素源等を考慮することによって、黄緑色蛍光色素の産生能をさらに向上させた場合、蛍光性 *Pseudomonas* sp. の検出に用いることができる可能性が考えられる。代表的な蛍光性 *Pseudomonas* sp. 検出用の培地として、NACブイオン、キングA、キングBおよびNAC寒天培地等が知られている。しかしながら、何れの培地も問題点を有しており、必ずしも満足して使用されていない。NACブイオンは、最も優れた培地といわれているが、現在市販されておらず、実験者が調製しなければならないが、ウシ心臓浸出液等を含み組成が複雑であり

調製が面倒である。また、ペプトンを含むため色調が黄褐色であり、黄緑色蛍光色素の産生判定が自然光下では難しい。また、キングAおよびキングB培地については、色素産生の判定に約6日間の培養が必要とされており、工場などの製造現場で迅速な判定が必要な時は不向きである、これらの問題点を解決できるような培地として蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地を開発した²⁷⁾。

蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地は、NACブイヨンより蛍光色素産生力が優れており、かつ培地が無色透明であるため僅かな色素産生でも判定が可能であった。また、蛍光性*Pseudomonas* sp. 以外の*Pseudomonas* sp. や他の菌種では蛍光色素はまったく検出されず、色素産生の判定が培養開始1~2日で可能であり、実際の製造行程などの拭き取り試験で予想される他菌種が共存する場合も利用可能と推定される。さらに、培地処方が簡単であり調製しやすいなど、簡易法として優れていると考えられる。従って、蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地は、水産練製品工場内の低温変敗菌(蛍光性*Pseudomonas* sp. 等)の汚染状況検査などに充分応用できると考えられる。

第5節 蒲鉾製造工程の微生物汚染状況

市販蒲鉾から検出された*Pseudomonas* sp. (第3節参照)の由来を検討する一環として、蒲鉾製造工程の拭き取り試験を実施した。さらに、工程から検出分離された*Pseudomonas* sp. を用いて、蒲鉾の軟化再現実験を行った。

1. 蒲鉾製造工程の拭き取り試験と検出菌の同定

[実験方法]

某社の蒲鉾製造工程について、表2-23に示す9箇所(箇所)の拭き取り試験を実施した。まず、無菌綿棒により試験部位の約10cm²を拭き取り、その綿棒で蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用寒天培地に画線塗抹して、30℃で48時間培養した。また、拭き取った綿棒を簡易試験用液体培地(10ml)に投入し、30℃で24時間振とう培養した。培養後、平板培地については、形成されたコロニーの周囲の培地が黄緑色になり、かつ蛍光を発している検体を蛍光性*Pseudomonas* sp. 陽性とした。また、液体培地では、培地が黄緑色に着色され蛍光を発している検体を蛍光性

Pseudomonas sp. 陽性とした。さらに、平板培地に形成された周囲に黄緑色の蛍光を伴うコロニーを分離培養し、駒形の方法²³⁾に従って属レベルでの同定を実施した。

[結果および考察]

蒲鉾製造工程における蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地を用いた拭き取り試験結果と分離菌の同定結果を表2-23に示す。蒲鉾の原材料であるスケトウダラすり身から最終工程の冷却機まで9箇所について調べたところ、蒲鉾蒸し機の内部を除いて、全ての工程から蛍光性*Pseudomonas* sp. が認められ、検出したコロニーの同定結果からも*Pseudomonas* sp. であることが確認された。このことは、低温流通における主要な軟化変敗原因菌である*Pseudomonas* sp. が、蒲鉾製造工程には普遍的に常在していることを裏づける結果となった。特に、蒲鉾蒸し機出口以降の冷却機および冷却機出口付近に存在する*Pseudomonas* sp. は二次汚染の原因菌と推定され、市販蒲鉾から分離した蛍光性*Pseudomonas* sp. との関係が深いと考えられる。

表2-23. 蒲鉾製造行程における蛍光性*Pseudomonas* sp. の汚染状況

製造行程	蛍光色素 ^a		分離菌同定結果
	液体培地	寒天培地	
原料すり身 ^b	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c
カッターの内部	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c
カッターの床	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c
成形機の内部	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c
蒸し機の内部	-	-	
蒸し機出口部分のドリップ	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c
蒸し機出口付近の床	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c
冷却機の内部	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c
冷却機出口付近の床	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. ^c

a : 蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地を用い、肉眼にて蛍光色素の産生を判定した。

b : アラスカパック

c : 同定試験結果 ; グラム染色 : 陰性、形態 : 桿菌、芽胞形成 : 陰性
運動性 : 陽性、カタラーゼ : 陽性、オキシダーゼ : 陽性
OFテスト : O型

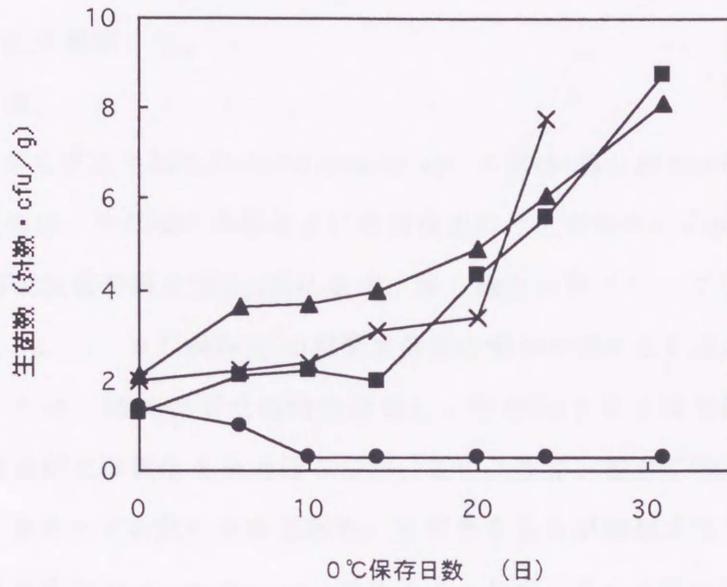


図2-10. 蒲鉾製造工程から分離した*Pseudomonas* sp. による
蒲鉾軟化再現試験
: 0°C保存中における蒲鉾の生菌数変化

- : 蒸し機出口部ドリップからの分離菌
- : 蒸し機出口部付近の床からの分離菌
- ▲ : 冷却機の内部からの分離菌
- × : 冷却機出口付近の床からの分離菌

2. 検出菌による蒲鉾軟化の再現実験

[実験方法]

蒲鉾製造工程から分離した*Pseudomonas* sp. 4 菌株を用いて、本章、第2節と同様にスライス蒲鉾に分離菌懸濁液を塗布した後、0℃に保存して生菌数変化および軟化変敗の発生状況を観察した。

[結果および考察]

蒲鉾製造工程から検出された*Pseudomonas* sp. 4 菌株(蒸し機出口部ドリップ、蒸し機出口部付近の床、冷却機の内部および冷却機出口付近の床からの検出菌)による蒲鉾の軟化変敗再現実験結果を図2-10に示す。蒸し機出口部ドリップから検出された*Pseudomonas* sp. は、0℃保存で30日間生菌数の増加が認められなかったが、その他の菌株については、蒲鉾表面で活発に増殖し、保存30日目には生菌数が 10^8 オーダー/gを越え、最終的には軟化を引き起こした。このように、製造工程から分離した菌株についても、蒲鉾上での軟化変敗起因性に差があることが確認された。これらの菌株は、何れも蛍光性*Pseudomonas* sp. であることから、この変敗起因性の差は、本章、第2節で考察したように各株のプロテアーゼ活性の差に起因する可能性が強いと推定される。

第6節 包装蒲鉾の汚染メカニズム

市販蒲鉾の軟化変敗原因菌となった*Pseudomonas* sp. は、蒲鉾の二次汚染菌と考えられる。すなわち、蒸し機以降の工程に存在する*Pseudomonas* sp. が、何らかの方法で蒲鉾を汚染し、低温保存中に増殖して変敗に至ったと推察される。そこで、包装蒲鉾の汚染経路について検討した。

[実験方法]

[供試菌]

軟化蒲鉾から分離同定した*P. fluorescens* Biovar V K-1(K-1株)と表2-10に示したB社製蒲鉾からの分離菌である*Leuconostoc* sp. およびF社製の蒲鉾から分離した*Micrococcus* sp. の合計3菌株を用いた。

[細菌汚染モデル試験]

殺菌したアルミ製トレイ(25.5×35cm)の底に滅菌ガーゼを1枚敷いて、供試菌懸

濁液20mlを滴下しガーゼを均一に湿らせた。このガーゼの上に、予め90℃で20分間のスチーム加熱にて殺菌した蒲鉾(化粧包装を除去した折込包装蒲鉾またはリテーナ成形蒲鉾)20個を、板を下にした状態で2分間静置した。そして、滅菌済みステンレス網上に蒲鉾を置いて1時間放置した後、10℃に30日間保存し、供試菌の蒲鉾表面への侵入の有無と蒲鉾の変敗状況を調べた。すなわち、30日間保存した蒲鉾のフィルムを無菌的に剥ぎ、蒲鉾表面全体を無菌綿棒で拭き取った。この綿棒を、K-1株区は蛍光性*Pseudomonas* sp. 簡易試験用培地に、*Micrococcus* sp. 区では標準寒天培地に、そして*Leuconostoc* sp. の場合はBCP加プレートカウント寒天培地上に画線塗抹した後、さらに各々同培地での混釈培養を実施した。そして、30℃にて48時間培養した後、画線平板および混釈培養平板のコロニー出現の有無を調べた。コロニーが形成された場合、その形態および顕微鏡での観察により、供試菌か否かを確認し、菌侵入の有無と侵入率(侵入個数/試験蒲鉾個数)を算出した。また、10℃保存・30日目における蒲鉾変敗の有無を目視観察し、変敗率(変敗個数/試験蒲鉾個数)を求めた。なお、供試菌懸濁液は、K-1株および*Micrococcus* sp. については肉エキス液体培地で、*Leuconostoc* sp. の場合はMRSブイヨンにて30℃で24時間培養した培養液を生理食塩水で希釈して調製し、 10^2 オーダー/mlおよび 10^5 オーダー/mlの菌液を供試した。

[結果および考察]

包装蒲鉾への供試菌の侵入実験結果を表2-24に示す。10℃で30日間保存した蒲鉾への供試菌の侵入率はK-1株が折込包装蒲鉾では93%、リテーナ成形蒲鉾では70%と他の2株よりも有意に高く、次いで*Leuconostoc* sp.、*Micrococcus* sp.の順となり、*Leuconostoc* sp.と*Micrococcus* sp.とでは大差はなかった。この際、当然ながら、ガーゼへの汚染菌数が多いほど侵入率は高くなった。また、包装形態別の侵入率では、K-1株の場合、折込包装の方がリテーナ成形蒲鉾より高かったが、*Leuconostoc* sp.および*Micrococcus* sp.区では、逆にリテーナ成形蒲鉾に侵入しやすかった。この相違の要因として、蒲鉾の包装方法と供試菌の菌形および運動性の差などが推定される。リテーナ成形蒲鉾の板および小口側は、KIC-PP包装で二重に折込まれているので、間隙は小さく菌は侵入しづらいと考えられる。一方、折込包装蒲鉾の場合、一重折込みであり、未シール部が存在すると菌は比較的容易に侵入できると推定される。従って、*Leuconostoc* sp.や*Micrococcus* sp.のような球菌で、K-1株より菌体が小さく

表2-24. 蒲鉾の細菌汚染モデル実験結果
 : 各供試菌の蒲鉾への侵入率と蒲鉾の変敗率

供試菌	包装形態	蒲鉾への侵入率 (%)		蒲鉾の変敗率 (%)	
		5.0×10^2	5.0×10^5	5.0×10^2	5.0×10^5
K-1株	折込包装	53	93	27	33
	リテーナ形成	50	70	10	40
<i>Micrococcus</i> sp.	折込包装	6	27	0	0
	リテーナ形成	30	50	0	0
<i>Leuconostoc</i> sp.	折込包装	13	47	0	0
	リテーナ形成	30	50	10	0

かつブドウ球菌の如く塊りを形成せずバラバラに存在する場合を考えると、リテーナ成形蒲鉾での侵入方法は、毛細管現象と菌のブラウン運動の要因が強いと推定される。また、折込包装蒲鉾の場合は、K-1株のような運動性を持つ菌のペン毛による前進侵入の要因が大きく関与していると推察される。

つぎに、保存後の変敗発生状況については、*Micrococcus* sp. では全く変敗が認められず、*Leuconostoc* sp. 区も僅かに粘質物を伴った変敗が発生したのみであり、変敗の中心はK-1株による軟化変敗で、3～4割の蒲鉾に発生がみられた。これは、蒲鉾への侵入率や菌の低温での増殖能に相関すると考えられるが、侵入率よりも変敗率の方がはるかに低い点については、K-1株の蒲鉾表面への侵入日時に差があり、30日間の保存中に変敗に至るまではに増殖できなかったケースが推定される。

これらの結果より、従来二次汚染による変敗はないと考えられていたリテーナ成形蒲鉾にも菌の侵入による変敗が確認されたので、市販のリテーナ成形蒲鉾(K、L、MおよびNの4社、表2-9)を用いて、K-1株の侵入モデル試験を行った。10℃で20日および30日間保存した蒲鉾のK-1株の侵入率および軟化変敗発生状況を表2-25に示す。その結果、何れのメーカーの蒲鉾でもK-1株の侵入が可能であり、保存期間が長くな

表2-25. 市販リテーナ成形蒲鉾の細菌汚染モデル実験結果
 ; K-1株のリテーナ成形蒲鉾への侵入率と蒲鉾の変敗率

供試蒲鉾	蒲鉾への侵入率 (%)		蒲鉾の変敗率 (%)	
	20日目	30日目	20日目	30日目
K社製蒲鉾	55	80	25	40
L社製蒲鉾	45	60	25	40
M社製蒲鉾	87	87	73	73
N社製蒲鉾	40	70	5	20

ると侵入率は上昇し、30日間の保存によって、60~87%の割合で侵入し、蒲鉾に黄緑色の蛍光色素の産生を伴う軟化変敗を発生させた。この蛍光色素の産生部位から、菌の侵入は小口および板側の折込み部であることが確認できた。菌の侵入率が保存期間と関連しているのは、K-1株がこれらの折込み部より自らの運動性に基づいて少しずつ前進侵入していくためと推定される。また、製品により侵入率が大きく異なるのは、折込み部の密着度合がメーカーによって異なるためと考えられる。

従来、加熱工程以降の二次汚染については、包装までの工場内での落下菌が主な原因であると考えられてきた。特に、リテーナ成形蒲鉾では、*Bacillus* sp.などの耐熱性芽胞菌のみによる変敗で、二次汚染はほとんど意識されなかったのが現状である。しかし、本実験の結果から、加熱工程以降において、蒲鉾包装フィルム折込み部からの細菌の侵入汚染の可能性が確認された。これは、新しい知見であり、特に低温保存蒲鉾において蛍光性*Pseudomonas* sp.などによる軟化変敗を防止する観点からも重要かつ注意が払われるべきことである。

第7節 蒲鉾および製造工程より分離した*Pseudomonas* sp.のプロテアーゼ産生能

市販蒲鉾より分離した*Pseudomonas* sp.と蒲鉾製造工程より検出した*Pseudomonas* sp.について、プロテアーゼ産生能を調べ、種名との関連を検討した。

表2-26. 二層平板寒天培地の組成

上層部分	標準寒天培地 ^a	
下層部分	I : スキムミルク ^b	40 g
	蒸留水	1 L

	pH 7.0	
	II : 寒天	30 g
	蒸留水	1 L

	pH 7.0	

a : 日水製薬(株)

b : 雪印乳業(株)、100g中の配合組成は以下の通り。

たん白質 : 34.8g、脂肪 : 0.8g、糖質 : 52.4g

灰分 : 8.0g、水分 : 4.0g

IおよびIIを別々に滅菌した後、液温が50~60℃の時に混合し、シャーレに分注する。固化後、標準寒天培地を重層して二層平板培地を調製した。

[実験方法]

[供試菌]

市販蒲鉾および蒲鉾製造工程から分離した*Pseudomonas* sp. 50菌株(表2-27-1および表2-27-2)を用いた。

[プロテアーゼ活性の測定]

二層平板寒天培地を用いたプロテアーゼ活性の測定²⁸⁾を以下の通り実施した。すなわち、二層平板寒天培地に滅菌したペーパーディスク(直径 : 5 mm、ADVANTEC)を1枚のせ、これに供試菌培養液100μlを滴下した。この平板培地を30℃および10℃で培養した時に形成されるクリアゾーンの直径を経日毎に測定した。なお、用いた二層平板寒天培地は、表2-26に示すように、上層部が標準寒天培地で下層部分がスキムミルク(雪印乳業(株)、東京)を含む寒天よりなる二層培地である。また、供試菌培養

液は、各供試菌一白金耳を接種したブレインハートインフュージョン液体培地(栄研化学株、東京)を30℃で24時間振とう培養して調製した。

[*Pseudomonas* sp. の種名同定]

前項でのプロテアーゼ活性測定結果より、プロテアーゼ活性の強い菌株と弱い(活性陰性株を含む)菌株を各々10菌株ずつ選び、それら*Pseudomonas* sp. の種名同定を本章、第1節の方法に準じて実施した。

[結果および考察]

蒲鉾および製造工程より分離した*Pseudomonas* sp. について、二層平板寒天培地に形成されたクリアゾーン直径の経日変化を表2-27-1および表2-27-2に示す。供試した*Pseudomonas* sp. 50菌株中、蒲鉾からの8菌株(K-42、K-69、K-76、K-80、K-89、K-102、K-103、K-124)と製造工程からの分離菌2菌株(K-64およびK-67)の合計10菌株が6日間の培養期間内にクリアゾーンが形成されず、プロテアーゼ陰性株と考えられた。一方、他の菌株ではクリアゾーンが形成された。その中でも、K-19およびK-31が、10℃培養で1日目に10mm以上のクリアゾーンが形成され、低温でも活発なプロテアーゼ産生能が示された。これらの結果より、プロテアーゼの活性レベルには、菌株により大きな差があることが認められた。そこで、プロテアーゼ活性の強い菌株と弱い菌株を選択し、それぞれの種名を同定した。プロテアーゼ活性の強い菌株としては、30℃培養1日目に直径が20mm以上のクリアゾーンを形成した菌株であるK-19、K-31、K-46、K-66、K-68、K-75、K-77、K-81、K-82およびK-88を用いた。これらの菌株は10℃においても活発にプロテアーゼを産生した。また、活性が弱い菌株あるいは活性を示さない株として、K-64、K-67、K-69、K-76、K-80、K-89、K-92、K-102、K-103およびK-124を供試した。これらの菌株の種名同定結果を表2-28に示す。プロテアーゼ活性の強い*Pseudomonas* sp. は、何れも*P. fluorescens* と同定された。一方、活性が弱いか活性を持たない*Pseudomonas* sp. の場合、5菌株が*P. putida* と、4菌株が*P. stutzeri* に、そして1菌株が*P. fluorescens* とそれぞれ同定された。

以上の結果より、市販蒲鉾および製造工程から検出された*Pseudomonas* sp. の大部分はプロテアーゼ活性が陽性菌であり、蒲鉾への*Pseudomonas* sp. 汚染は軟化を伴う変敗に至る可能性が高いと考えられる。また、*P. fluorescens* の場合、プロテアー

表2-27-1. *Pseudomonas* sp. のプロテアーゼ活性 (その1)
: 二層平板培地でのクリアゾーン測定値

菌株	分離源	クリアゾーンの直径 (mm)					
		30℃			10℃		
		1日目	2日目	3日目	1日目	3日目	6日目
K-1	軟化蒲鉾	20	29	37	0	24	38
K-8	α社: 製造行程-1	17	25	34	0	0	24
K-12	α社: 製造行程-2	19	27	34	0	16	23
K-18	α社: 製造行程-3	20	29	36	0	25	39
K-19	α社: 製造行程-4	21	29	37	12	27	40
K-29	α社: 製造行程-5	16	22	28	0	17	28
K-31	β社: 蒲鉾-1	19	27	35	13	26	38
K-42	β社: 蒲鉾-2	0	0	0	0	0	0
K-46	γ社: 蒲鉾	19	27	35	0	23	37
K-47	γ社: 蒲鉾	16	25	32	0	23	36
K-49	γ社: 蒲鉾	15	22	27	0	24	36
K-50	γ社: 蒲鉾	14	22	27	0	20	33
K-52	δ社: 蒲鉾	14	18	23	0	19	31
K-55	δ社: 蒲鉾	15	22	29	0	19	34
K-60	ε社: 蒲鉾-1	18	24	30	0	22	32
K-61	ε社: 蒲鉾-2	19	28	34	0	22	33
K-62	ζ社: 蒲鉾	19	29	36	0	23	36
K-63	η社: 蒲鉾	16	23	30	0	21	32
K-64	θ社: 製造行程-1	0	0	0	0	0	0
K-65	θ社: 製造行程-2	18	27	35	0	19	30
K-66	θ社: 製造行程-3	21	30	37	0	25	39
K-67	θ社: 製造行程-4	0	0	0	0	0	0
K-68	ι社: 蒲鉾	20	30	37	0	25	38
K-69	κ社: 蒲鉾-1	0	0	0	0	0	0
K-75	λ社: 蒲鉾	24	34	42	0	22	33

表2-27-2. *Pseudomonas* sp. のプロテアーゼ活性 (その2)
: 二層平板培地でのクリアゾーン測定値

菌株	分離源	クリアゾーンの直径 (mm)					
		30℃			10℃		
		1日目	2日目	3日目	1日目	3日目	6日目
K-76	μ社: 蒲鉾-1	0	0	0	0	0	0
K-77	ν社: 蒲鉾	20	29	37	0	25	38
K-78	κ社: 蒲鉾-2	18	24	31	0	18	28
K-79	ξ社: 蒲鉾	0	0	19	0	16	25
K-80	ο社: 蒲鉾-1	0	0	0	0	0	0
K-81	π社: 蒲鉾-1	25	35	41	0	24	37
K-82	ρ社: 蒲鉾-1	23	34	42	0	25	39
K-84	σ社: 蒲鉾	22	31	39	0	23	34
K-85	τ社: 蒲鉾	22	33	39	0	22	34
K-87	υ社: 蒲鉾	0	17	22	0	17	28
K-88	φ社: 蒲鉾	23	32	40	0	24	38
K-89	ρ社: 蒲鉾-2	0	0	0	0	0	0
K-90	π社: 蒲鉾-2	0	16	21	0	23	36
K-91	χ社: 蒲鉾	22	30	38	0	20	32
K-92	ψ社: 蒲鉾	0	0	0	0	0	18
K-93	β社: 蒲鉾-3	16	21	25	0	18	27
K-94	β社: 蒲鉾-4	23	32	41	0	23	37
K-95	ο社: 蒲鉾-2	14	19	24	0	0	0
K-102	κ社: 蒲鉾-3	0	0	0	0	0	0
K-103	κ社: 蒲鉾-4	0	0	0	0	0	0
K-121	β社: 蒲鉾-5	18	26	34	0	23	38
K-122	β社: 蒲鉾-6	18	22	34	0	18	32
K-124	μ社: 蒲鉾-2	0	0	0	0	0	0
K-131	β社: 製造工程-1	12	21	34	0	18	31
K-132	β社: 製造工程-2	17	28	36	0	21	34

表2-28. *Pseudomonas* sp. の種名同定結果

プロテアーゼ活性	菌 株	同定結果
強 い	K-19、K-31、K-46、K-66	<i>P. fluorescens</i>
	K-68、K-75、K-77、K-81	
	K-82、K-88	
弱 い	K-69、K-80、K-89、K-92	<i>P. putida</i>
	K-124	
or 陰 性	K-64、K-67、K-76、K-103	<i>P. stutzeri</i>
	K-102	<i>P. fluorescens</i>

ゼ活性が強く、また一般的に低温での増殖性も良好であることより、軟化変敗の主要菌群となるのであろう。

第3章 蒲鉾表面での*Pseudomonas* sp.の増殖について

包装蒲鉾での新しいタイプの変敗(黄緑色蛍光を伴う液状軟化変敗)の原因菌として、*P. fluorescens* Biovar V K-1を前章に示したように分離同定した⁴⁾。本菌株は、蒲鉾表面で、低温でも良好に増殖し軟化を起こす。一方、同じ*P. fluorescens* 属の細菌であっても、*P. fluorescens* IFO3081は、蒲鉾上で全く増殖しない。この相違は、両株のプロテアーゼの生産性によるものである。つまり、プロテアーゼ陰性である*P. fluorescens* IFO3081では、プロテアーゼによって増殖に必要な低分子の窒素(N)源を調製できないために増殖不可であると推察している。そこで、蒲鉾に微生物が利用できる低分子のN源を配合した場合の*P. fluorescens* IFO3081の増殖について検討した。また、プロテアーゼ活性と増殖との関係を探る一環として、*P. fluorescens* Biovar V K-1が産生するプロテアーゼの活性を低下させる物質を検索し、これを配合した蒲鉾での*P. fluorescens* Biovar V K-1の増殖について調べた。

第1節 低分子N源が増殖に及ぼす影響

蒲鉾に低分子N源であるペプトンを添加した時の*P. fluorescens*の増殖について検討した。

[実験方法]

[供試菌]

モデル蒲鉾上での増殖が不可能であった*P. fluorescens* IFO3081(以下、IFO株とする。)を用いた。

[蒲鉾の調製方法]

表3-1に示す処方にて、サイレントカッターを用いて調製した蒲鉾練肉を、折径7cmの塩化ビニリデン系ケーシングに充填した。これを、40℃の湯浴にて1時間坐らせた後、90℃で1時間ボイル加熱して蒲鉾に仕上げた。冷却後、ケーシングを除去し、無菌的に蒲鉾を厚さ15mmに切断した。このスライス蒲鉾の片面に、供試菌懸濁液を接種した後、10℃に保存して経日生菌数変化を標準寒天培地を用いた混釈法により測定した。蒲鉾には、低分子N源が供試菌の増殖に及ぼす影響を調べるために、ポリペプトン(日水製薬株、東京)を上乗せ添加で配合した。なお、供試菌懸濁液は、供試菌

表3-1. 蒲鉾の配合処方

原 材 料	配合量 (%)
助宗無塩すり身(SA級)	63
馬鈴薯澱粉	3
食塩	2
砂糖	2
水	30

を普通ブイヨンにて30℃で24時間振とう培養した培養液を、無菌水にて 10^5 倍希釈して調製し、50 μ lを蒲鉾スライス面に滴下し滅菌したコンラージ棒を用いて塗布した。

[結果および考察]

10℃保存中における蒲鉾表面でのIFO株の生菌数の変化を図3-1に示す。ポリペプ

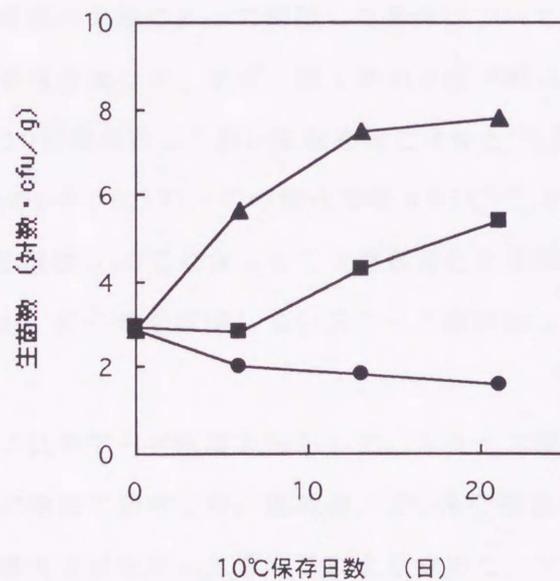


図3-1. ペプトンが添加された蒲鉾表面でのIFO株の経日生菌数変化

● : 0%、■ : 1%、▲ : 5%

トン無添加区では、IFO株は20日間の保存中に生菌数の増加は一切認められなかった。一方、ポリペプトン添加区では、経日的なIFO株の増殖がみられ、保存20日目にはポリペプトンが1%添加の場合 3.1×10^5 cfu/gに、また、5%添加では 5.2×10^7 cfu/gにまでそれぞれ達するという活発な増殖がみられた。すなわち、IFO株は、N源がすり身の場合のみでは、菌体外プロテアーゼを持たないために、増殖に必要なN源を調達できず増殖しなかったが、微生物が利用しやすい低分子N源を豊富に含むポリペプトンの添加により、増殖に必要なN源が調達され増殖が可能になったと考えられる。

第2節 プロテアーゼ処理が増殖に及ぼす影響

プロテアーゼ処理を施して、低分子N源を豊富に存在させて作った蒲鉾上における *P. fluorescens* の増殖を検討した。

〔実験方法〕

〔供試菌〕

P. fluorescens Biovar V K-1(以下、本章ではK-1株とする。)とモデル蒲鉾上で増殖が不可能である *P. fluorescens* IFO3081(IFO株)を用いた。

〔プロテアーゼ処理蒲鉾の調製方法〕

本章、第1節と同様の方法によって調製した蒲鉾について、以下に示す二通りの方法でプロテアーゼ処理を施した。まず、第1節の方法に準じK-1株を植菌したスライス蒲鉾を、10℃に10日間保存して軟化変敗を起こさせた(生菌数： 2.2×10^9 cfu/g、10%ホモジネイトのpH：6.17)。この軟化蒲鉾を95℃で90分間加熱してK-1株を殺菌した後、IFO株を接種し10℃に保存して生菌数変化を標準寒天培地を用いた混釈法にて測定した。なお、K-1株を植菌しないスライス蒲鉾についても同様に処理して対照区とした。

つぎに、第二のプロテアーゼ処理方法として、スライス蒲鉾に市販プロテアーゼ製剤を滅菌コンラージ棒にて塗布した。風乾後、IFO株を植菌し10℃保存中における生菌数の変化を標準寒天培地を用いた混釈法により求めた。プロテアーゼ製剤には食品添加物であるバイオプラーゼSP-4(プロテアーゼ：4%、炭酸カルシウム：20%、食品素材：76%、ナガセ生化学工業(株)、東京)を用いた。この2.5%水溶液50 μ lをスライス蒲鉾に塗布した。なお、バイオプラーゼの代わりに滅菌水を塗布した蒲鉾を対照

区とした。

[結果および考察]

10℃保存中のプロテアーゼ処理蒲鉾上におけるIFO株の生菌数変化を図3-2に示す。まず、K-1株を増殖させ、十分に軟化変敗が起った蒲鉾では、IFO株の増殖が可能となり、10℃保存・20日目には生菌数は 4.3×10^7 cfu/gに達した。また、滅菌水を塗布した蒲鉾では、IFO株の増殖はみられなかった。しかし、バイオプラーゼ塗布蒲鉾ではIFO株の増殖が開始され、10℃保存・20日目で 8.6×10^7 cfu/gに増殖した。すなわち、K-1株による軟化変敗が生じた蒲鉾およびプロテアーゼ処理蒲鉾上ではIFO株の増殖が可能となることが示された。これは、前者ではK-1株産生の菌体外プロテアーゼによって、後者ではバイオプラーゼによって蒲鉾の蛋白質が低分子化され、IFO株は、それらをN源として利用し増殖したと考えられる。

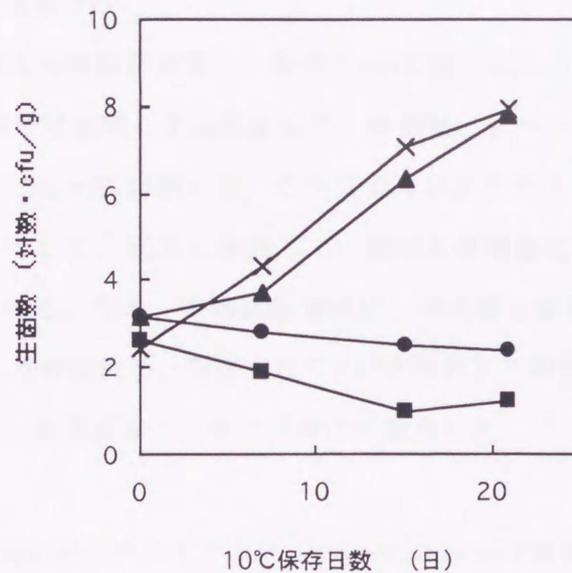


図3-2. プロテアーゼ処理蒲鉾におけるIFO株の経日生菌数変化

- ▲ : K-1株植菌 → 軟化 → 加熱処理 → IFO株植菌
- : K-1株未植菌 → 加熱処理 → IFO株植菌
- × : バイオプラーゼ塗布 → IFO植菌
- : 滅菌水塗布 → IFO株植菌

第3節 各種粉末たん白が増殖に及ぼす影響

加工食品に多用されている粉末たん白類である卵白、乳たん白、大豆たん白および牛血漿たん白が*P. fluorescens* の増殖に及ぼす影響について検討した。

1. 粉末たん白ゲル上での増殖

粉末たん白類の加熱ゲル上での*P. fluorescens* の増殖を調べた。

[実験方法]

[試料]

粉末たん白として卵白、乳たん白、大豆たん白および牛血漿たん白(何れも日本新薬株扱い)を用いた。

[供試菌]

前節と同じく*P. fluorescens* Biovar V K-1(K-1株)および*P. fluorescens* IFO3081(IFO株)を用いた。

[粉末たん白ゲルの調製方法]

各粉末たん白の15%水溶液を調製し、折径7cmの塩化ビニリデン系ケーシングに充填して、75℃で30分間加熱しゲル化させた。冷却後、ケーシングを除去し、無菌的にたん白ゲルを厚さ15mmに切断した。このスライスゲルのスライス片面に、供試菌懸濁液を接種した。そして、10℃に保存して、経日生菌数変化を標準寒天培地を用いた混釈法により測定した。なお、供試菌懸濁液は、供試菌を普通ブイヨンにて30℃で24時間振とう培養した培養液を、無菌水にて 10^5 倍希釈して調製した。この50 μ lをゲルスライス面に滴下し滅菌済みコンラージ棒にて塗布した。

[結果]

10℃保存中におけるたん白ゲル上での*P. fluorescens* の生菌数変化を図3-3に示す。まず、K-1株は、何れのたん白ゲル上でも活発に増殖し、10℃保存・7日目には生菌数が 10^8 オーダー/gを越えた(図3-3、I)。一方、IFO株については、卵白、乳たん白および大豆たん白ゲル上では、K-1株と同様に活発な増殖を示し、保存7日目には 10^6 オーダー/gを越えたが、牛血漿たん白ゲル上では生菌数は減少傾向となり、14日間の保存中に増殖は認められなかった(図3-3、II)。

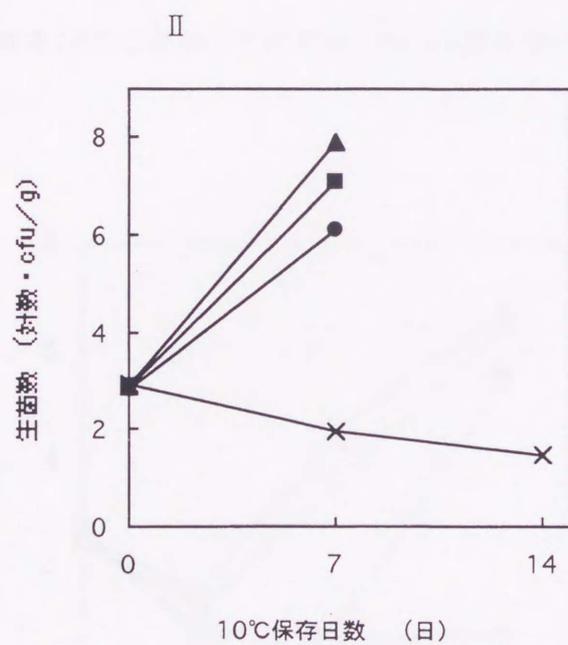
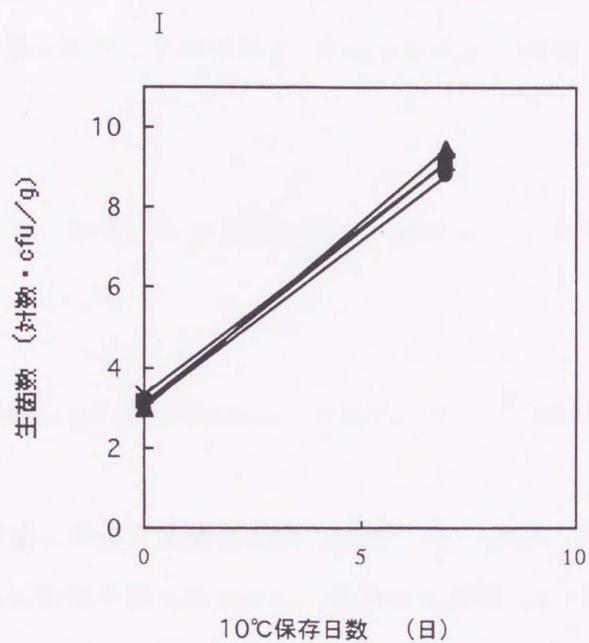


図3-3. 粉末各種たん白ゲル表面でのK-1株およびIFO株の経日生菌数変化

● : 卵白、■ : 卵たん白、▲ : 大豆たん白、× : 牛血漿たん白

I : K-1株、II : IFO株

2. 蒲鉾上での増殖

蒲鉾に粉末たん白類を配合した場合の*P. fluorescens* の増殖について検討した。

[実験方法]

[試料]

