



Title	細菌の増殖に及ぼす二酸化炭素の影響
Author(s)	山崎, 浩司; 川合, 祐史; 猪上, 徳雄; 信濃, 晴雄
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 43(3), 115-123
Issue Date	1992-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24095
Type	bulletin (article)
File Information	43(3)_P115-123.pdf



[Instructions for use](#)

細菌の増殖に及ぼす二酸化炭素の影響

山崎 浩司*・川合 祐史*・猪上 徳雄*・信濃 晴雄*

Effect of Carbon Dioxide on the Growth of Bacteria

Koji YAMAZAKI*, Yuji KAWAI*, Norio INOUE*
and Haruo SHINANO*

Abstract

Fillets of walleye pollack (*Theragra chalcogramma*) were packed in pouches of low gas permeability under air or 100% carbon dioxide (CO₂), and stored at 0°C. The microflora and chemical properties were examined. The effect of CO₂ on the isolated spoilage bacterium, *Pseudomonas* sp., was also investigated in relation to intracellular organic acids.

No increase was observed in aerobic viable counts and volatile basic nitrogen (VB-N) of the fillets packed in CO₂. The pH of fillets packed in CO₂ immediately decreased to a low value, and this value remained throughout the storage period. The dominant genera of fillets in air-packs were of the *Pseudomonas* type I/II and *Moraxella* spp., while those in CO₂-packs were *Micrococcus* spp. and *Staphylococcus* spp..

Gram-negative bacteria isolated from the spoiled air-packaged fillets showed a higher sensitivity to CO₂ than did gram-positive bacteria isolated from CO₂-packaged fillets. The relative amount of L-malate increased in cells of *Pseudomonas* sp. incubated in a CO₂ atmosphere. This result supported the idea that CO₂ inhibits L-malate dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. isolated from air-packaged samples.

緒 言

食品の貯蔵法に関する多くの研究の中でも冷蔵あるいは冷凍法に関する報告が多い¹⁾が、昭和40年代中頃から新しい貯蔵法としてガス置換包装が話題になり始めた。この方法は、ガスバリア性の高い包装容器内の酸素 (O₂) を機械的 (一般には真空包装機) に除去し、その後窒素 (N₂) または二酸化炭素 (CO₂) などの不活性ガスを充填し、食品の品質を保持しようとするものである。食品の中でも特に生鮮魚介類については、肉質の変化、脂質の酸化および微生物による腐敗などが起こりやすいため、この方法を用いることが検討されている^{2-5,7,8)}。この方法はシェルフライフを延長できる点もさることながらガス置換することだけで既存の設備と流通網をそのまま利用できる点とともに、生鮮魚を包装状態で輸送可能であることから、微生物による二次汚染も防止できる利点がある。

ガス置換貯蔵法に関する研究は、Parkin²⁾ および Molin ら³⁾ が海産魚を用いて CO₂ の静菌効果を、また King ら⁶⁾ は CO₂ 濃度 70% において腐敗細菌である *Pseudomonas aeruginosa* の世代時間が2倍に延長することを明らかにしている。またガス置換する場合の効果的な CO₂ 濃度について、Tarr⁷⁾ は 40~50%、Coynes⁸⁾ は 100% としているが、一般的には CO₂ 濃度が高いほどその効果

* 北海道大学水産学部食品製造学講座
(Laboratory of Food Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

も高いと考えられている。我が国においては、藤井ら⁴⁾ および岡ら⁵⁾ が魚介類を対象として同様の研究を行っているが、その報告例は少ないのが現状である。そこで本研究では、スケトウダラ切り身を高濃度 CO₂ 存在下で貯蔵した場合の化学的変化および細菌の増殖と菌相を調べ、さらに CO₂ によって抑制される代表細菌の TCA 回路に及ぼす影響について検討した。

実 験 方 法

試料の調製

函館市内の小売店から入手した新鮮なスケトウダラ (*Theragra chalcogramma*) の内臓を除去し、水洗後、三枚に卸し、剥皮後に再度水洗して 30 g ずつの切り身にしたものを試料とした。

