

9360 醗酵型肉製品における微生物スターターの活性保持と食塩の役割

助成研究者：関川 三男(帯広畜産大学 畜産学部)

共同研究者：三上 正幸(帯広畜産大学)

三浦 弘之(帯広畜産大学)

醗酵型肉製品は、独特の風味を醸成させるために加工工程で加熱処理が行われない。これらの製品の製造に当っては、温度や湿度が制御されるが、自然汚染した微生物の増殖程度によっては、製品に不快臭が生じたり色調の褪色をきたすことがある。そこで、製品に対して有用と考えられる微生物をスターターとして原料肉に添加することにより、有害な微生物の増殖を抑制し、製品の品質を均一、かつ良好に維持することが試みられている。しかし、原料肉に加えられた食塩によって、微生物の代謝が阻害され増殖が抑制されることがあり、スターターを添加することによって期待される効果が十分に現れないことがある。そこで、本研究では、高濃度の食塩による微生物の発育阻害を緩和する性質や低濃度で水分活性を低下させることが知られているペタインに注目し、醗酵型肉製品の乾燥工程で生じる高食塩濃度環境下において、製品中に加えられた微生物スターターの増殖と食塩およびペタイン濃度との関係を検討した。

スターターとして *Micrococcus variety* を使用することの利点は、硝酸塩を還元する能力が高いことや、広範囲のpHで生育すること、タンパク質の分解力が強いこと等が挙げられる。今回は、硝酸塩の還元性に注目し、食塩濃度との関係を調査したが、食塩5%で最も高い活性が得られた。この試験では、静置培養を行ったが、培養2日後の濁度は、食塩の濃度が低い方が高いので、硝酸塩の還元は、単純に細菌数に依存しているものとは考えられない。また、供試菌の硝酸塩還元には食塩が重要な役割りを演じていることが推察される。さらに、ペタインを添加すると高濃度の食塩存在下でも硝酸塩の還元活性がやや回復することが確認できたので、スターターとして *Micrococcus variety* を使用する際には、塩漬剤へ食塩とともに少量のペタインを加えることが有用と考えられる。

高食塩濃度や高浸透圧に対して、一般にグラム陽性菌は陰性菌よりも抵抗性を示し、さらにこの傾向は球菌で著しい。グラム染色の作用機序は、細菌の細胞表層構造の違いや成分に依存しており、食塩に対する抵抗性も表層構造の差に一部依存しているものと考えられる。今回の走査型電子顕微鏡像から、明らかに食塩は *Micrococcus variety* の細胞表層の構造に影響を与えていることが示唆された。さらに、ペタインを加えることにより、この影響が除かれ形態が食塩0%のものに類似することが明かとなった。

今後は、*Micrococcus variety* の耐塩性の作用機序およびペタインによる阻害解除機構と形態との関係等を調査することが重要である。

9360 醱酵型肉製品における微生物スターターの活性保持と食塩の役割

助成研究者: 関川 三男(帯広畜産大学 畜産学部)

共同研究者: 三上 正幸(帯広畜産大学)

三浦 弘之(帯広畜産大学)

目 的

醱酵型肉製品(非加熱食肉製品;生ハム・ドライソーセージ)は、独特の風味を醸成させるために加工工程で加熱処理が行われない。これらの製品の製造に当っては、温度や湿度が制御されるが、自然汚染した微生物の増殖程度によっては、製品に不快臭が生じたり色調の褪色をきたすことがある。そこで、製品に対して有用と考えられる微生物をスターターとして原料肉に添加することにより、有害な微生物の増殖を抑制し、製品の品質を均一、かつ良好に維持することが試みられている。しかし、原料肉に加えられた食塩によって、微生物の代謝が阻害され増殖が抑制されることがあり、スターターを添加することによって期待される効果が十分に現れないことがある。

そこで、本研究では、高濃度の食塩による微生物の発育阻害を緩和する性質や低濃度で水分活性を低下させることが知られているペタインに注目し、醱酵型肉製品の乾燥工程で生じる高食塩濃度環境下において、製品中に加えられた微生物スターターの増殖と食塩およびペタイン濃度との関係を検討した。

