水産ねり製品の褐変について—I.

褐変原因菌の来源

金山 龍男・藤田 八束・松田 敏生

(1972 年 12 月 12 日受理)

On the Brown Discoloration in Fish Jelly Products—I.

Sources of Bacteria Causing Browning

Tatsuo KANAYAMA, Yatsuka FUJITA and Toshio MATSUDA*

Sources of bacterial contamination causing brown discoloration in fish jelly products during the manufacture and storage in factories were investigated. The properties of the browning bacteria and the reason for the occurrence of brown discoloration were also studied.

No browning bacteria were found among air-borne microorganisms nor on the surface of the machinery and other equipment in the factories where brown discoloration had occurred. However, two strains of browning bacteria were isolated from frozen fish pastes of Alaska pollack and pre-cooked raw material ready for making into fish jelly products.

UFF-15, one of the above two strains, was identified as *Achromobacter brunificans* AJ 3230 which has been described by Ogawa *et al*, while the other strain, UFF-115, had different properties.

本報告での水産ねり製品の褐変とは、ねり製品を常温に放置しておく、数日で、高温多湿の季節には1晩で表面の一部が褐色に変化し、反応が進むと黒褐色を帯び、表面全体さらには製品の内部にまで褐変が浸透し、さらに放置しておくとも黒色に近くなり、pHの低下とともに酸臭も認められ、製品は堅く脆くなる現象である。

この現象に関しては、すでに小川ら¹⁾が褐変したかまぼこ、揚げかまぼこ、ちくわなどの表面から原因菌を分離して *Achromobacter brunificans* AJ 2320 と同定し、この細菌がねり製品あるいは培地中にグルコースとたん白質あるいは特定のアミノ酸などと共存するときに発育すると、アミノ・カルボニル反応を促進し、メラノイジン色素を生成するためであると報告している。^{1,2)}

しかし今までのところ、この原因菌の来源は全く究明されていないので、著者らは昭和46年夏期に褐変の多発したねり製品工場において、製造工程を中心とした原因菌の来源調査を行なった。その結果、小川らの報告した原因菌およびそれとは異なつた菌株を発見した。さらに褐変製品発生の諸要因を追求し、ある程度の褐変防止法の知見を得た。

本報告では、ねり製品に褐変が発生した2工場について、褐変原因菌の来源調査を実施し、各種の場所より分離された細菌をねり製品に塗抹する褐変再現試験および製品の加熱状況の結果を報告する。

実験方法

褐変原因菌の検出培地 小川らの褐変原因菌の褐変発生の条件などを参考として、ペプトン 1.0%, 牛

* 上野製薬研究所 (Food Additive Section Research Laboratory, Ueno Fine Chemical Industries, LTD. Shimoichiba Itami City)

(印刷費負担)

エキス 0.5%, グルコース 5%, グルタミン酸ソーダ 5%, 食塩 0.5%, 寒天 1.5%, pH 7.0~7.5 の培地 (以下 PGG agar と略称する) を使用した。被検菌をこの培地に塗抹して, 30°C に培養すると, *Achromobacter brunificans* AJ 3230 類似菌ならば培地を褐変させる。

汚染源の調査法 第1回の調査 (1971年7月) では, Y かまぼこ工場で Nutrient agar のみを用いて, 落下菌, 器具機材, 用水, 原料すりみなどから菌を採取した。これらの菌をそれぞれ市販ねり製品 (小型ちくわ) に塗抹する褐変再現試験によつて褐変能の有無を調査した。落下菌の測定については, 急冷室のコンベヤーラインの全工程を5段にわけて開蓋し, 包装室内では5分間開蓋した後, 30°C 48時間培養した。使用したベトリ皿の面積は 63.58 cm² であつた。器具機材については Swab 法により約 10 cm² の面積を滅菌ガーゼによりふきとり, Nutrient agar を用い, 常法通り培養した。第2回の調査 (1971年10月) においては, 第1回の結果および小川らの報告を参照して, K かまぼこ工場で PGG agar のみを用い, 落下菌 (5分間開蓋) と生すりみからの菌を採取し, 培地上で褐変する細菌のみを分離した。第3回の調査 (1972年3月) は再度 Y かまぼこ工場において, 落下菌 (5分間開蓋, PGG agar), 器具機材 (Swab 法—10 cm², Nutrient agar) および用水中の細菌について常法通り調べた。また冷凍すりみおよび生原料からの原因菌の分離には, Nutrient agar, SS agar (ニッサン) および MacConkey agar (ニッサン) を使用し, これら3種の培地の分離菌はねり製品塗抹試験により褐変能の有無を調べ, 同時にまた PGG agar に試料を塗抹することにより原因菌の存在の有無も調べた。

