水産ねり製品の変敗に関する研究—I

Bacillus licheniformis による包装かまぼこの軟化変敗について*

森 一雄・沢田玄道・鍋谷 修・丸尾重昭・平野とも子

(1973 年 6 月 21 日受理)

Studies on the Spoilage of Fish Jelly Products—I

Softening Spoilage of Film Packaged Kamaboko Due to *Bacillus licheniformis*Kazuo MORI**, Harumichi SAWADA**, Osamu NABETANI**,
Shigeaki MARUO**, and Tomoko HIRANO**

The bacterial spoilage of film packaged kamaboko was investigated with respect to the properties of the isolated causative bacteria and the source of the contamination in the kamaboko.

The isolated causative bacteria was identified as *Bacillus licheniformis* and, among various kamaboko raw materials, was found only in potato starch.

In addition, it was proven that the addition of sucrose hastens this type of spoilage and that the use of some lower fatty acids is an effective means of preservation from spoilage.

包装かまぼこ形状が類似する魚肉ソーセージの変敗に関する研究は、従来数多く報告されているが、包装かまぼこについては近年普及したためか、比較的少ない。

無包装かまぼこの変敗型式については、木俣¹⁾によれば、第 I 型（含糖かまぼこ）としてかまぼこ表面に酸性、透明、粘稠性の水滴様物質を生ずるもの（酸生成型）、第 II 型（無糖かまぼこ）としては不透明のバター、もしくはチーズ様物質を生ずるもの（アンモニア生成型）、第 III 型（無糖かまぼこ）は最初からカビを発生するものの 3 種に大別した。

包装かまぼこについては、無包装かまぼこや魚肉ソーセージの変敗とはやや異なり、包装かまぼこ特有の変敗型式も認められており、既に茂木²⁾により、ケーシングと製品表面の間に小気泡の発生する気泡発生型、かまぼこ特有の弾力性がなくなり、組織が崩壊する軟化型、さらに表面が部分的に円形褐変する斑紋型変敗の 3 つに分類し報告されているが、本報告では実験室で試作した包装かまぼこにおいて、これらの変敗型式とは明らかに異なるスポット状の部分軟化型変敗の発生を認め、また同様な変敗例が市販のなると巻にも発見されたことより、本変敗原因菌の分離同定、汚染源の調査、再現実験、さらに変敗発生に関連する物質を追求すると共に、本変敗防止法について検討を行い、興味ある知見が得られたので報告する。

実験方法

試料 供試かまぼこ (Table 1) は常法により試作し、塩化ビニリデンケーシング (直径 30 mm) に約 200 g 充填し、90°C で 50 分間加熱湯煮した後、冷却して 30°C の恒温器に入れ、連日外観、および内部を切断して観察し、異常を認めたものを細菌試験などに供した。

* 本研究は昭和 48 年 4 月 4 日 日本水産学会春季大会 (東京) において発表した。

** 日本新薬 (株) 食品技術研究所 (Nippon Shinyaku Co., Ltd., Nishioji-dori, Minami-ku, Kyoto).

Table 1. Composition of kamaboko used for studies of softening spoilage.

Materials	Composition (Parts)
Frozen fish paste*	100
Potato strach	5
Sodium chloride	3
Sucrose	1
Monosodium glutamate	1
Water and ice	15

* Alaskan pollack.

原因菌の分離、および同定法 外観、および内部に異常が認められた試料より、無菌的にスポット状の部分軟化変敗部位 10 g を採取し、滅菌生理食塩水 90 ml を加え、十分にホモジナイズした。かまぼこ試作時の原料も同様に処理して均一な懸濁液を調製した。これらの懸濁液を滅菌生理食塩水に適当に希釈した後、標準寒天培地に接種し、30°C で 48 時間培養後、コロニー計数により細菌数を測定すると共に、コロニー全部を釣菌して菌を分離した。分離した菌株は標準寒天培地で純粋分離した後、Bergey's Manual³⁾, Smith⁴⁾, および東⁵⁾ の方法に従って同定した。また、耐熱性菌についてはかまぼこ原料からの分離菌株を滅菌生理食塩水にて均一に懸濁したものを 90°C の湯煎にて 30 分間加熱した後、平板混釈法により生菌数を測定し、加熱前の生菌数と比較した。

pH の測定 供試料に等量の水を加え、十分にホモジナイズした後、ガラス電極 pH メーターで測定した。

結果と考察

軟化変敗の発現状態 スポット状の部分軟化型変敗はかまぼこ表面に大きさ 2-8 mm の円形のコブ状突起として出現し、防腐剤無添加試料では、30°C 保存で早い場合には 2 日目頃から、遅くても 4 日目頃にはかまぼこ表面の各所に認められるようになった。このコブ状突起はケーシング表面に明瞭に膨出し、その数も 10 日目頃迄は日数と共に徐々に増加し且つ大きくなったが、それ以後はあまり変化せず、かまぼこ全体が軟化する。

