

白カビおよび酵母を利用した発酵ソーセージ製造に関する研究

八十川大輔, 田中 彰, 中川良二, 佐々木しずか¹, 渡邊いくみ¹, 松波真哉¹

Research on Fermented Sausage Processing Using White Mold and Yeast

Daisuke Yasokawa, Akira Tanaka, Ryoji Nakagawa, Shizuka Sasaki¹,
Ikumi Watanabe¹, and Shinya Matsunami¹

The process of fermenting sausage using white *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* was investigated. The water activity of the sausage, with a 15mm diameter, reached below 0.87 in approximately 1 week, starting at 85% RH and lowering the RH to 75% on the fourth day at 18.5°C. The resulting dried sausage was satisfactorily covered with mold and yeast. Its water activity, with a 35mm diameter, reached below 0.87 in approximately 12 days, with modified drying. The resulting dried sausage, inoculated with mold and yeast, was compared to one without these microbes. In such a drying condition, the growth of the inoculated microorganisms did not influence the free amino acid content of the dried sausage. On the other hand, the flavor component (mainly comprised of alcohol and aldehydes) increased significantly, with growth of mold and yeast, which altered the flavor. The quantity of the flavor components for the sausage with mold and yeast was much higher than that of the sausage with mold alone. However, during the sensory evaluation, this difference did not affect the preference for a certain sausage.

KEY-WORDS : Meat products, Mold, Yeast, Fermented sausage, Water activity

キーワード : 食肉製品, カビ, 酵母, 発酵ソーセージ, 水分活性

発酵生ハム, 発酵ソーセージなどの非加熱食肉製品は, 発酵および熟成によって特有の香気成分や旨み成分が付与される。従来, これらの製品の発酵は原料および環境由来の微生物の自然選択によっていたが, 乳酸菌を活用して発酵による風味の増強に加え, 食品を汚染する微生物の増殖を抑制する技術が実用化されている¹⁾。一方, これらは非加熱製品であるため, 製品表面のカビの発生制御など微生物制御に技術を要する。これらの対策には物理的的表面処理, 添加物利用, 燻煙などが考えられるが乾燥食肉製品, 非加熱食肉製品に適用できるものは少な

く, 熟成工程を安定化する製造技術が求められている。

ヨーロッパでは, 白カビなどの真菌を積極的に利用し, 表面の微生物を制御し, 風味を改善, 品質向上させる製造技術が利用されているが^{2, 3)}, 日本国内ではカビ付けをした食肉製品を製造販売している事例は極めて少ない。

本研究では乳酸菌を活用した発酵生ハム, 発酵ソーセージなどの発酵食肉製品を製造している札幌バルナバフーズ株式会社とともに, 白カビなど食経験のある真菌を活用した発酵ソーセージ製造条件について検討を加えた。

¹札幌バルナバフーズ株式会社

事業名: 共同研究

課題名: 白カビを利用した発酵ソーセージ製造に関する研究

実験方法

1. 真菌類の分離、新菌数の測定

市販外国産および国産白カビソーセージ25gを無菌的に細切して225mLの滅菌生理食塩水に加え、ストマッカーにて10% (w/v) 乳剤を調製した。滅菌したPDA寒天培地にクロラムフェニコール (Cp) を100 μ g/mLとなるように添加したシャーレに10% (w/v) 乳剤から作成した10倍希釈系列の希釈液を0.1mL塗抹し、25°Cで5日間培養、真菌 (カビおよび酵母) コロニーを分離した。Cp加PDA培地で分離コロニーの純化培養を行い30% (v/v) 滅菌グリセロール溶液に懸濁、-80°Cで凍結保存した。菌数は平板2枚の平均値に希釈率を乗じて算出した。

2. 真菌類の菌種推定

DNAプライマー 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'および5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'を用いたPCRにより増幅する真菌の28S rRNA遺伝子断片の塩基配列により菌種を推定した。

3. 真菌の耐塩性試験、亜硝酸耐性試験、タンパク質分解性試験

分離・純化培養したカビおよび酵母を5, 10, 15% (w/v) の食塩を添加したPDA寒天培地に接種、25°Cで培養して増殖の有無を観察し、増殖したものを食塩耐性とした。同様に100, 200, 400ppmとなるように亜硝酸ナトリウムを添加したPDA寒天培地に接種、25°Cで培養して増殖の有無を観察し、増殖したものを亜硝酸耐性とした。

タンパク質分解性試験はカビおよび酵母を10% (w/v) 還元脱脂乳寒天培地に1白金耳塗抹し、25°Cで1週間培養し、コロニー周囲の透明環形成 (乳タンパク質分解) の有無を観察した。

