水産ねり製品の褐変について—V

再加熱による褐変*¹

藤 田 八 束・宮 本 美 和 子

(1975 年 7 月 4 日受理)

On the Brown Discoloration in Fish Jelly Products—V

Brown Discoloration by Reheating

Yatsuka FUJITA*² and Miwako MIYAMOTO*²

The brown discoloration in fish jelly products by reheating was studied, and the following results were obtained:

1. *A. brunificans* AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115 and *E. cloacae* UFF-107 were inoculated individually into broth media containing 5% (w/v) glucose and 5% (w/v) homogenized fish meat, and they were incubated at 30°C for 3 or 5 days. The culture media turned brown or dark brown when heated at 100°C for 3 or 5 minutes.

2. The same strains of bacteria as were used in (1) were incubated individually at 30°C for 7 days in culture media containing 5% (w/v) glucose. Homogenized fish meat was then added to the culture media at a concentration of 10% (w/v). The culture fluid turned brown when heated at 100°C for 60 minutes.

3. The same strains of bacteria as used in experiments 1 and 2 were inoculated individually into broth media containing carbohydrate at a concentration of 5% (w/v) and 5% (w/v) homogenized fish meat. After 7 days' incubation at 30°C, they were heated again at 100°C for 7 minutes. This reheating caused the following discoloration. *A. brunificans* AJ-3230 formed the brown substance in the cultures containing glycerol or glucose plus homogenized fish meat, while *S. marcescens* UFF-115 caused the similar discoloration in the cultures containing D-ribose and D-arabinose instead of glycerol. On the other hand, *E. cloacae* UFF-107 formed the brown substance in the culture media containing D-ribose and D-arabinose instead of glycerol.

水産ねり製品の保存中に発現する褐変現象は、小川ら¹⁾および著者ら^{2,3,4)}により *Achromobacter brunificans* AJ-3230¹⁾, *Serratia marcescens* UFF-115^{2,3)}, *Enterobacter cloacae* UFF-107⁴⁾ などの特定の細菌の増殖に起因することが明らかにされてきた。また、これとは別に、リテナー式のかまぼこや真空包装製品、他にてんぷらや竹輪等の水産ねり製品において、包装後あるいは消費者の手に渡った段階で再度 80～90°C で加熱されたとき、製品の表面を中心にして斑点状あるいは、しみ状に広がる褐色乃至黒褐色の着色部を生ずることがある。このような現象（ここでは“再加熱による褐変現象”と表現する）は業界において特に問題視されている。上記種の培養菌をねり製品に塗抹し 30°C において保存すると、*A. brunificans* AJ-3230 の場合は僅か 1 日にして肉質が淡黄色を帯びてくるが、他の 2 種の菌株では、この程度の培養時間では変色が認めにくいことがある。しかし後者 2 者についてもその後沸騰水中で 5～10 分間加熱すると、塗抹部を中心に急速に黒褐色を帯びてくる。このことから“再加熱による褐変現象”も、小川ら¹⁾および著

*¹ 本研究は昭和 47 年 10 月 29 日日本水産学会秋季大会（高知）において発表した。

*² 上野製菓研究所 (Food Department, Research Laboratories, Ueno Fine Chemical Industries LTD, 1-127 Higashi Arioka, Itami City)

者ら^{2,3,4)}により報告された汚染細菌の増殖に起因する褐変現象に関連することが示唆される。そこで本報ではその関連性について検討した。

実験方法

加熱による褐変現象と細菌との関係 培養には次の培地を用いた。すなわち、ぶどう糖 10% (w/v)、食塩 0.5% (w/v) を含む 1% ペプトン水 (pH 7.0~7.2) を調製する。これとは別に食塩 0.5% (w/v) を含む 1% ペプトン水に 10% (w/v) の魚肉を加え 100°C で 30 分間の加熱処理後、十分にホモジナイズし、pH を 7.0~7.2 に調整する。これら両者をそれぞれ滅菌した後その 5 ml 宛を滅菌試験管 (径 18×180 mm) に無菌的に混合分注し、無菌検定を行つた後供試培地とする。したがって、最終的には培地中に 5% のぶどう糖、5% の魚肉、1% のペプトンおよび 0.5% の食塩が含まれることになる。なお魚肉としてはいとよりを三枚におろしたものの肉質部を使用した。

