

製造環境から分離したブドウ球菌を添加した食肉製品の風味特性

小林哲也, 田中 彰, 八十川大輔, 川上 誠

Flavor Properties of Meat Products Inoculated with Staphylococci Isolated from a Meat-Processing Plant

Tetsuya Kobayashi, Akira Tanaka, Daisuke Yasokawa and Makoto Kawakami

In this study, we evaluated the flavor properties of meat products inoculated with staphylococci. Strain No. 119 and No. 120 identified as *Staphylococcus xylosum*, and strain No. 161 and No. 168 identified as *S. carnosus*, grew well in vacuum-packed minced meat containing sodium chloride and sodium nitrite. The volatile compounds in the minced meat varied depending on the staphylococcal strains inoculated. The samples that were inoculated with strain No. 119 and No. 120 contained a lot amount of ketones, especially 3-hydroxy-2-butanone. On the other hand, the ones inoculated with strain No. 161 and No. 168 contained aldehydes, alcohols, acids and a small amount of ketones. With the differences in the volatile compounds, there was also a discernible change in the sensory evaluation. Experimental meat products were made by inoculation with strain No. 120 or No. 168 as a starter culture inside the pork loin. The volatile compounds of these meat products reflected the characteristics of *S. xylosum* and *S. carnosus*. These results suggested that the flavor of meat products can be modified by the selection of the staphylococcal starter cultures.

KEY-WORDS : *S. xylosum*, *S. carnosus*, Starter culture, Volatile compounds, Meat products

キーワード : *S. xylosum*, *S. carnosus*, スターターカルチャー, 揮発性成分, 食肉製品

ヨーロッパ各地で製造される生ハムやソーセージなどの非加熱食肉製品の多くは、微生物や酵素の作用によって豊富な旨味や独特の芳香といった熟成風味を持つ^{1~3)}。このうち、単一塊の原料肉から製造する生ハム類においては、原料肉や製造環境に由来する微生物や原料肉に由来する酵素の作用で熟成風味が形成される^{1, 2)}。これらの作用は極めて緩やかであるため、イタリアやスペインで製造される生ハム類は完成までに1~2年を要する⁴⁾。一方、挽肉状もしくは糊状にした原料肉から製造するソーセージ類においては、原料肉由来等の微生物もしくは酵素の作用だけでなく、人為的に添加した微生物の作用

で熟成風味が形成される場合もある⁵⁾。スターターカルチャーと呼ばれるこのような微生物は、製品中で速やかに優占種となるよう6 log CFU/g程度添加される³⁾ため、風味形成にかかる期間も短い。

国内では、ハムの製造にもスターターカルチャーを用いる取り組みがいくつか報告されている。芳賀らは、肉塊中に接種した乳酸菌が5℃の塩漬中に100倍程度まで発育することを示した⁶⁾。井上らは、*Staphylococcus xylosum*を含む塩漬液を肉塊中に注入することにより短期間で熟成風味を形成させる方法を開発した⁷⁾。この取り組みは、北海道内の食肉製品製造企業において製品化に至ってい

事業名：重点研究

課題名：発酵食肉製品の新たな製造技術の開発

る⁸⁾。また、山中らは*S. xylosum*で発酵させた豚肉エキスを肉塊中に注入して塩漬することでロースハムに熟成風味が付与されることを報告している⁹⁾。これらのことは、ハム類の製造においてもスターターカルチャーが有用であることを示唆している。

一方で、いずれの例においても「香り」は官能評価に留まり、機器分析による評価は行われていない。スターターカルチャーに用いるブドウ球菌について、培地や挽肉を基質としたときに生成する揮発性成分は多く報告されている^{3, 10-12)}が、肉塊を基質とした報告は少ない。本研究では、スターターカルチャーを用いた生ハムの風味形成について、食肉製品製造環境から分離したブドウ球菌の添加効果を評価した。