4. 塩分, pH, 水分活性および水分測定

試料4gを細切し精製水36mLを加えてホモジナイズ (日本精機製作所: EX-T) して10% (w/v) 乳剤を調製後、塩分分析計 (東亜ディーケーケー: SAT-210) およびpHメーター (東亜ディーケーケー: HM-50G) にて塩分およびpHを測定した。

水分活性は、試料容器に細切したソーセージを入れ、水分活性精密測定装置 (NOVASINA社: Lab Master. aw) にて測定した。水分は常圧加熱乾燥法 (105°C) にて測定した。

5. 発酵ソーセージ試作

ソーセージは札幌バルナバフーズ株式会社にて製造し

た。ケーシングには豚腸, 羊腸を用いた。カビおよび酵母の接種は、1000mLの滅菌蒸留水に、PDA寒天培地に一面に増殖した真菌を90mm径シャーレ2枚分懸濁し、その懸濁液にソーセージを浸して付着させた。カビのみ場合はカビのシャーレ2枚分、カビ酵母併用ソーセージではカビのシャーレ、酵母のシャーレそれぞれ2枚分の真菌を懸濁したものに漬け込んだ。軽く水分を切り金属棒に吊して恒温恒湿槽 (東京理化学器械: KCL-2000W) で乾燥を行った。

6. 遊離アミノ酸および有機酸の分析

塩分測定・pH測定で作成した試験溶液をろ紙 (ADVANTEC No.5A) でろ過し、ろ液を試験用液として測定に用いた。遊離アミノ酸分析では試験溶液を蒸留水で適宜希釈し、希釈液1.0mLをエッペンチューブに取り、2% (w/v) スルホサリチル酸水溶液を等量加え、30分間静置した。静置後、遠心分離 (3000rpm, 10分) し、上清を孔径0.22 μ mのナイロンメンブレンフィルターでろ過し、測定に供した。遊離アミノ酸の測定には日立アミノ酸分析計 (日立ハイテクフィールドディング: L-8900) を用いた。

有機酸の分析は、上記試験溶液を蒸留水で適宜希釈し、0.45 μ mのフィルターでろ過したものを試料とし、分析にはポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法により高速液体クロマトグラフ (Prominence有機酸分析システム, 島津製作所) を用いて測定した。詳細な分析条件を下記に示した。

カラムはShim-pack SCR-102H (300mm \times 8.0mm i.d.: Shimadzu) 2本、ガードカラムはShim-pack SCR-102 HG (50mm \times 6.0mm i.d.: 島津製作所)、検出器は電気伝導度検出器CDD-10A VP CONDUCTIVITY DETECTOR (島津製作所)、移動相は20mM ビス (2-ヒドロキシエチル) -イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン水溶液 (5 mM p-トルエンスルホン酸, 100 μ M EDTA含有)、流量は0.8mL/min、カラム温度は40°Cとし、試料注入量は10 μ Lで分析した。

7. 揮発性成分の測定

試料ソーセージをナイフで細かく切り、フードプロセッサーにて均質化した。均質化試料を揮発性成分測定用の20mL容量のバイアル瓶に約3g採取した。内部標準試薬として100 μ g/mLシクロヘキサノール水溶液50 μ Lを加え、スパーテルで混合して密封した。試料を封入したバイアルを40°Cで20分間予備加温した後、固相マイクロ抽出ファイバー (SPMEファイバー: 85 μ m Carboxen™/PDMS, SUPELCO) に揮発性成分を40°C

で30分間吸着させ、GC/MSに供して分析を行った。GC/MS分析は GCMS-QP2010（島津製作所）を用いた。キャリアガスはヘリウム、キャリアガス流速は線速度 36.1cm/sec、カラムはDB-WAX（30m×0.25mm I.D., 膜厚0.25 μ m, J&W Scientific）、注入口温度は250℃とし、スプリットレスモードで試料導入した。カラムの昇温条件は、35℃で5分間保持し、100℃まで毎分2℃昇温後、240℃まで毎分15℃昇温して3分保持とした。検出された各成分はマススペクトルデータベース（NIST）との比較により同定した。

8. 微生物検査

本発酵ソーセージは食品衛生法上乾燥食肉製品となるため、成分規格であるE.coli陰性である必要がある。試料25gを225mLの生理食塩水に加えて10%乳剤を調製し、EC培地（日水製薬）10mLに1mLずつ5本に接種し、44.5℃で24時間培養し、ガストラップチップの浮き沈みによりガス発生の有無を判定した。

