

水ようかんの変敗，離水の防止に関する研究（第2報）

変敗，離水の性状

南場 毅・加藤和人*・芦刈重人**

前報¹⁾で水ようかんの変敗，離水の原因菌を分離し，*Bacillus subtilis* と同定した。本報では分離した原因菌により水ようかんを離水させ，その性状について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 成分分析 一般成分の分析は前報¹⁾に準じた。色調は色差計（日本電気工業㈱製色差直読デジタル測色色差計 ND-504型）で測定した。粘度はB型回転粘度計（BL-アダプター）を用い，20℃で測定した。

2. 微生物菌数の測定 生菌数は前報¹⁾に準じて測定した。耐熱性芽胞菌数は試料の10倍希釈液を沸とう水中で10分間加熱後，標準寒天培地を用い，希釈平板培養法により測定した。

3. 水分活性の測定 Rotoronic 社製の Aw 測定装置を用い，25℃で測定した。

4. 培養方法 変敗水ようかんから分離し，*Bacillus subtilis* と同定した strain W-1¹⁾の液体培養は M-3培地（レバーエキス10g，ポリペプトン10gおよび食塩5gを脱イオン水1ℓに溶解）を用い，18×180mmの試験管に10ml ずつ分注し，120℃，15分殺菌後，接種し，30℃で振とう培養（88回/分，㈱トーマス科学器械製，四連式振とう恒温器使用）した。吸収スペクトルの測定の場合は振盪温度勾配培養装置（東洋科学産業㈱ MODEL TN-3）を用い，30℃で培養した。

5. 離水の試験 使用した生あんの分析値を第1表に，水ようかんの培地組成を第2表に示した。初発菌数を変えた試験では，strain W-1を用い，実験方法4に記載した液体培養液を水ようかん培地に添加し，30℃で保存後，離水状態を観察した。培地組成を変えた試験では，供試菌株として strain W-1の他に，変敗水ようかんから分離した strain M-2¹⁾も用い，前報¹⁾と同様，オートクレーブ殺菌（120℃，15分）したそれぞれの培地に液体培養菌体を塗布し，30℃で12日間保存後に観察した。市販酵素剤による離水の試験では，タカジャスターゼB（三共㈱），プロテアーゼA（天野製薬㈱），ペクチナーゼG（天野製薬㈱），グルクザイム AF 6（天野製薬㈱），アミラーゼ AD（天野製薬㈱），セルラーゼT（天野製薬㈱），インベルターゼ（三共㈱）の各酵素製剤0.1gを10mlの滅菌脱イオン水に溶

* 元愛工大生 **元名城大生

第1表 生あんの分析結果

項 目	分析値
水 分 (%)	63.7
灰 分 (%)	0.4
脂 質 (%)	0.1
蛋白質 (%)	1.1
纖 維 (%)	0.9
糖 質 (%)	33.8
エネルギー (kcal/100 g)	144
p H	5.5
水分活性値	99.2
色 調	
Y %	3.4
x	0.339
y	0.332
生菌数	5×10^6 / g
耐熱性芽胞菌数	10以下 / g

第2表 培 地 組 成

培地の種類	培 地 組 成
水ようかん試作培地	脱イオン水532 ml + 生あん340 g + グラニュー糖315 g + 食塩0.75 g + 寒天6.25 g
水 + 寒天	脱イオン水532 ml + 寒天6.25 g
水 + 砂糖 + 寒天	脱イオン水532 ml + 寒天6.25 g + グラニュー糖360 g
水 + 生あん + 寒天	脱イオン水532 ml + 生あん340 g + 寒天6.25 g
水 + 生あん + 砂糖 + 寒天	脱イオン水532 ml + 生あん340 g + グラニュー糖315 g + 寒天6.25 g
M-3 寒天培地	M-3 液体培地532 ml + 寒天6.25 g
M-3 寒天培地 + 砂糖	M-3 液体培地532 ml + 寒天6.25 g + グラニュー糖360 g
M-3 寒天培地 + 生あん	M-3 液体培地532 ml + 寒天6.25 g + 生あん340 g
M-3 寒天培地 + 砂糖 + 生あん	M-3 液体培地532 ml + 寒天6.25 g + グラニュー糖315 g + 生あん340 g
水 + カラギーナン	脱イオン水532 ml + カラギーナン10 g
水 + 砂糖 + カラギーナン	脱イオン水532 ml + カラギーナン20 g + グラニュー糖360 g
水 + 生あん + カラギーナン	脱イオン水532 ml + カラギーナン20 g + 生あん340 g
水 + 生あん + 砂糖 + カラギーナン	脱イオン水532 ml + カラギーナン20 g + 生あん340 g + グラニュー糖315 g