実験方法

1. 供試菌株と基礎的性状の評価

札幌市内の食肉製品製造企業の熟成庫やピクル液、中間製品等から分離したブドウ球菌6株 (No.103, No.119, No.120, No.161, No.168およびNo.177) (表1)を用いた。細菌属種名は、分子生物学的手法を用いて推定した¹³⁾。食塩耐性および亜硝酸塩耐性は、塩化ナトリウム (和光純薬, 特級) もしくは亜硝酸ナトリウム (和光純薬, 特級) を所定濃度添加した0.6% Yeasts Extract (Difco) 加 Tryptic Soy Broth (Difco, 以下, TSBYE) にTSBYEで30°C, 24時間培養した各菌株の培養液を1% (v/v) 接種し, 30°Cで14日間培養したときの培地の濁りの有無で評価した。低温耐性は, TSBYEに各菌株の培養液を同様に接種し, 8~14°Cで21日間培養したときの培地の濁りの有無で評価した。タンパク質分解活性は, スキムミルクを2%添加した0.6% Yeast Extract加Tryptic Soy Agar (Difco, 以下TSAYE) に各菌株の培養液を画線塗抹して30°Cで2日間培養した時の透明帯形成の有無で評価した。

2. ブドウ球菌を接種したモデル試料の調製

豚挽肉に塩化ナトリウム6.0% (w/w), グルコース (和光純薬, 特級) 1.0% (w/w) および亜硝酸ナトリウム製剤 (硝精S, 第一化成) 0.02% (w/w) を混合し, モデル試料とした。

TSBYEで30°C, 24時間培養した各菌株の培養液をモデル試料に0.1% (v/w) 接種してよく混合した後, 滅菌済遠沈管もしくは酸素バリア性パウチに充填した。パウチに充填した試料は真空包装した。試料は, 18.5°Cで2週間, 10°Cで2週間の合計4週間もしくは, 18.5°Cで4週間発酵させた後, 各種分析に供した。

3. ブドウ球菌を接種した生ハムの試作

原料には北海道産豚ロース肉を用いた。塩漬は乾塩法および一本針注入法を併用し, いずれも原料肉重量の5%の配合塩, ピクル液を用いて5°Cで25日間塩漬した。水分活性が0.97未満であることを確認した後, 18.5°C, 相対湿度83%で11日間, 次いで相対湿度60%で14日間乾燥させた。水分活性0.95未満であることを確認した後, 真空包装して5°C, 10°Cおよび15°Cで50日間保管して各種分析に供した。なお, 分析試料はロース芯部分から採取し, 細切してから用いた。

ピクル液は, 食塩15%, グラニュー糖11%, グルコース6%, 硝精#10 2.4%, 水45.92%, 混合菌液19.68%の割合で混合して調製した。混合菌液は, GYP液体培地で25°C, 3日間培養した*Pediococcus pentosaceus*およびブドウ球菌を滅菌生理食塩水で再懸濁し, それぞれを等量混合して調製した。配合塩は, 食塩82.32%, 硝精#10 2%, グラニュー糖15.68%を混合して調製した。

4. 生菌数の測定

生菌数は寒天平板培養法で測定した。試料約20gを9倍量の滅菌生理食塩水で均質化して10倍希釈乳剤を調製し, 適宜希釈した後に寒天平板に塗抹した。一般生菌数は標準寒天培地 (日水製薬), 酸生成菌数はGYP白亜寒天培地を用い, 30°Cで3日間培養して測定した。耐塩性菌数はマンニット食塩培地 (日水製薬) を用い, 35°Cで3日間培養して測定した。

5. 揮発性成分の測定とにお記述子の検索

試料約3gとシクロヘキサノール0.05ml (0.1mg/ml, 内部標準) を添加して窒素置換したバイアルを40°Cで20分間加温した後, 固相マイクロ抽出ファイバー (SPMEファイバー, 85 μ m CarboxenTM/PDMS) を用いて揮発性成分を40°Cで30分間抽出した。抽出した揮発性成分は, ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010, 島津製作所) で分析した。カラムにはDB-WAX (30m \times 0.25mm I.D., 膜厚0.25 μ m, J&W Scientific) を用い, 注入口温度は250°C, カラム温度は40°Cを5分間保持し, その後200°Cまで3°C/minで昇温して分析した。検出した各成分は, マススペクトルデータベース (NIST) との比較により同定し, 保持指標&にお記述子 (AroChemBase, アルファ・モス・ジャパン) でお記述子を検索した。

