スルメイカ塩辛の菌相特性に及ぼすトリメチル アミノキシドの影響

西村 昌彦, 信濃 晴雄

(1990 年 11 月 27 日受付)

The Effect of Trimethylamine-N-Oxide on Microbial Flora in "Ika-Shiokara"

Masahiko Nishimura^{*1,2} and Haruo Shinano^{*1}

Since no means of sterilization is used throughout the manufacturing process of the salted and ripened squid meat product "Ika-Shiokara," the quality of the product depends on its associated microbial flora. In the early stage of "Ika-Shiokara" ripening using 10% salts, viable bacteria occurred at a level of about 10⁶/ml of fluid, and then increased gradually with time. The dominant species of bacteria in "Ika-Shiokara" was *Staphylococcus epidermidis*, but *Staphylococcus aureus* which closely resembles *S. epidermidis* in many respects was not detected in all the stages of ripening process. The result suggests that growth of *S. aureus* was inhibited by some component of "Ika-Shiokara". We paid attention to trimethylamine-N-oxide (TMAO) and trimethylamine (TMA) which were the characteristic components derived from squid meat. A high amount of TMAO (500-600 mg/100 ml) was detected in raw squid and in the early ripening process of "Ika-Shiokara", and it inhibited the growth of *S. aureus* at this level of concentration but not of *S. epidermidis* in the nutrient broth.

イカ塩辛は、その基本的原材料としてイカ胴肉、肝臓及び食塩を混和し、殺菌処理を行うことなく保存熟成させた水産発酵食品である。一般的には肝臓あるいはイカ肉中の自己消化酵素によるタンパク質の分解によって旨味が付与されるが、高濃度の食塩の添加により保蔵性を高めるとともに、熟成過程において淘汰されずに生残した微生物の作用により特有な風味が醸成されることも無視し得ないと考えられる。¹⁾ 従来、イカ塩辛に関する研究は、その独特の風味形成に関与する酵素化学的研究に重点がおかれていたが、²⁾ 森らは、微生物生態学の立場からイカ塩辛の熟成機構について検討を行い、³⁾ 原材料由来の通性嫌気性、グラム陽性球菌である *Staphylococcus* 属が優勢種となることを明らかにしている。また、食塩濃度の異なるイカ塩辛の菌相についても観察を行っているが、何れの場合も優勢種は *Staphylococcus* 属で、しかも分離同定した供試菌の全てが *S. epidermidis* で、*S. aureus* は検出されないことを報告している。*S. aureus* は、*S. epidermidis* よりも高い食塩耐性を持ち、分類学的に見ても *S. epidermidis* との間に高い類似性を持つ食中毒菌である。このように、イカ塩辛から分離し同定

した *Staphylococci* は、その全てが *S. epidermidis* で *S. aureus* を全く検出し得なかったと言う事実は、製造学的な立場で発酵食品中の優勢種の形成される理由を明らかにしようとする場合、極めて興味深いものであり、さらに食品衛生学的視点からもその原因についての究明が必要と考えられる。

本論文では、イカ塩辛の熟成過程において *S. epidermidis* が優勢となるにもかかわらず、これと同属異種の食中毒原因菌である *S. aureus* が全く検出されないというイカ塩辛の菌相の特性をイカ塩辛液汁中に大量に依存するエキス成分、トリメチルアミノキシド (以下 TMAO とする)⁴⁾ と関連させて検討し、二三の新しい知見を得たので以下に報告する。

実験方法

供試イカ塩辛の作製法 供試イカ塩辛は函館地方において“普通作り”と称される製法に準じて実験室内で作製した。すなわち、スルメイカ *Todarodes pacificus* の胴肉を水洗後、1% 食塩水に 10 分間浸漬し取出して十分に水切り細切後、食塩および肝臓内容物を添加混合し 1/

^{*1} 北海道大学水産学部食品製造学教室 (Laboratory of Food Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

^{*2} 現住所、東京大学海洋研究所海洋微生物部門 (Ocean Research Institute, University of Tokyo, Minamidai, Nakano, Tokyo 164, Japan).

