

北海道産生中華麺（生ラーメン）の細菌学的特徴

長島浩二・山木一史・中野敦博・山木 携・川上 誠

Bacteriological Characterization of Raw Chinese Noodles
Produced in HokkaidoKoji NAGASHIMA, Kazufumi YAMAKI, Atsuhiko NAKANO,
Tazusa YAMAKI and Makoto KAWAKAMI

In order to improve the quality of raw Chinese noodles produced in Hokkaido, we researched the microflora in the food. Bacteria were isolated on an agar plate from the Chinese noodles after preservation, and identified on the basis of their nucleotide sequences of the 16S ribosomal RNA gene. Nine kinds of Chinese noodles produced by seven manufacturers in Hokkaido and one manufacturer outside of Hokkaido were preserved at 25°C for seven days and their microfloras were analyzed. As a result, these products were divided into two types; one type in which a species closely related to *A. viridans* is most predominant, and another type in which a kind of unknown gram-negative and rod bacteria is most predominant. Such differences of microflora in the Chinese noodles were inferred to be due to whether or not it contained vitamin B₂, saccharide or gardenia yellow as food-additives. When the representatives of the former and later types of noodles were preserved at 25°C for four weeks, predominant bacteria were a species closely related to *A. viridans* and alkaliphilic *Bacillus* sp. in the former, and the above mentioned gram-negative and rod bacteria and a species closely related to *Salinicoccus roseus* in the later.

生中華麺（生ラーメン）は北海道の主要工業製品の一つであり、北海道内において消費される他に本州方面へのお土産品、贈答品として流通している。このような流通の広域化により、その品質・保存性のより一層の向上が求められている。生中華麺の保存性に関しては幾つかの報告があるが^{1)~6)}、大部分は菌数変化を調べたものであり、菌相解析にまで踏み込んだ研究は少ない。一般に、生中華麺の保存期間中に増殖する細菌は乳酸菌が主であることが指摘されているが、最近の生中華麺には保存料を含む種々の添加物が加えられており、より詳細な検討が必要と考えられる。

近年の遺伝子解析技術の進展により、16SリボソームRNA遺伝子（16SrDNA）の塩基配列に基づいた細菌同定法が簡便法として一般に用いられてきている。この方

法は多数の細菌を短時間に同定することが可能であることから、菌相解析に適している。我々は以前から食品の菌相解析に本方法を用いており⁷⁾、今回、同様にして生中華麺の菌相解析を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料および細菌の分離

北海道内及び道外メーカーそれぞれ7社及び1社によって製造された市販生中華麺を25°Cで7日間保存し、その間に定法に従って食品の10%乳剤を調製、塗抹法によって細菌を分離した。使用した培地は、標準寒天培地および標準寒天培地に10%（終濃度）炭酸ナトリウムを添加したアルカリ培地である。培養は30°Cで行った。

2. 16SrDNA配列による近縁種の特定

寒天培地上に出現したコロニーから既報⁸⁾に従ってDNAを抽出した。これを鋳型としてPCRによって16SrDNAを増幅した後、その5'末端約300塩基の配列を決定した。得られた塩基配列をDNAデータベースと照合することで近縁種を特定した⁷⁾。照合結果は、塩基配列の相同性(%)で表示した。分離した菌株の塩基配列と90%以上の相同性をもつ菌株がデータベースに登録されていない場合は、その分離株を未知菌と表示した。また、データベースに塩基配列が登録されているが、生理生化学的性状による同定がなされていない菌株と相同性があった場合は、その分離株の近縁種は未同定菌と表示し、相同性(%)を示した。