6. 遊離アミノ酸の測定

試料約3gを9倍量の蒸留水でホモジナイズして10倍希釈乳剤とした後, 濾過 (No.5A, 東洋濾紙) して上清を得た。この上清について, タンパク質を除いた後¹⁴⁾,

日立カスタムイオン交換樹脂 (4.6mm I.D.×60mm) を用いたポストカラムニンヒドリン比色法にてアミノ酸自動分析計 (L-8900, 日立ハイテク) で測定した。

7. 官能評価

モデル試料において, No.120株およびNo.168株を接種した試料の香りの違いを三点識別法で評価した。各試料の香りの特徴は, 自由記述で評価した。パネルは当センター職員および食肉製品製造企業従業員とした。

実験結果および考察

1. 供試ブドウ球菌の基礎的性状

供試菌株の属種名は, 分子生物学的手法により, *S. xyloso* (No.103株, No.119株, No.120株), *S. carnosus* (No.161株, No.168株), *S. saprophyticus* (No.177株) と推定された。いずれの菌株も15%以上の食塩耐性と400ppm以上の亜硝酸耐性を示した。No.103株, No.119株, No.120株およびNo.177株の発育下限温度は8℃以下, No.161株およびNo.168株の発育下限温度は12℃であった。いずれの菌株もタンパク質分解は陽性であった (表1)。

*S. xyloso*や*S. carnosus*, *S. saprophyticus*は, ヨーロッパ各地で製造される非加熱食肉製品から分離される^{1, 5, 15~18})。このうち, *S. xyloso*および*S. carnosus*は, 発酵食肉製品の代表的なスターターカルチャーである^{3, 10~12, 17})。 *S. saprophyticus*は, 製造環境から分離されることが多く,

自然発酵タイプの製品において優占種となる^{15, 16})。食肉製品のスターターカルチャーには, 食塩濃度6%の環境でも速やかに発育することや, 100ppm以上の亜硝酸耐性が求められる¹⁹)。本研究で供試した菌株はいずれもこの条件を満たしていた。

以上のことから, 本研究のブドウ球菌はいずれも食肉製品のスターターカルチャーとして利用できることが示唆された。

2. ブドウ球菌を接種したモデル試料の風味成分

各菌株を接種した試料を遠沈管に充填し, 好気培養したときの生菌数は, 酸素バリア性パウチに充填し, 真空包装して嫌気培養したときのそれと比較して0.5~1 log CFU/g程高い水準であった。また, 嫌気培養では, 好気培養と同程度の水準に発育するまでに18.5℃で4週を要した (表2)。これらのことから, ブドウ球菌の発育は, 酸素の影響を受けて, 嫌気環境では遅延することが示唆された。

真空包装して18.5℃で4週間保存した試料の揮発性成分は, 接種菌株毎に異なる傾向を示した (表3)。アルデヒド類では, 2-および3-メチルブタナールの生成に差があり, *S. xyloso*接種試料は相対的に生成量が低い一方, *S. carnosus*接種試料は相対的に多く, No.168株接種試料は, 3-メチルブタナールが全体の20%を占めた。アルコール類では, 2-および3-メチル-1-ブタノールの生成に差があり,