ガス充填および貯蔵方法

材料を包材 (K-ナイロン/セロハン, 18 cm×18 cm) に入れ、まず真空包装 (柏木式真空包装機 FN4-IA) した。その後 CO₂ を約 600 ml 注入し (CO₂ 濃度 98.8%), これを CO₂ 100% 置換区とした。また同様に空気を注入して含気包装したものを Air 対照区とした。これら 2 区の試料を 0°C で貯蔵し、経日的に取り出して以下の測定に供した。なお各試料区のガス組成は、WG-100 (1/4"×1.8 m, GL Science) カラムを用いてガスクロマトグラフィーで定量した。

揮発性塩基窒素 (VB-N) および pH の測定

試料 30 g を滅菌生理的食塩水 270 g とともに 1 分間、ホモジナイズ (日本精機 HD-2) したものを試料液とした。これの VB-N は Conway の微量拡散緩衝法 (H₃BO₃-HCl 法)⁹⁾、pH はガラス電極 pH メーター (HORIBA H-7 SD) を用いて測定した。

生菌数の測定と好気性細菌の分離

VB-N の測定と同様の方法で調製した試料液を用い、常法に従って普通寒天平板培地で表面塗抹法によって 15°C、7 日間培養後生菌数を測定した。また最適希釈平板の一定区画に存在するすべてのコロニーを釣菌し、同定に供した。

分離菌の同定

分離菌株は Bergey 便覧^{10,11)} を参考にして Shewan ら¹²⁾ の図式を改変したスキーム¹³⁾ に準じて同定した。なお試験項目は以下に示す通りである。

1) 形態学的性状検査

分離菌株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 (懸濁標本)、鞭毛の付着部位、芽胞の有無などを観察した。

2) グルコースからの好氣的並びに嫌氣的酸生成試験

Baird-Parker の方法¹⁴⁾ に準じて行った。

3) オキシダーゼ試験

普通寒天平板培地で 30°C、2 日間培養した分離菌株を濾紙に塗抹し、1% *N, N, N', N'*-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine Dihydrochloride 水溶液を濾紙に浸み込ませて、30 秒以内に濃青色に変色したものを陽性とした。

4) カタラーゼ試験

普通寒天平板培地上の新鮮培養集落に 3% 過酸化水素水を滴下し、発泡の有無により判定した。

5) ペニシリン感受性試験

感性ディスク用培地-N (ニッスイ) 平板に分離菌株を塗抹した後、ペニシリンディスク (昭和ディスク) を無菌的に置き 30°C, 2 日間培養後、培地上に形成された阻止円の直径により判定を行った。

6) 好塩性試験

普通寒天斜面培地で 30°C, 2 日間培養した分離菌株を、食塩無添加および 1.0% 添加ペプトン水に 10⁴ cells/ml 程度になるように接種後、30°C, 2 日間培養し増殖の有無を肉眼で観察した。

分離代表菌株の CO₂ 抵抗性測定

供試菌株として Air 対照区から分離した *Pseudomonas* I/II 型, *Moraxella* sp. および CO₂ 置換区から分離した *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp. の 4 種類を供試した。これらの供試菌を、魚肉エキス 0.5%, Trypticase peptone (BBL) 0.5%, NaCl 0.5%, グルコース 0.1% の組成の魚肉ブイヨン (FNB) によって前培養 (25°C, 15 時間) し、遠心分離 (3,000×g, 10 分間) によって集菌・洗浄 (2 回) 後、これを 100 ml の FNB に 550 nm における吸光値が 0.100 となるように懸濁した (500 ml 容三角フラスコを使用)。三角フラスコのヘッドスペースを CO₂ で置換 (流速 1 l/min で 2 分間注入) したものを CO₂ 培養区とし、未処理のものを Air 培養区とした (対照)。それぞれ 25°C で振盪培養 (65 往復/min) し、経時的に 550 nm における吸光値を測定した。また測定後には毎回 CO₂ を同様の条件で再充填した。