M-3 液体培地（1 l 中）

レバーエキス10 g + ポリペプトン10 g + 食塩 5 g

解した後、2ml づつシャーレに塗布、30℃で保存した試料について離水状態を観察した。

6. 顕微鏡写真 strain W-1により離水させた水ようかん培地の薄片を下記の色素で染色処理後、オリンパス AH-2 VANOX-S 光学顕微鏡で撮影した。

(1) 0.1%ヨウ素、ヨウ化カリ液

(2) クマシーブルー液

(3) 0.3%コンゴレッド液

(4) 0.01%メチレンブルー液

7. 酵素活性の測定 *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, strain W-1および strain M-2を10ml の M-3培地に1白金耳接種して30℃で72時間振とう培養した。培養液を10,000 rpm で20分間遠心分離し、上澄液を粗酵素液として用いた。 α -アミラーゼはブルーバリュ法²⁾、プロテアーゼはフォーリン法³⁾によって測定した。

8. 吸収スペクトル 培養液および離水液の可視部および紫外部吸収スペクトルはスペクトルフォトメーター UV-180 (株島津製作所製)を用いて測定した。

9. 高速液体クロマトグラフィー 離水液および培養中の糖含量を前報¹⁾に準じて測定した。

実験結果及び考察

1. 離水に及ぼす初発菌数及び培地成分の影響 初発菌数を変えた場合の離水の状態の差異を比較した(第3表)。いずれの試験区も8日目には $10^8/g$ レベルに達した。離水は初発菌数 $10^3 \sim 10^5/g$ の場合に特に著しかったが、 $10/g$ レベルの場合もかなり離水がみられた。しかし、初発菌数 $10^7/g$ レベルの場合は弱く、離水は strain W-1の増殖と関連しているように考えられた。

水ようかんの培地成分と離水の関係を求めた(第4表)。strain W-1では水ようかん培地、水+生あん+砂糖+寒天(またはカラギーナン)に特に強い活性がみられ、生あんと砂糖の同時使用が離水と関係があるように考えられる。M-3寒天培地系はレバーエキス、ポリペプトンを含み、本菌の生育に必要な栄養源を含むにもかかわらず、さほど強い離水現象は見られず、本菌の場合、増殖において生あん-砂糖系を利用し、その結果、離水を生じるのではないかと考えられる。

一方、strain M-2の場合は、水+生あん+寒天、M-3寒天培地+生あん、水+生あん+砂糖+カラギーナンに強い活性がみられ、離水に生あんが関係しているが、strain W-1のように必ずしも砂糖の存在が必要とは考えられない。また、カラギーナンはこの濃度では、寒天よりも離水し易い傾向を示した。

市販の酵素剤による離水の観察結果では、ペクチナーゼGにおいて、培地の表面に赤色調の液体が少し浮いていた程度で、それ以外の酵素剤では離水は認められず、離水には細菌の増殖あるいは複雑な分解酵素系を必要とすることが考えられた。

第3表 strain W-1の初発菌数と離水の関係*

初発菌数	2日目	4日目	5日目	8日目	8日目の生菌数
$6 \times 10^7 / g$	+	++	++	++	$2 \times 10^8 / g$
$6 \times 10^5 / g$	±	+	+++	++++	$3 \times 10^8 / g$
$6 \times 10^3 / g$	—	+	++	++++	$1 \times 10^8 / g$
$6 \times 10 / g$	—	—	±	+++	$2 \times 10^8 / g$

