魚醬油細菌の生理的性質に就て*

(昭和 23 年 12 月 9 日受理)

天 野 慶 之 ・ 佐 藤 健

(水 産 試 験 場)

Bacteriological Examination of Fish Sauce

K. AMANO and T. SATO

SYNOPSIS

A bacteriological test was undertaken to the fish sauce which was processed from the waste products of fish loaf manufacture (viscera, flakes and bones of fish) by hydrolyzing, HCl used.

In three samples tested, bacteria organisms in 12 strains were isolated, all of them, belonging to Micrococci, and Gram positive, measured 0.5 to 1.4 microns. The optimum temperature of the growth was about 30°C (86°F) and survived the maximum temperature, 37°C (98.6°F); they resist to the NaCl solution, having 15 to 20 % in concentration; bacteria succumb in the media with PH value below 5.0; no gelatin is liquefied by any of the strains observed. Nitrate is favorably reduced to nitrite and sometimes converted into nitrogen form; ammonium sulfate is also utilized by them, but no ammonia, hydrogen sulfide and indol are produced from peptone water. Carbohydrates are slightly consumed.

The 8 strains of them are nearly related to *Micrococcus nitrificans*, it was disclosed.

魚醬油の類は最近の調味料事情から、かなり製造されているやうであるが、一般に貯蔵性に乏しい欠点があり、これが原因は微生物中、主として bacteria に因るものと想像されるが、その実際に就ては、あまり調べられてゐないし、変敗の状況も、必ずしも單純ではなからうと思ふ。それは製造法が區々であつて、1) 單に生原料に食塩を加へ、塩辛様のものを作り、熟成期間を経て、これを圧搾濾過する「ショツツル」(秋田)、「エシル」(石川)の如き在來のものもあり、2) 煮乾品、搾粕等の製造の際、副産する煮汁を濃縮し、食塩を加へて加熱濾過した製品もあり、3) 罐詰、煉製品の廃棄部分を加水分解してアミノ酸製造と同様な手法で製品としているものもあり、4) 場合によつては、加熱濾過の際、醬油粕等を混和して一般醬油の擬似製品をつくる場合もある次第で、必ずしも組成は近似でないからである。しかし、製造工程に於て、加熱若くは酸分解等の滅菌的操作があるからして、変敗を起す微生物は製了後の第二次的汚染によつて發育すると考へられるから、それらは一應魚醬油に特有な微生物として扱つてよいであらう。仍て筆者らは製造操作の間に確実に滅菌操作の加はる事と原料が魚類のみであることから、煉製品廃棄物の塩酸分解液を選び、その中の微生物群をしらべたので、主としてその

* 水産試験場業績 第 109 号 (1948)

昭和 22 年 11 月 1 日日本水産学会 15 週年記念大会にて講演。

生理的性質を述べる。既往の文献としては生原料に食塩を混入して自然熟成を行つた佛印の Nuoc Mam については L. Boez & J. Guillermin (1930)¹⁾、塩醬品の微生物については半沢・佐々木・中根 (1941~43)²⁾、鮭鱈内臓の自家消化液汁については谷川・松浦 (1944)³⁾ の報告があり、夫々特有の菌株を分離してゐる。

I. 試料及実験方法

1.) 実験材料

昭和 22 年 6 月 15~18 日、東京煉製品協同組合製造による 3 種の提供を受け、細菌の分離は 7 月 4 日に行つた。試料は蒲鉾製造の廃棄物を塩酸分解し、曹達灰で中和した半製品である。

第 1 表 実験材料の分析結果

原 料	全 窒 素	揮 発 性 窒 素	食 塩	pH
	%	mg %	%	
ナ メ タ カ レ イ	1.65	397	5.3	4.6
サ バ	2.10	363	10.8	6.0
サバ・カレイ混合物	1.50	373	11.0	5.2

