



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	鮫肉腐敗の微生物化学的研究：第1報 鮫肉の腐敗に於けるUrease Activity及び細菌群の消長について
Author(s)	木村, 喬久; KIMURA, Takahisa; 長尾, 清 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 5(4), 352-356
Issue Date	1955-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22887
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(4)_P352-356.pdf



鯨肉腐敗の微生物化学的研究

第1報 鯨肉の腐敗に於ける Urease Activity 及び細菌群の消長について

木村 喬久・長尾 清

(北海道大学水産学部水産細菌学教室)

Studies in the Bacteriological Chemistry of Shark Muscle Spoilage

I. On the changes of urease-activity and bacterial flora during shark muscle spoilage

Takahisa KIMURA and Kiyoshi NAGAO
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Abstract

In the present work, the authors observed the change of urease-activity in infusion of shark muscle and the change in the bacterial flora during its spoilage. As a result it can be summarized as the following:

1) In the beginning the urease-activity increases. In four or five days it reaches to the highest point. After that there is a great production of ammonia and decomposition of urea, while the urease-activity decreases rapidly. On about the twentieth day the urease-activity rises again but decreases immediately there after.

2) The change in the bacterial flora was observed as follows: (A) In the first stage, bacterial groups III, IV and V (grown on medium containing urea) grew very rapidly, and increases to almost the same number as bacterial groups I and II (grown on bouillon agar medium). But following that the growth stops after about fifteen days and their number becomes about 1% of that in groups I and II. In the latter period these grew slightly again. (B) Till about fifteen or twenty days, groups I and II grew logarithmically. But in the last stage they stopped their growth and even showed some decrease. (C) Bacterial group VI (grown on medium using sole ammonium chloride as nitrogen source) showed a similar tendency to groups I and II, but its number was a little less than that of groups I and II.

3) From the results of 1) and 2) the following inferences have been drawn: (A) The change in the urease-activity has close relation to the changes in the bacterial flora. (B) In the spoilage of shark muscle, the principal decomposition of urea is caused by bacterial enzyme. (C) The greater part of the bacteria in groups I and II must have been the same as those in group VI.

板鰓類の諸組織器管中に 1~2.5% にも及ぶ多量の尿素が存在すると云う事は古くから多くの研究者に依り報告されている。¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ 此の様に他の魚類に比較して尿素含量が特異的に多い板鰓類就中鯨肉等は鮮度低下、腐敗の際は勿論冷蔵保存中に於ても多量の ammonia を発生すると云う事も又多くの研究者に依り報告されている。³⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾ 此の多量の ammonia は勿論多量に含有する尿素の分解に依り発生する事は疑う余地の無い所であるが、その発生機構に付ては未だ確たる定説が無い様である。最近清水⁹⁾、高橋¹¹⁾等に依り其の原因の大部分は尿素分解細菌に依るもので有ると報告されているが、森・小林²⁾、Wood¹³⁾等は鯨筋肉及び血液中に urease の存在を報告して居り、其の初期に於ける尿素の分解が自家消化酵素によるものではないかと云う事も否定出来ない事実であろう。いづれにせよ斯の如く多量の尿素を含有する魚類の腐敗には当然尿素分解細菌が大きな役割をなして居るだろうと云う事は想像に難くはない。Wood¹³⁾ は鯨肉の変敗を細菌学的に研究し、此の変敗に関係する細菌は 1 種の海洋性の細菌で、多くは海泥中の細菌に似て居ると報告して居り、又最近木俣¹⁴⁾等も鯨肉の変敗を細菌学的に研究し尿素分解細菌が鯨肉の ammonia 発生の際の重要な役割をなすと云う事が考えられると述べて居る。斯の如き特異的な鯨肉の腐敗を model として生活要因の

変化と細菌相或は細菌の酵素活性の変化との関係を追求する事は興味深い事であり、又板鰐類魚肉の ammonia 発生機構解明の一助ともなし得ると考えられる。著者等は以上の観点から本研究を始め、本報に於ては先ず鮫肉の腐敗進行中に於ける尿素、及び ammonia 量の変化と鮫肉水抽出液中の urease 活性の変化及び細菌群の消長を測定し、若干の結果を得たので報告する。