Pseudomonas sp. 菌体内の TCA 回路関連有機酸の定量

Air 対照区スケトウダラ肉から分離した *Pseudomonas* I/II 型の菌株を、上記と同様の方法で 24 時間 Air および CO₂ 存在下で培養を行った (それぞれを Air 培養区, CO₂ 培養区と呼ぶ)。この培養液を 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.6) で遠心分離 (3,000×g, 10 分間) により集菌・洗浄 (3 回) して得た細胞を、1% リゾチーム-0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.6) 4 ml に再懸濁し、37°C, 12 時間保温して溶菌させた後、超音波ホモジナイザー (大岳製作所製 5202PZT) で 50 W, 20 分間の処理を行い菌体を破壊した。この菌体浮遊液を遠心分離 (13,000×g, 30 分間) し、その上清区分を限外濾過チューブ (MILLIPORE ウルトラフリー-C3, 分画分子量 5,000) を用いて遠心分画 (5,000×g, 120 分間) した濾液区分を試料液とした。この試料液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供し TCA 回路関連有機酸 (ピルビン酸, オキサロ酢酸, クエン酸, 2-ケトグルタル酸, フマル酸, L-リンゴ酸) を定量した。なお HPLC の分析条件は以下に示した通りである。

ポンプ: BIP-I (日本分光)

検出器: UVIDEC-100-V (日本分光)

検出波長: 210 nm

カラム: Finepak SIL C-18S×2 (日本分光)

カラム温度: 室温 (20°C)

移動相: 0.1 M KH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.1)

流速: 1.0 ml/min

結果および考察

生菌数, VB-N および pH の変化

0°C で貯蔵した CO₂ 100% 置換区, Air 対照区の両試料区が生菌数変化は Fig. 1 に示した。両者共に貯蔵直後には 10⁴ cells/g 程度であったが, Air 対照区では貯蔵 2 日目以降増加傾向を示し, 貯

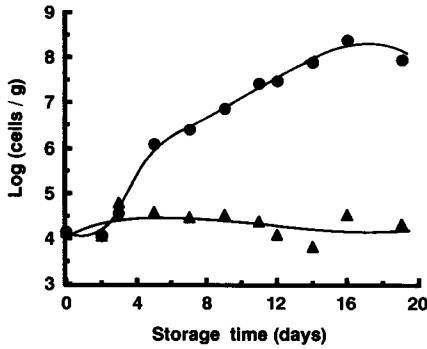


Fig. 1. Changes in the viable cell counts of walleye pollack fillets stored at 0°C under air (●) or 100% CO₂ (▲).

蔵5日目には 10^6 、11日目には 10^7 、16日目には 10^8 に達した。しかしCO₂置換区では貯蔵期間を通して生菌数にはほとんど変化がなく、初発菌数 (10^4 cells/g) が維持され静菌状態を示した。この結果については、CO₂置換区におけるO₂濃度が低く、本実験では貯蔵期間を通して0.3%未満であったために増殖が抑制されたとも考えられるが、一般的な好気性細菌 (*Pseudomonas* 属) ではわずか0.1%のO₂存在下でも十分に増殖できることが明らかにされている¹⁴⁾ことから、細菌の増殖がO₂の減少よりもCO₂により何らかの影響を受けているものと考えられた。

次にVB-Nの変化 (Fig. 2) は、両区ともに貯蔵直後には10 mg/100 g程度であったが、Air対照区ではその後徐々に上昇し、貯蔵9日目には20 mg/100 g程度となったが、その後急激に増加し11日目には41 mg/100 g、19日目には67 mg/100 gに達した。一方、CO₂ 100%置換区では貯蔵期間を通じてほとんど変化はなく、貯蔵直後の約10 mg/100 g、前後を維持した。一般に魚肉の腐敗の指標として用いられるVB-Nは30~40 mg/100 gで初期腐敗の魚肉とされていることから考えると、本実験に供した試料のシェルフライフはAir対照区で約10日間、CO₂ 100%置換区では19日間以上で、Air対照区の約2倍を示す値が得られた。

