

## 魚卵製品における細菌菌種の解析および工程改善

川上 誠・長島浩二・中川良二・奥村幸広・八十川大輔

## Bacterial Phase Analysis of Salmon Roe Products and Improvement on the Manufacturing Process

Makoto KAWAKAMI, Koji NAGASHIMA, Ryoji NAKAGAWA  
Yukihiro OKUMURA and Daisuke ASOKAWA

In order to improve the quality of salmon roe products in Hokkaido, we researched the microflora in the food. Bacteria were isolated on an agar plate from the salmon roe products, and identified on the basis of their nucleotide sequences of the 16S ribosomal RNA gene. When salmon roe (ikura) was preserved at 10°C for 5 days, there were two types of results. On one type, *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp. are main bacteria, and in the other *Staphylococcus* sp. are main bacteria. In the former, the salmon roe tended to rot, and in the latter, *Staphylococcus* sp. formed lactic acid and tended to suppress putrefying bacteria. In order to control the microorganisms of salmon roe, we tested acid treatment by conducting a 0.1% lactic acid cleaning process which suppressed gramnegative putrefying bacteria such as *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp. among others.

イクラや筋子などのサケ魚卵製品は北海道の主要な工業製品の一つであり、北海道内のみならず国内各地に流通している。生ものである性質から製品の微生物コントロールは重要であるが、魚卵製品は加熱殺菌などによる微生物制御が難しく、製造現場では厳しい品質管理が求められている。しかしながら、製造現場における微生物把握は菌数などの量的なものに限定されており、菌相解析にまで踏み込んだ質的な把握は少ない。

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<sup>1) 2)</sup>、今回、サケ魚卵の菌相解析を実施するとともに乳酸によるサケ魚卵製造工程の改善を検討したので報告する。

## 実験方法

## 1. 試料および細菌の分離

北海道内A社製イクラ、筋子の中間製品、最終製品および下記に示す保存試験後の製品を用い、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。使用培地は、3%食塩加標準寒天培地、BCP加寒天培地を用い、培養は35°C、48時間で行った。

## 2. 16SリボソームRNA遺伝子の増幅および細菌の同定

分離した菌株から InstaGene Matrix (Bio-Rad Lab.) を用い DNA を回収し、これをテンプレートとして16S リボソーム RNA 遺伝子を増幅後、その5'末端約500bpの塩基配列を決定した。得られた塩基配列を米国国立生物学情報センター (NCBI) のデータベースと照合することにより菌種を同定した<sup>1) 2)</sup>。

## 3. イクラ製品の保存試験

イクラ凍結製品を解凍後、10°C、5日間保存し、その前後で細菌検査を実施した。保存試験で細菌の増殖が顕

著であったロットについて酸処理を行った。すなわち0.1～0.5%乳酸でイクラ表面を2回洗浄し、洗浄後生理食塩水ですすいだのち10°C、5日間保存した。対照には同一ロットの製品に生理食塩水で処理したものをを用いた。

### 実験結果及び考察

#### 1. 魚卵製品の菌相解析

北海道内A社で製造された魚卵製品の一般細菌数（幾何平均値）は塩イクラ製品で $4.0 \times 10^1$  cfu/g（61検体）、

筋子製品で $1.6 \times 10^4$  cfu/g（53検体）であった（表1）。イクラ製品から分離された主な菌種は*Pseudomonas* sp.（89コロニー中18コロニー、以下同様）、*Enterobacter* sp.（14/89）、*Microbacterium* sp.（12/89）*Staphylococcus* sp.（9/89）などであり、海洋由来と考えられる *Moraxella* sp.、*Psychrobacter* sp.、*Rahnella* sp. なども検出された（表2）。*Pseudomonas* sp.、*Enterobacter* sp. は食品の腐敗、変敗の原因菌として知られており、これらの菌の挙動がイクラ製品の品質に影響すると考えられ

表1 魚卵製品の一般細菌数

	検体数	塩分 (%)	一般細菌数 (cfu/g)
イクラ	61	3.1	$4.0 \times 10^1$
筋子	53	4.2	$1.6 \times 10^4$