方 法

供試菌

供試菌は、帯広畜産大学生物資源利用学講座で保存されている市販の醱酵ソーセージから分離された Micrococcus variety, Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus plantarum の3菌株、Escherichia coli および腐敗肉から分離した Pseudomonas sp., Acinetobacter sp. および Achromobacter sp. である。

耐塩性試験

肉エキス培地に種々の濃度で食塩を加え平板および振盪培養により、細菌の増殖状態を検討した。また、細菌の形態は、走査型電子顕微鏡で、細菌の凝集状態は、光学顕微鏡で観察した。

水分活性

水分活性は、コンウエイユニットを用いるグラフ挿入法から求めた（ 25 ± 2 °C、 2 ± 0.5 時間）。また、種々の微生物の生育限界水分活性値は、ペタインあるいは食塩を用いて所定の水分活性に調整した平板培地での生育状態から推定した。

硝酸塩還元活性

肉エキス液体培地に硝酸カリウムを加え、これに供試菌を接種し2日間培養後、遠心分離し上澄の亜硝酸イオンをジアゾ化法で定量し、この値を硝酸塩還元活性とした。

モデル醗酵型肉製品の作製

牛肉あるいは豚肉（約500g、厚さ約1.5cm）を材料として、塩漬液に10日間（冷蔵庫内）浸漬し、温度と湿度を制御し熟成させて醗酵型肉製品を作製した。

結 果

耐塩性

Fig. 1 は、振盪培養における *Micrococcus* variety の生育曲線で、食塩濃度の増加に伴い誘導期は長くなるが、48時間後の濁度は、いずれの食塩濃度でも2.0以上の値となる。振盪培養48時間後の *Micrococcus* variety と *Escherichia coli* の生菌数は、Table 1. に示した通り、*Micrococcus* variety は、食塩に対して抵抗性を示し、さらに、ある程度の食塩、今回の結果では5%および10%の食塩の存在下で高い生菌数を示し、生育に食塩が必要であることが分る。しかし、15%以上の高濃度では、生育が阻害されている。*Escherichia coli* は、食塩濃度が高くなるのに伴い生菌数が減少し、15%以上では生育できないことが明らかである。また、ペタイン添加により *Escherichia coli* では、食塩10%、*Micrococcus* variety では食塩10%以上で生菌数の増加が認められた。

Fig. 2 は、平板培養における *Micrococcus* variety に対する食塩とペタインの影響を観察した結果で、コロニーの面積の平均値をTable 2. に示した。食塩の濃度が高くなるとコロニーの面積は減少した。また、ペタインの添加は、食塩5%を除いて、コロニーの面積に大きな影響を与えなかった。

Fig. 3 は、*Micrococcus* variety の走査型電子顕微鏡像で、食塩0%と食塩5%（含ペタイン0.1%）の培地から得られた菌体の形態は類似していたが、食塩5%のものは表面に皺様のものが多数認められた。

水分活性

標準寒天培地に種々の濃度でベタインを加え、所定の水分活性を示す平板培地を作製し、これに予め前培養した菌液を一定量加え、37℃で7日間培養した後、肉眼でコロニーの有無を確認した。この結果をTable 3. に示した。

Fig. 4 は、食塩とベタインの混合割合を変化させて水分活性を調整した培地における *Escherichia coli* の生育状況を示したもので、同一の水分活性値においては、食塩を単独で用いた方が、ベタインを含むものよりも生育を阻害している傾向が表れている。

Fig. 5 は、食肉を汚染する低温性細菌の生育曲線で、水分活性値をベタインで調節したブレインハートインフュージョン培地を用いたものである。供試菌全て、全体的な生育パターンは類似していたので代表的な *Pseudomonas* sp. を示した。いずれの水分活性値においても生育は認められるが、水分活性が低くなると生育速度が低下することが明らかである。

硝酸塩還元活性

Table 4 は、硝酸塩還元活性を調査した結果で、ベタインの有無にかかわらず、還元性は食塩5%の時に最大であり、食塩濃度5%および10%においては、ベタインが供試菌の還元力を賦活化していることが分る。

モデル醗酵型肉製品

Fig. 6 は、醗酵ソーセージの熟成中のpHの変化を示したもので、スターター添加および無添加区ともに3日目以降は大きな変化を示さない。*Micrococcus* variety添加区は、対照区と大きな差はないが、やや低いpHを示した。

