

## ノート

## 水産物の一夜干しおよびベニズワイガニむき身中の生菌数測定における誤差範囲の推定について

長井 敏・森俊郎

(1997年9月2日受付)

## Estimation of the Range of Errors in Viable Bacterial Counts in Hastily Dried Marine Products and Boiled Crab Meats

Satoshi NAGAI and Toshio MORI

キーワード: 生菌数, 分析誤差, 水産加工品

1995年4月より, 食品衛生法施行規則と栄養改善法施行規則の一部が改正され施行された。すなわち加工食品に関して, 従来の製造年月日表示を, 賞味期限等の表示に替えるもので表示の移行期間は1997年3月31日までとなっている。また, 1995年7月より, PL法(製造物責任法)が施行され, 表示した賞味期限を保証できなければ, 損害賠償の対象になり得ることになった。このため, 加工業者は自社製品の保存性を正確に知ること, および安全性を高める必要性が出てきた。兵庫県但馬水産事務所試験研究室の加工部門では, 加工業者からの加工相談の総数に対して, 水産加工品の保蔵に関する分析試験の依頼が急増している。<sup>1,2)</sup>

製品の安全性を高めるために, また, できるだけ長期間, 製品の品質を保持するために多くの工夫が必要となるが, その度に水分, 塩分などの一般化学成分の分析や色, つや, 臭い等の品質のチェックをしなければならない。とりわけ生菌数の経時的な測定は, 製品の安全性を確認するために必須である。製品の製造工程の見直しなどで条件毎に保蔵試験をする場合, 非常に多くの検体で生菌数を測定しなければならない。ここで問題になるのが生菌数を計数する際に生じる測定誤差である。1検体毎に生菌数を数回測定すれば, 条件間で統計学的に有意な差があるのかどうかを知ることは容易である。しかし,

これが多検体になると, 非常に多くの労力と手間がかかり, 現実的には不可能な作業となる。

そこで今回は, 保蔵試験の依頼が最も多い兵庫県城崎郡香住町の加工業者により製品化された魚類一夜干しやカニのむき身製品を用いて, 生菌数測定時に生じる分析誤差を推定した。魚種ごと, あるいは同一魚種で同一ロットの製品でも生菌数が異なるサンプルについてそれぞれ分析誤差を求め, その誤差範囲から, 例えば, 一夜干しかレイの2個のサンプル間の生菌数の差の判定が可能かどうかについて考察した。

## 材料と方法

今回, 実験に用いた一夜干しは1997年1~4月にかけて但馬地区の加工業者が製品化したもので, 魚種はカレイ類(ヒレグロ, *Glyptocephalus stelleri*; ソウハチ, *Cleisthenes pinetorum*; ソウハチについては2業者が製品化したものを供試し, ソウハチ1, ソウハチ2とした), ハタハタ(*Arctoscopus japonicus*), およびニギス(*Argentina semifasciata*), イカ類はスルメイカ(*Todarodes pacificus pacificus*), 甲殻類はベニズワイガニ(*Chionoecetes bairdi*)である。各製品5個体の平均全長±標準偏差, および平均体重±標準偏差は, それぞれヒ

レグロで  $30.5 \pm 1.3\text{cm}$ ,  $131.8 \pm 6.4\text{g}$ , ソウハチ1で  $22.2 \pm 0.7\text{cm}$ ,  $79.6 \pm 6.9\text{g}$ , ソウハチ2で  $23.3 \pm 0.6\text{cm}$ ,  $83.7 \pm 8.8\text{g}$ , ハタハタで  $19.3 \pm 1.2\text{cm}$ ,  $39.8 \pm 3.7\text{g}$ , ニギスで  $18.8 \pm 1.1\text{cm}$ ,  $20.1 \pm 3.5\text{g}$ であった。スルメイカの平均外套背長±標準偏差, および体重±標準偏差は,  $26.6 \pm 0.6\text{cm}$ ,  $185.9 \pm 20.7\text{g}$ であった。なお, ペニズワイガニについては, 香住町の加工業者により製品化されたボイル後の脚の部分のむき身を使用した。