9. 官能評価

共同研究機関において、カビを接種したソーセージおよびカビと酵母両方を接種したソーセージ（熟成乾燥2週間目、水分活性 $A_w=0.75$ ）について嗜好性官能評価を行った。また、水分活性 $A_w=0.82$ （熟成乾燥7日目）、0.78（熟成乾燥10日目）および0.75（熟成乾燥14日目）のカビを接種したソーセージの固さ、かみ応えについての嗜好性官能評価を行った。

実験結果および考察

1. 市販白カビソーセージの性状および使用真菌類

市販の白カビソーセージ（輸入品5品、国産品1品）について塩分、pH、遊離アミノ酸、有機酸を分析した。その結果、塩分は国産品が約3%であったものの、輸入品は約3.3~6.25%と高塩分であった。pHについてはフランス製の1品がpH6.8と中性近辺であったが、その他は5.2~6.1と酸性側であった（表1）。

遊離アミノ酸については、B社（スペイン産）の白カビソーセージが313mg/100gと低い値を、E社（フランス産）の白カビソーセージが1284mg/100gと高い値を示したが、その他は概ね600~900mg/100gの範囲であった（図1）。

有機酸については、いずれのソーセージも乳酸が主体で、その他に酢酸、ピルビン酸などが少量認められた（データ略）。

分析に使用した輸入白カビソーセージ5品から真菌類の分離を試みたところ、カビ様コロニーおよび酵母様コロニーが分離され、28S rRNA遺伝子による菌種の推定を行ったところ、白カビは*Penicillium chrysogenum*またはその近縁種、酵母は*Debaryomyces hansenii*と推定された。

表1 市販白カビソーセージの塩分及びpH

	原産地	塩分 (%)	pH
他社製品	北海道	2.96	6.0
A社	スペイン	4.18	6.1
B社	スペイン	3.94	6.1
C社	フランス	3.34	5.2
D社	フランス	6.25	6.8
E社	フランス	6.07	6.0

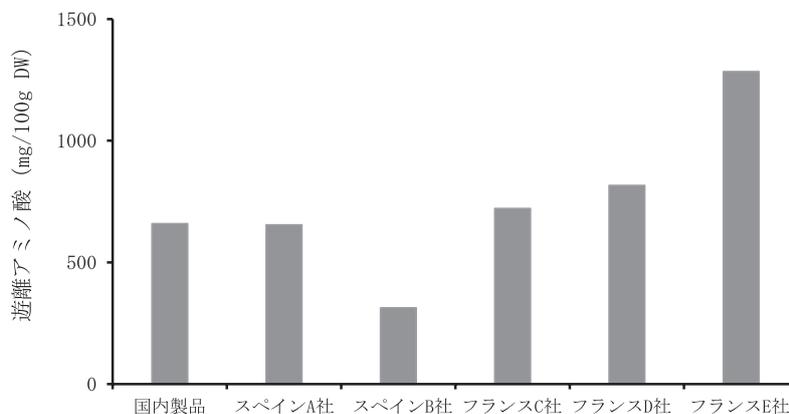


図1 市販白カビソーセージの遊離アミノ酸量

2. 分離真菌類の耐塩性, 亜硝酸耐性およびタンパク質分解活性

食肉製品は食塩および亜硝酸ナトリウムを加えて製造するため、接種するカビや酵母には耐性が必要となる。食塩または亜硝酸ナトリウムを添加したPDA培地に、分離した*P. chrysogenum*および*D. hansenii*を接種し、25°Cで培養して増殖の有無を観察した結果、分離した菌株はいずれも食塩15%または亜硝酸ナトリウム400ppm添加のPDA寒天培地で増殖可能であり、白カビソーセージに使用可能であることを確認した（データ省略）。

10%還元脱脂乳寒天培地、25°C、1週間培養により*P. chrysogenum*および*D. hansenii*による乳タンパクの分解を観察したところ、コロニー周囲にカゼインタンパク分解に伴う透明環の形成は認められなかった（データ不掲載）。

国内のカビを接種した発酵ソーセージの研究では*P. miczynskii*、*P. nalginovenis*、*P. candidum*などが使用されているが^{4, 5)}、これらを踏まえ、本研究では上記*P. chrysogenum*および*D. hansenii*を供試微生物として使用

することとした。

3. 羊腸詰め白カビソーセージの試作とその分析

分離した白カビ (*P. chrysogenum*) を羊腸詰めソーセージ表面に付着させた発酵ソーセージを試作し、乾燥条件の検討を行った。恒温恒湿槽の温度を18°C、湿度を85%および90%で乾燥させた試験区で、表面がカビで白く覆われたのが確認できた（図2）。乾燥温度14°C、湿度75%では、4日目に一部に白カビが確認できたが、7日目まで保管してもカビが全体に広がらなかった。

