水産ねり製品の褐変について—III. 2種の褐変原因菌の褐変に関与する諸条件

藤田 八束・金山 龍男

(1972年12月12日受理)

On the Brown Discoloration in Fish Jelly Products—III. Various Condition Affecting the Discoloration by Two Species of Bacteria

Yatsuka FUJITA and Tatsuo KANAYAMA*

OGAWA et al. had already reported *Achromobacter brunificans* as a species of bacteria causing the brown discoloration in fish jelly products. The authors reported in the previous paper that *Serratia marcescens* also has a similar property. The present study describes various conditions under which the brown discoloration of fish jelly products was produced by *A. brunificans* and *S. marcescens*. It was found that these bacteria inoculated into media containing glucose and any one of gluten, glutenin, casein or gelatin caused extensive discoloration.

A. brunificans also formed a brown substance on the media containing glucose and histidine or Na-glutamate instead of a protein. But *S. marcescens* did not form a brown substance on the media containing any one of the amino acids tested. The brown discoloration occurred most readily under the conditions of NaCl concentration, pH and incubation temperature optimal for the growth of these bacteria. These facts suggest that, in order to avoid the brown discoloration of fish jelly products, it is important to give most careful attention to the heating process during their manufacture.

著者らは前報告^{1,2)}でねり製品の原料であるすり身から2種の褐変原因菌を分離し、その内の1種はすでに小川ら³⁾の報告した *Achromobacter brunificans* AJ-3230 に一致すること、また他の1種は *Serratia marcescens* であることを報告した。本報告はこれら褐変原因菌の褐変発生条件と、防腐剤感受性について比較検討を行なったのでその結果について報告する。

実験方法

供試菌株 水産ねり製品に褐変をひきおこす *A. brunificans* AJ-3230 と *S. marcescens* UFF-115 を供試菌として用いた。

褐変再現試験液の調製 2% ペプトン水に Table 3 に記載した各種アミノ酸あるいは Table 4 に記載した、たん白質のひとつを濃度が 20% になるように添加、また魚肉の場合は白味の魚を三枚におろし、その肉質を 2% ペプトン水に 20% 添加しホモゲナイズした。各溶液を pH 7.0 に調製し、120°C 15 分間滅菌した。次に Table 2 に記載した各種糖液をそれぞれ 20% 水溶液とし、同様にして滅菌した。これら2種類の溶液 5cc づつを滅菌試験管 (18×180 mm) に分注して試験液に原因菌を接種して、30°C で 10 日間静置培養して褐変の発生状態を観察した。

* 上野製菓研究所 (Food Additive Section Research Laboratory, Ueno Fine Chemical Industries, LTD. 85 Shimoichiba, Itami City)

(印刷費負担)

褐変発生に対する培養温度、培地の食塩濃度および pH の影響 魚肉 5 %, グルコース 5 %, ペプトン 1 % および食塩 0.5 % 含有液体培地を褐変基礎培地とし、培養温度、食塩濃度、培地の pH を種々変化せしめ本培地中に 2 種の褐変原因菌をそれぞれ接種し、30°C で 10 日間静置培養し褐変発生状態を肉眼的に観察した。

防腐剤に対する感受性試験 寒天平板希釈法によつて pH 6.0-7.0 の各段階の普通寒天培地中にフリルフラマイド (FF) およびソルビン酸 (SoA) を添加し、防腐剤に対する感受性を試験した。

結 果

魚肉とグルコースの混合比率の影響 先づ、魚肉とグルコースの混合比率の影響を検討したが、Table 1 に示すごとく *A. brunificans* および *S. marcescens* の両菌には共通性がみられた。すなわち魚肉、グルコースの共存する時のみにその褐変は認められ、そのどちらか一方でも欠けると褐変は認められず本褐変発生にはグルコースと魚肉の共存が必要であることが明らかとなつた。

褐変に対する糖類の影響 グルコースの代りに種々の糖類をおきかえてみたところ、Table 2 のごとく他の糖類ではグルコースほど強い褐変をおこすものは認められず、グルコースに特異性が認められた。

褐変に対するアミノ酸の影響 他の糖類ではグルコースの代りができないことがわかつたので、糖類としてグルコースを用い魚肉の代りに各種のアミノ酸を添加して、その影響をみた結果が Table 3 である。

Table 1. Effect of concentration of fish meat and glucose on browning by *Achromobacter brunificans* AJ-3230 and *Serratia marcescens* UFF-115.

Fish meat (%)	Glucose (%)	Browning	
		UFF-115	AJ-3230
20	20	+	+
	10	+	+
	5	+	+
	0	-	-
10	20	+	+
	10	+	+
	5	+	+
	0	-	-
5	20	+	+
	10	+	+
	5	+	+
	0	-	-
0	20	-	-
	10	-	-
	5	-	-
	0	-	-

Key to symbols: +, positive; -, negative
The test organisms were inoculated into mixture containing fish meat and glucose, and then the media were incubated at 30°C for 10 days.

