酵母及び細菌を単独又は混合接種した魚介類における 揮発性塩基窒素の経日変化^{*1}

(昭和 63 年 6 月 20 日受理)

小 畠 満 子^{*2} 外 海 泰 秀^{*3}
小林加代子^{*2} 伊藤誉志男^{*3}

Time Courses of Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) in Seafoods Inoculated Singly or as Mixtures with Spoilage Yeasts or Bacteria

Michiko KOBATAKE^{*1}, Yasuhide TONOGAI^{*2}, Kayoko KOBAYASHI^{*1} and Yoshio ITO^{*2}

(^{*1}National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan;

^{*2}National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch:
1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka, Japan)

Previously, we reported on the amount of T-VBN produced by yeasts or bacteria. *Candida lipolytica* produced the largest amount of T-VBN among the 5 yeast species tested, while *Staphylococcus epidermidis* produced the smallest amount, and *Pseudomonas fluorescens* produced the largest amount among the 4 bacterial species tested. In this paper, the microbiological and chemical changes of these 3 species were compared. *C. lipolytica*, *S. epidermidis* and *P. fluorescens* were inoculated singly or as mixtures into 3 different kinds of sterile seafood homogenate (common mackerel, black tiger shrimp and neon flying squid), and incubated at either 5, 15 or 25°C. The time courses of viable counts, pH values, and TVB-N values determined according to the microdiffusion method of Conway were observed for up to 7 days.

(1) Viable counts: The growth curves of *C. lipolytica* at 15 and 25°C showed gradual slopes, and reached the stationary phase on day 7. The growth curves of *P. fluorescens* and a mixture containing *C. lipolytica*, *S. epidermidis* and *P. fluorescens* at 15 and 25°C reached the stationary phases on day 2. The growth curves of *S. epidermidis* at 5 and 15°C were lower than those of *C. lipolytica*, *P. fluorescens* and a mixture of all three.

(2) pH: The pH values in the seafood homogenate inoculated with *C. lipolytica*, *P. fluorescens* and a mixture of all three increased with temperature and duration of incubation.

(3) TVB-N: Whereas the viable counts at 25°C of *C. lipolytica* were less than those of *P. fluorescens*, *S. epidermidis* and the mixture, the production of TVB-N by *C. lipolytica* was at almost the same levels as those of *P. fluorescens* and the mixture, and considerably more than that of *S. epidermidis*. The results of the previous and present experiments have thus confirmed that the yeasts produced the same spoilage phenomenon as the bacteria.

(Received June 20, 1988)

Key words: *Candida lipolytica*; *Staphylococcus epidermidis*; *Pseudomonas fluorescens*; 魚介類 seafood; pH 値 pH value; 増殖曲線 growth curve; 総揮発性塩基窒素 total volatile basic nitrogen (TVB-N); 生菌数 viable counts

緒 言

前報¹⁾において、魚介類から分離^{2), 3)}したタンパク質及

び脂肪分解能陽性酵母 *Candida lipolytica*, *C. sake*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon cutaneum*, *Tr. pullulans*⁴⁾ による腐敗実験¹⁾を行った結果、これらの酵母は揮発性塩基窒素を生成し、細菌と同様な腐敗現象を起こすことを報告^{1), 5)}した。

^{*1} 食品の腐敗に関する研究 (第 5 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

本報では、前報¹⁾の腐敗実験に用いた酵母5菌種の中で揮発性塩基窒素の生成量が最も多かった *C. lipolytica* と、細菌4菌種の中で生成量が最も多かった *P. fluorescens*、最も少なかった *S. epidermidis* の3菌種を滅菌魚介類ホモジネートに単独または混合接種し、5°、15°、25°で1週間保存した場合の生菌数、pH値、揮発性塩基窒素量を経日的に測定した。また混合接種1週間保存における各3菌種の生育状態を調べるとともに、混合接種3週間保存後の各菌種の生残菌数をも測定し、相互の関連性について検討した。

実験方法

1. 供試試料

市販の生鮮マサバ、冷凍ウシエビ（ブラックタイガーシュリンプ）、冷凍ムラサキイカを用いた。

2. 供試菌株

先に魚介類から分離²⁾、同定³⁾した下記の3菌種を用いた。

Candida lipolytica M-20-P-5 NHL 11027, *Pseudomonas fluorescens* S-1 NHL 11074, *Staphylococcus epidermidis* S-6 NHL 11076

