充填豆腐の黄変化菌 (*Leuconostoc
mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)
の分離および同定

松澤一幸*・山中信介*・山下浩一*・山口年宣**
上田 修***・寺下隆夫****

Isolation and Identification of a Microorganism from Juten-Tofu with Yellow Spots
(*Leuconostoc mesenteroides* subsp.
mesenteroides)

Kazuyuki MATSUZAWA*, Shinsuke YAMANAKA*,
Hirokazu YAMASHITA*, Toshinori YAMAGUCHI**,
Osamu UEDA*** and Takao TERASHITA****

* Nara Prefectural Institute of Industrial Technology,
129-1, Kashiwagi-cho, Nara-shi 630

** Yamashoku Co., Ltd., 817, Basa, Oyodo-cho,
Yoshino-gun, Nara 639-31

*** Technical Adviser for Nara Prefecture, 8-2-15,
Nishitomigaoka, Nara-shi 631

**** Laboratory of Food Microbiology, Faculty of
Agricuture, Kinki University, 3327-204,
Naka-machi, Nara-shi 631

A microorganism in Juten-tofu (heated after packaging) with yellow spots was isolated and identified. The microorganism was isolated on a soymilk agar plate at 5°C under anaerobic conditions. Tofu yellow coloring isolate, a type of lactic acid bacteria, was identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Because of its heat resistance (about 50°C), it was estimated that the contamination of this strain occurred after heating of a package in the process of Juten-tofu manufacturing.

(Received Oct. 3, 1996; Accepted Oct. 1, 1997)

豆腐は日本の伝統的な食品の一つであり、優れた食品としての特性を持つ反面、微生物の増殖がきわめて速い

ため、製造過程における衛生管理や流通、保存時の取り扱いに注意が必要な食品である。この理由から市販豆腐や製造工程における微生物汚染の実態調査報告^{1)~5)}、豆腐の微生物フローラに関する研究^{6)~11)}が数多く認められる。これらの報告には、*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*などが豆腐の汚染微生物として記載されている。

1993年4月、賞味期限が10日間に設定されている充填豆腐の表面に、粘性物とともに鮮やかな黄色のスポットが特異的に現れる現象が数例発生した。そこで、豆腐黄変化の原因究明を目的として、原因微生物の分離および同定を試みたので報告する。

1. 実験方法

(1) 使用培地

豆乳寒天培地は、豆乳(Brix 5.2)を90°Cで30分加熱殺菌したものに、等量の寒天滅菌溶液(寒天濃度4%)を熱時混合し寒天平板を作成した。菌の培養および同定のための諸性質の検討には、乳酸菌実験マニュアル記載のGYP培地¹²⁾を基本培地として使用した。

(2) 豆腐黄変化菌の分離

豆腐の黄変化部に付着する粘性物を採取し滅菌水で適宜希釈した菌液を豆乳寒天培地に塗抹し、三菱ガス化学製アネロバックを使用して5°Cで10日間嫌気培養(酸素濃度0.1v%以下)した。

(3) 分離菌の同定

実験は乳酸菌実験マニュアル¹²⁾に準じて行った。糖類の発酵性はGYP培地のグルコースを各試験糖類に置き換えた培地に供試菌 10^2 /mlを接種し、20°Cで5日間培養後、培地の滴定酸度を測定し判定した。デキストランの生成は、GYP培地のグルコースをスクロースに置き換えたSYP寒天平板培地に菌体を塗抹し20°Cで5日間培養後、粘性物の生成により判定した。生育温度は、GYP培地に供試菌 10^5 /mlを接種し、1~45°Cで7日間培養後、ODを測定して求めた。耐アルコール濃度は、エタノールを2.5~15.0%添加したGYP培地に供試菌 10^5 /mlを接種し、20°Cで5日間培養後、ODを測定して求めた。耐熱性は、滅菌生理食塩水で 10^7 /mlに調整した菌液0.3mlずつをエッペンチューブに分注し、乾式ア

* 奈良県工業技術センター (〒630 奈良市柏木町 129-1)

