



Title	カマボコ表面よりのネット細菌の侵入速度
Author(s)	谷川, 英一; TANIKAWA, Eiichi; 藤井, 豊 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 9(2), 145-148
Issue Date	1958-08
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23039">https://hdl.handle.net/2115/23039</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	9(2)_P145-148.pdf



## カマボコ表面よりのネット細菌の侵入速度

谷川 英一・藤井 豊

(北海道大学水産学部水産食品製造学教室)

### Velocity of Invasion of Bacteria from the Point of the Slime ("Neto") formed on the Surface of the Fish Jelly Product, ("Kamaboko")

Eiichi TANIKAWA and Yutaka FUJII

#### Abstract

If a kind of fish jelly product called "Kamaboko" is placed at room temperature for a couple of days, it will produce a transparent, slimy material (called "Neto") on its surface as if it were sweating. This "Neto" is made of bacterial colonies. The bacteria which form "Neto" are dominantly of various kinds, for example for sugared "Kamaboko": *Streptococcus*, *Leuconostoc* and *Micrococcus*, and for non-sugared one: *Micrococcus*, *Serratia*, *Flavobacterium* and *Achromobacter*. Those bacteria will invade into the inner part of the meat paste of "Kamaboko" from the point of the "Neto", and at last cause spoilage.

The authors have studied the invasion of the bacteria, the course of invasion and velocity of the invasion by microscopical photographic observations using non-sugared "Kamaboko" which was made from Atka-mackerel meat with by potato starch added.

The "Neto" bacteria invaded the inner part of the "Kamaboko" by moving from particle to particle of starch in the meat paste of the "Kamaboko". The part of fish meat protein in the paste has initially scarcely been attached by the "Neto" bacteria. The degree of the invasion of "Neto" bacteria at 15°C was estimated to be about 50, 200, 600, 1,000, 1,800 $\mu$  in depth on the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th day respectively after the formation of the "Neto", on the surface of the "Kamaboko". In making this estimate, use was made of stained preparates according to Lillie's method.

The changes of the condition of potato starch in the fish paste meat of the "Kamaboko" were observed to agree with the observations of Okada *et al.*<sup>7)</sup>

無包装のカマボコを室内に放置すると、数日後において、その表面に粘質物、所謂「ネット」が部分的に形成され、ついにはカマボコ全表面をおおうに至る。この「ネット」は木村<sup>1)</sup>によつて始めて細菌によることが明らかにされ、これを防止するには過酸化水素水をカマボコの表面に塗布することが効果的であるという。また木俣<sup>2)</sup>はカマボコの腐敗型式を三種に大別し、その第I型としてカマボコ表面に酸性透明の粘稠性の水滴様物質を生ずるもの、第II型として不透明のバターもしくはチーズ様の物質を生ずるもの、なお第III型として最初からカビを発生するものに分けている。この中第I型は典型的な「ネット」とみなされるもので、主として含糖カマボコにみられる腐敗型式でこの種のネットは酸性反応を呈し、アンモニア臭を発生せず主として *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus* 等の糖類から酸を生成する球菌類によつて惹起されるものとしている<sup>3)</sup>。第II型は無糖カマボコにみられる腐敗型式で、この場合の粘質物は中性またはアルカリ性を呈し、アンモニア臭を発生しこの種の腐敗型式のものからは、*Micrococcus*, *Serratia*, *Flavobacterium* 及び *Achromobacter* 属の蛋白分解能を有する細菌を分離している<sup>4)</sup>。第III型は第II型と同様に無糖カマボコにみられる腐敗型式で、含有澱粉量が特に多い場合にみられるという。

最近、内山ら<sup>5)</sup>は前記第I型の腐敗型式に属する含糖カマボコのネットの形成機構について研究し、ネット形成時には蔗糖が減少し還元糖が増加することを認め、且つ生成されたネットはデキストランと、その諸性質を

同じくすることを観察している。

一方、内山ら<sup>6)</sup>は偏光顕微鏡を用いてカマボコ中の澱粉の糊化と加熱温度について検討を行い、さらに、岡田ら<sup>7)</sup>は位相差顕微鏡によりカマボコ内部における澱粉粒の状態を観察している。