3. 滅菌魚介類ホモジネートの調製

前報¹⁾と同様に調製した。滅菌ホモジネートの量は各50gとした。

4. 供試菌株の接種及び培養

前報¹⁾の実験方法4と同様な方法で *C. lipolytica*, *S. epidermidis*, *P. fluorescens* の接種菌液を調整した。 *C. lipolytica* は 5.0×10^4 /g, *S. epidermidis* は 3.6×10^4 /g, *P. fluorescens* は 3.2×10^4 /g の菌数でサバ、エビ、イカの3種滅菌ホモジネート（以下サバ、エビ、イカと略記）にそれぞれ単独で、あるいは3菌種を混合して（ 1.2×10^5 /g）接種し、滅菌スパーテルで無菌的に攪拌した後、5°、15°、25°で保存した。

すなわち単独接種は3菌種別、3種魚介類別、3種保存温度別に合計27種類の試料を7日間保存した。混合接種は3種魚介類別、3種保存温度別に、合計9種類の試料を3週間保存した。

5. 保存試料の採取

単独接種及び混合接種合計36種類の三角フラスコから無菌的に保存0, 2, 4, 7日目に各1gを生菌数測定用として、各2gを官能試験用及びpH測定用として、各3gを揮発性塩基窒素（以下VBNと略記）測定用として採取した。また混合接種の9種類の三角フラスコから保存3週間後に、各1gを生菌数測定用として採取した。

6. 生菌数測定

食品衛生検査指針（I）⁶⁾の生菌数測定法に準拠した。生菌数測定のための培地は、酵母用としてYM寒天培地（Difco）を、また細菌用として生菌数測定用標準寒天培地（栄研化学（株）製）を使用し、培養は酵母、細菌ともに25°、4日間とした。

混合接種試料の同一希釈段階の希釈液0.1mlを各々YM寒天平板と標準寒天平板に塗抹した。YM寒天平板上に出現した白色大型のコロニーを測定して *C. lipolytica* の生菌数とした。標準寒天平板上の *S. epidermidis* と *P. fluorescens* のコロニーを別々に測定した。このようにして測定した3菌種単独の各生菌数値を合計して混合接種による保存試料の総菌数値とした。

7. 汚染微生物確認試験

前報¹⁾と同様な方法で接種菌以外の汚染微生物の有無を確認した。

8. pHの測定

前報¹⁾と同様にガラス電極式pHメーターで測定した。

9. VBNの定量

前報¹⁾と同様にConwayの微量拡散法^{7), 8)}により定量した。

実験結果

1. 汚染微生物確認試験

一週間保存後の36種類、及び3週間保存後の9種類の試料には接種菌以外の汚染微生物は認められなかった。

2. 対照実験

サバ、エビ、イカの対照VBN値はそれぞれ9.1, 12.1, 9.7 mg-N/100g、対照pH値はそれぞれpH 5.7, pH 6.8, pH 6.6であった。これらの値は5°、15°、25°保存の7日後においてもほとんど変化しなかった。

3. *Candida lipolytica* NHL 11027 単独接種

本菌をサバ、エビ、イカに接種し、5°、15°、25°で7日間保存した場合のVBN値をFig. 1, Aに、pH値をFig. 1, Bに、増殖曲線をFig. 1, Cに示した。

VBN: サバにおける5°保存7日目のVBN値は、初期腐敗値の目安とされている30 mg-N/100gをやや上回り、32.7 mg-N/サバ100gとなった。15°保存では4日目に37.5 mg-N/サバ100g、7日目には初期腐敗値をはるかに越え149.3 mg-N/サバ100gとなった。25°保存におけるVBN値は経日的に著しく増加し、2, 4, 7日目でそれぞれ32.7, 112.0, 260.0 mg-N/サバ100gと高い値を示した。サバ、エビ、イカの魚種別によるVBN値は近似していた。

pH: 5°保存ではほとんど変化しなかったが、15°及び25°保存におけるサバ、エビ、イカのpH値は経日的に上昇し、7日目にはpH 7.5~8.1となった。

増殖曲線: 5°、15°、25°保存で緩やかな曲線を示した。サバにおける5°保存2日目の酵母数は 2.5×10^5 cfu/g（以下cfu/gを略）、7日目には 3.4×10^6 となった。15°保存では、2, 4, 7日目でそれぞれ 1.6×10^6 , 1.3×10^7 , 5.7×10^7 と増加した。25°保存でも15°保存とほとんど同様な増殖曲線を示し、7日目にはほぼ定常期に達した。

Fig. 1. Time courses of yeast counts, pH values, and TVB-N values in 3 kinds of seafood samples inoculated with *C. lipolytica*, and incubated at 5, 15 and 25°C for up to 7 days.