Table 5 は、pHの変化が著しい熟成初期の4日間の生菌数、大腸菌群数、酸生成菌数を示したもので、*Micrococcus* variety添加により4日目には、大腸菌群数が0となった。

Table 6 は、塩漬中の塩漬液と試料肉の水分活性値の変化を示したもので、開始時には塩漬液の水分活性値が試料肉よりも低いが、7日目には塩漬液と試料肉でほぼ等しい値となり、10日目には、逆に試料肉の水分活性値が低くなった。

考 察

醗酵型非加熱肉製品である生ハムは、最も古い伝統的な肉製品のの一つで、少なくとも2,500年前からヨーロッパや中国で作製されてきた (Leistner)。このヨーロッパの製品は、塩漬や熟成にそれぞれ数ヶ月、完成までには約1年以上の期間を費やすために、その地域独自の環境で自然醗酵が生じ、このため各地域独自の風味が醸成されると言われ

ている。これらの肉製品を製造するに当って重要なことは、細菌学的な安全性を確保することである。我国では、1982年に非加熱肉製品の規格基準が告示され、生産が一般化してきたが、品質の良いものを短期間に製造し、速やかに流通させることが要求されてきた。また、1993年の食品衛生法の改正に伴い、醗酵ソーセージ等の製造が容易になったが、非加熱肉製品には、水分活性値により保存温度やpHを表示することが義務づけられた。

今回、試験を行った腐敗肉から分離した低温性細菌は、水分活性0.95で著しく生育が阻害され、改正された食品衛生法の保存温度でも大きな問題は無いと推定される。しかし、濁度の増加が認められるので生育速度は著しく低下しているものの完全に死滅しているのではないので、製品の製造や冷蔵に当っては汚染を極力避ける必要がある。

一般に、自然醗酵で作製された品質良好な非加熱肉製品において優勢な菌相は、耐塩性あるいは好塩性のMicrococcus や乳酸菌等であり、このことがスターターとして、これらの細菌が用いられていることの原因である。

今回、試作した醗酵型肉製品において熟成中のpHは、全期間を通じて乳酸菌は、対照区やMicrococcus variety添加区よりも低く推移したが、その変化は熟成3日目、すなわち初期に低下し、それ以後の変化ほとんどなかった。乳酸菌をはじめ、ほとんどの細菌は低いpHでは生育が困難であり、乳酸菌自身、生成した乳酸により生育阻害を受ける。熟成中のpHの変化から、スターターとして用いられる乳酸菌は、熟成初期には代謝が活発で酸生成を行うが、後期には不活性化するものと考えられる。醗酵型肉製品の風味において酸味は重要な要素であるが、初期の急激な酸生成は、pHの低下による有用菌の不活性化や酸敗の可能性がある。また、我々が行った官能検査から、乳酸菌を単独で用いたものよりもMicrococcus varietyあるいはその混用の方が全体的な風味が良いと判断された。すなわち、スターターとして乳酸菌を用いる際には、単独での添加ではなく、いくつかの菌種を混用する方が良いと考えられる。

Micrococcus varietyを使用することの利点は、硝酸塩を還元する能力が高いことや、広範囲のpHで生育すること、さらにタンパク質の分解力が強いこと等が挙げられる。

今回は、硝酸塩の還元性に注目し、食塩濃度との関係を調査したが、食塩5%で最も高い活性が得られた。この試験では、静置培養を行ったが、培養2日後の濁度は、食塩の濃度が低い方が高いので、硝酸塩の還元は、単純に細菌数に依存しているものとは考えられない。しかし、濁度と生菌数は、必ずしも平行的な関係にあるわけではないので、軽々に断定できないが、Micrococcus variety の硝酸塩還元には食塩が重要な役割を演じていることが推察される。さらに、ペタインを培地に添加すると、高濃度の食塩存在下でも硝酸塩の還元活性がやや回復することが確認できたので、スターターとしてMicrococcus varietyを使用する際には、塩漬剤へ食塩とともに少量のペタインを加えることが有用と考えられる。