著者らは無糖カマボコについて、カマボコ表面にネトが発生する状況を位相差顕微鏡により観察した。

## 実験の部

### 1. 試料の調製並に貯蔵

新鮮なホッケより精肉のみを採取し、細切後、流水中で1時間水晒しを行い、ついでチョッパーにかけて細碎し、これに5%量の馬鈴薯澱粉を加え、30分間攪潰混和したのち、2%量の食塩と10%量の水を添加し30分攪潰を継続して、成型に附し、100°C、50分間蒸煮して製品化した。

上記、供試カマボコを80%の湿度に調節した硫酸デシケーター中に保存し、室温(15°±2°C)に放置し、1日1回宛、試料カマボコの表面部を10×20×10mm宛切りとり、約40倍量のBouin液(飽和ピクリン酸15cc, 40%ホルマリン25cc, 及び氷醋酸5cc混液)中に浸漬して固定した。

この際、外観的には4日目で全表面の $\frac{1}{4}$ 、5日目で $\frac{2}{5}$ 、6日目で $\frac{4}{5}$ 程度がネト粘質物で覆われておつたが、試料採取部分は常にネトの発生のも著しい部分のみを用いた。なおこの場合のネトは木俣<sup>2)</sup>も無糖カマボコの第II腐敗型式のものについて観察しているように、1日後においては透明な水滴様のものであつたが、2~3日以降は不透明なチーズ様のものとなり、かつ7日目においてはやゝ異臭を感じるようになった。また本試験の貯蔵条件においては、1週間以内ではカマボコの内部腐敗<sup>9)</sup>の徴候は全く認められなかつた。

### 2. 切片の作製

Bouin液で固定した試料を70%アルコールに浸漬して脱色促進剤として炭酸リチウムの飽和液を数滴加え、30分間放置後、常法によりアルコール脱水処理し、パラフィン包埋後、厚さ10 $\mu$ に切断し、スライドガラス上に貼附した。

ついで各貼附切片をキシロール(2回)、無水アルコール(2回)、95%、90、80、70、50、及び30%のアルコール液中に順次5分間宛浸漬し、パラフィンを完全に除去すると共に最後に蒸留水中で完全に水戻しを行い、下記の種々の染色法により、染色処理後、30%、50、70、80、90、95%アルコール、ついで無水アルコール(2回)に5分間宛浸漬脱水を行い、さらにキシロール・アルコール(1:1)、キシロール(2回)液中に5分間宛浸漬した後バルサム封入を行つた。かくして得られた切片標本を位相差顕微鏡により検鏡した。

### 3. 染色方法

#### (1) Weigert のフィブリン染色法(グラム染色<sup>9)</sup>)

グラム陽性菌の染色法で、本試験において発生したネト菌も本法により染色し得た。

#### (2) Lison 法<sup>10a)</sup>

多糖類硫酸塩はトルイジン青によりメタクロマージを起して青紫色となる。第1液と第2液との2種の染色を行うが、第1液の方が強く染まる。ネト菌の発生顕著な部分が濃い紫色に染色された。

#### (3) Lillie 法<sup>10b)</sup>

多糖類の染色に適し、赤~赤紫色となる。通常のカマボコでは澱粉粒が美しい赤色に染色されたが、ネト菌の侵入部分では澱粉粒は全く染色されなかつた。

#### (4) Chévrement et Frédéricq 法<sup>11)</sup>

これはSH-基による反応を利用した蛋白質染色法の一つであつて、蛋白質部分が弱い青色に染色される。

### 4. 検鏡結果及び考察

検鏡結果のうち、主要なものを掲げると Fig. 1~12の如くであつて、この中 Fig. 6, 8及び12を除き他の顕微鏡写真はどれも同倍率(検鏡には200倍とした)のものである。

Fig. 1は染色を行わず直ちにバルサム封入したもので、他の染色したものとの比較とした。この写真中、

粒状のものは澱粉粒（あるいは澱粉粒の脱落した空隙）であり、その形状も大小様々のものが認められる。この中で大型のものは糊化した澱粉粒と考えられ、その大きさは水中で加熱糊化した馬鈴薯澱粉に比し約半分程度であり、小型のものは生澱粉粒子とみなされるものである。