容広口瓶に密閉し 25°C で保存熟成を行った。食塩添加量は細切肉重量に対して 10%, 肝臓量は 5% とした。仕込み後は毎日 2~3 回十分に攪拌を行い熟成をはかった。

好気性細菌数の測定法および同定法 仕込み後一定時間毎に遊離液汁を採取し 3% 食塩加標準寒天培地を用いて混積培養を行い (30°C, 2~3 日間) 菌数を測定した。また, 細菌の分離に当っては最適希釈平板からそれぞれ一定区画内の全コロニーを鈎菌し, 熟成期間を通じて計 560 株を分離した。それら分離菌株を数回塗抹平板培養を繰り返した後に得た純粋培養供試菌について Berg-ey's Manual 第 8 版⁵⁾および Baird-Parker の方法⁶⁾に準拠して分類を行った。なお試験項目は以下に示すとおりである。

1) **形態学的性状**: 分離供試菌の標準寒天培地上における色調, 集落の形態, グラム染色標本による菌体の形状配列ならびに運動性 (懸滴標本) を観察した。

2) **カタラーゼ産生試験**: 標準寒天培地上の培養集落から採取した一白金耳の菌体をスライドガラス上の 3% 過酸化水素水と混和し, 発泡の有無により判定した。

3) **グルコース, マンニトールからの嫌氣的並びに好氣的酸生成試験**: Baird-Parker の法⁶⁾に準じて, バクトトリプトン 1.0%, 酵母エキス 0.1%, グルコースあるいはマンニトール 1.0%, プロモクレゾールパープル 0.004%, 寒天 0.2%, 塩化ナトリウム 0.5% の組成の培地 (pH 7.2) を用い, 供試菌を接種し, 37°C で 3 日間培養後酸生成の有無を観察した。なお嫌氣的条件下の培養においてはワセリンと流動パラフィンの 1:1 の混合物を培地上に重層した。

4) **コアグラゼ試験**: ウサギブラズマ 0.5 ml に新鮮培養菌の一白金耳量を接種し, 37°C の恒温器中に 3 時間納置後, 凝固状態を観察した。

Staphylococcus aureus の供試イカ塩辛への接種 標準寒天培地に前培養 (37°C, 48 h) した供試菌 *S. aureus* (広島衛研) を滅菌生理食塩水に懸濁し, 遠心分離による菌洗浄 (2 回) を行い再び滅菌生理食塩水に懸濁した。この濃厚菌液 (10^8 cells/ml) 1 ml を 300 g の供試イカ塩辛に接種し, 熟成期間中の総生菌数とその時の菌相からイカ塩辛中の *S. aureus* の菌数変化を計算して求めた。

TMAO およびトリメチルアミン (TMA) の定量 熟成過程中的イカ塩辛から経時的に液汁部分を採取し, 微量拡散法を応用した山形の方法⁷⁾を参照して TMAO および TMA を定量した。

S. epidermidis および S. aureus の増殖に及ぼす TMAO, TMA の影響 一般に細菌の TMAO 還元能の測定に用いられる Wood & Baird の培地,⁸⁾ バクトペプトン

0.5%, 硫酸マグネシウム 0.1%, リン酸水素二カリウム 0.1%, グルコース 0.25%, 塩化ナトリウム 0.5%, を基礎培地として, TMAO, TMA の添加はイカ塩辛の熟成過程における塩辛液汁中のそれぞれの含有量を考慮して TMAO は 0, 300, 500 および 600 mg/100 ml, TMA は 100, 200, 300 および 600 mg/100 ml とした。この供試培地にイカ塩辛から分離した *S. epidermidis* ならびに *S. aureus* (広島衛研) の 2 供試菌種を初発菌数が 10^4 cells/ml となるように接種して, 25°C で培養し経時的に生菌数を測定することにより供試菌の発育状態を調べた。

食塩存在下における S. epidermidis および S. aureus の増殖に及ぼす TMAO, TMA の影響 TMAO が供試 2 菌種の増殖に与える影響をみるために酵母エキスを 0.25% 添加し, 食塩濃度を塩辛液汁に相当する 9.0% に調製した Wood & Baird の改変培地に所定の濃度の TMAO を添加し, 滅菌後それぞれに供試菌を接種し 5 日間にわたりその増殖の程度を観察した。また, TMA についても同様であるがその濃度は前述同様 0~600 mg/100 ml までの 5 種類とした。また, 特に食塩濃度の影響を調べる場合には Wood & Baird の改変培地の TMAO 濃度を塩辛熟成初期に検出される濃度 500 mg/100 ml と固定し, 食塩を所定の濃度 (0.5, 4, 6, 8, 10%) に調製滅菌後, それぞれの培地に供試菌を接種し 5 日間にわたり増殖の程度をみた。なお, 培養温度はいずれも 25°C とした。

