腐敗魚介類から分離した細菌のタンパク質及び脂肪分解能^{*1}

(昭和 61 年 7 月 29 日受理)

小 畠 満 子^{*2} 外 海 泰 秀^{*3} 伊 藤 誉 志 男^{*3}

Proteolytic and Lipolytic Activities of Bacteria Isolated from Spoiled Seafoods

Michiko KOBATAKE^{*2}, Yasuhide TONOGAI^{*3} and Yoshio ITO^{*3}

(^{*2}National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan; ^{*3}National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka, Japan)

Four bacterial strains isolated from spoiled seafoods were identified, and their growth temperature ranges were determined. Proteolytic activity on nutrient agar plus 1% skim milk and lipolytic activity on butterfat in Crossley's agar were determined under various conditions of incubation for 2 weeks at 5, 15 and 25°C.

Pseudomonas fluorescens S-1 was isolated at the cell number of 2.4×10^5 per gram from a spoiled common mackerel (*Scomber japonicus*). This strain was a gram negative aerobic rod with polar flagella, and produced diffusible fluorescent pigment and arginine dihydrolase. The strain was psychrotrophic, having a growth temperature range from 0 to 30°C with the optimum temperature at about 25°C. The strain showed both proteolysis and lipolysis within 2 days at 25°C, within 4 days at 15°C, and within 14 days at 5°C.

Bacillus subtilis S-8 was isolated at the cell number of 1.1×10^8 per gram from a spoiled neon flying squid (*Ommastrephes bartrami*). This strain was a gram positive endospore-forming rod, and hydrolyzed gelatin, starch and casein. The strain showed both proteolysis and lipolysis within one day at 25°C, within 3 days at 15°C, and within 4 days at 5°C.

Staphylococcus epidermidis S-6 was isolated at the cell number of 5.5×10^7 per gram from a spoiled black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). This strain was a gram-positive yellow pigmented coccus. It grew on mannitol salt agar, but it did not produce lecithinase or coagulase. Both proteolysis and lipolysis of the strain were positive within 2 days at 25°C. The proteolysis at 5 and 25°C was negligible.

Alcaligenes sp. S-4 was isolated at the cell number of 6.1×10^6 per gram from a spoiled black tiger shrimp. This strain was a gram negative aerobic coccoid rod with peritrichous flagella. Its coenzyme Q system was Q-8, its GC content of DNA was 57.8 mol %. The strain demonstrated neither proteolysis nor lipolysis.

These 4 bacterial strains will be employed as test strains for microbiological and chemi-

^{*1} 食品の腐敗に関する研究 (第 3 報)

^{*2} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*3} 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市東区法円坂 1-1-43

cal analysis in further investigations on spoilage of seafoods.

(Received July 29, 1986)

Key words: 腐敗魚介類 spoiled seafoods; 腐敗細菌 spoilage bacteria; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus subtilis*; タンパク質分解能 proteolytic activity; 脂肪分解能 lipolytic activity

緒 言

低温で流通または長期貯蔵される食品は低温微生物によって汚染される機会が多い。特にタンパク質及び脂肪分解能を有する低温細菌群の存在は、変敗、腐敗との関連において食品衛生上重視されている。そのため、細菌のタンパク質及び脂肪分解能に関する研究^{1)~7)}は多い。たとえば、タンパク質及び脂肪分解能陽性細菌の各種食品における分布状況、あるいは培養温度別、細菌菌属別の出現頻度などについて詳しく調べられている。しかし、酵母のタンパク質及び脂肪分解能に関する研究は少なく、著者らの低温酵母についての報告⁸⁾の他に、水・畜産食品由来の未同定酵母についての報告^{4), 5), 7), 9)}が少数ながらみられるに過ぎない。まして、タンパク質及び脂肪分解能を酵母菌種と細菌菌種間で比較した研究は見当らない。

本報では、腐敗魚介類から主要な細菌を分離、同定し、発育温度特性、並びに 5°, 15°, 25° 培養におけるタンパク質及び脂肪分解能を調べ、前報⁸⁾で得られた酵母の成績と比較しながら検討したので報告する。