Fig. 2, 3 及び 4 はグラム陽性菌染色法によつたもので Fig. 2 は貯蔵後 3 日目のものでカマボコ表面にネト菌が附着発生し、表面部分が侵されはじめた時期のものであり、Fig. 3 はその後 2 日を経た 5 日目のものであつて、ネト菌の侵入はすでに  $0.07 \times 20mm$  附近にまで達していた。ネト菌の侵入部の周辺にある澱粉粒は白色を呈し、ネト菌未侵入部周辺の澱粉粒との区別は明瞭であつた。またネト菌の存在する部分は青紫色に染色されている。

Fig. 4 は 7 日目のものについて検鏡したものでカマボコ表面はネトで泥状を呈したものについての観察結果である。したがつて青紫色に染色されたネト菌の分布は極めて広範囲に亘つている。

Fig. 5 及び 6 は 5 日目のものについて Lison 法により染色したもので Fig. 6 は Fig. 5 を更に拡大したものである。この場合にはネト侵入部が澱粉粒をも含めて全般的に赤紫色に染色されていた。

Fig. 2, 3, 5 及び 6 を通じて観察されることは、ネト菌の侵入が、まずカマボコ表面に附着後、主として澱粉粒から澱粉粒へと飛石つばいに内部へ侵入していくことである。しかしてその状態が極度に進行した最表面においては多孔質構造が破壊されてネト特有のどろどろした粘液状物質が形成される。従つてこの場合本試験に供せる無糖カマボコのネト発生時には魚肉蛋白質が部分的に分解することも当然考慮されるべきことであつて、この場合形成された粘質物の一部には魚肉蛋白質の中間分解物も含まれるものと思われる。

Fig. 7 及び 8 も Lison 法により染色したものであるが、Fig. 7 の倍率を高くした Fig. 8 においては、上部よりのネト菌の侵入の状態が一見して明らかであつた。また Lison の染色法によりネト菌の作用をうけた澱粉のみが染色されるということは、次の Lillie の染色法で反対にネト菌の作用をうけた澱粉のみが染色されなかつたことと併せ考えると、ネト菌の作用により澱粉が幾分、変質、分解を蒙ることが想定される。

Fig. 9 及び 10 は Lillie の染色によつたもので Fig. 9 は 2 日目、Fig. 10 は 5 日目のカマボコ表面における検鏡結果である。Fig. 9 によれば澱粉粒は美しい赤色に染色され、澱粉粒以外の空隙、或は岡田らりの推定している如き澱粉粒の内容物の剝離した場所は未染色の状態で存在していた。しかしネト菌の侵入したカマボコでは Fig. 10 にみるように、ネト菌の侵入した部分の澱粉粒はもはや染色されず、ネト菌未侵入の部分の澱粉粒のみが赤色に染色された。

次に Fig. 11 及び 12 は Chévrement et Frédéric 法により染色したものでこの場合には蛋白質部が青色に染色されていた。この方法によつたものではネト菌の侵入の状態は殆んど判別できず、ネトの最も著しく発生した最表面の部分において多少巨視的にみとめられた多孔状構造に切断部を生じているのを認めただけであつた。したがつて Fig. 11 は Fig. 1 の対照試験のものと非常に類似した状況を示しているが、ただその澱粉粒の内部に白色の曲線部が認められ、澱粉粒内に著しい陰影の存在することが判明した。そこで倍率を高めて内部の状態を観察した結果 Fig. 12 に示されるように、澱粉粒と思われる粒状物は滑らかな表面ではなく、極めて凹凸の著しい不整な立体構造を有していることが認められた。これは岡田らりも述べている如く、加熱による澱粉粒の膨化時には、凝固温度が澱粉の糊化温度以下の澱粉粒周辺の蛋白質が既に凝固しているため、その後起る澱粉粒の膨化が著しく阻害されるためと思われる。

次にネト菌のカマボコ内部への侵入速度を検鏡により推定した結果を Table 1 に示した。この場合、ネト菌の侵入位置を最も明瞭に知り得た染色法は Lillie 法であつたが、この染色法によつたものについての観察結果では、ネト菌の侵入は実験的に  $Y = 7x^2 - 3x$  で表わされた。但し上式中  $Y$  はネト菌の表面よりの侵入深度 ( $\mu$ )、 $x$  はネト菌の発生した日を 0 とした後の経過日数である。