結果および考察

供試イカ塩辛の熟成過程中的生菌数は仕込み直後の 10^5 cells/ml から 2 日目以降対数的に増殖し食用最適の状態となった 8 日目では 10^8 cells/ml を越え, その後はほぼ一定の値を示した。また, 熟成期間を通じて得た計 560 株の分離菌株はその全てがグラム陽性, カタラーゼ陽性の好気性球菌で, いずれも運動性が認められず, グルコースの糖代謝様式の違いから 498 株が *Staphylococcus* 属, 62 株が *Micrococcus* 属と同定された。62 株の *Micrococcus* 属は仕込み直後 40% を占めたが, 熟成が進むにつれて徐々に減少し, 6 日目以降検出不可能となった。さらに, 498 株の *Staphylococcus* 属はマンニトールの代謝様式, コアグラゼの有無によりその全てが *S. epidermidis* と同定された。

供試イカ塩辛の熟成過程中的における液汁中の TMAO および TMA の変化を Fig. 1 に示した。塩辛仕込み直後から, 650 mg/100 ml という大量の TMAO が検出された。その後, 2 日目以降 15 日目までは急激に, 以後はゆるやかに減少する傾向がみられた。一方, TMA は熟成が進むにつれて徐々に増加し, 仕込み直後の 4 mg/100 ml から 30 日目で 230 mg/100 ml にまで達した。こ

Fig. 1. TMAO & TMA contents in the ripening process of "Ika-Shiokara" using 10% salt, and viable cell count of bacteria of the "Ika-Shiokara" inoculated with *S. aureus*.

●; TMAO, ○; TMA, ▲; *S. epidermidis*,
△; *S. aureus*

ここで、TMAO の減少量と TMA の増加量が一致しないのは、TMA の揮発性が高いことに起因するものと考えられる。また、初期における TMAO の減少と時期を同じくして、*S. epidermidis* が増殖するのに対し、人為的に接種した *S. aureus* は急激に死滅することから、TMAO は *S. epidermidis* の増殖には何ら影響を与えないが、*S. aureus* に対してはその増殖に抑制的に作用する可能性が考えられた。次に、TMAO を含む合成培地中で 2 種の菌を培養しこの点を確認することを試み、その結果を Fig. 2 に示した。この結果から、TMAO は 500~600 mg/100 ml の添加濃度で *S. aureus* の増殖を強く抑制する事が認められた。特に 600 mg/100 ml においては 3 日目迄に同菌の生菌数は 10^4 cells/ml から 10^3 cells/ml まで減少しその後は静菌的な効果を示した。一方、*S. epidermidis* に対しては、いずれの添加濃度 (300~600 mg/100 ml) においても TMAO による増殖抑制効果は認められなかった。次に Fig. 3 にそれぞれ *S. aureus* と *S. epidermidis* の増殖に及ぼす TMA の影響を調べた結果を示した。この結果からも明らかなように、TMA

Fig. 2. Effect of different concentrations of TMAO on the growth of *S. aureus* (A) and *S. epidermidis* (B).

●; CONTROL, ○; TMAO 300 mg/100 ml,
▲; TMAO 500 mg/100 ml, △; TMAO 600 mg/100 ml.

Fig. 3. Effect of different concentrations of TMA on the growth of *S. aureus* (A) and *S. epidermidis* (B).

●; TMA 100 mg/100 ml, ○; TMA 200 mg/100 ml,
▲; TMA 300 mg/100 ml, △; TMA 600 mg/100 ml.

Fig. 4. Effect of different concentrations of TMAO with 9.0% sodium chloride on the growth of *S. aureus* (A) and *S. epidermidis* (B).

●; CONTROL, ○; TMAO 300 mg/100 ml,
▲; TMAO 500 mg/100 ml, △; TMAO 600 mg/100 ml.

Fig. 5. Effect of different concentrations of TMA with 9.0% sodium chloride on the growth of *S. aureus* (A) and *S. epidermidis* (B).

●; TMA 100 mg/100 ml, ○; TMA 200 mg/100 ml,
▲; TMA 300 mg/100 ml, △; TMA 600 mg/100 ml.

Fig. 6. Effect of different concentrations of sodium chloride with TMAO 500 mg/100 ml, on the growth of *S. aureus* (A) and *S. epidermidis* (B).

●; NaCl 0.5%, ○; NaCl 4%, ▲; NaCl 6%, △; NaCl 8%,
□; NaCl 10% (TMAO 500 mg/100 ml).

