

## 岩塩の組成・物性が発酵ソーセージの製造工程中の品質に及ぼす影響

船津 保浩<sup>1</sup>, 山本 克博<sup>1</sup>, 川上 誠<sup>2</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学酪農学部食品科学科, <sup>2</sup>北海道立食品加工研究センター

**概要** 1. 研究目的 発酵ソーセージの製造に使用されている岩塩は採集地により微量の無機成分の組成が異なることが知られている。無機成分は製品の色調、脂質酸化および菌の生育に何らかの影響を与えると考えられる。本研究では、岩塩を用いて発酵ソーセージを調製し、その形状や組成の違いが製品製造工程中の品質に与える影響について検討することを目的とした。

2. 研究方法 冷凍豚腕肉を解凍後、切断し、赤身肉と脂肪を4:1に分け、挽肉とした。この挽肉の重量に対して、乳糖0.6%、ブドウ糖0.3%、硝精S0.14%、砂糖0.2%および塩2.5%を加えてよく混合した。なお、塩には食塩((財)塩事業センター)、ボリビア産岩塩およびドイツ産岩塩を使用した。スターター菌は、*Pediococcus pentosaceus* および *Staphylococcus xylosus* を用い、これらの菌液30 mLを混合肉500 gに加え、滅菌スパチュラでよく攪拌した(PP添加区およびSX添加区)。なお、PPとSX各15 mLを、混合肉500 gに添加したものを混合区とし、菌液の代わりに滅菌生理食塩水30 mLを添加したものを対照区とした。これら4種類の試料をそれぞれ絞り袋に入れ、直径約4 cmの人工ケーシングに充填後、恒温恒湿条件下で21日間熟成させた。熟成中の製品の品質を色調、化学成分、呈味成分、菌叢等から調査した。

3. 研究結果 岩塩は食塩に比べて分布範囲が広く、組成をみると食塩にみられないZn, Mn, Cu, Feがボリビア産岩塩では検出され、ドイツ産岩塩でもZnが検出された。また、ボリビア産とドイツ産岩塩のCa量はそれぞれ食塩の約15倍、約0.08倍であった。これらの塩を用いて製造した発酵ソーセージの品質を調査したところ、塩分、pH、Aw、亜硝酸根、遊離アミノ酸総量、AMP量およびIMP量、初期弾性率およびタンパク質成分組成には塩による大きな違いはみられなかった。しかし、色調では食塩やドイツ産岩塩に比べ、ボリビア産岩塩では熟成中に明るさや黄色味の低下や赤味の増加が他に塩よりも顕著にみられた。また、食塩のPP添加区では熟成21日後に他の塩に比べ脂質酸化が顕著にみられた。さらに、熟成中の菌数には塩による大きな違いは認められなかったが、熟成21日後の菌叢を調査したところ、塩により菌叢の違いが認められ、香气成分分析でもアルデヒド類、アルコール類、ケトン類、エステル類および炭化水素類の組成が異なっていた。

### 1. 研究目的

発酵ソーセージの製造が盛んなヨーロッパでは、発酵ソーセージを製造する際の製造工程で岩塩が添加されている。岩塩は大部分が塩化ナトリウムであるが、採集地により微量の無機成分の組成が異なり、亜鉛等の微量金属も含まれていることから発色効果があるという報告も一部で見られる。また、発酵ソーセージの風味は原料の配合条件や熟成条件などでも異なる。とくにスターターに用いる菌は、無機成分の組成により生育条件も影響を受けることから、最終製品の酸味やフレーバー等の風味醸成に大きく関わると考えられる。しかし、塩の組成の違いが発酵ソーセージの風味に与える影響についての研究例はほとんどない。本研究では、採集地が異なる塩を用いて発酵ソー

セージを調製し、その成分・物性の違いが製品の製造工程中の品質に与える影響について検討することを目的とした。

### 2. 研究方法

#### 2.1 材料

豚ウデ肉は、ホクレン(株)より購入した。岩塩は、ヒマラヤ産(カオス(株))、モンゴル産(アリマジヤパン(株))、中国(四川省)産(白松(株))、パキスタン産((有)FAR EAST RS)、アメリカ(テキサス州)産(赤穂あらなみ塩(株))、イタリア(シチリア)産((株)シー・アイ・オージャパン)、ボリビア産((株)あがりび)およびドイツ産(赤穂あらなみ塩(株))より購入した。粒形が大きいものは岩塩ミル

で粉砕して用いた。

## 2. 2 方法

### 2. 1. 1 塩の形状および組成分析

塩の形状は光学顕微鏡による観察、微量無機成分の分析は原子吸光法<sup>1)</sup>により行った。

### 2. 2. 2 市販製品からの発酵ソーセージに使用するスターター菌のスクリーニング

市販発酵ソーセージ 17 種類を購入し、食肉製品の専門家 5 名で評点法により外観、色沢、肉質、熟成風味、香辛料、バランスおよび受容性で評価したところ、上位 5 種類から下記の菌が検出された。*Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Debaryomyces hansenii* であった。いずれもスターター菌であったため、本研究では酸生成菌である *Pediococcus pentosaceus* (PC-1 株, Flora Carn) とフレーバー生成菌である *Staphylococcus xylosus* (DD-34 株, Flora Carn) を使用した。

### 2. 2. 3 岩塩の選択

無機塩類を取り除いた GYP 液体培地にそれぞれの塩を 3% 添加し、スターター菌の *Pd. pentosaceus* および *S. xylosus* を  $10^3$  cfu/ml 添加、25°C、20 時間培養後の液体培地の濁度からスターターの増殖性の高かった 2 種類の岩塩(ボリビア産およびドイツ産)を選択した。

### 2. 2. 4 発酵ソーセージの調製

冷凍豚腕肉を冷蔵(4°C)で 3 日間解凍後、切断し、赤身肉と脂肪を 4:1 に分け、チョッパー(ミンサー I 型、fatos)を用いてそれぞれ挽肉(4 mm 角)とした。この挽肉の重量に対して、乳糖 0.6%、ブドウ糖 0.3%、硝精 S(第一化成)0.14%、砂糖 0.2% および食塩 2.5%を加えてよく混合した。なお、塩には食塩((財)塩事業センター)、ボリヴィア産岩塩およびドイツ産岩塩を使用した。スターター菌は、*Pd. pentosaceus* および *S. xylosus* を用い、それぞれ 3 L タンクで 25°C、72 時間培養後、遠心分離し、得られた沈殿を滅菌生理食塩水で 300 ml に定容した。これらの菌液 30 mL を混合肉 500 g に加え、滅菌スパチュラでよく攪拌した(PP 添加区および SX 添加区)。なお、PP と SX 各 15 mL を、混合肉 500 g に添加したものを混合区とし、菌液の代わりに滅菌生理食塩水 30 mL を添加したものを対照区とした。これら 4 種類の試料を絞り袋に入れ、直径約 4 cm の人工ケーシング(TIPPER TIE, TIPPER Clip)に充填後、恒温恒湿器(KCL-2000A 型, 東京理化)で 21 日間熟成さ