Air対照区のpHの変化 (Fig. 3) は、VB-Nの変化と同様に貯蔵11日目以降に上昇傾向を示し、16日目には7.2に達した。しかし、CO₂ 100%置換区では貯蔵開始直後にpHの低下 (pH 6.5) が観察され、その後は貯蔵期間を通じて著しい変化はなく、6.3~6.6の値を維持した。このようにCO₂ 100%置換区で貯蔵開始直後に観察されたpHの低下は、CO₂置換貯蔵において一般的に認められる現象¹⁵⁾であり、CO₂が魚肉中に浸透・溶解して炭酸 (H₂CO₃) となり、それが解離することによりpHが低下したものと考えられる。

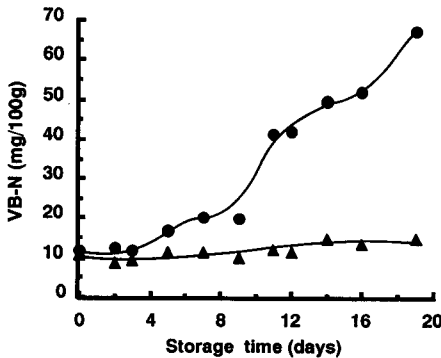


Fig. 2. Changes in the amount of VB-N of walleye pollack fillets stored at 0°C under air (●) or 100% CO₂ (▲).

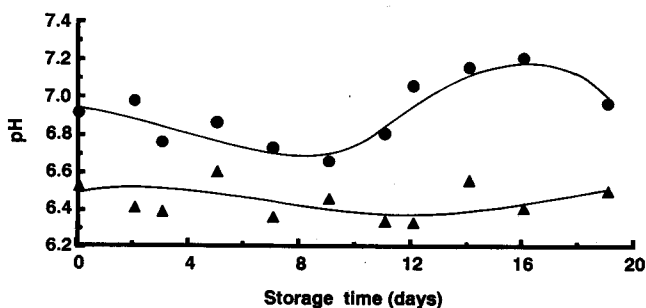


Fig. 3. Changes in the pH of walleye pollack fillets stored at 0°C under air (●) or 100% CO₂ (▲).

分離菌の同定と菌相の変遷

Air 対照区から 162 株, CO₂ 置換区から 171 株の合計 333 株の分離菌株を得たが, これら菌株を同定した結果は Table 1 に示した通りである。Air 対照区では, *Pseudomonas* I/II 型に 49 株, *Pseudomonas* III/IV-NH 型に 12 株, *Morazella* 属に 44 株, *Micrococcus* 属に 25 株, *Staphylococcus* 属に 13 株, *Corynebacterium* 属に 8 株が同定されたが, 11 株は同定し得なかった。一方, CO₂ 100% 置換区では *Pseudomonas* I/II 型に 10 株, *Pseudomonas* III/IV-NH 型に 8 株, *Morazella* 属に 11 株, *Micrococcus* 属に 55 株, *Staphylococcus* 属に 57 株, *Corynebacterium* 属に 11 株が同定されたが 19 株は同定できなかった。

また菌相の変遷は, Fig. 4-A および B に示したように, 貯蔵直後には両区共にグラム陽性球菌の *Micrococcus* ならびに *Staphylococcus* の両属で 50% 程度を占め優勢であり, グラム陰性桿菌の *Pseudomonas* 属および *Morazella* 属は併せて 10% 程度であった。その後, Air 対照区では, 貯蔵 7 日目以降にはグラム陰性桿菌の *Pseudomonas* I/II 型および *Morazella* 属の占める割合が高くなり優勢となった。しかし, CO₂ 100% 置換区では貯蔵期間を通して菌相の変動はほとんどなく, 貯蔵直後に多く検出された *Micrococcus* 属ならびに *Staphylococcus* 属が貯蔵期間を通して 50% 以上を占め優勢であった。また, Air 対照区で優勢であった *Pseudomonas* I/II 型および *Morazella* 属は, 貯蔵期間の延長につれて割合が減少する傾向にあった。

Table 1. The number of bacterial strains isolated from walleye pollack fillets stored at 0°C under air or 100% CO₂