高食塩濃度や高浸透圧に対して、一般にグラム陽性菌は陰性菌よりも抵抗性を示し、さらにこの傾向は球菌で著しい。グラム染色の作用機序は、細菌の細胞表層構造の違いや成分に依存しており、食塩に対する抵抗性も表層構造の差に一部依存しているものと考えられる。このことは、今回の走査型電子顕微鏡の観察結果から、明らかに食塩はMicrococcus variety の細胞形態に影響を与えていることが示唆されたことから推

察される。さらに、この影響は、ペタインを加えることにより、緩和されることが示唆された。

ペタインは、ある種の細菌に対しては、高濃度の食塩で阻害される呼吸活性に抵抗性を付与 (Rafaeli-Eshkol) することが示されている。これらの作用は、細胞内にペタインを蓄積することに依るのではなく、外側から高食塩濃度 (高浸透圧) による呼吸阻害を解除することによると推定されている (Shkedy-Vinkler)。これらの結果や今回の電顕像からペタインの作用部位の一つは、細菌の細胞表層と推察される。高食塩濃度や高浸透圧に対する細菌や植物の応答に関しては、現在、精力的な研究が行われているが、詳細な機構については不明な点も多い (Csonka)。今後は、Micrococcus varietyの耐塩性の作用機序およびペタインによる阻害緩和機構、特に今回示したような形態や細胞壁との関連性、あるいは醗酵型肉製品の塩漬剤における食塩やペタインの至適濃度、また、今回、言及することができなかったが、タンパク質分解活性と食塩の関係について調査することが重要である。

参考文献

Leistner, L., *Fleischwirtschaft*, 66 496, 1986

Csonka, L. N., *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 569, 1991

Rafaeli-Eshkol, D., *Biochem. J.* 109, 679, 1968

Shkedy-Vinkler, C. and Avi-Dor, Y., *Biochem. J.*, 150, 219, 1975

Table 1 Effect of salt concentration on bacterial count

betaine(%)	<u>E. Coli</u>		<u>M. var.</u>	
	0	0.1	0	0.1
NaCl(%)				
0	7.9	8.0	7.1	7.2
5	5.6	5.9	7.7	7.7
10	1.8	4.2	7.4	7.6
15	-	-	6.5	7.6
20	-	-	5.5	5.9

(log)

Table 2 Means (SD) of colony area

betaine(%)	0		0.1	
NaCl(%)				
0	0.18	(.08)	0.16	(.05)
5	0.06	(.02)	0.09	(.01)
10	0.03	(.01)	0.02	(.01)

(mm²)

Table 3 Minimal water activity for growth

	std. agar	BHI
<u>E. coli</u>	0.95	0.93
<u>Micrococcus</u> var.	0.89	0.88
<u>L. plantarum</u>	0.95	0.93
<u>P. cerevisiae</u>	0.94	0.92

std. agar; standard agar
 BHI; brain heart infusion agar

Table 4 Nitrate reduction activity

betaine	0	0.1
NaCl (%)		
0	0.30	0.26
5	1.65	2.11
10	0.65	1.60
15	0.16	0.15

(micro g/ml medium)

Table 5 Bacterial count of dry-cured ground beef

day	control			M. var.		
	std	coli	acid	std	coli	acid
0	4.6	3.6	4.6	5.4	3.6	4.5
2	7.1	5.4	6.8	7.3	4.8	6.9
3	6.9	4.1	6.9	6.7	4.3	6.9
4	7.1	3.6	7.7	6.9	-	6.8

(log)

std; Standard agar, common bacteria
 coli; Desoxycholate agar, coliform bacteria
 acid; BCP-plate agar, Acid producing bacteria