あらかじめ 30°C で 24 時間、前培養した褐変原因菌 *A. brunificans* AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115 または *E. cloacae* UFF-107 株の 1 白金耳量をそれぞれ上記の培地に接種し、10°C、15°C および 30°C で 3~5 日間静置培養した。所定時間培養後、各試験管を沸騰水中で 5~60 分間加熱し、加熱後の培養液の褐変状態を肉眼的に観察し、着色の認められなかつたものを一、わずかに黄色~淡褐色の着色が認められたものを十、明らかに褐色の着色が認められたものを十、黒褐色の着色が認められたものを廿~卅と判定した。

褐変物質産生に及ぼすぶどう糖および魚肉の影響 1) ペプトン水、2) 10% (w/v) のぶどう糖加ペプトン水、3) 10% (w/v) の魚肉を添加したペプトン水、4) ぶどう糖と魚肉をそれぞれ 10% の割合に含むペプトン水、以上の 4 種の培地を調製、滅菌した。これら各培地中に 3 株の褐変原因菌をそれぞれ接種し、7 日間静置培養を行つた。培養後 1) の培地には 10% (w/v) の魚肉と 10% (w/v) のぶどう糖をそれぞれ添加し、2) の培地には 10% (w/v) の魚肉を添加し、3) の培地には 10% (w/v) のぶどう糖を添加した。また 4) の培養液はそのままとした。このようにして再調製した 1) から 4) までの培養液を沸騰水中で 1 時間加熱し、その色調を、菌を接種しない同じ組成の培地に同一処理を行つた対照区のそれと比較しながら観察し、前記と同様の判定基準で結果を表わした。

炭水化物の種類と褐変との関係 食塩 1% および魚肉 20% を含む 2% のペプトン水と、Table 3 に示した各種炭水化物の 10% 水溶液とを別々に滅菌した。滅菌後滅菌試験管 (径 18~180 mm) にこれらをそれぞれ 5 ml 宛混合分注して培養液とした。これらの培地に *A. brunificans* AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115, または *E. cloacae* UFF-107 をそれぞれ接種し、30°C で 3 日、5 日および 7 日間培養を行つた。培養後各培養液を沸騰水中で 1 時間加熱して褐変の程度を前記同様に肉眼的に比較観察した。

褐変に及ぼす各種アミノ酸およびたん白質の影響 10% (w/v) のぶどう糖と 1% (w/v) のブレインハートインフィジョンブイオン末 (日水製薬) を加えた液体培地に *A. brunificans* AJ-3230 あるいは *E. cloacae* UFF-107 を接種した。また、*S. marcescens* UFF-115 の場合はぶどう糖を 20% (w/v) に増量した同様の培地に接種して、それぞれ 30°C で 5 日間振盪培地を行つた。培養後、遠心分離 (15,000×G, 20 分, 0°C) により上澄液を採取し、この上澄液中に Table 4(1) に示す各種アミノ酸もしくはたん白質をそれぞれ 10% (w/v) の割合になるように加え、十分に混合してから沸騰水中で 7 分間加熱した。褐変の程度は前期同様に肉眼的に比較観察した。

実験結果

加熱による褐変現象と細菌との関係 Table 1 はぶどう糖、魚肉加ペプトン水系でいわゆる再加熱による褐変現象に及ぼす細菌の影響を観察した結果である。すなわち褐変原因菌を接種して培養後、未だ着色の認められない培養液でもそれを加熱することにより明瞭に褐変することが観察された。また加熱前にすでに若干着色しているものでは、その後の加熱により着色度は著しく増強されることが観察された。このように供

Table 1. Browning of culture fluid by heat treatments

bacteria inoculated	incubation temp. (°C)	incubation period (days)						heating time (min.)					
		3						5					
		0	5	10	15	30	60	0	5	10	15	30	60
<i>A. brunificans</i> AJ-3230	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	30	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. marcescens</i> UFF-115	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	—	±	+	—	±	±	+	+	+
<i>E. cloacae</i> UFF-107	30	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+
control (not inoculated)	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Key to symbols: —, no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; +~++, extreme browning.

A. brunificans AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115 or *E. cloacae* UFF-107 were inoculated to broth media containing 5% glucose and 5% fish meat homogenate. The media inoculated were incubated at 30°C for 3 or 5 days. After incubation, the media were heated at 100°C for indicated periods.

