＝短 報＝

ママカリ酢漬製品の乳酸菌による膨化現象

河野 勇 人

(岡山県工業技術センター)

(受付: 平成 18 年 10 月 23 日)

(受理: 平成 19 年 1 月 30 日)

Swelling of Packaged *Mamakari* Fish in Vinegar by Lactic Acid Bacteria

Isato KONO

(Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, Haga 5301,
Okayama-shi, Okayama 701-1296)

The swelling phenomenon of packages containing *Mamakari* fish treated with vinegar seasoning was observed. Analysis of the swollen sample revealed lactic acid bacteria but not in a normal sample, and the isolate was identified as *Lactobacillus brevis*. The process of carbon dioxide gas production was supposed by heterofermentation and glutamate decarboxylation. Growth of the isolate was inhibited additively in a mixed solution containing acetic acid, lactic acid and NaCl. Accordingly, it is shown that growth of the isolate causing swelling of the package was inhibited by vinegar seasoning containing appropriate organic acid contents.

Key words: *Lactobacillus brevis*, Swelling, Organic acid

緒 言

ママカリ酢漬製品は、ニシン科のママカリを調味酢に漬け込んだ食品で、岡山県をはじめとする瀬戸内地方の代表的な特産品である。本品は加熱殺菌処理をせず、調味酢に漬けた状態で密封包装し、製品化される。本品は常温流通にした場合、特に夏期の温度が高い時季において、製品の袋が膨張する“膨れ”の問題がしばしば生じる。

加工食品の品質劣化、特に加熱殺菌処理できない包装食品の膨化現象は、微生物に起因することが多い。ママカリ酢漬包装食品の膨れ原因についても、製品中に生育する酵母 (*Debaryomyces hansenii*) の再発酵によることが、これまでに報告されている¹⁾。

ここでは、膨張し返品された県内メーカー製のママカリ酢漬製品についてその原因を検討した結果、従来の酵母菌による膨化とは違い、乳酸菌がその原因菌と認められたこと、ならびにその膨化防止対策について検討した結果について報告する。

方 法

1. 使用材料

供試試料は、頭部と内蔵を除いたママカリを塩漬け水洗後、調味酢（砂糖 25%、グルタミン酸ナトリウム 0.15%、食塩 4%、酢酸 1.1%）に漬け込み、椎茸、生姜を加えて密封包装したものをを用いた。

2. 微生物の培養

乳酸菌の培養は、MRS 培地 (Difco) を用い、30℃ で 7 日間嫌気培養した。一般生菌数の測定は、標準寒天培地（ニッスイ）を用いて 37℃、2 日間の平板培養法により、また真菌数の測定は Potato Dextrose Agar 培地 (Difco) を用いて 30℃、5 日間の平板培養法により行った。調味酢ならびに試料浸漬液は膜ろ過 ($\phi 0.20 \mu\text{m}$) し、前培養した微生物を 10^5 cells/ml 植菌後、30℃、7 日間静置培養した。菌の生育は、吸光度 (OD_{660}) の測定によった。細菌の同定は、細菌同定検査用キット Api 50 CH (bio-Merieux) での培養結果ならびに Bergey's Manual of Systematic Bacteriology²⁾ に準拠して行った。

3. 成分分析

乳酸の分析は、F-キット D-乳酸/L-乳酸 (Roche Diag-

nostics) を用いて測定した。有機酸の分析は、有機酸分析システム（島津 HPLC Organic Acid Analysis System）を用いて、アミノ酸はアミノ酸分析計（日立高速アミノ酸分析計 835 形）により、糖の分析は糖分析システム（島津）を用いて、エタノールはガスクロマトグラフ（DBWAX, キャピラリーカラム）により、塩分は電位差自動滴定装置（京都電子工業 AT-200）を用いて定量した。供試試料中の二酸化炭素は、二酸化炭素検知管（ガステック）を用いて測定した。

結果および考察

1. 膨化製品の分析

膨化製品中のガス进行分析した結果、主成分は二酸化炭素であった。膨化製品と正常品の浸漬調味酢液の成分分析の結果を Table 1 に示した。これより、膨化製品の特徴として、pH と糖（ショ糖）が減少し、乳酸とエタノール