Table 6 Water activity of cured beef and pickle

day	beef	pickle
0	0.98	0.96
7	0.97	0.97
10	0.96	0.97

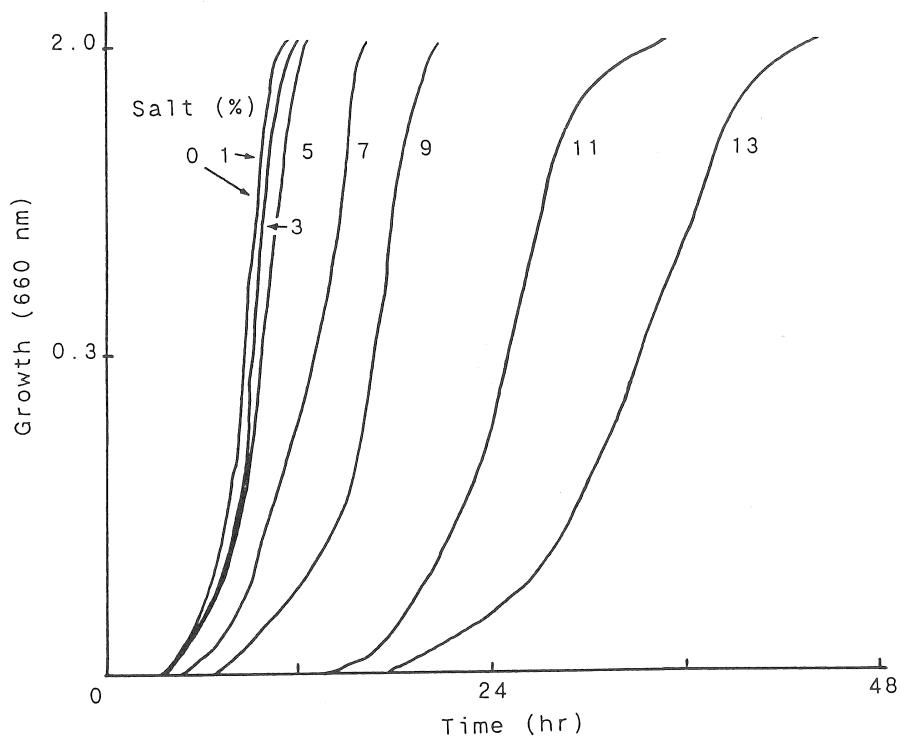


Fig. 1 Effect of salt concentration on growth curve of Micrococcus variety

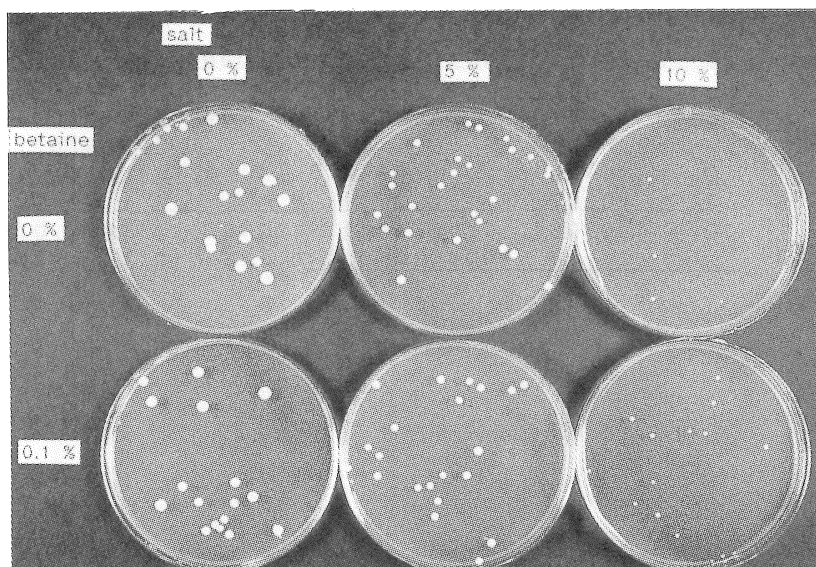
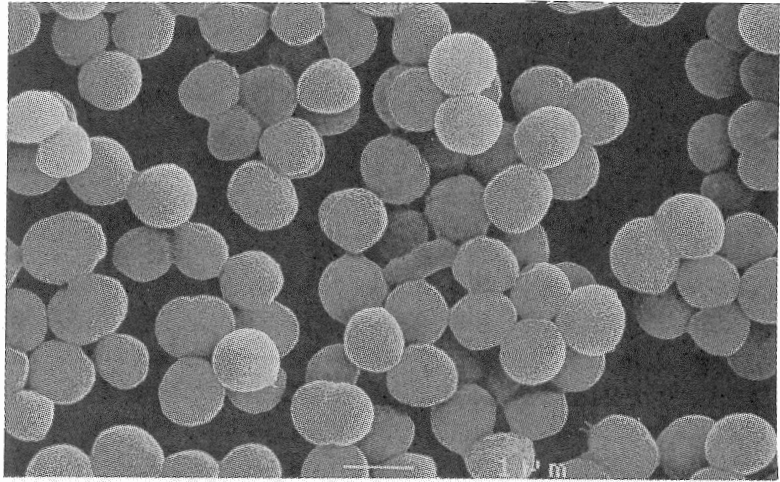
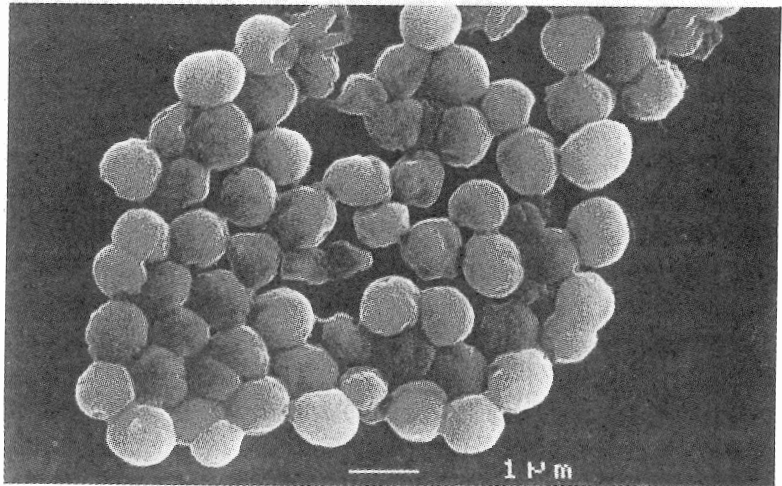