粉末たん白類として、前項、1.と同様に卵白、乳たん白、大豆たん白および牛血漿たん白を用いた。

[供試菌]

モデル蒲鉾上で増殖しない*P. fluorescens* IFO3081(IFO株)を用いた。

[蒲鉾調製方法]

本章、第1節の方法に準じて蒲鉾を調製・処理した。なお、粉末たん白類の配合による供試菌の増殖への影響を調べるために、各試料を蒲鉾に2.5%添加した。

[結果]

粉末たん白添加蒲鉾を10℃に保存した時のIFO株の生菌数変化を図3-4に示す。粉

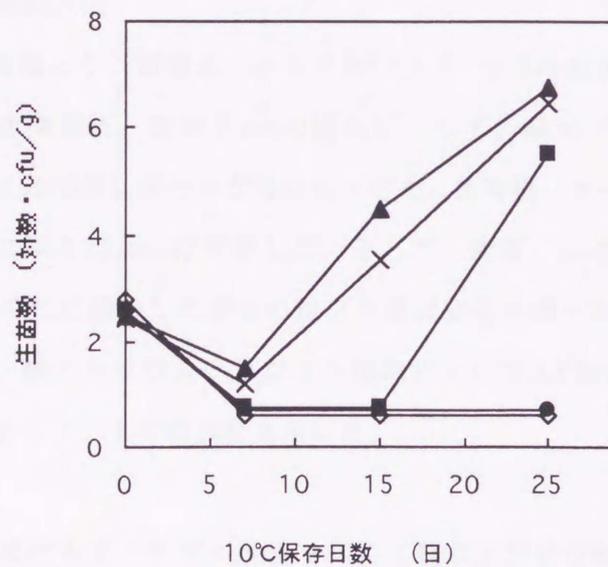


図3-4. 粉末たん白添加蒲鉾でのIFO株の経日生菌数変化

●: 無添加、■: 卵白、▲: 乳たん白
×: 大豆たん白、◇: 牛血漿たん白

未たん白未配合の蒲鉾では、保存中にIFO株の増殖は認められなかったが、卵白、乳たん白あるいは大豆たん白の蒲鉾への配合により、IFO株の増殖が可能となった。特に、乳たん白と大豆たん白配合区では、活発な増殖がみられ、保存15日目には生菌数が 10^4 オーダー/g前後に達し、25日後には 10^6 オーダー/gとなった。卵白の場合、増殖速度はそれらより劣り、保存15日目には生菌数の増加は認められなかったが、その後、増殖が始まり、25日目には 3.8×10^5 /gにまで増えた。一方、牛血漿たん白配合区では、保存期間中にIFO株の増殖は認められなかった。

3. ポークゲル上での増殖

食肉製品の主要原材料である豚ミンチ肉にて調製したポークゲル上での *P. fluorescens* の増殖について検討した。

[実験方法]

[供試菌]

P. fluorescens Biovar V K-1(K-1株)と *P. fluorescens* IFO3081(IFO株)を用いた。

[ポークゲルの調製方法]

豚ミンチ肉に食塩とリン酸塩ミックスを98:1.5:0.5の割合で混合し、5℃に一夜塩漬した。この塩漬肉を、折径7cmの塩化ビニリデン系ケーシングに充填した後、75℃で1時間ボイル加熱しポークゲルに仕上げた。冷却後、ケーシングを除去し、ポークゲルを無菌的に厚さ15mmに切断した。そして、前項、2.の蒲鉾と同様に供試菌懸濁液を接種し、10℃に保存した場合の経日生菌数変化を調べた。なお、リン酸塩ミックスは、ポリリン酸ナトリウム:ピロリン酸四ナトリウム(無水):ピロリン酸二水素二ナトリウム=2:2:1の混合物を用いた。

[結果]

10℃保存中におけるポークゲル表面でのK-1株およびIFO株の生菌数変化を図3-5に示す。K-1株は、蒲鉾と同様にポークゲル上でも活発に増殖し、10℃保存・10日目には生菌数が 3.6×10^9 cfu/gに達した。一方、IFO株についても、K-1株よりは増殖速度は劣ったが、保存10日目の生菌数が 4.1×10^4 cfu/gとなり、スタート時(3.0×10^2 cfu/g)の約100倍とポークゲル上での増殖が可能であった。

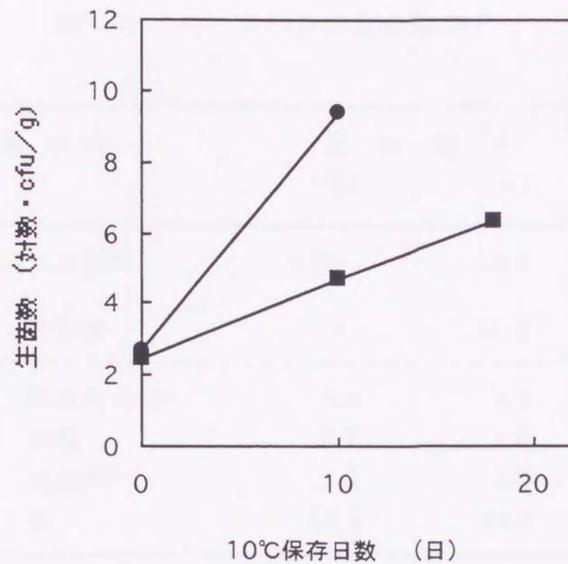


図3-5. ポークゲル表面でのK-1株およびIFO株の経日生菌数変化

● : K-1株、■ : IFO株

4. ロースハム上での増殖

ロースハムに粉末たん白類を配合した時の*P. fluorescens*の増殖について検討した。

〔実験方法〕

〔試料〕

粉末たん白類として、本節、1.と同様に卵白、乳たん白、大豆たん白および牛血漿たん白を用いた。

〔供試菌〕

P. fluorescens Biovar V K-1(K-1株)と*P. fluorescens* IFO3081(IFO株)を供試した。

〔ロースハムの調製方法〕

豚ロース赤肉に表3-2に示す処方のピクル液を注入(肉：ピクル液=100：70)した後、5℃にて24時間のタンプリング処理を行った。塩析後、肉塊を折径11cmのファイブラスケーシングに充填し、加熱処理(ドライン：60℃・60分間 → スチー

表3-2. ロースハムの配合処方

原 材 料	配 合 割 合	
	(部)	(%)
豚ロース赤肉	100	58.8
ピクル液	70	41.2
粉末たん白 ^a	6.8	4.0
食塩	2.7	1.6
塩漬剤 ^b	1.3	0.8
水	59.2	34.8

a : 卵白、乳たん白、大豆たん白および牛血漿たん白
を使用

b : 総合塩漬剤エポナN100(日本新薬株)を使用

ミング：80℃・90分間 → シャワリング：30分間 → ドライング：20℃・30分間)を
施し、ロースハムに仕上げた。ケーシングを剥いだ後、無菌的に厚さ15mmにスライ
スして蒲鉾と同様に供試菌懸濁液を接種し、10℃に保存した時の経日的な生菌数変化
を調べた。なお、粉末たん白類の配合による供試菌の増殖への影響を調べるために、
各試料を仕上がりで4%量となるようにピクル液に添加した。

[結果]

粉末たん白類を添加したロースハム表面での供試菌の生育状況(10℃保存)を図3-6
に示す。K-1株の場合、粉末たん白類の配合による増殖への影響はほとんどなく、無
添加および粉末たん白配合区ともに生菌数が保存14日目には $10^8 \sim 10^9$ オーダー/gに達
した。一方、IFO株では、無添加、卵白および乳たん白配合区でK-1株と同様に活発
に増殖し 10^5 オーダー/gを越えたが、牛血漿たん白配合区では保存した14日間中、生菌
数の増加は認められなかった。

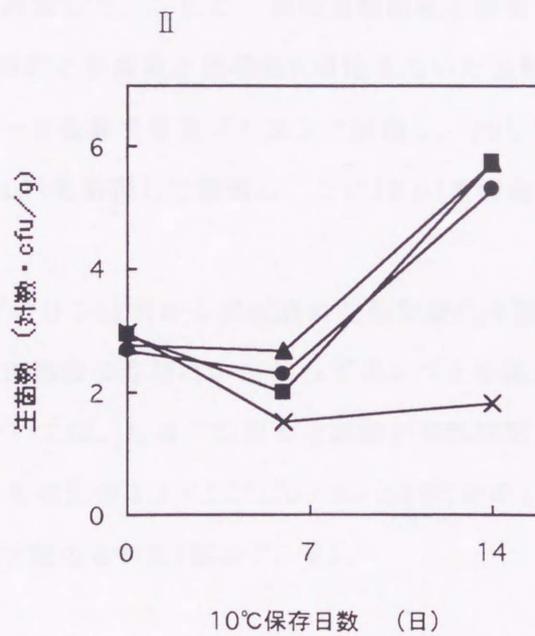
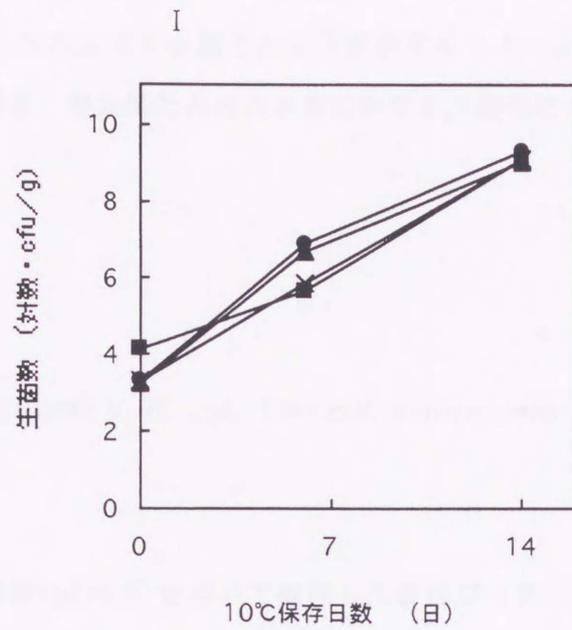


図3-6. 粉末たん白添加ロースハム表面でのK-1株およびIFO株の経日生菌数変化

● : 無添加、■ : 卵白、▲ : 乳たん白、× : 牛血漿たん白

I : K-1株、II : IFO株

5. 牛血漿たん白が*P. fluorescens* の増殖に及ぼす影響

前項、4.にてロースハムに牛血漿たん白を配合することによってIFO株の増殖が抑制された結果に基づき、牛血漿たん白の本菌に対する抗菌性について調べた。

[実験方法]

[試料]

牛血漿たん白

[供試菌]

P. fluorescens Biovar V K-1(K-1株)と*P. fluorescens* IFO3081(IFO株)を用いた。

[試験方法]

40mMリン酸緩衝液(pH6.5)を用いて調製した普通ブイヨンオートクレーブで滅菌(121℃・15分間)した後、牛血漿たん白を1%量溶解した。これを75℃の湯浴中で1時間加熱殺菌した後冷却した。これに、供試菌懸濁液を接種して10℃で振とう培養を行った。そして、経時的に生菌数を標準寒天培地を用いた混釈法で測定した。なお、供試菌懸濁液は供試菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とうした培養液を滅菌水を用いて 10^5 倍希釈して調製し、この20 μ lを培地10mlに添加した。

[結果]

10℃培養中の普通ブイヨンにおける供試菌の生菌数変化を図3-7に示す。K-1株については、牛血漿たん白添加の有無にかかわらず同レベルの増殖が示された(図3-7、I)。一方、IFO株については、培養7日目の生菌数が無添加区では 4.0×10^6 cfu/mlであったが、牛血漿たん白区は 4.3×10^4 cfu/mlと100分の1であり、牛血漿たん白に本菌の増殖抑制作用が認められた(図3-7、II)。

6. 考察

IFO株が蒲鉾表面で増殖しなかった理由は、蒲鉾のように比較的 low molecular weight の N 源が少ない固形食品の表面での増殖には、プロテアーゼが重要な因子になっているためと考えられる。すなわち、プロテアーゼ活性が陰性であるIFO株は、増殖に必要なN源を調達できないため増殖できない。そこで、ペプトン等の低分子N源を添加したり、あるいはプロテアーゼを作用させ低分子N源が生成された蒲鉾上ではIFO株の増殖が可

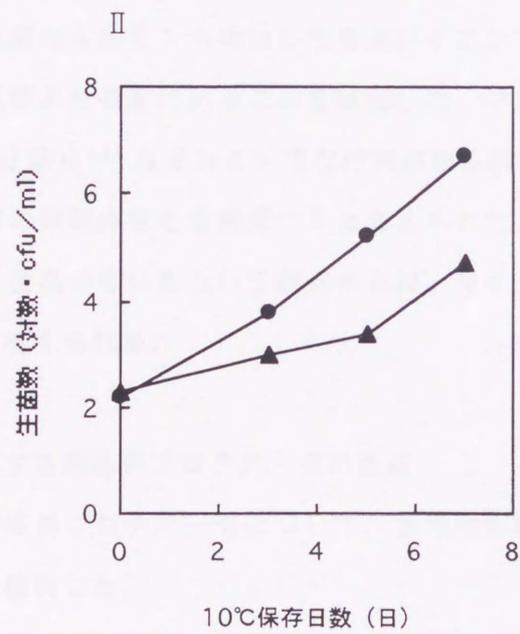
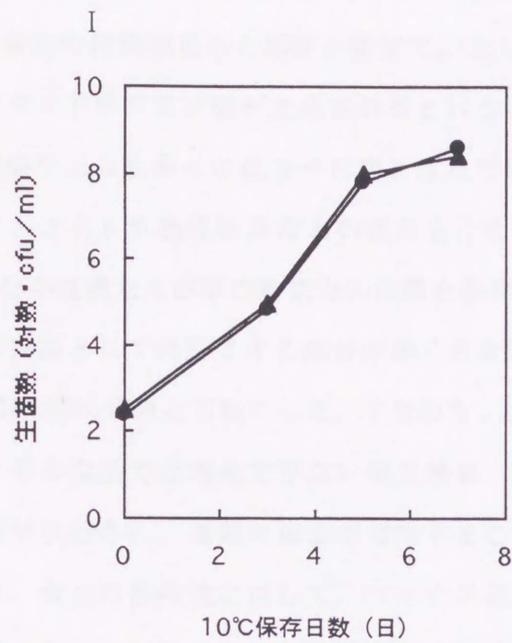


図3-7. 牛血漿たん白添加普通ブイヨンでのK-1株およびIFO株の生菌数変化

●：無添加、▲：牛血漿たん白 1%添加

I：K-1株、II：IFO株

能であった。一方、IFO株は、豚肉ゲル上では増殖が可能であった。これは、市販されている豚肉には、屠殺後の死後硬直から解硬の段階で、たん白質が酵素的作用によって低分子化され、ペプチドやアミノ酸が生成されるといういわゆる熟成の過程²⁹⁾を経ていることより、蒲鉾中よりも多くの低分子N源を含んでいるためと推定される。

近年、加工食品では、コストや物性改良などの面から、肉の代替として卵白、乳たん白、大豆たん白および牛血漿たん白等の粉末たん白類を多用する傾向がある^{30~34)}。これらには、微生物がN源として利用できる成分が多く含まれており^{35~38)}、これらを添加した蒲鉾上でのIFO株の増殖を可能にした。すなわち、IFO株のようなプロテアーゼ活性が陰性であり、その食品では増殖できない微生物も、粉末たん白類の配合により、増殖に必要なN源が供給され、増殖の機会が増加することになる。この意味において、粉末たん白類は、食品の保存性に対して、マイナス要因になる可能性が考えられる。一方、牛血漿たん白をロースハムに配合することによって、IFO株の増殖が抑制された。また、牛血漿たん白を1%添加した普通ブイヨンでの本菌の増殖速度は、普通ブイヨンのみの場合より有意に劣ることを確認した。牛血漿たん白には、戻りの抑制^{39,40)}や食品の軟化防止⁴¹⁾などいろいろな作用が知られているが、特定の菌に対してではあるが、増殖の抑制作用をも発揮すると考えられた。これらの結果より、粉末たん白類の使用は、食品の保存性という観点からは、マイナス要因とプラス要因の二面性を持っていると考えられる。

第4節 K-1株が産生する菌体外プロテアーゼの性質

K-1株が産生する菌体外プロテアーゼについて、各種化合物および食品添加物がその活性に及ぼす影響を検討した。

1. 各種化合物が活性に及ぼす影響

K-1株が産生する菌体外プロテアーゼの活性に及ぼす各種化合物の影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

表3-3に示す12種類の化合物を用いた。

[供試菌]

P. fluorescens Biovar V K-1(K-1株)

〔菌体外粗酵素液の調製〕

20%蒲鉾ホモジナイズ溶液に供試菌培養液を一白耳接種し、30℃で48時間振とう培養した。この培養溶液を遠心分離(4℃、10,000×g、15分間)し、得られた上清を菌体外粗酵素液とした。これを、セルロースチューブ(三光純薬(株)、東京)に入れ、4℃で24時間、50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.4)中で透析したものをプロテアーゼ活性の測定に用いた。なお、供試菌培養液は、供試菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とう培養して調製した。

〔プロテアーゼ活性の測定法〕

プロテアーゼ活性測定用の基質として、0.6%ミルクカゼイン(Merk、ドイツ)を50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.4)に溶解して調製した。反応は次のようにして行った。すなわち、基質のカゼイン溶液5mlに粗酵素液を1ml加え、30℃のウォーターバス中で30分間反応させた。その後、0.44Mトリクロロ酢酸5mlを添加して反応を停止させ、そのまま30℃に40分間保った。そして、沈降したカゼインをろ紙(No.2、ADVANTEC、東京)を用いて除去し、得られたろ液の280nmにおける吸光度を分光光度計を用いて測定した。また、対照は、基質カゼイン溶液、トリクロロ酢酸、粗酵素液の順に加え、同様に処理したものとした。なお、プロテアーゼ活性に及ぼす影響を検討した化合物は、反応液中に0.1mMおよび1mMになるように添加した。本測定法での酵素単位は、上記の反応条件で、1分間において1 μ gのチロシンに相当するペプチドを生成する酵素量を1 protease unit (1 U)とした。このとき、チロシンの定量は図3-8に示すチロシンの標準曲線によって行った⁴²⁾。

〔結果〕

K-1株が産生した菌体外プロテアーゼの活性に及ぼす各種化合物の影響を表3-3に示す。2,2'-ビピリジンおよび塩化1,10-フェナントロリンが0.1mM添加されるとプロテアーゼ活性が90%以上阻害された。これらの化合物は、鉄イオンと結合して安定なキレート錯体を作るキレート剤であるので、本酵素は活性部位に金属イオンを持つ金属酵素である可能性が高いと推定される。また、キレート剤であるEDTA(0.1mM)によっても約20%の阻害がみられた。しかし、他の化合物についてはほとんど阻害は認められなかった。

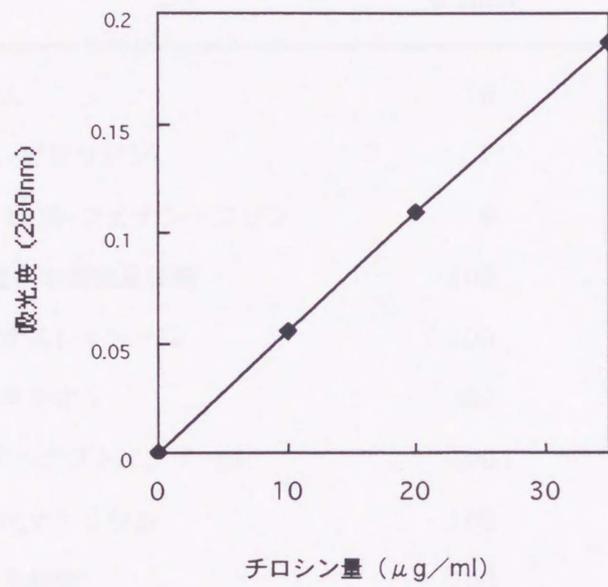


図3-8. チロシンの標準曲線

表3-3. K-1株産生プロテアーゼの活性に及ぼす各種化合物の影響

供試化合物	Relative activity (%) ^a	
	0.1mM	1mM
EDTA	79	68
2,2-ピペリジン	7	—
塩化1,10-フェナントロリン	9	—
4-塩化水銀安息香酸	100	82
ジチオスレイトール	100	81
グルタチオン	100	100
2-メルカプトエタノール	100	97
アジ化ナトリウム	100	96
ヨード酢酸	100	98
イミダゾール	98	95
ピラゾール	94	88
フェリシアン化ナトリウム	100	90

a : 無添加 ; 100%

2. 食品添加物が活性に及ぼす影響

食品添加物の中でpH調整剤に分類されている化合物を中心に、K-1株が産生したプロテアーゼの活性に及ぼす影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

表3-4に示す11種類の食品添加物を用いた。

[菌体外粗酵素液の調製]

前項、1.と同じ。

[プロテアーゼ活性の測定法]

前項、1.と同じ。

[結果]

各種食品添加物のプロテアーゼ活性に及ぼす影響を表3-4に示す。供試した添加物の中で、トリポリリン酸ナトリウムの阻害効果が最も大きく15%の阻害が認められた。他の添加物については、グリシンおよびフマル酸に阻害がみられなかった以外は概ね10%弱の阻害が示された。

3. トリポリリン酸ナトリウムがK-1株の増殖に及ぼす影響

K-1株の蒲鉾での増殖には、自らが産生するプロテアーゼ活性が大きく関与していると推定している。そこで、プロテアーゼ活性の阻害効果を示すトリポリリン酸ナトリウムが蒲鉾に添加された場合のK-1株の増殖について検討した。

[実験方法]

[供試菌]

P. fluorescens Biovar V K-1(K-1株)

[蒲鉾調製方法および保存試験方法]

本章、第1節の方法に準じて調製したスライス蒲鉾に供試菌を第1節と同様の方法で植菌し、30℃および10℃に保存して経日的に生菌数変化を調べた。なお、蒲鉾には、供試菌の増殖に及ぼす影響を調べるためにトリポリリン酸ナトリウムを0.5%添加した。

[普通ブイヨンでの増殖試験]

普通ブイヨンに供試菌懸濁液を接種し、30℃で振とう培養を行った。そして、培養

表3-4. K-1株産生プロテアーゼの活性に及ぼす食品添加物の影響

供試食品添加物	Relativ activity (%) ^a
	10mM
グリシン	102
酢酸ナトリウム(無水)	91
トリポリリン酸ナトリウム	85
ピロリン酸ナトリウム	90
酸性ピロリン酸ナトリウム	94
アジピン酸	91
フマル酸一ナトリウム	93
クエン酸三ナトリウム	92
リンゴ酸ナトリウム	91
フマル酸	101

a : 無添加 ; 100%

24時間目および48時間目の生菌数を標準寒天培地を用いた混釈法で測定した。培地には、供試菌の増殖への影響を調べるために、トリポリリン酸ナトリウムを0.5%添加した。なお、供試菌懸濁液は供試菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とうした培養液を滅菌水にて 10^5 倍希釈して調製し、20 μ lを培地10mlに添加した。

〔蒲鉾の物性試験〕

本章、第1節の方法に準じて調製したスライス蒲鉾の破断強度、圧出水分量およびpHを次の通り測定した。まず、破断強度は、レオメーター(不動工業株、東京)にて厚さ15mmの蒲鉾に7mm球プランジャーを侵入させた際の破断応力を測定した。圧出水分量については、15mm厚の蒲鉾の上に3kgの重りを3分間置いたときの遊離水分量とした。また、pHは、蒲鉾：蒸留水=1：9の混合物をホモジナイザーにかけて得られた10%蒲鉾ホモジネイトをpHガラス電極を用いて測定した。

〔結果〕

普通ブイヨンでの30℃振とう培養におけるK-1株の増殖挙動を表3-5に示す。トリポリリン酸ナトリウム(0.5%)は、K-1株の普通ブイヨンでの増殖に全く影響を及ぼすことなく、培養1日目には生菌数が無添加区と同じ 10^7 オーダー/gに達した。

つぎに、蒲鉾表面でのK-1株の増殖試験結果を表3-6に示す。保存開始時に 1.6×10^2 cfu/gの生菌数であった蒲鉾を30℃に1日保存することによって 6.3×10^6 cfu/gに増加したが、トリポリリン酸ナトリウム(0.5%)の添加により、 6.3×10^5 cfu/gと10分の1に抑制された。また、10℃保存区では、4日目の生菌数が無添加の場合

表3-5. トリポリリン酸ナトリウム添加普通ブイヨンでのK-1株の生菌数変化

トリポリリン酸Na	生菌数(対数・cfu/ml)		
	スタート	1日目	2日目
無添加	2.0	7.4	9.4
0.5%添加	2.1	7.2	9.4

表3-6. トリポリリン酸ナトリウム配合蒲鉾でのK-1株の生菌数変化

トリポリリン酸Na	生 菌 数 (対数・cfu/g)					
	30℃ 保 存			10℃ 保 存		
	スタート	1日目	2日目	2日目	4日目	6日目
無添加	2.2	6.8	9.0 ^a	3.7	6.6	8.7 ^a
0.5%添加	2.2	5.8	8.7 ^a	3.5	4.5	7.6

a : ネット形成

4.0×10⁶cfu/gにまで達したが、トリポリリン酸ナトリウム区では3.2×10⁴cfu/gであり約100分の1の生菌数に抑制された。さらに、無添加区では10℃保存・6日目にはネットの発生が観察されたが、トリポリリン酸ナトリウム区ではネットは認められなかった。以上の結果より、トリポリリン酸ナトリウムの添加により、蒲鉾上でのK-1株の増殖が抑制されることが確認された。

蒲鉾の物性値測定結果を表3-7に示す。破断強度、圧出水分量およびpHともにトリポリリン酸ナトリウム配合の有無による差はなく、トリポリリン酸ナトリウム(0.5%)は蒲鉾の物性に影響を与えないと考えられる。また、官能検査の結果、蒲鉾の風味への影響もないと判定された。

表3-7. トリポリリン酸ナトリウム配合蒲鉾の物性測定結果

トリポリリン酸Na	pH ^a	破断強度 (g)	圧出水分量 (%)
無添加	7.21	233	1.8
0.5%添加	7.28	226	1.7

a : 10%ホモジナイズ溶液

4. 考察

K-1株が産生するプロテアーゼは、2,2'-ピピリジンおよび塩化1,10-フェナントロリンによって強く活性が阻害された。これらの化合物は、主として鉄イオンと結合して安定なキレート錯体を作るキレート剤であるので、本酵素は活性部位に金属イオンを持つ金属酵素である可能性が高いと推定される。また、キレート作用を有するEDTAによっても約20%の活性阻害が認められた。このことは、本酵素が金属酵素である可能性を支持している。

蒲鉾表面での*P. fluorescens*の増殖にはプロテアーゼが重要な因子となっており、増殖に必要なN源をプロテアーゼによって調達していると考えられる。今回、食品添加物であるトリポリリン酸ナトリウムにプロテアーゼ活性の阻害効果が見いだされた。そこで、トリポリリン酸ナトリウムが蒲鉾に存在した場合、産生されたプロテアーゼの活性が一部阻害されることによって、N源の供給が低下し増殖速度に影響が及ぼされるのではないかと考え、トリポリリン酸ナトリウム配合蒲鉾でのK-1株の生育実験を行った。リン酸塩類は、さまざまな用途で幅広く食品に使用されている^{43~45)}。トリポリリン酸ナトリウムやピロリン酸ナトリウム等は、すり身の凍結保存中におけるたん白質の変性防止や、最終製品(蒲鉾等)の物性改良のために、冷凍すり身に添加されている^{46,47)}。しかしながら、これらリン酸塩類を保存性向上を目的に使用した例はない。一般的に、リン酸塩類はグラム陰性菌に対して抗菌力を発揮せず^{48, 49)}、K-1株についても、普通ブイヨンでの増殖に0.5%トリポリリン酸ナトリウムは全く影響が及ぼさなかった。しかし、蒲鉾表面での増殖の場合、10℃保存・4日目の生菌数が0.5%トリポリリン酸ナトリウムの添加により約100の1に抑制された。このことは、トリポリリン酸ナトリウムはK-1株に直接抗菌性を示して、その増殖を抑制したのではなく、蒲鉾上で増殖するために必要なN源を調達するプロテアーゼの活性を阻害した結果、K-1株の利用できるN源が減少し、増殖が低下したものと推定される。このような観点において、トリポリリン酸ナトリウムは、食品、特に蒲鉾のように比較的 low molecular weight N source の少ない固形食品での保存性向上対策として有効であることが示唆された。

第4章 ホップの抗菌効果について

ホップ(*Humulus lupulus* L.)の毬花は、古くからビールの製造に使用され、ビールに独特な芳香と爽快な苦味を与える^{50~53)}と共に、雑菌の繁殖を抑え、ビールの腐敗を抑えている^{54~59)}。ホップの抗菌性については、古くから多くの研究がなされているが、グラム陽性菌には強い抗菌力を示すものの、その他の菌種に対してはほとんど抗菌力を示さないと報告されている^{60~73)}。今回、ホップから超臨界二酸化炭素抽出によって得られたホップエキスを用いて、細菌に対する抗菌効果を検討したところ、大腸菌に強い抗菌力が発揮されるケースを見出した。そこで、本系における抗菌特性を明らかにするとともに、食品の保存性向上へのホップの利用に関して検討を行った。

第1節 ホップエキスの抗菌力

供試ホップエキスの抗菌特性(抗菌スペクトル)を把握するために、各種微生物に対するインビトロ系抗菌力試験を実施した。

〔実験方法〕

〔試料〕

ホップエキスは、カルターフードサイエンス社(USA)より販売されているアロマホップ(以下、本節ではホップとする)を用いた。本品は、ホップの超臨界条件下における液体二酸化炭素抽出によって得られた抽出物より、苦味の主成分である α 酸を除去した β 酸リッチ画分(β 酸：約50%、その他：ホップオイルおよび樹脂)である。

〔供試菌〕

供試菌株として、表4-1に示す細菌12株(グラム陽性菌6株、グラム陰性菌6株)、酵母2株およびかび2株の計16株を用いた。

〔抗菌力測定法〕

細菌については、液体培地(乳酸菌にはMRSブイヨン(オキシイド社)を、その他の菌株には普通ブイヨンを使用)9mlに、滅菌水1mlと供試菌懸濁液0.01mlを加えた後、30℃での振とう培養を行った。そして、培養開始48時間後に分光光度計にて660nmの吸光度(OD₆₆₀)を測定し、培養開始前の値との差が0.03以下の場合を増殖阻止とし

表4-1. 供試菌株

供 試 菌 名	分離源
<i>Bacillus cereus</i> OUT8032	OUT株
<i>Bacillus subtilis</i>	カスタードクリーム分離株
<i>Micrococcus flavus</i>	日本新薬(株)保存株
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	FDA株
<i>Lactobacillus brevis</i>	ベーコン分離株
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ミートボール分離株
<i>Escherichia coli</i> K-12 IFO3301	IFO株
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	蒲鉾分離株
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3080	IFO株
<i>Citrobacter freundii</i> IFO12681	IFO株
<i>Salmonella</i> Typhimurium	京都大学からの分譲株
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	食品工場分離株
<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	大阪大学からの分譲株
<i>Candida utilis</i> OUT6020	OUT株
<i>Aspergillus niger</i> IFO6341	IFO株
<i>Rhizopus nigricans</i> IFO5781	IFO株

た。抗菌力の測定は、滅菌水の代わりにホップ溶液を添加した。水に溶解しにくいホップは等量のTween80(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ナカライテスク(株)、京都)に溶解して用いた(以下、本章では、ホップの添加は同様の方法にて実施した)。なお、Tween80は、培地中に添加された濃度では供試菌の増殖に影響を与えなかった。また、供試菌懸濁液は、各供試菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とうした培養液を滅菌水にて 10^4 倍希釈して調製した。この測定において、ホップ濃度が0.05%以上になると培地に濁りが生じ、吸光度を測定できない。そこで、培地中の生菌数を測定することにより、ホップの抗菌効果を判定した。すなわち、30℃で振とう培養した48時間目の生菌数を標準寒天培地を用いた混釈法で測定した。

酵母の抗菌力の測定は、上記の細菌での方法に準じたが、ペプトン：5.0g、酵母エキス：2.5g、ブドウ糖：1.0g、蒸留水：1Lからなる液体培地(pH6.5)を用いた。

かびへの抗菌力については、ジャイアントコロニー法にて効果を調べた。すなわち、

表4-2. ホップの抗菌スペクトル

供試菌株	MIC ^a (%)
グラム陽性菌	
<i>Bacillus cereus</i>	0.001
<i>Bacillus subtilis</i>	0.003
<i>Micrococcus flavus</i>	0.005
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.002
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.001
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.002
グラム陰性菌	
<i>Escherichia coli</i> K-12	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
酵 母	
<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	1
<i>Candida utilis</i>	2
かび	
<i>Aspergillus niger</i>	> 4
<i>Rhizopus nigricans</i>	4

a : Minimum inhibitory concentration

滅菌したポテトデキストロース寒天培地(日水製薬(株)、東京)に所定量のホップを添加した後、シャーレに分注し固化させた。これに、各供試菌の孢子懸濁液10 μ lを植菌して、25 $^{\circ}$ C培養中における経日コロニー直径の変化を調べた。なお、孢子懸濁液は、ポテトデキストロース寒天培地にて十分に孢子形成がみられる供試菌を0.005%ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウムに懸濁して用いた。

[結果および考察]

ホップの微生物に対する抗菌効果を表4-2に示す。ホップは、供試した6株のグラム陽性菌全てに0.005%以下の低濃度で、その増殖を完全に抑制した。一方、グラム陰性菌に対しては、*S. Typhimurium*が0.1%、*P. aeruginosa*で0.5%、*C. freundii*では1%添加で増殖が抑制されたが、他の3菌株については1%添加しても、増殖抑制力はなかった。また、真菌類については、酵母の場合、1~2%で増殖が抑制されたが、*R. nigricans*では4%、*A. niger*の場合では4%以上のホップが必要であった。

以上の結果より、グラム陽性菌には強い抗菌力を発揮するが、グラム陰性菌および真菌に対する効果は弱く、本ホップエキスについても、従来報告されているホップの抗菌スペクトルと同様の傾向が示された^{60~73)}。

第2節 ホップエキスと制菌素材の併用による大腸菌への抗菌効果

薬剤の併用により抗菌スペクトルが拡大されるケースが知られている^{74~77)}。そこで、ホップエキスと同様にグラム陰性菌に抗菌効果を示さない薬剤とホップエキスを組合わせた場合の大腸菌に対する抗菌効果を調べた。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとしてアロマホップ(以下、本節ではホップとする)を用い、併用薬剤としては、グラム陰性菌に対してほとんど抗菌力を発揮しないメタリン酸ナトリウム(太平化学産業(株)、大阪)、カプリン酸モノグリセライド(太陽化学(株)、三重)およびリゾチーム(キューピー(株)、東京)を用いた。これらの試料は何れも食品添加物グレード品を使用した。

[供試菌]

表4-3. ホップと抗菌素材との併用による *E. coli* K-12への抗菌効果

供試抗菌素材 ^a	増殖 ^b (OD ₆₆₀)
無添加	+
ホップ	+
メタリン酸ナトリウム	+
カプリン酸モノグリセライド	+
リゾチーム	+
ホップ + メタリン酸ナトリウム	0
ホップ + カプリン酸モノグリセライド	+
ホップ + リゾチーム	+

a: 各抗菌素材の添加量 ; ホップ : 0.01%
 メタリン酸ナトリウム : 1%
 カプリン酸モノグリセライド : 0.01%
 リゾチーム : 0.1%

b: + ; 吸光度(OD₆₆₀)が1.0以上の時

食品衛生上極めて重要な菌種であり、食中毒を発生させる種も存在し、食品の安全性確保のためには、その制御が不可欠である大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 IFO3301)を用いた。

[抗菌力測定法]

普通ブイヨン 9 mlに、滅菌水 1 mlと供試菌懸濁液 0.01 mlを加えた後、30℃での振とう培養を行った。そして、培養開始 48時間後に分光光度計を用いて 660nmの吸光度(OD₆₆₀)を測定し、培養開始前の値との差が 0.03以下の場合を増殖阻止とした。抗菌力の測定は、滅菌水の代わりに各試料溶液を添加した。また、カプリン酸モノグリセライドは 10%エタノールに溶解して用い、培地中に添加された濃度のエタノールは供試菌の増殖に影響を与えなかった。なお、供試菌懸濁液は、各供試菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で 24時間振とうした培養液を滅菌水を用いて 10⁴倍希釈して調製した。

[結果および考察]

ホップとメタリン酸ナトリウム、カプリン酸モノグリセライドあるいはリゾチーム

とを併用した場合の*E. coli* K-12に対する抗菌効果を表4-3に示す。まず、メタリン酸ナトリウム、カプリン酸モノグリセライドおよびリゾチームの各単独区は培養48時間後の吸光度(OD₆₆₀)が何れも1.0以上となり、ホップと同様に単独では*E. coli* K-12に対して抗菌力を示さなかった。メタリン酸ナトリウム、カプリン酸モノグリセライドおよびリゾチームは、グラム陽性菌には抗菌力を示すが、グラム陰性菌に対する抗菌効果は弱いと報告されている^{48, 78, 79}。次に、ホップとカプリン酸モノグリセライドあるいはホップとリゾチームとの組み合わせでは、*E. coli* K-12の増殖に影響を及ぼさなかった。一方、ホップ(0.01%)とメタリン酸ナトリウム(1%)とを併用すると、30℃培養で48時間、*E. coli* K-12の増殖は完全に抑制されるという強い抗菌効果が示された。さらに、その後、一週間培養を継続したが、*E. coli* K-12の増殖は認められなかった。この時の培地(普通ブイヨン)pHは、無添加区が6.73で、これにホップ0.01%とメタリン酸ナトリウム 1%を添加した培地が6.55であり、上記の抗菌効果は培地のpH差によるものではなく、試料の併用による抗菌スペクトルの拡大であると考えられた。抗菌剤の併用により抗菌スペクトルが拡大するケースは多く報告されている^{74~77}が、ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの組み合わせによる大腸菌への抗菌力の発現は過去にその報告がなく、今回初めて見いだされたことになる。