褐変物質産生に及ぼすぶどう糖および魚肉の影響 前記の褐変が培地成分のぶどう糖あるいは魚肉の何れに起因するものであるかを明らかにするためさらに検討を加えた。ぶどう糖、魚肉の両者を添加した培地、またそれぞれを単独に添加した培地、および両者いずれをも添加しない培地に供試菌を接種、培養した。培養後、ぶどう糖を添加しなかった培養液にはぶどう糖を添加し、また魚肉を加えなかった培地中には魚肉をそれぞれ添加して沸騰水中で加熱した。加熱後各培養液の褐変の程度を観察し、その結果を Table 2 に示した。すなわち、供試菌をぶどう糖加ペプトン水で培養後魚肉を添加した場合およびぶどう糖と魚肉を併せて含む培地で培養した場合にのみ、その後の加熱によつて著明な褐変現象が認められた。この結果は、魚肉が直接の褐変の原因ではなくむしろぶどう糖が細菌により資化され褐変を起こし易い物質へ変化したのが直接の原因と考える。資化されて出来た物質は、さらに加熱によつて魚肉と反応し褐変物質を形成することを示している。

炭水化物の種類と褐変との関係 つぎに再加熱による褐変現象に及ぼす種々の炭水化物の影響について観試した3菌株では、程度の差はあるが 30°C で培養した場合にはいずれも褐変が認められ、*A. brunificans* AJ-3230 ではもつとも強い褐変が見られた。一方無接種対照区では加熱後も褐変が認められなかったので褐変の原因は細菌であることが明らかである。

察した。その結果 Table 3 に見られるように、褐変は *A. brunificans* AJ-3230 をぶどう糖含有培地で培養した場合に最も強く、ソルボースやグリセリンにおいても多少認められた。*S. marcescens* UFF-115 ではぶどう糖で最も顕著で、アラビノース、ソルボースでもかなりの褐変が認められた。また *E. cloacae* UFF-107 ではぶどう糖および蔗糖において強い褐変が認められた。なおキシロース、アラビノース、フラクトース、ソルボースおよびガラクトースは供試菌を接種しない対照培地においても弱い褐変が認められた。

褐変に及ぼす各種アミノ酸およびたん白質の影響 つぎに、供試菌3株をそれぞれぶどう糖加ペプトン水

Table 2. Effects of glucose and fish meat homogenate on browning of culture fluid

No.	bacteria inoculated heating time (hr) composition of medium								
		<i>A. brunificans</i> AJ-3230		<i>S. marcescens</i> UFF-115		<i>E. cloacae</i> UFF-107		control (not inoculated)	
		0	1	0	1	0	1	0	1
1	1% Polypeptone 0.5% NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—
2	1% Polypeptone 0.5% NaCl 10% Glucose	—	卅	—	卅	—	卅	—	—
3	1% Polypeptone 0.5% NaCl 10% Fish meat	—	—	—	—	—	—	—	—
4	1% Polypeptone 0.5% NaCl 10% Glucose 10% Fish meat	+	卅	+	卅	+	卅	—	—

Key to symbols: —, no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; 卅~卅, extreme browning.

A. brunificans AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115 and *E. cloacae* UFF-107 were inoculated to the media. The media were incubated at 30°C for 7 days. After incubation, 10% fish meat homogenate and 10% glucose were added to culture No. 1, 10% fish meat homogenate was added to culture No. 2, and 10% glucose was added to culture No. 3. After being added with these materials each of the cultures was heated at 100°C for 1 hr.

中に接種して 30°C で 5 日間培養を行い、その培養上澄液に各種アミノ酸あるいはたん白質の溶液をそれぞれ個々に添加して沸騰水中で加熱した。そして褐変の程度がアミノ酸あるいはたん白質の種類によつてどのように異なるかを観察し、Table 4(1), 4(2), 4(3) の結果を得た。すなわち、いずれの供試菌においてもシスチンでは褐変は全く認められず、またシスチンおよびチロシンでは 7 分まではほとんど褐変現象は観察されなかつたが、他の多くのアミノ酸やたん白質においてはその種類に関係なく褐変が観察された。特にアミノ酸のうち、グリシン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどにおいて強い褐変が認められ、たん白質ではカゼイン、ゼラチンにおいて特に強い褐変現象が認められた。