Table 1. において Lison 法と Lillie 法の両染色法によるネト菌の侵入位置決定の差異が極めて著しいことは澱粉粒はネト菌の侵入により、まず Lillie 法によつて染色される形態のものに変化せしめられ、しかるのちに或一定の変質過程を経て Lison 法により染色される物質に変化するものであらうと思われ、その中間

Table 1. The velocity of invasion of "Neto" bacteria from the surface of the non-sugared "Kamaboko" by various staining methods

Staining method	Sample (days)	A <sub>1</sub> (1 day)	A <sub>2</sub> (2 day)	A <sub>3</sub> (3 day)	A <sub>4</sub> (4 day)	A <sub>5</sub> (5 day)	A <sub>6</sub> (6 day)	A <sub>7</sub> (7 day)
Lillie's method		-	+ -	50 $\mu$	200	600	1,000	1,800
Lison's method (No. 1 soln.)		-	-	-	+ -	50~100 $\mu$	100~150	300~400
Lison's method (No. 2 soln.)		-	-	-	-	+ -	0~100 $\mu$	0~100
Weigert's method (Gram staining)		-	-	-	+ -	0~50 $\mu$	0~100	200~300

Note: The marks (-) showing the invasion of "Neto" bacteria was visible, but not distinguish of its position

変質過程が両染色方法の侵入速度判定上の差となつてあらわれたものであろう。グラム染色法の場合もまたネト菌の繁殖が或程度以上に達した部分のみが観察可能程度に染色されるため、比較的遅い侵入速度を示したものと考えられる。なお Lison 法の第1及び第2液の染色上の程度の差は使用トルイジン青溶液の性質の差によるものである。

今後無澱粉カマボコ、含糖カマボコ等について放置条件等を種々に変えて検討すべきものと思われる。

要 約

1. 無糖カマボコ(ホツケ)についてネト菌の侵入状態を顕微鏡的に観察した。
  2. その結果、ネト菌のカマボコ表面よりの侵入は澱粉粒を主な侵入経路とする如く観察され、従つて澱粉粒間の魚肉蛋白のネト菌による分解も考慮されるべきものと思われた。
  3. 本実験におけるネト菌の侵入速度は Lillie 法による染色法によつた結果では 15°C では 1, 2, 3, 4 及び 5 日目においては夫々表面より約 50, 200, 600, 1000 及び 1800 $\mu$  の深度にまで達していた。
- 終りにのぞみ本実験における検鏡切片の作成に当り、御援助を戴いた当学部、新山英二郎助教に対し深謝する。なお本研究は昭和31年度文部省科学試験研究費によつて行つたことを附記して謝意を表する。

文 献

- 1) 木村 (1934). 水産製造全書, 中巻 [469p.] 東京; 大日本水産会.
- 2) 木俣 (1951). 日水誌 16 (9), 428.
- 3) 木俣 (1949). 応用菌学 3 (2), 45.
- 4) 木俣 (1951). 日水誌 16 (12), 46.
- 5) 内山・天野 (1958). 日水誌 23 (11), 716.
- 6) 内山・天野 (1955). 同 上 20 (9), 830.
- 7) 岡田・右田 (1956). 同 上 22 (4), 265.
- 8) 横関 (1958). 日水誌 23 (9), 539, 543.
- 9) 水平・山田 (1955). 新しい組織学研究法. [204p.] 東京; 医歯薬出版.
- 10a) 市田 (1953). 細胞化学, その理解と術式. [225p.] 東京; 本田書店.
- 10b) 市田 (1953). 同 上 [187p.]
- 11) Lison, L. (1954). "組織化学および細胞化学" 今泉訳 [216p.] 東京; 白水社.