第3節 ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用による大腸菌への抗菌効果

前節で、単独では大腸菌に対して抗菌効果を発揮しない試料であるホップエキスとメタリン酸ナトリウムを併用することにより強い抗菌力が認められた。そこで、本併用系における大腸菌への抗菌特性についてさらに解明するために、大腸菌の種類、試料濃度の影響、試料の添加時期・添加順序の影響および菌体表層への影響等について検討した。

1. 大腸菌への抗菌効果

ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用による大腸菌への抗菌力について、*Escherichia coli* K-12 IFO3301株以外の大腸菌株に対する効果を調べた。

1-1. 単独時の抗菌効果

表4-4. 供試大腸菌

菌 株	由 来
<i>Escherichia coli</i> ATCC15224	ATCC株
<i>Escherichia coli</i> K-12 OUT8401	OUT株
<i>Escherichia coli</i>	生ガキ分離菌
<i>Escherichia coli</i> var. <i>communior</i>	食品工場分離菌

併用による抗菌力を検討する前にホップエキスおよびメタリン酸ナトリウムの単独時における大腸菌への抗菌力を調べた。

〔実験方法〕

〔試料〕

ホップエキスとしてはアロマホップ(以下、本節ではホップとする。)を用い、メタリン酸ナトリウム(太平化学産業(株)、大阪)は食品添加物グレード品を使用した。

〔供試菌〕

供試大腸菌として、表4-4に示すように菌株保存機関より入手した2株と食品および食品工場からの分離菌の合計4菌株を用いた。

〔抗菌力測定方法〕

抗菌力の測定は、本章、第1節と同様の方法にて実施した。

〔結果〕

ホップとメタリン酸ナトリウム単独時での大腸菌に対する抗菌効果を表4-5に示す。ホップの場合1%添加でも全ての大腸菌の増殖は可能であった。一方、メタリン酸ナトリウムについては、*E. coli* ATCC15224、*E. coli* K-12 OUT8401および*E. coli* var. *communior* では5%添加でも増殖が可能であり、他の2株では、増殖を完全に抑制するには3%濃度のメタリン酸ナトリウムが必要であった。従って、供試大腸菌に対するホップおよびメタリン酸ナトリウムの抗菌力は非常に弱いと考えられる。

表4-5. 大腸菌に対するホップおよびメタリン酸ナトリウムの抗菌効果

菌 株	MIC ^a (%)	
	ホップ	メタリン酸Na
<i>Escherichia coli</i> K-12 IFO3301	> 1	3
<i>Escherichia coli</i> ATCC15224	> 1	> 5
<i>Escherichia coli</i> K-12 OUT8401	> 1	> 5
<i>Escherichia coli</i>	> 1	3
<i>Escherichia coli</i> var. <i>communior</i>	> 1	> 5

a : Minimum inhibitory concentration

1-2. 併用時の抗菌効果

前項、1-1.にて、全ての供試大腸菌に対してホップエキスとメタリン酸ナトリウムは、単独ではほとんど抗菌力を示さないことが確認されたので、両試料の併用時における抗菌効果について検討した。

[実験方法]

[試料]

前項、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

前項、1-1.と同じく、大腸菌4菌株を用いた。

[抗菌力測定方法]

本章、第1節と同じ。

[結果]

ホップとメタリン酸ナトリウムの併用による大腸菌への抗菌効果を表4-6に示す。供試した大腸菌は、全て*E. coli* K-12 IFO3301と同様の傾向であり、併用によって、その増殖がより抑制された。特に、*E. coli* ATCC15224および*E. coli* var. *communior* に対しては、非常に強い相乗効果が認められた。すなわち、両株ともメタリン酸ナトリウム単独では5%添加でも増殖が認められたが、0.01%ホップの併用

表4-6. 大腸菌に対するホップとメタリン酸ナトリウムの併用効果

菌株 ^a	ホップ (%)	増殖 ^b (OD ₆₆₀)							
		メタリン酸ナトリウム (%)							
		0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	5.0
A	0	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.01	+	+	0.08	0	0	0	0	0
B	0	+	+	+	+	+	+	0.80	0.55
	0.01	+	+	+	0	0	0	0	0
C	0	+	+	+	+	0.96	0	0	0
	0.01	+	+	+	0.98	0.12	0	0	0
D	0	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.01	+	+	+	+	+	+	+	0.63
E	0	+	+	+	+	+	0	0	0
	0.01	+	0	0	0	0	0	0	0

a : A ; *E. coli* ATCC15224

B ; *E. coli* var. *communior* (食品工場分離菌)

C ; *E. coli* (生ガキ分離菌)

D ; *E. coli* K-12 OUT8401

E ; *E. coli* K-12 IFO3301

b : + ; 吸光度(OD₆₆₀)が1.0以上の時

によりメタリン酸ナトリウム濃度が1.5%でも増殖が完全に抑制され、併用によりメタリン酸ナトリウム量を約1/3に減じることが可能であった。また、生がきから分離した*E. coli* および*E. coli* K-12 OUT8401については、ホップとの併用によって、その増殖を完全に抑制するために必要なメタリン酸ナトリウム量を減じることが出来なかったが、同じメタリン酸ナトリウム使用濃度でも、ホップ併用区では、これらの菌株の増殖レベルが低下し併用効果が示された。

2. 併用系での各試料濃度の影響

相乗的な併用効果が認められたホップエキスとメタリン酸ナトリウムの組合せについて、それぞれの試料濃度を変化させた場合の大腸菌の増殖への影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

Escherichia coli K-12 IFO3301を用いた。

[抗菌力の測定]

本章、第2節と同様の方法にて実施した。

[結果]

メタリン酸ナトリウム濃度を変化させた時の*E. coli* K-12に対する抗菌力への影響を表4-7に、ホップ濃度を変化された場合を表4-8に示す。まず、ホップを0.01%に固定し、メタリン酸ナトリウム濃度を0.25~1.0%まで変化させた場合、メタリン酸ナトリウムが0.5%以上で強い抗菌力が認められた(表4-7)。また、メタリン酸ナトリウムを0.5%に固定し、ホップ濃度を0.0025~0.01%まで変化させた時は、ホップが0.0075%までは抗菌力が発揮されなかった(表4-8)。

表4-7. *E. coli* K-12に対するホップとメタリン酸ナトリウムの併用効果
～メタリン酸ナトリウム濃度の影響～

ホップ (%)	メタリン酸ナトリウム (%)	増殖 ^a (OD ₆₆₀)	
		24時間	48時間
0.01	0	+	+
0.01	0.25	0.2	+
0.01	0.5	0	0
0.01	0.75	0	0
0.01	1.0	0	0

a : + ; 吸光度(OD₆₆₀)が1.0以上の時

表4-8. *E. coli* K-12に対するホップとメタリン酸ナトリウムの併用効
 ～ホップ濃度の影響～

ホップ (%)	メタリン酸ナトリウム (%)	増殖 ^a (OD ₆₆₀)	
		24時間	48時間
0.0025	0.5	0	+
0.005	0.5	0	+
0.0075	0.5	0	+
0.01	0.5	0	0

a : + ; 吸光度(OD₆₆₀)が1.0以上の時

3.併用系での試料の添加時期の影響

大腸菌に対するホップエキスとメタリン酸ナトリウム併用時の抗菌効果について、試料の添加時期の影響を検討した。

3-1.誘導期における添加効果

大腸菌増殖過程の誘導期にホップエキスおよびメタリン酸ナトリウムを添加した場合の増殖への影響について調べた。

[実験方法]

[試料]

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

E. coli K-12 IFO3301

[抗菌力測定法]

普通ブイヨンに供試菌の前培養液を一白金耳植菌し、30℃での振とう培養を開始した。その後、本菌の誘導期である培養開始3時間目および6時間目に試料(ホップ0.01%+メタリン酸ナトリウム1%)を添加し、さらに培養を続け増殖への影響を調べた。試料の増殖への影響は、供試菌の増殖曲線より判断した。培養は、微生物増殖

自動測定装置にて行い、経時的に650nmの吸光度を測定した。なお、供試菌培養液は、本菌株の一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とう培養して用いた。

[結果]

ホップおよびメタリン酸ナトリウムを誘導期に添加した場合の*E. coli* K-12 IFO3301の増殖曲線を図4-1に示す。両試料を培養開始時に添加した場合、*E. coli* K-12の増殖は完全に抑制された。一方、培養開始3時間後に添加した場合、誘導期が約44時間延長されたが、増殖は可能であった。同様に、培養開始6時間後に添加した場合、誘導期が約17時間延長され、その後増殖した。すなわち、ホップおよびメタリン酸ナトリウムの両試料を培養開始時に添加した場合、*E. coli* K-12は増殖できなかつたが、菌が増殖のための活動を開始している誘導期の添加では、増殖開始の遅延効果はあるが、増殖を完全に抑えることはできなかった。

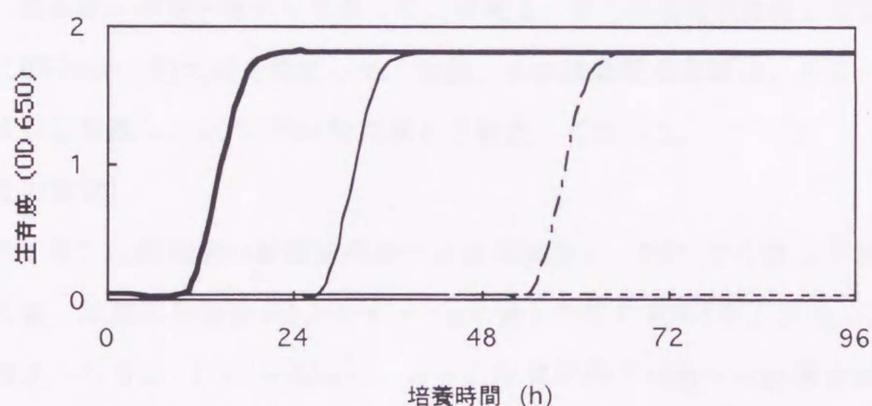


図4-1. 誘導期に試料を添加した時の*E. coli* K-12の増殖曲線

試料(0.01%ホップ+1%メタリン酸ナトリウム)の添加時期は以下の通りである

- : 無添加
- : 培養開始時に添加
- · - · - : 培養開始3時間後に添加
- : 培養開始6時間後に添加

3-2.対数増殖期における添加効果

大腸菌増殖過程の対数増殖期にホップエキスおよびメタリン酸ナトリウムを添加した場合の増殖への影響について調べた。

[実験方法]

[試料]

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

E. coli K-12 IFO3301 およびホップが強い抗菌効果を示す *Bacillus cereus* OUT8032を用いた。

[吸光度の測定]

普通ブイヨンに供試菌の前培養液を一白金耳植菌し、20℃での振とう培養を開始した。その後、対数増殖期にあたる培養開始18時間目に試料(ホップ 0.01%およびメタリン酸ナトリウム 1%)を添加し、さらに培養を続け増殖への影響を調べた。試料の影響は、供試菌の増殖曲線から判断した。培養は、微生物増殖自動測定装置にて行い、経時的に650nmの吸光度を測定した。なお、各供試菌前培養液は、各菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とう培養して用いた。

[生菌数の測定]

普通ブイヨンに供試菌の前培養液を一白金耳植菌し、30℃での振とう培養を開始した。その後、本菌の生菌数が 10^4 オーダー/gに達した時に試料(ホップ 0.01%およびメタリン酸ナトリウム 1%)を添加し、さらに培養を続け増殖への影響を調べた。試料の影響は、供試菌の生菌数を経時的に測定することにより判断した。生菌数は、標準寒天培地を用いた混釈法にて測定した。なお、各供試菌前培養液は、各菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とう培養したものを用いた。

[結果]

ホップおよびメタリン酸ナトリウムを対数増殖期に添加した場合の *E. coli* K-12 および *B. cereus* の増殖曲線を図4-2に示す。*E. coli* K-12の場合、ホップあるいはメタリン酸ナトリウムの単独添加では増殖に影響を及ぼさなかったが、両試料の併用により有意な増殖速度の低下が認められた(図4-2、I)。一方、*B. cereus* については、ホップのみの添加によって吸光度が減少し、溶菌現象が観察された(図4-2、II)。

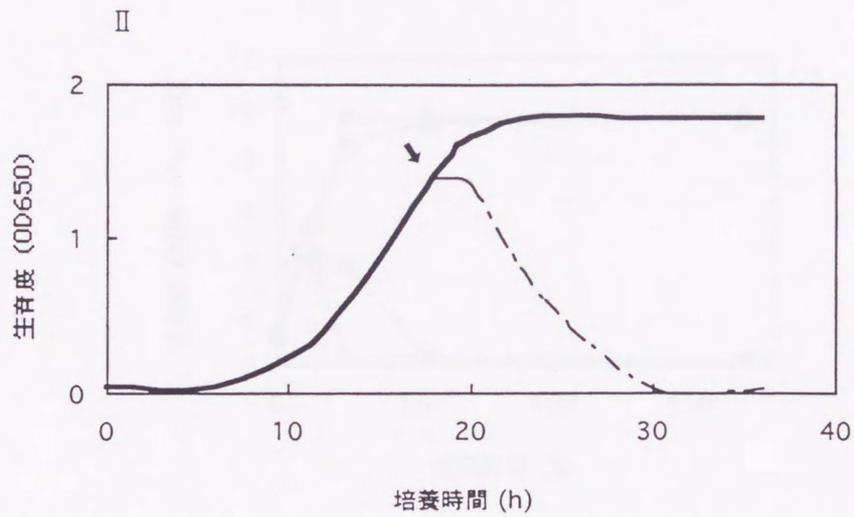
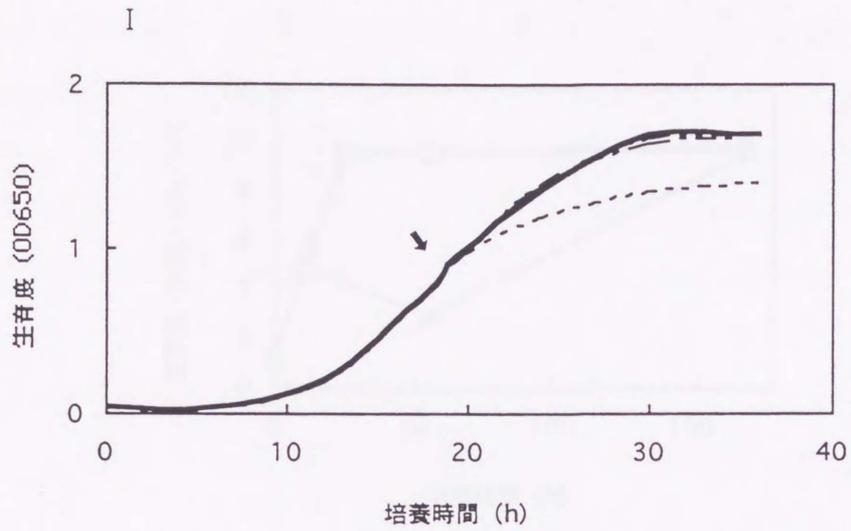


図4-2. 対数増殖期に 試料を添加した時の *E. coli* K-12 (I) および *B. cereus* (II) の増殖曲線

I : ——— ; 無添加 - - - - - ; 0.01%ホップ
 - · - · - · ; 1%メタリン酸ナトリウム - - - - - ; 0.01%ホップ + 1%メタリン酸ナトリウム

II : ——— ; 無添加 - - - - - ; 0.01%ホップ

↓ : 試料の添加時期

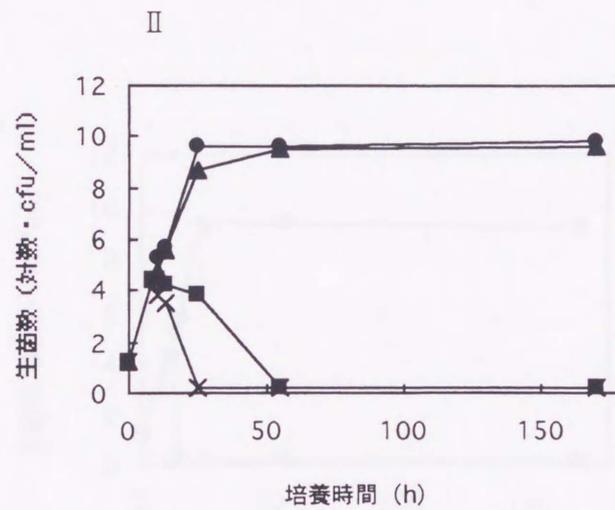
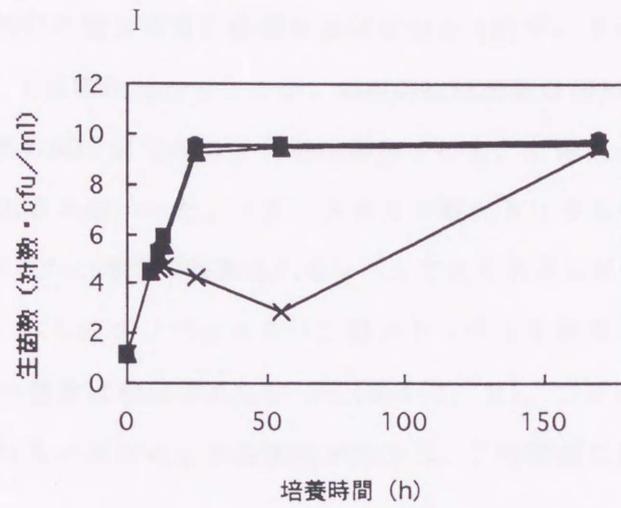


図4-3. 対数増殖期に試料を添加した時の*E. coli* K-12の生菌数変化

● : 無添加、■ : ホップ、▲ : メタリン酸ナトリウム
 × : ホップ+メタリン酸ナトリウム

I : ホップ ; 0.01%
 メタリン酸ナトリウム ; 1%

II : ホップ ; 3%
 メタリン酸ナトリウム ; 3%

次に、試料添加後の生菌数変化を図4-3(*E. coli* K-12)および図4-4(*B. cereus*)に示す。まず、*E. coli* K-12 については、ホップ0.01%あるいはメタリン酸ナトリウム1%の単独添加は本菌の増殖に影響を及ぼさなかったが、それらの併用により一時的に増殖が停止して生菌数は減少したが、最終的には菌数は増加した(図4-3、I)。一方、ホップを本菌のMIC値である3%濃度添加すると、生菌数は徐々に減少し、添加50時間後には検出されなかった。一方、メタリン酸ナトリウムについては、MIC値である2%添加でも僅かに増殖が抑制されるレベルであり大きな影響は認められなかった。また、MIC値レベルのホップとメタリン酸ナトリウムを併用することによって、添加20時間後には生菌数は検出されなかった(図4-3、II)。つぎに、*B. cereus* については、ホップ0.01%の添加により生菌数が減少し、2時間後には検出されなくなった(図4-4)。

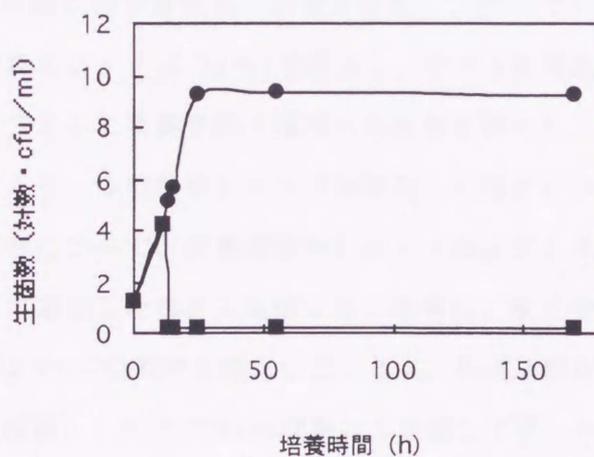


図4-4. 対数増殖期に試料を添加した時の*B. cereus*の生菌数変化

● : 無添加、■ : 0.01% ホップ

4. 併用系での試料の添加順序と濃度の影響

大腸菌に対するホップエキスとメタリン酸ナトリウム併用時における抗菌効果について、試料の添加順序と濃度の影響を検討した。

4-1. 試料の添加順序について

大腸菌の培養過程において、ホップエキスおよびメタリン酸ナトリウムを時間差で添加した場合の増殖への影響について調べた。

[実験方法]

[試料]

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

E. coli K-12 IFO3301

[抗菌力測定法]

普通ブイヨンに供試菌の前培養液を一白金耳植菌し、30℃での振とう培養を開始した。まず、培養開始時にホップ(0.01%)を添加し、その5時間後にメタリン酸ナトリウム(1%)を添加してさらに培養を続け増殖への影響を調べた。次に、培養開始時にメタリン酸ナトリウムを、5時間後にホップを添加した場合についても同様に実施した。これらの増殖状況について、培養開始時にホップおよびメタリン酸ナトリウムを単独あるいは併用にて添加した場合と比較した。培養は、微生物増殖自動測定装置にて行い、経時的に650nmの吸光度を測定した。なお、供試菌前培養液は、本菌一白金耳を普通ブイヨンに接種し、30℃で24時間振とう培養して用いた。

[結果]

ホップ(0.01%)およびメタリン酸ナトリウム(1%)の添加時間をずらして添加した場合の*E. coli* K-12の増殖曲線を図4-5に示す。両試料を培養開始時に併用すると強い抗菌力が発揮され、菌の増殖が認められなかった。しかし、どちらか一方の試料を培養開始5時間後に添加するケースでは、菌の増殖が開始され抗菌効果が低下した。すなわち、培養開始時にホップを添加し、培養5時間後にメタリン酸ナトリウムを添加した場合は、*E. coli* K-12の誘導期所要時間が無添加区より約5時間延長された。また、培養開始時にメタリン酸ナトリウムを、培養5時間後にホップを添加すると誘

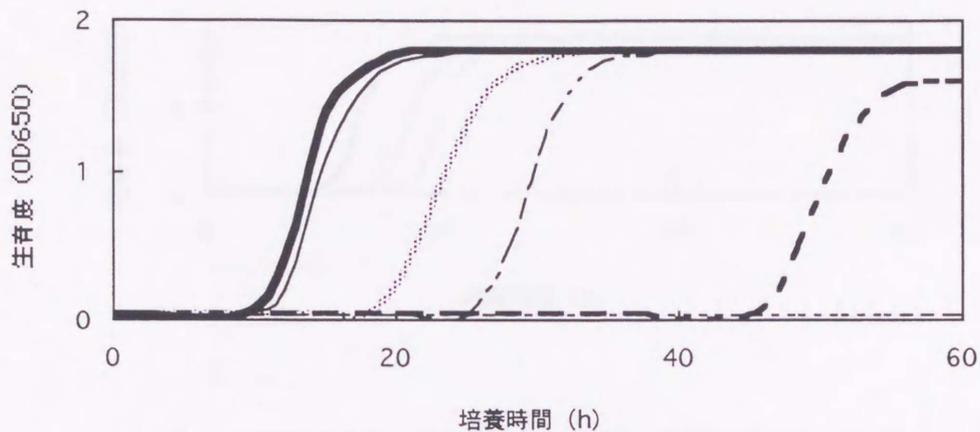


図4-5. ホップとメタリン酸ナトリウムの添加順序が*E. coli* K-12の増殖に及ぼす影響

-
- : コントロール
 - : 培養開始時; ホップ(0.01%), 培養5時間後; メタリン酸ナトリウム(1%)
 - : 培養開始時; メタリン酸ナトリウム(1%), 培養5時間後; ホップ(0.01%)
 - : 培養開始時; ホップ(0.01%)
 - · - · - · : 培養開始時; メタリン酸ナトリウム(1%)
 - : 培養開始時; ホップ(0.01%) + メタリン酸ナトリウム(1%)

導期が約32時間延長された。しかし、これらの場合、菌の増殖が可能となった。この時の抗菌効果の低下は、培養開始時にメタリン酸ナトリウムを加え、5時間後にホップを添加する場合よりも、先にホップを添加し、5時間後にメタリン酸ナトリウムを添加する方が顕著であった。

4-2. 添加順序と濃度の影響

ホップエキスおよびメタリン酸ナトリウムを時間差で添加した時の大腸菌に対する抗菌力について、各試料濃度の影響を調べた。

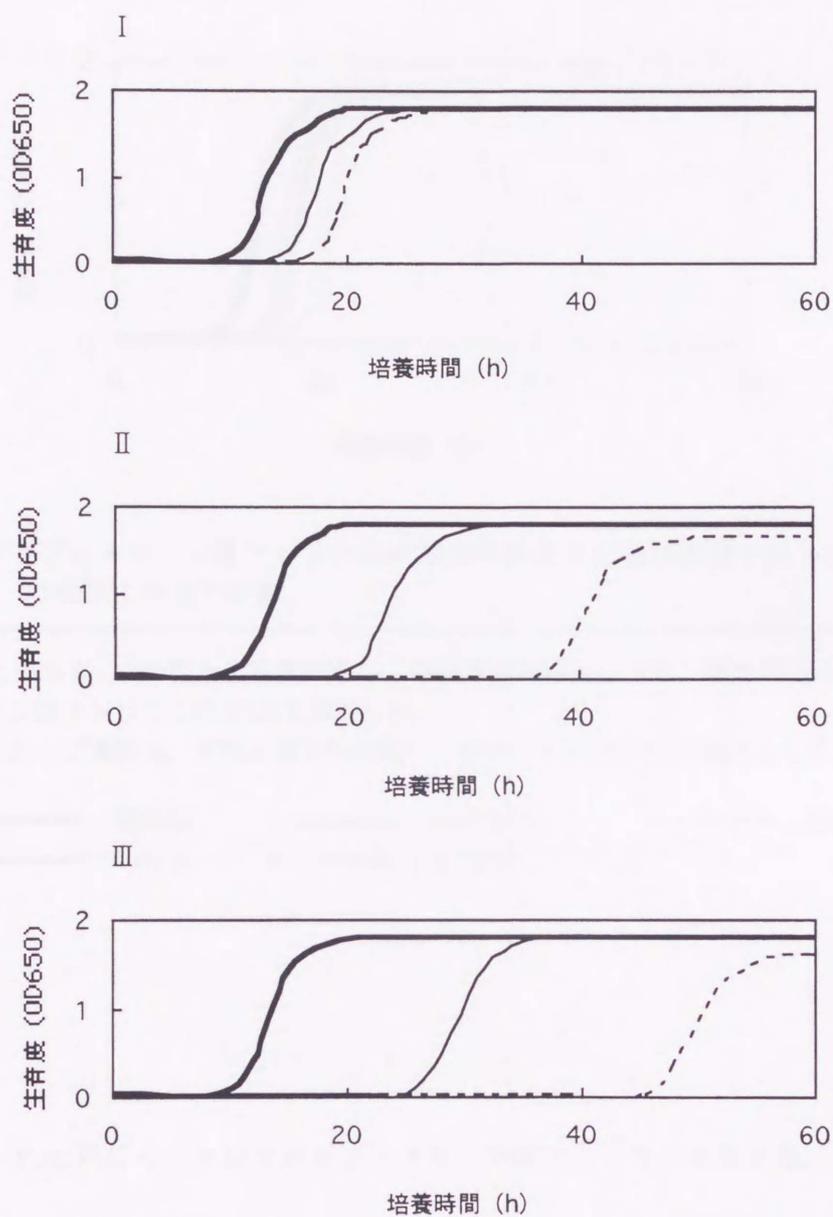


図4-6. ホップとメタリン酸ナトリウムの添加時期および添加濃度が *E. coli* K-12 の増殖に及ぼす影響

30℃で *E. coli* K-12 の振とう培養を行い、培養開始時にメタリン酸ナトリウムを、培養開始5時間後にホップ(0.01%)を添加した。

添加したメタリン酸ナトリウム濃度は、Iが0.25%、IIが0.5%で、IIIが1.0%とした。

- : 無添加
- : メタリン酸ナトリウムのみ添加
- : メタリン酸ナトリウムとホップを添加

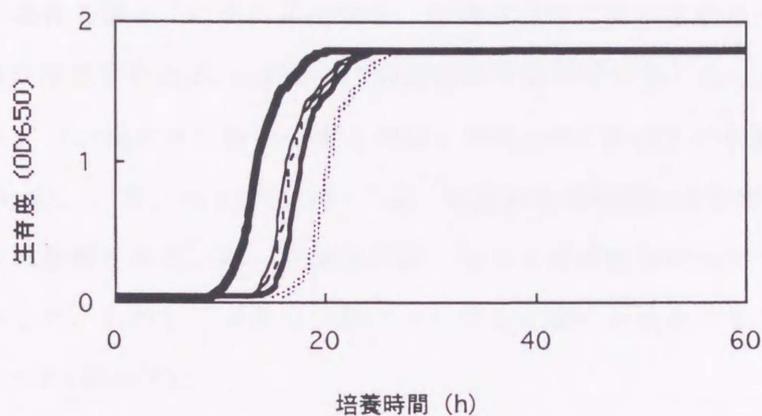


図4-7. ホップとメタリン酸ナトリウムの添加時期および添加濃度が*E. coli* K-12の増殖に及ぼす影響

30℃で*E. coli* K-12の振とう培養を行い、培養開始時にホップを、培養開始5時間後にメタリン酸ナトリウム(0.5%)を添加した。

添加したホップ濃度は、下記の通り0.0025、0.005、0.01および0.02%とした。

————— : 無添加、 - - - - - : 0.0025%、 - - - - - : 0.005%
 ———— : 0.01%、 ········· : 0.02%

[実験方法]

[試料]

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

E. coli K-12 IFO3301を用いた。

[抗菌力測定法]

前項、4-1.と同様の方法で、供試菌の培養開始時にメタリン酸ナトリウムを、培養開始5時間後にホップ(0.01%)を添加した。メタリン酸ナトリウムは、0.25、0.5および1%の濃度になるようにして実験を行った。また、培養開始時にホップを、培養開始5時間目にメタリン酸ナトリウム(0.5%)を添加する場合についても検討した。添加したホップ濃度は、0.0025、0.005、0.01および0.02%とした。

[結果]

メタリン酸ナトリウムの添加濃度を変えた場合の*E. coli* K-12 の増殖曲線を図4-6に、ホップの場合を図4-7にそれぞれ示す。培養開始時に添加されるメタリン酸ナトリウムの濃度が増加すると*E. coli* K-12の誘導期所要時間が長くなった。つまり、培養開始時のメタリン酸ナトリウム濃度と相関した*E. coli* K-12 の増殖の抑制効果がみられた(図4-6)。一方、ホップについては、培養開始時の添加濃度は*E. coli* K-12の増殖に僅かに影響を与え、ホップ濃度が高くなると増殖開始時間がごくわずかに遅れる傾向があった。しかし、メタリン酸ナトリウムの場合と比較すると、その影響は非常に小さかった(図4-7)。

5. 試料接触処理菌の増殖能

ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用系における大腸菌への抗菌効果を、各試料と本菌との接触処理時間を変えることによって検討した。

[実験方法]

[試料]

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

E. coli K-12 IFO3301を用いた。

[抗菌力測定法]

普通ブイヨンにて30℃で24時間振とう培養した供試菌を、滅菌したリン酸緩衝生理食塩酸水にて洗浄した。得られた洗浄菌体を表4-9に示す各試料溶液に懸濁(一回目)し、30℃に1時間放置した。この処理菌体を再洗浄後、さらに各試料溶液に懸濁(表4-9、二回目)し、30℃に1時間放置して試料接触処理菌体とした。これらの処理菌体について、普通ブイヨンでの増殖状況(30℃・振とう培養)を調べた。培養は、微生物増殖自動測定装置にて行い、経時的に650nmの吸光度を測定した。なお、上記に示した試料処理方法のフローチャートを図4-8に示す。

[結果]

各試料溶液中で接触処理を施した*E. coli* K-12の増殖曲線を図4-9に示す。試料溶液の種類および接触処理順の違いによって、対数増殖期前半の増殖速度にごく僅かな相違がみられたが、試料接触処理による有意な増殖への影響はないと考えられた。

Escherichia coli K-12 IFO3301培養液

← 遠沈

← 洗浄(二回)：リン酸緩衝生理食塩水

← 遠沈

洗浄菌体

試料溶液に懸濁(一回目)

← 30℃・1時間放置

← 遠沈

← 洗浄：リン酸緩衝生理食塩水

← 遠沈

試料溶液に懸濁(二回目)

← 30℃・1時間放置

← 遠沈

← 洗浄：リン酸緩衝生理食塩水

← 遠沈

←リン酸緩衝生理食塩水に懸濁

試料処理菌体

普通ブイヨンに植菌：0.02ml／培地10ml

↓
微生物増殖自動測定装置(30℃振とう培養)

図4-8. *E. coli* K-12 の試料接触処理方法

表4-9. 接触処理を施した薬剤内容

Ex. No.	薬 剤 溶 液 内 容 ^a	
	一 回 目	二 回 目
1	リン酸緩衝生理食塩水	リン酸緩衝生理食塩水
2	ホップ 0.01%	メタリン酸ナトリウム 1%
3	メタリン酸ナトリウム 1%	ホップ 0.01%
4	ホップ 0.01%	ホップ 0.01%
5	メタリン酸ナトリウム 1%	メタリン酸ナトリウム 1%
6	ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%	ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%

a : リン酸緩衝生理食塩水は調製後滅菌し、その他の溶液は滅菌水に各薬剤を溶解して調製した。

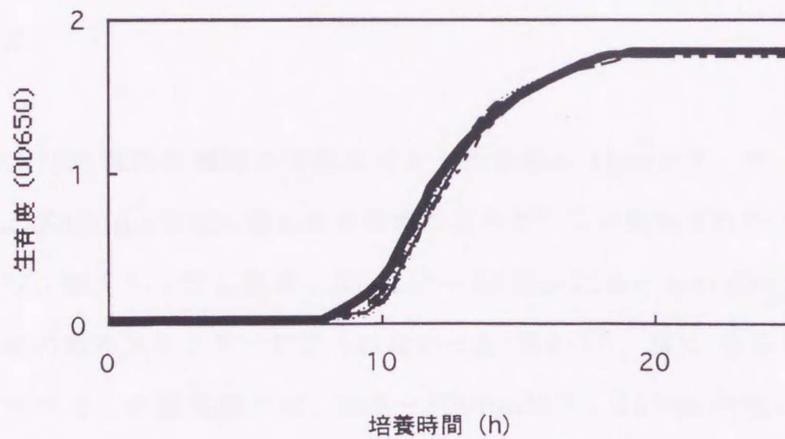


図4-9. 薬剤接触処理を施した*E. coli* K-12の増殖曲線

————— : Ex. No. 1, - - - - - : Ex. No.4
 ————— : " 2, - - - - - : " 5
 - - - - - : " 3, : " 6

Ex. No.1~6は表4-9を参照

6. 試料接触処理による菌体成分の漏洩

大腸菌をホップエキスおよびメタリン酸ナトリウム溶液で処理した場合の菌体成分の漏洩について調べた。

[実験方法]

[試料]

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

E. coli K-12 IFO3301および*B. cereus* OUT8032を用いた。

[試験方法]

供試菌を普通ブイヨンにて30℃で24時間振とう培養した。その培養液10mlを遠心分離によって集菌した後、滅菌した40mMリン酸緩衝液(pH6.5)で2回洗浄した。この洗浄菌体に、同上のリン酸緩衝液に溶解した各試料溶液10mlを懸濁し、30℃で4時間および24時間の接触処理を行った。処理終了後、再び遠心分離を行い、上清を菌体処理液とし、分光光度計にて吸収スペクトル(210nm~500nm)を測定した。なお、試料溶液としては、ホップ(0.01%)、メタリン酸ナトリウム(1%)および両試料の混合液を用いた。

[結果]

E. coli K-12の試料処理液の吸収スペクトルを図4-10に示す。ホップ処理によって、230および330nm付近に吸収極大を持つスペクトルが観察された(図4-10、II)。また、メタリン酸ナトリウム処理では、210~300nmにおけるわずかな吸収が認められたが、特徴のあるスペクトルは見られなかった(図4-10、III)。さらに、ホップとメタリン酸ナトリウムの混合液では、200~300nm間で、260nm付近に吸収極大をもつスペクトルの発現が観察された(図4-10、IV)。一方、ホップ溶液中で*B. cereus*を処理することによっても、260nm付近に吸収ピークが見られた(図4-10、V)。

7. マッシュポテトでの併用効果

ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用による大腸菌への抗菌効果を食品系、すなわちマッシュポテトを用いて調べた。