図2に示す外観と、図3に示すサンプリングしたソーセージの分析値から、白カビが十分にソーセージ表面に生育するためには、水分活性値が0.93以上必要であった。白カビが十分に生育した後に、恒温恒湿槽内の湿度を75%まで低下させることで、7日目までに乾燥食肉製品の規格基準である水分活性値を0.87未満にすることができた。乾燥温度18°C、湿度90%の試験区のpHは、白カビが表面に十分に生育した4日目から上昇し、5日目には5.3以上となったが、白カビの生育後に乾燥温度や湿度を低下させることでpHの上昇が抑制された（図4）。



図2 試作白カビソーセージの外観

(A)：温度18°C 湿度90% 乾燥3日目、(B)：温度18°C 湿度85% 乾燥4日目、(C)：温度14°C 湿度75% 乾燥7日目

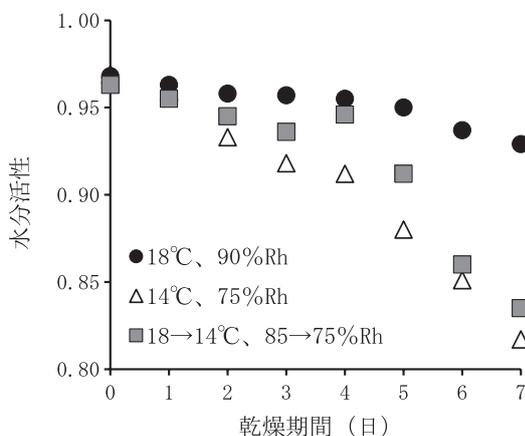


図3 乾燥条件の違いによる水分活性の変化

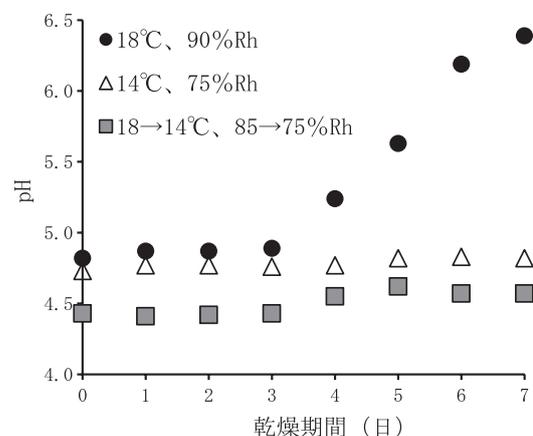


図4 乾燥条件の違いによるpHの変化

遊離アミノ酸含有量は、乾燥温度18℃、湿度90%の試験区では、白カビが表面に確認できた乾燥4日目から増加していたが、白カビ生育後に乾燥温度、湿度を低下させた試験区では、遊離アミノ酸含有量は殆ど変化しなかった(図5)。また、低い乾燥温度では、遊離アミノ酸生成が抑制された。アンモニアは乾燥温度18℃、湿度90%の試験区では乾燥5日目から増加していたが、白カビ生育後に乾燥温度、湿度を低下させた試験区では殆ど変化しなかった(図6)。これらのことから、カビの旺盛な増殖は遊離アミノ酸の増加をもたらすものの、アンモニアの生成やpHの上昇を引き起こすことが推定された。

カマンベールチーズでは、白カビが旺盛に増殖することにより表面のカビの層が厚く硬くなり、品質低下要因となるが、酵母を併用することによりカビの増殖を抑制することができる。今回真菌類を分離した輸入白カビソーセージにおいても、*P. chrysogenum*と共に酵母

*D. hansenii*が分離されており、この酵母も同様の目的で使用されている可能性も考えられた。そこで、白カビのみで試作した試験区と、白カビと酵母を併用した試験区でそれぞれソーセージを試作した。乾燥条件は、カビの生育が認められる4日目まで温度18℃、湿度85%、その後温度14℃、湿度75%とした。

白カビソーセージと白カビ酵母併用ソーセージでは、両方とも表面に真菌の生育が確認できたが、外観に大きな差が認められ、酵母を併用することにより白カビの気菌糸生育が抑制されていた(図7)。しかし、水分活性(図8)及びpH(データ不掲載)の経時変化においては、試験区間に大きな違いは認められなかった。遊離アミノ酸は、カビのみ使用した試験区が高い値を示した(図9)。アンモニアは、酵母を併用した試験区がカビのみを使用した試験区より少なかったが、各試験区共に低い含有量で推移した(データ不掲載)。