考 察

以上の実験結果は *A. brunificans* AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115, *E. cloacae* UFF-107 などの褐変原因菌がぶどう糖加培地に発育すると、ぶどう糖を資化し、アミノ酸あるいはたん白質と加熱によつて反応して褐変物質を形成するような物質（褐変前駆物質）を産生することを示唆している。このことから、いわゆるねり製品の“再加熱による褐変現象”の場合においても、これらの細菌が関与している可能性が大きいものと考えられる。実際、ねり製品を消費者が加熱調理する時、著しく褐変することがあるが、このような場合未調理の製品を 20°C~37°C で保存すると 2~3 日で同様の褐変現象が認められることが観察されていることから“再加熱による褐変”も、小川ら³⁾、著者ら²⁻⁴⁾ が報告したような細菌の増殖による褐変とほぼ同一の機構によるものと考えられる。

Table 3. Effects of carbohydrates on the browning of culture fluid by heating

carbohydrate added	bacteria tested				incubation period (days)				<i>A. brunificans</i> AJ-3230				<i>S. marcescens</i> UFF-115				<i>E. cloacae</i> UFF-107				control (not inoculated)			
									0	3	5	7	0	3	5	7	0	3	5	7	0	3	5	7
Glycerol									—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Xylose									—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
D-Arabinose									—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+
Glucose									—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—
D-Mannose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Galactose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±	±
D-Fructose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
L-Sorbose									—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+
L-Ramnose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dulcitol									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Inocitol									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Sorbitol									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Mannitol									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Erythritol									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adonitol									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Trehalose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Maltose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cellobiose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Saccharose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—
Lactose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Starch									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Raffinose									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Inulin									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sarcosine									—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Key to symbols: —, no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; ++~+++, extreme browning.

A. brunificans AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115 or *E. cloacae* UFF-107 was inoculated to the broth media containing each one of the carbohydrates in 5% and 5% fish meat homogenate. The inoculated media were incubated at 30°C for 7 days. After incubation, the cultures were heated at 100°C for 7 min..

要 約

水産ねり製品の“再加熱による褐変現象”についてその原因を調べ、次のような結果を得た。

1) 5% (w/v) ぶどう糖と 5% (w/v) 魚肉ホモジネートを含むペプトン水に *A. brunificans* AJ-3230, *S. marcescens* UFF-115, *E. cloacae* UFF-107 をそれぞれ接種し、30°C で 3~5 日間培養し、その培養液を沸騰水中で 3~5 分間加熱すると褐色乃至黒褐色の着色現象が認められた。

2) 魚肉ホモジネートを多量に添加したペプトン水培地で培養し、その後ぶどう糖を添加して加熱しても褐変は認められなかった。これに対し、ぶどう糖のみを加えたペプトン水培地で培養したのち、魚肉ホモジネートを加えて加熱すると強く褐変を起し、褐変原因菌により、ぶどう糖から褐変前駆物質が生成することが示唆された。

3) *A. brunificans* AJ-3230 ではぶどう糖の他にグリセリンが, *S. marcescens* UFF-115 ではソルボース, アラビノースが, また *E. cloacae* UFF-107 では蔗糖も褐変前駆物質生成の基質となつた。

4) 5% (w/v) ぶどう糖加培地に上記3種の褐変原因菌を培養し, 遠沈して得た培養上澄液に種々のアミノ酸あるいはたん白質を添加し, 沸騰水中で5~10分間加熱すると3株のいずれにおいてもシステイン以外のすべての場合に褐変現象が認められた。

5) 以上のことから水産ねり製品のいわゆる“再加熱による褐変現象”は, 汚染した褐変原因菌が製品原料の糖類に作用し, アミノ酸やたん白質の共存下で加熱によつて褐変物質を形成しやすい中間物質を生成する結果であろうと推察した。

Table 1(1). Effects of amino acids and proteins on the browning of culture fluid in which *A. brunificans* was grown

Amino acid or protein added	heating time (min.)					
	0	1	2	3	5	7
Glycine	—	±	±			
L-Alanine	—	—	—	+	±	±
L-Valine	—	—	—	+	±	±
L-Leucine	—	—	—	—	+	±
L-Isoleucine	—	—	—	—	+	±
L-Serine	—	—	—	—	±	±
L-Threonine	—	±	+	±	±	±
L-Cysteine	—	—	—	—	—	—
L-Cystine	—	—	—	—	—	+
L-Methionine	—	—	—	—	+	±
Na-Glutamate	—	+	±	±		
Na-Asparatate	—	—	—	—	+	±
L-Lysine. HCl	—	—	±	±		
L-Arginine	—	+	+	±		
L-Histidine	—	+	±	±		
L-Phenylalanine	—	—	+	±	±	±
L-Tyrosine	—	—	—	—	—	+
L-Tryptophan	—	—	—	+	+	±
L-Proline	—	—	—	—	+	+
L-Hydroxyproline	—	—	—	—	+	+
Gluten	—	—	—	+	±	±
Casein	—	±	±	±	±	±
Gelatine	—	+	±	±	±	±
Nil	—	—	—	—	—	—

Key to symbols; —, no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; ±~±, extreme browning.