Genera	Air pack	CO ₂ pack
<i>Micrococcus</i> spp.	25	55
<i>Staphylococcus</i> spp.	13	57
<i>Pseudomonas</i> type I/II	49	10
<i>Pseudomonas</i> type III/IV-NH	12	8
<i>Morazella</i> spp.	44	11
<i>Corynebacterium</i> spp.	8	11
Others	11	19
Total	162	171

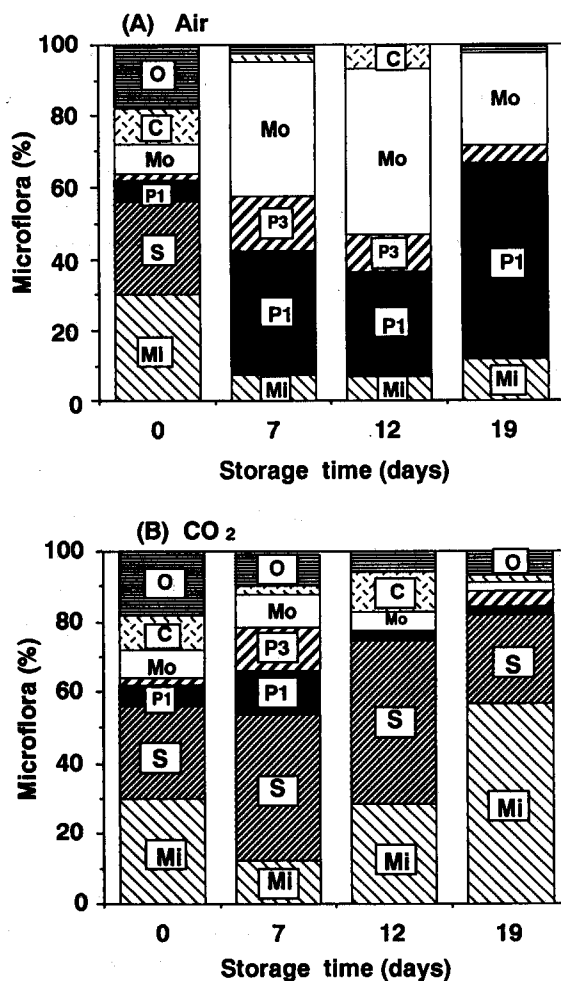


Fig. 4. Changes in microflora of walleye pollack fillets stored at 0°C under (A) air or (B) 100% CO₂.

Abbreviations: Mi, *Micrococcus* spp.; S, *Staphylococcus* spp.; P1, *Pseudomonas* type I/II; P3, *Pseudomonas* type III/IV; Mo, *Moraxella* spp.; C, *Corynebacterium* spp.; O, Others.

一般に魚肉の腐敗には、*Pseudomonas* 属をはじめとするグラム陰性桿菌が関与するとされている¹⁵⁻¹⁷。また奥積ら¹⁸)は解凍魚の腐敗時における菌相を検討し、*Pseudomonas* I/II型、*Pseudomonas* III/IV-H型、*Moraxella* 属などが多数検出されたとしている。本研究でも、Air 対照区では貯蔵7日目から腐敗に至る19日目にかけて *Pseudomonas* I/II型および *Moraxella* 属が多数検出され、奥積ら¹⁸)の結果とよく一致した。一方、CO₂ 置換区においては生菌数の増加も認められず (Fig. 1)、さらに魚肉の腐敗に関与する *Pseudomonas* 属および *Moraxella* 属などのグラム陰性桿菌がほとんど検出されず、グラム陽性球菌が多数検出された (Fig. 4-B)。したがってこの差異がVB-N量およびpHにも反映されたものと思われる。CO₂ に対する抵抗性は Sutherland ら¹⁹)