** (株)山食 (〒639-31 奈良県吉野郡大淀町馬佐 817)

*** 奈良県技術アドバイザー (〒631 奈良市西登美ヶ丘 8-2-15)

**** 近畿大学農学部 (〒631 奈良市中町 3327-204)

ルミヒートブロック恒温装置を用いて 35~60℃ で 15 分間加熱、冷却後、菌液 0.1 ml を乳酸菌数測定用 BCP 加プレートカウント寒天培地（日水製薬）に塗抹し、20℃ で 7 日間培養後、コロニーの発生により求めた。

同定は、調べた諸性質を乳酸菌実験マニュアル⁽¹²⁾ および Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁽¹³⁾ の記載と照合し行った。

(4) 生産物の分析

有機酸は、島津 HPLC 有機酸分析システム（電気伝導度検出法）により、また、乳酸の D, L 体およびエタノールの定量は、F-キット（ペーリンガー・マンハイム製）によった。

(5) 細胞壁のペプチドグリカン

乳酸菌実験マニュアル⁽¹²⁾ に記載の方法によりペプチドグリカンを調製し、6 N 塩酸中 100℃ で 20 時間加水分解後、AccQ・Tag アミノ酸分析法（Waters）によりアミノ酸を定量し、モル比を算出してタイプを決定した。

(6) GC 含量

乳酸菌実験マニュアル⁽¹²⁾ に記載の方法（Thomas-Marmur 法）に準じ菌体から DNA を抽出、精製した。溶菌酵素はアクロモペプチダーゼ（和光純薬工業、600 単位/ml）とリゾチーム（和光純薬工業、600 μg/ml）を併用した。精製 DNA は GC 含量測定キット（ヤマサ醤油製）を使用して、モノヌクレオチドに加水分解後、高速液体クロマトグラフィーで分析した。

2. 結果および考察

(1) 豆腐黄变化菌の特性と分離

豆腐黄变化菌（以下 YT 菌）の分離に際して、本菌の特性と考えられる豆腐黄变化、粘性物生成について若干の検討を行った。まず、黄变化は豆腐固形分を含む培地に本菌が増殖する際に発生したが、豆腐固形分を含まない標準寒天培地、GYP 寒天培地、豆腐パック水寒天培地（カット豆腐のパック水を 10 倍に希釈し、寒天粉末を加え作成）では発生しなかった。粘性物は、豆腐、豆腐パック水寒天培地、SYP 寒天培地などスクロースを含有する培地で生成した。また、殺菌豆腐（105℃、30 分加熱殺菌）に豆腐黄变化部に付着する粘性物を微量接種し、嫌気状態で、5℃、10 日間放置する試験において、豆腐の黄变化と粘性物の生成が認められたことから本菌の通性嫌気性および低温増殖性を確認した。

そこで本菌のこれらの特性を考慮し、豆乳寒天培地を用い、嫌気下低温培養を行い、培地を黄变化し粘性物を生成するコロニーを分離した。さらに、同コロニーを殺

菌豆腐に接種し 5℃ で 7 日間放置したところ、豆腐の黄变化と粘性物の生成が認められた。これらの結果から分離菌が YT 菌であることを確認した。

(2) 豆腐黄变化菌の同定

YT 菌の諸性質を Table 1 に示した。本菌は、グラム陽性の連鎖球菌（二連～長連鎖）で、カタラーゼ陰性、GYP 培地でガスを生成し、消費グルコースの約 1/2 量の 0.47% (5.2 mmol/dl) の D (－) 乳酸および、これとほぼ等モル (3.7 mmol/dl) のエタノールを生産することからヘテロ発酵の乳酸球菌 *Leuconostoc* 属と判断した。さらにスクロースからデキストランを生成し、アラビノース、キシロース、グルコース、スクロース、フラクトース、トレハロース、マンノース、メリビオース、リボースを強く発酵し、ガラクトース、マルトース、ラクトースも発酵したことより *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* と同定した。本菌のペプチドグリカンの Lys : Glu : Ala : Ser は 1.05 : 1 : 3.7 : 0 でタイプは L-Lys-L-Ala₂ 型と判定した⁽¹⁴⁾。また DNA の GC 含量は 36.6% であった。

(3) 市販豆腐の黄变化原因の考察

本菌は豆腐から分離された例はないが、清酒、ワイン、漬物、サイレージの製造過程などに広く分布する乳酸菌⁽¹⁵⁾であり、0℃ 付近でも増殖する低温細菌⁽¹⁶⁾である。