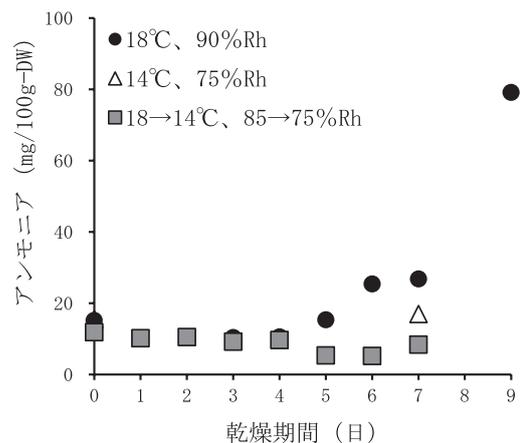
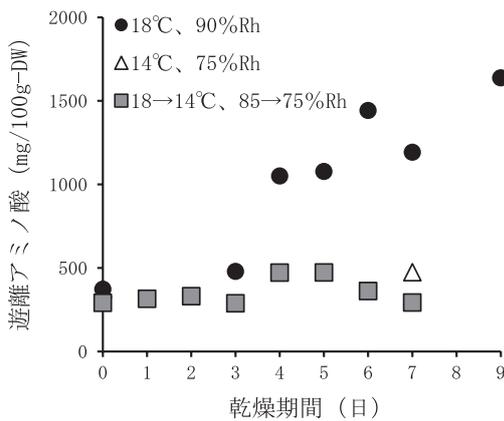


図5 乾燥条件の違いによる遊離アミノ酸含有量の変化

図6 乾燥条件の違いによるアンモニア含有量の変化



図7 真菌のバランスを変えて試作したソーセージの乾燥6日目の外観
乾燥条件：乾燥温度18℃から4日目に14℃、湿度85%から4日目に75%

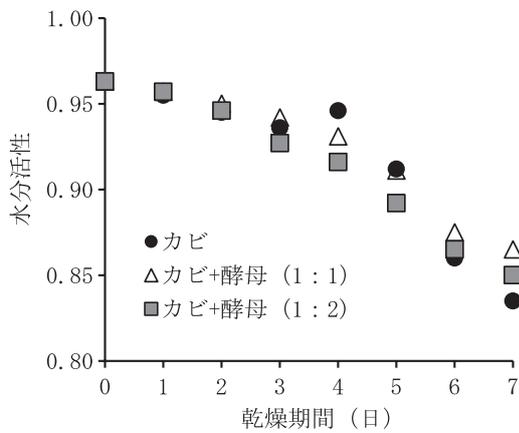


図8 真菌のバランスを変えて試作したソーセージの水分活性変化

乾燥条件：乾燥温度18℃から4日目に14℃，湿度85%から4日目に75%

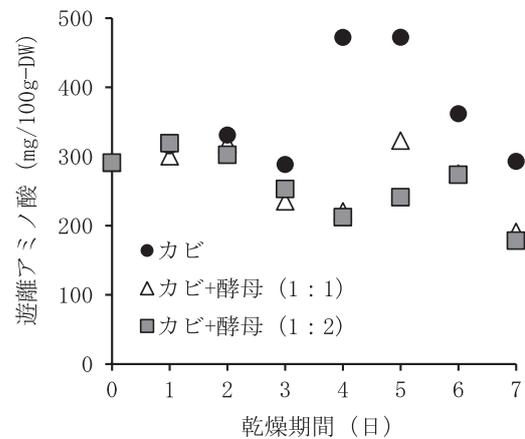


図9 真菌のバランスを変えて試作したソーセージの遊離アミノ酸含有量変化

乾燥条件：乾燥温度18℃から4日目に14℃，湿度85%から4日目に75%

乾燥条件を，乾燥温度18℃，湿度85%で開始し，カビの増殖を認める4日目から温度一定で湿度を75%まで低下させて乾燥を行った場合，カビを付着させた試験区では表面が白くなり始めた3日目でカビの生菌数は約 10^6 cfu/gであり，6日目には約 10^7 cfu/gに増加した。ま

た，カビと酵母を併用した試験区では，3日目で酵母が約 10^7 cfu/gに対してカビが約 10^4 cfu/gであったが，酵母は4日目に約 10^8 cfu/gに達した後，ほとんど増加しないのに対し，カビは6日目に約 10^7 cfu/gまで増加した（図10）。