A: TVB-N; B: pH values; C: yeast counts

4. *Staphylococcus epidermidis* NHL 11076 単独接種

本菌をサバ、エビ、イカに接種し、5°, 15°, 25°で7日間保存した場合のVBN値をFig. 2, Aに、pH値をFig. 2, Bに、増殖曲線をFig. 2, Cに示した。

VBN: 5°及び15°保存におけるサバ、エビ、イカのVBN値は極めて低く、いずれも初期腐敗値以下であった。25°保存ではエビのVBN値が経日的に増加した。腐敗エビから分離した本菌によるVBN生成値は、サバ及びイカよりはエビでやや高い値を示した。

pH: 5°と15°保存では変化しなかった。25°保存ではエビとイカのpH値が経日的に上昇し、7日目にはpH 7.9~8.0となったが、サバではやや下降した。

増殖曲線: 5°保存では接種菌は増殖しなかったが、

15°保存では7日目に 10^8 となった。25°保存では、2日目に定常期に達した。生菌数はエビで最も多く、イカ、サバの順であった。

5. *Pseudomonas fluorescens* NHL 11074 単独接種

本菌をサバ、エビ、イカに接種し、5°, 15°, 25°で7日間保存した場合のVBN値をFig. 3, Aに、pH値をFig. 3, Bに、増殖曲線をFig. 3, Cに示した。

VBN: サバにおける5°保存7日目のVBN値は65.3 mg-N/サバ100 gであった。15°保存では経日的に漸次増加し、25°保存では、2, 4, 7日目でそれぞれ74.5, 174.7, 283.3 mg-N/サバ100 gと著しく増加した。

pH: 5°保存ではわずかに上昇した。15°及び25°保存におけるサバ、エビ、イカのpH値は経日的に上昇し、7日目にはpH 8.0~8.5となった。

Fig. 2. Time courses of bacterial counts, pH values, and TVB-N values in 3 kinds of seafood samples inoculated with *S. epidermidis*, and incubated at 5, 15 and 25°C for up to 7 days. A: TVB-N; B: pH values; C: bacterial counts

増殖曲線: 5°保存では7日目に 10^8 となった。15°及び25°保存では増殖が速く、2日目に定常期に達した。腐敗サバから分離した本菌の生菌数は、エビとイカよりはサバにおいてやや高い値を示した。

6. *C. lipolytica*, *S. epidermidis*, *P. fluorescens* 混合接種

3菌種を混合してサバ、エビ、イカに接種し、5°、15°、25°で7日間保存した場合のVBN値をFig. 4, Aに、pH値をFig. 4, Bに、総菌数による増殖曲線をFig. 4, Cに、また各3菌種別の増殖曲線をFig. 5に示した。

VBN: サバにおける5°保存7日目のVBN値は46.7 mg-N/サバ100gであった。15°保存では経日的に暫時増加し、25°保存では2, 4, 7日目でそれぞれ37.5, 116.7, 229.0 mg-N/サバ100gと著しく増加した。

pH: 5°保存ではわずかに上昇した。15°及び25°保存におけるサバ、エビ、イカのpH値は経日的に上昇し、7日目はpH 7.7~8.3となった。

総菌数による増殖曲線: 5°、15°、25°保存における各増殖曲線は、*P. fluorescens* 単独接種のそれらと類似していた。

3菌種別の増殖曲線: 混合接種、1週間保存における各3菌種別の増殖曲線のうち、5°、15°、25°保存での*C. lipolytica*の増殖曲線(Fig. 5, E)は、Fig. 1, Cに示した*C. lipolytica*単独接種の増殖曲線と類似しており、また*P. fluorescens*の増殖曲線(Fig. 5, D)は、Fig. 3, Cに示した*P. fluorescens*単独接種の増殖曲線と類似していた。しかし、*S. epidermidis*の増殖曲線(Fig. 5, F)は25°保存では、Fig. 2, Cに示した*S. epidermidis*単独接種の