せた。熟成条件は Table 1 のとおりである。

Table 1 Set up temperature (°C) and humidity (%) on a drying machine during ripening

Days	Temperature	Humidity
1	20	95
2	20	93
3	20	91
4	20	88
5	20	86
6	18	83
7	18	80
8	17	75
:	:	:
21 - 28	17	75

### 2. 2. 5 色および化学成分の分析

試料の色は、厚さ 1.5 mm にスライスした試料を、反射法により色差計(SPECTRO PHOTO METER 東京電色)を用いて、L\*、a\*および b\*を測定した。塩分はモール法<sup>2)</sup>、亜硝酸根は Shinn の変法<sup>3)</sup>、脂質酸化はチオバルビツール酸(TBA)法<sup>4)</sup>、D-, L-乳酸は酵素法<sup>5)</sup>により測定した。水分活性(Aw)は試料を 5 mm の輪切りにし、水分活性測定装置(Thermoconstanter swiss MADE novasina)を用いて、25°Cで測定した。pHは蒸留水で 10 倍希釈した試料をホモジナイズ後、ガラス電極式の pH メーターで測定した。

### 2. 2. 6 呈味成分および香気成分分析

遊離アミノ酸組成、AMP 量および IMP 量の分析は川崎らの方法<sup>6)</sup>により行った。また、香気成分分析は、テフロン製のバイアル瓶(直径 3.0 cm, 高さ 6.7 cm)に各試料を正確に 2.5 g 取り、内部標準として 1% シクロヘキサナール 2.0 μL を添加した。次にテストチューブミキサーで攪拌後、Carboxen/PDMS (75 μm 部分架橋型)を吸着剤とした SPME ファイバーをバイアル内に挿入し、ヘッドスペースの揮発性成分を 50°Cで 1 時間捕集した。吸着した揮発性成分を直ちに GC/MS 分析に供した。吸着した揮発性成分の GC/MS 分析は船津らの方法<sup>7)</sup>で行った。揮発性成分の同定は NIST マススペクトルデータベース<sup>8)</sup>を用いて行った。また、未知試料の同定は 標品の保持時間を比較して行った。

### 2. 2. 7 初期弾性率の測定

1 cm 角の大きさに切断した試料をステージ上に円盤状のプランジャー(直径 40 mm)の中央になるように置き、プランジャーを進入させ、得られた荷重/変形曲線の傾きから初期弾性率を求めた。また、傾きは変形量が 20%以内の領域で 0.5 mm の区間を使って算出した。ロードセルは

0日目の場合は2 kgf、9と21日目の場合は20 kgfを使用し、アンプ倍率は1倍、データ取り込みの格納ピッチは0.01 secとした。初期弾性率(E)は次式によって求めた。

$$E (\text{Pa}) = [\text{厚さ}(\text{mm}) \times \text{傾き}] / \text{面積}$$

## 2. 2. 8 SDS-PAGE 分析

細切した試料 0.4 g を精秤し、7.5 mL の 8 M 尿素-2% SDS-2% 2-メルカプトエタノール-2mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を加え、100°C で 2 時間加熱後、室温で 24 時間攪拌させながら溶解した。24 時間後、10,000 g で 20 分間遠心分離後の上清を回収した。得られた上清を Laemli の方法<sup>9)</sup> に準じて 10% ポリアクリルアミドを支持体とした SDS-PAGE を行い、CBB-R により染色後、10% メタノール-10% 酢酸溶液でゲルの背景が透明になるまで脱色した。

## 2. 2. 9 菌数の測定と菌叢の解析

試料の菌数は GYP 白亜寒天培地にサンプル希釈液を 0.1 mL 表面塗抹し、25°C で 72 時間培養後に計測した。菌の同定は定法に準じて行った。すなわち、各プレートから代表的なコロニーを 5 コロニー分離し、それぞれのコロニーから DNA を抽出、16S リボゾーム RNA 遺伝子(約 1,500 bp) の 5' 側末端から約 500 bp をサーマルサイクラーによって増幅し、その塩基配列を決定後、データベースと照合してコロニーの同定を行った。ただし、酵母の場合は 28S リボゾーム RNA 遺伝子を増幅し、上記と同様の方法で同定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 塩の形状および組成の特徴

塩の形状と組成を Fig. 1 と Table 2 にそれぞれ示す。食塩は立方体に近い形状で大きさが約 320~440 μm

であった。これに対してボリビア産岩塩は分布範囲がかなり大きく、大きさは約 20~640 μm であるが、ドイツ産岩塩は約 30~240 μm とボリビア産に比べて分布範囲が狭かった。組成では食塩は Zn, Mn, Cu, Fe が検出されないが、ボリビア産岩塩ではそれらが微量検出され、ドイツ産岩塩は Mn, Cu, Fe は検出されなかった。また、食塩の Ca 量はボリビア産岩塩のその約 0.6 倍、ドイツ産岩塩のその約 13 倍であった。

**Table 2** Minerals in three kinds of salts (mg/100 g)

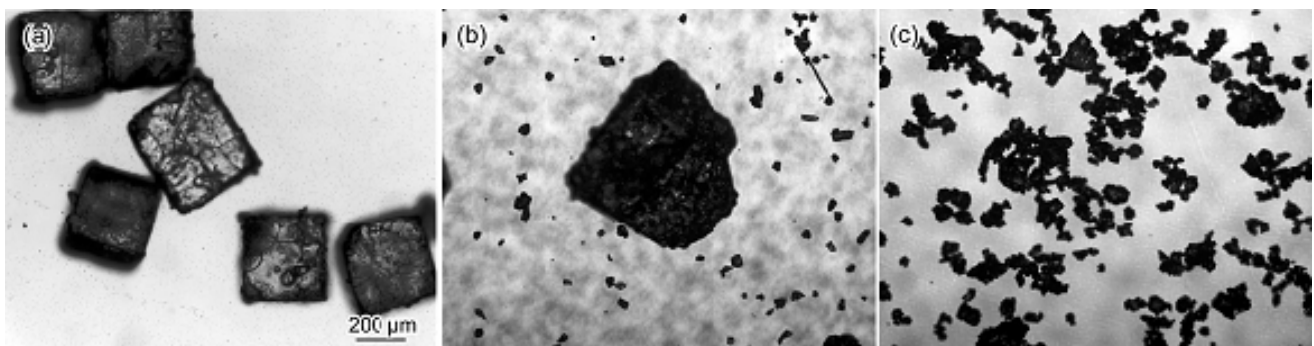
	Common salt	BRS	GRS
Ca	11.4	176.0	0.9
Mg	11.1	29.9	0.9
K	74.5	157.7	113.2
Zn	ND	0.05	0.004
Mn	ND	0.021	ND
Cu	ND	0.022	ND
Fe	ND	0.022	ND

BRS: Bolivian rock salt, GRS: German rock salt.

ND: not detected.