および Silliker ら²⁰⁾ によって、グラム陰性菌よりも陽性菌の方が強いことが報告されているが、本実験でも同様の結果であった。

スケトウダラ肉由来の代表菌株の CO₂ 抵抗性

スケトウダラ肉由来の代表菌株の発育に対する CO₂ の影響について Fig. 5 に示した。いずれの場合も CO₂ により増殖の遅延が認められた。しかし、*Staphylococcus* sp. ではかなり増殖が遅いものの貯蔵期間を通じて増加傾向を示した。また、*Micrococcus* sp. においても若干ではあるが増殖が認められた。しかし、*Pseudomonas* I/II 型および *Moraxella* sp. では培養期間中を通じて増殖は全く認められなかった。この結果は、生菌数の変化 (Fig. 1) ならびに菌相の変遷 (Fig. 4-A, B) の結果とよく一致するもので、グラム陽性菌のほうが陰性菌よりも CO₂ に対する抵抗性の強いことが顕著に認められた。また、*Micrococcus* sp. より *Staphylococcus* sp. の方が増殖力が強かった結果は、絶対好気性菌の *Micrococcus* 属よりも通性嫌気性菌の *Staphylococcus* 属の方が酸素 (O₂) の少ない環境に適していたためと考えられる。

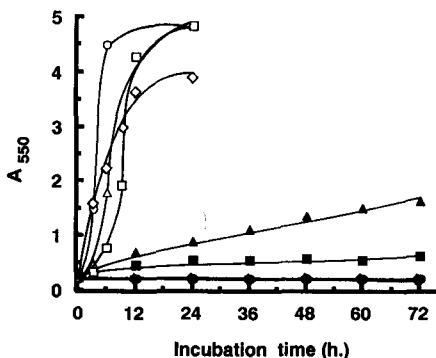


Fig. 5. Effects of CO₂ on the growth of bacteria isolated from 0°C stored walleye pollack filets under air or 100% CO₂.

Symbols :

incubation under Air, (○) *Pseudomonas* sp.; (◇) *Moraxella* sp.; (△) *Staphylococcus* sp.; (□) *Micrococcus* sp.
incubation under CO₂, (●) *Pseudomonas* sp.; (◆) *Moraxella* sp.; (▲) *Staphylococcus* sp.; (■) *Micrococcus* sp..

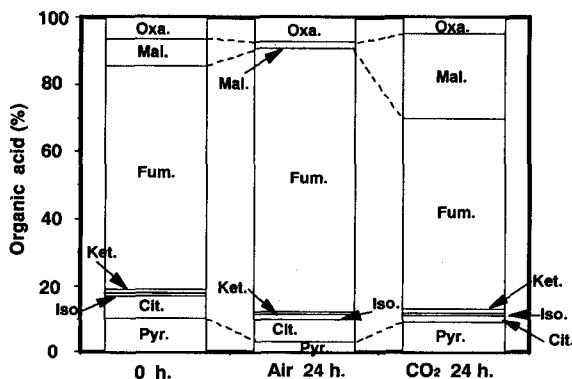


Fig. 6. Organic acid composition extracted from cells of *Pseudomonas* sp. grown on FNB under air or 100% CO₂.

Abbreviation: Oxa, oxaloacetate; Pyr, pyruvate; Mal, L-malate; Iso, isocitrate; Ket, 2-ketoglutarate; Cit, citrate; and Fum, fumarate.

***Pseudomonas* sp. の菌体内 TCA 回路に及ぼす CO₂ 影響**

Air 対照区で増殖し、CO₂ 100% 置換区では全く増殖しなかった *Pseudomonas* I/II 型に分類される一菌株 (*Pseudomonas* sp.) を供試し、菌体内の 7 種の TCA 回路関連有機酸の組成を Fig. 6 に示した。有機酸組成を培養前の状態 (対照) と比較した場合、CO₂ 培養区ではリンゴ酸の増大とフマル酸およびクエン酸の減少が顕著に認められ、Air 培養区ではリンゴ酸およびピルビン酸の減少とフマル酸の増大がみられた。King ら²¹⁾ は 50% CO₂ 存在下での *Pseudomonas aeruginosa* の代謝有機酸の消長について検討した結果、リンゴ酸脱水素酵素およびイソクエン酸脱水素酵素が阻害を受けることを報告している。本実験の結果からは、間接的ではあるが CO₂ がリンゴ酸からオキサロ酢酸への反応に関与するリンゴ酸脱水素酵素を阻害し、リンゴ酸の相対的増大が起こったものと推察された。このように TCA 回路関連の酵素が CO₂ により阻害を受け、正常な代謝が行われなくなることも、CO₂ による増殖抑制メカニズムの要因のひとつになっているものと考えられる。