本変敗はかまぼこ表面のみならず、内部にも同程度に発生し、切断すると 4 日以上保存試料では大きさ 2-8 mm の球形の変敗部位が各所に認められた。

本変敗部位には無色、無臭で pH 6.5 付近の多量の粘質物が蓄積されている。同様所見の突起状変敗に対して、横関ら⁶⁾により、魚肉ソーセージで部分ガス変敗として、さらに茂木ら²⁾によつて包装かまぼこでの気泡発生型変敗として、既に 2 つの報告がなされているものは、いずれもケーシングと製品の間にガスの蓄積を認めている点で明らかに本変敗とは異なる。

変敗試料における細菌の増殖状態 透明な粘質物の蓄積していた軟化変敗部位と、その周囲の外観、および弾性に全く変化の生じていない正常部位とのそれぞれの生菌数を比較した結果を Table 2. に示した。軟化変敗部位では、培養所見より明らかに同一菌種と判断できる単一菌種のみが多数増殖しており、一方、正常部位では、軟化変敗部位の千分の 1 以下の細菌しか増殖しておらず、しかも培養所見より数種の菌種が混在しているのが認められた。

Table 2. Number of viable bacteria in the normal and the softened parts of kamaboko*.

Parts	Number of viable bacteria in 1 g
Normal parts	2.5×10^4
Softened parts	6.4×10^7

* Stored for 6 days at 30°C.

軟化変敗部位より分離した菌株の形態、および性状 軟化変敗部位には殆ど同一の性質を持つた、ほぼ単一の菌種と思われる菌株が純培養的に繁殖して、正常部位との生菌数の違いからも、本菌株が変敗原因菌と推定された。

本菌は *Bacillus licheniformis* の記載³⁻⁵⁾と同様な性質を持ち、さらに *Bacillus licheniformis* IFO 12107 標準株とも、形態的性質 (Table 3), 培養的性質 (Table 4), 生理的性質 (Table 5), および酸酵試験 (Table 6) の分類学的諸性質がほぼ一致したことより、*Bacillus licheniformis* と同定された。

Table 3. Morphological characters of the isolate.

Strains	Vegetative cells		Sporangia	Spores		
	Form	Size (μ)		Location	Form	Size (μ)
<i>B. licheniformis</i> *	rod	0.6-0.8 $\times$ 1.5-3.0	not definitely swollen	central or paracentral	ellipsoidal to cylindrical	0.5-0.9 $\times$ 1.0-1.5
<i>B. licheniformis</i> IFO 12107	ditto	0.7-0.9 $\times$ 2.0-3.0	ditto	ditto	ditto	0.5-0.6 $\times$ 1.0-1.5
Isolate	ditto	0.7-0.8 $\times$ 1.0-2.0	ditto	ditto	ditto	0.6-0.7 $\times$ 1.0-1.5

Strains	Gram stain	Motility
<i>B. licheniformis</i> *	+	+
<i>B. licheniformis</i> IFO 12107	+	+
Isolate	+	+

* Described by Bergey's manual 7th Ed.

Table 4. Cultural characters of the isolate.

Strains	Agar colonies	Agar slants	Nutrient broth	Potato
<i>B. licheniformis</i> *	large, spreading, rough or rugose, hairy outgrowth. offwhite.	abundant, rough, opaque, adherent, hairy outgrowth. matt.	clear with heavy wrinkled, tough pellicle.	heavy, spreading, wrinkled, warty, extruded droplets. pink.
<i>B. licheniformis</i> IFO 12107	large, rough or rugose, hairy out- growth. offwhite.	ditto	ditto	ditto
Isolate	large, spreading, smooth, offwhite.	ditto	ditto	ditto

* Described by Bergey's manual 7th Ed.

軟化再現 軟化変敗部位より分離した、*Bacillus licheniformis* の芽胞懸濁液を Table 1 に示した組成のすり身に、 7.5×10^2 /g の芽胞数になるように添加した。このすり身を用いて調製したかまぼこ試料での軟化再現結果を Table 7 に示した。

分離菌の芽胞は 90°C , 50 分間の加熱湯煮で殆ど死滅せず、 5.8×10^2 /g の試料中での生残菌数を示し、明らかにスポット状の部分軟化型変敗の再現が認められた。しかし、芽胞無添加の試料でもわずかながら軟化が発生したが、これはかまぼこ試作時の原料より原因菌が混入したためと考えられる。

汚染源の追求 Table 1 に示したかまぼこ試作の各原料について、おのおの生菌数、および耐熱性菌数を測定した結果を Table 8 に示した。生菌数は無塩冷凍スケトウすり身に多く、ついでわずかながら馬鈴薯澱粉に認められただけである。一方、耐熱性菌は馬鈴薯澱粉にのみ認められ、さらにそのうち原因菌と同種の *Bacillus licheniformis* の存在も確認されたため (Table 9), 本原因菌は馬鈴薯澱粉より混入汚染したものと断定した。

Table 5. Physiological characters of the isolate.