Table 1 Taxonomic character of isolated strain from yellowed tofu

Cell form	cocci (pairs and chains)
Size (μm)	0.6~0.8
Gram staining	+
Catalase reaction	—
Oxidase reaction	—
Anaerobic growth	+
Fermentation type	hetero
Optical form of lactic acid	D (－)
Dextran formation	+
Growth at 5℃	+
Growth at 35℃	—
Growth in 5% ethanol	+
Growth in 10% ethanol	—
Heat resistance (at 50℃ for 15 min)	—
Peptidoglycan type	L-Lys-L-Ala ₂
Mol % G+C of DNA	36.6%

+, positive; —, negative.

市場調査で、YT 菌による充填豆腐の黄変化事例はそれほど頻繁ではなかった。「充填豆腐」はプラスチック容器に豆乳と凝固剤を充填密封後、85℃で60分間、加熱凝固させ製造されるため一般細菌数はきわめて少なかった(松澤ら、未発表)。

今回の黄変化例は、微生物汚染の少ない充填豆腐が冷蔵庫内で、また通性嫌気的な環境下で長期間保存されることにより本菌が優先的に増殖し、粘性物(デキストラン)を生成するとともに、黄色のスポットが発生したものと考えられる。また、本菌の耐熱性は50℃以下であり、汚染は加熱工程以後に起ったものと推察される。

汚染発生箇所および本菌による豆腐の黄変化の機作等について現在調査検討中で、近い将来明確にしたいと考えている。

3. 要 約

充填豆腐を黄変化する微生物を、豆乳寒天培地を用い、嫌気培養法により分離し、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* と同定した。本菌は5℃の低温下で増殖し豆腐に黄変化を発生させることを確認した。また、本菌の耐熱性は弱く、汚染は充填豆腐製造工程中の加熱以降の工程で発生するものと推察した。

本研究を行うにあたり、微生物の分離・同定に有益なご教示を頂きましたイカリ消毒株式会社クリーンライフテクノロジー西日本研究所 日佐和夫所長、ならびに菌の同定に関してご指導を頂きました東京農業大学 岡田早苗博士、京都府保健環境研究所 降井佐太郎博士、奈良先端科学技術大学院大学 吉田信行博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 寺田育子・青木善也・岩本サカエ・山本安純・小野泰美：奈良県衛生研究所年報, 17, 119 (1982).
- 2) REHBERGER, T.G., WILSON, L.A. and GLATZ, B.A.: *Journal of Food Protection*, 47, 177 (1984).
- 3) VAN KOOLJ, J.A. and DE BOER, E.: *International Journal of Food Microbiology*, 2, 349 (1985).
- 4) 大村芳正・島本富明：徳島県食品加工試験場研究報告, 33, 1 (1985).
- 5) 大野仁志・横田忠夫, 中野 浩：岐阜県工業技術センター研究報告, 17, 45 (1985).
- 6) 好井久雄・金子安之・山口和夫：食品微生物学, (技報堂出版, 東京), p. 268 (1978).
- 7) 金子精一：フードパッケージング, 30, 57 (1986).
- 8) 白川武志：日食工誌, 32, 1 (1985).
- 9) SZABO, R.A., JARVIS, G.A., WEISS, K.F., RAYMAN, K., LACHAPPELLE, G. and JEAN, A.: *Journal of Food Protection*, 52, 727 (1989).
- 10) TUITMOWONG, K. and FUNG, D.Y.C.: *Journal of Food Protection*, 54, 212 (1991).
- 11) FOUAD, K.E. and HEGEMAN, G.D.: *Journal of Food Protection*, 56, 157 (1993).
- 12) 内村 泰・岡田早苗：乳酸菌実験マニュアル, 小崎道雄監修(朝倉書店, 東京), 164 pp., (1992).
- 13) GARVIE, E.I.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2 (Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA), p. 1071 (1986).
- 14) 岡田早苗・柳田藤寿：乳酸菌の科学と技術, 乳酸菌研究集談会編(学会出版センター, 東京), p. 78 (1996).
- 15) 岡田早苗・柳田藤寿：同上, p. 249 (1996).
- 16) 好井久雄：日食工誌, 39, 564 (1992).

(平成8年10月3日受付, 平成9年10月1日受理)