実験方法

1. 供試試料

市販の生鮮マサバ 1 尾、冷凍ウシエビ（ブラックタイガージュリンブ）3 尾、及び冷凍ムラサキイカ 50 g を供試試料とした。（Table 1）

2. 魚介類の腐敗

生鮮マサバ及び室温（17°）で解凍したウシエビとムラサキイカの筋肉部分のみを用いた。ムラサキイカの筋肉は 100° で 3 分間加熱した。それぞれを 25° の恒温器に入れ、腐敗するまで放置した。

3. 細菌の分離

腐敗試料 10 g を滅菌生理食塩液 90 ml に採取し、ワーリングブレンダーで磨砕してこれを原液とし、10倍希釈法により、生菌数測定用標準寒天培地（栄研化学（株）製）平板上に塗抹した。これらを 25° で 7 日間培養し、各試料別に発生した集落のうち出現頻度の高い集落の代表 1 集落を釣菌し、4 菌株の細菌を分離した。

4. 分離細菌の同定

分離細菌の同定は主として、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹⁰⁾（第 8 版）、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology（第 1 巻）、「医学細菌同定の手引き」¹²⁾（第 2 版）、「微生物の分類と同定」¹³⁾（下）などに準じた。同定のための培養温度は 25° で行った。

運動性は半流動寒天高層、Craigie の方法¹²⁾及び懸滴法¹³⁾などにより観察した。色素生成試験にはキング A 及び B 培地（日水製薬）を、fruity odor の観察¹⁴⁾には羊血液寒天培地（日水製薬）を用いた。嫌気性発育はダーラム管入りブドウ糖ブイヨン¹²⁾に接種し、ガスパック嫌気システム（BBL）で嫌気培養を行った。7% 塩化ナトリウム要求試験は 7% 塩化ナトリウム加 Nutrient broth（Difco）を用いた。ブドウ球菌用培地としてはマンニット食塩培地（日水製薬）を用いた。OF テストは Hugh らの方法¹²⁾、チトクロームオキシダーゼ試験は Kovacs の方法¹²⁾、アルギニンの分解試験は Thornley の方法¹²⁾、コアグラゼ産生試験は Cowan の方法¹²⁾、ゼラチンの液化は Frazier の方法¹²⁾、脱窒反応は駒形らの方法¹³⁾によった。ペニシリン感受性試験は Corlett らの方法¹⁵⁾によった。糖から酸の産生は、Smith らの糖加アンモニウム塩培地（ASS）¹²⁾、炭素化合物の利用は駒形らの培地¹³⁾を用いて試験した。キノンの抽出は山田の方法^{16), 17)}、DNA の抽出は Marmur らの方法¹⁸⁾によった。

5. 生育温度試験

標準寒天培地上で 25°, 4 日間の前培養を行った分離細菌菌株を同培地の斜面に接種し、0°, 5°, 10° で 2 週間、15°, 20°, 25°, 30°, 37°, 42° で 1 週間培養し、生育状態を観察した。0°~10° 培養にはインキュベーター MIR-150（三洋電機（株）製）を使用した。

6. タンパク質分解能試験

タンパク質分解能試験には 10% 脱脂乳（Difco）液を 10% の割合に加えた標準寒天培地を用いた。培養及び判定は前報⁸⁾と同様に行った。

Table 1. Seafood Samples Used for Isolation of Bacteria and Spoilage Examinations

Japanese name	English name	Scientific name	Fishing ground
Masaba	Common mackerel ^{a)}	<i>Scomber japonicus</i>	Japan
Ushi-ebi	Black tiger shrimp ^{b)}	<i>Penaeus monodon</i>	Australia
Murasaki-ika	Neon flying squid ^{b)}	<i>Ommastraphes bartrami</i>	Japan

a) Fresh; b) frozen

Table 2. Morphological and Biochemical Characteristics of Bacteria Isolated from Spoiled Seafoods