各サンプルにつき魚類一夜干し製品については5~10個体ずつ, スルメイカでは3個体, カニではむき身15本程度の可食部を細断後, 約2分間フードチョッパー(象印, BFA-NO4型)でホモジナイズした後, ストマフィルター(オルガノ)1袋に8~12g, 各サンプルにつき合計10袋ずつ入れた。1袋につきオートクレーブ滅菌した0.85% NaCl溶液100mlを入れ, ストマッカー(オルガノ, Stomacher Lab-Blender 400)で約90秒間処理し, 袋内の試料を均一にした。0.85% NaCl溶液9mlを入れた試験管(18mm × 200mm)を必要量だけオートクレーブ滅菌しておき, ストマッカーにより均一にされた試料を原液として, 10倍ずつの希釈液を作製した。あらかじめ作製しておいた3%食塩添加寒天培地(ニッスイ, 一般生菌数測定用標準寒天培地)に各希釈液100μlずつを滴下後, コンラージ棒で広げ, 温度20℃のインキュベーターで3日間培養した。寒天培地は各希釈段階につき1枚用いた。培養終了後, 各希釈段階における細菌コロニー数を平均し, 生菌数(CFU g<sup>-1</sup>)を算出した。1サンプルにつき10袋の測定結果から, その平均値と標準偏差を求めた。

10回の生菌数の測定結果が正規分布をとるならば, 平均値±2×標準偏差(σ)が95%信頼区間と一致するので, ここでは平均値±2σを分析誤差と定義した。また, 平均値のとりうる最大値と最小値の差をLog(平均値+2σ) - Log(平均値-2σ)とし, これを分析誤差範囲と定めた。

一夜干しの対象となるカレイ類の種類は輸入物も含めてかなり多く, 全種のカレイについて今回のような実験を行うのは困難である。そこでカレイ類については, 種類と生菌数の多少(温度10℃での保藏日数を変えることにより, 生菌数を調整した)をコンビネーションさせ

て実験することにより, 種間や生菌数の多少といった差異が分析誤差に及ぼす影響について検討した。

## 結果と考察

Table 1にカレイ類, ハタハタ, ニギス, スルメイカの一晩干し製品, およびペニズワイガニの脚のむき身製品の生菌数測定結果を示した。ヒレグロ, ソウハチ1, およびソウハチ2で得られた平均値および標準偏差はTable 1に示した通りであるが, 標準偏差は生菌数の多少で大きく変化し, 生菌数が多いほど大きい値を示した。ヒレグロ, ソウハチ1, およびソウハチ2の生菌数(平均値±2σ)は, それぞれ  $(9.2 \pm 4.4) \times 10^4$ ,  $(3.8 \pm 1.6) \times 10^7$ ,  $(7.3 \pm 2.8) \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup>であった。また, その分析誤差範囲Log(平均値+2σ) - Log(平均値-2σ)はそれぞれ0.44, 0.38, および0.35であり, これらは一桁の半分未満の値であった。カレイ類については種間および生菌数の多少の差に伴う分析誤差範囲の差はほとんど認められなかった。

ハタハタ一夜干し製品の生菌数A, B, およびCは同一ロットの製品を温度10℃で同時に保藏し, 保藏日数を変えることによって生菌数を調整したものであり, A, B, Cとしてそれぞれ示した。以下, ニギス, スルメイカ, およびズワイガニも同様な方法により生菌数を調整し, A, B, Cとしてそれぞれ示した。ハタハタのA, B, およびCの生菌数(平均値±2σ)は, それぞれ  $(2.1 \pm 1.5) \times 10^4$ ,  $1.5 \times 10^4 \pm 9.6 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^9 \pm 5.4 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup>であった。その分析誤差範囲Log(平均値+2σ) - Log(平均値-2σ)はそれぞれ0.75, 0.64, および0.53であり, 一桁の半分から一桁に近い値であった。カレイ類で得られた値に比べて大きい値であった。また, カレイ類同様, 分析誤差範囲は生菌数の多少に左右されることはなかった。