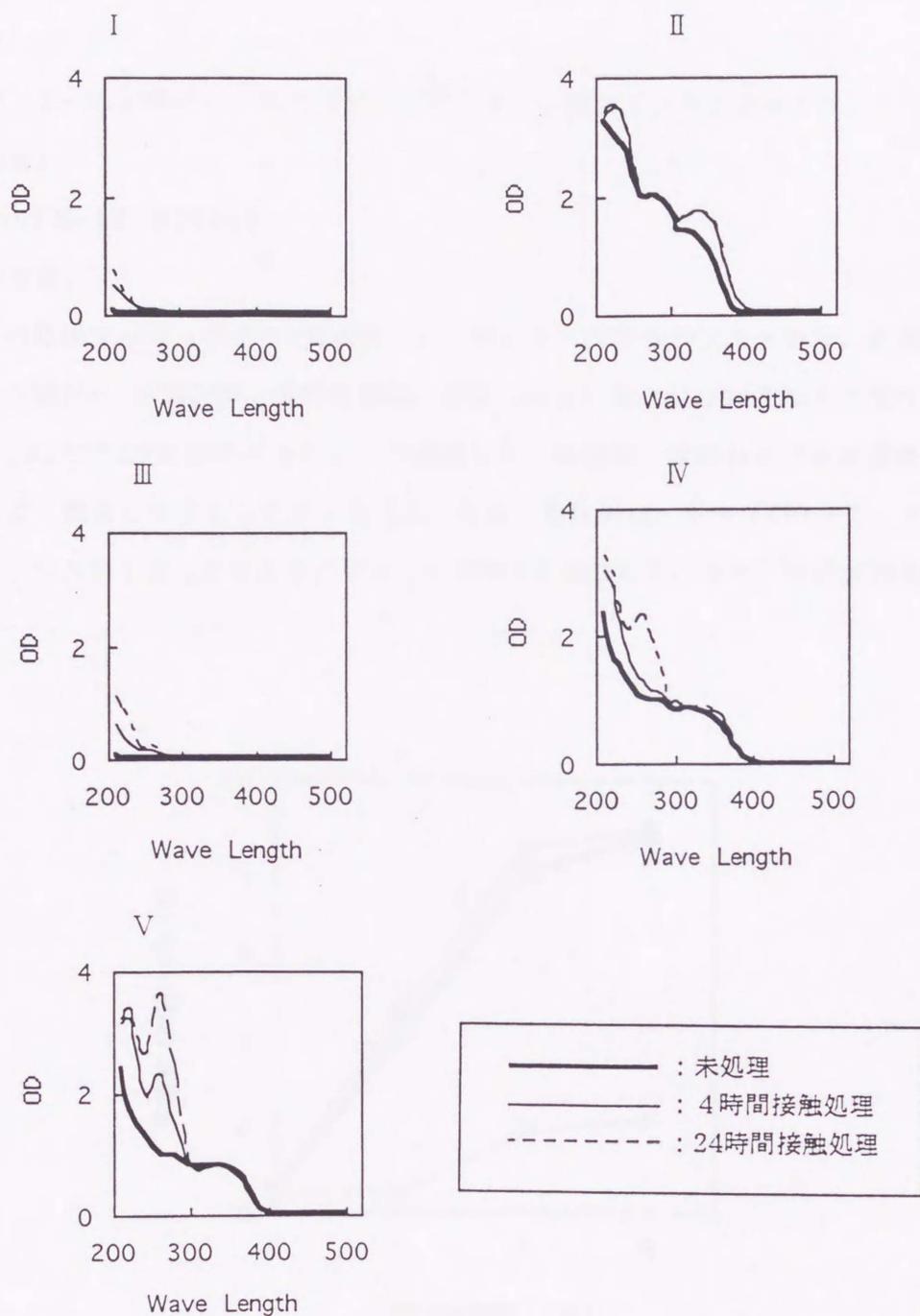


図4-10. 供試菌試料処理液の吸収曲線

- I : *E. coli* K-12 をリン酸緩衝液中で処理
 II : " をホップ溶液中で処理
 III : " をメタリン酸ナトリウム溶液中で処理
 IV : " をホップ・メタリン酸ナトリウム混合液中で処理
 V : *B. cereus* をホップ溶液中で処理

〔実験方法〕

〔試料〕

本節、1-1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

〔供試菌〕

E. coli K-12 IFO3301

〔試験方法〕

市販の乾燥マッシュポテト(原材料;じゃがいも、グリセリンエステル、脱脂粉乳、ピロリン酸Na、クエン酸、雪印乳業株、東京)100gに温水400mlを加えて攪拌混合した後、121℃で20分間オートクレーブ殺菌した。冷却後、試料および供試菌懸濁液を加えてよく混合しマッシュポテトとした。なお、各試料は、ホップが0.1%、メタリン酸ナトリウムが1%となるようにマッシュポテトに添加した。また、供試菌懸濁液は、

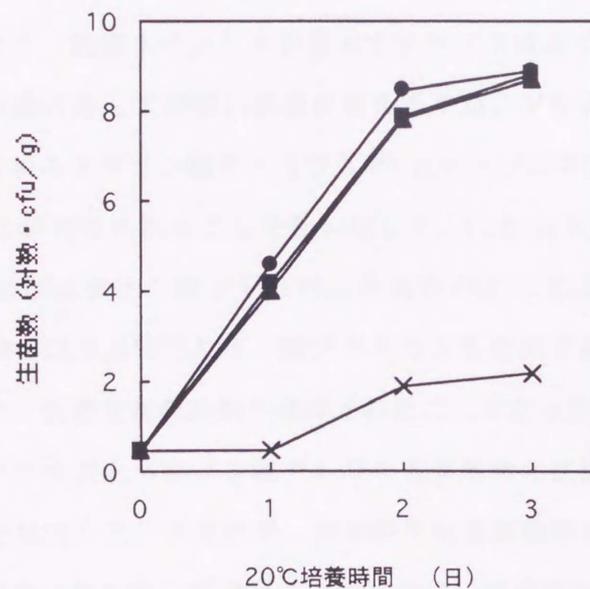


図4-11. 20℃保存中におけるマッシュポテトの生菌数変化

● : 無添加、■ : ホップ、▲ : メタリン酸ナトリウム
× : ホップ+メタリン酸ナトリウム

供試菌の一金耳を接種した普通ブイオンを30℃で24時間振とう培養した後、滅菌水にて 10^6 倍希釈して調製し、これをマッシュポテト100gにつき1mlを添加した。このようにして仕上げたマッシュポテトを無菌シャーレに封入し、20℃での保存中におけるマッシュポテトの生菌数の変化を標準寒天培地を用いた混釈法にて測定した。

[結果]

20℃に保存したマッシュポテトの生菌数変化を図4-11に示す。保存開始時の生菌数が300cfu/g以下であったマッシュポテトを20℃に保存することによって、保存1日目から急激に生菌数が増加し、2日目には 5.8×10^8 cfu/gに達し完全に腐敗した。この際、ホップ(0.1%)あるいはメタリン酸ナトリウム(1%)を添加しても、2日目には生菌数が 10^7 オーダー/gに、3日目には 10^8 オーダー/gとなり、マッシュポテトは腐敗に至った。しかし、ホップとメタリン酸ナトリウムを併用すると生菌数の増加が抑制され、保存3日目の生菌数が 1.9×10^2 cfu/gと著しく日持ちの延長効果が認められた。

8. 考察

薬剤の併用により、抗菌スペクトルが拡大するケースは広く知られている^{74~77)}。今回、グラム陽性菌に対しては強い抗菌作用を示すが、グラム陰性菌には抗菌効果が弱いと報告されているメタリン酸ナトリウム⁴⁸⁾とホップエキスとを併用すると、大腸菌に対する抗菌力が発現されることを見出した。*E.coli* K-12 IFO3301に対するホップエキスおよびメタリン酸ナトリウム単独時のMIC値は何れも3%であるが、0.01%ホップエキスと0.5%メタリン酸ナトリウムを併用することにより本菌の増殖が完全に抑制され、大きな相乗効果が発揮されたことになった。

つぎに、ホップエキスとメタリン酸ナトリウム併用時の抗菌効果について、試料の添加時期の影響を検討した。その結果、両試料を培養開始時に添加した場合、大腸菌の増殖は完全に抑制されたが、誘導期での添加では、増殖開始時間が遅れた(誘導期の延長)が、増殖は可能であった。この際、試料の添加時間が培養開始時から早いほど、誘導期の延長が長い傾向にあった。すなわち、培養が開始され、大腸菌が増殖のための活動を開始してからの試料との接触では抗菌効果が大きく減少した。また、試料を対数増殖期に添加した場合、増殖速度に低下が認められたが、溶菌現象は観察されなかった。これらのことより、ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの大腸菌に対する

抗菌作用は、静菌的であると推察される。

グラム陽性菌をメタリン酸ナトリウムで処理すると菌体成分が漏洩する⁸⁰⁾が、グラム陰性菌ではそのような漏洩は起らない。須田ら^{81, 82)}は、大腸菌の外膜がメタリン酸ナトリウムの作用障壁となっていると報告している。メタリン酸ナトリウムとホップエキスの併用により、抗菌効果が発揮されたことから、大腸菌の外膜が両試料による処理で損傷を受け、菌体成分の漏洩が起っている可能性が推定された。そこで、菌体成分の漏洩を調べたところ、260nm付近に吸収スペクトルの発現が認められた。一色ら⁸⁰⁾は、*B. subtilis*をメタリン酸ナトリウムで処理することにより、258nmに吸収極大を、234nmに吸収極小を持つ吸収スペクトルの発現を報告しており、これは、*B. subtilis*からの核酸系物質の漏洩であると推定している。このことから考えると、ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用によって、大腸菌の細胞内より核酸系物質が漏洩している可能性が推定される。しかし、両試料の作用時間および吸収スペクトルのピークレベルから考えて、その漏洩の程度は小さく、菌を死滅させるほど大きなものではないと考えられ、現に両試料との24時間の接触後も菌の生存が確認されている。

また、須田ら^{81, 82)}は、大腸菌の外膜がメタリン酸ナトリウムの作用点ともなっており、メタリン酸ナトリウム処理によって外膜のたん白質やリポ多糖体を遊離させると報告している。これらの事項から推察するに、ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用による大腸菌に対する抗菌作用は、まず、メタリン酸ナトリウムが大腸菌の外膜に作用してその構造に変化を起し、ホップエキスの膜内部への透過が容易になり、膜内部で作用したホップエキスが抗菌力を発現するためと考えられる。このことは、両試料の併用系における試料の添加順序と濃度の影響に関する検討(本節、4)の中で、培養開始時に添加されるメタリン酸ナトリウムの濃度に相関して*E. coli* K-12 IFO3301の増殖レベルが抑制された(図4-6)ことから裏づけられる。さらに、両試料の併用時に細胞内物質の漏洩が認められることより、ホップエキスは、メタリン酸ナトリウムによる膜構造の変化、すなわち損傷レベルの促進作用も発揮しており、菌体成分の漏洩およびそれに伴う生理機能の低下に関与していると推察される。代表的なバクテリオシンであるナイシンは、グラム陰性菌に抗菌性を示さない。Stevensら⁸³⁾は、EDTAとナイシンの併用によって、大腸菌を含むグラム陰性菌に抗菌性が発揮

されるようになると報告している。これは、EDTAのキレート作用によりグラム陰性菌細胞の外膜に変化が生じ、ナイシンの膜内部への透過性が向上した為である。この抗菌作用は、上記の如く推察したホップエキスとメタリン酸ナトリウムの大腸菌に対する併用効果と同様であると推定される。

第4節 ホップエキスと制菌素材の併用によるグラム陰性菌への抗菌効果

単独では、大腸菌に対して抗菌効果を示さない試料であるホップエキスとメタリン酸ナトリウムを併用することにより、大腸菌に強い抗菌力が発揮されることを前節にて見い出された。そこで、ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用系について、大腸菌以外のグラム陰性菌に対する抗菌効果を調べた。また、ホップエキスと組み合わせる制菌素材として、メタリン酸ナトリウム以外の制菌素材との併用による抗菌効果についても検討した。

1. ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用効果

ホップエキスとメタリン酸ナトリウムの併用時における抗菌効果について、グラム陰性菌への影響を調べた。

〔実験方法〕

〔試料〕

ホップエキスとしてはアロマホップ(以下、本節ではホップとする。)を用い、併用するメタリン酸ナトリウム(太平化学産業(株)、大阪)は食品添加物グレード品を使用した。

〔供試菌〕

以下に示す5種類のグラム陰性菌を用いた。

- ・ *Citrobacter freundii* IFO12681
- ・ *Klebsiella pneumoniae* (食品工場分離菌)
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080
- ・ *Pseudomonas fluorescens* (蒲鉾分離菌)
- ・ *Salmonella* Typhimurium (京都大学からの分譲菌)

〔抗菌力測定法〕

本章、第1節と同様の方法にて抗菌力を測定した。

〔結果〕

各供試菌に対するホップおよびメタリン酸ナトリウム単独時のMIC値を表4-10に示す。ホップについては、*S. Typhimurium* が0.1%で、*P. aeruginosa* が0.5%量で増殖を抑制したが、他の菌種では、増殖抑制のためには1%以上の添加が必要であった。また、メタリン酸ナトリウムについては、MIC値が2%から5%以上と強い耐性が示された。この両試料を併用した時の抗菌効果を表4-11に示す。0.01%ホップとメタリン酸ナトリウムを併用することにより、*S. Typhimurium* の増殖抑制に必要なメタリン酸ナトリウム濃度が単独時の3%から2%に減じられ、また、*P. fluorescens* では4%から3%に低下し両試料の併用効果が認められたが、*E. coli* K-12 IFO3301に対する併用効果レベルより劣った。*K. pneumoniae* に対しては、0.01%ホップと併用しても増殖を完全に抑制するメタリン酸ナトリウム濃度に変化はなかったが、同濃度でもホップとの併用によって増殖レベルの低下がみられた。*C. freundii* については併用による抗菌作用の向上は認められなかった。

表4-10. グラム陰性菌に対するホップとメタリン酸ナトリウムの抗菌効果

菌 株	MIC ^a (%)	
	ホップ	メタリン酸ナトリウム
<i>Citrobacter freundii</i>	1	> 5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	> 5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	5
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.1	3
<i>Escherichia coli</i> K-12	3	3

a : Minimum inhibitory concentration

表4-11. ホップとメタリン酸ナトリウムの併用によるグラム陰性菌への抗菌効果

試料内容		増殖 ^a (OD660)					
ホップ (%)	メタリン酸ナトリウム (%)	A	B	C	D	E	F
0	0	+	+	+	+	+	+
0.01	0.25	+	+	+			
0.01	0.5	0	+	+	+	+	+
0.01	0.75	0	+	+			
0.01	1.0	0	+	+	0.83	+	+
0.01	2.0	0	0	0	0.65	+	+
0.01	3.0				0	+	+
0.01	4.0				0	+	+
0.01	5.0				0	+	0.59
0	0.5	+	+	+	+	+	+
0	1.0	+	+	+	+	+	+
0	2.0	+	0.13	0	0.93	+	+
0	3.0	0	0	0	0.13	+	+
0	4.0	0	0	0	0	+	+
0	5.0	0	0	0	0	+	+

a : + ; 培養48時間目のO.D.値が1.0以上

菌株 : A ; *E. coli* K-12 IFO3301
 B ; *S. Typhimurium*
 C ; *P. aeruginosa*
 D ; *P. fluorescens*
 E ; *C. freundii*
 F ; *K. pneumoniae*

2. ホップエキスと酢酸ナトリウムの併用効果

日持向上剤の主剤の一つである酢酸ナトリウムについて、ホップエキスと併用した場合のグラム陰性菌に対する抗菌性を検討した。

〔実験方法〕

〔試料〕

ホップエキスとしてはアロマホップを用い、併用する酢酸ナトリウム(大東化学(株)、東京)は食品添加物グレード品を使用した。

〔供試菌〕

以下に示す6種類のグラム陰性菌を用いた。

- ・ *Escherichia coli* K-12 IFO3301
- ・ *Citrobacter freundii* IFO12681
- ・ *Klebsiella pneumoniae* (食品工場分離菌)
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080
- ・ *Pseudomonas fluorescens* (蒲鉾分離菌)
- ・ *Salmonella* Typhimurium (京都大学からの分譲菌)

〔抗菌力測定法〕

本章、第1節と同様の方法にて実施した。

〔結果〕

各供試菌に対する酢酸ナトリウムのMIC値を表4-12に示す。各供試菌の増殖抑制には、*P. aeruginosa* および *P. fluorescens* の場合は2%、*S. Typhimurium* および *C. freundii* では4%、*E. coli* K-12 および *K. pneumoniae* に対しては5%以上の酢酸ナトリウムが必要であった。この酢酸ナトリウムとホップを併用した場合の各供試菌に対する抗菌効果を表4-13に示す。何れの菌株についても、試料の併用による抗菌効果の向上が認められ、特に、ホップ0.01%との併用によって、*P. aeruginosa* では酢酸ナトリウム濃度を単独時の2分の1に、*P. fluorescens* では2分の1以下にすることができた。また、*E. coli* K-12、*S. Typhimurium* および *K. pneumoniae* に対しては、併用により酢酸ナトリウム濃度を1%以上減少させることが可能であった。*C. freundii* については、ホップとの併用時、増殖を完全に抑制するための酢酸ナトリウム濃度に変化はなかったが、同じ酢酸ナトリウム濃度でも併用により増殖度

表4-12. グラム陰性菌に対する酢酸ナトリウムの抗菌効果

菌 株	MIC ^a (%)
<i>Citrobacter freundii</i>	4
<i>Escherichia coli</i> K-12	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4

a : Minimum inhibitory concentration

が低下することによって併用効果が認められたことになる。

3. ホップエキスとグリシンの併用効果

日持向上剤の主剤の一つであるグリシンとホップエキスとを併用した時のグラム陰性菌に対する抗菌性を検討した。

〔実験方法〕

〔試料〕

ホップエキスとしてはアロマホップを用い、併用するグリシン(昭和電工(株)、東京)は食品添加物グレード品を使用した。

〔供試菌〕

前項、2.と同じ

〔抗菌力測定法〕

本章、第1節と同様の方法にて実施した。

〔結果〕

各供試菌に対するグリシンのMIC値を表4-14に示す。各供試菌の増殖抑制には、*E. coli* K-12 に対しては2%、*C. freundii*、*K. pneumoniae* および *S. Typhimurium* では3%、*P. aeruginosa* および *P. fluorescens* には4%濃度のグ

表4-13. ホップと酢酸ナトリウムの併用によるグラム陰性菌への抗菌効果

試料内容		増殖 ^a (OD660)					
ホップ(%)	酢酸ナトリウム(%)	A	B	C	D	E	F
0	0	+	+	+	+	+	+
0.01	0.5	+	+	0.59	+	+	+
0.01	0.75	+	+	0.26	0	+	+
0.01	1.0	+	+	0	0	+	+
0.01	2.0	+	0.35	0	0	+	+
0.01	3.0	+	0			0.30	+
0.01	4.0	0.09	0			0	0.02
0.01	5.0	0					0
0	1.0	+	+	0.18	0.34	+	+
0	2.0	+	+	0	0	+	+
0	3.0	+	0.10	0	0	+	+
0	4.0	0.91	0	0	0	0	+
0	5.0	0.10	0	0	0	0	0.43
0	6.0	0					

a : + ; 培養48時間目のO.D.値が1.0以上

菌株 : A ; *E. coli* K-12
 B ; *S. Typhimurium*
 C ; *P. aeruginosa*
 D ; *lP. fluorescens*
 E ; *C. freundii*
 F ; *K. pneumoniae*

表4-14. グラム陰性菌に対するグリシンの抗菌効果

菌 株	M I C ^a (%)
<i>Citrobacter freundii</i>	3
<i>Escherichia coli</i> K-12	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3

a : Minimum inhibitory concentration

リシン添加が必要であった。このグリシンとホップを併用した場合の各供試菌に対する抗菌効果を表4-15に示す。グリシンと0.01%ホップとを併用することによって、*P. aeruginosa*、*P. fluorescens* および*S. Typhimurium* に対して、増殖抑制のためのグリシン量を単独時よりも1%量減じることが可能であり、併用による抗菌効果の向上が認められた。一方、*E. coli* K-12 および*K. pneumoniae* に対しては、ごく僅かに併用効果が認められたが、*C. freundii* では併用による抗菌力向上は示されなかった。

4. 考察

メタリン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよびグリシンとホップエキスとの併用によるグラム陰性菌への抗菌効果について検討したところ、一部組合せを除き概ね併用による相加・相乗的な抗菌効果の向上が認められた。制菌素材の抗菌作用は、pHによって影響を受ける⁸⁴⁾。グリシンではpHが酸性になるとやや抗菌作用が弱くなり、酢酸ナトリウムの場合、その抗菌力は解離度に基づくため、pHが酸性では極めて強い作用が発揮される。0.01%ホップはそれら試料のpHに影響を及ぼさないことより、今回認められた併用による抗菌力の向上はpH変化によるものではなく、試料同士の相乗作用と考えられる。

酢酸ナトリウムおよびグリシンは日持向上剤製剤の主剤として扱われており⁸⁵⁾、代

表4-15. ホップとグリシンの併用によるグラム陰性菌への抗菌効果

試料内容		増殖 ^a (OD660)					
ホップ (%)	グリシン (%)	A	B	C	D	E	F
0	0	+	+	+	+	+	+
0.01	0.5	0.58	0.58			+	+
0.01	0.75	0.61	0.47	+	+	+	+
0.01	1.0	0.37	0.24	+	+	+	0.48
0.01	2.0	0	0	0.53	0.91	+	0.23
0.01	3.0		0	0	0	0	0
0.01	4.0			0	0		
0	1.0	0.75	0.36	+	+	+	0.90
0	2.0	0	0.10	0.71	+	+	0.54
0	3.0	0	0	0.61	+	0	0
0	4.0	0	0	0	0	0	0
0	5.0	0	0	0	0	0	0

a : + ; 培養48時間目のO.D.値が1.0以上

菌株 : A ; *E. coli* K-12
 B ; *S. Typhimurium*
 C ; *P. aeruginosa*
 D ; *P. fluorescens*
 E ; *C. freundii*
 F ; *K. pneumoniae*

表的な食品用制菌剤として汎用されている。これらの薬剤とホップエキスの組合せにより抗菌力の向上が認められたことは、より強力な日持ち向上作用を持った食品用制菌剤設定の可能性が示されたことになる。また、薬剤の添加量低減によるコストメリットや食味への悪影響の緩和対策としても非常に有望であると考えられる。

第5節 微生物の耐熱性に及ぼすホップエキスの影響

微生物の耐熱性に影響を与える抗菌性物質が多く知られている^{86~88)}。そこで、耐熱性芽胞菌である*Bacillus cereus*の芽胞と非耐熱性菌である*Escherichia coli*について、それらの耐熱性に及ぼすホップエキスの影響を調べた。

1. セレウス菌芽胞の耐熱性に及ぼす影響

B. cereus 芽胞の耐熱温度に対するホップエキスの影響を検討した。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとしてはアロマホップ(以下、本節ではホップとする。)を用いた。また、ホップと併用したメタリン酸ナトリウム(太平化学産業(株)、東京)は食品添加物グレード品を使用した。

[供試菌]

Bacillus cereus OUT8032を用いた。

[試験方法]

滅菌した40mMリン酸緩衝液(pH6.5)に試料を溶解し、試験管(φ18)に10ml分注した。これに、供試菌の芽胞懸濁液を0.1ml加え、加熱処理(沸騰水中にて、5、10、15および20分間加熱)した後、急冷した。この加熱処理液の生菌数を、標準寒天培地を用いた混釈法にて求めた。すなわち、30℃にて48時間の培養後に形成されたコロニー数を計測した。芽胞懸濁液は、標準寒天培地にて形成された供試菌芽胞を40mMリン酸緩衝液(pH6.5)に懸濁(マクファランドNo.2程度)して調製した。

[結果]

加熱処理による*B. cereus*の生存芽胞数変化を図4-12に示す。加熱時間が長くなるにつれて生存芽胞数は減少したが、この場合、ホップやメタリン酸ナトリウムが存在しても、芽胞数の減少速度に有意な変化はみられなかった。すなわち、両試料は、*B. cereus* 芽胞の耐熱性に影響を及ぼさないと考えられた。

2. 大腸菌の熱耐性に及ぼす影響

大腸菌の熱耐性に対するホップエキスの影響を検討した。

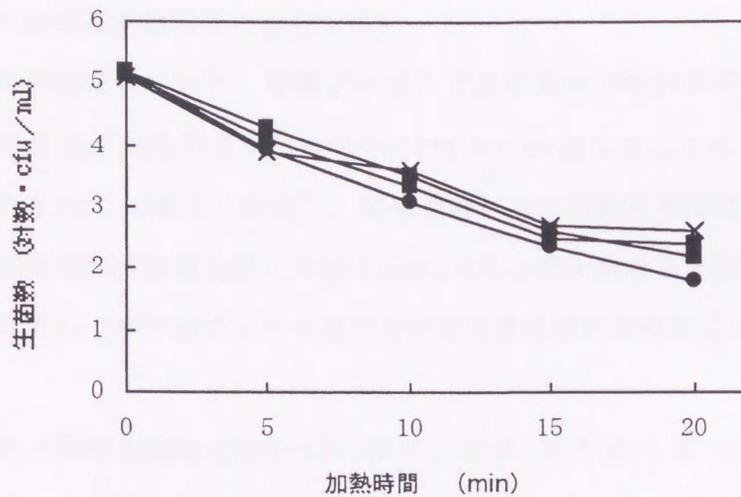


図4-12. 加熱処理による*B. cereus*の生存芽胞数変化

- × : 無添加
- : ホップ 0.01%
- : メタリン酸ナトリウム 1%
- ▲ : ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%

[実験方法]

[試料]

前項、1.と同じく、アロマホップとメタリン酸ナトリウムを用いた。

[供試菌]

Escherichia coli K-12 IFO3301を用いた。

[加熱処理後の生菌数測定方法]

滅菌した40mMリン酸緩衝液(pH6.5)に試料を溶解し、試験管(φ18)に10ml分注した。これに、供試菌培養液0.02mlを添加し、50℃の湯浴中にて加熱処理(0.5、1および2時間)した後、急冷した。この加熱処理液の生菌数を、標準寒天培地およびデゾキシコレート寒天培地(日水製薬(株)、東京)を用いた混釈法によって求めた。すなわち、標準寒天培地は30℃にて48時間、デゾキシコレート寒天培地については30℃で24時間培養した後に形成されたコロニー数を計測した。なお、供試菌培養液は、供試

菌を接種した普通ブイオンを30℃にて24時間振とう培養して調製した。

〔加熱処理菌の誘導期所要時間の測定方法〕

加熱処理後の供試菌について、普通ブイオンでの増殖時における誘導期の所要時間を調べた。加熱処理が施された供試菌を 10^7 オーダー/mlとなるように普通ブイオンに接種した。これを30℃で振とう培養し、増殖過程における誘導期時間を調べた。培養は、微生物自動増殖測定装置を用いて650nmにおける吸光度を自動的に測定し、培養開始時から吸光度の上昇が認められるまでの時間を誘導期所要時間とした。

〔結果〕

加熱処理後の大腸菌数変化を図4-13に示す。供試した*E. coli* K-12は、50℃で2時間の加熱処理によっても生菌数に減少はみられなかった。また、ホップ(0.01%)の存在下でも同様に生菌数は一定であった。一方、メタリン酸ナトリウム(1%)の添加によって、加熱処理(50℃・2時間)後の生菌数が約100分の1となり、ホップとメタリン酸ナトリウムの併用区ではさらに約10000分の1にまで減少した(図4-13、I)。この傾向は、デゾキシコレート寒天培地を使用した場合に顕著であった。メタリン酸ナトリウムの添加により50℃加熱・2時間後に、両試料併用の場合は加熱1時間後には生菌数はほとんど検出されなかった(図4-13、II)。しかしながら、デゾキシコレート寒天培地においても、ホップ単独区では生菌数の減少は認められなかった。

つぎに、加熱処理菌の普通ブイオンでの増殖能について検討した。各加熱処理菌の30℃振とう培養時における誘導期の所要時間を表4-16に示す。加熱処理(50℃・60分間)中にメタリン酸ナトリウム(1%)が存在することにより、誘導期時間が約2.1倍に延長されたが、ホップは全く影響を及ぼさなかった。また、ホップとメタリン酸ナトリウムの併用系では、誘導期時間が約2.6倍となり、併用による熱損傷の拡大が示唆された。

以上の結果より、ホップは、*E. coli* K-12の耐熱性に影響を及ぼさないが、メタリン酸ナトリウムは熱損傷を促進すると考えられた。また、メタリン酸ナトリウムとホップの併用によって、さらに熱損傷が拡大され耐熱性が低下することが確認された。

3. 考察

微生物の耐熱性は固有の遺伝的性質であるが、いくつかの環境因子によって変動す

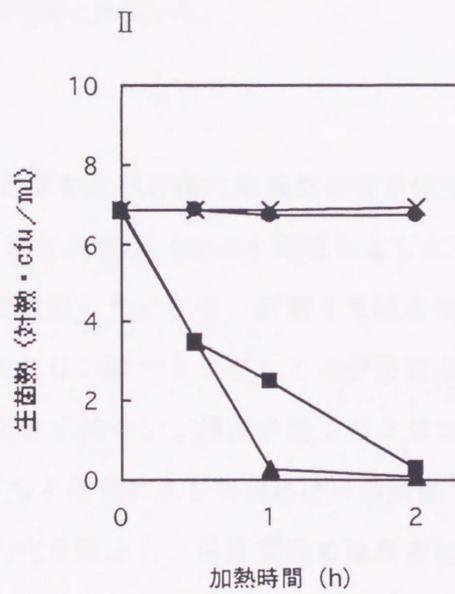
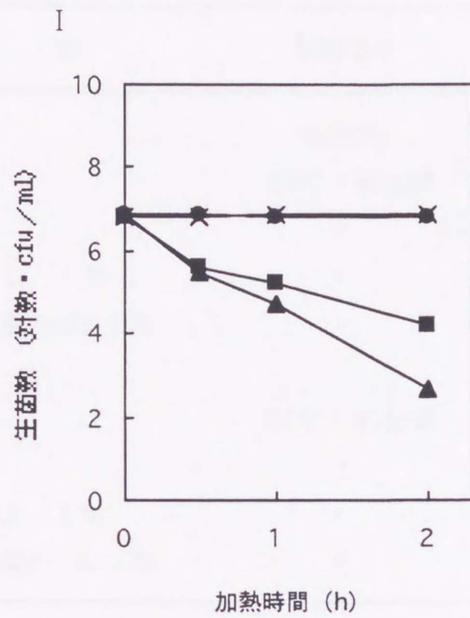


図4-13. 加熱処理による *E. coli* K-12の生存菌数変化

×：無添加、●：ホップ 0.01%、■：メタリン酸ナトリウム 1%
▲：ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%

I：標準寒天培地、II：デゾキシコレート寒天培地

表4-16. 加熱処理を受けた*E. coli* K-12の誘導期所要時間

検 体 内 容	加熱条件	誘導期時間(h)	倍率 ^a
無添加	未加熱	6.0	—
無添加	50℃・30分間	7.0	1
ホップ 0.01%	"	7.0	1.0
メタリン酸ナトリウム 1%	"	13.5	1.9
ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%	"	14.2	2.0
無添加	50℃・60分間	7.0	1
ホップ 0.01%	"	7.0	1.0
メタリン酸ナトリウム 1%	"	14.4	2.1
ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%	"	18.2	2.6

^a 検体無添加区を50℃にて30分間加熱処理した供試菌の誘導時間を1として、他の誘導期所要時間と比較した。

る。水分、pH、抗菌性物質および各種の栄養成分等が微生物の耐熱性に影響を及ぼす^{86~89)}。今回、ホップエキスが*B. cereus* 芽胞および*E. coli* K-12の耐熱性に影響を与えるか否かについて検討したところ、影響を及ぼさなかった。しかしながら、*E. coli* K-12に対して、メタリン酸ナトリウムとの併用により、メタリン酸ナトリウム単独時よりも耐熱性が大きく減少し、選択培地でのコロニー形成率の低下および加熱処理菌の増殖能力の低下など併用により加熱処理時の損傷が促進されると考えられた。

微生物による食品の劣化を防止し、保存期間の延長を図るとともに食中毒等の危険を減じる手段として、加熱殺菌は重要な方法の一つである。しかしながら、多くの食品は、加熱により変色を起こしたり風味が損なわれる。また、栄養成分等の破壊も起こる。従って、加熱殺菌に当たっては、加熱による品質劣化を最小限にとどめ、食品中に存在する有害微生物を効率良く死滅させることが必要である。ホップエキス0.01%およびメタリン酸ナトリウム1%は、食品の風味に影響を与えない。この両試料の併用によって、汚染指標菌である大腸菌の耐熱性低下作用(加熱損傷促進作用)が示さ

れることは、食品衛生上意義深く、かつ食品の保存性向上の一助となり、加熱殺菌の効率化の有効な手段になりうると考える。

第6節 大腸菌の凍結・解凍耐性に及ぼすホップエキスの影響

凍結・解凍処理により微生物が損傷を受けるケースが知られている^{90~93)}。そこで、この損傷に及ぼすホップエキスの影響について検討した。

1. インビトロ系での凍結耐性に及ぼす影響

大腸菌に凍結・解凍処理を施した時、本菌の凍結損傷にホップエキスが及ぼす影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとしてはアロマホップ(以下、本節ではホップとする)を用いた。また、ホップと併用したメタリン酸ナトリウム(太平化学産業株、東京)は食品添加物グレード品を使用した。

[供試菌]

Escherichia coli K-12 IFO3301を用いた。

[凍結・解凍処理後の生菌数測定方法]

普通ブイヨンにて30℃で24時間前培養した供試菌を、滅菌後試料を溶解した普通ブイヨンに 10^7 オーダー/ml前後となるように懸濁した。この普通ブイヨン10mlを試験管(φ18)に入れ、-20℃の冷凍庫にて凍結させた。凍結開始1日目および8日目に、普通ブイヨンを室温で解凍し、普通ブイヨン中の生菌数を測定した。生菌数の測定は、標準寒天培地およびデゾキシコレート寒天培地を用いた混釈法を用いて実施した。標準寒天培地は30℃で48時間、デゾキシコレート寒天培地の場合は30℃にて24時間の培養後に形成されたコロニー数を計測した。ホップは0.01%を、メタリン酸ナトリウムは1%となるように普通ブイヨンに添加した。また、普通ブイヨンにグリセリンを10%添加した場合についても同様に凍結・解凍後の生菌数を測定した。なお、今回実施した凍結・解凍過程における普通ブイヨンの経時温度変化を図4-14に示す。

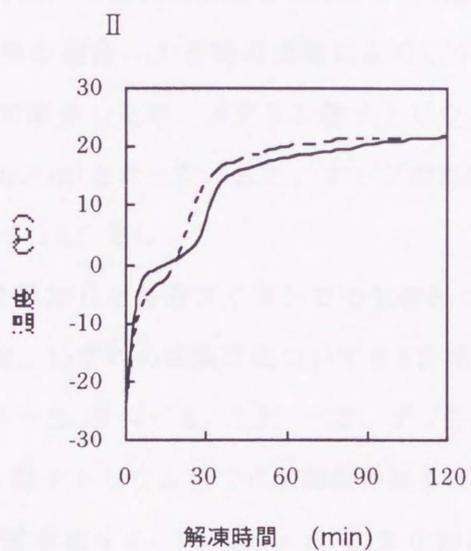
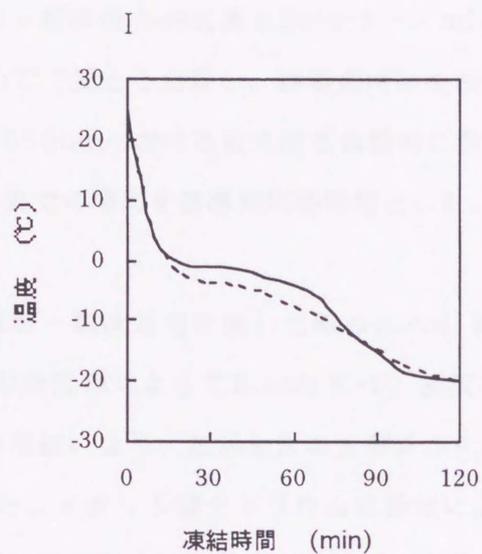


図4-14. 凍結・解凍処理時における普通ブイヨンの経時温度変化

————— : 普通ブイヨン
 - - - - - : 10%グリセリン添加普通ブイヨン

I : 凍結処理時、II : 解凍処理時

〔凍結・解凍処理菌の誘導期所要時間の測定〕

凍結・解凍処理後の供試菌について、普通ブイヨンでの増殖時における誘導期の所要時間を調べた。凍結・解凍後の供試菌を 10^{10} オーダー/mlとなるように普通ブイヨンに接種した。これを30℃で振とう培養し、誘導期時間を調べた。培養は、微生物自動増殖測定装置を用いて650nmにおける吸光度を自動的に測定し、培養開始時から吸光度の上昇が認められるまでの時間を誘導期所要時間とした。

〔結果〕

普通ブイヨンにて凍結・解凍処理を施した時の*E. coli* K-12の生存菌数変化を図4-15に示す。凍結・解凍処理によって*E. coli* K-12菌数の低下が認められた。標準寒天培地では8日間の凍結により、無添加区の生菌数が 9.6×10^6 cfu/mlから 8.7×10^3 cfu/mlに減少した。メタリン酸ナトリウムの添加によっては 9.5×10^2 cfu/mlまで減少し、ホップ添加区では、30cfu/mlまで減少した。また、ホップとメタリン酸ナトリウムの併用区では、生菌数は検出されなかった(図4-15、I)。一方、デゾキシコレート寒天培地使用の場合、1日間の凍結により、 9.6×10^6 cfu/mlの菌数が 3.6×10^3 cfu/mlにまで減少したが、メタリン酸ナトリウムが存在すると、さらに生菌数が減り 8.1×10^2 cfu/mlとなった。また、ホップ添加区では凍結1日目で生菌数は検出されなかった(図4-15、II)。