分離された褐変原因菌の性状比較 Manual of Microbiological Method³⁾ により, 味の素 (株) の御好意により分与を受けた小川らの同定した *Achromobacter brunificans* AJ 3230 と著者らの分離した褐変原因菌との性状比較試験を行なつた。

褐変原因菌の耐熱性試験 培地を用いる試験として, 1白金耳の菌を 10 ml の生理食塩水中に懸濁し, さらにその 1白金耳を 10 ml のペプトン水中に懸濁後, 温水槽中で所定の温度で一定時間加熱した後, 水道水中で冷却, 30°C で2日間培養し, 発育の有無によつて熱抵抗性を判定した。さらに褐変原因菌を 1g 中 10^{4~5} 程度になるように冷凍すりみ中にねり込み, でんぷん 5%, 食塩 2%, 氷水 7%, グルタミン酸ソーダ 1%, 複合調味料 1% およびグルコース 5% を混合して板付かまぼこを作製し, 製パン用オーブン中で, 所定の温度で一定時間加熱後, ただちにサーミスターサーモメーターで中心温度を測定するとともに生菌数を測定した。この製品を 30°C で保存し, 褐変の発生の有無を7日間にわたつて観察した。

加熱中心温度の測定法 ねり製品の加熱中の中心温度はサーミスターサーモメーターにより測定した。

結 果 と 考 察

PGG agar による褐変原因菌の検出性の検討 PGG agar に褐変菌を含む8株の細菌を接種し, 褐変現象の発現の有無を観察したところ, Table 1 に示したように, 褐変原因菌 (*Achromobacter brunificans* AJ 3230) が存在すれば, 培地を明らかに褐色に変化させることを認めた。従つてこの検出培地を使用すれば落下菌や生原料中の生菌数の中から *Achromobacter brunificans* 類似の褐変原因菌の存在の有無を調べることができる。

褐変原因菌の汚染源 褐変製品が発生した工場において, 落下菌, 器具機材, 生原料および用水から分離された約 1000 株の細菌について, それぞれの培養液を市販ちくわへ塗抹し, 褐変能を有するか否かを観察することにより, 褐変原因菌の存在の有無を調べた。

第1回 (1971年7月) の Y かまぼこ工場での結果を Table 2 に示した。落下菌については3度にわたつて調べた。褐変原因菌は落下菌あるいは器具機材からは発見できなかった。しかし成型前のちくわ用生原料から褐変菌1株 (UFF-115) が発見された。

Table 3 は K かまぼこ工場における 1971年10月の検査結果である。生原料 (加熱前の混合すりみ) を PGG agar に塗抹することにより, 褐変能を有する1株を分離したので, これを UFF-15 株とした。落下菌などからの分離菌には褐変菌は存在しなかった。

Table 4 は, Y かまぼこ工場における 1972年3月の包装室, 包装室外 (包装室と冷蔵庫の中間に位置す

Table 1. Brown discoloration by the growth of various microorganisms on PGG agar.*

Test organism	Browning						
	1	2	3	4	5	6	7 (day)
<i>Bacillus subtilis</i> 8038	—**	—	—	—	—	—	—
<i>Bacillus coagulans</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bacillus megaterium</i> 8036	—	—	—	—	—	—	—
<i>Micrococcus flavus</i> 8276	—	—	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 p	—	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> 8057	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8136	—	—	—	—	—	—	—
<i>Achromobacter brunificans</i> AJ 3230	—	—	+	+	+	+	+

* PGG agar: Peptone 1%, Beef extracts 0.5%, Glucose 5%, Monosodium glutamate 5%, Sodium chloride 0.5%, Agar 1.5%, pH 7.0–7.5.