ニギス一夜干し製品のA, B, およびCの平均生菌数(平均値±2σ)は, それぞれ  $1.1 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^4$ ,  $(5.0 \pm 2.4) \times 10^4$ ,  $(2.2 \pm 1.7) \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup>であった。分析誤差範囲Log(平均値+2σ) - Log(平均値-2σ)はそれぞれ0.24, 0.44, および0.94であり, ニギスについては, カレイ類やハタハタの場合とは異なる

Table 1. Viable bacterial counts in hastily dried marine products and boiled crab meats, and the ranges of errors in their measurement.

Marine product	Mean (CFU g <sup>-1</sup> ) (n=10)*	S.D. (CFU g <sup>-1</sup> ) (σ)	Log (Mean+2σ)- Log (Mean-2σ)
a hastily dried <i>Glyptocephalus stelleri</i>	9.2x10 <sup>4</sup>	2.2x10 <sup>4</sup>	0.44
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 1**	3.8x10 <sup>7</sup>	7.9x10 <sup>6</sup>	0.38
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 2**	7.3x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>	0.35
a hastily dried <i>Arctoscopus japonicus</i>	2.1x10 <sup>5</sup>	7.3x10 <sup>4</sup>	0.75
A***			
B	1.5x10 <sup>6</sup>	4.8x10 <sup>5</sup>	0.64
C	1.0x10 <sup>9</sup>	2.7x10 <sup>8</sup>	0.53
a hastily dried <i>Argentina semifasciata</i>	1.1x10 <sup>5</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	0.24
A			
B	5.0x10 <sup>5</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	0.44
C	2.2x10 <sup>8</sup>	8.6x10 <sup>7</sup>	0.94
a hastily dried <i>Todarodes pacificus pacificus</i> A	5.9x10 <sup>6</sup>	2.2x10 <sup>6</sup>	0.82
B	3.8x10 <sup>7</sup>	7.9x10 <sup>6</sup>	0.38
C	1.1x10 <sup>9</sup>	2.1x10 <sup>8</sup>	0.33
boiled leg meat of <i>Chionoectes bairdi</i>	6.1x10 <sup>4</sup>	1.9x10 <sup>4</sup>	0.65
A			
B	7.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	0.58
C	7.1x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>	0.49

\*, Numbers in parentheses indicate the number of replicates examined. \*\*, They were made by another processor of marine products. \*\*\*, The products of A, B, and C were from the same lot. The bacterial density was adjusted by changing the preservation period to confirm the variance of the range of errors of measurement.

り、これらの値は、生菌数が多くなるに従い顕著に大きくなる傾向を示した。

スルメイカー一夜干し製品A, B, およびCの平均生菌数(平均値 $\pm 2\sigma$ )は、それぞれ $(5.9 \pm 4.4) \times 10^6$ ,  $(8.8 \pm 5.0) \times 10^7$ ,  $1.1 \times 10^9 \pm 4.2 \times 10^8$  CFU  $g^{-1}$ であった。また、 $\text{Log}(\text{平均値} + 2\sigma) - \text{Log}(\text{平均値} - 2\sigma)$ はそれぞれ0.82, 0.58, および0.33であり、分析誤差範囲は生菌数によって異なり、生菌数が少ないほど高い値を示した。この傾向は、ニギスで得られた結果と逆であった。

ベニズワイガニむき身製品のA, B, およびCの平均生菌数(平均値 $\pm 2\sigma$ )は、それぞれ $(6.1 \pm 3.8) \times 10^6$ ,  $(7.0 \pm 4.0) \times 10^7$ ,  $(7.1 \pm 3.6) \times 10^8$  CFU  $g^{-1}$ であった。また、 $\text{Log}(\text{平均値} + 2\sigma) - \text{Log}(\text{平均値} - 2\sigma)$ はそれぞれ0.65, 0.58, および0.49であり、分析誤差範囲は生菌数が少ない場合に若干大きくなる傾向が認められたが、その差は大きくはなかった。