2) 細菌分離方法

原液 1 c.c. を滅菌ピペットで採取し、無菌蒸溜水中に 10 倍稀釈を反覆し、その各々の 1 c.c. を中性寒天平板、10% 食塩寒天平板に培養し、1000 倍稀釈の試料の平板発育せる集落から形状の略同一菌群と認められ、且つ多数存在するものより、順次番号を附し、1~12 を得て、更に純粋培養を反覆して、実験用菌株とした。

II. 実験結果

1) 魚醬油中の生菌数

原液 1 c.c. 中の生菌数は、次の如くで、若干食塩寒天平板に多く現れる結果を示した。(第 2 表)

第 2 表

原 料	中 性 寒 天	10 % 食 塩 寒 天
ナ メ タ	1,000	1,500
サ バ	170,000	230,000
サバ・カレイ	140,000	160,000

2) 魚醬油放置中の揮発性窒素量

約 500 c.c. 容の硝子壺に各試料を入れ、室温に放置中。その揮発性窒素量をしらべた結果は次の如くである。(括弧内は pH を示す)。

- 1) L. Boez & J. Guillermin: Archives des Instituts Pasteur d'Indochine. Tome 3, No. 11, 17~21, 1930.
- 2) 半沢 洵・佐々木西二・中根正行・醸学, 19, 1~17, 1941; 20, 523~540, 1942, 21, 733~739, 1943.
- 3) 谷川英一・松浦 寛・日水学, 12, 6, 187~191, 1944.

第 5 表

原 料	即 日	7 日 後	21 日 後
ナ メ タ カ レ イ	397(4.6)	397(4.6)	402(4.6)
サ バ	363(6.0)	365(6.0)	360(6.2)
サ バ ・ カ レ イ	373(5.2)	376(5.2)	366(5.8)

この結果と、上の生菌数とから、実験に供するまでの製造後約 20 日間のあいだに、細菌が 1 c.c. 中 10~20 万程度増殖した事実が、魚醬油中のどの部分を消費した結果であるか、興味ある点なので、生理的性質は、主として窒素形態の利用状況を目標に行ふこととした。

3) 分離菌株の形態及び性狀

第 4 表

菌 株 番 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
菌 体 の 大 さ <small>ミク ロン</small>	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5~ 0.8	1.0~ 1.2	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	1.4
排 列	單在, 連鎖, 集合	單在, 連鎖, 集合	單在, 連鎖, 集合	單在	4個 集合	單在, 連鎖, 集合	單在, 連鎖, 集合	單在, 連鎖, 集合	2個 集合	集合	連鎖, 集合	連鎖, 集合
グ ラ ム 染 色	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
中 性 寒 天 斜 面	汚乳白	汚乳白	乳白	薄白	微黃	橙	乳白	汚乳白	橙	黃	橙	橙
馬 鈴 薯 斜 面	乳白	乳白	乳白	乳白	微黃	微褐	乳白	褐	微褐	鮮黃	微褐	褐
ゼ ラ チ ン 液 化	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
H ₂ S 産 生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
b. c. p. 寒 天 着 色	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+

表でわかるやうに、分離菌株は全部球状菌であつて、グラム陽性であり、ゼラチンを液化しない。寒天平板上の集落は、円型、表面は凸円状に隆起するものが多く、且つ平滑であり、周縁は4号菌株が侵蝕状であるの外は、全縁であり、内部まで均質である。

菌株番号中、1~3 は、3 試料に共通であり、且つ最も多数出現し、4~12 は主としてサバ及びサバ・カレイ混合の試料から得たものである。

4) 分離菌株の耐塩性

中性寒天に食塩を 15, 20, 25 % 宛加へた培地に各菌株を一白金耳接種し平板培養を行つた結果は次の通りである。(観察 96 時間) - は全く無発育のものを示す。

第 5 表

[illegible]