3. その他の分析

pHは前記の10%乳剤の一部を用いて測定した。細菌の生理生化学試験はNCIMBジャパン(清水市)に依頼した。

実験結果及び考察

1. 生中華麺の菌相変化

生中華麺は通常冷蔵(5℃前後)で流通され、また、静菌剤としてエタノールを主成分とした酒精が添加されているので、菌の増殖はこの温度ではほとんど問題にならない。しかし、流通過程で一時的に、場合によっては長時間室温に曝されることが考えられる。そこで、北海道の代表的な生中華麺であるA社の市販麺を25℃で保存した場合の菌数と菌相の変化を調べた。0, 2, 7日目間保存した麺の菌数(CFU/g)は、標準寒天培地を用いた場合はそれぞれ $86, 1.4 \times 10^3$ および 4.9×10^4 、アルカリ培地の場合はそれぞれ $40, 3.7 \times 10^3$ および 7×10^3 であった。一方菌相を見ると、0日目では *Aerococcus viridans* や *Nesterenkonia* (旧名 *Micrococcus*) *halobius* 近縁菌、*Bacillus* 属菌(この中には好アルカリ性 *Bacillus* 近縁菌も存在した)及びその他幾種類かの細菌が主要菌種として存在したが、2, 7日目には *A. viridans* 近縁菌が優勢となった(表1)。これは、生中華麺の保存に伴って乳酸菌が増加するという従来の報告^{1) 4) 5) 6)}と一致する結果であった。

2. 各種市販生中華麺の保存後優勢菌種

生中華麺の添加物は各社各様であるが、これら麺の保存後優勢菌種がA社麺と同様なのかどうかを調べた。A社他製品を含む道内7社、道外1社製造の9種の生中華麺を25℃で7日間保存後、アルカリ培地を用いて菌を分離し菌相を解析した。A, B, C社麺の最優勢菌種は何れ

も *A. viridans* 近縁菌であった。道外メーカーD社の麺の場合は、*A. viridans* 近縁菌の他に *N. halobius* 近縁菌及び未同定菌が優勢菌種であった。E, F, G社麺では、互いに良く似た塩基配列を持つ菌株(相同性99%以上)

表1 A社生中華麺保存期間中の菌相変化

培地	保存日数	近縁菌種名	相同性(%)	コロニー数	
アルカリ培地	0	<i>Aerococcus viridans</i>	99	9	
		未同定菌1	94	6	
		未同定菌2	97	1	
		<i>Nesterenkonia halobius</i>	95	5	
		<i>Aerococcus viridans</i>	99	50	
	2	<i>Aerococcus viridans</i>	99	9	
	標準寒天培地	0	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	96	17
			未同定菌3	97	11
			<i>Staphylococcus sciuri</i>	98	2
			<i>Staphylococcus lentus</i>	99	3
<i>Bacillus pumilus</i>			97	2	
2		<i>Bacillus</i> sp.	98	2	
		<i>Streptomyces diastaticus</i>	98	1	
		<i>Streptomyces griseus</i>	99	1	
		<i>Leifsonia poae</i>	98	1	
		<i>Aerococcus viridans</i>	97	23	
7	<i>Bacillus pumilus</i>	98	2		
	<i>Leifsonia poae</i>	96	6		
	<i>Paenibacillus velasolus</i>	97	3		
7	<i>Aerococcus viridans</i>	98	49		

表2 各種生中華麺の保存後優勢菌種

メーカー	近縁菌種名	相同性(%)	コロニー数
A社製品1	表1参照		
A社製品2	<i>Aerococcus viridans</i>	99	12
	<i>Aerococcus</i> sp.	100	1
B社	<i>Janibacter limosus</i>	98	1
	<i>Aerococcus viridans</i>	99	15
	<i>Methylomicrobium</i> sp.*	92	4
	未同定菌4*	100	1
	未同定菌5*	93	3
C社	<i>Bacillus</i> sp.*	99	2
	未知菌1*		1
	<i>Aerococcus viridans</i>	99	18
D社	<i>Corynebacterium</i> spp.*	95~100	6
	<i>Aerococcus viridans</i>	99	6
	<i>Nesterenkonia halobius</i>	94	8
E社	未知菌2		6
	未知菌3		3
	未知菌1		13
F社製品1	未知菌4		1
	未知菌5		1
F社製品2	未知菌1		24
	未知菌1		15
G社	未知菌1		18
	未知菌6		2
	未知菌7		6
	未知菌8		1
	<i>Staphylococcus</i> sp.	100	1

*, コロニーの生育は *A. viridans* に比べてかなり遅い。

が最優勢であった。これらの菌株の塩基配列と90%以上の相同性を持つ菌種はデータベースに登録されていなかったため、便宜上、以後これらの菌株を未知菌1と表示した。以上の結果から、調べた各社の麺は、*A. viridans* 近縁菌が優勢となるタイプ（Iタイプ；A, B, C, D社）と未知菌1が優勢となるタイプ（IIタイプ；E, F, G社）に大きく分けられることが解った（表2）。