実験 I

a) 試料及び方法

1953年5月22日函館近海に於て漁獲され鮮度の極めて良好なアブラツノザメ, *Squalus suckleyi* (GIRARD), を可及的細菌汚染の無い様注意して脱皮後、頭部及び骨部、血合肉を除いた全精肉を、煮沸殺菌したチヨッパで2回繰返し肉挽し、殺菌綿絨フラスコに10g及び5gづつ分取し、13°~17°Cに貯蔵し試料とした。後一定日数毎に urea-N, ammonia-N 及び水抽出液の urease活性を次の様な方法により測定した。先ず ammonia-N は10gの試料を用い通気法¹⁵⁾により測定した。urea-N の測定には5gの試料を水と共に良く磨碎し、水で3回抽出遠心分離を繰返し全量を 100 ml とし Seitz 細菌濾過器にて濾過し、此の液 1 ml に urease を作用させて生ずる CO₂量を Warburg の検圧計を用いて測定し¹⁶⁾その量から urea-N 量を算出した。尙 ureaseは G. Grüberl co. 製のものを用い、反応は38°C, pH5で210分行った。urease活性の測定は前記抽出液の細菌濾過器を通さぬ液 1 ml を用い、3%尿素水溶液を基質とし38°Cで30分及び60分間の反応にて発生するCO₂量を測定し、其の測定値より 1 ml の試料が1時間に発生するCO₂の μ l を算出し、それを以て urease 活性とした。尙本実験に於て ammonia-N と称し測定して居るものは厳密な意味に於ては揮発性塩基-Nに相当するものである。

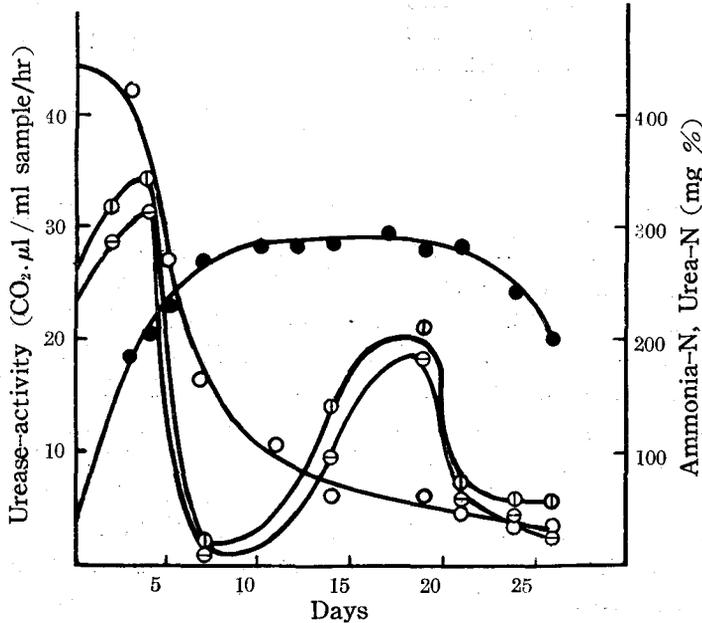


Fig. 1. Changes of urease-activity, ammonia-N (volatile-N) and urea-N in shark muscle during spoilage at 13° to 17°C

- Urease-activity, measured at 30°C for 1 hr.
- " " " " 30 min.
- Ammonia-N
- Urea-N

b) 結果

以上の方法に依り腐敗進行過程に於ける一定日数毎の urea-N 及び ammonia-N の増減量及び水抽出液の urease活性を測定した結果を Fig. 1 に図示した。即ち初期4日目迄に ammonia-N は急激な増加を示し、300mg%にも達してそのまま数日間は殆んど恒量に保たれ、後期即ち21日目頃より少量の減少を示して居る。これと反対に urea-N は新鮮時460mg%、即ち尿素にして970mg%程度含有して居たものが14日目頃迄に其の大部分が分解され100mg%前後となり、以後極めて緩慢に減少して26日目頃には50mg%程度となった。urease 活性は初期に於て少々増加して最大を示すが以後 urea-N の急激な減少と稍平行して急激に減少し、7日目頃に最低となり以後再び増加を始めるが18~19日目頃から再び減少した。