カレイ類、ハタハタ、スルメイカー一夜干し製品、およびベニズワイガニのむき身製品では、生菌数が少ないほど、10回の測定値がばらつく傾向が認められた。すなわち、生菌数が少ないほど分析誤差範囲 $\text{Log}(\text{平均値} + 2\sigma) - \text{Log}(\text{平均値} - 2\sigma)$ が大きくなった。これは生菌数が少ない時は、製品中での細菌の増殖がパッチ状に起こるため、細菌の分布密度が部分的に大きく異なり、サンプルをホモジナイザーでよく混合した後に分取しても、未だ細菌の分布が不均一であることが直接的な原因と推察される。これに対して、製品中の生菌数が $10^6 \sim 10^8$  CFU  $g^{-1}$ のような非常に高い場合、細菌の増殖ステージはほぼ定常期に達し、細菌の分布がある程度均一になっているために、生菌数が多いほど分析誤差範囲が小さい値を示すという可能性が考えられる。一方、ニギスでは他の製品で得られた結果とは逆に、生菌数が多いほど分析誤差範囲が顕著に大きくなった。他の魚類一夜干しでは内臓を除去した後に製品化するが、ニギスの一夜干しでは内臓を除去しない。ニギスでは内臓を除去しない分、他の魚類一夜干しに比べて、全体をよく乾燥させて水分を低めに調製する。香住町の加工業者の製品化された魚類一夜干しの水分は、カレイ類で70~80%, ハタハタで65~75%, ニギスで40~70%である(森未発表)。ニギスの表面は比較的良好に乾燥しているが、

内臓部分は表面ほど乾燥していない。内臓部分は細菌数も高く、従って細菌は、内臓部分で増殖することになる。ホモジナイザーでよく混合しても細菌の多い内臓の小片がサンプルに混入していると、その分、生菌数が大きい値を示すことになる。細菌の塊である内臓小片がサンプルに混入するかもしれないかで測定値が大きくなる可能性が考えられる。このため、ニギス一夜干し製品では、生菌数が高いほど分析誤差範囲が大きくなるのではないかと推測される。

カレイ類については、種類を問わず、また、同一種でも異なる加工業者によって製品化されたものや生菌数の多少にかかわらず、分析誤差範囲 $\text{Log}(\text{平均値} + 2\sigma) - \text{Log}(\text{平均値} - 2\sigma)$ は大きく異ならなかったことから、分析誤差範囲をヒレグロでは0.44, ソウハチでは0.38を採用しても差し支えないと判断できる。仮にaとbという一夜干しサンプルの生菌数を測定した場合、その対数変換した値の差がヒレグロでは $\leq 0.44$ , ソウハチでは $\leq 0.38$ であれば、両生菌数は分析誤差範囲内にあり、両者の間には有意な差異は認められないと判断し、ヒレグロで $> 0.44$ , ソウハチで $> 0.38$ であれば、両者の生菌数の差は分析誤差ではなく、サンプル間に存在する差と判定できよう。

ハタハタおよびベニズワイガニについてもカレイ類と同様、分析誤差範囲が生菌数の多少によって影響を受けているようには見えなかった。従って、ハタハタおよびベニズワイガニの分析誤差は、それぞれその範囲の最も大きかった0.75および0.65を採用することで問題はないと考えられる。一方、ニギスについては、分析誤差範囲はサンプル中の生菌数が多いほど大きくなる傾向にあったことから、仮に2つのサンプルa, bの生菌数の差が有意な差かどうかを検討する場合、Table 1に示したA, B, およびCの中で最も生菌数が近い分析誤差範囲を用いる必要がある。この生菌数a, bが、BとCの中間の生菌数であれば、BとCの生菌数を比例配分して分析誤差範囲を求めることにより、生菌数a, bの有意さの判定が可能となる。ニギスとは逆に、スルメイカー一夜干し製品における分析誤差範囲はサンプル中の生菌数が少ないほど大きくなる傾向にあったことから、ニギスの場合と同様、仮にサンプルa, bの生菌数の差を比較する場合、Table 1に示したA, B, およびCの中で最も