このタイプの違いは添加物によると考えられる。そこで、タイプと相関する添加物があるかどうかを調べた（表3）。その結果、ビタミンB₂が*A. viridans* 近縁菌の、糖類（ソルビトール、トレハロース、還元水飴）あるいはクチナシ色素が未知菌1の優勢に関わっている可能性が示唆された。すなわち、ビタミンB₂はD社麺以外のIタイプ麺にのみ添加されており、D社麺では上記添加物は何れも添加されていないが、小麦粉自体にビタミンB₂が含まれている（約0.05mg/kg）ことから、ビタミンB₂が*A. viridans* 近縁菌の優勢に関わっていると推察された。糖類はIIタイプ麺にのみ共通する添加物であり、従って、未知菌1の優勢に関わっていると推察された。クチナシ色素はIIタイプ麺だけでなくB社とC社のIタイプ麺にも添加されているが、B社麺からも1コロニーではあるが未知菌1が検出されていることから、クチナシ色素が未知菌1の優勢に関わっている可能性がある。何れにしても、最終的な結論を出すには、これら添加物の有無による麺の試作を行い、菌相を解析する必要がある。

3. 生中華麺の長期保存

ビタミンB₂やクチナシ色素のような着色料の添加は北海道の中華麺の特徴である。どちらの色素を使うかで、

麺の保存後優勢菌種が異なる可能性が示唆された。この優勢菌種の違いが麺の品質にどのような影響を与えるかの詳細は今後の課題として残るが、今回は長期保存後の菌数、pH及び菌相が両タイプでどのように異なるかを調べた。

A社とE社の麺を25℃で4週間保存し、その間の菌数（アルカリ培地を使用）とpHを測定し、4週目の菌相を解析した。アルカリ培地での菌数は4週間後で共に5×10⁷CFU/g程度にまで増加したが、3週間までは「生麺の衛生規範」に定められた規格基準（3×10⁶CFU/g以下）以下であった。pH変化も両者の間で大きな違いはなかった。すなわち、pHは10.0から徐々に低下し4週間後には9.5前後になった。文献⁶⁾で述べられているようなpHの中性付近までの低下は見られず、比較的高いアルカリを保っており、いわゆる「麺の色落ち現象」¹⁾も見られなかった。また、両者の麺で走査電子顕微鏡像に違いはなかった。菌相は、前者では*A. viridans* 近縁菌と共に好アルカリ性 *Bacillus* 属近縁菌（相同性92~99%、淡黄色コロニー）が、後者では未知菌1と共に *Salinicoccus roseus* 近縁菌（相同性92%程度、淡赤色コロニー）が優勢菌種であった。4週間でのpH低下は全体として0.5程度であったが、ミクロ的には、先行優勢菌種の酸生成によってパッチ状に低pH領域が存在しているものと考えられる。4週目の菌相は、この局所的pH低下あるいはエタノールの消失及びその両方の結果と考えられる。

4. 分離菌の生理生化学的同定

A社麺で優勢となった*A. viridans* 近縁菌とE社麺で優勢となった未知菌1のそれぞれ1株ずつについて生理

表3 生中華麺の添加物と優勢菌種タイプ

メーカー	A社	B社	C社	D社 [§]	E社	F社製品1	F社製品2	G社
添加物*\優勢菌種のタイプ	I	I	I	I	II	II	II	II
小麦粉	○	○	○	○	○	○	○	○
かんすい	○	○	○	○	○	○	○	○
食塩	○		○	○	○	○	○	○
小麦蛋白(グルテン)	○	○					○	○
卵白	○	○	○		○	○	○	○
全卵粉				○				○
酒精	○	○	○	○	○	○	○	○
クチナシ色素		○	○		○	○	○	○
ビタミンB ₂	○	○	○					
ソルビット					○	○	※	○

*、1社のみで使用されている添加物は省略；§、秋田県のメーカー；※、ソルビットの代わりにトレハロースと還元水飴添加

生化学的性状に基づく同定を行った。前者は、2連あるいは4連のグラム陽性非運動性球菌であり、オキシダーゼ陰性、OFテスト陽性、 α 溶血性陽性、ロイシニアミノペプチダーゼ産生陰性等（表4）の性状を示すことから *Aerococcus* 属と推定された。さらに、生理性状試験（表5）よりラクトース醗酵性が陽性であることから、最終的に *A. viridans* と同定された。後者は、湾曲状桿