Table 1. Analysis of vinegar seasoning contents of treated *Mamakari* fish

	Normal sample	Swelled sample
pH	4.3	4.0
Sugars (%)		
Sucrose	11.6	6.5
Glucose	0.5	0.4
Fructose	0.2	0.4
Ethanol (%)	0.2	0.8
NaCl (%)	3.5	3.5
Organic acid (mmol/l)		
Citric acid	2.6	2.8
Gluconic acid	7.7	ND*
Malic acid	1.8	0.5
Succinic acid	1.1	1.1
Lactic acid	16.8	131.3
Formic acid	0.7	1.3
Acetic acid	145.4	212.8
Pyroglutamic acid	1.0	1.8
Amino acid (mmol/l)		
Asp	8.9	12.1
Thr	7.7	10.5
Ser	5.6	10.2
Glu	17.7	2.5
Gly	5.3	13.3
Ala	12.6	21.7
Val	12.2	14.7
Met	5.8	11.2
Ileu	8.5	11.3
Leu	17.1	25.5
Tyr	2.5	1.0
Phe	15.5	15.5
GABA	1.2	21.2
Lys	13.3	18.3
NH ₃	18.8	39.7
His	6.6	7.6
Arg	5.3	3.0
Living cells (cells/ml)	9.0×10^2	2.9×10^9
Yeasts (cells/ml)	3.3×10^2	ND
Lactic acid bacteria (cells/ml)	3.0×10^2	2.7×10^9

* Not detected.

ルがほぼ等モル生成し、また酢酸やギ酸も生成したのに対し、グルコン酸は膨化製品では検出されなかった。アミノ酸については、グルタミン酸が減少し、逆にほぼ等モルの γ -アミノ酪酸が生成した。浸漬調味酢液中の菌数を測定した結果、正常品ではほとんど生菌は検出されなかった。それに対し膨化製品では、標準寒天培地で検出された生菌数が 2.9×10^9 cells/ml、また MRS 培地で検出した菌数は 2.8×10^9 cells/ml であり、コロニーの性状も同一で、そのほとんどが乳酸菌と考えられた。なお、酵母は検出されなかった。

2. 分離株の同定

MRS 培地のコロニーからランダムに 10 株を釣菌し分離株とした。これらの分離株を、水で 2 倍希釈した調味酢で 30°C、7 日間静置培養した結果、いずれも二酸化炭素の生成を確認した。これらの菌の性状を検討した結果を Table 2 に示した。分離した 10 株はいずれも同じ結果であった。これらの菌の性状ならびに細菌同定検査用キットの結果 (%ID; 99.9, T index; 0.40) より、分離菌は *Lactobacillus brevis* と推定された。*L. brevis* は、ミルク、チーズ、漬物、またニシンの酢漬けなどから分離

Table 2. Physiological characteristics of isolate

	Isolate	<i>L. brevis</i> ²⁾
Shape	rod	rod
Gram stain	+	+
Catalase	—	—
Spore formation	—	—
Anaerobic culture	+	+
Growth in MRS medium	+	+
Temperature requirement		
45°C	—	—
15°C	+	+
Optical form of lactic acid	DL	DL
Fermentation		
glucose	+	+
fructose	+	+
mannose	—	—
arabinose	+	+
ribose	+	+
xylose	+	d
rhamnose	—	—
mannitol	—	—
sorbitol	—	—
galactose	+	d
sucrose	+	d
trehalose	—	—
amygdalin	—	—
melezitose	+	—
raffinose	+	d
esculin	±	d
salicin	—	—
cellobiose	—	—
maltose	+	+
lactose	+	d
melibiose	+	+
gluconate	+	+

+, 90% or more strains positive, —, 90% or more strains negative, d; 11–89% strains positive.

される耐塩性・酢酸耐性の乳酸菌であり、生育限界食塩(%)は6.5, 生育 pH 域は3.7~4.2であると報告^{2), 3)}されており, 膨化製品の浸漬調味酢液で *L. brevis* が生育できることを裏づけている。なお分離株の由来を検討するため, ママカリ酢漬製品材料(魚体, 調味酢, 椎茸, 生姜)から乳酸菌を分離した結果, 魚体のみから乳酸菌が検出されたことから, 分離株は魚体由来と推定された。

3. 分離株の発酵形式

乳酸菌による二酸化炭素の生成は, ヘテロ型発酵による生成, アミノ酸の脱炭酸反応, またマロラクティック発酵による生成などが知られている。本ママカリ酢漬製品は, 調味酢にグルタミン酸ナトリウムを0.15%添加しており, 他のアミノ酸に比べて, 特にその含量が多い。微生物には各種アミノ酸脱炭酸酵素が広く存在し, 本分離株の *L. brevis* は, グルタミン酸をはじめとするアミノ酸を脱炭酸することが知られている^{4~6)}。