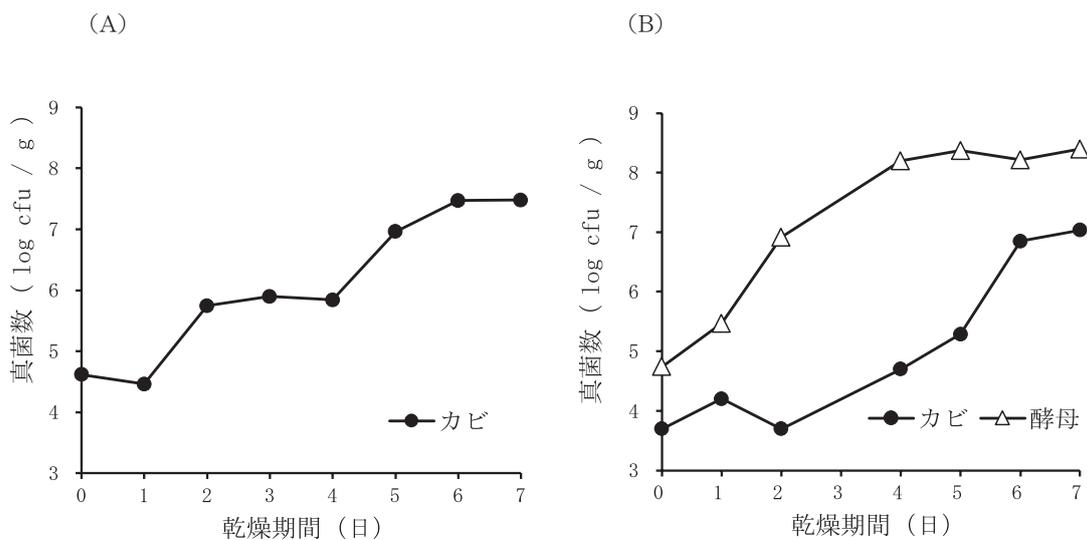


図10 試作ソーセージの真菌数の推移

A：白カビソーセージ，B：白カビ酵母併用ソーセージ
乾燥条件：温度18℃湿度85%で開始，4日目に湿度を75%に低下

この乾燥条件においては、におい成分は、カビを付着した試験区では対照区と比べアルコールとケトンが増加していた。また、カビと酵母を併用した試験区では、アルコール（パンの香りである3-メチルブタノールなど）、アルデヒド、酸が増加しており、カビのみの試験区とも異なるにおい成分の組成を示した（図11）。

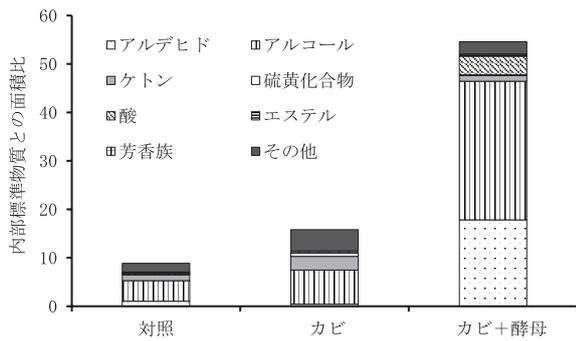


図11 試作ソーセージの香り成分比較

温度を18℃で一定として湿度85%で乾燥を開始し、乾燥4日目に湿度を75%に低下させる方法では、恒温恒湿槽内の風の当たり具合により、ソーセージ上のカビ（酵母）の増殖に多少の濃淡が発生する場合があった。このことから、温度は18.5℃一定として、湿度を徐々に下げる条件で羊腸詰めソーセージの乾燥条件を検討し、3日目まで85%、3日目から5日目82%、5日目から7日目79%、7日目から10日目78%、10日目から14日目75%とした（図12（A））。この条件で乾燥させることにより、乾燥14日目のソーセージの外観は図13のようにムラのない仕上がりになった。4日目に湿度を85%から75%に低下させる方法とほぼ同様に、乾燥6日目あたりで乾燥食肉製品の規格基準である水分活性0.87未満に達した（図12（B））。