菌で、運動性を有し、無芽胞、オキシダーゼ、カタラーゼ共に陰性、好気性であり（表4）、形態及び生理性状的に近縁な既知株はなかった。本菌は、標準寒天培地では増殖できないか、増殖が非常に遅く、アルカリ培地では速やかに増殖することから、好アルカリ性菌と考えられた。

要 約

北海道内メーカー1社の生中華麺について25°C 7日間の保存期間中の菌相変化を調べた。保存前には十数種の主要菌種が存在したが、2日目以降には *Aerococcus viridans* 近縁菌が優勢となった。北海道内及び道外メーカーそれぞれ7社及び1社によって製造された市販生中華麺9種を同様に保存し、保存後の菌相を解析した。その結果、*A. viridans* 近縁菌が優勢菌種となるのものと未知のグラム陰性桿菌が優勢菌種となるのものとに分けられた。これは、麺へのビタミンB₂、糖類及びクチナシ色素の添加の有無に起因するのではないかと推察された。前者と後者のタイプを代表する麺の25°C 4週間保存後の菌数とpHは共に、 5×10^7 CFU/gおよび9.5前後であった。優勢菌種は、前者では *A. viridans* と好アルカリ性 *Bacillus* 属近縁菌であり、後者では前出のグラム陰性桿菌と *Salinicoccus roseus* 近縁菌であった。

文 献

- 1) 日清製粉(株)中央研究所：食品と科学, **31**, 114 (1989)
- 2) 内藤茂三：愛知県食品工業技術センター年報, **33**, 111 (1993).
- 3) 北瀬照代, 安川章, 宮本三郎, 福島猛：日本食品微生物学会誌, **11**, 159 (1994).
- 4) 鈴木賢二, 斎藤孔男：福島県ハイテクプラザ試験研究報告, **1994**, 238 (1995).
- 5) 坂口勝美：長崎県工業技術センター研究報告, **23**, 137 (1996).
- 6) 米虫節夫, 奥村学, 上野武美, 藤田藤樹夫：*J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 249 (1996)
- 7) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸：食科工, **45**, 58 (1998).
- 8) Nagashima, K., Shimizu, T., Takeshi, K., Kawakami, M., Yasokawa, D., Nakagawa, R. and Okumura, Y. : *J. Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 115 (2000).

表4 分離菌の基本性状

項目\検体	A	B
細胞形態	球菌 ($\phi 0.8 \mu\text{m}$)	湾曲状桿菌 ($0.6 \sim 0.7 \mu\text{m} \times 3.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$)
グラム染色	+	-
胞子形成	-	-
運動性	-	-
コロニー形態	円形, 全縁滑らか, 低凸状, 光沢, 半透明	円形, 全縁滑らか, 低凸状, 光沢, 半透明
カタラーゼ	-	-
オキシダーゼ	-	-
O/F試験	+	-
α 溶血性	+	ND
ロイシニアミノペプチダーゼ	-	ND

A, A社麺から分離された *A. viridans* 近縁菌株; B, E社麺から分離された未知菌1の菌株; ND, 未試験

表5 A社麺から分離された *A. viridans* 近縁菌株の生理性状

試験項目	
尿素	-
L-アルギニン塩酸塩	-
L-オルニチン塩酸塩	-
エスクリン	-
ブドウ糖	+
果糖	+
D-マンノース	+
D-マルトース	+
乳糖	+
トレハロース	+
D-マンニトール	+
ラフィノース	+
硝酸塩還元	-
ピルビン酸ナトリウム	-
2-ナフチル- β -D-ガラクトピラノシド	-
L-アルギニン- β -ナフチルアミド	-
β -ナフチルリン酸ナトリウム	-
L-ピロドニル- β -ナフチルアミド	-
ノボジオシンナトリウム	+
白糖	+
N-アセチルグルコサミン	+
D-ツラノース	+
L-アラビノース	+
p-ニトロフェニル- β -D-グルクロニド	-
D-リボース	+
D-セロビオース	+