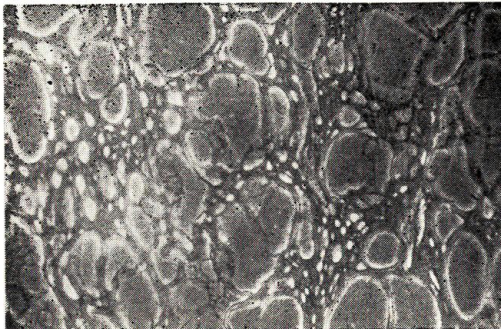


Fig. 1. Not stained "Kamaboko" ( $\times 70$ )  
(A<sub>1</sub>: after 1 day)

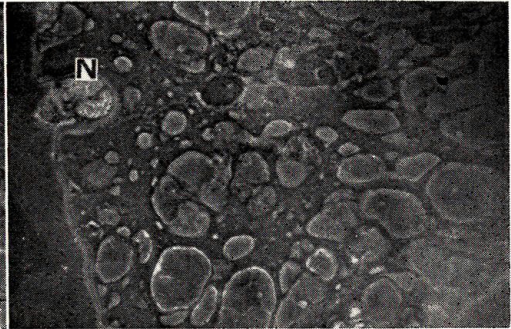


Fig. 2. Stained by Weigert's method  
(Gram staining) ( $\times 70$ ) (A<sub>3</sub>: after 3 days)  
N: Invaded part of the meat paste of  
"Kamaboko" by "Neto" bacteria (Similar  
signs in subsequent figures showed the  
same mean as in this Fig.)

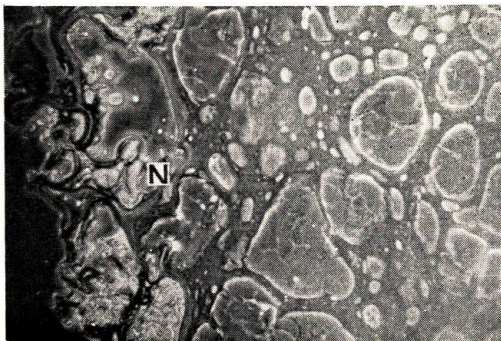


Fig. 3. Weigert's method ( $\times 70$ ) (A<sub>5</sub>:  
after 5 days)

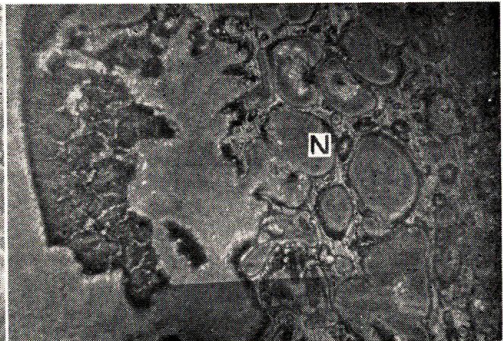


Fig. 4. Weigert's method ( $\times 70$ ) (A<sub>7</sub>:  
after 7 days)

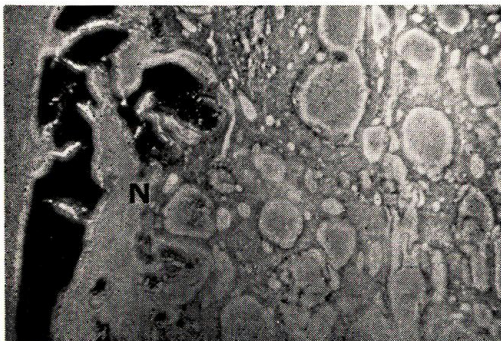


Fig. 5. Stained by Lison's method ( $\times 70$ ) (A<sub>5</sub>: after 5 days)

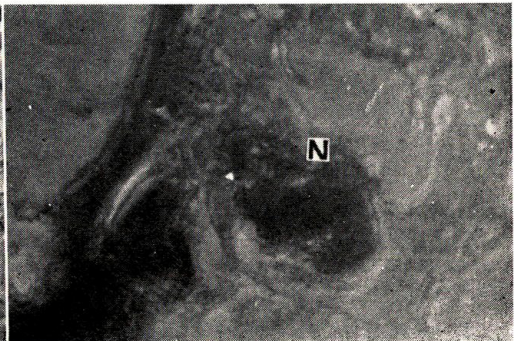


Fig. 6. Lison's method ( $\times 280$ ) (A<sub>5</sub>:  
after 5 days)