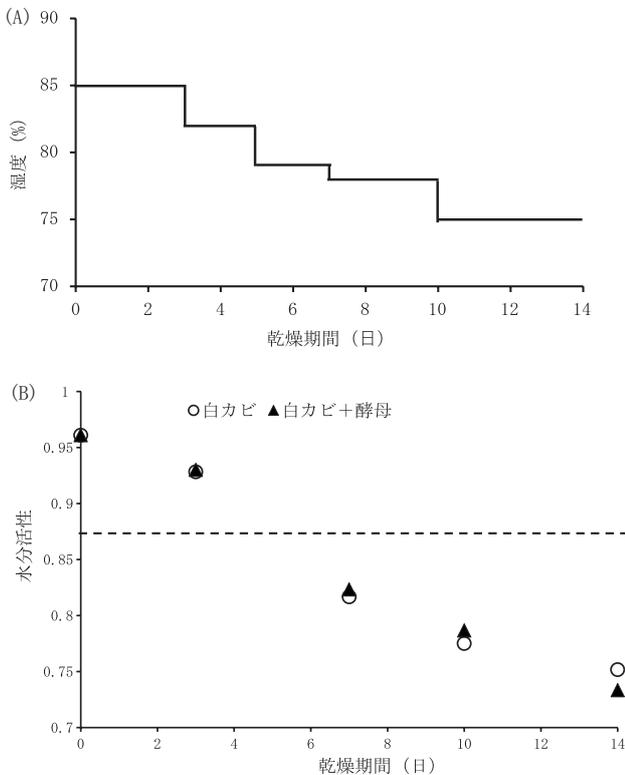


図12 温度一定条件での羊腸詰めソーセージ乾燥(緩徐法)
(A) 湿度変化, (B) その際のソーセージ水分活性変化

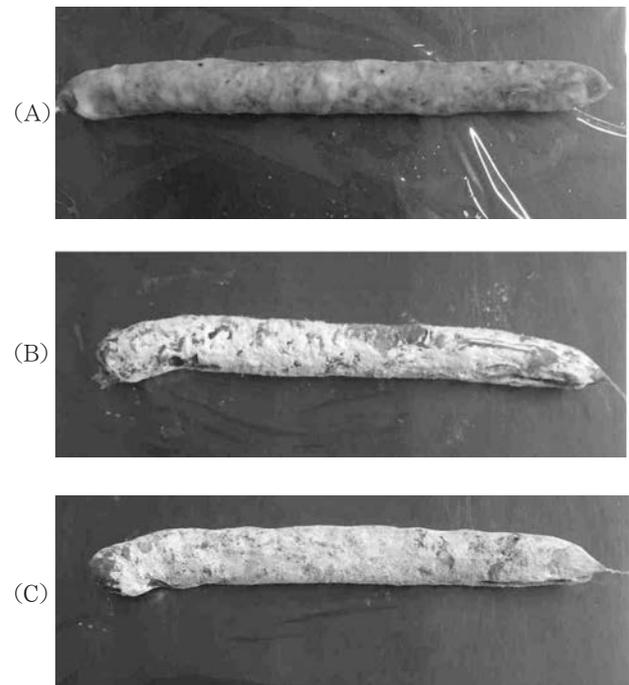


図13 乾燥14日目ソーセージの外観
(A) 対照ソーセージ, (B) カビ付けソーセージ, (C) カビ+酵母併用ソーセージ

4. 豚腸詰めソーセージの試作とその分析

羊腸詰めソーセージ（16～17mm径）で得られた結果を基に、径の異なる豚腸詰め（30～35mm径）のカビ付けソーセージを試作し、乾燥条件を検討した。温度を18.5℃で固定し、湿度は85%で開始し、3日目で82%、4日目に79%、5日目に77%、6日目以降は75%として14日間乾燥した。

豚腸ソーセージでの1回目の試作で、水分活性は14日目頃に乾燥食肉製品の規格基準である0.87に達した（データ不掲載）。また総遊離アミノ酸の変化については、羊腸ソーセージでの挙動との違いも少なく、また、対照ソーセージ、カビ付けソーセージ、カビ酵母併用ソーセージ間の差異も殆どなかった（データ不掲載）。また、乾

燥期間を湿度75%のまま21日目まで延長させたところ、水分活性の規格基準を確実に達成し、かつドライリング形成などによる乾燥不良が起きないことを確認した。

本乾燥条件で順調に水分が減少し、ほぼ12日目に水分活性が0.87未満となることが確認できた（データ不掲載）。また、これまでの試作品については酸味が少し強すぎたため、原材料組成を修正した。この結果、pHの変化は5.75～6.5の範囲内で推移した（データ不掲載）。

5. 微生物検査

食品衛生法における乾燥食肉製品の基準ではE.coli陰性となっているため、EC培地でのガス発生を検討した。44.5℃、24時間培養においてガス発生は認められず、E.coliは陰性であった。