Fig. 3. Time courses of bacterial counts, pH values, and TVB-N values in 3 kinds of seafood samples inoculated with *P. fluorescens*, and incubated at 5, 15 and 25°C for up to 7 days. A: TVB-N; B: pH values; C: bacterial counts

増殖曲線よりは2オーダー減少し、7日目には *S. epidermidis* は死滅した。

7. 混合接種3週間保存後の各菌種の消長

混合接種3週間保存後の5°, 15°, 25°における各菌種の増殖曲線をFig. 6に示した。

C. lipolytica の生残性が最も高く、5°, 15°及び25°保存のサバ、エビ、イカでは本菌の定常期の菌数(10⁷~10⁸)のままで生残していた。しかし *P. fluorescens* は5°, 15°, 25°と保存温度が高くなるに従って生残菌数は減少した。

考 察

酵母 *C. lipolytica* 及び細菌 *P. fluorescens*, *S. epidermidis* 単独接種の初発菌数は3菌種とも10⁴のオーダーであったが、*C. lipolytica* の細胞⁹⁾ (2~4.5 µ×4~22 µ)

は大きく、増殖速度が遅いため、25°保存、2日目の生菌数(10⁶/g)は、細菌より2~3オーダーも低かった。しかし、各3菌種により生成されるVBN量を同条件で比較すると、酵母による生成量は、細菌によるそれらより少ない量とはならなかった。また、*C. lipolytica* の生育は遅いが、急速に生育する *P. fluorescens* と同様に保存日数の短い時点で、すなわち25°保存では2日目、15°保存では4日目には初期腐敗値を越えた。

酵母 *C. lipolytica* は世代時間¹⁰⁾ (約90~120分) が長いため細菌とは異なった緩やかな増殖曲線を示した。酵母または細菌の増殖曲線と、それに対応するVBN曲線を3菌種間(25°保存)で比較してみると、まず、細菌 *P. fluorescens* と *S. epidermidis* 2菌種間では、両者(Fig. 3, C; Fig. 2, C)の増殖曲線は類似しているにもかかわらず

Fig. 4. Time courses of total counts, pH values, and TVB-N values in 3 kinds of seafood samples inoculated with a mixture containing *C. lipolytica*, *S. epidermidis* and *P. fluorescens*, and incubated at 5, 15 and 25°C for up to 7 days.

A: TVB-N; B: pH values; C: total counts

ず、VBNの生成量は前者 (Fig. 3, A) の方が後者 (Fig. 2, A) よりは著しく多かった。次に酵母 *C. lipolytica* と細菌 *S. epidermidis* 2 菌種間では、増殖曲線の傾斜は前者 (Fig. 1, C) の方が、後者 (Fig. 2, C) よりは緩やかであったが、VBN 生成量は前者 (Fig. 1, A) の方が後者 (Fig. 2, A) より極めて多かった。また、酵母 *C. lipolytica* と細菌 *P. fluorescens* 2 菌種間では、増殖曲線の傾斜は前者 (Fig. 1, C) の方が後者 (Fig. 3, C) より緩やかであったが、両者 (Fig. 1, A; Fig. 3, A) の VBN 曲線はほぼ類似していた。このように酵母数または細菌数の増加と VBN 生成量との間には必ずしも比例関係は成立しなかった。

C. lipolytica, *P. fluorescens*, *S. epidermidis* 3 菌種の混合接種 1 週間保存における各 3 菌種別の生育状態をみ

ると、優勢菌種である *C. lipolytica* (Fig. 5, E) と *P. fluorescens* (Fig. 5, D) は、相互の生育に影響されことなく個々に増殖したが、*S. epidermidis* (Fig. 5, F) は 7 日目には死滅した。酵母と細菌 3 菌種の混合接種による VBN 曲線 (Fig. 4, A) は、酵母 *C. lipolytica* (Fig. 1, A) または細菌 *P. fluorescens* (Fig. 3, A) の単独接種時の VBN 曲線と類似していた。この結果は 3 菌種の細菌 *Pseudomonas schulkilliensis*, *Micrococcus nitrificans*, 連鎖状乳酸球菌の混合培養における VBN 曲線が、優勢菌種である *P. schulkilliensis* 単独培養時の VBN 曲線と類似していたという中島¹¹⁾の結果と同様であった。

要 約

酵母 *C. lipolytica* 及び細菌 *S. epidermidis*, *P. fluo-*

Fig. 5. Individual yeast and bacterial counts in 3 kinds of seafood samples inoculated with a mixture containing *C. lipolytica*, *S. epidermidis* and *P. fluorescens*, incubated at 5, 15 and 25°C for up to 7 days
These growth curves correspond with the total counts as in Fig. 4.