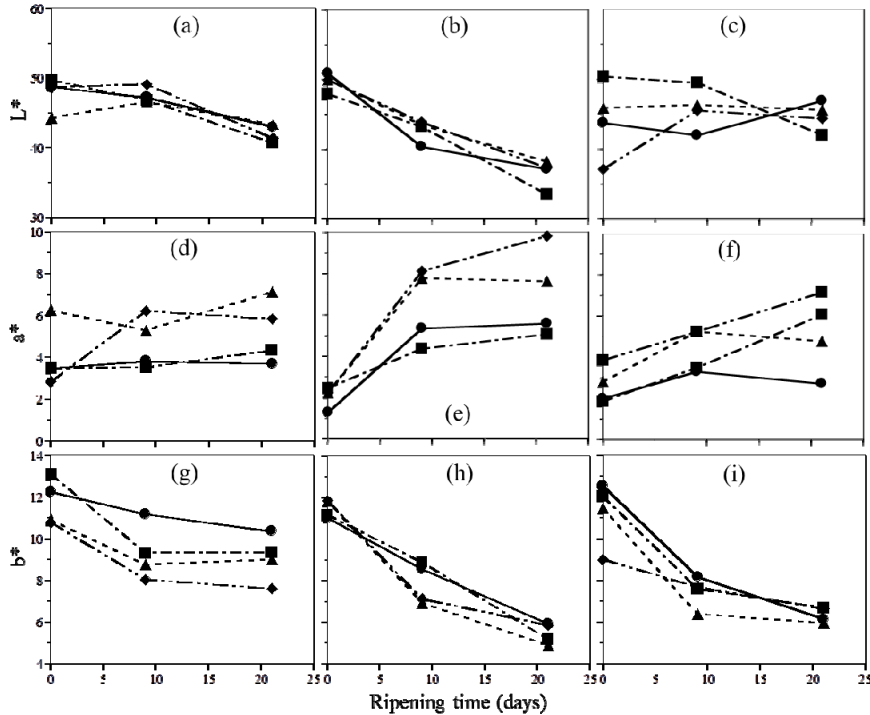
### 3. 2 発酵ソーセージ熟成中の色、化学成分および呈味成分の変化

熟成中の発酵ソーセージの色の変化を Fig. 2 に示す。明るさを示す L\* は食塩やドイツ産岩塩では大きな低下はみられないが、ボリビア産岩塩では熟成中の顕著な低下がみられた。また、赤味を示す a\* は熟成中に増加する試料も一部ではみられるが、ボリビア産岩塩では熟成中の増加がみられ、とくに PP 添加区と混合区で大きいことが分かった。さらに、黄色味を示す b\* はいずれの塩でも熟成中に低下するが、ボリビア産およびドイツ産岩塩の方が食塩よりも比較的大きな低下がみられた。



**Fig. 1** Optical micrographs of three kinds of salts.

(a): Common salt, (b): Bolivian rock salt, (c): German rock salt.



**Fig. 2** Changes in L\*, a\* and b\* of various fermented sausages during ripening.

(a), (d), (g): Common salt. (a), (b), (c): L\*  
 (b), (e), (h): Bolivian rock salt. (d), (e), (f): a\*  
 (c), (f), (i): German rock salt. (g), (h), (i): b\*  
 —●—: Control, —▲—: PP, —■—: SX, —◆—: MIX.

Control: A fermented sausage prepared without bacteria.

PP: A fermented sausage prepared with *Pedococcus pentosaceus*.

SX: A fermented sausage prepared with *Staphylococcus xylosum*.

MIX: A fermented sausage prepared with *Pd. Pentosaceus* and *S. xylosum*.

熟成中の発酵ソーセージの塩分、亜硝酸根および  $A_w$  の変化を **Fig. 3** に示す。いずれの試料でも発酵中の塩分増加、亜硝酸根と  $A_w$  の減少がみられ、塩の違いや菌添加の有無ではこれらの成分に大きな違いはみられなかった。また、いずれの試料でも熟成 21 日後には亜硝酸根が 5 ppm 以下、 $A_w$  が 0.87 未満に低下していた。

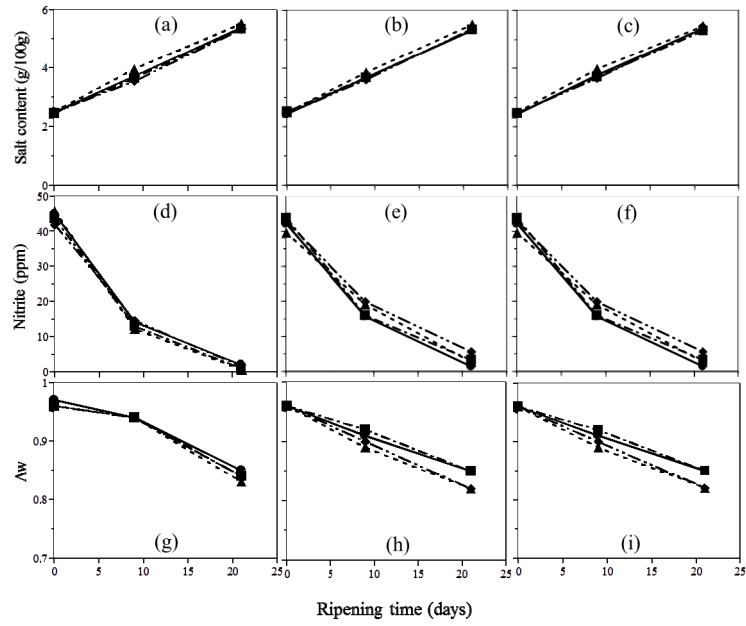
熟成中の発酵ソーセージの遊離アミノ酸総量、AMP 量および IMP 量の変化を **Fig. 4** に示す。いずれ試料でも遊離アミノ酸総量は熟成中に増加するが、熟成 9 日までの増加はいずれの塩でも PP 添加区で大きかった。AMP 量は熟成中の大きな変化はみられず熟成 21 日後はいずれの試料でも僅少であった。また、IMP 量は熟成中の低下度合いは塩でやや異なるが、熟成 21 日後はいずれの試料でも塩にかかわらず僅少であった。

熟成中の発酵ソーセージの D-および L-乳酸の変化を **Fig. 5** に示す。D-乳酸の場合、いずれの塩でも熟成中の

大きな増加は PP 添加区と混合区でみられ、対照区と SX 添加区では熟成中の緩やかな変化しかみられなかった。また、L-乳酸をみると、塩にかかわらずいずれの試料でも熟成中の増加がみられた。したがって、塩にかかわらず PP 添加区と混合区では乳酸の生成量が多いことが分かった。

熟成中の発酵ソーセージの pH と TBA 値の変化を **Fig. 6 (a), (b), (c)** に示す。pH の場合、いずれの試料でも熟成中に低下がみられるが、その低下の度合いは PP 添加区と混合区の方が対照区や SX 添加区よりも大きかった。この現象は **Fig. 5** の乳酸の生成量と対応していた。