Fig. 2 Effects of salt and betaine on bacterial colony form

control



NaCl 5%



NaCl 5%

beatine 0.1%

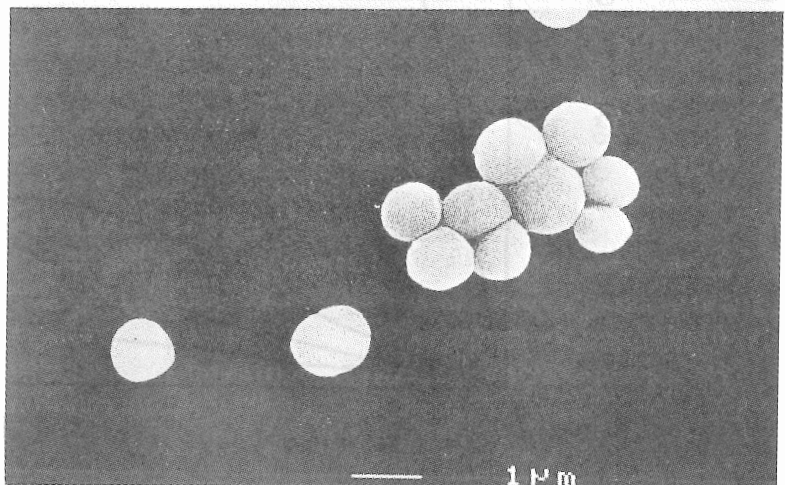


Fig. 3 SEM photographs of Micrococcus variaty

N:b	Aw 0.96						Aw 0.94					
	2	3	4	5	6	7	2	3	4	5	6	7
1:1	3	3	3	4	4	4	1	2	2	2	2	2
1:2	3	3	3	4	4	4	1	2	2	2	2	2
2:1	3	3	3	4	4	4	1	2	2	2	2	2
1:3	3	4	4	4	4	4	1	2	2	2	2	2
3:1	3	3	3	4	4	4	1	2	2	2	2	2
1:0	1	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0