5) 分離菌株の耐酸性

中性ブイヨンに、HCl 及び CH_3COOH を夫々加へて、pH を 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0 とし、之を滅菌後、直接各菌株を白金耳接種し、濁濁の有無を検してその耐酸性の指標とした。(第6表)

(上段は HCl, 下段は CH_3COOH を示す)

第 6 表

菌 株 番 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
発育可能な最低 pH	5.5	5.5	5.5	5.0	5.5	5.5	5.5	5.5	5.0	5.5	5.5	5.5
	5.0	5.0	5.0	5.0	5.5	5.0	5.0	5.5	5.0	5.0	5.0	5.5

6) 炭水化物醗酵

1.0% の中性 Witte peptone 水に、各 0.5% の糖類を添加して常法に依り、醗酵試験を行つた結果は次表の通りである。(空欄は培養前の pH 7.0 と殆ど変化のないことを意味する。+ は瓦斯産生を示す。)

第 7 表

菌 株 番 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Glycerin		6.6		+5.6								
Glucose	6.4	5.8	6.4	+4.6			5.6		5.4	5.2	5.0	5.8
Galatose	6.4	6.0	6.6	+5.2			5.8		5.8	6.0	4.8	5.2
Lactose		6.0	6.4				6.0		5.8		4.8	5.8
Mannose	6.6	5.6	6.0				5.8			6.4	5.0	5.6
Rhamnose												
Saccharose	6.4	6.4					6.2		5.6	6.4	4.8	
Mannit		6.6					6.4		6.4		5.2	
Starch									6.6		5.0	

7) 分離菌株の窒素利用状況

i) NH_3 の生成

A) peptone 水 (1%) より NH_3 の生成、1% peptone 水 (Witte) を用ふ。

B) NaNO_2 より NH_3 の生成

NaNO_2 を 0.2% 含む 1% peptone 水を用ふ。夫々 30°C 96 時間培養後、Nessler 試薬で NH_3 を定性する。

ii) NO_2 の生成及消費

A) KNO_3 より NO_2 の生成は、 KNO_3 0.2% を含む 1% peptone 水を用ふ。

B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ より NO_2 の生成は, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g, glucose 1.0 g, MgSO_4 1.0 g, NaCl 4.0 g, KH_2PO_4 2.0 g を水 1000 c.c. に溶解滅菌したものを用ふ。

C) NaNO_2 より NO_2 の消費

NaNO_2 0.2 % を含む 1 % peptone 水を用ふ。 NO_2 の定性は Gries 試薬に依る。培養条件は i) と同じ。A) B) では NO_2 反應の現れたものを+とし, C) は NO_2 反應の消失した場合を+とした。

iii) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ より NO_3 の成生

ii) の B と同じ培地に就き生成せる NO_3 を亜鉛末で還元したのち NO_2 を Gries 試薬で定性する。培養条件は i) と同じ。

第 8 表 分離菌株の窒素利用状況

菌株番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Peptone より NH_3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO_2 より NH_3	-	-	-	-	-	-*	-	-*	-	-	-	-
NO_3 より NO_2	++	++	-	++	+	-	+	-	+	+	++	++
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ より NO_2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ より NO_3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO_2 消費	±	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

* 印は培養中発泡を示したものであり、恐く N 瓦斯と想像する。なほ peptone より Indol は形成しない。

III. 考察

分離菌株は一般に、ゼラチン液化力、 H_2S 、Indol 形成力を欠如しているところから、あまり蛋白分解的ではなく、有機態窒素の利用力が鈍いのではないかと考へられる。ペプトンよりアンモニアを形成しない点からも、さう思はれる。その反面、硝酸塩、アンモニア塩の利用力は強く、この両塩から 1, 2 号菌株は亜硝酸を形成する。1 号菌株は、純粹培養を反覆しない以前では、硝酸態から亜硝酸態を経て窒素を遊離させるまで作用したが、純粹培養中、この力が衰へたのは、或は 6, 8 号菌株の如き NO_2 消費性の菌株が混在したのかも知れない。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ から NO_3 を形成する菌株はなかつたが、 KN O_3 及び $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ から夫々 NO_2 を形成し得る菌株 1, 2 号は甚だ興味深い。