実験 II

a) 試料及び方法

1953年9月14日漁獲された鮮度の極めて良好なるホシザメ, *Mustelus mauazo BLEEKER*, を表面良く水洗後, 可及的細菌汚染を防ぐため, マツダ紫外線ランプを用いて約5時間殺菌した小部屋にて, 実験 I の際と同様調理肉挽し, 同じく10gづつに分け一定日数毎に urea-N, ammonia-N の増減及び細菌群の変化を次の様な方法により測定した。ammonia-N の測定は減圧蒸溜法¹⁵⁾により行い, urea-N の測定は除蛋白液について, diacetylmonoxime を用いる A. A. Ormsby 法¹⁷⁾に依り光電比色した。又細菌群の変化の測定は一定日数毎に試料を50ml容の滅菌 homogenizer にて27mlの滅菌生理食塩水と共に5分間良く homogenize し, 後常法の如く適当に稀釈して平板培養法により Table 1 に示す5種類の培地に培養してこれに発育する集落の数を測定した。

Table 1. The composition of media

	Medium I	Medium II ¹⁹⁾	Medium III ²⁰⁾	Medium IV ²⁰⁾	Medium V ¹⁸⁾
Composition	Beef extract 10g	Urea 30g	Urea 20g	Urea 50g	NH ₄ Cl 6g
	Peptone 10g	K ₂ HPO ₄ 0,5g	CaCl ₂ 0,1g	K ₂ HPO ₄ 0,5g	MgSO ₄ 0,2g
	NaCl 5g	C ₆ H ₅ O ₇ Ca ₃ 10g	Beef extract 5g	Soil extract 100ml	KH ₂ PO ₄ 3g
	Agar 20g	Agar 20g	NaCl 0,1g	Agar 20g	Na ₂ HPO ₄ 6g
	Water 1000ml	Water 1000ml	K ₂ HPO ₄ 1g	Water 1000ml	Glucose 4g
	pH 7	pH 7	FeCl ₂ 0,01g	pH 7	Agar 20g
			MgSO ₄ 0,3g		Water 1000ml
			Agar 20g		pH 7
			Water 1000ml		
			pH 7		

b) 結果

以上の方法により腐敗進行過程に於ける urea-N, ammonia-N の増減及び細菌群の変化を測定した結果は Fig. 2 に示す如くである。実験 I の際と同様初期3日目までに ammonia-N は急激に増加し300mg%となり, 以後4~5日間恒量の後少しづつ減少し始めた。urea-N は ammonia-N の増加と対照に初期に於て急激に減少し, 以後10日間恒量の後再び減少して24日間には殆んど全量が分解しつくされた。細菌群の変化は Fig. 2 により明らかな如く尿素細菌群(III, IV及びV群)は初日に於て普通細菌群(I及びII群)の約1/100で10²程度より認め得なかつたが, 腐敗の進行と共に初期3~5日目までに急激に増加し後者と略同数となる。此は丁度初期に於ける ammonia-N 及び urea-N の増減に平行している如く思われる。其の後約16日間は発育が停止, 若しくは減少を示し後期に於て再び漸次増加を示した。其の際IV群のみは急激に増加し, I及びII群と略同数となつている。一方普通細菌群(I及びII群)は初期に於て10⁴程度あつたものが腐敗の進行と共に対数的に増加し後期即ち17日目で約10⁷となり発育が停止して以後次第に減少を示して居る。IV群即ちN源としてNH₄Clのみを含有する培地に発育する所謂 non-exacting-bacteria はI及びII群と略同数又は稍下廻つた数で殆んど其等と平行した変化を示して居る。以上の結果の中, 初期に於て ammonia-N, urea-N の増減が急激で有ることは清水²⁾, 日引⁹⁾, 高橋¹¹⁾の結果と同様であるが, 後期に於て ammonia-N が減少を示して居る事は全然異なつた現象である。又尿素細菌数と普通細菌数との比は木俣¹⁴⁾等の結果といささか異つて居る。又 urea-N の減少に於て清水, 大石²⁾が指摘して居る step と思われる点が観察された。

考 察

以上2回の実験に於て尿素細菌の急激に増加を示す初期に於て urease 活性は最大となり, それと稍平行して urea-N の大部分が消失し, 反対に ammonia-N は急激に増大, 其後尿素細菌が増殖停止又は減少を始める