Strains	Hydrolysis of starch	Production of acetyl-methyl carbinol	Reduction of nitrate to nitrite	Utilization of citrate	Hydrolysis of gelatin
<i>B. licheniformis</i> *	+	+	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> IFO 12107	+	+	+	+	+
Isolate	+	+	+	+	+

Strains	Hydrolysis of casein	Anaerobic growth in glucose broth	Anaerobic production of gas from nitrate	NaCl (8%) broth
<i>B. licheniformis</i> *	+	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> IFO 12107	+	+	+	+
Isolate	+	+	+	+

* Described by Bergey's manual 7th Ed.

Table 6. Fermentation tests of the isolate.

Sugars	Strains		Sugars	Strains	
	Isolate	<i>B. licheniformis</i> IFO 12107		Isolate	<i>B. licheniformis</i> IFO 12107
Glucose	+	+	Trehalose	+	+
Fructose	+	+	Raffinose	±	±
Mannose	+	+	Inositol	±	±
Galactose	±	±	Mannitol	+	+
Rhamnose	±	±	Sorbitol	+	±
Xylose	±	±	Glycerol	+	+
Arabinose	+	+	Starch	+	+
Sucrose	+	+	Dextrin	+	+
Maltose	+	+	Inulin	+	+
Lactose	±	±			

(Incubated for 7 days at 30°C).

Table 7. Reproduction of partial softening spoilage by the strain isolated.

Days of storage Samples	Number of viable bacteria in 1 g		Reproduction of partial softening spoilage*	
	0	6	6	10
Control (Not inoculated)	$< 1.0 \times 10$	7.1×10^5	±	+
Inoculated (7.5×10^2 spores per g of fish paste)	5.8×10^2	8.1×10^5	‡	‡‡

* Key to symbols: (—...Unchanged), ±...Very slightly softened, +...Slightly softened, ‡...Moderately softened, ‡‡...Heavily softened.

Table 8. Viable bacterial counts and percent of spore-forming bacteria in kamaboko materials.

Materials	Number of viable bacteria in 1 g	Percent of spore-forming bacteria
Frozen fish paste	4.9×10^3	N.D.*
Potato starch	6.0×10	99<
Sodium chloride	$<1.0 \times 10$	N.D.
Sucrose	$<1.0 \times 10$	N.D.
Monosodium glutamate	$<1.0 \times 10$	N.D.
Water and ice	$<1.0 \times 10$	N.D.

*N.D....Non detected.

Table 9. Composition of the isolates from potato starch.

Number of isolates per g	Species
10	<i>B. licheniformis</i>
10	<i>B. megaterium</i>
8	<i>B. pumilus</i>
6	<i>B. polymyxa</i>
5	<i>B. circulans</i>
5	<i>B. cereus</i>
4	<i>B. subtilis</i>
2	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>
10	Not identified (<i>Bacillus</i> sp.)
Total 60	

軟化変敗に関する物質 軟化変敗部位に多量に蓄積する粘質物の生成とかまぼこに添加された原料との関係を検討した。使用した冷凍スケトウすり身は塩酸レゾルシン反応⁷⁾陽性(ケトース反応を呈する蔗糖様物質の存在)であつたため、新鮮なハモの肉を、水洗を繰り返して可溶性の糖類と蛋白質とをほぼ完全に除去した後、スケトウすり身の代りに使用した。さらに、蔗糖を除いた以外は Table 1 に示した組成に従い試料を調製した。これを対照として、おのおの5%濃度になるように蔗糖、葡萄糖、およびソルビトールを添加した各試料を調製し、軟化発生を観察した (Table 10)。馬鈴薯澱粉、およびグルタミン酸ナトリウムなどが添加されていた対照試料、さらに葡萄糖、およびソルビトール添加試料のいずれにおいても軟化変敗は発生せず、蔗糖添加試料のみにスポット状の部分軟化型変敗が発生したことより、本変敗は蔗糖と密接な関連があることが判明した。

Table 10. Influence of kamaboko materials on the partial softening spoilage.

Samples	Reproduction of partial softening spoilage*		
	Days of storage		
	2	3	5
Control**	—	—	—
Sorbitol	—	—	—
Glucose	—	—	—
Sucrose	—	+	‡

* Key to symbols used were the same as those in Table 7.