そこで, 分離株の発酵形式を検討するため, MRS 培地を基本培地とし, これにグルタミン酸68 mMを添加した培地に分離株を植菌し, 30℃で6日間静置培養した。培養液の成分分析結果を Table 3 に示した。MRS 培地で培養した場合, 乳酸, エタノール, CO₂ がおよそ等モル生成した。またこれらの生成比より, 本分離株はヘテロ型発酵の形式をとると思われた⁷⁾。また MRS にグルタミン酸を添加した場合, 発生する二酸化炭素量は, 添加したグルタミン酸のモル数に比例して増加した。乳酸菌は, クエン酸回路の2-オキソグルタル酸合成が遮断されているためグルタミン酸合成機能が欠如⁸⁾しており, 生育にグルタミン酸を必要とする。この分離した *L. brevis* では, グルタミン酸量は添加した量がほぼ消費され, 逆にγ-アミノ酪酸が増加した。したがって, ヘテロ型発酵とともに, グルタミン酸の脱炭酸反応を確認した。なお, *L. brevis* はアルギニンの加水分解によるアンモニアの生成反応も知られている⁹⁾が, これらの変化量からこの分離株での反応は生じていないと思われ

た。

ヘテロ型発酵による二酸化炭素の生成の場合, 本分離株の *L. brevis* はヘテロ発酵型乳酸菌であることから, 糖とグルコン酸から二酸化炭素が生成する。グルコースの代謝については, Hexose monophosphate 経路により代謝されて二酸化炭素が生成する。Table 1 の生成モル数より発生する二酸化炭素は, 糖の発酵から調味液量の約2.6倍量, グルコン酸発酵から調味液量の約22%量の体積である。またアミノ酸脱炭酸反応^{4~6)}のうち, ヒスチジン⁵⁾, チロシン⁶⁾などのアミノ酸脱炭酸反応では, 発生する二酸化炭素の体積は調味液量の10%以下であるのに対し, グルタミン酸ナトリウムが0.15%添加された本製品の場合, グルタミン酸からの脱炭酸反応により調味液量の約34%量の二酸化炭素が生成している。またマロラクティック発酵¹⁰⁾で発生する二酸化炭素量は, リンゴ酸含量から換算すると, 調味液量の約4%にすぎない。

以上のことから, 本膨化製品における二酸化炭素の発生源は, 乳酸菌による糖やグルコン酸を発酵するヘテロ型発酵とグルタミン酸の脱炭酸によると考えられる。これより, 本ママカリ酢漬製品の膨化を抑制するためには, 魚体中の *L. brevis* の生育を抑えることが必要である。

4. 食品成分による静菌

食品保存料を使わない膨化対策として, 調味酢成分による静菌について検討した。本製品の調味酢の成分には, 有機酸, 食塩などが含まれている。有機酸による静菌効果については報告があり¹¹⁾, そのうち酢酸と乳酸が一般的に利用されている。特に乳酸については, 酸の閾値が低く pH を下げるが酸味を感じないこと, また乳酸の解離定数(3.86)は酢酸(4.76)よりも低いことから, 利用範囲が広い。また食塩についても, 微生物の生育を阻止する素材として広く利用されている。有機酸による分離菌の静菌作用について, 酢酸 (Fig. 1) および乳酸 (Fig. 2) を検討した。その結果, 酢酸は1%で, 乳酸も1%で誘導期の遅延が認められた。また酢酸と乳酸を併用した場合, 酢酸1%に乳酸0.2%を混合すると, 分離

Table 3. Analysis of fermented medium contents of isolate

	MRS	MRS+Glu ^a	MRS+Glu ^a +Asp ^b
CO ₂	79.4	134.7	138.3
Lactic acid	72.0	105.0	91.9
Acetic acid	58.0	41.0	48.0
Ethanol	62.4	53.0	45.1
Asp	0.2	0.7	86.0
Ala	4.0	3.0	3.0
Glu	0.6	0.6	1.0
GABA	3.0	71.0	71.0
Arg	0.3	0.4	0.2
NH ₃	25.0	25.0	24.0

(mmol/l)

Glutamic acid^a (68.0 mM) and aspartic acid^b (75.0 mM) were added to MRS broth (Difco) and the isolate was cultured in this broth at 30℃ for 5 days. After cultivation, these media were analyzed.