Characteristics	<i>Pseudomonas fluorescens</i> S-1	<i>Bacillus subtilis</i> S-8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> S-6	<i>Alcaligenes</i> sp. S-4
Form	rod	rod	coccus	coccal rod
Gram stain	—	+	+	—
Capsule	—	—	—	—
Flagella	+ ^{a)}	+ ^{b)}	—	+ ^{b)}
Spore	—	+	—	—
Motility	+	+	—	+
Fluorescent pigment	+	—	—	—
Pyocyanin production	—	—	—	—
Fruity odor	NT ^{d)}	NT	NT	—
Growth at:				
5°C	+	—	—	—
37°C	—	+	+	+
42°C	—	+	+	—
Growth in anaerobic agar	—	—	+	—
Growth without added NaCl	+	+	+	+
Growth in 7.0% NaCl	—	+	+	+
Growth on mannitol salt agar	NT	NT	+	NT
Acid from glucose (OF test):				
aerobic	+	+	+	+
anaerobic	—	+	+	—
Catalase	+	+	+	+
Cytochrome oxidase ^{e)}	+	+	—	+
Arginine dihydrolase	+	—	+	—
Urease	—	—	+	+
Coagulase	—	—	—	—
Gelatin liquefaction	+	+	—	—
Starch hydrolysis	—	+	—	—
Casein hydrolysis	+	+	+	—
Egg yolk reaction	+	—	+	—
Nitrate reduction	—	+	+	—
Denitrification	—	NT	NT	—
Indole production	—	—	—	—
H ₂ S production	—	—	+	—
MR reaction	—	+	+	—
Acetoin production	—	+	+	—
Penicillin sensitivity:				
0.5 I.U./ml	—	—	+	—
10 I.U./ml	—	—	+	—
Acid from: ^{e)}				
Glucose	+	+	+	+
Arabinose	+	+	—	NT
Xylose	+	+	—	NT
Fructose	+	+	+	NT
Mannitol	+	+	+	NT
Inositol	+	+	—	NT
Sorbitol	+	+	—	NT
Lactose	—	—	+	NT
Maltose	—	+	+	NT
Sucrose	—	+	+	NT
Utilization of: ^{f)}				
Glucose	+	+	+	+
Trehalose	+	NT	NT	—
2-Ketogluconate	+	NT	NT	+
Citrate	+	—	—	+
meso-Inositol	+	NT	NT	—
L-Valine	+	NT	NT	—
β-Alanine	+	NT	NT	—
DL-Arginine	+	NT	NT	—
Coenzyme Q system	NT	NT	NT	Q-8
Mol% G+C of DNA	NT	NT	NT	57.8

+, positive; —, negative; ^{a)} polar flagella; ^{b)} peritrichous flagella; ^{e)} Kovac's; ^{d)} not tested; ^{e)} ASS (Smith, *et al.*); ^{f)} Komagata *et al.*

Table 3. Temperature Ranges of Growth of Bacteria Isolated from Spoiled Seafoods

Isolated strain	Strain number	Temperature range
<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	S-1	10-30
<i>Alcaligenes</i> sp.	S-4	15-37
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S-6	20-37
<i>Bacillus subtilis</i>	S-8	20-42
		0 5 10 15 20 25 30 37 42 (°C)

* *Pseudomonas fluorescens* isolated from a fresh common mackerel was psychrotrophic bacteria.

Table 4. Proteolytic and Lipolytic Activities of Bacteria Isolated from Spoiled Seafoods

Species	Incubation																	
	5°C						15°C						25°C					
	1	2	3	4	7	14	1	2	3	4	7	14	1	2	3	4	7	14
	(Days)						(Days)						(Days)					
Proteolysis																		
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i>	—	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>Alcaligenes</i> sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lipolysis																		
<i>S. epidermidis</i>	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i>	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alcaligenes</i> sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