Fig. 4 Growth of E. coli restricted water activity

N; NaCl, b; beatine

0; no growth, 1; <10, 2; <100, 3; <1000, 4; >1000

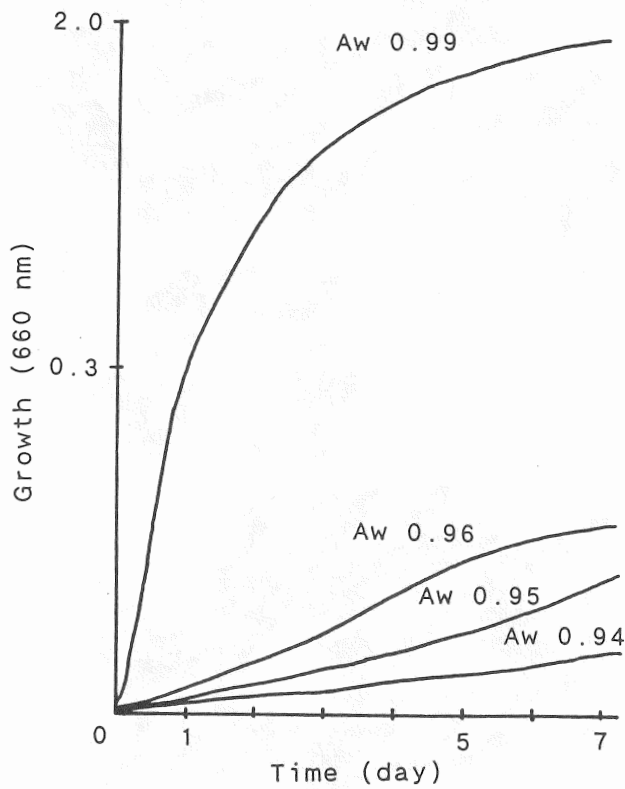


Fig. 5 Growth curve of Pseudomonas sp.

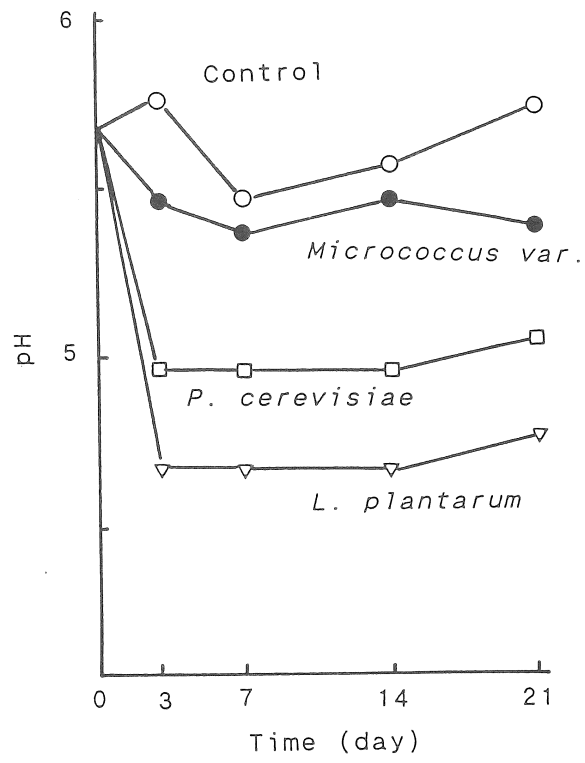


Fig. 6 Change of pH values during ripening period

Effects of salt and betaine on fermented meat product.

M. Sekikawa, M. Mikami and H. Miura

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Summary

Unpasteurized meat products are used in many countries for fermented sausages and raw hams to achieve a specific microorganisms growth in the products by natural ripening. The proper controls of the temperature and moisture is therefore needed to ensure the natural contamination and the safety of the products. There are complicated biochemical and physiological changes caused by the specific bacteria growth and various enzyme activities in meat. Applying starter culture on meat products is mainly based on two reasons: first, some starter culture inhibit the growth of other microorganisms, especially the putrefactive ones, second, they develop the favorable sensory properties of the products. Although salt is one of the most important ingredients in meat products, some bacteria growth and enzyme activity is inhibited by the high concentration of salt. In the present study, we studied the effect of salt and betaine on the growth of stater culture bacteria and on the ability of nitrate reduction.

The lag phase of Micrococcus sp. was proportional to the higher salt concentration. However, the maximum nitrate reduction ability was recorded in culture medium containing 5% salt compared with these of 0, 10, and 15 % salt. When betaine was added to the culture medium, there was no difference in the bacterial count after 48 hrs shaking incubation. The nitrate reduction ability was higher in the presence of betain than in its absence. The nitrate reduction is considered to be an important factor of meat products, especially the color development. It was suggested by the present study that the salt and betaine were important ingredients of the fermented meat products when Micrococcus var. was used as the starter culture for the development of cured meat color; nitrosomyoglobin formation.