A. brunificans AJ-3230 was incubated in the broth medium containing 5% glucose at 30°C for 5 days. Various amino acids and proteins were added individually to the culture after incubation. The cultures were heated at 100°C for 7 min..

Table 4(2). Effects of amino acids and proteins on the browning of culture fluid in which *S. marcescens* was grown

Amino acid or protein added	heating time (min.)					
	0	1	2	3	5	7
Glycine	—	±	±			
L-Alanine	—	—	—	+	±	±
L-Valine	—	—	—	±	±	+
L-Leucine	—	—	—	—	+	+
L-Isoleucine	—	—	—	—	+	+
L-Serine	—	—	—	—	+	±
L-Threonine	—	±	±	±	+	+
L-Cysteine	—	—	—	—	—	—
L-Cystine	—	—	—	—	—	±
L-Methionine	—	—	—	—	+	+
Na-Glutamate	—	+	±	±		
Na-Asparatate	—	±	±	+		
L-Lysine. HCl	—	—	+	±		
L-Arginine	—	—	+	±		
L-Histidine	—	±	+	±		
L-Phenylalanine	—	—	+	+	±	±
L-Tyrosine	—	—	—	—	—	+
L-Tryptophan	—	—	—	±	±	+
L-Proline	—	—	—	—	+	+
L-Hydroxyproline	—	—	—	—	+	+
Gluten	—	—	—	+	±	±
Casein	—	+	±	±	±	±
Gelatine	—	+	±	±	±	±
Nil	—	—	—	—	—	—

Key to symbols; —, no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; ±~±, extreme browning.

S. marcescens UFF-115 was incubated in the broth medium containing 5% glucose at 30°C for 5 days. Various amino acids and proteins were added individually to the culture after incubation. The cultures were heated at 100°C for min..

Table 4(3). Effects of amino acids and proteins on the browning of culture fluid in which *E. cloacae* was grown

Amino acid or protein added	heating time (min.)						
	0	1	2	3	5	7	
Glycine	—	⦿	⦿				
L-Alanine	—	—	—	+	⦿	⦿	
L-Valine	—	—	—	±	+	⦿	
L-Leucine	—	—	—	—	+	⦿	
L-Isoleucine	—	—	—	—	+	⦿	
L-Serine	—	—	—	—	+	⦿	
L-Threonine	—	±	±	±	+	⦿	
L-Cysteine	—	—	—	—	—	—	
L-Cystine	—	—	—	—	—	±	
L-Methionine	—	—	—	—	+	⦿	
Na-Glutamate	—	+	+	⦿			
Na-Asparatate	—	±	+	+			
L-Lysine, HCl	—	—	⦿	⦿			
L-Arginine	—	±	+	+			
L-Histidine	—	±	+	⦿			
L-Phenylalanine	—	—	+	+	⦿	⦿	
L-Tyrosine	—	—	—	—	—	—	
L-Tryptophan	—	—	—	±	+	⦿	
L-Proline	—	—	—	—	±	+	
L-Hydroxyproline	—	—	—	—	±	+	
Gluten	—	—	—	+	⦿	⦿	
Casein	—	+	⦿	⦿	⦿	⦿	
Gelatine	—	+	⦿	⦿	⦿	⦿	
Nil	—	—	—	—	—	—	

Key to symbols; —, no browning; ±, slight browning; +, moderate browning; ⦿~⦿, extreme browning.

E. cloacae UFF-107 was incubated in the broth medium containing 5% glucose at 30°C for 5 days. Various amino acids and proteins were added individually to the culture after incubation. The cultures were heated at 100°C for 7 min..

文 献

- 1) 小川博望・小名木正躬・福島 清: 食衛誌, **11**, 325-355 (1970).
- 2) 藤田八束・金山龍男: 本誌, **39**, 229-235 (1973).
- 3) 藤田八束・金山龍男: 同誌, **39**, 327-331 (1973).
- 4) 藤田八束・宮本美和子・松田敏生: 同誌, **40**, 825-833 (1974).