- = no hydrolysis; + = weak or strong hydrolysis

7. 脂肪分解能試験

脂肪分解能試験にはクロスリー寒天培地 (栄研化学 (株)) を用いた。培養及び判定は前報⁸⁾ と同様に行った。

実験結果

1. 細菌の同定

分離細菌菌株の形態学的、生理・生化学的諸性質を Table 2 に示した。

1) 分離菌株: S-1

本菌は悪臭の強い腐敗マサバの筋肉から 2.4×10^5 /g の菌数で分離された。本菌は極鞭毛を有する運動性のグラム陰性桿菌で、水溶性の黄色蛍光色素を産生した。ゼラチンの液化、カゼインの加水分解及び卵黄反応は陽性であった。食塩 0% で発育したが、7% では発育しなかった。ペニシリン耐性であった。これらの性質及び Table 2 の結果より、本菌を *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula と同定した。

2) 分離菌株: S-8

本菌は軟泥化した腐敗ムラサキイカの筋肉から 1.1×10^8 /g の菌数で分離された。本菌はグラム陽性の運動性有芽胞桿菌で、糖を発酵的に分解した。ブドウ糖ブイヨンにおける嫌気性発育は認められなかった。ゼラチンを

液化し、デンプンとカゼインを加水分解した。これらの性質及び Table 2 の結果より、本菌を *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn と同定した。

3) 分離菌株: S-6

本菌は弱いアンモニア臭を発生した腐敗ウシエビの筋肉から 5.0×10^7 /g の菌数で分離された。本菌はグラム陽性の球菌で、非水溶性の黄色色素を産生した。通性嫌気性で、糖を発酵的に分解した。マンニット加食塩培地に発育したが、卵黄反応とコアグラゼ産生試験は陰性であった。これらの性質及び Table 2 の結果より本菌を *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow) Evans と同定した。

4) 分離菌株: S-4

本菌は弱いアンモニア臭を伴った腐敗ウシエビの筋肉から 6.1×10^6 /g の菌数で分離された。本菌は周鞭毛を有するグラム陰性の球桿菌または短桿菌で、硝酸塩の還元及び脱窒反応は陰性であった。また、呼吸系キノン型が Q-8、DNA の GC 含量が 57.8% であったことなどを総合して *Alcaligenes* 属に分類した。更に化学分類¹⁰⁾ を行い、菌種名を決定したい。

2. 生育温度域の検討

分離4菌種の生育温度域を Table 3 に示した。

P. fluorescens は 0° から 30° の温度範囲内で生育し、約 25° の最適温度を有する psychrotrophic bacteria^{20), 21)}であった。*B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Alcaligenes* sp. は mesophilic bacteria であった。

3. タンパク質分解能

5°, 15°, 25° 培養における分離4菌株のタンパク質(カゼイン)分解能試験の成績を Table 4 に示した。

B. subtilis の分解能は強く、5°, 15°, 25° 培養の1日目に陽性となった。*P. fluorescens* の分解能は *B. subtilis* よりは弱く、5° 培養の7日目、15° 培養の4日目、25° 培養では2日目に陽性となった。*S. epidermidis* の分解能は弱く、5°, 15° 培養では陰性であったが、25° 培養の2日目から陽性となった。*Alcaligenes* sp. は 5°, 15°, 25° 培養で陰性であった。

被験4菌種のタンパク質分解能は *B. subtilis* が最も強く、次いで *P. fluorescens*, *S. epidermidis*, *Alcaligenes* sp. の順であった。

4. 脂肪分解能

5°, 15°, 25° 培養における分離4菌種の脂肪(バター脂肪)分解能試験の成績を Table 4 に示した。

S. epidermidis は 5° 培養の7日目、及び 15°, 25° 培養の1日目に陽性となった。*P. fluorescens* は 5° 培養の3日目、15° 培養の2日目、25° 培養では1日目に、また、*B. subtilis* は *P. fluorescens* よりはやや遅く、5° 培養の4日目、15° 培養の3日目、25° 培養の1日目に分解能陽性となった。*Alcaligenes* sp. は 5°, 15°, 25° 培養で陰性であった。

被験4菌種の脂肪分解能は *P. fluorescens* が最も強く、次いで *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Alcaligenes* sp. の順であった。