* 離水の強さ

++++	著しい	+++	非常に強い
++	強い	+	弱い
±	かすかに認められる	—	認められない

第4表 培地成分と離水

培地の種類	離水の強さ*	
	strain W-1	strain M-2
水ようかん培地	++++	+
水+寒天	+	+
水+砂糖+寒天	+	—
水+生あん+寒天	+	+++
水+生あん+砂糖+寒天	++++	++
M-3寒天培地**	—	+++
M-3寒天培地**+砂糖	+	+
M-3寒天培地**+生あん	—	++++
M-3寒天培地**+生あん+砂糖	++	+
水+カラギーナン	+	—
水+生あん+カラギーナン	+	+
水+砂糖+カラギーナン	+	+
水+生あん+砂糖+カラギーナン	++++	++++

* 離水の強さ

++++	著しい	+++	非常に強い
++	強い	+	弱い
±	かすかに認められる	—	認められない

** M-3培地（1ℓ中）

レバーエキス10g + ポリペプトン10g + 食塩5g

第5表 酵素活性の測定結果

菌 株	α -Amylase *	Protease **		
		pH 3	pH 6	pH 8
strain W-1	90	17	71	54
strain M-2	1759	57	1705	1958
<i>B. subtilis</i>	43	61	32	8
<i>B. circulans</i>	338	3	30	12
<i>B. coagulans</i>	175	12	15	25

* α -Amylase : Blue Value method

力価：40℃，30分間で Blue value (700nm OD) を10%低下させたアミロースのmg数であらわした。

** Protease : Folin method

力価：60分間で tyrosine 1 μ g を生ずる酵素量を1単位とした

供試した *Bacillus* の酵素活性の測定の結果 (第5表)，strain M-2の α -アミラーゼ，プロテアーゼ活性が strain W-1など他の菌株よりかなり高い値を示した。生菌の砂糖分解能を調べるため，各菌株を M-3液体培地10ml に50% グラニュー糖液1ml を添加した培地で30℃，6日間培養した後，Somogyi-Nelson 法⁴⁾で還元糖を定量した。その結果，strain W-1，strain M-2はそれぞれ39.2mg/ml，36.4mg/ml の還元糖を生成したが，*B. subtilis* は0.14mg/ml，*B. circulans*，*B. coagulans* は0.17mg/ml であった。前報¹⁾で strain W-1と同様，*B. subtilis* (当所保存菌株) に強い離水活性を認めたが，今回，生成還元糖量に大きな差が認められ，また，strain M-2も水ようかん培地での離水活性は弱く，還元糖生成力の強弱と離水活性は必ずしも関連しているとはいえなかった。セルラーゼも濾紙崩壊法⁵⁾で測定したが，ほとんど活性はみられなかった。寒天分解酵素の存在を温度勾配培養装置を使用 (40℃，70 rpm) し，L字管に糸状寒天を加えて測定したが，いずれの菌株も寒天を分解しなかった。

2. 離水させた水ようかんの顕微鏡観察 離水させた水ようかんの薄片の顕微鏡写真の結果の一例を写真1，2に示した。無染色の場合は正常品に比べてその差異は明らかでないが，ヨード澱粉反応させた場合 (写真3，4)，正常品に比べて離水物は各細胞はほとんど染色せず，細菌により澱粉が分解されたと考えられる。クマシーブルーの場合 (写真5，6) も正常品に比べて，染色度は弱く，蛋白質もなんらかの損傷を受けていると思われる。細胞壁の染色に用いられるコンゴレッドの場合 (写真7，8)，正常品では各細胞の細胞壁のみが鮮明に染色されていたが，離水物は細胞全体が染色されていた。