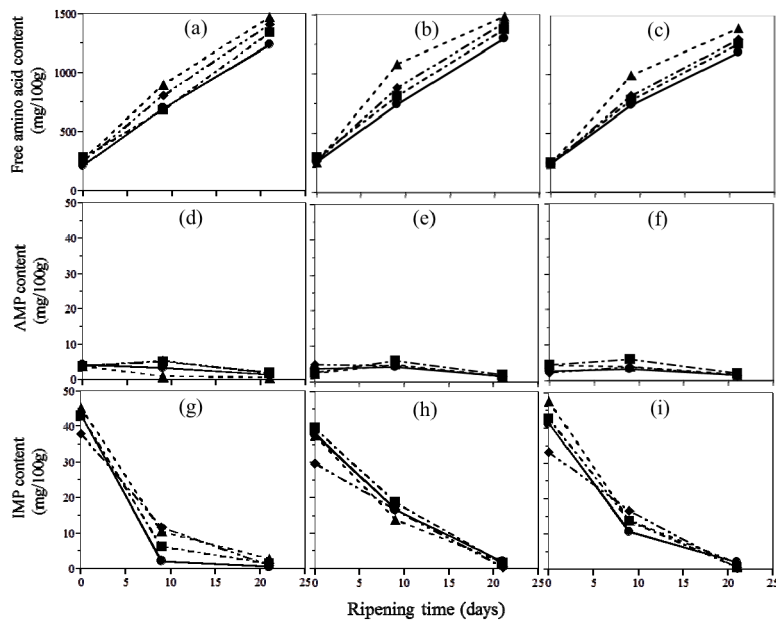
熟成中の発酵ソーセージの脂質酸化を **Fig. 6(d), (e), (f)** に示す。いずれの試料でも熟成中に TBA 値は増加するが、PP 添加区で大きく、とくに食塩の PP 添加区の TBA 値の増加は岩塩のそれに比べて顕著であり、可食限界値 (0.5) をはるかに超えていた。



**Fig. 3** Changes in salt content, nitrite and water activity ( $A_w$ ) of the fermented sausages during ripening.

(a), (d), (g): Common salt. (a), (b), (c): Salt content.  
 (b), (e), (h): Bolivian rock salt. (d), (e), (f): Nitrite  
 (c), (f), (i): German rock salt. (g), (h), (i):  $A_w$   
 —●—: Control, —▲—: PP, —■—: SX, —◆—: MIX.

See Fig. 2 for Control, PP, SX and MIX.

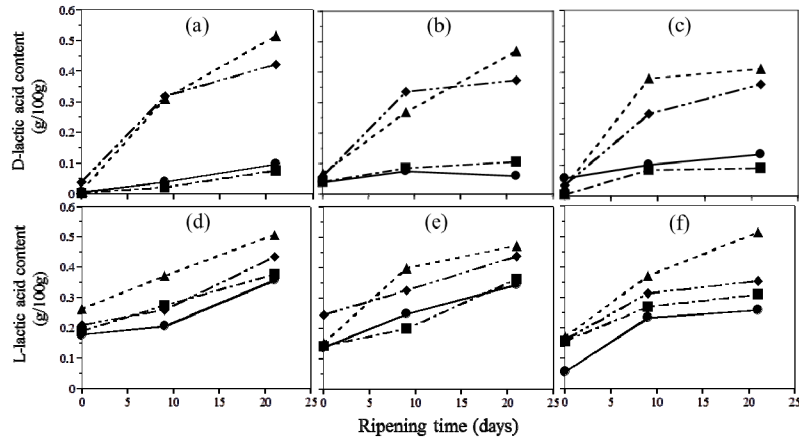


**Fig. 4** Changes in free amino acid, AMP and IMP contents of the fermented sausages during ripening.

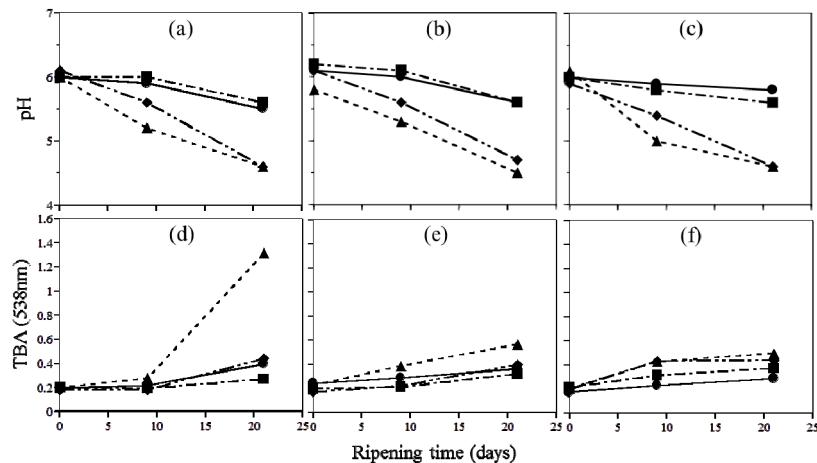
(a), (d), (g): Common salt. (a), (b), (c): Free amino acid content.  
 (b), (e), (h): Bolivian rock salt. (d), (e), (f): AMP content.  
 (c), (f), (i): German rock salt. (g), (h), (i): IMP content.  
 —●—: Control, —▲—: PP, —■—: SX, —◆—: MIX.

See Fig. 2 for Control, PP, SX and MIX.

AMP: adenosine-5'-monophosphate, IMP: inosine-5'-monophosphate.



**Fig. 5** Changes in D- and L-lactic acid contents of the fermented sausages during ripening.  
 (a), (d): Common salt. (a), (b), (c): D-lactic acid content.  
 (b), (e): Bolivian rock salt. (d), (e), (f): L-lactic acid content.  
 (c), (f): German rock salt.  
 —●—: Control, —▲—: PP, —■—: SX, —◆—: MIX.  
 See Fig. 2 for Control, PP, SX and MIX.



**Fig. 6** Changes in pH and TBA in the fermented sausages during ripening.  
 (a), (d): Common salt. (a), (b), (c): pH.  
 (b), (e): Bolivian rock salt. (d), (e), (f): TBA.  
 (c), (f): German rock salt.  
 —●—: Control, —▲—: PP, —■—: SX, —◆—: MIX.  
 See Fig. 2 for Control, PP, SX and MIX.