表2 いくら製品より分離された細菌

近縁菌種	検出数	相同性
<i>Aranicola proteolyticus</i>	2	99.00% 476/481
<i>Bacillus flexus</i>	1	100.00% 348/348
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	99.00% 385/389
<i>Citrobacter brackii</i>	1	98.60% 493/500
<i>Curtobacterium citreum</i>	1	99.70% 372/373
<i>Curtobacterium luteum</i>	4	99.30% 403/406
<i>Enterobacter agglomerans</i>	7	99.80% 477/478
<i>Enterobacter amnigenus</i>	2	99.60% 454/456
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	99.80% 458/459
<i>Enterobacter toletana</i>	2	98.10% 367/374
<i>Erwinia persicinus</i>	1	97.30% 390/401
<i>Flavobacterium heparinum</i>	1	96.10% 366/381
<i>Flavobacterium indologenes</i>	2	98.30% 395/402
<i>Lactococcus cremoris</i>	1	99.00% 484/489
<i>Klebsiella terrigena</i>	1	96.10% 446/464
<i>Kocaria rhizophila</i>	4	97.80% 450/460
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	8	98.90% 457/462
<i>Microbacterium luteolum</i>	3	99.30% 443/446
<i>Microbacterium oxydans</i>	1	99.30% 442/445
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	2	97.10% 403/415
<i>Pseudomonas cedrella</i>	2	100.00% 494/494
<i>Pseudomonas fulva</i>	3	99.60% 453/455
<i>Pseudomonas gessardii</i>	2	100.00% 439/440
<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	1	98.70% 449/455
<i>Pseudomonas monteilii</i>	2	99.30% 458/461
<i>Pseudomonas putida</i>	8	100.00% 474/474
<i>Psychrobacter immobilis</i>	4	99.30% 444/447
<i>Rahnella aquatillis</i>	4	99.70% 362/363
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1	99.80% 432/433
<i>Serratia proteamaculans</i>	1	98.60% 408/414
<i>Staphylococcus equorum</i>	4	100.00% 454/454
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	1	99.80% 504/505
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	98.40% 437/444
<i>Staphylococcus vitulus</i>	3	99.20% 350/353
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	97.30% 426/438
<i>Yersinia aldovae</i>	3	99.40% 318/320

複数コロニー検出した種の相同性は最も相同性の高かったもののデータを記載した。

る。一方、筋子製品から分離された菌種の多くは *Staphylococcus equorum* 近縁種など *Staphylococcus* sp. (38/67)であり、一部汚染腐敗菌として *Enterobacter* sp. などが検出された(表3)。*Staphylococcus* sp. は乳酸を生成することが知られており<sup>3)</sup>、今回分離した株でも確かめられた。*Staphylococcus equorum* のある株は *Listeria monocytogenes* や黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌に対する抗菌物質を生産することが知られている<sup>4)</sup>。また、*Staphylococcus* sp. はチーズや塩辛な

どの発酵熟成に関わるとともに<sup>5) 6)</sup>、有害菌の抑制にも関わっていると推察される。

今回筋子製品の菌数がイクラ製品に比べ高く、*Staphylococcus* sp. が優勢であったのは筋子製品の塩分濃度がイクラ製品に比べ高いこと、製造工程に熟成工程が含まれることなどに起因し、熟成中に *Staphylococcus* sp. が増殖し、汚染腐敗菌などの増殖を抑制するためと考えられる。また、これら *Staphylococcus* sp. が熟成に大きく関与しているものと推察される。