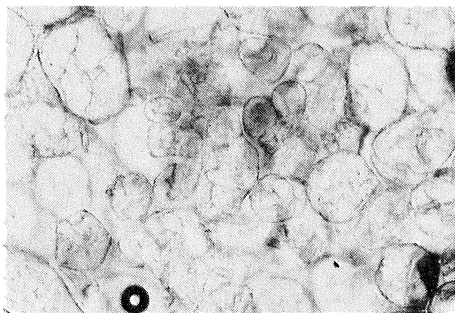


写真1 無染色 (×200)
正常品



写真2 無染色 (×200)
離水物

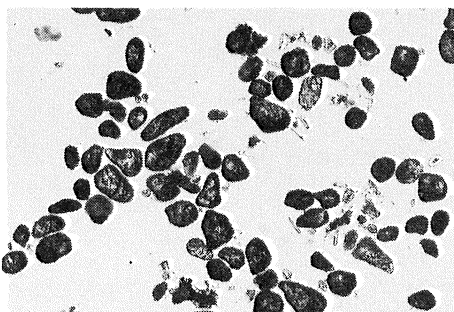


写真3 ヨード・ヨードカリ処理 (×100)
正常品

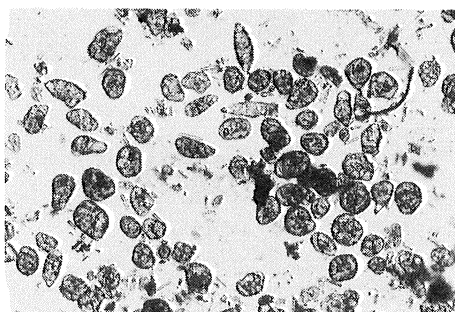


写真4 ヨード・ヨードカリ処理 (×100)
離水物

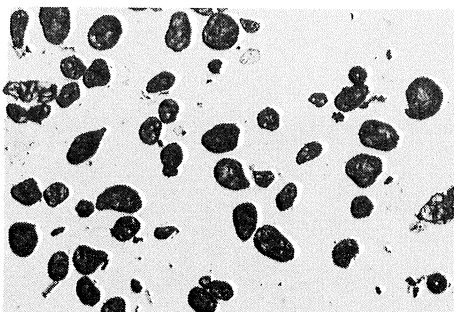


写真5 クマシーブルー処理 (×100)
正常品

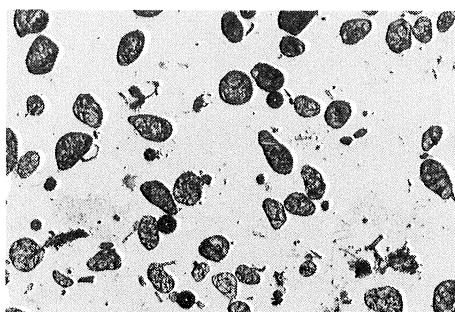


写真6 クマシーブルー処理 (×100)
離水物

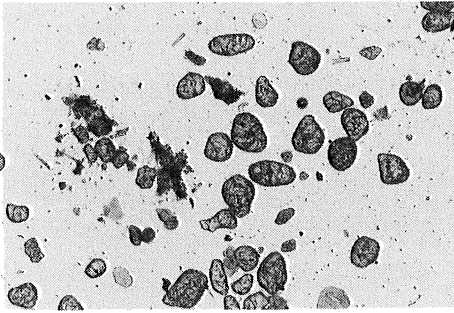


写真7 コンゴレッド処理 (×100)

正常品

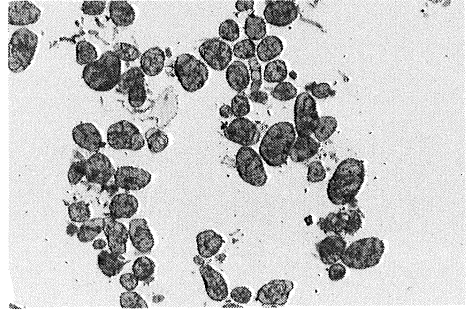


写真8 コンゴレッド処理 (×100)