### 3. 3 発酵ソーセージ熟成中の初期弾性率およびタンパク質成分組成の変化

発酵ソーセージ熟成中初期弾性率の変化を **Table 3** に示す。いずれの塩でも熟成 9 日後までは初期弾性率には大きな変化はみられないが、熟成 21 日後には大きな増加がみられ、とくに PP 添加区と混合区は対照区と SX 添加区に比べて大きな増加がみられた。

発酵ソーセージ熟成中のタンパク質成分組成の変化を

Fig. 7 に示す。いずれの試料でも塩にかかわらず熟成中のタンパク質成分組成に変化がみられるが、とくに熟成が進行した PP 添加区と混合区の試料ではいずれの塩でもミオシン重鎖やアクチンの染色強度の著しい低下やアクチンよりも低分子量成分のバンドがみられた。

### 3. 4 発酵ソーセージ熟成中の菌数の変化

発酵ソーセージ熟成中の菌数の変化を **Fig. 8** に示す。食塩をみると、熟成時間の進行に伴い対照区は緩やかな

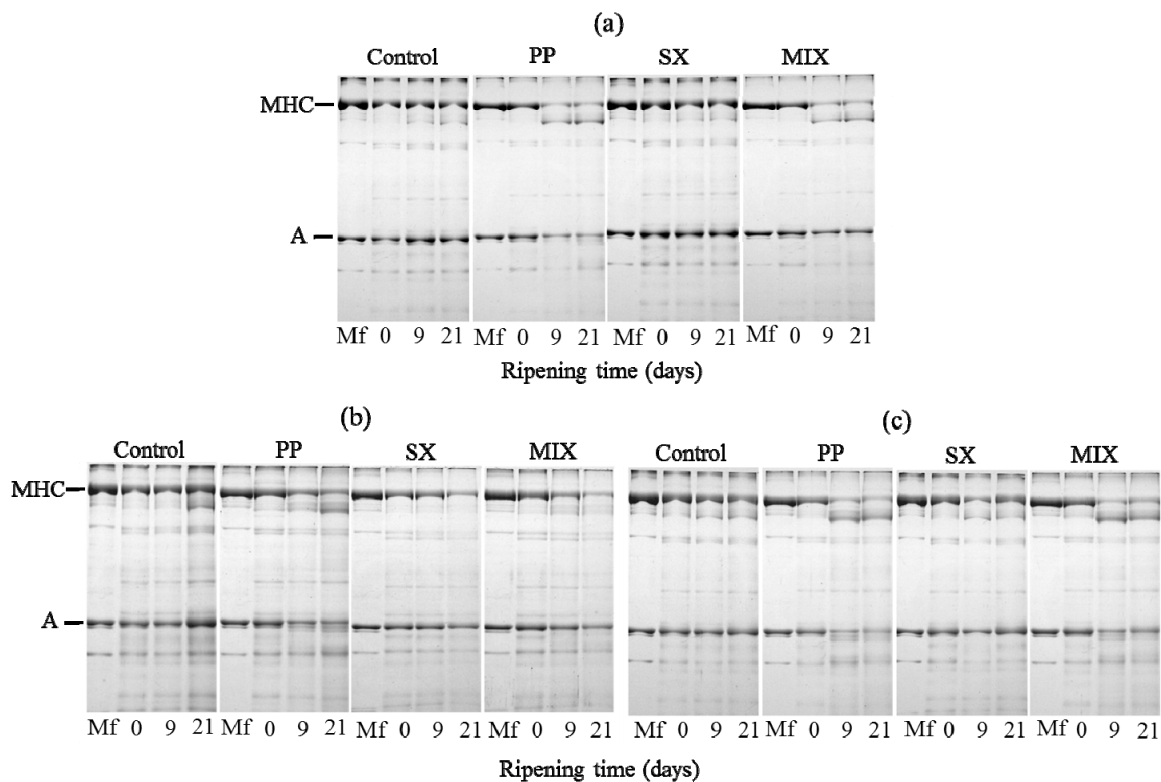
増加、SX 添加区は 9 日後に一度増加し、21 日後に低下する傾向が示されたが、PP 添加区と混合区では熟成中の低下がみられた。一方、岩塩添加区では対照区と SX 添加区の熟成中の変化がやや異なる以外は類似しており、

ボリビア産岩塩とドイツ産岩塩では PP 添加区と混合区の熟成中の低下速度が前者は後者に比べやや遅い点を除いては類似していた。いずれの試料でも熟成 21 日後の菌数は約  $10^7$  cfu/g レベルであった。

**Table 3** Changes in elasticity (Pa) of the fermented sausages during ripening

	Ripening time (days)	Control	PP	SX	MIX
Common salt	0	2.9±0.5	2.2±0.4	2.7±0.6	2.4±0.3
	9	3.4±1.4	2.1±0.2	4.9±1.3	4.1±1.1
	21	1124.2±85.0	8509.5±963.7	1538.4±366.4	7143.0±763.5
BRS	0	2.2±0.2	2.3±1.0	2.1±0.4	3.0±0.6
	9	8.6±1.6	11.1±2.6	8.2±2.3	13.0±2.7
	21	775.9±73.6	10556.0±3864.0	804.3±396.0	7579.8±3031.6
GRS	0	2.2±0.2	4.6±0.8	2.6±0.5	3.8±0.6
	9	8.6±1.5	13.0±3.2	4.2±1.5	9.3±3.2
	21	887.3±197.4	9603.6±108.3	1038.2±121.8	7927.3±231.9

Refer to the captions of Table 2 and Fig.2 for details. Values are means ± SD from 3 different experiments.



**Fig. 7** Changes in SDS-PAGE patterns of solubilized protein from the fermented sausages during ripening.

The fermented sausages (each 0.4 g) made soluble with 2% SDS-8M Urea-2% mercaptethanol-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) at 100°C for 2 min, followed by stirring at room temperature for 24 h.

The identical aliquots (each 5 µl) of the solubilized protein were applied to SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gels and stained by Coomassie Brilliant Blue R.

The positions of myosin heavy chain (MHC) and actin (A) are indicated on the left side.

(a): Common salt, (b): Bolivian rock salt, (c): German rock salt.

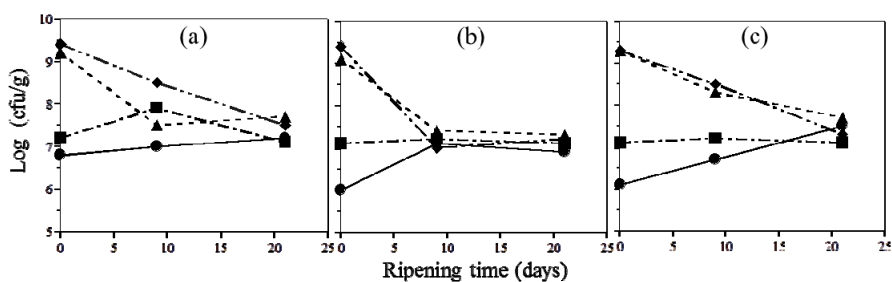


Fig. 8 Changes in total bacterial counts of the fermented sausages during ripening.  
(a): Common salt, (b): Bolivian rock salt, (c): German rock salt.