** — negative, + positive.

Table 2. Microbial examinations at the Y Kamaboko manufactory.
(July, 1971)

Location	Viable bacterial counts			Browning
Floating bacteria* collected from:	Counts/petri dish			
Step 1	2	7	9	—**
Step 2	5	3	9	—
Cooling chamber	10	7	34	—
Step 3	11	2	7	—
Step 4	8	51	10	—
Step 5	42	48	41	—
Packing room	53	86	196	—
	43	88	140	—
	19	23	35	—
Surface bacteria* from	Counts/swab			
Cooling chamber				
Stainless conveyor belt		1		—
Packing room				
Stainless belt		51		—
Plastic container		29		—
Film shaft of packing machine		4		—
Products before being packed		2		—
Workers' hand		394		—
Water*	Counts/ml or g <10 ²			—
Raw material*	10 ⁵ <			+ (UFF-115)

* Cultured on Nutrient agar.

** — negative, + positive.

る), 冷蔵車における落下菌および包装室内面より分離した菌について調査した結果であるが, 褐変原因菌は発見されなかった。

さらに褐変原因菌の汚染源を追求するために, 生原料とくにスケソウ冷凍すりみを中心に検査した結果を Table 5 に示した。冷凍すりみは A 社, B 社および C 社のもので, いずれも A 級以上の品質のものであった。PGG agar に塗抹して分離することにより, B 社すりみ中に UFF-15 株と同じと思われる褐変菌が発見された。SS agar および MacConkey agar は UFF-115 分離用として使用したが, Nutrient agar

Table 3. Microbial examinations at the K Kamaboko manufactory.
(October, 1971)

Location	Viable bacterial counts	Browning
Floating bacteria* collected from:	Counts/petri dish	
Kitchen	0	— **
Near the packing equipment	0	—
Near the refrigerator	2	—
Below the ventilator	9	—
Near the frying place	7	—
Storage room of products	13	—
Near the molder	18	—
Above the table	4	—
Raw material*	Streak method	+ (UFF-115)

* Cultured on PGG agar.

** — negative, + positive.

Table 4. Microbial examinations at the Y Kamaboko manufactory.
(March, 1972)

Location	Viable bacterial counts	Browning
Floating bacteria* collected from:	Counts/petri dish	
	17	— ***
	16	—
Packing room	24	—
	17	—
	7	—
Outside the packing room	164	—
	54	—
Refrigerator	23	—
	37	—
Surface bacteria** from:	Counts/swab	
Equipments in the packing room	$10^5 <$	—
	$10^5 <$	—
	8.3×10^3	—
	3.3×10^3	—
Water**	Counts/ml	
	10^2	—

* Cultured on PGG agar.

** Cultured on Nutrient agar.

*** — negative, + positive.

も含めて、3種の平板希釈培地上の分離菌からは褐変原因菌を発見できなかった。

以上のように、数回にわたる褐変原因菌汚染源検査から、UFF-15は加熱前の生原料およびスケソウ冷凍すりみ中に、そしてUFF-115は加熱前の生原料中から発見された。加熱後の冷却室、包装室、冷蔵庫などからは一度も褐変原因菌を分離できなかった。

Achromobacter brunificans AJ 3230, UFF-15 および UFF-115 の性状比較 結果は Table 6 に示した。UFF-15 は *Ach. brunificans* と各項目について性状は一致した。一方 UFF-115 はグラム陰性桿

Table 5. Microbial examinations of frozen fish pastes and raw material for the Kamaboko making at the Y Kamaboko manufactory. (March, 1972)

Sample	Culture	Viable bacterial counts / g	Browning	
Frozen fish pastes	A	Nutrient agar	7.5×10^7	—*
		SS agar	7.5×10^5	—
		MacConkey agar	1.2×10^5	—
		PCG agar	streak method	—
	B	Nutrient agar	7.5×10^5	—
		SS agar	1.2×10^4	—
		MacConkey agar	4.3×10^3	—
		PGG agar	streak method	+ (UFF-15)
	C	Nutrient agar	1.8×10^6	—
		SS agar	10^4	—
		MacConkey agar	1.8×10^5	—
		PGG agar	streak method	—
Raw material	Nutrient agar	5.3×10^6	—	
	SS agar	8.1×10^3	—	
	MacConkey agar	7.6×10^4	—	
	PGG agar	streak method	—	

* — negative, + positive.