つぎに、グリセリンを添加した普通ブイヨンでの生存*E. coli* K-12菌数を図4-16に示す。標準寒天培地では、いずれの試験区についても8日間の凍結による生菌数の減少はほとんど認められなかった(図4-16、I)。一方、デゾキシコレート寒天培地では、無添加区およびメタリン酸ナトリウム区では生菌数の減少は認められなかったが、ホップの添加によって、生菌数は 6.4×10^3 cfu/mlとなり約1000分の1に低下した(図4-16、II)。すなわち、ホップ(0.01%)の添加により、凍結・解凍時の*E. coli* K-12の死滅が促進されており、凍結変性防止剤であるグリセリン添加区でも凍結耐性の低下が認められた。

普通ブイヨンにて凍結・解凍処理を施した*E. coli* K-12の誘導期所要時間を表4-17に示す。ホップの添加によって、8日間凍結処理した*E. coli* K-12の誘導期が約4時間延長され、無添加区の約1.2倍となったが、メタリン酸ナトリウム添加区では誘導期の延長は認められなかった。しかし、ホップとメタリン酸ナトリウムの併用に



図4-15. 普通ブイヨンでの凍結・解凍処理後の*E. coli* K-12の生存菌数変化

×：無添加、●：ホップ 0.01%、■：メタリン酸ナトリウム 1%
 ▲：ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%

I：標準寒天培地、II：デゾキシコレート寒天培地

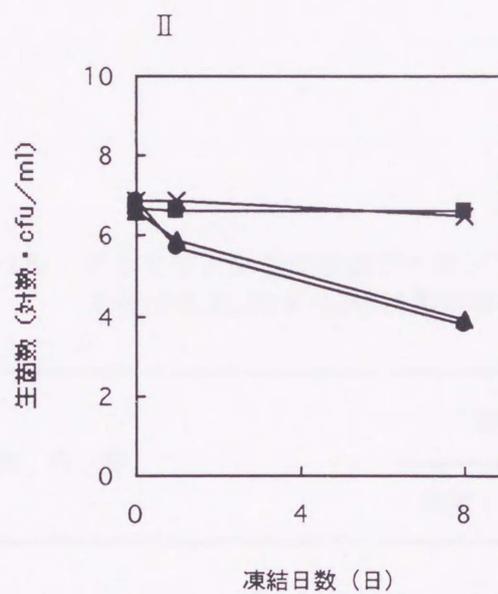
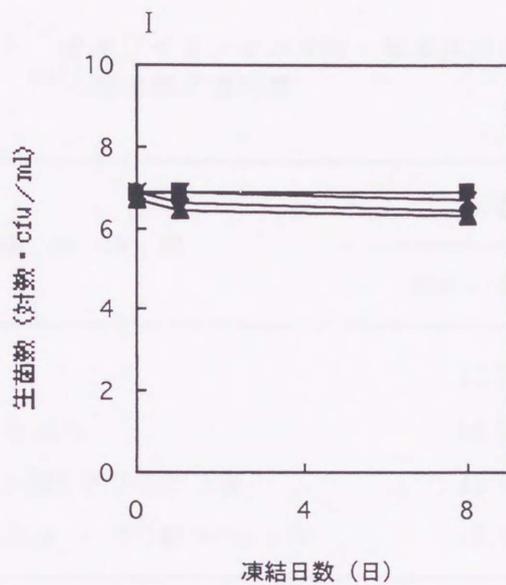


図4-16. グリセリン添加の普通ブイヨンでの凍結・解凍処理後の *E. coli* K-12の生存菌数変化

×：無添加、●：ホップ 0.01%、■：メタリン酸ナトリウム 1%
▲：ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%

I：標準寒天培地、II：デゾキシコレート寒天培地

表4-17. 普通ブイヨンでの凍結・解凍処理を受けた*E.coli* K-12の誘導期所要時間

検体内容	誘導期所要時間 (h)	
	凍結1日目	凍結8日目
無添加	12.5	15.8
ホップ 0.01%	14.0	19.5
メタリン酸ナトリウム 1%	12.7	15.8
ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%	16.4	25.4

表4-18. グリセリン添加の普通ブイヨンでの凍結・解凍処理を受けた*E.coli* K-12の誘導期所要時間

検体内容	誘導期所要時間 (h)	
	凍結1日目	凍結8日目
無添加	6.4	6.6
ホップ 0.01%	7.6	9.3
メタリン酸ナトリウム 1%	6.4	6.7
ホップ 0.01% + メタリン酸ナトリウム 1%	7.9	10.6

よって、誘導期所要時間が無添加区より約10時間延長された。また、表4-18に示すように、グリセリンを添加した普通ブイヨンでも同様の傾向であり、ホップの添加により、誘導期が約1.4倍に延長された。一方、メタリン酸ナトリウム単独での影響は認められなかったが、ホップとメタリン酸ナトリウムの併用によって、*E. coli* K-12への相乗作用的な損傷が加わり誘導期が約1.6倍にまで延長された。

以上の結果より、*E. coli* K-12が凍結・解凍処理によって受ける損傷をホップが大きく促進すると考えられた。

2. 豚ミンチ肉系での凍結耐性に及ぼす影響

大腸菌が存在する豚ミンチ肉に凍結・解凍処理を施した時、本菌の凍結損傷にホップエキスが及ぼす影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

アロマホップを用いた。

[供試菌]

Escherichia coli K-12 IFO3301

[試験方法]

豚ミンチ肉に滅菌水を90:10の比率にて混合し、ハンバーグ状に成型した。これをホットプレートにて加熱(200℃、片面5分間)して焼き上げた。冷却後、供試菌培養液0.2mlを豚ミンチ肉(約30g)の片面に滴下し、コンラージ棒で全体に広げて植菌し、これを-20℃に凍結保存した。この凍結保存豚ミンチ肉を経日的に解凍(室温での自然解凍)し、供試菌の生存菌数測定(標準寒天培地およびデゾキシコレート寒天培地を使用)および生存菌の増殖状況(増殖曲線)を前項、1.と同様の方法を用いて調べた。なお、供試菌培養液は、本菌を接種した普通ブイヨンを30℃で24時間振とう培養して調製した。

[結果]

-20℃での凍結・解凍処理後における豚ミンチ肉の生菌数変化を図4-17に示す。まず、標準寒天培地では、スタート時に 4.9×10^5 cfu/gの*E. coli* K-12が存在したが、

-20℃で28日間の凍結後も菌数にほとんど変化はなく、 1.9×10^5 cfu/gが検出され

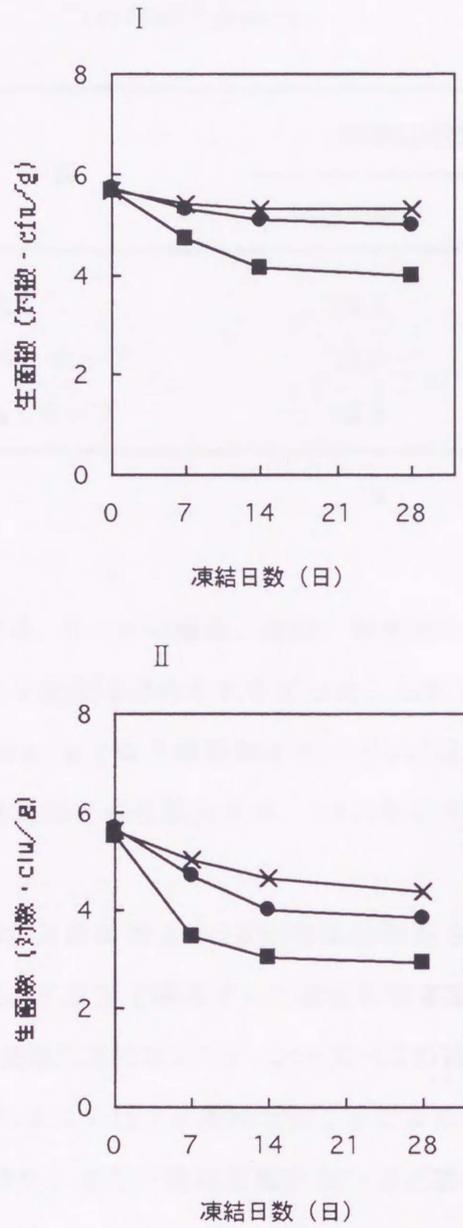


図4-17. -20℃に保存した豚ミンチ肉における*E.coli* K-12の生存菌数変化

×：無添加、●：0.1% ホップ、■：1% ホップ

I：標準寒天培地、II：デゾキシコレート寒天培地

表4-19. -20℃にて凍結保存した豚ミンチ肉に生存した
E. coli K-12の普通ブイヨンでの増殖能
 (誘導期所要時間)

試料	誘導期所要時間 (時間)	
	14日間凍結	28日間凍結
無添加	10.5	11.5
0.1% ホップ	11.0	12.0
1% ホップ	12.5	13.5

た。ホップ添加区では、0.1%の場合、凍結・解凍後の生菌数は無添加区よりは減少傾向があったが、大きな変化は認められなかった。しかし、1%区では、凍結28日目の生菌数が 9.2×10^3 cfu/gとなり無添加区の10分の1以下となった。この傾向は、デゾキシコレート寒天培地でさらに拡大され、28日目の生菌数が 8.7×10^2 cfu/gにまで減少した。

つぎに、-20℃に14日間および28日間凍結保存された豚ミンチ肉に生存した*E. coli* K-12を、普通ブイヨンで増殖させた場合の誘導期所要時間を表4-19に示す。28日間凍結した場合、無添加区における*E. coli* K-12の誘導期所要時間は11.5時間であったが、ホップを0.1%あるいは1%添加することにより、誘導期時間がそれぞれ12.0、13.5時間と延長された。また、凍結日数が長いほど誘導期所要時間が延長される傾向が示された。

以上の結果より、豚ミンチ肉においても、*E. coli* K-12が凍結・解凍処理によって受ける損傷をホップエキスが促進し、耐凍性が低下することが確認された。

3. 蒲鉾での凍結耐性に及ぼす影響

大腸菌が存在する蒲鉾に凍結・解凍処理を施した時、本菌の凍結損傷にホップエキ

スが及ぼす影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

アロマホップを用いた。

[供試菌]

Escherichia coli K-12 IFO3301を用いた。

[試験方法]

第2章、第2節の方法に準じて調製したスライス蒲鉾の片面に、供試菌培養液0.2mlを滴下してコンラージ棒で全面に広げて植菌した後、 -20°C にて凍結保存した。この凍結保存蒲鉾を経日的に解凍し、供試菌の生存菌数測定(標準寒天培地およびデゾキシコレート寒天培地を使用。)および生存菌の増殖状況(増殖曲線)を前項、2.と同様の方法にて調べた。なお、供試菌懸濁液は、本菌を接種した普通ブイヨン 30°C で24時間振とう培養して調製した。

[結果]

-20°C での凍結・解凍処理後における蒲鉾の生菌数変化を図4-18に示す。 $3.4 \times 10^5 \text{cfu/g}$ の*E. coli* K-12が存在した蒲鉾を -20°C にて31日間凍結保存することにより、生菌数が標準寒天培地では $1.4 \times 10^5 \text{cfu/g}$ に、デゾキシコレート寒天培地では $3.4 \times 10^4 \text{cfu/g}$ となった。この時、0.01%および0.1%のホップ添加は*E. coli* K-12の生存菌数に有意な影響を与えなかったが、1%の添加によって、31日後の生菌数が標準寒天培地では $3.1 \times 10^3 \text{cfu/g}$ と約100分の1に、デゾキシコレート寒天培地では $1.0 \times 10^1 \text{cfu/g}$ とほとんど検出されないレベルまで減少した。

つぎに、 -20°C にて31日間凍結保存された蒲鉾に生存した*E. coli* K-12を、普通ブイヨンで増殖させた時の誘導期所要時間を表4-20に示す。無添加区の*E. coli* K-12を普通ブイヨンにて増殖させた時の誘導期所要時間は9.5時間であったが、ホップの添加により添加濃度に相関した誘導期の延長が認められ、1%区では所要時間が14.5時間となった。

以上の結果より、蒲鉾に存在する*E. coli* K-12についても、凍結・解凍処理時に起こる本菌への凍結損傷を大きく促進することが確認された。

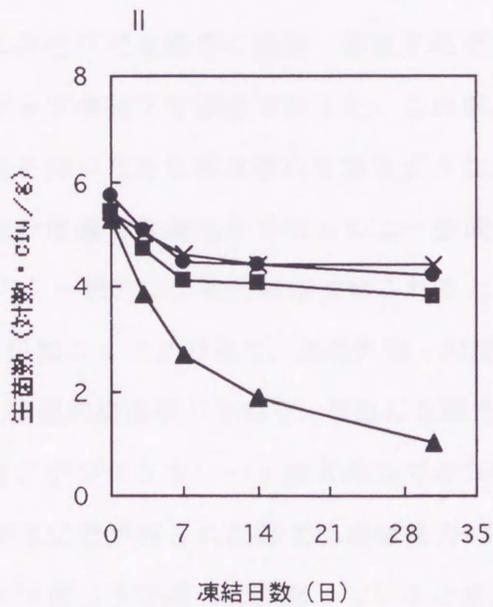
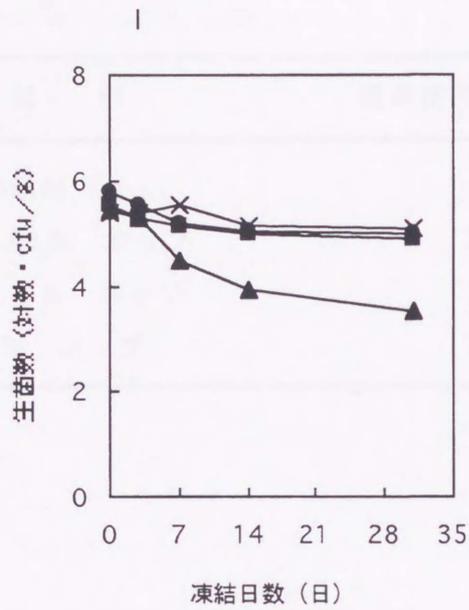


図4-18. -20°C に保存した蒲鉾における*E. coli* K-12の生存菌数変化

× : 無添加、● : 0.01% ホップ、■ : 0.1% ホップ
▲ : 1% ホップ

I : 標準寒天培地、II : デゾキシコレート寒天培地

表4-20. -20℃にて31日間凍結保存した蒲鉾に生存した*E. coli* K-12の普通ブイヨンでの増殖能(誘導期所要時間)

試料	誘導期所要時間(時間)
無添加	9.5
0.01% ホップ	10.5
0.1% ホップ	11.0
1% ホップ	14.5

4. 考察

ホップおよびメタリン酸ナトリウムは、ともに大腸菌に対してほとんど抗菌力を示さない。それら試料の存在下で大腸菌の凍結・解凍処理を行うと生菌数減少の促進作用が認められ、特にホップ存在下で顕著であった。この際、標準寒天培地よりもデゾキシコレート寒天培地を用いた方が解凍後の生菌数が少なかった。これは、凍結損傷を受けた大腸菌は、胆汁酸塩含有培地中ではコロニー形成能を欠くというSpeckらの報告と一致する^{94, 95)}。一般的に、微生物は凍結されると、凍結・解凍の過程で浸透圧の強い影響を受け、温度ショックの他に、細胞外液・内液の溶質の濃縮効果、脱水、細胞内部の氷晶形成、機械的損傷等が加わり、細胞は死滅あるいは損傷を受ける。ホップエキスの添加により、デゾキシコレート寒天培地でのコロニー形成能が大きく低下したことや、凍結・解凍処理が施された菌では増殖能力(増殖速度)が低下したことより、ホップエキスは大腸菌の凍結損傷を促進していると考えられる。また、細胞凍結による死滅および損傷に対する保護物質であるグリセリン存在下においても、ホップエキスの作用がみられることより、ホップエキスの損傷促進効果は極めて強いと推察される。金田ら⁹⁶⁾は、メタリン酸ナトリウム共存下の凍結・解凍処理によって、大腸菌外膜の損傷が促進され、菌体成分の漏洩が激しくなるとともに、薬剤の膜透過性が向上すると報告している。ホップエキスについても、これと同じような現象が起こっ

ていると推定される。大腸菌数の減少はメタリン酸ナトリウム存在下より大きいことより、外膜の損傷はメタリン酸ナトリウムの場合以上と考えられる。

近年、調理食品を中心とした冷凍食品が増加しており⁹⁷⁾、その衛生管理が益々重要となってきている。冷凍食品に存在する微生物は、凍結・解凍処理により、上記の如く物理的に或は代謝面で損傷を受けている。今回、インビトロ系では0.01%と微量のホップエキスの添加によって、大腸菌の凍結損傷が大きく促進され、生菌数の大幅な減少とともに、解凍後の菌の増殖が著しく遅延されたことより、ホップエキスは冷凍食品の衛生管理に有効に利用できると考えられた。

第7節 ホップエキスの熱安定性

抗菌性物質の中には、リゾチームのように熱によって、その抗菌力が低下するケースが知られている⁹⁸⁾。そこで、ホップエキスの抗菌活性に及ぼす加熱の影響について検討した。

1. ホップエキスの抗菌力に及ぼす加熱温度の影響

沸騰水中での加熱処理やオートクレーブ処理がホップエキスの抗菌力に及ぼす影響を検討した。

[実験方法]

[試料]

供試ホップエキスとして、アロマホップ(以下、本節ではホップとする。)を用いた。

[供試菌]

ホップが強い抗菌効果を発揮し、加工食品の代表的な変敗原因菌である乳酸菌2菌株(下記)を供試菌とした。

- ・ *Lactobacillus brevis* (ベーコン分離株)
- ・ *Leuconostoc mesenteroides* (ミートボール分離株)

[試験方法]

40mMリン酸緩衝液(pH6.5)にて調製したMRSブイヨン10mlを試験管に分注し、オートクレーブ滅菌(121℃・15分間)した。これに、ホップを0.01%濃度となるように溶解した後、沸騰水中にて加熱処理(10、30および60分間、表4-21)を施した。水

表4-21. ホップの加熱条件

Ex.No.	添加薬剤 ^a	加熱条件 ^b
1	無添加	—
2	ホップ	オートクレーブ後、試料添加
3	ホップ	オートクレーブ後、試料添加 → 沸騰水中 10分
4	ホップ	オートクレーブ後、試料添加 → 沸騰水中 30分
5	ホップ	オートクレーブ後、試料添加 → 沸騰水中 60分
6	ホップ	試料添加後、オートクレーブ

a : ホップ ; 0.01%

b : オートクレーブ ; 121℃・15分間

表4-22. 加熱処理を施したホップのインビトロ系抗菌力試験結果

供試菌	増殖 ^a					
	1 ^b	2 ^c	3	4	5	6
<i>L. brevis</i>	+	—	—	—	—	—
<i>L. mesenteroides</i>	+	—	—	—	—	—

+ : 増殖

— : 増殖認めず

a : 数値はEx. No.で、検体内容については表4-21を参照

b : 植菌時の培地pH ; 6.46

c : 植菌時の培地pH ; 6.49

冷後、供試菌懸濁液0.02mlを植菌して30℃で2日間静置培養した時の生育の有無を観察した。また、未滅菌のMRSブイヨンにホップを0.01%溶解した後、オートクレーブ処理(121℃・15分間)した培地についても、同様に供試菌懸濁液を接種し生育状況を調べた。なお、供試菌懸濁液は、各供試菌をMRSブイヨンにて30℃で24時間静置培養した培養液を10⁵倍希釈して調製した。

[結果]

30℃培養・2日目における各乳酸菌の増殖状況を表4-22に示す。ホップ(0.01%)は、沸騰水にて60分間の加熱処理後も抗菌力の低下は認められず、さらに、オートクレーブ処理区についても、両乳酸菌の増殖を抑制した。従って、ホップの熱安定性は高いと考えられた。

2. オートクレーブ処理がホップエキスの抗菌力に及ぼす影響

前項、2.より、ホップエキスの抗菌活性は、オートクレーブ処理によっても失活しないことが確認された。しかし、前検討では、オートクレーブ処理による僅かな抗菌力の低下に関しては判定できない。そこで、ホップエキスの添加濃度を供試菌のMIC値付近に設定し、オートクレーブ処理による抗菌力への影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

供試ホップエキスとして、アロマホップを用いた。

[供試菌]

前項と同様に下記の乳酸菌2菌株を用いた。

- ・ *Lactobacillus brevis* (ベーコン分離株)
- ・ *Leuconostoc mesenteroides* (ミートボール分離株)

[試験方法]

40mMリン酸緩衝液(pH6.5)を用いて調製したMRSブイヨンをオートクレーブにて滅菌(121℃・15分間)した後、所定量のホップを溶解した。これに、供試菌懸濁液を植菌して30℃で静置培養し24時間後の吸光度(OD₆₆₀)を測定した。また、未滅菌のMRSブイヨンに所定量のホップを溶解した後、オートクレーブ処理(121℃・15分間)を施した培地についても、同様に供試菌を植菌し培養後の吸光度を調べた。なお、供

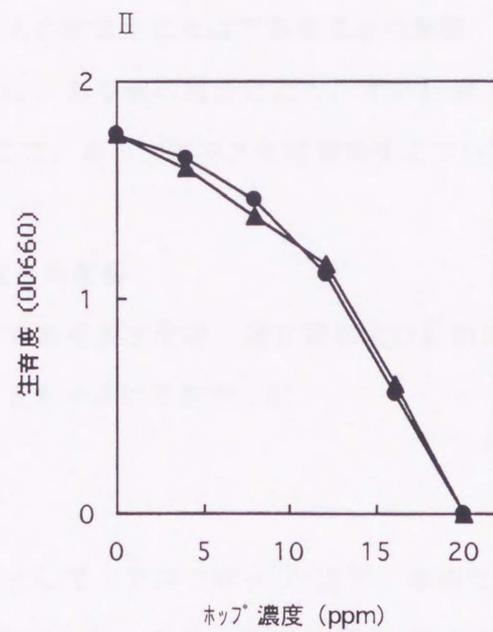
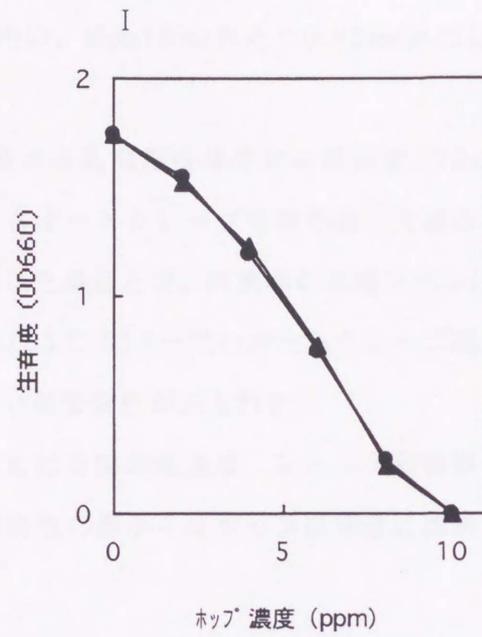


図4-19. オートクレーブ処理がホップの抗菌性に及ぼす影響

- : オートクレーブ前にホップを添加
- ▲ : オートクレーブ後にホップを添加

I : *L. brevis*, II : *L. mesenteroides*

試菌懸濁液としては、各供試菌をMRSブイヨンにて30℃で24時間静置培養した培養液の10⁵倍希釈液を用い、培地10ml当たり0.02ml添加した。

[結果および考察]

30℃培養24時間後の各乳酸菌接種培地の吸光度(OD₆₆₀)を図4-19に示す。培地にホップを添加してからオートクレーブ処理を施した場合と、オートクレーブ処理した培地にホップを添加した場合とで、両菌株の増殖レベル(OD値)はほとんど同じであることから、ホップは121℃で15分間のオートクレーブ処理によっても、全く安定であることが示され、高い熱安定性が示された。

通常、食品工業における加熱温度は、レトルト殺菌等を除き100℃以下で実施されることが多く、熱安定性の面からはホップは十分に加熱食品に適応できると考えられる。

第8節 ホップエキスの抗菌力に及ぼす各種成分の影響

抗菌性物質の中には、ある種の成分により、その抗菌力が低下するケースが知られている^{99~102})。そこで、ホップエキスの抗菌活性について各種成分の影響を調べた。

1. 代表的な食品成分の影響

代表的な食品成分である炭水化物、蛋白質および脂肪について、ホップエキスの抗菌力への影響をインビトロ系にて検討した。

[実験方法]

[試料]

供試ホップエキスとして、アロマホップ(以下、本節ではホップとする)を用いた。また、代表的な食品成分としては、可溶性澱粉(炭水化物、関東化学(株)、東京)、TMP-1100(蛋白質、ニュージーランド・デイリーボード社)およびTween80(脂質、ナカライテスク(株)、京都)を使用した。さらに、スキムミルク(配合成分を表-4-23に示す。雪印乳業(株)、東京)と10%豚肉抽出液についても併せて供試した。

[供試菌]

供試菌として、ホップが強い抗菌効果を示す以下のグラム陽性菌3菌株を用いた。

- ・ *Baillus cereus* OUT8032

表4-23. スキムミルクの配合処方

たん白質	34.8 g	カルシウム	1100 mg
脂 肪	0.8 g	リ ン	1000 mg
糖 質	52.4 g	鉄	0.5 mg
灰 分	8.0 g	ビタミンA	20 IU
水 分	4.0 g	ビタミンB1	0.3 mg
		ビタミンB2	1.6 mg

100 g 中

- ・ *Staphylococcus aureus* FDA209P
- ・ *Micrococcus flavus* (日本新薬株保存菌)

〔試験方法〕

40mMリン酸緩衝液(pH6.5)用いて調製した標準寒天培地に各試料を溶解した後、オートクレーブ滅菌(121℃・15分間)し平板培地に仕上げた。これに、供試菌懸濁液を無菌ガラス棒で接種(ーの字を書くように植菌した)し、30℃に培養して菌の増殖を観察した。抗菌力の判定基準としては、増殖の認められないものをー、増殖の兆候がみられるものを±、対照区の増殖を#とした時の生育程度に応じ+、#、##とした。なお、供試菌懸濁液は、標準寒天斜面培地(φ18の試験管を使用)で30℃・24時間培養した菌に、滅菌水を1ml加えて懸濁することにより調製した。また、10%豚肉抽出液系については、40mMリン酸緩衝液(pH6.5)と豚ミンチ肉を9:1の比率にて混合し、ホモジナイザーで処理した10%豚肉ホモジネイトをガーゼにてろ過し、このろ液を用いて標準寒天培地を調製した。なお、ホップは、オートクレーブ処理後の各培地に0.01%となるように溶解した。これらの試験検体内容を表4-24に示す。

〔結果〕

30℃培養時の各供試菌の生育状況を表4-25に示す。ホップの0.01%添加により、各供試菌は30℃で2日間の培養後にも増殖が認められなかった。この場合、何れの食品成分が添加されても、供試菌の増殖は観察されず、ホップの抗菌力に対して、今回供試した食品成分等は、影響を及ぼさないと考えられた。

表4-24. 試験検体内容

Ex. No.	培地への添加成分		添加薬剤
1	無添加		無添加
2	可溶性澱粉	0.5%	無添加
3	TMP-1100	0.5%	無添加
4	Tween80	0.2%	無添加
5	スキムミルク	0.5%	無添加
6	10%豚肉抽出液 ^a		無添加
7	無添加		ホップ 0.01%
8	可溶性澱粉	0.5%	ホップ 0.01%
9	TMP-1100	0.5%	ホップ 0.01%
10	Tween80	0.2%	ホップ 0.01%
11	スキムミルク	0.5%	ホップ 0.01%
12	10%豚肉抽出液 ^a		ホップ 0.01%

a : 抽出液に標準寒天培地を溶解し培地とした。

表4-25. 食品成分配合培地でのホップの抗菌力結果

Ex.No. ^a	→ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
供試菌	培養日数 → 1 2		1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2
<i>B. cereus</i> (BAC-1)	±	±	±	±	±	±	±	---	---	---	---	---
<i>S. aureus</i> (Sta-1)	±	-	±	±	±	±	±	---	---	---	---	---
<i>M. flavus</i> (Mic-1)	±	+	±	±	±	±	±	---	---	---	---	---
平板培地のpH	6.61	6.57	6.88	6.55	6.48	6.41		6.56	6.56	6.62	6.50	6.40

無添加区(Ex. No. 1)の増殖を±とし、各検体の増殖レベルを±、+、±、±で表した。
-は増殖認めず。

a : 検体内容は表4-24を参照

2. 金属イオンの影響

ホップエキスの抗菌性に関する研究の中で、Simpsonは、カチオンがホップエキスの抗菌活性に影響を及ぼすと報告している¹⁰³⁾。そこで、今回、供試しているホップエキスについて金属イオンの影響を調べた。

[実験方法]

[試料]

供試ホップエキスとして、アロマホップを用いた。金属イオンとしては、一価および二価イオンの代表として Na^+ (NaCl 、和光純薬工業(株)、大阪)および Ca^{2+} (CaCl_2 、和光純薬工業(株)、大阪)を供試した。

[供試菌]

以下の2菌株を用いた。

- ・ *Bacillus cereus* OUT8032
- ・ *Leuconostoc mesenteroides* (ミートボール分離菌)

[抗菌力の測定方法]

培地にホップを0.001、0.0015、0.002、0.0025および0.003%となるように溶解し、これに NaCl あるいは CaCl_2 を100mM加えた。この培地に各供試菌を植菌して、30℃にて培養し、経日的に吸光度(OD_{660})を測定した。この際、*B. cereus*については、普通ブイヨンを用いた振とう培養を、*L. mesenteroides* ではMRSブイヨンを用いて静置培養を行った。なお、植菌は、普通ブイヨン(*B. cereus*)あるいはMRSブイヨン(*L. mesenteroides*)を用いて30℃で24時間培養した培養液の 10^5 倍希釈液を培地10ml当たり0.02ml添加した。

[結果]

30℃培養時における各供試菌の吸光度変化を表4-26に示す。*L. mesenteroides* については、ホップの0.0015%添加区で、培養2日目には本菌が増殖したが、 NaCl との併用により培養3日目においても増殖は認められなかった。従って、 Na^+ (NaCl)の添加により、ホップの抗菌力が上昇したことになる。一方、 Ca^{2+} (CaCl_2)の場合、その添加により培養2日目の吸光度が0.57から0.05に低下したことより、僅かではあるが抗菌力の向上が認められた。次に、*B. cereus*については、今回の実験範囲では金属イオンの影響を正確に判断するには至らなかったが、 Na^+ および Ca^{2+} によって大き

表-4-26 30℃培養での吸光度変化

添加試料内容 ^a		増殖 ^b (OD660)					
		<i>B. cereus</i>			<i>L. mesenteroides</i>		
		1日目	2日目	3日目	1日目	2日目	3日目
無添加		+	+	+	+	+	+
ホップ	0.001%	0	0	0	+	+	+
"	0.0015%	0	0	0	0	0.57	+
"	0.002%	0	0	0	0	0	0
"	0.0025%	0	0	0	0	0	0
"	0.003%	0	0	0	0	0	0
NaCl		+	+	+	+	+	+
ホップ	0.001% + NaCl	0	0	0	0.74	+	+
"	0.0015% + NaCl	0	0	0	0	0	0
"	0.002% + NaCl	0	0	0	0	0	0
"	0.0025% + NaCl	0	0	0	0	0	0
"	0.003% + NaCl	0	0	0	0	0	0
CaCl ₂		+	+	+	+	+	+
ホップ	0.001% + CaCl ₂	0.11*	0.15*	0.17*	0.85	+	+
"	0.0015% + CaCl ₂	0.09*	0.13*	0.14*	0	0.05	0.39
"	0.002% + CaCl ₂	0.10*	0.13*	0.14*	0	0	0
"	0.0025% + CaCl ₂	0.08*	0.11*	0.13*	0	0	0
"	0.003% + CaCl ₂	0.08*	0.11*	0.12*	0	0	0

* : 細菌検査より生菌数の増加は認められなかった。

a : NaCl ; 100mM

CaCl₂ : 100mM

b : + ; 吸光度が1.0以上の時

な抗菌力の低下はないと考えられた。なお、普通ブイヨンのCaCl₂添加区で、経日的な吸光度の増加が認められたが、供試菌の増殖ではなく(細菌試験によっても菌の増加は認めず。)、培地成分とCaCl₂の反応生成物の影響と推定された。

3. 考察

食品中では、通常制菌剤の試験管内の抗菌力はそのまま現れない。これは、食品中に含まれるたん白質や澱粉等の食品成分およびpH等の影響によるものであるが、これらの影響を受けやすい化合物と受けにくい化合物がある。従って、食品成分であるたん白質、澱粉および脂質等の制菌剤の抗菌力に対する影響を確認しなければならない。今回実施したインビトロ系抗菌力試験より、ホップエキスは、その抗菌効果に、これら食品成分の影響を受けないと考えられた。また、食塩(Na⁺)によって、乳酸菌に対するホップエキスの抗菌力が向上したが、食塩は多くの食品に使用されており、保存性向上面では好都合になると考えられる。

第9節 水素添加ホップエキスの抗菌効果

ホップエキスは化学的に不安定であり、空気中では酸化を受けやすい¹⁰⁴⁾。そこで、ホップエキスの化学的な安定性を増すために、還元処理を施したホップエキスについて、その抗菌性を検討した。

1. 水素添加ホップエキスの抗菌スペクトル

ホップエキスに還元処理を施した水素添加ホップエキスについて、細菌、酵母および黴に対する抗菌効果を調べ、通常のホップエキスと比較した。

1-1. 細菌に対する効果

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとして供試しているアロマホップの主要成分であるβ酸へ、化学的に水素を付加することにより安定化した水素添加ホップエキス(Hexahydrobeta Acid, 図4-20, 以下、本節では水添ホップとする。)を、カルターフードサイエンス社(U.S.A)

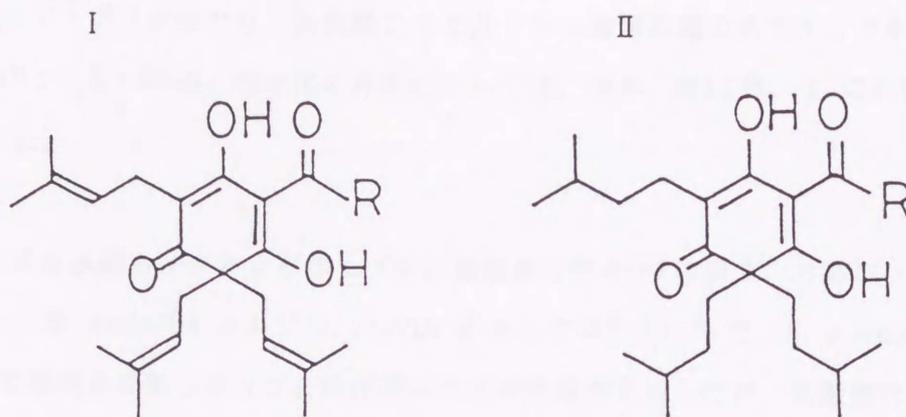


図4-20. 水素添加ホップエキスの構造式

I : ホップエキス(β 酸)

II : 水素添加ホップエキス(水素添加 β 酸)

より入手して用いた。通常のホップエキスとしては、アロマホップ(以下、本節ではホップとする。)を供試した。

〔供試菌〕

以下に示すグラム陽性菌 6 菌株およびグラム陰性菌 2 菌株の計 8 菌株を用いた。

- ・ *Bacillus cereus* OUT8032
- ・ *Bacillus subtilis* (カスタードクリーム分離株)
- ・ *Micrococcus flavus* (日本新薬(株)保存株)
- ・ *Staphylococcus aureus* FDA209P
- ・ *Lactobacillus brevis* (ベーコン分離株)
- ・ *Leuconostoc mesenteroides* (ミートボール分離株)
- ・ *Escherichia coli* K-12 IFO3301
- ・ *Pseudomonas fluorescens* (蒲鉾分離株)

〔抗菌力測定法〕

抗菌力の測定は、本章、第1節の方法に準じた。なお、水添ホップとしては、粉末化(水添ホップ：ポリグリセリン脂肪酸エステル：ショ糖脂肪酸エステル：デキストリン=10：10：0.5：79.5、粉末化の詳細については、本章、第11節、1.に示す)したものを用いた。

[結果]

細菌に対する水添ホップおよびホップの抗菌効果を表4-27に示す。水添ホップは、*B. cereus*、*B. subtilis* および *M. flavus* に対しては0.001%で、*S. aureus* には0.0005%で増殖を抑制しホップとほぼ同レベルの抗菌力を示したが、乳酸菌に対しては抗菌力に若干の低下が認められた。一方、*E. coli* K-12および*P. fluorescens* には、水添ホップの2%添加でも増殖が認められ、ホップと同様にグラム陰性菌への抗菌性は低いレベルであった。

表4-27. 水素添加ホップエキスの細菌に対する抗菌効果

供試菌株	MIC ^a (%、β酸として)	
	ホップ ^b	水添ホップ ^c
<i>Bacillus cereus</i>	0.0005	0.001
<i>Bacillus subtilis</i>	0.0015	0.001
<i>Micrococcus flavus</i>	0.0025	0.001
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.001	0.0005
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.0005	0.025
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.001	0.025
<i>Escherichia coli</i> K-12	1.5	> 2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.0	> 2

a : Minimum inhibitory concentration

b : アロマホップ

c : 水素添加ホップエキス粉末

(水素添加ホップエキス：グリスター-ML-750：ソルゲン90：NSD300
= 10：10：0.5：79.5)