#### 4. 考 察

欧州では多種類のドライソーセージが製造されており、産地により食肉部位、塩、香辛料、発酵時間や温度、脂肪量や形態およびスターター菌などが異なることが知られている。<sup>10)</sup> 本研究ではその中で塩の違いに着目し、製品の熟成中の品質に与える影響について検討した。その結果、食塩、ボリビア産およびドイツ産の異なる塩を使用しても製造工程では塩分、pH、Aw、亜硝酸根、遊離アミノ酸総量、AMP 量および IMP 量、初期弾性率およびタンパク質成分組成には大きな違いはみられなかった。しかし、色には塩による違いがみられ、とくにボリビア産岩塩では熟成中に明るさや黄色味の低下や赤味の増加が他に塩よりも顕著にみられた。赤味の増加には水溶性タンパク質のミオグロビンが関係しており、発色剤の作用によりミオグロビンのヘム色素がニトロソ化される<sup>11)</sup>ことが知られている。一方、Wakamatsu *et al.*<sup>12,13)</sup> はパルマハムの赤色は亜鉛プロトポルフィリン IX (ZPP) に起因すること、赤色色素には Fe ではなく Zn が含まれていることを報じている。本研究では亜硝酸塩が添加されているため ZPP の生成は阻害されるが、赤色色素には Fe か Zn が含まれるかについては不明である。また、脂質酸化においても塩による違いがみられ、食塩の PP 添加区で熟成 21 日後に TBA の急激な上昇がみられた。脂質の酸化には光、酸素、温度、ヘム化合物、水分、酵素等で影響を受けるが、金属イオン封鎖剤(クエン酸等)が脂質酸化を抑制することが知られている<sup>14)</sup>。市販発酵ソーセージは有機酸組成が異なることから、熟成中に生成されるクエン酸量が塩により異なる可能性があると思われる。熟成 21 日後の菌叢を調査したところ、スターター菌を用いなかった試料では菌叢が大きく異なり、食塩の対照区では他の塩のそれと比べ *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* のような大腸菌群や

*Micrococcus luteus* も検出されている (Table 4, 5 および 6)。菌叢が塩の種類で異なることから熟成 21 日後の遊離アミノ酸組成や香気成分を調査した。その結果、遊離アミノ酸組成では塩の種類にかかわらず対照区が PP 添加区、SX 添加区および混合区に比べてアルギニンが多く、PP 添加区でも対照区、SX 添加区および混合区に比べてグルタミン酸が多く、プロリンが少なかった (Table 7)。また、香気成分では塩の種類によりアルデヒド類、アルコール類、ケトン類、エステル類および炭化水素類の組成が異なっていた (Table 8)。脂質酸化の進行した食塩の PP 添加区では 1-ヘキセナール<sup>15)</sup> や 1-penten-3-ol<sup>16)</sup> 等の脂質の酸化に関与する成分が他の試料よりも多く検出された。Marco *et al.*<sup>17)</sup> は発酵ソーセージ熟成中の微生物叢、化学成分および官能評価に及ぼす亜硝酸塩や硝酸塩の影響を調査し、脂質酸化は硝酸塩を添加した試料に比べ亜硝酸塩を添加した試料の方が進行すること、亜硝酸塩を加えた試料ではアミノ酸の分解や炭水化物の発酵により生じた香気成分が高いレベルで検出されることを報告している。本研究では亜硝酸塩と硝酸塩の混合物を使用しており、亜硝酸塩や硝酸塩の違いは不明であるが、香気成分の醸成には微生物の影響が考えられるため、今後は微生物叢と香気成分との関係の調査も必要と思われる。

熟成 21 日後には PP 添加区と混合区が対照区や SX 添加区よりも初期弾性率が高いことからそれぞれの試料の切片の Azan 染色を行ったが、塩の種類による明確な違いは見出せなかった (結果は図示せず)。今後は走査型電子顕微鏡によるゲル構造の調査も必要と思われる。

以上の結果より、塩の組成の違いは発酵ソーセージ製造中の色調、脂質酸化および微生物叢に影響を与えることが分かった。



**Table 4** Microbial flora of the fermented sausage prepared with Common salt after ripening for 21 days

Control	PP	SX	MIX
<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Staphylococcus carnosus</i>	4.8×10 <sup>6</sup> cfu/g
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1.1×10 <sup>7</sup> cfu/g	
<i>Staphylococcus equorum</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>		1.0×10 <sup>6</sup> cfu/g	2.7×10 <sup>7</sup> cfu/g
TVC: 9.5×10 <sup>6</sup> cfu/g	TVC: 5.0×10 <sup>7</sup> cfu/g	TVC: 1.3×10 <sup>7</sup> cfu/g	TVC: 3.2×10 <sup>7</sup> cfu/g

TVC: Total viable counts. See Fig.2 for Control, PP, SX and MIX.

**Table 5** Microbial flora of the fermented sausage prepared with Bolivian rock salt after ripening for 21 days.

Control	PP	SX	Mix
<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>		1.1×10 <sup>7</sup> cfu/g	<i>Staphylococcus carnosus</i>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		4.1×10 <sup>6</sup> cfu/g
<i>Staphylococcus vitulus</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
		1.0×10 <sup>6</sup> cfu/g	1.7×10 <sup>7</sup> cfu/g
TVC: 8.8×10 <sup>6</sup> cfu/g	TVC: 2.1×10 <sup>7</sup> cfu/g	TVC: 1.2×10 <sup>7</sup> cfu/g	TVC: 1.7×10 <sup>7</sup> cfu/g

TVC: Total viable counts. See Fig.2 for Control, PP, SX and MIX.

**Table 6** Microbial flora of the fermented sausage prepared with German rock salt after ripening for 21 days

Control	PP	SX	Mix
		<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	5.1×10 <sup>6</sup> cfu/g
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1.3×10 <sup>7</sup> cfu/g	
<i>Staphylococcus carnosus</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
		1.1×10 <sup>6</sup> cfu/g	1.6×10 <sup>7</sup> cfu/g
TVC: 3.5×10 <sup>7</sup> cfu/g	TVC: 5.6×10 <sup>7</sup> cfu/g	TVC: 1.4×10 <sup>7</sup> cfu/g	TVC: 2.1×10 <sup>7</sup> cfu/g

TVC: Total viable counts. See Fig.2 for Control, PP, SX and MIX.

**Table 7** Comparison of free amino acid composition of the fermented sausages prepared with Common salt, Bolivian rock salt and German rock salt after ripening for 21 days (mg/100g)