Fig. 1. Growth curve of isolate in broth containing acetic acid.
Acetic acid conc., ○, 0%; ●, 1%; □, 2%

Fig. 2. Growth curve of isolate in broth containing lactic acid.
Lactic acid conc., ○; 0%, ●; 0.4%, □; 0.6%, ■; 0.8%, △; 1.0%

Fig. 3. Growth curve of isolate in broth containing lactic acid and 1% acetic acid.
Lactic acid conc., ○; 0%, ●; 0.2%

Fig. 4. Growth curve of isolate in broth containing NaCl.
NaCl conc., ○; 0%, ●; 2%, □; 4%, ■; 6%

株は生育せず、併用効果が認められた (Fig. 3)。また、食塩による静菌効果について検討した結果、食塩濃度 6% で生育が認められなかった (Fig. 4)。食塩と乳酸を併用した場合、食塩 4% に乳酸 0.8% を混合すると分離株の生育が認められず、相加的な抗菌作用が示された (Fig. 5)。本菌は、正常品の浸漬液ならびに調味酢には生育しなかった。これは以上の結果を裏づけるものである。

加工食品の膨化現象のうち、ママカリ酢漬製品と同様に乳酸菌が原因菌であった例として、減塩醤油¹²⁾や加工味噌¹³⁾、また小袋詰ストレートつゆ¹⁴⁾などが報告されている。特に、本分離菌である *L. brevis* は、耐塩性・酢酸耐性の乳酸菌であり、ママカリ酢漬の調味液や正常品の

Fig. 5. Growth curve of isolate in broth containing lactic acid and 4% NaCl.
Lactic acid conc., ○; 0%, ●; 0.2%, □; 0.4%, ■; 0.6%, △; 0.8%

浸漬液には本菌は生育しないが、水での 2 倍希釈液では生育が可能であった (データ未提示)。膨化製品と正常品の浸漬液を比較 (Table 1) すると、膨化製品におけるエタノールや乳酸の増加分に比べ酢酸の増加分が低い。またママカリ酢漬において、調味酢に魚体を加えると、魚体量に比例して調味酢の pH は上昇する¹⁾。これより、浸漬液の酢酸をはじめとする有機酸濃度が魚体などの製品材料により希釈され、また浸漬液の pH が上昇することにより、本菌が生育したものと推測される。したがって、製品中の有機酸 (特に酢酸、乳酸) をはじめとする食品成分の濃度を希釈を考慮に入れて適正に調整することや、調味酢の pH 上昇を防ぐことにより、本製品の膨化現象を抑制することが可能と考えられる。

文 献

- 1) 合屋晏秀, 花井玲子, 斎藤昌義, 中村宗一郎: ママカリ酢漬包装品のガス発生による膨張の防止対策. 日食工誌, **46**, 170-176 (1999).
- 2) Kandler, O. and Weiss, N.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2, p. 1208, Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA (1986).
- 3) 好井久雄, 金子安之, 山口和夫: 食品微生物学ハンドブック, p. 227, 技報堂, 東京 (1995).
- 4) Park, K.B. and Oh, S.H.: Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. Bioresour. Technol., **98**, 312-319 (2007).
- 5) Landete, J.M., Pardo, I. and Ferrer, S.: Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. FEMS Microbiol Lett., **260**, 84-90 (2006).
- 6) Moreno-Arribas, V. and Lonvaud-Funel, A.: Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. FEMS Microbiol Lett., **180**, 55-60 (1999).
- 7) 内村 泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル. 小崎道雄監修, p. 62, 朝倉書店, 東京 (1992).
- 8) 乳酸菌研究集談会: 乳酸菌の科学と技術, p. 126, 学会出版センター, 東京 (2000).

- 9) Liu, S.-Q., Holland, R. and Crow, V. L.: The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 257-269 (2003).
- 10) du Plessis, H. W., Dicks, L. M., Pretorius, I. S., Lambrechts, M. G. and du Toit, M.: Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int. J. Food Microbiol.*, **91**, 19-29 (2004).
- 11) 松田敏生: 食品微生物制御の化学, p. 116, 幸書房, 東京 (1998).
- 12) 浦 哲二, 稲森和夫, 古屋 武, 内田一生: 低塩醤油に生育する微生物に関する研究 (第 1 報) 乳酸桿菌によるアミノ酸の脱炭酸. *醤研*, **14**, 187-192 (1988).
- 13) 新国佐幸, 石山朋治, 鈴木チセ, 鈴木忠直, 小坂直治, 森勝美: ヘテロ乳酸菌 *Lactobacillus fructivorans* に起因する加工味噌の膨れ. *日食工誌*, **43**, 910-916 (1996).
- 14) 内藤茂三: 包装食品の微生物変敗防止に関する研究 (第 34 報) 包装ストレートつゆの乳酸菌による膨張現象について. *愛知食品工技セ年報*, **37**, 39-47 (1996).