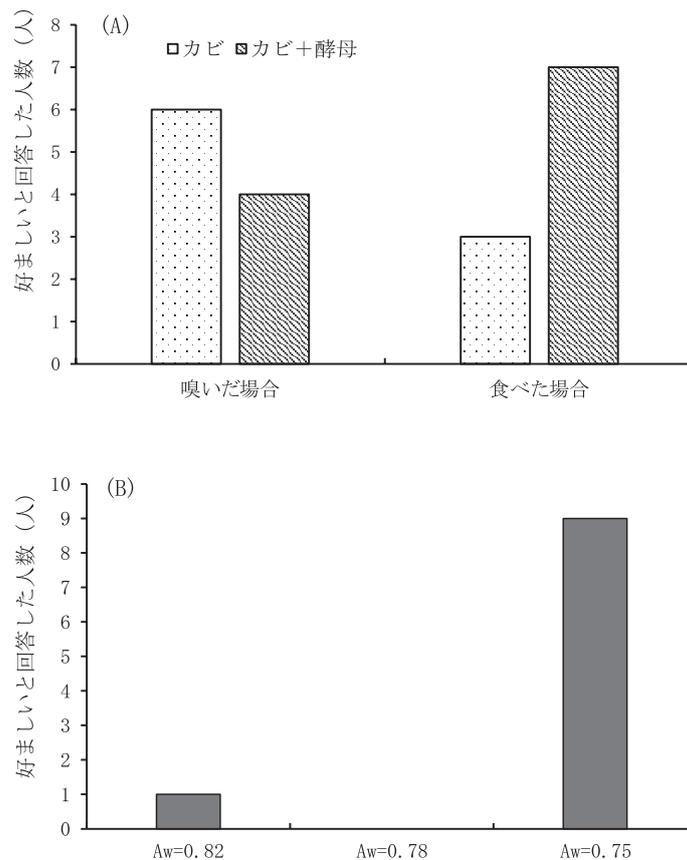


図14 試作ソーセージの嗜好性官能評価

(A) カビ付けソーセージとカビ・酵母併用ソーセージの嗜好性、
 (B) 固さ、かみ応えの嗜好性（いずれもn=10）
 Aw:水分活性値

6. 官能評価

カビ付けソーセージとカビ・酵母併用ソーセージについて、嗜好性の官能試験を行った。パネルは男性5名、女性5名の10名で、年齢は20代3名、40代5名、50代2名であった。その結果、鼻で嗅いだにおいについては、カビ付けを好むパネルが6名、カビ・酵母併用を好むパネルが4名であったが、食べた場合のにおいについては、カビ付けを好むパネルが3名、カビ・酵母併用を好むパネルが7名となった。いずれの試験においても、二項検定において有意差は確認されなかった(図14(A))。一方で、香り成分に関する機器分析の結果では両者間に顕著な差が認められた(図11)ことから、嗜好への影響を確認するには、パネル数を増すなど、官能試験の再検討が必要と考えられた。

水分活性が0.82, 0.78, 0.75のカビ付けソーセージの「硬さ、かみ応え」に関する嗜好性官能試験においては、最も乾燥が進んだAw=0.75を好むパネルが9名、Aw=0.82を好むパネルが1名と、硬めのソーセージが好まれた(図14(B))。

要 約

15% (w/v) 食塩および400ppm亜硝酸ナトリウムに耐性を示す白カビ*Penicillium chrysogenum*および酵母*Debaryomyces hansenii*を表面に接種するソーセージ製造技術について検討した。羊腸ソーセージ(約15mm径)においては、温度18.5℃、湿度85%で熟成乾燥を開始し、温度一定で4日目に湿度を75%に下げることによりカビ酵母がソーセージ表面に増殖した状態となり、約1週間でソーセージの水分活性が法令で定める水分活性以下になった。豚腸ソーセージ(約35mm径)では湿度を徐々

に下げ、約12日間で水分活性を低下させることができた。

本条件で製造した試作品を表面に白カビ等真菌類を接種しない非発酵のソーセージと比較したところ、カビおよび酵母は熟成中の遊離アミノ酸増加には寄与せず、アルコールおよびアルデヒドを主とする香り成分を大幅に増加させ、風味改変に寄与することを見いだした。理化学分析では香り成分において白カビのみを接種したソーセージとカビと酵母両方を接種したソーセージの間で顕著な差が認められたものの、嗜好性官能評価においては嗜好性には影響がなかった。「固さ、かみ応え」の嗜好性官能評価においては乾燥が進んで固くなったソーセージが好まれた。

文 献

- 1) 森地敏樹, 松田敏生 編 (1999) 第5章バイオプリザバティブの食品への利用, 乳酸菌による食品微生物制御, バイオプリザベーション, 幸書房 72-80.
- 2) Cook, P. E. (1995). Fungal ripened meats and meat products. In Fermented Meats (Campbell-Platt, G and Cook P. E. eds). Blackie Academic and Professional. 110-129.
- 3) Lücke, F. K., (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtsch.*, **66** 1505-1509.
- 4) 沼田正寛ら (1988). カビ発酵サラミソーセージの熟成・乾燥期間中における風味関連物質の変化. 日畜会報 **59**(1) 12-22.
- 5) 三上正幸ら(2004). 白カビを接種した発酵ソーセージの製造と諸性質. 北畜会報 **46** 71-78.