Table 2. Effect of carbohydrates on browning by *A. brunificans* AJ-3230 and *S. marcescens* UFF-115.

Carbohydrates	Browning	
	UFF-115	AJ-3230
D-Xylose	-	-
D-Arabinose	-	-
D-Glucose	+	+
D-Mannose	-	-
D-Galactose	-	-
D-Fructose	-	-
L-Sorbose	-	-
L-Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
D-Inositol	-	-
D-Sorbitol	-	-
D-Mannitol	-	-
Maltose	-	-
Saccharose	-	-
Lactose	-	-
Starch	-	-
Inulin	-	-

Key to symbols: + positive; -, negative.
The test organisms were inoculated into mixtures of 10% fish meat and 5% carbohydrates, and the mixtures were incubated at 30°C for 10 days.

Table 3. Effect of amino acids on browning by *A. brunificans* AJ-3230 and *S. marcescens* UFF-115.

Amino acids	Browning	
	UFF-115	AJ-3230
L-Alanins	—	—
L-Asparatic acid	—	—
L-Arginine	±	±
L-Cysteine	—	—
L-Cystine	—	—
L-Glutamic acid	—	+
Glycine	—	—
L-Histidine	—	+
Isoleucine	±	—
L-Leucine	±	—
L-Methionine	±	±
L-Phenylalanine	—	—
L-Proline	—	—
L-Serine	—	—
L-Threonine	±	±
L-Tryptophan	—	±
L-Tyrosine	±	—
L-Varine	±	±

Key to symbols: + positive: ± weakly positive: — negative.

The test organisms were inoculated into mixtures containing one of the amino acids at 10% and 10% glucose respectively, and then the mixtures were incubated at 30°C for 10 days.

Table 4. Effect of proteins on browning by *A. brunificans* AJ-3230 and *S. marcescens* UFF-115.

Protein	Browning	
	UFF-115	AJ-3230
Gluten	+	+
Glutenin	+	+
Casein	+	+
Gelatin	+	+
Fish meat	+	+
Protein-free	—	—

Key to symbols: + positive, — negative

The test organisms were inoculated into mixtures containing one of the protetins at 10% and 5% glucose respectively, and then the mixtures were incubated at 30°C for 10 days.

本結果にみられるように、*A. brunificans* はアルギニン、メチオニン、スレオニン、トリプトファンおよびバリンなどで非常に微弱な程度に褐変を起こし、またヒスチジンやグルタミン酸ソーダでは強い褐変が認められた、しかし *S. marcescens* はアルギニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、スレオニン、チロシンおよびバリンなどで若干褐変するにすぎず魚肉ほど強いものではなかった。

褐変に対するたん白質の影響 次に魚肉をグルテン、グルテニン、カゼインおよびゼラチンなどのたん白質におきかえてその影響をみたところ Table 4 にみられるごとく、魚肉以外のこれらのたん白質

でも強い褐変が認められ、たん白質-グルコース系で両菌は褐変をおこすことが明らかとなった。なお、小川ら⁴⁾ はたん白質の種類によつて褐変現象に差のあることを報告しているが、本実験では特に大きな差は認められなかった。

食塩濃度、pH および培養温度の影響 次に本現象への食塩濃度、pH および培養温度について検討をくわえた。その結果 Table 5 に示すごとく培養温度は両菌ともに褐変基礎培地中において 15°C では発育は若干みられたが褐変せず、また 42°C では *S. marcescens* は発育したが *A. brunificans* は発育せず褐変は認められなかったが、両菌は 25-37°C で良く発育し強い褐変発生がみられた。さらに、培地中に添加された食塩濃度の影響については Table 5 に示すごとく *A. brunificans* が 5% 以上、*S. marcescens* が 3% 以上で発育は認められたが褐変は認められなかった。また pH の影響は Table 6 に示すごとく *A. brunificans* が 6-9、*S. marcescens* が 5-9 で褐変し、特に 7 付近で最も良く褐変が認められた。

褐変原因菌の防腐剤感受性 両菌の防腐剤に対する感受性について検討を加えたところ、Table 7 に示すごとく *A. brunificans* は pH 6.0 で FF 4.0 ppm で発育が阻止されたが、*S. marcescens* の最少発育阻止濃度は 16 ppm 以上であり、さらにソルビン酸では 0.1% 以上添加しても両菌の繁殖を阻止すること

Table 5. Effect of salt concentration and incubation temperatures on browning by *A. brunificans* AJ-3230 and *S. marcescens* UFF-115.