以上のことから、スケトウダラ切り身を CO₂ によるガス置換貯蔵した場合、そのシェルフライフが貯蔵日数で約 2 倍に延長され、ガス置換包装法の有効性が確認できた。また鮮魚の腐敗に関与する *Pseudomonas* 属および *Moraxella* 属などのグラム陰性桿菌は、グラム陽性球菌と比較して CO₂ に対する感受性が高く、増殖の抑制が認められた。このような CO₂ による増殖抑制メカニズムのひとつとして、TCA 回路のリンゴ酸脱水素酵素が CO₂ によって阻害を受け、正常な増殖を示さない状態になっている可能性が示唆された。

文 献

- 1) 天野慶之・横関現延・江口浩平・島川順二 (1972). 冷凍食品と食品衛生. 11-38, 73-105. 新思潮社, 東京.
- 2) Kirk, L.P., Wells, M.J. and Brown, W.D. (1981). Modified atmosphere storage of rockfish fillets. *J. Food Sci.* **47**, 181-184.
- 3) Molin, G., Stenström, I. and Ternström, A. (1983). The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen or air at 2°C. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 49-56.
- 4) 藤井健夫・平山昌宏・奥積昌世・西野 甫・横山理雄 (1989). 二酸化炭素・窒素混合ガス置換包装による生鮮マイワシのシェルフライフ. 日水誌 **55**, 1971-1975.
- 5) 岡 重美・西沢洋一・高間浩蔵 (1989). ガス置換貯蔵法によるラミコンカップ詰め魚肉切り身の鮮度保持に関する研究. 北大水産彙報 **40**(2), 138-146.
- 6) King, J.R., A.D. and Charles, W.N. (1967). Growth of a *Pseudomonas* by carbon dioxide. *J. Food Sci.* **32**, 575-579.
- 7) Tarr, H.L.A. (1954). Microbiological deterioration of fish postmortem, its detection and control. *Bact. Rev.* **18**, 1-15.
- 8) Coyne, F.P. (1933). The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. Part II. *J. Soc. Chem. Ind.* **52**, 19T-24T.
- 9) 石坂音治 (1968). 微量拡散分析試験法. 13-19. 南江堂, 東京.
- 10) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (eds.) (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Edition. 1246 p. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 11) Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.) (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume I. 965 p. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 12) Shewan, J.M., Hobbs, G. and Hodgkiss, W. (1960). The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 463-468.
- 13) 須山三千三・鴻巣章二 (1987). 水産食品学. 108-122. 恒星社厚生閣, 東京.
- 14) Baird-Parker, A.C. (1963). A classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.* **30**, 409-427.

- 15) Shaw, B.G. and Shewan, J.M. (1968). Psychrophilic spoilage bacteria of fish. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 89-96.
- 16) Shewan, J.M., Hobbs, G. and Hodgkiss, W. (1960). The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 463-468.
- 17) Lerke, P., Adams, R. and Farber, L. (1963). Bacteriology of spoilage of fish muscle. *Appl. Microbiol.* **11**, 458-462.
- 18) 奥積昌世・堀江 進・木村正幸・赤堀正光・川前正幸 (1972). 冷蔵海産魚の腐敗細菌 (第2報) 解凍魚の腐敗した場合のマイクロフローラ. 食衛誌 **13**, 418-421.
- 19) Sutherland, J.P., Paterson, J.T., Gibbs, P.A. and Murray, J.G. (1977). The effect of several gaseous environments on the multiplication of organisms isolated from vacuum-packaged beef. *J. Food Technol.* **12**, 249-255.
- 20) Silliker, J.H., Woodruff, R.E., Lugg, J.R., Wolfe, S.K. and Brown, W.D. (1977). Preservation of refrigerated meats with controlled atmosphere: treatment and post treatment effects of carbon dioxide on pork and beef. *Meat Science.* **1**, 195-204.
- 21) King Jr. A.D. and Charles, W.N. (1975). Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Food Sci.* **40**, 362-366.