1-2. 酵母に対する効果

[実験方法]

[試料]

前項、1-1.と同様に、カルターフードサイエンス社より入手した水添ホップおよびアロマホップを用いた。

[供試菌]

以下の2菌株を用いた。

- ・ *Sacchromyces cerevisiae* (大阪大学分譲株)
- ・ *Candida utilis* OUT6020

[抗菌力測定法]

抗菌力の測定は、本章、第1節の方法に準じた。

[結果]

30℃培養における*S. cerevisiae*の生菌数変化を表4-28に示す。通常のホップでは、0.5%(β酸として)添加で本菌の増殖を抑制したが、水添ホップの場合、3%添加でも増殖が可能であった。つぎに、*C. utilis*での結果を表4-29に示す。本菌についても、ホップは1%で完全に増殖不可であったが、水添ホップでは3%添加区でも増殖速度の低下はみられるものの、増殖は可能であった。従って、酵母に対する抗菌効果は、ホップエキスへの水素添加によって大きく低下すると考えられた。

1-3. かびに対する効果

[実験方法]

[試料]

前々項、1-1.と同様に、カルターフードサイエンス社より入手した水添ホップおよびアロマホップを用いた。

[供試菌]

以下の2菌株を用いた。

- ・ *Aspergillus niger* IFO6341
- ・ *Rhizopus nigricans* IFO5781

表4-28. 水素添加ホップエキスの *S. cerevisiae* に対する抗菌効果

a 添加試料	添加量(%) (β酸として)	30℃培養時の生菌数(cfu/ml)		
		スタート	24時間後	48時間後
	0	4.0×10^3	3.2×10^6	—
ホ	0.5	3.4×10^3	N.D.	N.D.
ッ	1.0	2.6×10^3	N.D.	N.D.
プ	2.0	5.0×10^2	N.D.	N.D.
	3.0	1.3×10^3	N.D.	N.D.
水	0	4.0×10^3	3.2×10^6	—
添	0.5	1.0×10^4	7.1×10^5	—
ホ	1.0	1.1×10^4	8.6×10^5	—
ッ	2.0	5.7×10^3	1.3×10^6	—
プ	3.0	5.4×10^3	1.1×10^6	—

a : ホップ ; アロマホップ

水添ホップ ; 水素添加ホップエキス粉末

(水素添加ホップエキス : ゲリスター-ML-750 : リゲン90 : NSD300
= 10 : 10 : 0.5 : 79.5) を添加

表4-29. 水素添加ホップエキスの *C. utilis* に対する抗菌効果

a 添加試料	添加量(%) (β酸として)	30℃培養時の生菌数 (cfu/ml)		
		スタート	24時間後	48時間後
	0	2.7×10^4	1.1×10^7	—
ホ	0.5	1.4×10^4	4.1×10^6	—
ッ	1.0	3.6×10^4	N.D.	N.D.
プ	2.0	1.4×10^4	N.D.	N.D.
	3.0	1.7×10^4	N.D.	N.D.
水	0	2.7×10^4	1.1×10^7	—
添	0.5	3.2×10^4	9.0×10^6	—
ホ	1.0	1.4×10^4	8.3×10^6	—
ッ	2.0	3.0×10^3	2.5×10^6	—
プ	3.0	2.5×10^3	1.7×10^5	—

a : ホップ ; アロマホップ

水添ホップ ; 水素添加ホップエキス粉末

(水素添加ホップエキス : ゲリスター-ML-750 : リルゲン90 : NSD300
= 10 : 10 : 0.5 : 79.5) を添加

[抗菌力測定法]

抗菌力の測定は、本章、第1節の方法に準じた。

[結果]

25℃培養時における*A. niger*の経日コロニー直径変化を表4-30に、*R. nigricans*の結果を表4-31に示す。両供試菌ともに、水添ホップあるいはホップの添加量が増えると形成コロニーの直径が小さくなり、添加量に相関した抗菌性が示された。ホップと水添品との抗菌力比較については、水添ホップの方が経日形成コロニーの直径が大きく、水素添加による抗菌力の低下が示された。

表4-30. 水素添加ホップエキスの*A. niger*に対する抗菌効果

添加試料 ^a	添加量(%) (β酸として)	PDA の pH	25℃培養時のコロニー直径 (mm) ^b			
			1日目	2日目	3日目	4日目
無添加	—	5.53	9	23	44	62
ホップ	0.1	5.47	9	16	20	27
"	0.2	5.41	9	14	20	27
"	0.5	5.25	0	11	16	22
"	1	5.17	0	0	12	17
"	2	5.00	0	0	0	7
水添ホップ	0.1	5.44	9	18	27	36
"	0.2	5.36	8	16	23	34
"	0.5	5.27	5	14	20	26
"	1	5.11	0	10	16	22
"	2	5.06	0	10	12	18

a: ホップ; アロマホップ

水添ホップ; 水素添加ホップエキス粉末

(水素添加ホップエキス: ゲリスター-ML-750: ヲルゲン90: NSD300
= 10: 10: 0.5: 79.5)を添加

b: ジャイアントコロニー法

表4-31. 水素添加ホップエキスの*R. nigricans* に対する抗菌効果

添加試料 ^a	添加量(%) (β酸として)	PDA の pH	25℃培養時のコロニー直径 (mm) ^b			
			1日目	2日目	3日目	4日目
無添加	—	5.53	13	61	>90	
ホップ	0.1	5.47	11	21	28	39
"	0.2	5.41	9	19	26	36
"	0.5	5.25	9	15	19	26
"	1	5.17	0	0	13	17
"	2	5.00	0	0	0	0 ^c
水添ホップ	0.1	5.44	13	24	29	40
"	0.2	5.36	12	21	28	36
"	0.5	5.27	12	18	24	30
"	1	5.11	9	13	18	23
"	2	5.06	9	12	15	19

a : ホップ ; アロマホップ

水添ホップ ; 水素添加ホップエキス粉末

(水素添加ホップエキス : グリスター-ML-750 : リルゲン90 : NSD300)

b : ジャイアントコロニー法

c : 14日目も生育認めず

2. 水素添加ホップエキスと制菌素材との併用によるグラム陰性菌への抗菌効果

ホップエキスと制菌素材(メタリン酸ナトリウム、グリシンおよび酢酸ナトリウム)との併用により、グラム陰性菌への抗菌効果が相乗的に向上することを確認している(本章、第4節)。そこで、水素添加ホップエキスについても、上記制菌素材との併用時における抗菌性を調べた。

[実験方法]

[試料]

カルターフードサイエンス社より入手した水素添加ホップエキスを用い、併用する制菌素材として、メタリン酸ナトリウム(太平化学産業株、大阪)、グリシン(昭和電工株、東京)および酢酸ナトリウム(大東化学株、東京)を供試した。

[供試菌]

以下の2菌株を用いた。

- ・ *Escherichia coli* K-12 IFO3301
- ・ *Pseudomonas fluorescens* IFO3081

[抗菌力測定法]

本章、第4節の方法に準じた。

[結果]

各供試菌に対する水添ホップとメタリン酸ナトリウム、グリシンおよび酢酸ナトリウムとの併用効果を、それぞれ表4-32、4-33および4-34に示す。供試した *E. coli* K-12 および *P. fluorescens* の両菌株は、水添ホップが2%添加されても増殖が可能であり、水添ホップに強い耐性を示した。これらの菌に対して、メタリン酸ナトリウム単独で *E. coli* K-12 の増殖を抑えるためには、3%のメタリン酸ナトリウムが必要であったが、0.005%の水添ホップと併用することにより、2%のメタリン酸ナトリウム添加で増殖が阻止された。また、*P. fluorescens* については、その増殖抑制のために単独時4%のメタリン酸ナトリウムが必要であったが、0.005%の水添ホップとの併用によって、メタリン酸ナトリウム濃度を半減(2%)することが可能であった(表4-32)。次に、グリシンとの組合せでは、*P. fluorescens* に対する併用効果は認められなかったが、*E. coli* K-12 では0.005%水添ホップとの併用によりグリシン濃度を2.0%から1.5%に減じることができた(表4-33)。酢酸ナトリウムとの併用の場合、*P.*

表4-32. 水素添加ホップエキスとメタリン酸ナトリウムとの併用によるグラム陰性菌への抗菌効果

水添ホップ ^b (%)	メタリン酸ナトリウム (%)	増殖 ^a (OD660)	
		<i>E. coli</i> K-12	<i>P. fluorescens</i>
2.0		+	+
	1.0	+	+
	2.0	+	0.93
	3.0	0	0.13
	4.0	0	0
0.005	0.5	+	0.75
0.005	1.0	0.71	0.45
0.005	1.5	0.63	0.37
0.005	2.0	0	0
0.005	3.0	0	0
0.005	4.0	0	0
0.005	5.0	0	0

a : + ; OD 値が1.0以上

b : 水素添加ホップエキス粉末 (水素添加ホップエキス : ゲリスター-ML-750 : リルゲン90 : NSD300 = 10 : 10 : 0.5 : 79.5) を用い、添加量は水素添加ホップエキスの量を示す。

表4-33. 水素添加ホップエキスとグリシンとの併用による
グラム陰性菌への抗菌効果

水添ホップ ^b (%)	グリシン (%)	増殖 ^a (OD660)	
		<i>E. coli</i> K-12	<i>P. fluorescens</i>
2.0		+	+
	0.5	+	+
	1.0	0.75	+
	2.0	0	+
	3.0	0	+
	4.0	0	0
0.005	0.5	+	+
0.005	1.0	0.40	+
0.005	1.5	0	+
0.005	2.0	0	+
0.005	3.0	0	+
0.005	4.0	0	0

a : + ; OD 値が1.0以上

b : 水素添加ホップエキス粉末 (水素添加ホップエキス:グリスター-ML-750 :
リゲン90 : NSD300 = 10 : 10 : 0.5 : 79.5) を用い、添加量は
水素添加ホップエキスの量を示す。

表4-34. 水素添加ホップエキスと酢酸ナトリウムとの併用による
グラム陰性菌への抗菌効果

水添ホップ ^b (%)	酢酸ナトリウム (%)	増殖 ^a (OD660)	
		<i>E. coli</i> K-12	<i>P. fluorescens</i>
2.0		+	+
	1.0	+	+
	2.0	+	0.93
	3.0	+	0.13
	4.0	+	0
	5.0	0.75	0
	6.0	0	0
0.005	0.5	+	0.75
0.005	1.0	+	0.45
0.005	1.5	+	0.37
0.005	2.0	+	0
0.005	3.0	+	0
0.005	4.0	+	0
0.005	5.0	0.13	0
0.005	6.0	0	0

a : + ; OD 値が1.0以上

b : 水素添加ホップエキス粉末 (水素添加ホップエキス: グリスター-ML-750 :
リゲン90 : NSD300 = 10 : 10 : 0.5 : 79.5) を用い、添加量は
水素添加ホップエキスの量を示す。

fluorescens に対しては水添ホップとの併用により酢酸ナトリウム濃度を半減しても増殖が抑制された。しかし、*E. coli* K-12では、併用による酢酸ナトリウムの減量は不可能であったが、同一酢酸ナトリウム濃度でも、水添ホップとの併用区では、増殖レベルの低下が示された(表4-34)。

以上の結果より、水添ホップについても、メタリン酸ナトリウム、グリシンおよび酢酸ナトリウムといった制菌素材との併用により、菌種による程度の差はあるものの、概ね抗菌力が向上することが確認された。

3. 考察

ホップエキスは化学的に安定でなく、空気中では酸化を受けやすく、風味面での劣化の原因となる¹⁰⁴⁾。ホップエキスの主要成分の一つで、ビールへの苦みの付与に用いられている α 酸は、この酸化による品質劣化を防ぐため、還元処理が施されており、化学的に安定化されたものがビール製造に使用されている。そこで、今回検討を実施している β 酸を主成分とするアロマホップについても、同様の処理により安定化されると考えられたので、この還元処理されたホップエキスを入手し、その抗菌性について検討した。

ホップエキスの抗菌スペクトルの特徴は、グラム陽性菌への強い抗菌力である。ホップエキスへの水素添加によって、グラム陽性菌に対する抗菌性は維持された。しかし、グラム陰性菌および真菌については、水素添加によるさらなる抗菌力の低下が認められた。通常のホップエキス自体、食品への応用を考えた実添加量レベルではグラム陰性菌に対する抗菌効果がないので問題とはならないと考える。Mizobuchiら¹⁰⁵⁾は、ホップエキス誘導体の中には、酵母に対して抗菌力を発揮するものがあると報告しているが、今回用いた水素添加ホップエキスでは、抗菌力は逆に低下する結果となった。また、水素添加ホップエキスと制菌素材とを組合すことにより、通常のホップエキスの場合と同様に、グラム陰性菌への併用効果が認められた。これらの結果より、ホップエキスへの水素添加は抗菌性の面では大きな後退はなく、水素添加により風味が向上し、しかも製剤化時の経日安定性の向上も予想されるなど、水素添加のメリットは大きいと考えられる。

第10節 ホップエキスのアルコール製剤および洗浄除菌剤への配合

アルコールへ抗菌性物質を溶解することによって、殺菌効果が相乗的に強まるケースが知られている^{106~108})。そこで、アルコール(製剤)に抗菌性物質であるホップエキスを溶解し、殺菌力にいかなる影響を及ぼすかについて調べた。また、食品工場でのサニテーション対策の一環としてアルコール製剤とともに汎用されている洗浄除菌剤についても同様に検討した。さらに、アルコール製剤は、食品製造現場にて、食品の噴霧・浸漬処理に多用されているので、これら食品の表面処理による保存性の向上に対して、ホップエキスの及ぼす影響を調べた。

1. 殺菌力への影響

1-1. アルコール製剤へのホップエキスの配合

ホップエキスがアルコール製剤の殺菌力に及ぼす影響について検討した。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとしてアロマホップ(以下、本節ではホップとする。)を用いた。これを、ポリグリセリン脂肪酸エステル(グリスターML750、阪本薬品工業(株)、大阪)と1:1.8の比率にて混合し、アルコール製剤であるサンサークルH(配合処方を表4-35に示す。日本新薬(株)、京都)にβ酸として0.02%になるように添加して、ホップ配合アルコール製剤を調製した。

[供試菌]

以下に示す4菌株を用いた。

- ・ *Bacillus cereus* OUT8032
- ・ *Lactobacillus brevis* (ベーコン分離菌)
- ・ *Leuconostoc mesenteroides* (ミートボール分離菌)
- ・ *Escherichia coli* K-12 IFO3301

[殺菌力試験方法]

供試菌培養液0.5mlを、20℃に保った各試料希釈液5mlに添加混合した後、20℃に保持した。5分後、この試料希釈液を一白金耳とり、液体培地に植菌して30℃での静置培養を行った。そして、培養開始48時間後に分光光度計にて660nmの吸光度

表4-35. サンサークルHの配合処方

原 材 料	配合量 (%)
95度エタノール	54.4
乳酸	1.5
乳酸ナトリウム	0.4
グリセリン脂肪酸エステル	0.2
香料	0.01
精製水	43.49

- ・pH 4.4
- ・本品は、エタノール50.0w/w%
(58v/v%)を含有する

(OD₆₆₀)を測定し、培養開始前の値との差が0.03以下の場合を増殖なしとして「殺菌効果有り」と判定した。なお、使用した液体培地は、乳酸菌がMRSブイヨン、その他の菌種では普通ブイヨンを用いた。また、供試菌培養液は、各供試菌一白金耳を、上記液体培地にて30℃で24時間培養(乳酸菌は静置、その他は振とう培養)して調製した。

[結果]

各試料希釈液における供試菌の増殖有無を表4-36に示す。*L. brevis* の殺菌には50%濃度のサンサークルHが必要であったが、ホップ配合サンサークルHでは30%濃度で殺菌された。また、*L. mesenteroides* に対しても、ホップ配合サンサークルHの方が殺菌に必要な濃度が低く、ホップの配合によりサンサークルHの殺菌力向上が認められた。一方、*B. cereus* および*E. coli* K-12に対しては、ホップの配合によるサンサークルHの殺菌力への影響は認められなかった。

1-2. 洗浄除菌剤へのホップエキスの配合

ホップエキスが洗浄除菌剤の殺菌力に及ぼす影響について検討した。

[実験方法]

表4-36. ホップエキス配合サンサークルHの殺菌力試験結果

供試菌	試料	試料濃度 (%)								
		50	40	35	30	25	20	15	10	5
<i>B. cereus</i>	サンサークル H	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ホップ 配合品 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. brevis</i>	サンサークル H	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	ホップ 配合品 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>L. mesenteroides</i>	サンサークル H	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	ホップ 配合品 ^a	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> K-12	サンサークル H	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	ホップ 配合品 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+: 増殖

-: 増殖認めず

a: ホップエキス配合サンサークルH; サンサークルHにホップエキスをβ酸として0.02%添加した

〔試料〕

前項、1-1.と同様に、アロマホップをポリグリセリン脂肪酸エステル(グリスターML750)と1:1.8の比率にて混合し、洗浄除菌剤であるニンエース(配合処方を表4-37に示す。日本新薬(株)、京都)にβ酸として2%になるように添加して、ホップエキス配合洗浄除菌剤を調製した。

〔供試菌〕

以下に示す4菌株を用いた。

- ・ *Bacillus cereus* OUT8032
- ・ *Lactobacillus brevis* (ベーコン分離菌)

表4-37. ナインエースの配合処方

原 材 料	配 合 量 (%)
界面活性剤	30
非イオン系	
両性イオン系	
陽イオン系	
水	70

・ pH 5.0~7.0(1%水溶液)

・ *Leuconostoc mesenteroides* (ミートボール分離菌)

・ *Escherichia coli* K-12 IFO3301

[殺菌力試験方法]

前項、1-1.と同様の方法にて実施した。

[結果]

ナインエースおよびホップエキス配合ナインエースの各希釈倍率における供試菌の増殖有無を表4-38-1および4-38-2に示す。*B. cereus* について、ナインエースは200倍希釈で殺菌されたが、ホップ配合品では400倍希釈でも殺菌可能であり、ホップの配合により殺菌効果の向上が認められた。また、*E. coli* K-12に対しても、ナインエースでは3000倍希釈で増殖がみられたが、ホップの配合により同濃度で本菌は完全殺菌された。一方、乳酸菌では、ホップの配合によるナインエースの殺菌力の向上効果は認められなかった。

2. ホップエキス配合アルコール製剤の食品への利用

前項、1.にて、ホップエキスのアルコール製剤への配合による殺菌力の影響について検討したところ、乳酸菌に対して殺菌力の向上が認められた。そこで、ホップエキス配合アルコール製剤の噴霧あるいは浸漬処理による食品の保存性向上への影響について調べた。

表4-38-1. ホップエキス配合ナインエースの殺菌力試験結果(その1)

供試菌	試料	試料希釈倍率 (倍)					
		100	200	400	600	800	1000
<i>B. cereus</i>	ナインエース	-	-	+	+	+	+
	ホップ配合品 ^a	-	-	-	+	+	+
<i>L. brevis</i>	ナインエース	+	+	+	+	+	+
	ホップ配合品 ^a	+	+	+	+	+	+
<i>L. mesenteroides</i>	ナインエース	-	-	-	+	+	+
	ホップ配合品 ^a	-	-	-	+	+	+

+ : 増殖

- : 増殖認めず

a : ホップエキス配合ナインエース ; ナインエースにホップエキスをβ酸として2%添加した。

表4-38-2. ホップエキス配合ナインエースの殺菌力試験結果(その2)

供試菌	試料	試料希釈倍率 (倍)					
		3000	3500	4000	4500	5000	5500
<i>E. coli</i> K-12	ナインエース	+	+	+	+	+	+
	ホップ配合品 ^a	-	+	+	+	+	+

+ : 増殖

- : 増殖認めず

a : ホップエキス配合ナインエース ; ナインエースにホップエキスをβ酸として2%添加した

2-1. 蒲鉾でのネット発生防止効果

蒲鉾をホップエキス配合アルコール溶液で浸漬処理した時のネット発生抑制効果を調べた。

〔実験方法〕

〔試料〕

カルターフードサイエンス社より入手した水素添加ホップエキスをポリグリセリン脂肪酸エステル(グリスターML-750)と混合し、エタノール(特級、関東化学株、東京)に溶解してホップエキス添加アルコール溶液を調製した。表4-39に各アルコール溶液の配合組成を示す。

〔試験方法〕

市販の板つき蒲鉾(伊丹かねてつ食品株、兵庫)を無菌的に約1cm厚にスライスし、各アルコール溶液に浸漬した。5秒後、蒲鉾を溶液中から取り出し、クリーンベンチ内で滅菌した金網上に置き表面が完全に乾燥するまで風乾した。この蒲鉾のスライス面に供試菌懸濁液20 μ lを滴下し、コンラージ棒にて十字に塗布した。風乾後、蒲鉾を無菌シャーレに封入し、20 $^{\circ}$ Cおよび30 $^{\circ}$ Cに保存してネット発生状況を観察した。なお、供試菌は、*Bacillus cereus* OUT8032を普通ブイヨンにて30 $^{\circ}$ Cで24時間振とうした培養液を10⁵倍希釈して調製した。

表4-39. ホップエキス配合アルコール溶液の処方

Ex. No.	配 合 量 (%)			
	水素添加ホップエキス	グリスターML750 ^a	エタノール	滅菌水
1	-	-	-	100.0
2	-	0.2	60.0	39.8
3	0.1	0.2	60.0	39.7

a : ポリグリセリン脂肪酸エステル

[結果]

20℃および30℃保存中における蒲鉾のネット発生状況を表4-40に、30℃保存・2日目の蒲鉾写真を図4-21に示す。20℃保存区では、アルコール溶液で処理した蒲鉾が保存5日目にはネットの進行が激しく帯状に連なった状態にまで変敗したが、ホップエキス配合品では僅かにネット発生の兆候が認められるレベルであった。また、30℃保存についても同様の傾向であり、保存2日目にはアルコール溶液区で明確なネット発生が認められたが、ホップ配合区ではネットの形成は起こらなかった。以上のように、ホップエキス配合区にはネット発生の遅延がみられたが、これは、蒲鉾表面に付着しているホップエキスが*B. cereus*の増殖を抑制したためと考えられる。すなわち、アルコールへのホップエキスの配合(0.1%)により、有意なネット発生の抑制効果が示された。

表4-40. 保存蒲鉾のネット発生状況

Ex. No. ^a	20℃ 保 存			30℃ 保 存		
	1日目	2日目	5日目	1日目	2日目	5日目
1	—	—	≡	—	+	≡ ^b
2	—	—	≡	—	≡	≡ ^b
3	—	—	±	—	—	≡ ^b

— : ネットの発生認めず

±、+、≡ : ネットの発生レベルを目視的に判定した

^a : Ex. No. 1 ; 滅菌水

Ex. No. 2 ; エタノール

Ex. No. 3 ; エタノール + ホップエキス

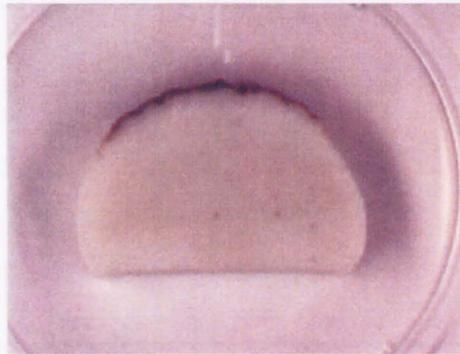
詳細は表4-39を参照

^b : 液状軟化が発生

Ex. No. 1



Ex. No. 2



Ex. No. 3

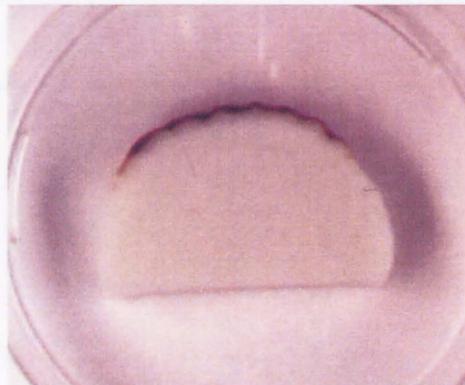


図4-21. 30℃保存・2日目の蒲鉾のネット発生状況

Ex. No. 1 : 滅菌水

Ex. No. 2 : エタノール

Ex. No. 3 : エタノール+ホップ

2-2. ソーセージでのネット発生防止効果

ソーセージをホップエキス配合アルコール溶液で処理した時のネット発生抑制効果を調べた。

[実験方法]

[試料]

前項、2-1.と同様に、表4-39に示すアルコール溶液を用いた。

[試験方法]

市販のソーセージ(丸大食品(株)、大阪)を前項、2-1.の蒲鉾と同様に処理し、ネットの発生状況を観察した。

表4-41. 保存ソーセージのネット発生状況

Ex. No. ^a	20℃ 保 存			30℃ 保 存		
	1日目	2日目	5日目	1日目	2日目	5日目
1	±	+	≡	+	≡	≡
2	-	+	≡	+	≡	≡
3	-	±	≡	-	+	≡

- : ネットの発生認めず

±、+、≡、≡ : ネットの発生レベルを目視的に判定した

a : Ex. No. 1 : 滅菌水

Ex. No. 2 : エタノール

Ex. No. 3 : エタノール + ホップエキス

詳細は表4-39を参照

b : 液状軟化が発生

Ex. No. 1



Ex. No. 2



Ex. No. 3



図4-22. 30℃保存・2日目のソーセージのネット発生状況

Ex. No. 1 : 滅菌水

Ex. No. 2 : エタノール

Ex. No. 3 : エタノール+ホップ

[結果]

ソーセージを20℃および30℃にて保存した時のネット発生状況を表4-41に、30℃保存・2日目のソーセージ写真を図4-22に示す。20℃保存区では、アルコール溶液およびホップエキス配合品ともに2日目にはネットの発生がみられたが、ネットの形成レベルはアルコール溶液の方が強く、ホップ配合区は僅かにネット形成の兆候がみられる程度であった。30℃保存ソーセージについては、アルコール溶液処理品が保存1日目でネット形成が認められたのに対し、ホップ配合品では、2日目に形成され、1日のネット発生遅延効果が示された。以上の結果より、ソーセージについても、アルコール溶液へのホップエキスの配合(0.1%)によるネット発生の抑制効果が示された。

2-3. 蒲鉾でのネット発生防止効果に及ぼすホップエキス濃度の影響

本節、2-1.でアルコール溶液へのホップエキスの配合(0.1%)により、蒲鉾のネット防止効果が向上することを確認した。そこで、ネット防止効果とアルコール溶液へ添加するホップエキス濃度の関係について詳細に調べた。

[実験方法]

[試料]

水素添加ホップエキスおよびポリグリセリン脂肪酸エステル(グリスターML750)を用い、表4-42に示すアルコール溶液を供試した。

[試験方法]

市販の板つき蒲鉾(伊丹かねてつ食品(株)、兵庫)を、本節、2-1.と同様に処理し、ネットの発生状況を観察した。

[結果]

30℃および20℃保存中における各蒲鉾のネット発生状況を表4-43-1および表4-43-2に、20℃保存・10日目の蒲鉾写真を図4-23に示す。30℃保存区では、ホップ未配合のアルコール溶液で処理した蒲鉾のネットが保存2日目に発生したが、ホップ0.01%配合区では3日目、0.02%および0.05%配合区では6日目にネットが形成され、0.75%以上のホップ配合品では保存中にネットの発生は認められなかった。20℃保存区でも同様の傾向であり、ホップの配合量に相関したネットの発生延長効果が示され、0.05%区では保存10日目においてもネットの発生はみられなかった。また、ホップエキ

表4-42. ホップエキス配合アルコール溶液の調製法

Ex.No.	配 合 量 (%)			
	ホップエキス ^a	グリスターML750 ^b	エタノール	滅菌水
1	-	-	-	100
2	-	0.2	60	39.8
3	0.01	0.2	60	39.79
4	0.02	0.2	60	39.78
5	0.05	0.2	60	39.75
6	0.075	0.2	60	39.725
7	0.1	0.2	60	39.7

a : 水素添加ホップエキス

b : ポリグリセリン脂肪酸エステル

ス0.1%配合区で処理された蒲鉾について官能検査を実施したが、風味への影響は感じられなかった。

3. 考察

食品分野で使用されているアルコール製剤は、通商産業省管轄の専売アルコールに有機酸塩類やグリセリンエステル等を配合してアルコールの殺菌力を高めた製剤として、食品が接する機械、器具、容器の殺菌や従業員の手指の殺菌等に利用されている。また、洗浄除菌剤は、文字どおり洗浄能力と除菌能力を併せ持った製剤であり、非イオン、両性および陽イオン界面活性剤を主成分としており、工場内施設環境(製造ライン、床など)の洗浄と除菌・殺菌に用いられている。これらの製剤に対しては、その使用目的から殺菌レベルが非常に重要となる。今回、これらへのホップエキスの配合により、食品工場の常在菌である乳酸菌や食中毒菌である大腸菌およびセレウス菌に対する殺菌力が上昇したことは、工場内衛生レベルの向上に有用である。

アルコール製剤は食品添加物製剤であるので、直接食品に噴霧したり浸漬処理を施

表4-43-1. 30℃保存蒲鉾のネット発生状況

Ex. No. ^a	ホップ量 (%)	1日目	2日目	3日目	6日目
1	0	-	±	+	## ^b
2	0	-	±	+	## ^b
3	0.01	-	-	± ^c	## ^b
4	0.02	-	-	- ^c	## ^b
5	0.05	-	-	- ^c	## ^b
6	0.075	-	-	-	-
7	0.1	-	-	-	- ^c

a : 検体配合処方 は表4-42を参照

b : 液状軟化が発生

c : 植菌した*B. cereus* 以外の菌によるネットが発生

表4-43-2. 20℃保存蒲鉾のネット発生状況

Ex. No. ^a	ホップ量 (%)	2日目	3日目	6日目	8日目	10日目
1	0	-	-	+	##	## ^b
2	0	-	±	+	##	## ^b
3	0.01	-	-	±	±	+ ^{bc}
4	0.02	-	-	±	±	±
5	0.05	-	-	-	-	-
6	0.75	-	-	-	-	-
7	0.1	-	-	-	-	-

a : 検体配合処方 は表4-42参照

b : 液状軟化が発生

c : 植菌した*B. cereus* 以外の菌によるネットが発生

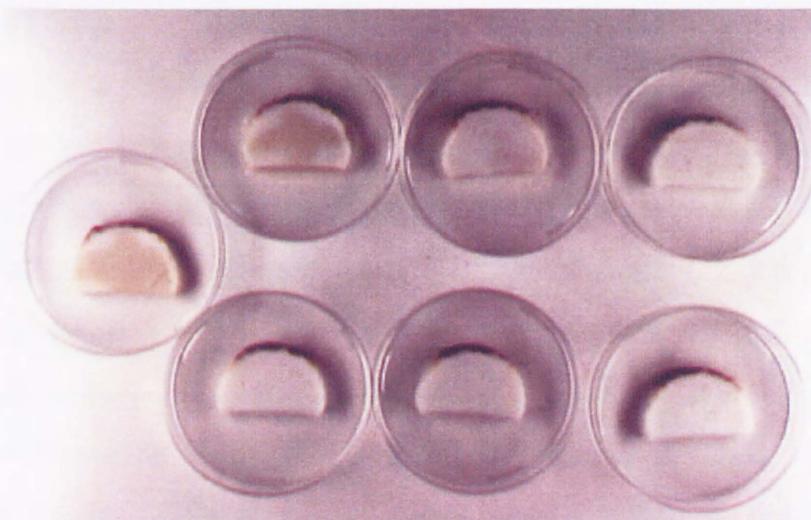
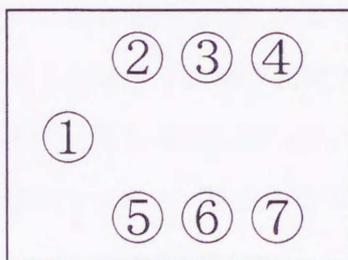


図4-23. 20℃保存・10日目の蒲鉾のネット発生状況



数値はEx. No.