	Common salt				Bolivian rock salt				German rock salt			
	Control	PP	SX	Mix	Control	PP	SX	Mix	Control	PP	SX	Mix
Taurine	233.0	199.1	187.6	190.5	226.0	210.7	205.6	185.0	194.4	188.8	191.9	158.7
Aspartic acid	3.1	29.7	31.8	13.1	25.1	29.2	22.2	26.2	36.5	46.9	37.5	38.2
Threonine	43.8	51.4	44.4	37.8	57.2	53.0	47.6	48.1	50.6	47.2	44.0	42.2
Serine	16.0	46.7	48.3	31.7	57.5	49.5	48.7	44.1	51.9	43.9	44.5	38.1
Asparagine	ND	32.2	24.1	25.0	24.8	38.6	30.0	38.7	21.7	35.2	27.4	33.1
Glutamic acid	159.1	229.0	127.5	169.4	137.3	212.8	182.0	193.1	131.3	218.1	171.8	174.4
Glutamin	3.5	6.7	53.2	6.5	68.6	36.7	49.8	39.7	38.8	21.8	28.0	9.7
Glycine	49.1	63.6	49.8	40.0	78.5	84.1	60.5	72.9	72.3	75.2	55.1	63.2
Alanine	154.6	151.8	142.3	107.7	148.8	126.8	133.4	132.6	145.5	118.5	128.7	120.6
Citrulline	ND	ND	ND	ND	5.6	ND	8.6	ND	ND	ND	ND	ND
Valine	59.6	63.6	56.1	76.1	62.0	65.4	65.3	71.1	45.0	57.2	59.8	59.9
Cystine	ND	ND	ND	ND	3.2	1.2	2.9	5.2	1.2	0.8	1.1	5.6
Methionine	26.6	33.6	28.6	33.3	29.5	36.6	30.5	36.2	28.6	32.4	31.3	30.2
Isoleucine	75.6	38.3	34.0	31.6	43.0	42.6	39.5	41.0	39.4	37.5	35.9	35.1
Leucine	75.6	98.8	75.5	80.3	88.3	109.4	92.9	105.7	80.0	95.6	83.3	89.9
Tyrosine	25.8	55.3	35.4	36.3	22.1	35.1	37.5	35.2	20.2	30.2	34.1	29.9
Phenylalanine	44.4	15.6	45.9	52.2	46.0	59.5	53.4	58.0	41.1	52.4	48.5	49.7
Tryptophan	6.4	7.7	8.8	7.8	8.2	7.2	8.2	8.3	8.4	9.0	2.3	8.6
Ornithine	20.6	55.5	12.4	39.8	12.3	65.4	34.5	58.1	10.8	58.5	30.9	50.0
Lysine	61.8	106.1	107.9	126.6	88.3	130.8	122.2	128.9	83.4	121.1	114.8	115.1
Histidine	30.6	31.6	32.9	31.6	37.2	33.9	38.4	33.7	34.9	30.8	35.9	29.8
Anserine	26.5	35.8	21.3	32.8	32.9	30.6	39.2	28.5	31.2	27.0	36.7	25.4
Arginine	21.6	1.6	31.0	1.6	29.9	3.7	5.1	3.5	25.4	1.1	2.4	ND
Hydroxyproline	0.6	0.5	ND	ND	1.9	1.5	1.8	1.9	ND	ND	ND	ND
Proline	47.0	26.3	45.4	30.6	53.1	20.6	44.5	35.0	47.2	17.6	39.7	29.2
Total	1185.0	1380.5	1244.3	1202.6	1387.3	1484.9	1404.3	1430.7	1239.8	1366.8	1285.6	1236.6

See Fig.2 for Control, PP, SX and MIX. ND: not detected.

**Table 8** Comparison of volatile compounds of the fermented sausages prepared with Common salt, Bolivian rock salt and German rock salt after ripening for 21 days

	Common salt				Bolivian rock salt				German rock salt			
	Control	PP	SX	Mix	Control	PP	SX	Mix	Control	PP	SX	Mix
<b>Acids</b>												
Acetic	0.0969	0.0411	0.2080	0.0743	0.1166	0.0791	0.3394	0.2351	0.0660	0.1258	0.1703	0.1571
Propanoic	ND	ND	0.0057	ND	0.0082	0.0153	0.0333	0.0508	ND	ND	ND	ND
Isobutyric acid	0.0145	0.3420	0.0100	0.0053	0.0247	0.0261	0.0139	0.0863	0.0025	0.0292	0.0175	0.0169
Isovaleric acid	0.1254	0.0281	0.1838	0.0189	0.1214	0.0511	0.4307	0.3279	0.0366	0.0468	0.0953	0.0767
2-methyl-butanoic	0.0290	ND	0.0317	0.0031	0.0264	0.0094	0.7405	0.0510	0.0077	0.0083	0.0195	0.0100
Hexanoic	0.0287	0.0162	0.0358	0.0073	0.0048	0.0109	0.0178	0.0197	0.0045	0.0115	0.0259	0.0177
Octanoic	0.0057	0.0036	0.0117	0.0024	0.0005	ND	0.0025	0.0029	0.0010	0.0020	0.0074	0.0058
<b>Aldehydes</b>												
Isovaleraldehyde	ND	0.0057	ND	0.0028	0.0677	0.0179	0.2765	ND	0.0065	0.0190	0.0362	0.0148
Valeraldehyde	0.0065	0.0673	0.0095	0.0159	ND	0.0147	ND	ND	ND	ND	0.0119	0.0107
1-Hexanal	0.2223	0.7178	0.1163	0.1159	0.0279	0.0973	0.0715	0.0718	0.0428	0.0815	0.0791	0.0339
1-Heptanal	ND	0.0893	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0206
Benzaldehyde	0.0047	ND	0.0046	0.0021	0.0019	0.0034	0.0071	0.0037	ND	ND	0.0053	ND
1-Octanal	0.0167	0.0226	ND	0.0061	ND	0.0055	ND	ND	0.0025	ND	ND	0.0088
Phenylacetaldehyde	ND	0.0022	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0024	ND
1-Nonanal	0.0425	0.0202	0.0273	0.0108	0.0010	0.0030	0.0046	0.0054	0.0033	0.0018	0.0204	0.0149
<b>Alcohols</b>												
Ethanol	0.1513	0.3420	0.4379	0.1282	0.4824	0.4098	0.5829	0.5672	0.1526	1.2308	0.1133	2.6070
1-Butanol	0.0109	0.0527	0.0218	0.0207	0.0593	0.0355	ND	0.0202	0.0444	0.0243	0.0999	0.0235
1-Penten-3-ol	ND	0.0149	ND	ND	ND	0.0042	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isoamyl alcohol	ND	ND	ND	0.0014	ND	0.0443	0.0558	0.0598	ND	0.0429	ND	0.0305
2,3-Butanediol	0.4580	0.2444	1.0685	0.1684	0.7453	0.3806	1.5442	1.4400	0.6132	0.3507	1.2798	0.6710
2-Propanol	ND	0.0487	ND	0.0312	ND	0.1130	ND	0.0579	ND	0.1315	ND	ND
1-Hexanol	ND	0.1026	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-Ethyl-1-hexanol	0.0137	0.0109	0.0226	0.0031	0.0035	0.0050	0.0109	0.0108	0.0370	0.0480	0.0126	0.0630
1-Octanol	0.0043	0.3420	ND	0.0017	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-Phenylethanol	ND	0.0012	0.0013	0.0004	0.0020	ND	0.0013	0.0016	ND	0.0006	0.0011	0.0017
<b>Ketons</b>												
Methyl propyl ketone	0.0257	0.0080	0.0261	0.0164	ND	ND	ND	ND	0.0068	0.0165	0.0720	ND
3-Hydroxy-2-butanone (Acetoin)	0.4389	0.3877	0.6825	0.5080	0.1670	1.4125	2.4621	3.8080	0.2628	1.3708	0.7071	2.1144
Methyl phenyl ketone	0.0012	0.3420	ND	0.0003	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Methyl heptyl ketone	ND	0.0116	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0043	0.0019	ND	0.0052
<b>Esters</b>												
Ethyl acetate	0.0353	0.0777	0.1002	0.0319	0.1154	0.0683	0.2083	0.1072	0.0605	0.1376	0.1507	0.0983
Ethyl isobutyrate	ND	ND	ND	ND	0.0040	0.0030	ND	ND	0.0019	0.0041	0.0046	ND
Ethyl isovalerate	0.0353	ND	0.0343	ND	0.0226	0.0064	0.0872	0.0421	0.0073	0.0072	0.0162	0.0041
Ethyl caproate	0.0060	0.3420	0.0062	ND	0.0010	0.0023	0.0051	0.0034	0.0016	0.0031	0.0034	0.0061
Ethyl octanoate	0.0023	0.0009	0.0044	0.0006	ND	ND	0.0016	0.0009	0.0005	0.0007	0.0021	0.0015
Ethyl decanoate	ND	ND	0.0014	0.0006	ND	0.0008	0.0012	0.0011	0.0004	ND	0.0014	0.0004
<b>Hydrocarbones</b>												
Pentane	ND	0.0654	ND	ND	0.0629	0.0929	0.0730	0.0736	0.0219	0.1239	0.0548	0.3803
<i>p</i> -xylene	0.0105	0.0257	0.0228	0.0056	0.0076	0.0148	0.0241	0.0273	0.0051	0.0165	0.0174	0.0202
<b>Nitrogen-containing compounds</b>												
2,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	0.0245	ND	ND	ND	0.0177	ND	ND	ND	0.0174	ND
<b>Phenols</b>												
Phenol	ND	ND	0.0067	ND	ND	0.0025	ND	0.0044	ND	0.0025	ND	ND