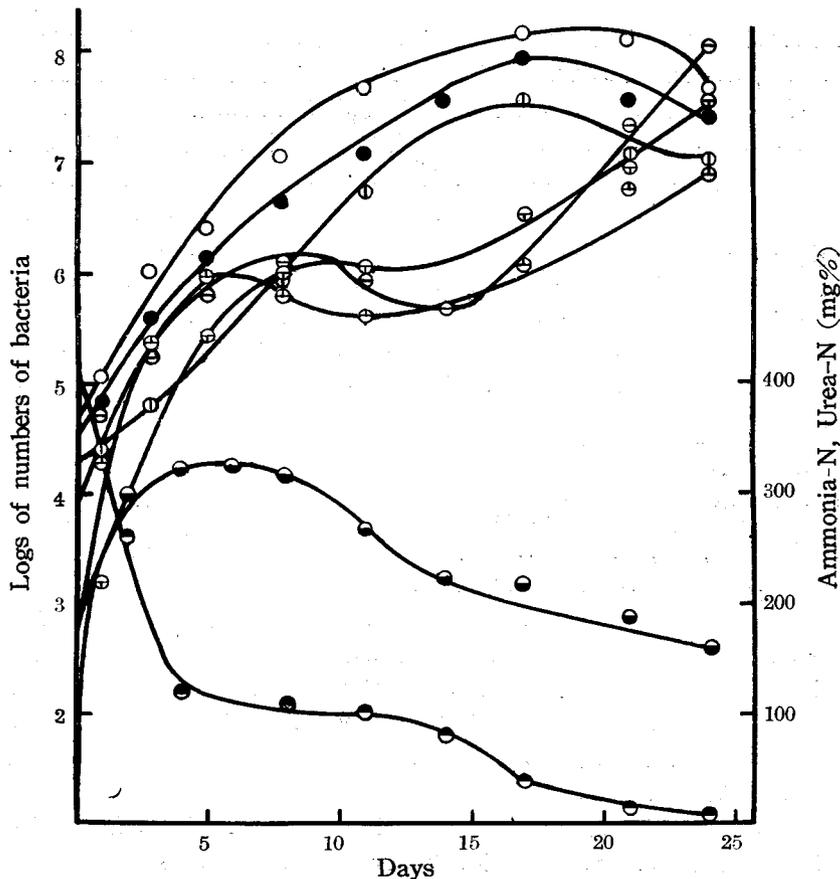


Fig. 2. Changes of bacterial flora, ammonia-N (volatile-N) and urea-N during spoilage of shark muscle at 15° to 20°C

- Bacterial group I, grown on medium I at 30°C
- // II // 37°C
- ⊕ // III // medium II at 30°C
- ⊖ // IV // III //
- ⊗ // V // IV //
- ⊙ // VI // V //
- Ammonia-N
- Urea-N

頃に urease活性は急激に減少し、後期に於て尿素細菌が再び漸次増加を示し、又普通細菌の増殖が最大となる頃に urease活性も又再び増加を示した。実験IIに於ては其の頃に減少が一時的停止して居た urea-Nが再び減少を示した事等から考えると、鯨肉に於ける尿素的の分解の大部分が細菌の酵素によるものであらうと思われ細菌組成の変化と urease活性との間には密接な関係が有ると予想出来るが、其の間に於ける関係がどの様なものであるかと云う事は以後の実験にまたねばならない。然し実験Iに於ける初期urease活性の変化は清水、大石⁷⁾等の結果と稍一致するもので、同氏等は此の変化は細菌の増殖によるものであらうと述べている。又 Gale が其の著書¹⁸⁾に於て細菌の發育齡と、乾燥菌一定量当りの酵素量との間について二つの型の関係を述べており、第I型の酵素は發育早期の培養が高い活性を示し、培養の生長につれて此の活性が弱まり細胞分裂が停止した後は低下するので、此の型のもは細菌の發育の為に細胞が持たねばならぬ同化酵素の特徴であり、第II型の酵素は發育早期の細胞は殆んど其の酵素活性がないか、全く酵素を持つて居ないが發育中に