生菌数が近い分析誤差範囲を用いればよい。

現在既に、水産加工業者から依頼のあった一夜干し製品やカニむき身製品における生菌数の測定や保蔵試験で得られた結果を比較・検討するのに、今回報告した分析誤差範囲を用いてサンプル間の有意差を判定しており、静菌効果のある調味料の探索や加工行程の見直しをするために役立てている。厳密に言えば、条件の異なるもの（加工工程の若干異なる製品）を統計学的に比較することはやや問題もあるが、大量に持ち込まれてくる製品の細菌レベルでの品質をより迅速にかつ正確に評価し、加工業者にアドバイスするためには、やむを得ない処理と考えられる。今後の課題として、さらに他の多くの水産物加工品の製品間での生菌数を比較するため、同様な作業を進めていく必要がある。また、このような煩雑な作業をすることなく、もう少し簡便・迅速にかつ正確に生菌数を測定する方法を開発することも、我が国における HACCP 方式の導入とともに必要となるであろう。

### 謝辞

兵庫县城崎郡香住町の蔵平水産株式会社の蔵野 勇社長にはカレイ類の一夜干し製品を提供して戴きました。心から厚くお礼申し上げます。

### 要約

1) 兵庫县城崎郡香住町の加工業者が製品化した水産物一夜干しおよびベニズワイガニのむき身製品を用いて、生菌数測定時に生じる分析誤差を推定した。同一サンプルをそれぞれ 10 回ずつ測定し、平均値と標準偏差を求めた。分析誤差に及ぼす生菌数の多少の影響を考慮して生菌数を 3 段階に調整した。平均値  $\pm (2 \times \text{標準偏差} (\sigma))$  を分析誤差と定義し、その分析誤差範囲  $\text{Log}(\text{平均値} + 2\sigma) - \text{Log}(\text{平均値} - 2\sigma)$  から、2 個の生菌数測定値の有意差の判

定が可能かどうかについて考察した。

- 2) カレイ類については、種類を問わず、また、同一種でも異なる加工業者によって製品化されたものや生菌数にかかわらず、分析誤差範囲は大きく異ならなかった。従って、分析誤差範囲として、ヒレグロでは 0.44、ソウハチでは 0.38 を採用しても差し支えないと判断した。仮に a と b という一夜干しサンプルの生菌数を測定した場合、その対数変換した値の差がヒレグロでは  $\leq 0.44$ 、ソウハチでは  $\leq 0.38$  であれば、生菌数 a と b の差は分析誤差によるものと判断し、ヒレグロで  $> 0.44$ 、ソウハチで  $> 0.38$  であれば、両者の生菌数の差は分析誤差ではなく、サンプル間に存在する差と判定できよう。
- 3) ハタハタおよびベニズワイガニについてもカレイ類と同様、分析誤差範囲  $\text{Log}(\text{平均値} + 2\sigma) - \text{Log}(\text{平均値} - 2\sigma)$  が生菌数の多少によって影響を受けることはなかった。従って、ハタハタおよびベニズワイガニの分析誤差範囲として、それぞれその値が最も大きかった 0.75 および 0.65 を採用することで問題はないと考えられる。一方、ニギスについては、サンプル中の生菌数が多いほど分析誤差範囲が大きくなる傾向にあったことから、仮に 2 サンプル a と b の生菌数の差が分析誤差によるのか、サンプル間の差かどうかを検討する場合、Table 1 に示した A、B、および C の内で最も生菌数が近い分析誤差範囲を用いる必要がある。

### 文献

- 1) 森 俊郎・岩佐隆宏・谷脇徹夫：加工相談及び分析試験 加工相談、平成 6 年度兵庫県但馬水産事務所試験研究室事業報告、1995、130pp。
- 2) 森 俊郎・岩佐隆宏・谷脇徹夫：加工相談及び分析試験 加工相談、平成 7 年度兵庫県但馬水産事務所試験研究室事業報告、1996、102pp。