表3 筋子製品より分離された細菌

近縁菌種	検出数	相同性
<i>Aerococcus viridans</i>	1	99.80% 405/406
<i>Bacillus subtilis</i>	2	100.00% 402/402
<i>Enterobacter amnigenus</i>	3	99.80% 431/432
<i>Enterobacter agglomerans</i>	5	99.40% 360/362
<i>Enterococcus seriolicus</i>	1	99.20% 356/359
<i>Flavobacterium balustinum</i>	2	95.80% 455/475
<i>Flavobacterium colomnare</i>	2	95.00% 384/404
<i>Flavobacterium heparinum</i>	1	98.50% 203/206
<i>Flavobacterium indologenes</i>	1	96.80% 276/285
<i>Macrocococcus caseolyticus</i>	3	100.00% 425/425
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	98.80% 336/340
<i>Psychrobacter immobilis</i>	4	99.70% 307/308
<i>Rahnella aquatilis</i>	2	99.50% 392/394
<i>Serratia proteamaculans</i>	1	99.30% 265/267
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	4	100.00% 333/333
<i>Staphylococcus equorum</i>	12	100.00% 469/469
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2	99.50% 382/384
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	7	99.80% 453/454
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7	99.30% 409/412
<i>Staphylococcus sciuri</i>	3	100.00% 406/406
<i>Staphylococcus vitulus</i>	3	99.70% 386/387

複数コロニー検出した種の相同性は最も相同性の高かったもののデータを記載した。

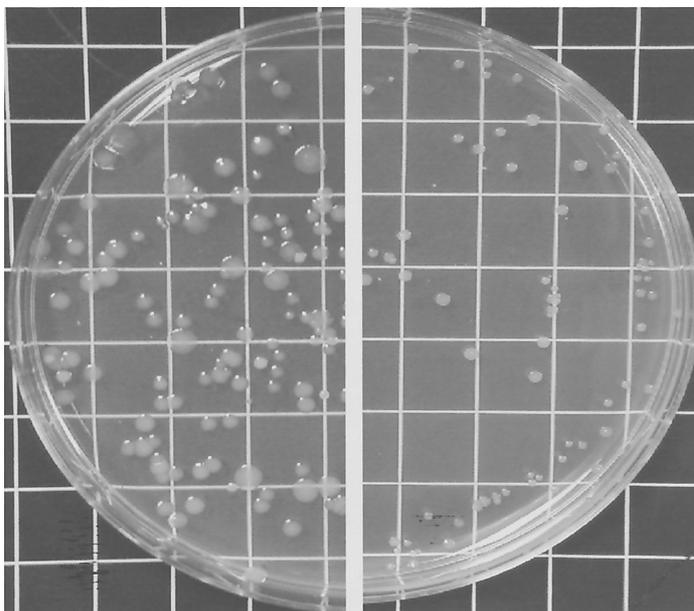


図1 イクラ保存試験で検出された細菌

検出された主な細菌

左：*Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp.,  
*Rahnella* sp., *Staphylococcus* sp.

右：*Staphylococcus* sp.

保存試験でイクラ凍結製品を解凍後、10°C、5日間保存した結果、菌数が急速に増加して $10^5 \sim 10^6$  cfu/gとなるサンプルが認められた。これらのサンプルは *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. などのグラム陰性菌が優勢となるグループと *Staphylococcus* sp. などの酸生成菌が優勢になるものの2つのグループに分けることができた(図1)。前者は低温保存中に腐敗、変敗するのに対し、後者はpHを低下させ、むしろ腐敗菌を抑制する傾向が認められた。

## 2. 乳酸処理によるイクラ製品の菌相改善

イクラ製造工程での低温性腐敗菌制御を目的として、塩漬、洗浄工程における乳酸処理を検討した。乳酸処理にはイクラ製品の一般細菌数を減少させる効果が認められたが、乳酸生成菌の菌数に大きな減少が認められないことから、乳酸処理は *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. などグラム陰性の低温腐敗菌を抑制すると考えられる。(表4, 図2)しかしながら、高濃度の乳酸処理は製品のpHを低下させ、製品の食味に影響するおそれ

があり、0.1%程度の乳酸による洗浄処理が適当であると考えられた。

従来、多くの水産食品は高い食塩濃度で製造がなされてきた。このため、発酵、熟成によって *Staphylococcus* sp. などの耐塩性の細菌が優勢となり、多くの腐敗細菌が抑制されていたと考えられる<sup>6)</sup>。しかし、近年イクラなど魚卵製品を含めて、多くの水産食品が消費者の嗜好に合わせて低塩化の傾向にある。このことは従来塩分によって抑制されていた腐敗細菌に増殖の機会を与えるものであり、製造者に対して製造現場における一層の微生物制御、衛生管理を要求するものである。今回、我々は乳酸処理がイクラ製品の菌相を改善し *Pseudomonas*, *Enterobacter* などグラム陰性の低温腐敗菌を抑制することを見出した。この乳酸処理が塩分による微生物制御に替わる方法として、イクラ製品以外でも発酵や熟成を伴う水産食品一般に対する前処理方法として有効であると考えられる。