菌ではあるが運動性があり、糖の分解方式が酵素的である点などで、UFF-15 すなわち *Ach. brunificans* とは異なる細菌であることが判明した。

褐変原因菌の耐熱性 試験管内における褐変原因菌の耐熱性の結果については Table 7 に示した。*Ach. brunificans* および UFF-115 の両菌ともに、pH 6.0, 7.0, 8.0 のとき、60°C 5 分間加熱では生き残り、10 分間では死滅した。加熱温度が 70°C になると、両菌とも 3 分間の加熱で死滅した。

次にねり製品用すりみに褐変原因菌をねり込んだときの耐熱性試験の結果を Fig. 1 と Table 8 および Fig. 2 と Table 9 に示した。*Ach. brunificans* をすりみにねり込みオーブン中 100°C で加熱したときには 60 分後でも中心温度はやつと 70°C に達する程度であり、生菌数も g 当り 10² 台を示した (Fig. 1)。この場合の製品を 30°C で保存したところ、60 分加熱区でも保存 3 日目で褐変が発生した (Table 8)。

同様の試料を 200°C で加熱すると、10 分後で中心温度は約 73°C となり、菌の残存は認められたが褐変は再現しなかつた。(Fig. 2 と Table 9)。

同様に UFF-115 をすりみにねり込み 200°C で加熱した結果については、*Ach. brunificans* と同じように、加熱 10 分後の中心温度は約 75°C で、30°C 保存 6 日目でも褐変の発生は認められなかつた。

これらの結果から褐変原因菌はきわめて易熱性の細菌であるといえる。

製品の加熱状況 褐変原因菌 *Ach. brunificans* および UFF-115 が加熱前の生原料中にすでに存在しているのに対して、手指、落下菌、製造機械、その他の二次汚染菌からは全く発見できなかったことは、加熱工程によつて完全に易熱性の原因菌が殺菌されないで繁殖し、褐変が起るという可能性を示唆している。

豊橋式小型ちくわでは中央部の焼色のついた部分と両端部の焼色のつかない部分があり、褐変はほとんど両端部で発生している。この事実から焼色のつかない両端部に褐変原因菌が生き残っている可能性が考えられる。その調査結果は Fig. 3 に示したように、中央部と両端部の加熱温度はたしかに異なり(焼色をつけないようにするために両端部の加熱温度は中央部よりも低くする)、70°C 以上の加熱時間をみると、中央部では約 3 分 30 秒であるのに対し、両端部では約 2 分 40 秒とはるかに短時間であつた。

一方、同じ工場内の全く平行したラインで焼かれ、しかも同一の冷却室を通り、同一のコンベヤーで包装室に流される大型野焼ちくわ(褐変はほとんど発生しない)について調べた結果を Fig. 4 に示したが、70°C 以上の加熱時間は 3 分から 3 分 40 秒もあり、豊橋式小型ちくわと比較して加熱温度が高いため褐変が発生しにくいと考えられる。

Table 6. Morphological and physiological properties of
Achromobacter brunificans AJ 3230 and isolates.

Characteristics	<i>Ach. brunificans</i>	UFF-15	UFF-115
Morphology	rods	rods	rods
Motility	—**	—	+
Gram stain	—	—	—
Glutamate agar slant	—	—	—
Gelatin Liquefaction	—	—	—
B.C.P. milk	—	—	—
Nitrate reduction	—	—	—
M.R. test	—	—	—
V.P. test	—	—	—
Indole test	—	—	—
H ₂ S production	+	+	—
Starch hydrolysis	—	—	—
Acid from			
Xylose O.*	+	+	+
F.	—	—	+
Glucose O.	+	+	+
F.	—	—	+
Arabinose O.	+	+	+
F.	—	—	+
Fructose O.	+	+	+
F.	—	—	+
Sucrose O.	+	+	+
F.	—	—	+
Maltose O.	+	+	+
F.	—	—	+
Lactose O.	+	+	—
F.	—	—	—
Gluconate oxidation	+	+	+
Utilization of			
Glucose	—	—	—
Gluconate	—	—	—
Citrate	—	—	—
Succinate	—	—	—
<p>-</p> Hydroxy benzoate	—	—	—
Protocatechuate	—	—	—
Milk hydrolysis	—	—	—
Breakdown of urea	—	—	—
Cytochrome oxidase test	+ (to a minor degree)	+ (to a minor degree)	—
Tyrosinase production	—	—	—
Catalase test	+	+	+
Growth temp. relation	15–30°C	15–30°C	—
NaCl resistance	1.0–10%	1.0–10%	—

* O. oxidative, F. fermentative.