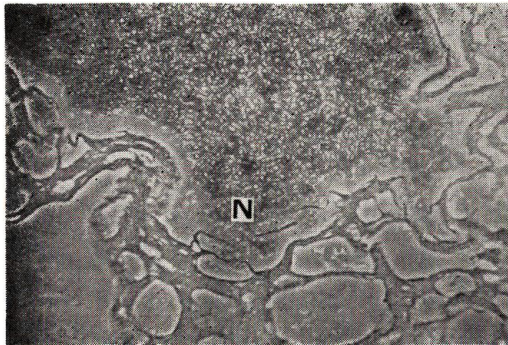


Fig. 7. Stained by Lison's method ( $\times 70$ ) (A<sub>7</sub>: after 7 days)

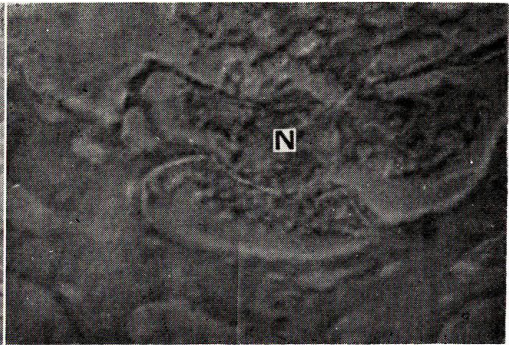


Fig. 8. Lison's method ( $\times 240$ ) (A<sub>7</sub>: after 7 days)

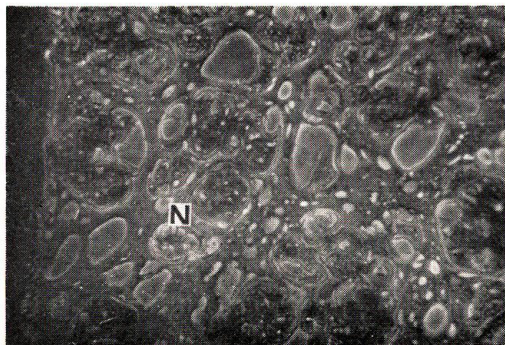


Fig. 9. Stained by Lillie's method ( $\times 70$ ) (A<sub>2</sub>: after 2 days)

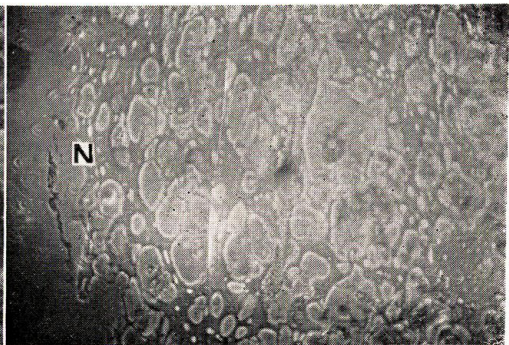


Fig. 10. Lillie's method ( $\times 70$ ) (A<sub>5</sub>: after 5 days)

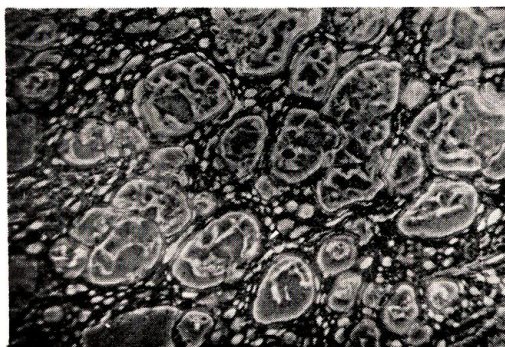


Fig. 11. Stained Chévremont and Frédéricq's method ( $\times 70$ ) (A<sub>5</sub>: after 5 days)

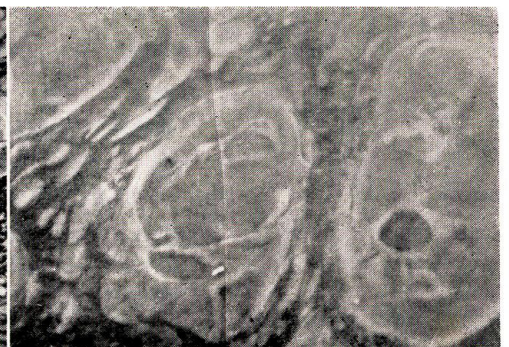


Fig. 12. Chévremont and Frédéricq's method ( $\times 240$ ) (A<sub>5</sub>: after 5 days)