表4 一般細菌数、酸生成菌数に及ぼす乳酸菌の影響

乳酸濃度 (%)	pH	一般細菌数 (cfu/g)	酸生成菌数 (cfu/g)
0	6.4	$3.3 \times 10^6$	$5.3 \times 10^4$
0.1	5.8	$2.1 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$
0.3	5.3	$3.0 \times 10^3$	$8.7 \times 10^2$
0.5	5.0	$3.1 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$

10°C、5日間保存後のpH及び菌数  
酸生成菌数の測定はBCP加寒天培地を用いた。

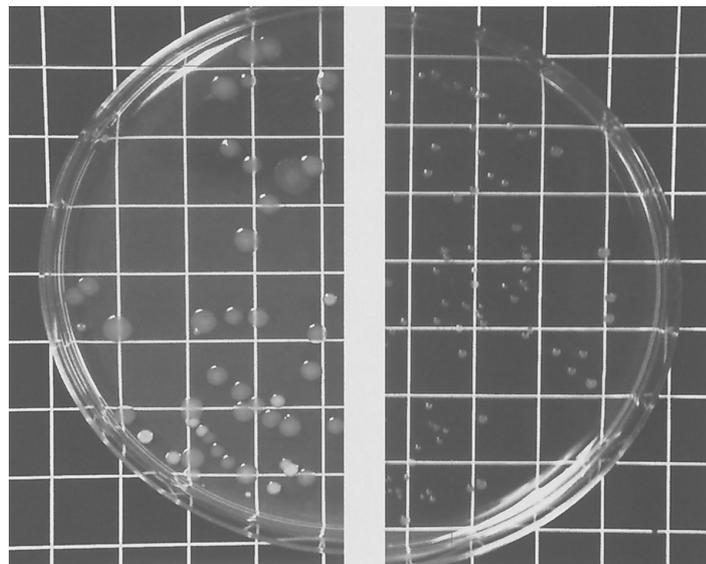


図2 乳酸処理による菌相の変化

左：無処理

右：0.1%乳酸処理

## 要 約

サケ魚卵の菌相解析の結果、筋子製品の菌数は $10^4$  cfu/g と高かったが、主要な菌種は *Staphylococcus* sp. であり、食塩含量が高いことや熟成工程があることで *Staphylococcus* sp. が優勢となったと推察される。イクラを $10^{\circ}\text{C}$ 、5日間保存した場合、*Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. が優勢になるグループと *Staphylococcus* sp. が優勢になるグループが認められた。後者の菌相は筋子に類似しており、*Staphylococcus* sp. が生成する酸などが腐敗菌の増殖を抑制していると考えられた。今回、イクラの微生物制御を目的に酸処理を検討した。0.1%乳酸による洗浄処理を実施することで *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. などグラム陰性低温腐敗菌は抑制され、製造工程の改善に有効であった。

## 文 献

- 1) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸: 日食科誌, **45**, 58 (1998).
- 2) Nagashima K., Shimizu T., Takesi K., Kawakami M., Yasokawa D., Nakagawa R., Okumura Y.: *J. Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 115 (2000).
- 3) Fujii T., Wu Y., Suzuki T., Kimura B.: *Fish Sci.*, **65**, 671 (1999).
- 4) Carnio M. C., Rudolf M., Scherer S., Hoeltzel A., Jung G., Henle T.: *Appl. Environ. Microbio.*, **66**, 2378 (2000).
- 5) Meugnier H., Bes M., Brun Y., Freney J., Fleurette J., Vernozy-rozand C., Mazuy C.: *Int. J. food Microbio.*, **31**, 325 (1996).
- 6) 森勝美, 信濃晴雄, 秋場稔: 北海道大学水産学部研究報, **34**, 355 (1983).