** — negative, + positive.

Fig. 5 に示したのは揚げかまぼこについての結果であるが、揚げ色をつけるために最終の 30 秒間に高温加熱を行なっている。中心温度は、最高 99°C、最低 52°C と大きく開いており、中心温度 70°C 以上の加熱時間はきわめて短いことがわかった。このような加熱不足のため揚げかまぼこに比較的多く褐変が発生するのであろう。

以上の結果より、褐変発生のみられた製品は易熱性の褐変原因菌が殺菌されるか否かのぎりぎりの条件にあることがわかる。すなわち加熱後の製品中にごく僅か生き残った原因菌が貯蔵中に繁殖し、褐変現象の原因となっている可能性が強い。

Table 7. Heat sensitivity of UFF-115 and *Achromobacter brunificans* AJ 3230 in peptone-media.

Test Organism	pH	Temp. °C	Heating time (min.)				
			30 sec.	1	3	5	10
UFF-115 and <i>Achromobacter brunificans</i> AJ 3230	8.0	90	+*	-	-	-	-
		80		-	-	-	-
		70		+	-	-	-
		60		+	+	+	-
	7.0	90	+	-	-	-	-
		80		-	-	-	-
		70		+	-	-	-
		60		+	+	+	-
	6.0	90	+	-	-	-	-
		80		-	-	-	-
		70		+	-	-	-
		60		+	+	+	-

* - inhibited to grow, + not inhibited.

Fig. 1. Relationship between the rate of heat penetration and viable bacterial counts in Kamaboko inoculated with *Achromobacter brunificans* AJ 3230 and heated at 100°C in the oven.

Fig. 2. Relationship between the rate of heat penetration and viable bacterial counts in Kamaboko inoculated with *Achromobacter brunificans* AJ 3230 and heated at 200°C in the oven.

Table 8. Relationship between heating time and brown discoloration in Kamaboko inoculated with *Achromobacter brunificans* AJ 3230.*

Heating time (min.)	Browning					
	1	2	3	4	5	6 (day)
0	-**	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+
30	-	+	+	+	+	+
40	-	+	+	+	+	+
50	-	+	+	+	+	+
60	-	-	+	+	+	+

* Inoculated Kamaboko was heated at 100°C in the oven.

** - negative, + positive.

Table 9. Relationship between heating time and brown discoloration in Kamaboko inoculated with *Achromobacter brunificans* AJ 3230.*

Heating time (min.)	Browning					
	1	2	3	4	5	6 (day)
0	-**	+	+	+	+	+
1	-	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-

* Inoculated Kamaboko was heated at 200°C in the oven.

** - negative, + positive.

Fig. 3. Relationship between the viable bacterial counts and the rate of heat penetration at the core of bamboo type Kamaboko produced at the Y Kamaboko manufactory.

Fig. 5. The rate of heat penetration at the core of fried Kamaboko produced at the K Kamaboko manufactory.

Fig. 4. Relationship between the viable bacterial counts and rate of heat penetration at the core of large bamboo type Kamaboko produced at the Y Kamaboko manufactory.

要 約

1. 水産ねり製品の貯蔵中に出現する褐変現象の原因菌の汚染源を調査するとともに、原因菌の性状、褐変発生の理由などを検討した。
2. 褐変発生がみられたねり製品工場の落下菌、器具機材などの菌からは褐変原因菌を発見することはできなかった。しかしねり製品の原料であるスケソウ冷凍すりみおよび加熱前の生原料から2菌株の褐変菌を検出した。
3. 褐変菌の1菌株 UFF-15 株は、先に小川らが報告した *Achromobacter brunificans* AJ 3230 が報告した *Achromobacter brunificans* AJ 3230 とは異なる菌種であった。
4. 褐変の発生には製品の加熱不足による褐変菌の生き残りとその繁殖がその原因と推察される。

本研究をすすめるにあたり、褐変原因菌 *Achromobacter brunificans* AJ 3230 を分与された味の素株式会社小川氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 小川博望・小名木正躬・福島 清：食衛誌，11，352-355 (1970)。
- 2) 小川博望・小名木正躬・福島 清：同志，11，356-360 (1970)。
- 3) M. J. PELCZAR JR.: "Manual of Microbiological Methods" Mac Graw-Hill Book Company INC (1957)。