離水物

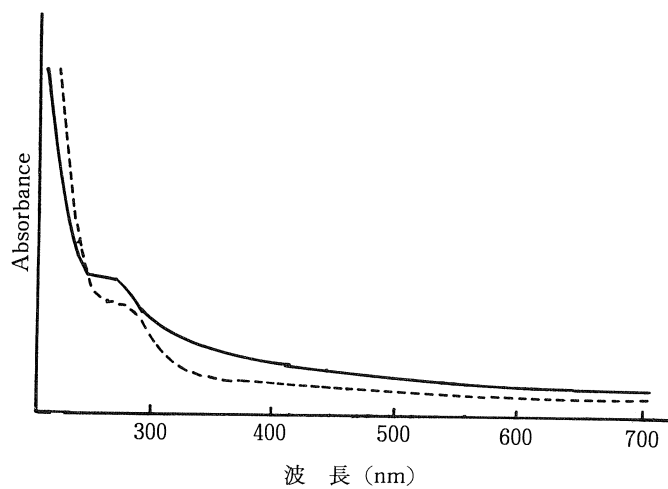
以上のように、染色後の顕微鏡観察の結果は、strain W-1の増殖により、離水した水ようかんの各細胞はかなり損傷を受けており、離水の発現に関係しているのではないかと考えられる。

第6表 離水液の分析結果

水分 (%)	51.1
灰分 (%)	0.01
脂質 (%)	0.30
蛋白質 (%)	0.33
全糖 (%)	54.40
直糖 (%)	34.00
Brix (%)	47.00
水分活性値	0.935
pH	4.77
粘度 (cps)	94.5
生菌数	$9 \times 10^6 / g$

3. 離水液の性状 離水液の分析結果を第6表に示した。全糖、直糖とも高い数値を示し、砂糖—あん—寒天の結合系から細菌により遊離して生成したと思われる。粘度は94.5 cps と高い数値を示し、pH も4.77と低値であった。離水液の吸収スペクトルを第1図に、培養液の吸収スペクトルを第2図に示した。離水液では270 nm 附近に吸収ピークが見られ、培養液では270 nm 附近の吸収ピークの他に、pH 5.4の場合に440 nm 附近に吸収ピークが見られた。

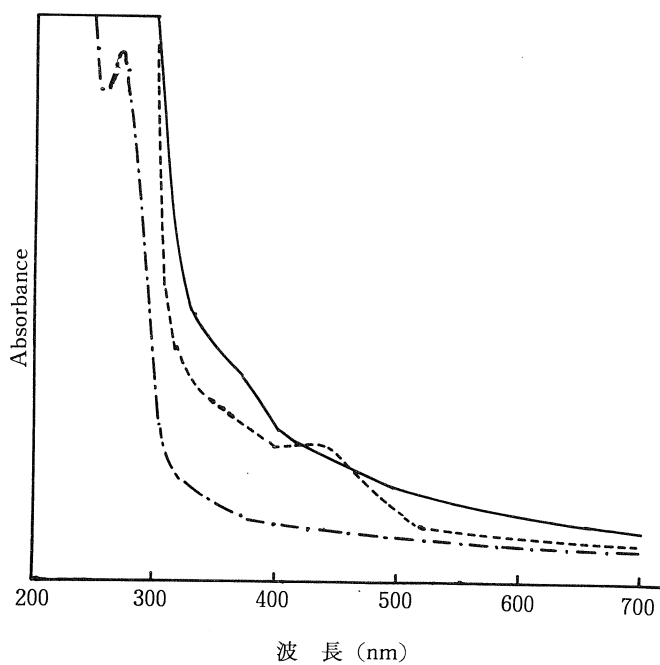
高速液体クロマトグラフィーによる測定の結果(第3図)、糖全体を100%とすると、フラクトース2.1.2%、グルコース69.5%、シュクロース2.7%、マルトース6.6%となり、離水によってシュクロースが極端に減少し、代わりにグルコース、フラクトースが増加し、前報¹⁾の変敗品と同様な傾向を示した。同様に、M-3液体培地で培養中の糖類の消長を測定した結果、初発のシュクロースが分解されて、グルコース、フラクトースが生成することが確認された。さらに、培養後の洗浄菌体を pH 6.0のマックイル