すことが可能である。食品工場では、半製品の殺菌や二次汚染防止目的で最終食品への噴霧等が頻繁に実施されている。噴霧あるいは浸漬処理によって食品表面に付着したアルコールは、経時的に蒸発するものの、アルコール製剤中に配合されている不揮発性の成分は、処理後食品表面付近に残存すると予想される。そこで、ホップエキス配合アルコール溶液を用いて、蒲鉾のネット発生実験を行ったところ、浸漬処理によって蒲鉾表面に付着したホップエキスがセレウス菌の増殖を抑制し、ネットの発生を大幅に遅らせた。このことは、加熱後の二次汚染対策として、アルコール製剤へのホップエキス配合が有効であることを示す。しかし、ホップエキスの抗菌スペクトルからみて、二次汚染菌がグラム陰性菌や真菌の場合は効果が期待できないと推察される。アルコール製剤が頻繁に使用されている食肉製品での二次汚染は主として乳酸菌などのグラム陽性菌による汚染が多く^{109~111)}、また、加工食品の変敗原因菌としても *Bacillus* sp.、*Micrococcus* sp. および乳酸菌等のグラム陽性菌が多数検出されている¹¹²⁾。従って、ホップエキスのアルコール製剤等への配合は、殺菌力の上昇のみならず、その残存による制菌効果の発揮という二段構えの作用があり、食品の保存性向上の有効な一手段となりうると思う。

第11節 食品での保存性向上効果

本節までに主としてインビトロ系でのホップエキスの抗菌性に関して検討を実施した。本節では、ホップエキスの食品での保存性向上効果を把握するために、食品ホモジネイズ溶液系および食品での保存試験を行った。また、食品用制菌剤として利用しやすくするために、水に溶けないホップエキスの可溶化を試みた。

1. ホップエキスの粉末化

ホップエキスは水に不溶であり、そのままでは食品用制菌剤として利用しづらい。そこで、制菌素材として扱いやすくするため、ホップエキスの可溶化・粉末化を試みた。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとして、カルターフードサイエンス社より入手したアロマホップ(β 酸

含量：50%）、ベータホップ(β 酸含量：70%)および水素添加ホップエキスを用いた。乳化剤および賦形剤として、カゼインナトリウム(ユニレート社)、ポリグリセリン脂肪酸エステル(グリスターML750)、ソルビタン脂肪酸エステル(ソルゲン90、第一工業製薬(株)、京都)およびデキストリン(NSD300、日本資糧工業(株)、東京)を使用した。

〔粉末化の方法〕

ホップエキスの粉末化は、ホップエキスの乳化液を調製し、これをスプレードライヤー(MODEL：L-12、大川原化工機(株))で噴霧乾燥する方法にて実施した。なお、スプレードライヤーは、入口温度が170~175℃、出口温度を75~80℃に設定し、アトマイザーの回転数を19,000rpmで運転した。

〔結果〕

まず、乳化剤として汎用されているカゼインナトリウムを用い、粉末化を試みた。表4-44に示す乳液の組成にてホップエキスの乳化が可能であり、スプレードライによりホップエキス粉末(以下、スプレー品とする。)が得られた。しかし、本乳化処方では、乳液を液状に保つためには高温の維持が必要であり、製造現場では、ハンドリング面で大きな問題になると予想された。また、スプレー品には、経日的なケーキングの発生が認められ、安定性の面でも好ましくないと判断されたので、乳化剤を変更して、ホップエキスの粉末化を試みた。ヤシ油、プロピレングリコール等ではホップエキスを乳化できなかったが、ポリグリセリン脂肪酸エステル(グリスター-ML750)を用いるとハンドリング性の優れたホップエキス乳液を調製することが可能であった。表4-45に示す組成の乳液をスプレードライにて粉末化し、 β 酸含量が2.25%のホップエキス粉末をB225、 β 酸含量が4.5%のホップエキス粉末をB450とした。B225およびB450ともに、ホップ臭を呈する水に易溶な黄色粉末であった。なお、グリスターML750は、デカグリセリンラウリン酸モノエステルであり、HLBが15と親水性の強いポリグリセリン脂肪酸エステルである。

次に、水素添加ホップエキスの粉末化を実施した。通常のホップエキスの場合と同様に、ポリグリセリン脂肪酸エステルを利用することにより粉末化が可能であり、表4-46に示す乳液より調製した水素添加ホップエキス粉末をH-10とした。また、表4-47に示すように、通常ホップエキス(ベータホップ)と水素添加ホップエキスの双方を含んだホップエキス粉末を調製することも可能であり、粉末中の β 酸含量が10.7%

表4-44. ホップエキス乳化液の組成

原 材 料	配合量(%)	
	アロマホップ	12.0
カゼインナトリウム	6.0	
ソルビタン脂肪酸エステル ^a	0.6	
デキストリン ^b	21.4	
水	60.0	

a : ソルゲン90

b : NSD500

表4-45. ホップエキス乳化液の組成

原 材 料	配合量(%)	
	B225	B450
ベータホップ	1.6	3.2
ポリグリセリ脂肪酸エステル ^a	0.9	1.8
ソルビタン脂肪酸エステル ^b	0.3	0.3
デキストリン ^c	47.2	44.7
水	50.0	50.0

a : グリスターML750

b : ソルゲン90

c : NSD300

表4-46. 水素添加ホップエキス乳化液の組成

原 材 料	配合量(%)	
水素添加ホップエキス	4.0	
ポリグリセリ脂肪酸エステル ^a	4.0	
ソルビタン脂肪酸エステル ^b	0.2	
デキストリン ^c	31.8	
水	60.0	

a : グリスターML750

b : ソルゲン90

c : NSD300

表4-47. ホップエキス乳化液の組成

原 材 料	配合量(%)	
	BH-10	BH-20
ベータホップ	0.4	0.8
水素添加ホップエキス	4.0	8.0
ポリグリセリ脂肪酸エステル ^a	3.6	7.2
ソルビタン脂肪酸エステル ^b	0.2	0.2
デキストリン ^c	31.8	23.8
水	60.0	60.0

a : グリスターML750

b : ソルゲン90

c : NSD300

の粉末をBH-10、21.4%含量粉末をBH-20とした。

2. ホップエキス粉末の抗菌力

前項、1.にて調製したホップエキス粉末の抗菌力を、通常のホップエキスと比較した。

〔実験方法〕

〔試料〕

ホップエキス粉末として、スプレー品およびB225を用い、通常のホップエキスとしてアロマホップを供試した。

〔供試菌〕

ホップが強い抗菌力を発揮する以下のグラム陽性菌6菌株を用いた。

- ・ *Bacillus cereus* OUT8032
- ・ *Bacillus subtilis* (カスタートクリーム分離菌)
- ・ *Micrococcus flavus* (日本新薬株保存株)
- ・ *Staphylococcus aureus* FDA209P
- ・ *Lactobacillus brevis* (ベーコン分離菌)
- ・ *Leuconostoc mesenteroides* (ミートボール分離菌)

〔抗菌力測定法〕

まず、乳酸菌を除く菌株に対する試験法は以下の通りである。40mMリン酸緩衝液(pH6.5)にて調製した標準寒天培地を滅菌した後、各試料をβ酸として0.0025%になるように添加溶解してシャーレに分注し寒天平板を調製した。風乾後、供試菌懸濁液を無菌ガラス棒で接種(ーの字を書くように植菌した)し、30℃にて48時間培養してコロニーの生育状況を観察した。なお、供試菌懸濁液は、標準寒天斜面培地(φ18試験管)にて30℃で24時間培養した供試菌を、滅菌水1mlに懸濁して調製した。

つぎに、乳酸菌に対しては、液体培地中での増殖の有無より抗菌力を判定した。すなわち、40mMリン酸緩衝液(pH6.5)にて調製したMRSブイオンを滅菌した後、各試料をβ酸として0.0025%になるように添加溶解し、試験管に10ml分注した。これに、供試菌懸濁液0.02mlを添加した後、30℃にて静置培養し増殖状況を観察した。なお、供試菌培養液は、供試菌一白金耳をMRSブイオンに接種し、30℃で24時間静置した

表4-48. ホップエキス粉末のインビトロ系抗菌力試験結果

供試菌	生育状況 ^a			
	無添加	ホップ	スプレー品	B225
<i>B. cereus</i>	+	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	+	-	-	-
<i>M. flavus</i>	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-
<i>L. brevis</i>	+	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	+	-	-	-
平板培地のpH	6.58	6.62	6.63	-

a : + ; 増殖認める
 - ; 増殖認めず

培養液を滅菌水にて10⁴倍希釈して用いた。

[結果]

スプレー品、B225およびアロマホップのインビトロ系抗菌力試験結果を表4-48に示す。両ホップエキス粉末は、β酸として0.0025%添加で供試菌の増殖を完全に抑制しており、粉末化による抗菌力の低下はみられずホップエキス粉末の抗菌効果は安定であることが確認された。

3. 食品ホモジネイト系での保存性向上効果

ホップエキスの保存性向上効果に関して、インビトロ系と食品との中間的な位置付けである食品ホモジネイトを用いてホップエキスの効果を検討した。

3-1. 竹輪ホモジネイトでの保存性向上効果

竹輪のホモジナイズ溶液にホップエキスを配合したミックスAおよびSW-113(何れ

表4-49. ミックルAおよびSW-113の配合処方

原 材 料	配 合 量 (%)	
	ミックルA	SW-113
酢酸ナトリウム(無水)	45.0	23.8
リゾチーム	-	1.0
グリセリン脂肪酸エステル	0.6	-
メタリン酸ナトリウム	-	25.0
クエン酸三ナトリウム	14.0	13.3
アジピン酸	-	12.0
フマル酸一ナトリウム	6.0	5.7
高級脂肪酸	0.6	-
食品素材(糖類等)	33.8	19.2

も日本新薬(株)製制菌剤、配合処方を表4-49に示す。)を添加し、ホップエキスの配合による保存性向上効果を調べた。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとして、粉末化ホップエキスであるスプレー品(アロマホップ:30.0%、カゼインナトリウム:15.0%、ソルゲン90:1.5%、NSD-500:53.5%、本節、1.を参照。)を用い、これをミックルAあるいはSW-113に配合してホップエキス配合品を調製した。すなわち、ミックルAとスプレー品を99:1の比率にて混合した製剤をホップエキス配合ミックルAとし、SW-113にスプレー品を98:2の割合にて加えホップエキス配合SW-113とした。なお、ホモジナイズ処理する竹輪については、市販品(株)ヤスマ製、大阪)を用いた。

[試験方法]

竹輪1部に対し9部の滅菌済み0.2Mリン酸緩衝液(pH6.5)を加えて、ホモジナイザーにより10%竹輪ホモジナイズ溶液を調製した。これに、表4-50-1および4-50-2に示す試料検体を添加溶解し、30℃にて保存した。そして、保存1日目および2日目にお

表4-50-1. 竹輪ホモジネイトに添加した検体内容(ミックルA)

Ex. No.	検 体 内 容	添加量 (%)
1	無添加	—
2	ミックルA	1.0
3	ホップエキス粉末 ^a	0.003 ^c
4	ホップエキス配合ミックルA ^b	1.0 ^d

a : スプレー品

b : ミックルA : スプレー品 = 99 : 1

c : アロマホップとして

d : アロマホップとしては、0.003%

表4-50-2. 竹輪ホモジネイトに添加した検体内容(SW-113)

Ex. No.	検 体 内 容	添加量 (%)
1	無添加	—
2	SW-113	0.5
3	SW-113	1.0
4	ホップエキス配合SW-113 ^a	0.5 ^b

a : SW-113 : スプレー品 = 98 : 2

b : アロマホップとしては、0.003%

けるホモジネイト中の生菌数を、標準寒天培地を用いた混釈法で測定した。また、各ホモジネイトのpHをpHガラス電極にて測定した。

[結果]

30℃保存中におけるホップエキス配合ミックルA等を添加した竹輪ホモジネイトの生菌数変化を図4-24に示す。保存開始時の生菌数は 10^4 オーダー/mlであったが、30℃での保存により*Staphylococcus* sp.および*Lactobacillus* sp.が活発に増殖し、無添加区では1日目で 1.8×10^{10} cfu/mlに達した。このホモジネイトへミックルA(1%)を添加することにより、保存1日目では生菌数の増加は認められなかったが、2日目には 1.5×10^8 cfu/mlとなり変敗に達した。しかし、ホップエキス配合ミックルA(ミックルA中にアロマホップを0.3%配合)区では、30℃保存・2日目でも生菌数の増加は認められなかった。一方、ミックルAに配合した量のホップエキス単独区(ホップエキス粉末区)については、保存1日目に生菌数は 1.5×10^9 cfu/mlに達した。従って、ミックルAにホップエキスを配合することにより、相乗的な竹輪ホモジネイトの保存性向上効果が示された。

つぎに、ホップエキス配合SW-113等を添加した竹輪ホモジネイトにおける30℃保存中の生菌数変化を図4-25に示す。生菌数が 10^4 オーダー/gであったホモジネイトを、30℃にて1日保存することにより 8.5×10^9 cfu/mlにまで増殖した。このホモジネイトへSW-113を0.5%添加することによって、1日目では 9.1×10^6 cfu/mlに、2日目には 9.2×10^{11} cfu/mlにまで達した。一方、ホップエキス配合SW-113の0.5%添加により、30℃保存で2日間完全に生菌数の増加が抑制され、SW-113の1%添加区と同レベルの保存性が示された。すなわち、ホップエキスの配合により、製剤(SW-113)の添加量が半減できたことになる。以上の結果より、ミックルAと同様に、SW-113へのホップエキスの配合による顕著な保存性向上効果が認められた。

3-2. ウィンナーホモジネイトでの保存性向上効果

ウィンナーのホモジナイズ溶液にホップエキスを配合したミックルAを添加し、ホップエキスの配合による保存性向上効果を調べた。

[実験方法]

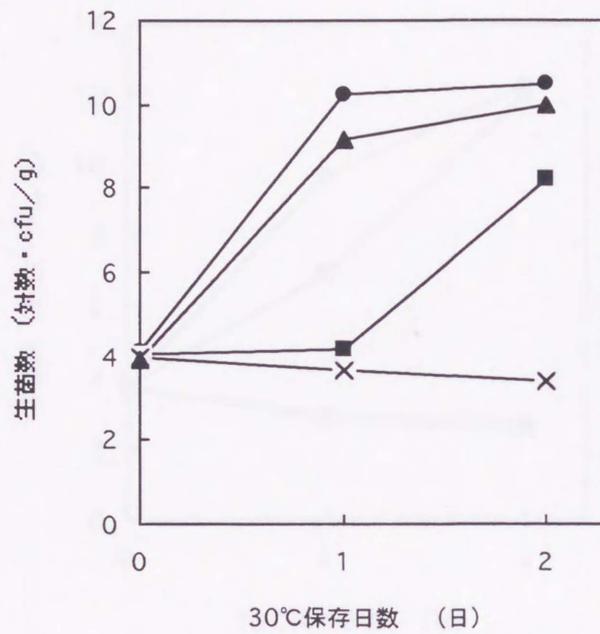


図4-24. 30°C保存中における竹輪ホモジネイトの生菌数変化(ミッケルA区)

- : 無添加
- : ミッケルA
- ▲ : ホップエキス粉末
- × : ホップエキス配合ミッケルA

主菌叢 : *Staphylococcus* sp.、*Lactobacillus* sp.

保存開始時の竹輪ホモジネイトのpH

- : 7.47、■ : 6.26、▲ : 6.23、× : 6.25

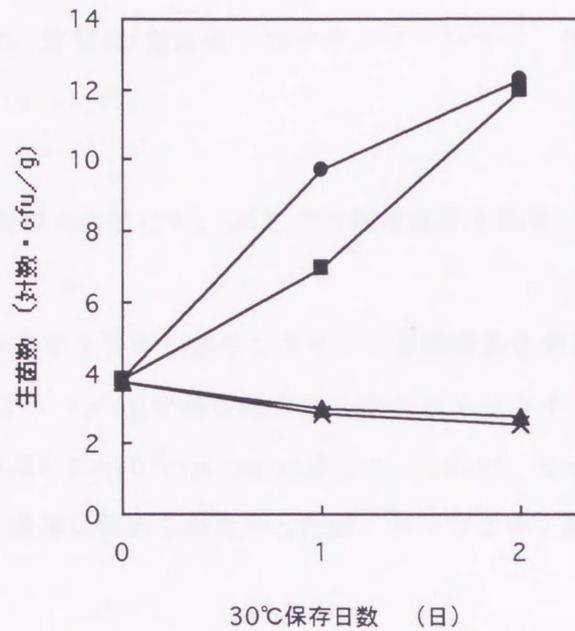


図4-25. 30°C保存中における竹輪ホモジネイトの生菌数変化(SW-113区)

- : 無添加
- : SW-113 (0.5%)
- ▲ : SW-113 (1.0%)
- × : ホップエキス配合SW-113 (0.5%)

主菌叢 : *Staphylococcus* sp.、*Lactobacillus* sp.

保存開始時の竹輪ホモジネイトのpH

- : 6.50、■ : 6.39、▲ : 6.29、× : 6.39

〔試料〕

ホップエキスとしては、前項、3-1.と同様にスプレー品を用い、ミックルAとスプレー品を95：5の比率にて混合した製剤をホップエキス配合ミックルAとした。なお、ホップエキス配合ミックルAは、製剤中にアロマホップを1.5%含有する。また、ウインナーについては、市販品(商品名：カクテルウインナー、中田天狗産業(株)、東京)を用いた。

〔試験方法〕

前項、3-1.と同様の方法にて、30℃での保存試験を実施した。

〔結果〕

30℃保存におけるウインナーホモジネイトの生菌数変化を表4-51に示す。保存開始時に生菌数が 10^1 オーダー/mlであったウインナーホモジネイトを30℃に保存すると、2日目には生菌数は 2.2×10^8 cfu/mlに達した。この時、ミックルAの0.5%区では、生菌数の増加抑制効果は認められなかったが、ホップエキス配合ミックルAの0.5%区

表4-51. 30℃保存におけるウインナーホモジネイトの生菌数変化

Ex.No.	検体内容	添加量	スタート ^a	30℃・2日目
1	無添加	—	6.0×10^1	2.2×10^8
2	ミックルA	0.5 %	2.0×10^1	1.9×10^8
3	ミックルA	1 %	3.0×10^1	7.0×10^7
4	ホップエキス配合ミックルA ^b	0.5 %	N.D.	1.1×10^7
5	ホップエキス配合ミックルA ^b	1 %	2.0×10^1	2.0×10^3

主菌叢：保存開始時 ; *Lactobacillus* sp.
 30℃・2日目 ; *Lactobacillus* sp.、*Bacillus* sp.
Staphylococcus sp.

a：ウインナーホモジネイトのpH

Ex. No. 1 ; 6.48、2 ; 6.44、3 ; 6.44、4 ; 6.42、5 ; 6.42

b：ミックルA：スプレー品=95：5

およびミックルA 1%区の場合は30℃保存・2日目の生菌数が無添加区の約10分の1となり、さらに、ホップエキス配合ミックルAの1%区では約100000分の1にまで抑制された。すなわち、ミックルAへのホップエキスの配合により、強い保存性向上効果が示された。

4. 食品での保存性向上効果

ホップエキスの抗菌性に関して、インビトロ系や食品ホモジネイト系での抗菌効果を検討してきたが、最終的な保存性向上効果について食品への添加実験を実施した。

4-1. 蒲鉾での保存性向上効果

4-1-1. K101へのホップエキスの配合

蒲鉾の保存性に対するK101(日本新薬(株)製制菌剤、配合処方を表4-52に示す。)とホップエキスの併用効果について検討した。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとして水素添加ホップエキス粉末BH-20(詳細は、本節、1.を参照。)を用い、K101と1:9(=BH-20:K101)の比率にて混合し、ホップエキス配合K101を調製した。

表4-52. K101の配合処方

原 材 料	配合量 (%)
グリシン	59.2
酢酸ナトリウム(無水)	32.1
グリセリン脂肪酸エステル	0.5
クエン酸三ナトリウム	2.5
高級脂肪酸	1.4
食品素材(糖類等)	4.3

表4-53. 蒲鉾の配合処方

原材料	配合量 (%)
助宗すり身(SA級)	60.0
馬鈴薯澱粉	7.0
食塩	1.7
砂糖	1.0
グルタミン酸ナトリウム	0.5
水	29.8

〔試験方法〕

表4-53に示す原材料をサイレントカッターにてカッティングし調製した練肉に、芽胞懸濁液を芽胞が 10^1 オーダー/g前後となるように混合した。これを、クレハロンケーシングに充填した後、85℃で40分間ボイル加熱して蒲鉾に仕上げた。5℃にて放冷した後、20℃に保存し、経日生菌数変化を標準寒天培地を用いた混釈法にて測定した。なお、芽胞懸濁液は、標準寒天培地にて形成された *Bacillus cereus* OUT8032の芽胞をM/25リン酸緩衝液(pH6.5)に懸濁(マクファランドNo.2程度)して調製した。

〔結果〕

20℃保存中における蒲鉾の生菌数変化を図4-26に示す。保存開始時の生菌数は、何れの試験区も検出されなかった。しかし、20℃で3日間の保存により、無添加区では 1.6×10^5 cfu/gにまで *B. cereus* が増殖した。この場合、K101区では $10^3 \sim 4$ オーダー/gの生菌数が認められたが、ホップエキス配合K101区の場合1%添加で菌が検出されず、0.5%区でも僅かに生菌数が認められるレベルであり、ホップエキスの配合による保存性向上効果が示された。また、官能検査の結果、何れの試験区についても異味・異臭は感じられなかった。

4-1-2. ホップエキス製剤の保存効果

ホップエキスと日持向上剤の主剤および副剤を組合せて調製したホップエキス製剤

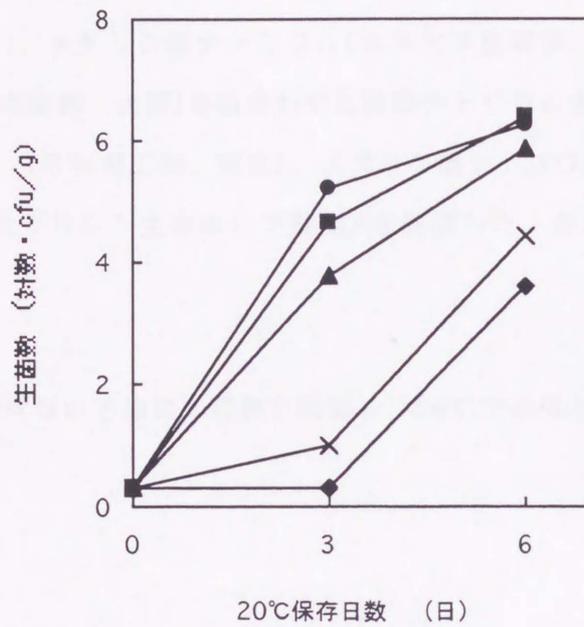


図4-26. 20°C保存中における蒲鉾の生菌数変化

- : 無添加
- : K101 (0.5%)
- ▲ : K101 (1%)
- × : ホップ配合K101 (0.5%)
- ◆ : ホップ配合K101 (1%)

主菌叢 : *Bacillus cereus*

保存開始時の蒲鉾のpH

- : 7.08、■ : 7.06、▲ : 7.06
- × : 7.06、◆ : 7.05

について、蒲鉾での保存効果を検討した。

[実験方法]

[試料]

水素添加ホップエキス粉末BH-20(詳細は、本節、1.を参照。)と酢酸ナトリウム(大東化学(株)、東京)、メタリン酸ナトリウム(太平化学産業(株)、大阪)およびクエン酸三ナトリウム(田辺製薬(株)、大阪)を組合わせた酢酸ナトリウム主体ホップ製剤A、さらにBH-20とグリシン(昭和電工(株)、東京)、メタリン酸ナトリウムおよびクエン酸三ナトリウムを配合したグリシン主体ホップ製剤Bを調製した。各ホップ製剤の処方を表4-54に示す。

[試験方法]

前項、4-1-1.と同様の方法にて蒲鉾を調製し、20℃での保存試験を実施した。

表4-54. 供試ホップ製剤の配合処方

原 材 料	酢酸Na主体 ホップ製剤A	グリシン主体 ホップ製剤B
酢酸ナトリウム	50 %	—
グリシン	—	50 %
メタリン酸ナトリウム	20	20
クエン酸三ナトリウム	10	10
BH-20 ^a	20	20
1 %水溶液pH	6.73	6.78

a : BH-20配合処方 ; 水素添加ホップ	20.0 %
ベータホップ	2.0
グリスターML-750	18.0
ソルゲン90	0.5
NSD-300	59.5

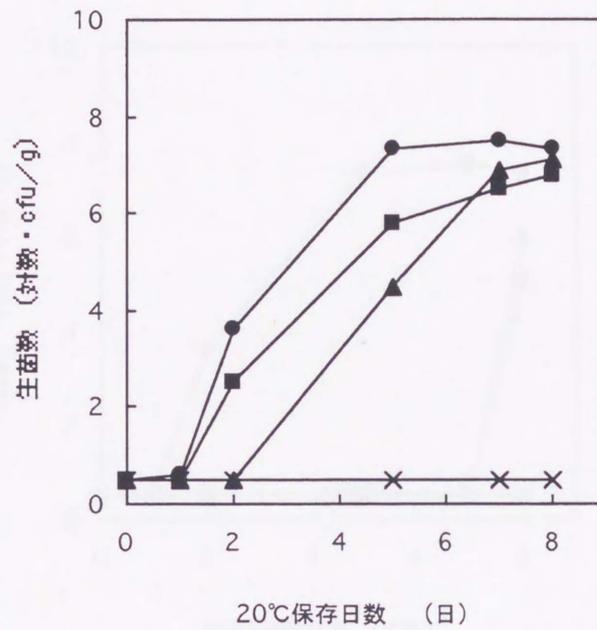


図4-27. 20°C保存中における蒲鉾の生菌数変化

- : 無添加
- : ミックルA (1%)
- ▲ : 酢酸ナトリウム主体ホップ製剤A (0.5%)
- × : 酢酸ナトリウム主体ホップ製剤A (0.75%)

主菌叢 : *Bacillus* sp.

保存開始時の蒲鉾のpH

● : 7.25、■ : 7.05、▲ : 7.14、× : 7.09

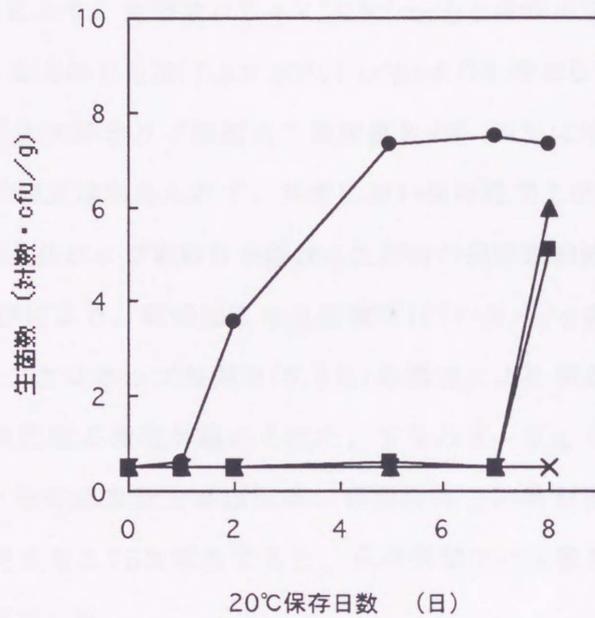


図4-28. 20℃保存中における蒲鉾の生菌数変化

- : 無添加
- : K101 (1%)
- ▲ : グリシン主体ホップ製剤B (0.5%)
- × : グリシン主体ホップ製剤B (0.75%)

主菌叢 : *Bacillus* sp.

保存開始時の蒲鉾のpH

- : 7.25、■ : 7.16、▲ : 7.10、× : 7.06

[結果]

酢酸ナトリウム主体ホップ製剤Aの蒲鉾における保存性向上効果を図4-27に示す。保存開始時には生菌数は検出されなかったが、20℃で5日間の保存により生菌数が 2.5×10^7 cfu/gに達し変敗に至った。この際、酢酸ナトリウム主体ホップ製剤Aを0.5%添加することにより、生菌数は 2.4×10^4 cfu/gと無添加区の1000分の1に抑制され、これはミックルAの1%区(7.3×10^5 cfu/g)よりも好ましい保存効果であった。また、酢酸ナトリウム主体ホップ製剤Aの添加量を0.75%に増量することにより10℃で8日間生菌数の増加は認められず、非常に強い保存性向上効果が示された。

つぎに、グリシン主体ホップ製剤Bを添加した蒲鉾の保存試験結果を図4-28に示す。20℃で7日間の保存により、無添加区が生菌数は 10^7 オーダー/gを越えたが、K101(1%)あるいはグリシン主体ホップ製剤B(0.5%)の添加により保存7日目まで生菌数は検出されず、8日目に菌の増殖が認められた。すなわち、グリシン主体ホップ製剤Bの場合、K101の半分の添加量でほぼ同等の保存性向上効果が得られた。また、グリシン主体ホップ製剤Bを0.75%添加すると、保存期間中に生菌数は検出されず、極めて強い保存効果が示された。

なお、官能検査の結果、酢酸ナトリウム主体ホップ製剤Aおよびグリシン主体ホップ製剤B区ともに異味・異臭は感じられなかった。

4-2. マッシュポテトでの保存性向上効果

SW-113とホップエキスの併用による保存性向上効果について、マッシュポテトを用いた検討を実施した。

[実験方法]

[試料]

ホップエキスとして、カルターフードサイエンス社より入手したベータホップをポリグリセリン脂肪酸エステルとデキストリンにて粉末化したホップエキス粉末3D(ベータホップ:10.7%、グリスターML750:19.3%、NSD-300:70.0%、β酸含量:7.5%、本節、1.を参照。)を用いた。併用する制菌剤としてはSW-113(日本新薬株、京都)とした。

[試験方法]

市販の乾燥マッシュポテト(原材料;じゃがいも、グリセリンエステル、脱脂粉乳、ピロリン酸Na、クエン酸、雪印乳業(株)、東京) 100gに無菌温水 400mlを加えてもどし、試料を添加混合して仕上げた。これを、30℃に保存し、1日目および2日目の生菌数を標準寒天培地を用いた混釈法にて測定した。

[結果]

30℃に保存した時のマッシュポテトの生菌数変化を図4-29に示す。仕上がり時のマッシュポテトの生菌数は 10^{20} cfu/gであったが、30℃に2日間保存することにより、生菌数は 6.8×10^9 cfu/gに達した。これに、ホップエキス粉末を水素添加ホップエキスとして0.01%添加すると若干の増殖抑制効果がみられ、また、SW-113(0.5%)単独区については、ホップエキス粉末区よりも好ましい保存効果が示された。さらに、SW-113とホップエキス粉末を併用使用することにより、より優れた保存性の向上効果が認められ、30℃保存・2日目の生菌数が 5.5×10^5 cfu/gと無添加区の約10000分の1に減少した。また、官能検査より、何れの試験区についても異味・異臭は感じられなかった。

5.考察

食品用制菌剤のスクリーニング方法として、まず、インビトロ系での抗菌力を確認した後、実際の食品での保存性向上効果を調べるのが通常である。しかしながら、インビトロ系での抗菌効果と食品での効果が必ずしも一致せず、インビトロ系では抗菌効果が認められても、食品では効果が発揮されないケースがたびたびある。食品の系は、通常たん白質、澱粉などの高分子、油脂を含み、またpH域も広く分布しているので、単純なインビトロ系試験では効力を全面的に判定できない。最終的には、食品での保存性評価が重要となるが、食品での評価の実施にあたっては、「検体毎に食品を作らなければならない」、「経日的な細菌試験が必要である」、「試験検体を多くしづらい」等、インビトロ系と比較した時のデメリットがある。これらのデメリットをなるべく解消し、かつ実際の食品成分に近い実験系として、食品ホモジナイズ溶液を用いた制菌剤の保存性向上評価を従来より実施している。本試験法では、インビトロ系と食品との中間的な位置付けであり、食品での試験結果と高い相関が得られる(日本新薬(株)内部実験結果より)。今回、ホップエキスが食品の保存性向上に及ぼす影響を調

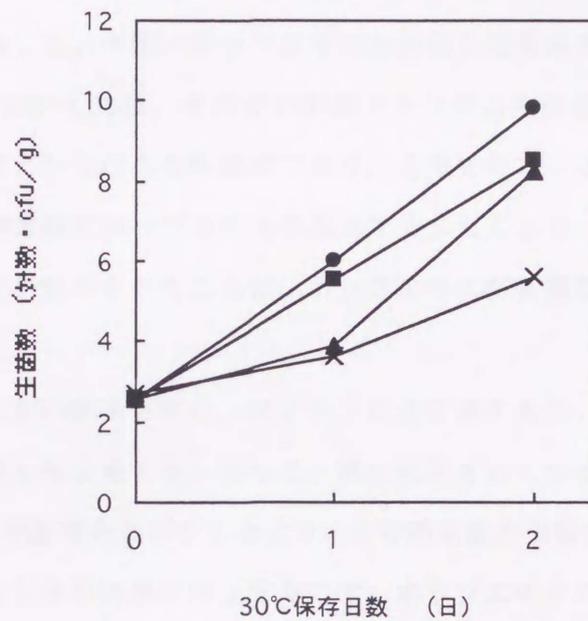


図4-29. 30°C保存中におけるマッシュポテトの生菌数変化

- : 無添加
- : ホップエキス粉末 (水添ホップとして0.01%)
- ▲ : SW-113 (0.5%)
- × : ホップエキス粉末+SW-113

主菌叢 : 保存開始時 ; *Bacillus* sp.
 それ以降 ; *Lactobacillus* sp.
 Staphylococcus sp.
 Bacillus sp.

保存開始時のマッシュポテトのpH

- : 5.25、■ : 5.20、▲ : 5.25、× : 5.25

べる一環として、竹輪およびウインナーのホモジネイトを用いてホップエキスの効果を評価した。その結果、食品用制菌剤(ミックルAおよびSW-113)とホップエキスを併用することにより、相乗的な保存性向上効果が示された。また、蒲鉾の保存試験においても、ホップエキスと制菌剤(K101)の併用によって、蒲鉾中の生菌数増加が抑制され、日持ちが延長した。今回、ホップエキスと併用した食品用制菌剤であるミックルA、K101およびSW-113は、それぞれ酢酸ナトリウム主体製剤、グリシン主体製剤およびメタリン酸ナトリウム主体製剤であり、上市されている代表的な制菌剤である¹¹³⁾。これらの制菌剤にホップエキスを配合することにより、何れの制菌剤でも大きな保存効果の向上が認められたことは、ホップエキスが有望な制菌素材であることを意味する。

酢酸ナトリウムは強い酸味を有し、グリシンには甘味があり、さらにメタリン酸ナトリウムはしゅうれん味を発する。従って、現在使用されている食品用制菌剤は、多かれ少なかれ風味へ悪影響を及ぼすことより、その添加量が制限される。制菌剤とホップエキスを併用すると保存効果が向上するので、ホップエキスの配合により制菌剤の添加濃度を減じることができる。現に蒲鉾の保存試験において、ホップエキス配合K101の0.5%区は、K101の1%区よりも優れた生菌数の増加抑制効果を示した。従って、ホップエキスの利用により、制菌剤の添加濃度を下げることが可能となり、風味への悪影響を減じながら従来と同等以上の保存効果を期待できると考えられる。

第5章 総合考察

近年、食品の安全性確保についての関心が国際的にも高まり、我が国でもPL法や総合衛生管理製造過程承認制度の施行および食品の期限表示のスタートと、次々と新しい制度が導入された。また、平成8年、病原性大腸菌O-157による食中毒が岡山の小学校に端を発し、全国に広まり死者もでたことから大きな社会問題となり、食品の安全性への要求・関心が一段と高まった。食品業界では、製造工程における衛生管理の徹底とともに、食品の制菌対策には一層の注意が払われるようになってきている。食品の保存性を向上させるには、微生物の汚染や増殖を阻止することが何よりも重要である。そして、その微生物を死滅させるか、あるいは増殖を阻止する方法として、加熱・冷殺菌、低温流通、酸素除去といった物理的な方法と、pH、浸透圧および水分活性の調整、保存料や日持向上剤などの抗菌性物質の添加等の化学的な方法がある。これらは、何れも古くから知られ、食品保存に長年実施されている技術であり、新しい微生物制御手段としては超高压技術の研究¹¹⁴⁾ (一部実用化されている)があるだけで、新規なアイデアによる研究はほとんどないのが現状である。しかしながら、それぞれの技術に関する進歩はみられ、特にコールドチェーンの発達に伴う低温流通技術の向上には目ざましいものがあり、また抗菌性物質についても、新規物質の食品への応用が報告されている^{115~118)}。

この低温流通技術の発達によって、生鮮食品や保存性の悪い加工食品の貯蔵期間の延長が図られるようになってきた。しかし、このような低温保存期間の延長により、常温流通とは異なるいわゆる低温細菌による新しいタイプの変敗が引き起こされる可能性が予想され、蒲鉾の軟化変敗はまさにその一例と考えられる。*Pseudomonas* sp. はたん白質および脂肪の分解力が強く、食品の最も重要な腐敗細菌の一つとして知られているが、低温長期保存という要因が加わって、蒲鉾での軟化変敗が初めて見出されたのであろう。蒲鉾は、通年販売されているものの、その需要は年末年始、特に正月過ぎに増大する。各製造メーカーは、週休二日制の導入や人手不足、製造能力などの理由により年末に集中生産できないため、11月下旬から正月用製品の製造にはいり、仕上がり品は低温保存される。以前は、凍結保存されていたが、離水やテクスチャー等の物性面から冷蔵保存が主体となり、その保存期間も増加している。また、

後述するが、脱ソルビン酸傾向により合成保存料を使用しない製品が増えている。これらの状況は、蒲鉾での*Pseudomonas* sp. のような低温細菌の増殖に有利な内容であり、本品の保存性対策に今一層の注意を払わなければならない。

その対策の一つとして、工場内のサニテーション対策が重要である。蒲鉾製造工場には、蛍光性*Pseudomonas* sp. が常在することを確認したことより、各ラインの洗浄殺菌が必須であるが、殺菌効果の確認のために、定期的な拭き取り試験が必要となる。現在知られている蛍光性*Pseudomonas* sp. 検出培地としては、NACブイヨン、NAC寒天培地、キングA培地およびキングB培地などを挙げるができる。これらの培地に共通していることは、ペプトンや牛心臓浸出液を必須構成成分としていることである。ペプトンや牛心臓浸出液は、N源として蛍光性*Pseudomonas* sp. の発育や蛍光色素の産生に不可欠であると考えられている。しかしながら、ペプトンや牛心臓浸出液を含有する培地では、培地自身が黄褐色を呈しているため、蛍光性*Pseudomonas* sp. が産生する黄緑色や青色の蛍光色素を鋭敏に検出判定するのが困難であった。そこで、培地の色調が無色透明で、蛍光性*Pseudomonas* sp. の検出判定が極めて容易であり、検定者の誤認や個体差が少なく、また紫外線を照射して検定する必要のない検出感度が優れた簡易試験用培地を考案した²⁷⁾。本培地は、蛍光性*Pseudomonas* sp. の選択増菌を高めるナリジクス酸などの抗菌剤やセトリマイドなどの界面活性剤は含まず、またペプトンや牛心臓浸出液を用いていないので、調製が極めて簡単で、また安価である。さらに、製造工程などの拭き取り試験で予想される他菌種が共存する場合でも利用可能であり、工場内の汚染状況検査に充分応用できることから、現在製造ライン等の汚染状況の把握や殺菌効果の確認に利用されている。

このように、簡易試験用培地により容易に検出される*Pseudomonas* sp. の蒲鉾での変敗起因性には、プロテアーゼが関与していることを確認した。すなわち、*Pseudomonas* sp. は、自身の産生したプロテアーゼにより蒲鉾蛋白質を分解し、生成された低分子N源を利用して増殖している。このプロテアーゼの活性が、インビトロ系にて食品添加物であるトリポリリン酸ナトリウムによって阻害され、また、蒲鉾においても配合されたトリポリリン酸ナトリウムがプロテアーゼの活性を低下させたことより、菌体の増殖が抑制された。一方、ホップエキスの抗菌力検討においても、ホップエキスとメタリン酸ナトリウムを併用することにより、グラム陰性菌への相乗

的な抗菌効果が発揮されることを見い出した。これらリン酸塩類は、さまざまな目的で食品に幅広く使用されている^{43~45)}。しかしながら、リン酸塩類を食品の保存性向上のために使用した報告はみられない。メタリン酸ナトリウムの抗菌性に関する研究^{48、49)}はあるものの、メタリン酸ナトリウムの抗菌スペクトルがグラム陽性菌のみと限られているために、食品保存への利用がなされなかったものと推察される。しかしながら、上記の如くトリポリリン酸ナトリウムは、間接的ではあるが*P. fluorescens* Biovar V K-1のようなプロテアーゼ活性を持つ菌への抗菌効果が認められた。また、メタリン酸ナトリウムは、他の抗菌素材との併用によりグラム陰性菌にまで抗菌力が拡大した。これらの抗菌特性より、リン酸塩類は、食品用制菌素材として有効に利用できると思われる。

微生物が生育のためにN源として利用できる窒素化合物は、微生物の種類により異なる。プロテアーゼ活性を持たない微生物はたん白を加水分解できずたん白分解微生物(プロテアーゼを産生してたん白を分解する微生物)の助けを受けるか、外部からN源が添加されなければN源を得られない。近年、加工食品ではコスト面や物性改良面等より肉(魚肉、食肉など)の代替として、卵白、乳たん白、大豆たん白および血漿たん白などの粉末たん白類およびそれらの加水分解物を多用する傾向がある^{30~34)}。これらには、微生物が利用できるN源の他、エネルギー源となるC源や無機塩類やビタミンなどの生育促進物質が含まれるものもある^{35~38)}。このことは、粉末たん白の添加が、*P. fluorescens* IFO3081のようにプロテアーゼ活性を持たない株の増殖を可能にするばかりではなく、微生物全般の増殖を促進するケースがあると予想されるので、微生物学的な視野も合わせ持って粉末たん白の利用を考えなくてはならない。

一方、牛血漿たん白には、*P. fluorescens* IFO3081の増殖を抑制する作用がみられたが、食品中には微生物の増殖を阻害する成分あるいは殺菌効果を示す成分であるいわゆる抗菌性物質の存在が知られている^{119~126)}。食品中の抗菌性物質に関しては、香辛料が食肉などの保存性向上に長年使用され、貴重な蛋白資源の確保に貢献してきた歴史がある。また、疾病の予防、治療にも抗菌活性の強い食品が積極的に利用され、化学医薬品のない時代には大切な医食同源の例とみなされた。このように、食品中の抗菌性物質は、いわゆる従来の栄養素とは全く異なる機能をはたしてきており、近年研究も進んでいるが、卵白由来のリゾチームが実用化されているのみで、乳汁中のラ