考 察

P. fluorescens S-1 は多種類の炭素化合物を利用し、レシチナーゼを産生し、ゼラチンとカゼインを加水分解するなど生理的に活性の強い菌種であり (Table 2), しかも低温で生育する特徴がある (Table 3)。古くから *P. fluorescens* は魚介類の主要な腐敗細菌として報告^{22)~28)}されているが、今回の分離株も生マサバが腐敗した場合の優勢菌種であった。

B. subtilis S-8 も生理的に活性の強い菌種であったが、発育温度域が *P. fluorescens* とは異なっており、*P. fluorescens* より高い温度 (15° 以上) で発育増殖した (Table 3)。耐熱性の *B. subtilis* による加熱水産加工食品の腐敗については種々報告^{29), 30)}されているが、加熱ムラサキイカを腐敗させた本実験においても *B. subtilis* S-8 が分離された。

S. epidermidis S-4 と *Alcaligenes* sp. S-4 は解凍ウシエビを腐敗させた場合の優勢菌種であった。解凍魚

の腐敗細菌フローラは鮮魚のそれとは異なっており、*Moraxella* や球菌類が優勢になると奥積³¹⁾らが報告しているように、著者らも球菌類と球菌を分離した。これらの分離株は生理的には、さほど強い活性を示さなかった (Table 2)。

今回の細菌4菌種と (Table 4), 今回と同一条件で試験した前回⁸⁾の酵母2菌種のタンパク質及び脂肪分解能を比較してみると、酵母 *C. lipolytica* は細菌 *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Alcaligenes* sp. の4菌種よりは強かった。一方、酵母 *Tr. cutaneum* は *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* の3菌種とほぼ同程度か、あるいは3菌種よりは弱く、*Alcaligenes* sp. よりは強かった。すなわち、タンパク質・脂肪分解能は酵母 *C. lipolytica* の方が細菌 *P. fluorescens* よりは強く、*P. fluorescens* の方が酵母 *Tr. cutaneum* よりは強く、*Tr. cutaneum* の方が細菌 *Alcaligenes* sp. よりは強かった。このように酵母と細菌では菌種間でかなりの差が認められたので、次回は酵母と細菌を滅菌魚介類ホモジネートに単独で接種し、詳細な比較実験を行いたい。

要 約

腐敗魚介類から分離した4菌株の細菌を同定し、生育温度域を調べ、5°, 15°, 25° 培養におけるタンパク質(カゼイン)及び脂肪(バター脂肪)分解能試験を行った。

1. *P. fluorescens* S-1 は生マサバが腐敗した場合の優勢菌種であった。*B. subtilis* S-8 は加熱ムラサキイカが、また *S. epidermidis* S-6 と *Alcaligenes* sp. S-4 は解凍ウシエビが腐敗した場合の優勢菌種であった。

2. *P. fluorescens* は psychrotrophic bacteria であり、*B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Alcaligenes* sp. の3菌種は mesophilic bacteria であった。

3. *P. fluorescens* と *B. subtilis* は 5°, 15°, 25° の各培養温度でタンパク質・脂肪両分解能を示したが、*Alcaligenes* sp. は両分解能とも陰性であった。*S. epidermidis* は 5° と 15° 培養では脂肪分解能のみ、25° 培養ではタンパク質・脂肪両分解能を示した。

4. 分離細菌4菌種のタンパク質及び脂肪分解能の成績と前報⁸⁾で得られた酵母2菌種の成績とを比較した結果、細菌 *S. epidermidis* と酵母 *Tr. cutaneum* 2菌種間の、また細菌 *P. fluorescens* と酵母 *C. lipolytica* 2菌種間の各培養温度におけるタンパク質及び脂肪分解能はほぼ類似していた。*B. subtilis* の脂肪分解能は *C. lipolytica* のそれより弱く、*Tr. cutaneum* のそれより強かった。また *Alcaligenes* sp. のタンパク質及び脂肪分解能は酵母のそれらより弱かった。