NaCl (%)	Incubation temp. (°C)	Browning	
		UFF-115	AJ-3230
0	15	—	—
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—
0.5	15	—	—
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—
1.0	15	+	—
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—
2.0	15	—	+
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—
3.0	15	—	—
	30	—	+
	37	—	+
	42	—	—
5.0	15	—	—
	30	—	—
	37	—	—
	42	—	—

Key to symbols; +, positive: —, negative.
The test organisms were inoculated into mixtures of various concentrations of NaCl, 5% fish Meat and 5% glucose, and then the mixtures were incubated at various temp. for 10 days.

ができず防腐剤に対する感受性が非常に低いことが明らかとなった。

考 察

食品の加工ならびに、保存中に発生する褐変現象はきわめて広範囲の食品におこり、またその原因となる物質や褐変に関与する条件も食品によつてさまざまであり、この発生機構および防止方法などに関する研究報告^{5-8)*}も多い。しかし微生物による食

* 加藤博通：昭和41年度日本食品工業学会第13図大会特別講演ならびにシンポジウム，64-71 (1966)。

Table 6. Effect of incubation temperature and pH on browning by *A. brunificans* AJ-3230 and *S. marcescens* UFF-115.

pH	Incubation temp (°C)	Browning	
		UFF-115	AJ-3230
4.0	15	—	—
	30	—	—
	37	—	—
	42	—	—
5.0	15	—	—
	30	+	—
	37	+	—
	42	—	—
6.0	15	—	—
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—
7.0	15	—	—
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—
8.0	15	—	—
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—
9.0	15	—	—
	30	+	+
	37	+	+
	42	—	—

Key to symbols: +, positive: —, negative.
The test organisms were inoculated into mixtures of 10% fish meat and 5% glucose at various temp. for 10 days.

Table 7. Sensitivity of *A. brunificans* AJ-3230 and *S. marcescens* UFF-115 against furofuramide (FF) and sorbic acid (SoA).

pH	Organism	Minimum inhibitory concentration (ppm)	
		UFF-115	AJ-3230
FF	7.0	16<	8
	6.7	16<	8
	6.5	16<	8
	6.3	16<	8
	6.0	16<	4
SoA	7.0	1000<	1000<
	6.5	1000<	1000<
	6.0	1000<	1000<

品の褐変現象については小川らにより最初に報告され、その現象は *A. brunificans* の繁殖することによってひき起こされるアミノカルボニール反応に類似した反応であることが報告されたのに初まる⁴⁾。

著者らは、ここ数年来日本各地で多発している水産ねり製品の褐変現象について、調査研究を進めてきたが、特に 1971 年夏期に多発した水産ねり製品の褐変の原因究明に着手し、本原因も小川らの報告に記載された細菌による褐変現象であることを明らかにし、さらに汚染源の究明を行なつたところ *A. brunificans* の他に *S. marcescens* もまた褐変をひき起こすことをみだした²⁾。そこで小川らにより分離同定された *A. brunificans* と著者らの分離同定した *S. marcescens* の褐変発生に関与する諸条件を明らかにした。その結果から現在の水産ねり製品を考えてみると、原因菌の汚染とその発育がおこりさえすれば褐変発生の条件がすべて満たされていると考えてよからう。すなわち、すべての製品中にはたん白質は豊富に存在し、焼色の必要な製品にはグルコースはかならず添加されるし味淋類の使われる機会も多く、グルタミン酸ソーダも広く使用されている。そして食塩度、製品の pH さらに両菌が防腐剤に対して感受性が低いことなどいづれも褐変発生に好条件を提供している。夏期における高温は両菌の発育にとつてさらに好条件をつくるものであり、水産ねり製品の性質と気温の好ましい条件とによつて本現象が水産ねり製品に、特に夏期を中心にして多発化してきた原因ではないかと考える。なお、これらの褐変現象がメーラー・ド反応に類似した反応であることから、細菌がどのように関与して褐変をひき起こすのかについては興味あるところであるが、今後十分な検討が必要である。

文 献

- 1) 金山竜男・藤田八東・松田敏生：本誌，
- 2) 藤田八東・金山竜男：同誌，
- 3) 小川博望・小名木正躬・福島 清：食衛誌，11，352-355 (1970)。
- 4) 小川博望・小名木正躬・福島 清：同誌，11，359-360 (1970)。
- 5) 藤巻正生・加藤博通：食品包装研究資料集，88-90 (1968)。
- 6) 豊水正道・富安行雄：食衛誌，3，323-333 (1962)。
- 7) 豊水正道・富安行雄：同誌，4，1-9 (1962)。
- 8) 山口直彦：食品包装研究資料集，91-95 (1968)。