第1図 離水液の吸収スペクトル（125倍希釈液）

— pH 4.95

---- pH 9.37

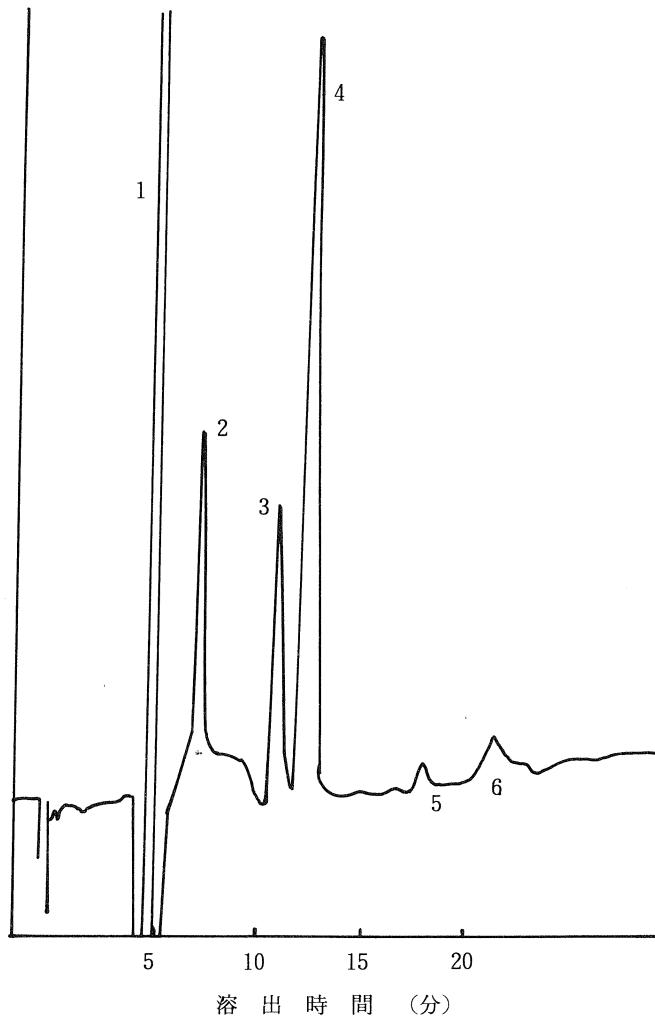


第2図 培養液の吸収スペクトル

— pH 9.4

---- pH 5.4

- · - pH 6.5



第3図 Strain W-1による離水液の高速液体クロマトグラム

LC 条件 カラム PNH₂-10/s 2504 (内径4.0mmφ×長さ25cm)

流 量 0.7 ml/min

溶 媒 アセトニトリル：水=75：25

Shimazu LC3A (RID-2A 検出器)

ピーク番号

- | | |
|-------------|-----------------|
| 1. エチルアルコール | 2. グリセリン (内部標準) |
| 3. フラクトース | 4. グルコース |
| 5. シュクロース | 6. マルトース |

バイン緩衝液に溶解させ、30℃で3時間反応させた場合にも、グルコース、フラクトースが検出され、strain W-1による離水はシュクロースからのグルコース、フラクトースの生成と関連していると考えられる。

要 約

1. 離水に及ぼす初発菌数の影響を調べた結果、strain W-1の初発菌数が $10^3 \sim 10^5$ /g レベルの場合に著しい離水が再現された。水ようかん培地の成分組成を変えた場合の試験では、strain W-1では生あんと砂糖が、strain M-2では生あんが離水生成に重要な培地成分と考えられた。

2. 離水させた水ようかんの断片を顕微鏡観察した。離水によりヨード澱粉反応は陰性になり、クマシーブルーでも染色されにくくなっていた。細菌による澱粉や蛋白質の損傷が、離水に関与していると考えられる。

3. strain W-1で調製した離水液を分析した結果、水分と糖質が大部分を占め、離水により水ようかん中のシュクロースが分解され、グルコース、フラクトースに変化していることが確認された。

文 献

- 1) 南場ら：愛知食品工試年報，28，48（1987）
- 2) 赤堀ら：酵素研究法2（朝倉書店），P. 108（1968）
- 3) 江上ら：標準生化学実験（文光堂），P. 208（1953）
- 4) 福井：還元糖の定量法（学会出版センター），P. 9（1985）
- 5) 小崎ら：酵素利用ハンドブック（地人書館），P. 243（1977）