本研究の要旨は日本食品衛生学会第50回学術講演会 (1985年10月、新潟) において発表した。

謝 辞

稿を終るに当たり、御懇切な御助言及び試験成績の一部

に御協力いただいた静岡大学 山田雄三教授, 東京大学 応用微生物研究所 山里一英助教授, (社)日本食品衛生協会研究所 河西 勉部長, 並びに終始御指導, 御鞭達を賜わった東邦大学 海老沢功教授, 同 村井貞子助教授, 国立衛生試験所 谷村顕雄副所長, 同 三瀬勝利部長, 同大阪支所 加納晴三郎元支所長に深謝致します。

文 献

- 1) Sulzbacher, W. L.: *Food Technol.* **4**, 386~390 (1950).
- 2) 小久保弥太郎, 梅木富士郎, 春田三佐夫: *食衛誌*, **12**, 164~169 (1971).
- 3) 橋本秀夫, 村上行雄, 太田欽幸: 同上 **14**, 168~172 (1973).
- 4) 日越博信, 浜田輔一: 同上 **17**, 41~47 (1976).
- 5) 鈴木 昭: *モダンメディア別冊* **23**, 244~266 (1977).
- 6) Kraft, A. A., Rey, C. R.: *Food Technol.* **33**, 66~71 (1979).
- 7) 久保倉洋子: *食衛誌*, **24**, 21~26 (1983).
- 8) 小島満子, 倉田 浩: 同上 **24**, 532~539 (1983).
- 9) Eklund, M. W., Spinelli, J., Miyauchi, D., Dassow, J.: *J. Food Sci.* **31**, 424~431 (1966).
- 10) Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8th Ed., (1974) Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 11) Krieg, N. R., Holt, J. G.: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Vol. 1, (1984) Williams & Wilkins Co., Baltimore/London.
- 12) Cowan, S. T. (坂崎利一訳): "医学細菌同定の手びき" 第2版 (1974) 近代出版.
- 13) 駒形和男著, 長谷川武治編: "改訂版 微生物の分類と同定 下" p. 99~161 (1975) 学会出版センター.
- 14) Yamasato, K., Akagawa, M., Oishi, N., Kuraishi, H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, 195~213 (1982).
- 15) Corlett, D. A., Lee, J. S., Sinnhuber, R. O.: *Appl. Microbiol.* **13**, 808~817 (1965).
- 16) Yamada, Y., Aida, K., Uemura, T.: *Agric. Biol. Chem.* **32**, 786~788 (1968).
- 17) Yamada, Y., Aida, K., Uemura, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**, 181~196 (1969).
- 18) Marmur, J., Doty, P.: *J. Mol. Biol.* **5**, 109~118 (1962).
- 19) 駒形和男編: "微生物の化学分類実験法" p. 131~282 (1982) 学会出版センター.
- 20) Morita, R. Y.: *Bacteriol. Rev.* **39**, 144~167 (1975).
- 21) Morita, R. Y., Burton, S. D.: *J. Bacteriol.* **86**, 1025~1029 (1963).
- 22) 藤井建夫: *東海水研報*, **92**, 1~63 (1977).
- 23) 相磯和嘉: *食衛誌*, **1**, 12~17 (1960).
- 24) 中島正博: *腐研報*, **2**, 4~35 (1949).
- 25) Ryser, E. T., Marth, E. H., Taylor, S. L.: *J. Food Prot.* **47**, 378~380 (1984).
- 26) van Spreekens, K. J. A., Topepoel, L.: *In*. "Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity" p. 283~294 (1981) Roberts, T. A., Hobbs, G., Christian, J. H. B. and Skovgard, N. Ed., Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- 27) 奥積昌世: *冷凍*, **61**, 120~130 (1986).
- 28) Hunter, A. C.: *J. Bacteriol.* **7**, 85~109 (1922).
- 29) 木俣正夫: *日水誌*, **16**, 52~54 (1951).
- 30) 赤松幹夫: *日水誌*, **26**, 581~587 (1960).
- 31) 奥積昌世, 堀江 進, 木村正幸, 赤堀正光, 川前政幸: *食衛誌*, **13**, 418~421 (1972).