はイカ塩辛熟成過程における濃度域 (100~300 mg/100 ml) においても、また、TMAO が *S. aureus* の増殖を強く抑制した濃度 600 mg/100 ml においても、2 種の供試菌の増殖に対しては何ら影響を与えなかった。

また、Fig. 4 に 9.0% 食塩存在下における *S. aureus*

および *S. epidermidis* の増殖に及ぼす TMAO の影響について調べた結果を示した。これからも明らかなように、対照では 3 日目にして 10^8 cells/ml にまで達したのに対して TMAO を 500 mg/100 ml あるいは 600 mg/100 ml 添加した場合には、5 日間でその生菌数は初発菌数

の $1/10^5$ 以下にまで減少し、低塩濃度の場合よりも強い増殖抑制効果が認められた。一方、*S. epidermidis* に対しては2日目までは僅かにその増殖が遅れたが、TMAO による増殖抑制効果は全く認められなかった。次に、Fig. 5 にそれぞれ *S. aureus* 及び *S. epidermidis* の増殖に及ぼす高塩濃度下における TMA の影響を示した。この結果からは、前述の低塩濃度の場合と同様に TMA は2菌種の増殖に対して何ら影響を与えないことが確認された。また、Fig. 6 は 500 mg/100 ml の TMAO 存在下における添加食塩量の影響について調べた結果を示したものである。これによると、食塩濃度 6.0% までは *S. aureus* の増殖は抑制し得ず、実際のイカ塩辛では 8.0% 以上の食塩濃度でなければ *S. aureus* の発育を阻止し得ないことが認められた。通常、*S. aureus* は 10% 食塩加寒天培地では明らかに発育し、15%でも弱いながら発育が認められるとされており、予備実験でも同様な結果を得ていることから、*S. aureus* の発育限界食塩濃度が 8.0% まで低下したのは 500 mg/100 ml の TMAO の存在によるものと考えられる。なお、本実験で採用した Wood & Baird 培地に 0.25% の酵母エキスを添加した改良培地では Fig. 6 に示したように低塩濃度域では *S. aureus* の増殖に対する静菌的效果は認められなかった。このことは、酵母エキスの添加により *S. aureus* の代謝活性が高まり 500 mg/100 ml の TMAO ではその増殖を阻止し得なくなったか、あるいは酵母エキス中の何らかの成分が TMAO の *S. aureus* に対する増殖阻害効果を減じているとも予想される。しかし、この場合でも高濃度の食塩 (8.0%) が共存することにより TMAO の *S. aureus* に対する増殖阻害効果は発揮され *S. aureus* の発育限界食塩量をより低く抑えているものと解釈し得る。従って、イカ塩辛の熟成過程においては TMAO と高濃度の食塩が共存する場合においてのみ *S. aureus* の増殖が抑制されると考える。一方、*S. epidermidis*

では Fig. 6 に示したように 500 mg/100 ml の TMAO 存在下で、0.5~10% までの何れの食塩濃度においても増殖抑制効果は認められなかった。

以上の結果から、イカ塩辛では *S. epidermidis* が優勢種となるにもかかわらず、*S. aureus* は検出されず、また、たとえ初期に多数存在したとしても熟成過程に検出し得ない状態にまで至るのは TMAO と食塩とが協同的に作用しているためと考えられる。しかし、このような協同的な効果が期待できないことが予想される最近のイカ塩辛の低塩化の傾向は、食品衛生学的視点からは十分注意する必要があると考えられる。

本研究ではイカ肉エキスの TMAO にのみ注目して実験を行ったが、他のエキス成分であるベタインやペプチド、あるいはイカ肝臓成分などのイカ塩辛中での優勢種形成に対する影響、さらには *S. aureus* に対する静菌又は殺菌的な作用の検討は今後に残された課題である。

文 献

- 1) 銭谷武平：九大農芸雑誌，12，247-253 (1952).
- 2) 木村喬久，長尾 清：水産学雑誌，54，21-24 (1949).
- 3) 森 勝美：日水誌，45，771-779 (1979).
- 4) 山田金次郎：日水誌，33，591-603 (1967).
- 5) R. E. Buchanan and N. E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1974, pp. 483-489.
- 6) A. C. Baird-Parker: Identification Methods for Microbiologists, Part A (ed. by B.M. Gibbs and F. A. Skinner), Academic Press, New York, 1966, pp. 59-64.
- 7) 山形 誠：水産生物化学・食品学実験書 (斎藤恒行，内山 均，梅本 滋，河端俊治 編)，恒星社厚生閣，東京，1974，pp. 281-286.
- 8) 坂崎利一：培地学各論 (1)，近代医学社，東京，1974，pp. 131-132.