A 2.5g of each specimen and 2.0μL of 1% cyclohexanol were put into Teflon vials (φ3.0cm×h 6.7cm). After sealing, the vials was vibrated with test tube mixer for 30s.

A Solid Phase Micro Extraction (SPME) fiber (75μm carboxen/PDMS) was inserted into the vial so that volatile compounds were absorbed on the fiber at 50 °C for 60 min. After absorption, the SPME fiber was injected into a gas chromatograph. GC/MS analysis was carried out under the following conditions: gas chromatograph, Hewlett Packard 6890 type; mass spectrometry detector: Hewlett Packard column, PTA-5 (length, 30m; I.D., 0.32mm; filmthickness, 1.5 μm); column temperature, 40 °C (2 min) - 250 oC (23 min); carrier gas, He; injection port temperature: 250 °C; injection method, split less (flow rate, 1.5 mL/min); heating rate, 10 °C/min; ion-trap manifold temperature, 230 °C; electron impact ionization voltage, 70eV. Peak concentration: the values represent the ratios of the peak concentration in the fermented sausage to that the internal standard (cyclohexanol). See Fig.2 for Control, PP, SX and MIX. ND: not detected.

## 5. 今後の課題

1. 肉色の変化に関与するタンパク質の量的な変化の調査を行う。
2. 熟成に伴う有機酸組成の変化が塩の違いでどのように異なるかの調査を行う。
3. 熟成中に伴うペプチドの生成量と微細構造との関係を調査する。

## 文献等

- 1) 安井明美, 志村悦郎. 原子吸光法, 「新・食品分析法」((社)食品科学工学会新・食品分析法編集委員会編), 光琳, 東京, pp.135-146 (1996).
- 2) 佐々木弘子. モール法, 「食品学実験書」(菅原龍幸編), 建帛社, 東京, pp.130-131 (2000).
- 3) 戸沢晴己. 水産食品中の亜硝酸塩定量法, 「食品分析法」((社)食品工業学会食品分析法編集委員会編), 光琳, 東京, pp.687-690 (1983).

- 4) 梶本五郎. TBA 値 (2-チオバルビツール酸法), 「食品分析ハンドブック」(小原哲二郎, 岩尾裕之, 鈴木隆雄編), 建帛社, 東京, pp.156-159 (1973).
- 5) Noll F. In: Bergmeyer HU(ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd edn., Vol.6. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 582-588 (1984).
- 6) 川崎賢一, 船津保浩, 伊藤裕佳子, 本江 薫, 鍋島弘明. スケトウダラ調味乾製品の呈味成分含量に及ぼす調味液中のソルビトールとスクロースの影響, *日食工誌*, **44**, 192-198 (1987).
- 7) 船津保浩, 深見克哉, 近藤秀裕, 渡部終五. マルソウダ魚醤油のもろみから分離した *Staphylococcus nepalensis* による黒作りイカ塩辛の臭気の改良, *日水誌*, **71**, 611-617 (2005).
- 8) Van Den Dool H, Krats PD, A generalization of the retention index system including linear programmed gas liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **11**, 463-471 (1963).
- 9) Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 10) 坂田亮一. 世界のソーセージ, 「食材図典Ⅱ」(成瀬宇平監修), 小学館, 東京, pp.90-98 (2001).
- 11) 石下真人. 食肉の加工, 「肉の科学」(沖谷明紘編集), 朝倉書店, 東京, pp.128-140 (2001).
- 12) Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Sci.*, **67**, 95-100 (2004).
- 13) Wakamatsu, J., Ito, T., Nishimura, T., Hattori, A. Direct determination of the presence of zinc in the acetone-extractable red pigment from Parma ham. *Meat Sci.*, **76**, 385-387 (2007).
- 14) 針宮正往. 脂質, 「新版食品学概論」(食品教育研究会編), 建帛社, 東京, pp.13-24 (1998).
- 15) Murel, E., Andres, A.L., Petron, M.J., Antequera T., Ruiz, J. Lipolytic and oxidative changes in Iberian dry-cured loin. *Meat Sci.*, **75**, 315-323 (2007).
- 16) Nakamura, K., Iida H., Tokunaga, T. Separation of identification of odor in oxidized sardine oil. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **46**, 355 – 360 (1980).
- 17) Marco, A., Navarro J. L., Flore, M. The influence of nitrite and nitrate on microbial chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Sci.*, **73**, 660-673 (2006).

## Effect of Component and Shape of Rock Salt on the Quality of Fermented Sausage during Preparation

Yasuhiro Funatsu\*, Katsuhiko Yamamoto\*, Makoto Kawakami\*\*

\*Department of Food Science, Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University

\*\*Hokkaido Food Processing Research Center

### Summary

The purpose of this study was to evaluate difference in quality among various kinds of fermented sausages prepared with three different kinds of salts i.e. Common salt, Bolivian rock salt and German rock and starter cultures (*Pediococcus pentosaceus* (PP), *Staphylococcus xylosus* (SX), PP+SX). The sample without using bacterial culture was used as a control. There were no clear differences in physicochemical and taste properties such as pH and aw values, contents of salt, nitrite, free amino acid, adenosine-5'-monophosphate (AMP) and inosine-5'-monophosphate (IMP) during ripening among the samples. However, addition of 2.5% Bolivian rock salt induced color fluctuation such as decrease in lightness (L\*) and yellowness (b\*) and increase in redness (a\*) of the fermented sausages during ripening. Lipid oxidation during ripening was greater in PP with common salt than in the other samples. Microbial flora and volatile components varied among the samples after ripening for 21 days.