** Composition was the same as described in Table 1 except that sucrose was not added.

軟化変敗防止方法 本変敗防止対策として、食品添加物を中心に広く添加実験により検索した結果、特に脂肪酸類のいくつかに、即ち低級脂肪酸類に顕著な本変敗防止効果を認めたが、高級脂肪酸類（パルミチン酸、ステアリン酸）ではその効果は極めて弱かった（Table 11）。

Table 11. Effect of some fatty acids on prevention of the partial softening spoilage of kamaboko.

(1)

Samples	Conc. (%)	Number of viable bacteria in 1 g		Reproduction of partial softening spoilage**		pH	
		Days of storage					
		0	6	6	10		0
Control*	—	$<1.0 \times 10$	1.6×10^6	‡	‡‡	6.44	
Acetic acid	0.05	$<1.0 \times 10$	9.8×10^3	—	+	6.16	
	0.10	—	$<1.0 \times 10$	—	—	5.95	
Butyric acid	0.05	—	2.9×10^5	±	+	6.23	
	0.10	—	$<1.0 \times 10$	—	±	6.10	
Caproic acid	0.05	—	1.5×10^5	—	±	6.30	
	0.10	—	$<1.0 \times 10$	—	—	6.17	
Caprylic acid	0.05	—	7.7×10^3	—	+	6.33	
	0.10	—	$<2.0 \times 10$	—	±	6.26	
Capric acid	0.10	$<1.0 \times 10$	$<1.0 \times 10$	—	—	6.33	
	0.20	—	$<1.0 \times 10$	—	—	6.28	

* 0.5×10 spores per g of fish paste were inoculated.

** Key to symbols used were the same as those in Table 7. All samples were added 0.2% sorbic acid.

(2)

Samples	Conc. (%)	Number of viable bacteria in 1 g		Reproduction of partial softening spoilage**		pH
		Days of storage				
		0	6	6	12	
Control*	—	5.8×10^2	8.1×10^6	†	‡	6.43
Acetic acid	0.05	3.5×10^2	6.0×10^6	—	†	6.15
	0.10	—	1.0×10^3	—	—	5.95
Capric acid	0.20	—	1.0×10^3	—	—	6.27
	0.40	—	4.0×10^2	—	—	6.12
Palmitic acid	0.20	—	8.3×10^6	+	†	6.29
	0.40	—	1.3×10^6	±	†	6.24
Stearic acid	0.20	3.7×10^2	7.6×10^6	+	‡	6.33
	0.40	—	1.3×10^6	±	†	6.27

* 7.5×10^2 spores per g of fish paste were inoculated.

** Key to symbols used were the same as those in Table 7. All samples were added 0.2% sorbic acid.

市販かまぼこでの本軟化変敗例 市販品 7 社の包装かまぼこについて予備的に保存試験を実施したところ、3 社のなると巻において、試作かまぼこでの変敗と同一性状のスポット状部分軟化型変敗の発生を認め、さらにその変敗部位より、おのおの原因菌を分離し検討した結果、いずれも *Bacillus licheniformis* と認めら

れた。この結果より、本菌によるスポット状の部分軟化型変敗は普遍的な変敗形態の一つと考えられたが、さらにこの点については検討を継続している。

要 約

1. 実験室で試作した包装かまぼこにおいて、スポット状の部分軟化型変敗の発生を認めた。
2. 本変敗の原因菌は *Bacillus licheniformis* と同定され、汚染源はかまぼこ原料として使用した馬鈴薯澱粉であった。
3. 本変敗はかまぼこに添加する蔗糖と密接な関連があり、さらに低級脂肪酸がその防止対策上、有効であった。
4. 本変敗は市販のなると巻においても発見され、普遍的な変敗形態と考えられる。

文 献

- 1) 木俣正夫：本誌，**16**, 428-432 (1951).
- 2) 茂木幸夫・松原瑞穂：食衛誌，**11**, 49-51 (1970).
- 3) R. S. BREED, E. G. D. MURRAY and N. R. Smith: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7th ed., Williams and Willkins, Baltimore (1957).
- 4) N. R. SMITH, R. E. GORDON and F. E. CLARK: "Aerobic Sporeforming Bacteria", Agriculture Monograph, No. 16, U.S. Department of Agriculture, (1952).
- 5) 東 量三: "New Food Industry", **4**, (10), 67-70 (1962).
- 6) 横関源延・大川洋子：本誌，**30**, 1015-1021 (1964).
- 7) J. H. ROE, J. H. EPSTEIN and N. P. GOLDSTEIN: *J. Biol. Chem.*, **178**, 839-845 (1949).