Fig. 6. Individual yeast and bacterial counts in 3 kinds of seafood samples inoculated with a mixture containing *C. lipolytica*, *S. epidermidis* and *P. fluorescens*, and incubated at 5, 15 and 25°C for 3 weeks
Viable counts after incubation for 3 weeks as in Fig. 5.
▨ *C. lipolytica*; ▤ *P. fluorescens*

rescens の3菌種をサバ、エビ、イカの3種滅菌ホモジネートに単独または混合接種し、それぞれ5°, 15°, 25°で保存した場合の生菌数, VBN 値, pH 値を保存0, 2, 4, 7日目に測定した。また、混合接種3週間保存後における各菌種の生残菌数を測定した。

1. *S. epidermidis* 単独接種の25°保存, 2日目の生菌数は著しく増加し, 10^8 cfu/g となったが, VBN 値は極めて低く初期腐敗値以下であった。本菌は被験3菌種の中では最も腐敗力の弱い菌種であった。

2. *P. fluorescens* をサバに接種し, 5°, 15°, 25°で7日間保存した場合の VBN 値は, それぞれ 65.3, 158.7, 283.3 mg-N/サバ 100 g であり, *C. lipolytica* よりやや高く, *S. epidermidis* よりは著しく高い値を示した。

3. *C. lipolytica* 単独接種の増殖曲線は細菌のそれらとは異なり, 緩やかな曲線を示した。本菌をサバに単独接種し, 5°, 15°, 25°で7日間保存した場合の VBN 値は, それぞれ 32.7, 149.3, 260.0 mg-N/サバ 100 g であり *P. fluorescens* よりやや低かったが, *S. epidermidis* よりは著しく高い値を示した。

4. 酵母と細菌の単独接種における生菌数測定値, VBN 値, pH 値は保存温度の上昇, 及び保存日数の経過に伴って増加した。VBN 曲線と pH 曲線の間には, ほぼ比例的な関係が認められたが, 増殖曲線と VBN 曲線との間には必ずしも比例関係は認められなかった。

5. 酵母と細菌3菌種の混合接種1週間保存における各菌種別の増殖状態は, 酵母 *C. lipolytica* と細菌 *P. fluorescens* が, 相互の生育に影響されることなく優勢に

増殖し, 細菌 *S. epidermidis* は7日目には死滅した。

6. 酵母と細菌3菌種の混合接種3週間保存後の各菌種の生残性は, 酵母 *C. lipolytica* が最も高く, 5°, 15°, 25°のいずれの保存温度においても定常期の菌数を保持していた。これに対し, *P. fluorescens* は5°, 15°, 25°と保存温度が高くなるに従って生残菌数は減少した。

文 献

- 1) 小島満子, 外海泰秀, 小林加代子, 伊藤誉志男: 食衛誌. **28**, 19~29 (1987).
- 2) 小島満子, 倉田 浩: 同上 **21**, 197~206 (1980).
- 3) 小島満子, 倉田 浩: 同上 **24**, 525~531 (1983).
- 4) 小島満子, 倉田 浩: 同上 **24**, 532~539 (1983).
- 5) 小島満子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: 同上 **28**, 30~35 (1987).
- 6) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針”(I) p. 103~106 (1973), 日本食品衛生協会.
- 7) 外海泰秀, 伊藤誉志男, 原田基夫: 食衛誌. **25**, 149~157 (1984).
- 8) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針”(II) p. 204~213 (1978) 日本食品衛生協会.
- 9) Kreger-van Rij, N. J. W., ed.: “The Yeasts, A taxonomic Study,” 3rd ed., p. 406~408 (1984), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- 10) Phaff, H. J., Miller, M. W., Mark, E. M.: “The Life of Yeasts” 2nd ed., p. 52~58 (1978), Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts and London, England.
- 11) 中島正博: 腐研報. **2**, 4~35 (1949).