クトフェリン¹²⁴⁾ や茶カテキン¹²⁵⁾ など新しい知見も報告されているが実用化までには至っていない。

抗菌性物質は、食品中のみならず、天然にも抗菌作用を示す物質が多数存在するし、複数の化学的合成品が食品保存料として利用されている。近年、消費者意識として、石油を出発原料とする化学的合成品である合成保存料が敬遠され、天然物由来のものが好まれる傾向にある。また、マスコミなどで成人病がクローズアップされるにつれて、低塩、低糖化が推進されるようになったが、このことが、食品自体の保存性を低下させることにもつながり、新たな問題を抱えることになった。さらに、コンビニエンスストアの弁当、惣菜類売上げの急速な拡大とともに加工食品市場が年々伸びている。このような背景から、微生物制御を目的とした制菌剤使用の重要性が増している。

現在、化学的に合成された物質は勿論、天然物も含め厚生大臣が認可した以外の物質は、添加物として使用することができない。また、食品に使用された添加物は、原則として全て表示することが義務づけられている。加工食品の保存を目的に使用された添加物には、保存料として許可された物質が用いられ、保存料という用途名と物質名の併記が義務づけられている。日本食品添加物協会発行の「新食品添加物表示の実務」⁸⁵⁾によれば、表5-1に示すように保存料として28種類の物質が指定されている。これら保存料ほどの効果はないものの、菌の増殖を抑制し保存性の低い食品に数時間または数日といった短期間の腐敗や変敗を抑える目的で使用される添加物がある。これらは、「新食品添加物表示の実務」では日持向上剤(シェルフライフ延長剤)とされ、表5-2に示す添加物を主剤とし、製剤化のため、または主剤の効果の保持・向上のために配合される副剤(表5-3)からなる製剤であり、食品衛生法上の正式な名称ではないが、同法での保存料と区別している。このように、保存性向上目的で使用できる添加物は限定されており、リストアップされている以外の物質を使用するには、厚生大臣の許可が必要となる。そのためには、保存効果に関するデータは勿論、毒性等の安全性データの提出が必須となり、そのデータの蓄積には莫大な時間と費用が必要で、単価が安い食品に使用する添加物として許可を得ることは、企業化としてメリットが少ない。そのため、リストに揚げられている物質を組合わせて使用しているのが現状である。しかしながら、食経験のある天然物からの抽出物はその限りではない。抗菌

表5-1. 保存料として指定されている主剤の範囲

指定添加物	
安息香酸	安息香酸ナトリウム
ソルビン酸	ソルビン酸カリウム
デヒドロ酢酸ナトリウム	パラオキシ安息香酸イソブチル
パラオキシ安息香酸イソプロピル	パラオキシ安息香酸エチル
パラオキシ安息香酸ブチル	パラオキシ安息香酸プロピル
プロピオン酸	プロピオン酸カルシウム
プロピオン酸ナトリウム	亜硫酸ナトリウム(結晶)(無水)
次亜硫酸ナトリウム	二酸化硫黄
ピロ亜硫酸カリウム	ピロ亜硫酸ナトリウム

既存添加物	
ウド抽出物	エゴノキ抽出物
カワラヨモギ抽出物	酵素分解ハトムギ抽出物
しらこたん白抽出物	ツヤプリン(抽出物)
ペクチン分解物	ホオノキ抽出物
ε-ポリリジン	レンギョウ抽出物

性を示す動植物成分は多く知られており、保存料や日持向上剤の主剤としても用いられている。そこで、ビールの原料として古くから用いられているホップの抗菌性に注目した。

ホップはクワ科に属し、つる性、雌雄異株、宿根の栽培植物である。ビールには、成熟した未受精の雌花を使用する。これは、多数の苞が重なり合って、まつかさに似た形をしており、毬花と呼ばれている。ホップの生産地は、ドイツ、アメリカ、チェコなどの北緯45~50度の冷涼な地域であり、日本でも東北地方で僅かに栽培されている。ホップの味と香りは、毬花中に含まれるルプリンと呼ばれる顆粒中の樹脂と精油に由来する。樹脂成分は、ヘキサンに溶解する軟樹脂の主成分と溶解しない硬樹脂に区別される。軟樹脂の主成分はフムロン類(α 酸等)とルプロン類(β 酸等)に分けられ、ビールには苦味の主成分であるフムロン類が使用されている。本研究で使用したホッ

表5-2. 日持向上剤の主剤範囲

指定添加物	
グリセリン脂肪酸エステル(中鎖脂肪酸に限る)	グリシン
酢酸(氷酢酸)および酢酸ナトリウム	チアミンラウリル硫酸塩

既存添加物	
イチジク葉抽出物	オレガノ抽出物
カラシ抽出物	カンゾウ油性抽出物
キトサン	クローブ抽出物
クワ抽出物	コウジ酸
酸素処理チャ抽出物	酵素分解リンゴ抽出物
シソ抽出物	ショウガ抽出物
セイヨウワサビ抽出物	セージ抽出物
タデ抽出物	チャ抽出物
トウガラシ水性抽出	生ダイズ抽出物
ニンニク抽出物	ハチク抽出物
ピメンタ抽出物	ブドウ果皮抽出物
ブドウ種子抽出物	プロポリス抽出物
ペパー抽出物	ホッコシ抽出物
マダケ抽出物	ミカン種子抽出物
モウソウチク乾留物	モウソウチク抽出物
モミガラ抽出物	ユッカフォーム抽出物
リゾチーム	ローズマリー抽出物
ワサビ抽出物	

表5-3. 日持向上剤の副剤範囲

アジピン酸	イタコン酸
クエン酸(結晶)(無水)	クエン酸三ナトリウム
クエン酸一カリウム	クエン酸三カリウム
グルコノデルタラクトン	グルコン酸
コハク酸	コハク酸一ナトリウム
コハク酸二ナトリウム	DL-酒石酸
L-酒石酸	DL-酒石酸ナトリウム
L-酒石酸ナトリウム	炭酸塩類
二酸化炭素	乳酸
乳酸ナトリウム	ピロリン酸四カリウム
ピロリン酸二水素二ナトリウム	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)(無水)
フィチン酸	フマル酸
フマル酸一ナトリウム	ポリリン酸カリウム
ポリリン酸ナトリウム	メタリン酸カリウム
メタリン酸ナトリウム	DL-リンゴ酸
DL-リンゴ酸ナトリウム	リン酸及びリン酸塩類

プエキスは、アメリカ産ホップを原料に超臨界条件下における液体二酸化炭素抽出によって得られた抽出物より、苦味の主成分である α 酸を除去した β 酸リッチ画分である。従って、供試したホップエキスは苦みが少なく、食品用制菌剤の素材としては好都合である。試料の入手先であるカルターフードサイエンス社では、抽出物より得られた α 酸をビール業界向けに販売しているが、残渣である β 酸リッチ画分については利用されていない。この β 酸リッチ画分を有効に使用することは、植物資源の効率的な有効利用の面においても意義深い。ホップがビールに果たす役割としては、「ビールに独特な芳香と爽快な苦味を与える」、「過剰な蛋白質を沈殿・分離させ、ビールを清澄にする」、「ビールの泡もちをよくする」、「雑菌の繁殖を抑え、ビールの腐敗を防ぐ」などがある。また、ホップには鎮静作用、催眠作用、性ホルモン作用、健胃作用など様々な薬理作用も報告されている¹²⁷⁾。ホップの抗菌性に関しては、古くから多くの研究がなされており、*Bacillus cereus* や *Staphylococcus aureus* などのグラム陽性菌には強い抗菌力を示すものの、*Escherichia coli* などのグラム陰性菌に

に対する抗菌力は弱く、また真菌類にもほとんど抗菌力を示さない^{50~73)}。今回検討したβ酸リッチ画分であるホップエキス(アロマホップ)についても、グラム陽性菌に対する最小生育阻止濃度が0.005%以下と強い抗菌力を示したが、グラム陰性菌および真菌に対する効果は弱く、従来報告されているホップの抗菌スペクトルと同様の傾向が示された。しかし、本ホップエキスは、苦味の主成分であるα酸を除去したβ酸主体エキスであるため、苦味が少なく、食品用制菌素材として大切な点である風味への影響について有利であると考えられる。

このホップエキスと日持向上剤の成分であるメタリン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムあるいはグリシンとを併用することにより、グラム陰性菌に対する相加・相乗的な抗菌効果が発揮された。特に、ホップエキスとメタリン酸ナトリウムを併用した時の*E. coli* K-12 IFO3301に対する効果が強く、各々単独時のMIC値は何れも3%であったが、0.01%ホップエキスと0.5%メタリン酸ナトリウムを併用することにより、本菌の増殖が完全に抑制され大きな相乗効果が示された。この併用効果は、マッシュポテトにおいても再現され、風味に影響を及ぼさない添加量レベルで*E. coli* K-12 IFO3301の増殖を大きく抑制し、食品においても併用効果が発揮されることが確認された。ホップエキスは単独でもグラム陽性菌には0.005%以下という微量で抗菌力を発揮し、また、食品用制菌剤として汎用されている日持向上剤の主要成分であるメタリン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムあるいはグリシンとの併用によって、グラム陰性菌への抗菌作用が向上することより、ホップエキスは食品用制菌素材として有望であると考えられた。

そこで、水産練製品の代表である蒲鉾、食肉製品であるウインナーおよび惣菜類に分類されるマッシュポテトについて、ホップエキスによる保存性向上効果を調べた。その結果、何れの食品でも上市されている制菌剤との併用により、風味に影響を及ぼさない添加量レベルで有意な日持ちの延長効果が認められた。また、食品製造において重要な工程の一つである加熱殺菌時にホップエキスとメタリン酸ナトリウムが共存すると、大腸菌の加熱損傷が促進され、耐熱性が低下した。さらに、ホップエキスは、凍結・解凍処理時における大腸菌の凍結損傷を大幅に促進し、この作用は、凍結変性防止剤共存下やハンバーグ等の食品の凍結処理時にも観察された。一方、食品工場でのサニテーション対策として汎用されているアルコール製剤にホップエキスを配合する

ことによって、食肉製品や惣菜類の代表的な変敗原因菌である乳酸菌に対する殺菌力が向上した。また、ホップエキス配合アルコールにより食品を浸漬処理すると、ホップエキス未配合区よりも明らかなネト発生の遅延が認められ、ホップエキスの配合による保存性向上効果が示された。

一般的に、食品の保存性向上対策として、①：加熱殺菌、②：アルコール等による表面殺菌および③：制菌剤(内部添加タイプ)がポイントになる。すなわち、

①：いかに加熱殺菌によって菌を無菌レベルに近づけるか

②：加熱後の二次汚染菌をいかに殺菌するか

③：保存中における生菌数の増加をいかに抑えるか

が大切となる。これらの何れの項目に対しても、ホップエキスは有効に利用できる。すなわち、ホップエキスは、メタリン酸ナトリウムとの併用により加熱殺菌効率を向上させる。また、ホップエキスのアルコール製剤への配合により殺菌力が上昇し、噴霧・浸漬処理によって食品表面に付着したホップエキスがグラム陽性菌の増殖を抑制する。そして、ホップエキスが配合された食品用制菌剤の添加により、保存中の生菌数増加が抑制される。さらには、近年生産量が増加している冷凍食品では、ホップエキス存在下の凍結過程において大腸菌の耐凍性が著しく低下する。このように、ホップエキスは、食品の保存性向上対策を考えるに当たり、極めて魅力ある素材といえる

食品用制菌素材として実用化するためには、単に抗菌性のみでは満足されない。図5-1に示すように、食品用制菌剤には抗菌効果は勿論のこと、風味への影響、物性への影響、pHへの影響、価格、添加物表示内容、溶解性、分散性など種々の要因がかかわっている。いくら抗菌力、すなわち保存性向上効果が優れていても、風味への影響が大きく、その添加によって食に値しない味となれば制菌剤として用いることはできない。また、食品は毎日食するものであり、価格的にも制限を受ける。さらに、近年、先にも述べたように消費者意識から保存料が敬遠されるなど使用されている添加物(添加物表示)への関心が強い。このように、全てを網羅する制菌剤の設定は非常に難しく、各食品ごとに各ユーザーごとに個々に対応しているのが現状である。そのような中で、ホップエキスの食品用制菌剤への利用は、

①：少量の添加なので風味への影響が少ない。

②：pHおよび物性への影響がない。

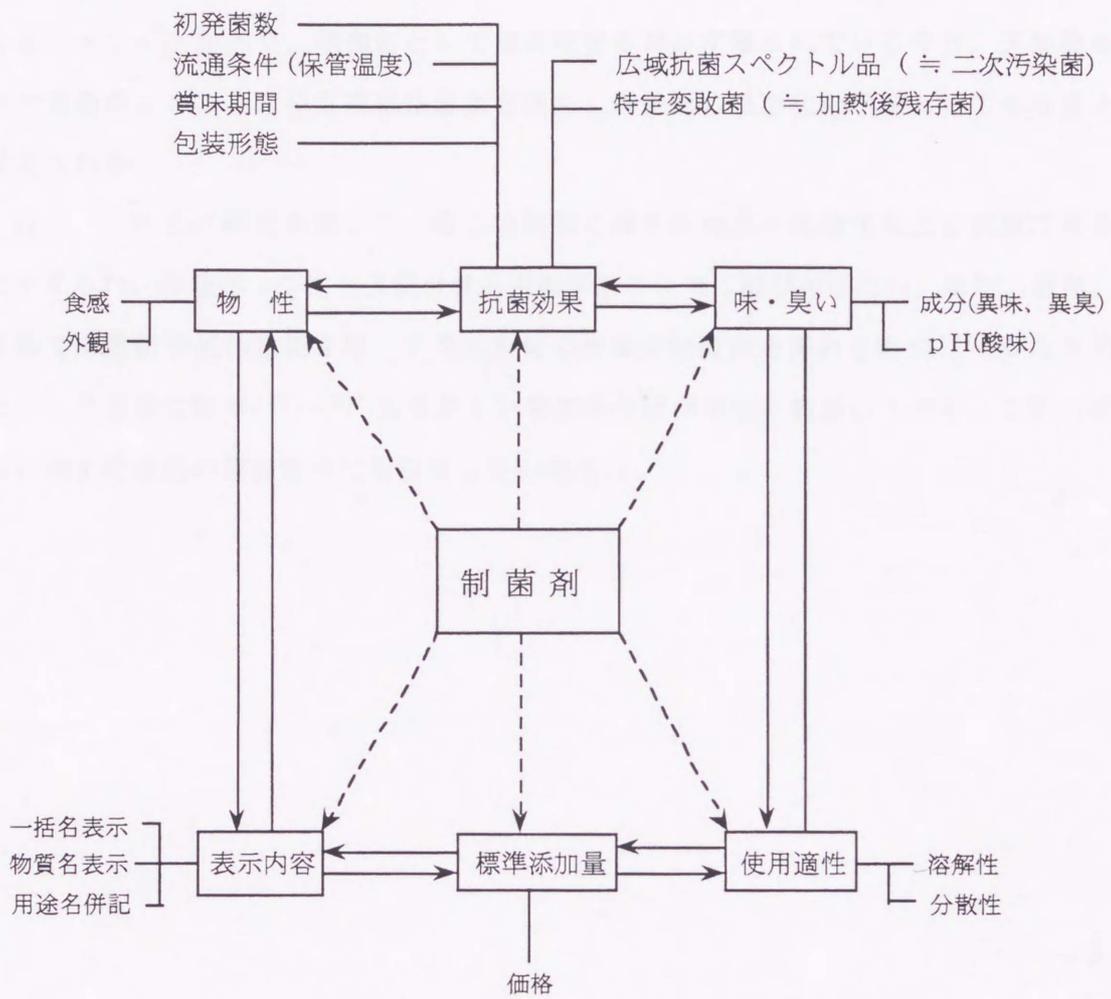


図5-1. 食品用制菌剤の相互関連図

③：他の制菌素材との併用により抗菌性が向上するので、合剤としての添加量の低減が可能となり、コストメリットや風味への影響を減じられる。

④：天然物からの抽出物であり、消費者へのイメージが良い。

などのメリットがあり、制菌剤として使用できる素材が限られている今日、天然物由来であるホップエキスの利用は注目度が高く、制菌剤の差別化の手段としても有望と考えられる。

以上、これらの研究を通じて、微生物制御に関する食品の保存性向上に貢献できたと考えられ、今後ホップエキス配合食品用制菌剤の上市に結び付けたい。また、近年、米国では遺伝子操作技術を用いて食品素材の抗微生物機能を高める研究¹²⁸⁾がなされたり、予測微生物学^{129、130)}なる新しい学際的分野が急速に発展しており、これら新しい微生物技術の開発動向にも注目していきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始ご指導下さいました広島大学生物生産学部太田欽幸教授に厚くお礼申し上げます。また、本論文のとりまとめを行うにあたり、懇切なご校閲を賜りました広島大学生物生産学部宮澤啓輔教授ならびに藤田耕之輔教授に謝意を表します。

さらに、研究にご協力頂いた太田研究室の皆様にお礼申し上げます。

そして、ご指導、ご支援を賜った日本新薬株式会社食品開発研究所の澤田前所長、テクニカルサポートセンターの星野所長、大藪課長、並びに機能食品事業部の皆様方に深く感謝致します。

最後に、研究にご理解を頂きました日本新薬株式会社前専務取締役市野瀬食品部長および取締役浅野機能食品事業部長に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課監視係：平成8年食中毒発生状況、食品衛生研究、47(9)、66-94 (1997) .
- 2) 石谷孝佑：新しい食品加工・品質保持技術、食品衛生研究、43(2)、13-34 (1993) .
- 3) Leistner, L.: Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation, J. Food Engineer., 22, 421 (1994) .
- 4) 西浦康雄、深尾正、杉本睦美、澤田玄道、伊藤政光、南波護：蒲鉾から分離した蛍光性軟化変敗原因菌の同定と変敗再現実験、日食工誌、37、687-694 (1990) .
- 5) 西浦康雄、南波護、伊藤政光、深尾正、澤田玄道：蛍光性軟化変敗原因菌シュードモナス属の分布と汚染メカニズム、日食工誌、38、1002-1012 (1991) .
- 6) Fukao, T., Ohayabu, S., Sawada, H. and Ohta, Y.: Effects of addition of powdered protein to kamaboko on growth of *Pseudomonas fluorescens*, Fisheries Science, 64, 58-62 (1998) .
- 7) Fukao, T. and Ohta, Y.: Influence of sodium tripolyphosphate on growth of *Pseudomonas fluorescens*, Fisheries Science (印刷中) .
- 8) Fukao, T. and Ohta, Y.: Influence of hop resins on freeze injury to *Escherichia coli*, Food Sci. Technol. Int. Tokyo, 4, 300-303 (1998) .
- 9) 木俣正夫：水産練製品の腐敗に関する研究-IV、腐敗細菌について(その1)、日水誌、16、562-565 (1951) .
- 10) 茂木幸夫、松原瑞穂：包装かまぼこ変敗品から分離された細菌について、食衛誌、11、49-51 (1970) .
- 11) 森一雄、澤田玄道、鍋谷修、丸尾重昭、平野とも子：水産ねり製品の変敗に関する研究-I、*Bacillus licheniformis* による包装かまぼこの軟化変敗について、日水誌、39、1063-1069 (1973) .
- 12) 横関源延：新版魚肉ねり製品、p.312、恒星社厚生閣 (1981) .
- 13) 森一雄、鍋谷修、平野とも子：水産ねり製品の変敗に関する研究-III、*Pseudomonas* 属細菌による蒲鉾の褐変について(1)、日水誌、40、959-962 (1974) .

- 14) 小川博望、小名木正射、福島清：微生物による食品の褐変(第1報)、水産ねり製品の褐変、食衛誌、11、352-355 (1970) .
- 15) 金山龍男、藤田八束、松田敏生：水産ねり製品の褐変について-I、褐変原因菌の来源、日水誌、39、221-228 (1973) .
- 16) 藤田八束、金山龍男：水産ねり製品の褐変について-II、冷凍すり身より分離された褐変原因菌の同定、日水誌、39、229-235 (1973) .
- 17) Noel, R. Krieg: *Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 1*, pp.141-198, Williams & wilkins, London (1984) .
- 18) 土屋俊夫：臨床材料より分離されるグラム陰性桿菌同定への手引き(GNRコード)、改訂第三版、医学書院 (1981) .
- 19) 藪内英子：ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌、医学書院 (1977) .
- 20) 森一雄、鍋谷修、丸尾重昭、平野とも子：水産ねり製品の変敗に関する研究-II、*Bacillus licheniformis* による蒲鉾の軟化変敗部位に存在する粘質物について、日水誌、39、1071-1076 (1973) .
- 21) Saito, H. and Miura, K.: Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment, *Biochim. Biophys. Acta.*, 72, 619-629 (1963) .
- 22) 芝崎勲：技術用語解説、低温細菌 Psychrophile、日食工誌、34、265-266 (1987) .
- 23) 駒形和男：好気性細菌の同定、化学と生物、10、332-341 (1972) .
- 24) 光岡知足：乳酸菌の効用と新しい利用分野、日食工誌、31、285-296 (1984) .
- 25) 清水亘：水産ねり製品、p.349、光琳書院 (1966) .
- 26) Totter, J. R. and Moseley, F. T.: Influence of the concentration of iron on the production of fluorescin by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, 65, 45-47 (1953) .
- 27) 澤田玄道、西浦康雄、深尾正：蛍光性シュードモナス検査用培地、公開特許広報、特開平4-325097 (1992) .
- 28) 東條敬、徳山龍明、浅野浩司：海水棲のプロテアーゼ生成細菌に関する研究-I、日本大学農獣医学部学術研究報告、32、140-152 (1975) .
- 29) Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A. and Kato, H.: Components

- contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2323-2330 (1988).
- 30) 猪股哲二：鶏卵タンパク質の食品加工への利用、*New Food Industry*, 26(9)、40-54 (1984) .
- 31) 戸田義郎：WPCの特性と効果、*フードケミカル*, 3(6)、43-49 (1987) .
- 32) 山下民治、関信夫：スケトウダラ肉糊の坐りに及ぼす大豆および小麦タンパク質添加の影響、*日水誌*, 62、806-812 (1996) .
- 33) 戸田義郎：蛋白素材としてのプラズマパウダー、*New Food Industry*, 29(9)、15-19 (1987) .
- 34) 半野堅治：食肉加工品の品質改良新技術、*フードケミカル*, 9(10)、37-43 (1993) .
- 35) Sato, Y. and Watanabe, K.: Function and control of egg white protein. *Protein, Nucleic acid and Enzyme*, 23, 54-65 (1978) .
- 36) Glass, L. and Hedrik, T. I.: Nutritional composition of sweet- and acid-type dry wheys. I. Major factors including amino acids. *J. Dairy Sci*, 20, 185-189 (1977) .
- 37) Meyer, E. W.: Nutritive value of soy protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48, 484-489 (1971) .
- 38) Evans, M. T. A. and Gordon, J. F.: Whey proteins, in "Applied Protein Chemistry" (ed. by R.A. Grant), Applied Science Publishers Ltd., London, pp. 31-67 (1980) .
- 39) 阿倍洋一、安永広作、北上誠一、太田隆男：等級の異なるスケトウダラ冷凍すり身のかまぼこ品質に対する牛血漿粉末添加の影響、*日水誌*, 61、750-755 (1995) .
- 40) 山下論明、逸見光、上田智広、小原貢、田老孝則、西岡不二男、小長谷史郎：産卵期サケ落とし身の加熱ゲル化過程で起きる著しいプロテオリシスとプロテアーゼインヒビター添加による魚肉ゲルの劣化抑制効果、*日水誌*, 62、934-938 (1996) .
- 41) 斎藤昌義、門間美千子、千國幸一：血漿蛋白質のもつプロテアーゼ阻害活性の食品素材への利用、*日水誌*, 39、901-906 (1992) .
- 42) 越智幸司：無臭化放線菌 *Rhodococcus* sp. B261の窒素源の利用性に関する研

- 究、広島大学、生物圏科学研研究科、修士論文、p.29-30 (1995) .
- 43) 勝井次雄：食品添加物としての無機リン酸化合物の安全性について、New Food Industry、15(2)、5-12 (1973) .
- 44) 谷村顕雄：食品添加物(その6)、各種食品添加物の特性と毒性④、47、89-97 (1979) .
- 45) 松永明信、山本敦、黒川弘子、関口陽子：イオンクロマトグラフィーによる食品中の縮合リン酸塩の分析、食衛誌、39、1-6 (1998) .
- 46) 野口敏：ねり製品原料の変敗防止機構、種々の添加物の効果、New Food Industry、13(12)、56-60 (1971) .
- 47) 西岡不二男：冷凍すり身とリン酸塩、フードケミカル、2(4)、33-41 (1986) .
- 48) 堤将和、西村和代、安井紀久代、松岡麻男、渡辺忠雄：二三の静菌作用物質に対するコール酸の共力作用、食衛誌、17、273-275 (1976) .
- 49) 渡辺忠雄、平田行：重合リン酸塩の抗菌性とその応用、フードケミカル、2(4)、27-32 (1986) .
- 50) Aitken, R. A., Bruce, A, Harris, J. O., and Seaton, J. C.: The bitterness of hop-derived materials in beer, J. Inst. Brew., 76, 29-36 (1970) .
- 51) Kuroiwa, Y., Kokubo, E., and Hashimoto, N.: Advanced hop chemistry in connection with beer flavour. In Fermentation technology today. Edited by G. Terui. Society of fermentation Technology, Osaka. pp. 633-637 (1972) .
- 52) Laws, D. R. J. and J McGuinness, J. D.: Origin and estimation of the gushing potential of isomerized hop extracts, J. Inst. Brew, 78, 302-308 (1972) .
- 53) Verzele, M.: Hop extracts, chemistry analysis and utilization. European Brewery Convention. Proc. 13th Congr., Estoril 1971. North Holland Publ. Co., Amsterdam, London, pp.95-106 (1972) .
- 54) Brown, A. J. and Clubb, D.: On the antiseptic properties of hops, J. Inst. Brew., 19, 261-295 (1913) .
- 55) Chapman, A. C.: On the preservative properties of hops, J. Inst. Brew., 31, 13-31(1929) .
- 56) Kleyn, J. and Hough, J.: The microbiology of brewing, Ann. Rev. Microbiol., 25, 583-608 (1971) .

- 57) Macrae, R. M.: Significance of the use of hop in regard to the biological stability of beer, *J. Inst. Brew.*, 70, 340-344 (1964) .
- 58) Walker, T. K. and Parker, A.: Report on the preservative principles of hops. Part XVIII, *J. Inst. Brew.*, 43, 17-30 (1937) .
- 59) Walker, T. K. and Blakebrough, N.: Bacteriostatic power of humulone boiling product, *J. Inst. Brew.*, 58, 13-21 (1952) .
- 60) Chin, C. Y., Chang, N. C., and Anderson, H. H.: Factors influencing the antibiotic activity of lupulon, *J. Clin. Invest.*, 28, 909-915 (1949) .
- 61) Erdmann, W. F.: Lupulon und humulon, ihre antibakterielle wirksamkeit und anwendung bei tuberkulosen infektionen, *Pharmazie*, 6, 442-451 (1951) .
- 62) Haas, G. J. and Barsoumian, R.: Antimicrobial activity of hop resins, *J. Food Prot.*, 57, 59-61 (1994) .
- 63) Hough, J. S., Howard, G. A., and Slater, C. A.: Bacteriostatic activities of hop resin materials, *J. Inst. Brew.*, 63, 331-333 (1957) .
- 64) Jaehrig, A. and Schade, W.: Untersuchungen zur antimikrobiellen wirksamkeit von hopfeninhaltsstoffen und deren umwandlungsprodukten gegenueber mikroorganismen in der brauerei, *Lebensmittelindustrie*, 28, 311-315 (1981) .
- 65) Michener, H. D., Snell, N., and Larsen, E. J.: Antifungal activity of hop resin constituents and a new method for isolation of lupulon, *Arch. Biochem.* 19, 199-208 (1948) .
- 66) Mizobuchi, S. and Sato, Y.: Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 399-403 (1985) .
- 67) Mizobuchi, S. and Sato, Y.: Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. Part III. Antifungal activity of 2,4-dihydroxyacylophenones and related compounds, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1327-1333 (1985) .
- 68) Schmalreck, A. F., Teuber, M., Reininger, W., and Hartl, A.: Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives, *Can. J. Microbiol.*, 21, 205-212 (1975) .
- 69) Shimwell, J. L.: On the relation between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic. Part I, *J. Inst. Brew.*, 43, 111-118

(1937) .

- 70) Simpson, W. J.: Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids, *J. Inst. Brew.*, **99**, 405-411 (1993) .
- 71) Simpson, W. J. and Smith, A. R. W.: Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives, *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 327-334 (1992) .
- 72) Smith, N. A. and Smith, P.: Antibacterial activity of hop bitter resins derived from recovered hopped wort, *J. Inst. Brew.*, **99**, 43-48 (1993) .
- 73) Teuber, M. and Schmalreck, F.: Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid, *Arch. Mikrobiol.*, **94**, 159-171 (1973) .
- 74) 金井美恵子 : *Bacillus subtilis* に対するリゾチーム、エタノール、ポリリン酸ナトリウム三者併用抗菌効果、防菌防黴、**19**、119-125 (1991) .
- 75) 加藤信行、芝崎勲 : モノグリセライドの抗菌作用に対するクエン酸およびポリリン酸の併用効果、防菌防黴、**4**、254-261 (1976) .
- 76) 李在根、竜口和恵、堤将和、渡辺忠雄 : グリシンと二、三の薬剤の抗菌力併用効果、食衛誌、**26**、279-284 (1985) .
- 77) 芝崎勲 : 微生物制御に関する資料(その2)、併用による微生物作用の増強、防菌防黴、**24**、545-552 (1996) .
- 78) 芝崎勲 : 脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用、醗酵工学、**57**、164-176 (1979) .
- 79) 赤司景 : 食品汚染菌に対する卵白リゾチームの溶菌性について、*Bacillus subtilis* に対する溶菌性、食衛誌、**9**、97-104 (1968) .
- 80) 一色賢司、堤将和、西村和代、渡辺忠雄 : 縮合リン酸塩の食品保存効果(第1報)、メキサメタリン酸塩の*Bacillus subtilis* に対する効果、食衛誌、**18**、335-340 (1977) .
- 81) 須田郁夫、宮山哲夫、松岡麻男、堤将和、渡辺忠雄 : 縮合リン酸塩の抗菌作用に対する大腸菌外膜の保護効果、農化、**55**、111-116 (1981) .
- 82) 須田郁夫、須田真理、渡辺忠雄、堤将和 : 縮合リン酸塩の抗菌作用に対する大腸菌外膜主要蛋白質の役割、農化、**63**、991-998 (1989) .

- 83) Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., and Klaenhammer, T. R.: Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3613-3615 (1991).
- 84) 石井泰造：微生物制御実用事典、p.91-93、フジテクノシステム（1993）。
- 85) 食品添加物表示問題連絡会・日本食品添加物協会共編：新食品添加物表示の実務、日本食品添加物協会（1997）。
- 86) 土戸哲明：微生物の加熱損傷に対する薬剤の併用効果、*醗酵工学*、55、144-155（1977）。
- 87) 山本泰、今泉渉、東和男、好井久雄：Clostridium 属芽胞の耐熱性に及ぼす有機酸の影響、*日食誌*、37、199-202（1990）。
- 88) 芝崎勲：新食品殺菌工学、p.389-403、光琳（1984）。
- 89) 好井久雄：食品微生物ハンドブック、p.474-478、技報堂（1995）。
- 90) Ostovar, K. and Bremier, M. J.: Effect of thawing on growth of *Staphylococcus aureus* in frozen convenience food items, *J. Milk Food Technol.*, 38, 337-339 (1975) .
- 91) Schothorst, M.: Resuscitation of injured bacteria in food. In "Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes," ed. by F. A. Skinner and W. B. Hugo, Academic Press, London, pp.317-328 (1976) .
- 92) Speck, M. L. and Ray, B.: Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods, *J. Food Protect.*, 40, 333-336 (1977) .
- 93) Warseck, M.: Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods, *Appl. Microbiol.*, 26, 919-924 (1973) .
- 94) Speck, M. L.: Selective culture of spoilage and indicator organisms, *J. Milk Food Technol.*, 33, 163-167 (1970) .
- 95) Speck, M. L. and Cowman, R. A.: Symposium on the restoration of sublethally impaired bacterial cells in foods, 2 Injury and recovery of frozen microorganisms, *J. Milk Food Technol.*, 34, 548-552 (1971) .
- 96) 金田弘拳、渡辺忠雄、堤将和：ヘキサメタリン酸塩あるいはコール酸塩共存下で凍結された *Escherichia coli* の凍結損傷部位、*食衛誌*、26、144-149（1985）。
- 97) 種谷信一：最近の詠等食品の傾向、*缶詰時報*、77(6)、456-464（1998）。

- 98) 赤塚慎一郎：卵白リゾチーム(その1)、日添協会報、6(12)、8-15 (1988) .
- 99) 春田三佐夫：最新食品微生物制御システムデータ集、p.500、サイエンスフォーラム社 (1983) .
- 100) 稲嶺成男、松田敏生：食品防腐剤の研究(第3報)、各種増粘剤中における食品防腐剤の抗菌力について、醗酵工誌、45、369-376 (1967) .
- 101) 古田太郎、上田明宏、高木一夫、村田雄司、木原孝治：第四級アンモニウム塩およびグルコン酸クロルヘキシジンの抗菌活性に及ぼす培地成分の影響、防菌防黴、21、117-124 (1993) .
- 102) 日本防菌防黴学会：防菌防黴ハンドブック、p.873-875、技報堂 (1986) .
- 103) Simpson, W. J.: Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids, *J. Inst. Brew.*, 99, 405-411 (1993) .
- 104) 橋本直樹：ビールの苦みを科学する、*New Food Industry*、38、49-56 (1996) .
- 105) Mizobuchi, S. and Sato, Y.: Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 399-403 (1985) .
- 106) 山下勝：アルコール類の微生物に対する作用、*防菌防黴*、24、195-219 (1996) .
- 107) 山下勝：昭和63年度食品保存技術及び技術シーズ探索に関する調査報告書、アルコール協会 (1988) .
- 108) 清水康美、古橋樹雄、長谷川光二：特許出願広告、昭和55-2274 .
- 109) M. Nakano, Y. Kokubo and M. Ogawa; Bacterial contamination of vacuum-packed sliced ham and sausage, *J. Food Hyg. Soc.*, 21, 260-265 (1979) .
- 110) J. E. Steele and M. E. Stiles: Microbial quality of vacuum packaged sliced ham, *J. Food Prot.*, 44, 435 (1981) .
- 111) 石井泰造：微生物制御実用事典、p.753、フジテクノシステム (1993) .
- 112) 食品産業戦略研究所：食品の腐敗変敗防止対策ハンドブック、p.87-93、サイエンスフォーラム (1996) .
- 113) 食品と開発編集部：食品の日持向上技術、*食品と開発*、32(10)、38-44 (1998) .

- 114) 林力丸：生物と食品の高圧科学、p.211-256、さんえい出版（1993）。
- 115) 酒井重男：食品用抗菌性物質の開発の現状、フードケミカル、14(2)、98-105（1997）。
- 116) 一色賢司、栖原浩、水内健二、徳岡敬子：カルシウム製剤による微生物制御の可能性について、日食工誌、41、135-140（1994）。
- 117) 村上文和：ユッカ抽出物の日持ち向上作用、Bio Industry、13(4)、20-26（1996）。
- 118) 矢嶋瑞夫、野崎一彦、高柳勉、横塚弘毅：トウガラシの超臨界炭酸ガス抽出残渣から抽出した抗菌画分の食品保存への利用、防菌防黴、25、131-137（1997）。
- 119) 仁科淳良、梶島史子、松長正見、手塚裕和：コーヒー残渣中に存在する抗菌物質について、食品工業、36(8)、51-54（1993）。
- 120) 一色賢司：食用植物成分などによる真菌の生育抑制、日食微誌、11、19-22（1994）。
- 121) 渡辺隆夫：グレープフルーツ種子抽出物の抗菌性とその利用、食品と開発、29(12)、15-16（1995）。
- 122) 関山泰司：カラシ抽出物ワサオーロの新しい利用、食品と開発、29(12)、17-19（1995）。
- 123) 七山正子：梅干し、梅肉エキスの抗菌作用、日食微誌、12、211-217（1996）。
- 124) 川瀬興三、山内航恒治：乳汁中の感染防御因子ラクトフェリンについて、日食微誌、12、219-225（1996）。
- 125) 戸田真佐子、島村忠勝：茶の抗微生物作用について、日食微誌、12、227-234（1996）。
- 126) 松田良蔵：天然物(カキフラボノイド)を利用した抗菌剤の開発、食品と開発、31(10)、17-18（1997）。
- 127) 富田亮：ビールの機能性、食品と開発、32(8)、20-22（1998）。
- 128) Fuglsang, C. C., Johansen, C., Christgau, S. and Adler-Nissen, J.: Anti-microbial enzymes; Applications and future potential in the food industry, Trends in Food Science & Technology, 6, 390 (1995)。

129) 矢野信豊：予測微生物学と食品保蔵(前編)、日食保蔵誌、23、41-49 (1997) .

130) 矢野信豊：予測微生物学と食品保蔵(後編)、日食保蔵誌、23、97-106 (1997) .