次第に作られ細胞分裂が停止する時期にその量が最大となり発育が終つた後は又活性が弱まるもので、此の様な変化をする酵素は発育時の合成過程に直接関係がない異化、或は防禦機構に関係するもので有ると述べて居るが、此の説が妥当で有るとすれば、著者等の実験に於ける初期の urease 活性の変化は尿素細菌（Ⅲ、Ⅳ及びⅤ群）の発育に起因するⅠ型の変化であり、以後に於ける変化は普通細菌の発育に起因するⅡ型の変化によるものではなからうかとも考えられる。此の点については今後個々の細菌について究明したい。次に ammonia-N が他の多くの報告と異り後期に於て減少を示しているが、再度の実験に於ても同様の現象が見出されたので著者等の測定法に起因するものとも思われず、本研究に於ては試料の調製に際し殺菌ランプを用いる等、特に空中細菌の汚染を防いだので Fig. 2 に見られる如く普通細菌の殆んどが海洋に由来すると思われる non-exacting-bacteria であつた為、ammonia-N が此の種細菌に利用されたのではないかとも考えられ、此の事に関してはいずれ機会のある時に更に究明したい。尙実験Ⅰと実験Ⅱの変化の間に時間的に若干のずれが認められるが、これは後者の試料放置温度が前者に比して高かつた為ではなからうか、終りに望み本研究遂行に当り終始実験器具を貸与下され、又助言を賜つた本学大石講師に衷心より謝意を表する次第である。

要 約

腐敗過程に於ける鮫肉の水抽出液 urease 活性の変化及び細菌相の消長を観察した結果は次の如くである。

- 1) 鮫肉抽出液の urease 活性は初期 4 日目頃まで増加を示して最大となり、以後急激に減少し 20 日目頃に再び僅かの増加が認められたが、その増加は間もなく低下した。
- 2) 細菌群の変化は初期に於て尿素細菌が急激に増加して普通細菌とほぼ同数に達したが、以後恒数、若しくは減少して普通細菌の 1% 程度となる。然し後期に於て普通細菌が減少を始める頃に再び少しづつ増加を示した。又 N 源として NH_4Cl のみ含有する培地に良く発育する細菌群は普通細菌より稍下まわつた数で、それと略同様の発育を行う事から普通細菌の大部分が此の群の細菌により占められるのではないかと思われた。尙こゝで普通細菌と呼ぶものは普通寒天培地によく発育した細菌群であり、尿素細菌とは尿素を含む培地によく発育した細菌群を呼ぶものである。
- 3) 以上の結果から細菌組成の変化と水抽出液の urease 活性の間には密接な関係が有ると考えられ、鮫肉の腐敗に於ける尿素の分解の大部分が細菌の酵素によるものであらうと推察した。

文 献

- 1) 野口栄三郎 (1906). 日水誌 1, 21.
- 2) 清水 亘・大石圭一 (1951). 同誌 16, 547.
- 3) 須山三千三・徳弘 真・須山善雄 (1950). 同誌 16, 211.
- 4) Oens, W. (1922). *J. Biol. Chem.* 54, 693.
- 5) 富士川濤 (1935). 朝鮮水試事業報告 6, 78.
- 6) 清水 亘・大石圭一 (1951). 日水誌 16, 423.
- 7) ———— (1951). 同誌 17, 33.
- 8) ———— (1951). 同誌 16, 545.
- 9) ————・日引重幸 (1951). 同誌 19, 139.
- 10) ———— (1953). 同誌 19, 159.
- 11) 高橋豊雄・田中武夫 (1950). 同誌 15, 777.
- 12) 森高次郎・小林敏雄 (1950). 同誌 15, 45.
- 13) Wood, E. J. F. (1950). *Aust. J. Mar. Freshwater. Res.* 1, 129.
- 14) Kimata, M. & Hata, Y. (1953). *Res. Inst. Food. Sci., Kyoto Univ.* 5, 55.
- 15) 厚生省 (1951). 食品衛生検査指針 II. 371 p.
- 16) Umbreit, W. W. (1951). *Manometric techniques and tissue metabolism.* 227p.
- 17) Ormsby, A. A. (1942). *J. Biol. Chem.* 146, 595.
- 18) Gale, E. F. (1951). *Chemical activities of bacteria.* 213p.
- 19) 宮路憲二 (1941). 応用細菌学実施篇. 462p.
- 20) Allen, O. N. (1951). *Experiments in soil bacteriology.* 127p.