試料の魚醬油中の揮発性窒素が放置中あまり増大しない事実と、生菌数が比較的多数である事実とは、発育菌群が既にアンモニア態となつた無機窒素を利用して増殖したとすれば、調和し得る事柄であらう。事実、約 3 ケ月放置後 (10 月 20 日) の試料ナメタカレイは 100 以下/c.c. サバカレイは 350, 000/c.c. の生菌数であり変化はないのである。

耐酸性、耐塩性から見ても亜硝酸産生力の強い菌株が、塩酸分解後の試料中に選択的に増殖したものであらう。揮発性窒素量の多い事は、イカナゴ醬油りの 976 mg. % と云ふ数字もあり、煉製品廃棄物自身、揮発性窒素量が多い事も十分考へられる。

4) 山下(齋木)利得：大正 12 年度大分縣水試業務報告、大正 14 年 1 月。

分離菌株の帰属は、球菌である点、一應考へ得られる *Staphylococcus* とはゼラチン液化の点に於て、*Gaffkya* とは硝酸塩還元、インドール産生、馬鈴薯培地発育の点に於て、*Sarcina* とは硝酸塩還元、インドール産生、馬鈴薯培地、硫化水素産生の点より、區別せられ、恐らく *Micrococcus* に分類することが至当と思はれる。12 株の中、主要菌株である 1, 2 号菌株は 3, 7 号と共に、*Micrococcus nitrificans* に最も近縁と考へられる。9, 10, 11, 12 号は菌苔の色沢の点で異なるが、生理的性質は大差なく、之に準ず可きものであらう。5 号菌株は糖酸酵に於て上記菌群と顯著に異り、*Mic. ochraceus* に似た点があるが硝酸塩還元力の点で相違する。4 号菌株は特に Glycerin, Glucose, Galactose より瓦斯産生を営み、分離菌株中では特殊である。*Mic. epimetheus* に類似の点もあるが、アンモニア産生、インドール産生の点で異なる。4, 5 号菌株は更に詳細な実験を経た上で決定したい。6, 8 号菌株は、*Mic. cereus* に稍近似であるが、8 号は寒天、馬鈴薯上の集落に相違が見られる。半沢・佐々木・中根によると、各種塩辛から *Bac. subtilis* 群、*Vibrio*, *Escherichia*, *Achromobacter* 等と共に *Micrococcus* を検出し、*Mic. conglomeratus* 外 2 種で、蛋白分解に関與する菌型であるし、谷川・松浦も同じく *conglomeratus* を純粹培養的に分離してゐる。これらは塩辛、魚醬油の熟成に関係ある菌群であらう。筆者らの場合は、酸分解試料であるために、このやうな蛋白分解的菌種の増殖する余地は少かつたものと思はれる。従つて実験の範圍では、直接魚醬油の変敗とは関係薄い菌型と云つてよいであらう。

IV. 要 約

1. 煉製品廃棄物から塩酸分解法によつて製造した魚醬油に就て、その bacteria の組成をしらべ、*Micrococcus* に属する球菌 12 菌株を得た。
2. 12 菌株株、8 菌株は一二の相違点を除けば *Micrococcus nitrificans* に類似であつた。
3. 本菌群は蛋白分解力に乏しく、peptone より、 NH_3 の生産力低く、 NO_3 態、 NH_3 態の窒素を主として利用する点から見て、魚醬油中の有機態窒素を消費する機会は少いものと想像される。
4. 12 菌株中、7 菌株は 20% NaCl 含有培地に発育可能であり、耐塩性細菌と認め得られる。

本実験中、有力な御助言を與へられた右田・鉄本両博士、並に発表の際適切な御注意を賜つた大島博士に感謝の意を表する。