表1 製造環境から分離したブドウ球菌の基礎的性状

供試菌株	推定される細菌属種名	食塩耐性(%)	亜硝酸耐性(ppm)	低温耐性(℃)	タンパク質分解活性
No.103	<i>Staphylococcus xyloso</i>	≥15	≥400	≤8	+
No.119	<i>Staphylococcus xyloso</i>	≥15	≥400	≤8	+
No.120	<i>Staphylococcus xyloso</i>	≥15	≥400	≤8	+
No.161	<i>Staphylococcus carnosus</i>	≥15	≥400	12	+
No.168	<i>Staphylococcus carnosus</i>	≥15	≥400	12	+
No.177	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	≥15	≥400	≤8	+

試験範囲内で全て発育した場合の耐性は, ≥最高濃度, ≤最低温度として表記した。
タンパク質分解活性は, 陽性: +, 陰性: -で表記した。

表2 モデル試料におけるブドウ球菌の発育

接種菌株	好気培養 (18.5℃, 2週間→10℃, 2週間)		嫌気培養 (18.5℃, 2週間→10℃, 2週間)		嫌気培養 (18.5℃, 4週間)	
	一般生菌 (log CFU/g)	耐塩性菌 (log CFU/g)	一般生菌 (log CFU/g)	耐塩性菌 (log CFU/g)	一般生菌 (log CFU/g)	耐塩性菌 (log CFU/g)
No.103	7.7	7.6	6.6	6.6	7.3	7.3
No.119	8.0	7.9	7.4	7.3	7.6	7.8
No.120	8.1	8.1	7.3	7.3	7.6	7.6
No.161	7.7	7.7	7.2	7.2	8.2	8.1
No.168	8.1	8.0	7.4	7.4	8.2	8.2
No.177	7.4	7.5	6.8	6.8	7.2	7.2
非接種	7.2	7.2	5.8	5.9	7.4	7.2

好気培養: 滅菌済遠沈管に試料を充填して培養した。

嫌気培養: 酸素バリア性パウチに試料を充填し, 真空包装して培養した。

表3 真空包装して18.5°Cで28日間発酵させたモデル試料から検出される揮発性成分のピーク面積比と相対割合

検出成分	接種菌株						
	非接種	No.103	No.119	No.120	No.161	No.168	No.177
アルデヒド類							
アセトアルデヒド	0.127 (4.5)	0.018 (0.5)	0.010 (0.3)	0.013 (0.1)	0.010 (0.5)	0.017 (0.3)	0.039 (1.8)
2-メチル-ブタナール	0.041 (1.4)	0.039 (1.2)	0.036 (0.9)	0.092 (0.9)	0.039 (1.7)	0.289 (5.4)	0.010 (0.4)
3-メチル-ブタナール	0.111 (3.9)	0.122 (3.7)	0.179 (4.3)	0.249 (2.5)	0.210 (9.1)	1.097 (20.5)	0.042 (1.9)
アルコール類							
エタノール	6.667	5.455	3.328	3.74	3.804	4.804	3.821
1-メトキシ-2-プロパノール	N.D.	0.038 (1.1)	0.011 (0.3)	0.010 (0.1)	0.024 (1.0)	0.026 (0.5)	0.018 (0.8)
1-ブタノール	0.037 (1.3)	0.071 (2.1)	0.090 (2.2)	0.085 (0.9)	0.066 (2.9)	0.082 (1.5)	0.078 (3.5)
2-メチル-1-ブタノール	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.184 (8.0)	0.924 (17.3)	N.D.
3-メチル-1-ブタノール	0.844 (29.5)	0.235 (7.1)	0.344 (8.3)	0.745 (7.5)	0.156 (6.7)	N.D.	0.039 (1.8)
1-プロパノール	0.045 (1.6)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ケトン類							
2-プロパノン	0.162 (5.7)	0.415 (12.6)	0.542 (13.1)	0.819 (8.2)	0.262 (11.3)	0.407 (7.6)	0.574 (26.1)
2-ブタノン	0.011 (0.4)	0.011 (0.3)	0.020 (0.5)	0.017 (0.2)	0.017 (0.7)	0.019 (0.4)	0.018 (0.8)
2,3-ブタンジオン	0.090 (3.2)	0.135 (4.1)	0.224 (5.4)	0.537 (5.4)	0.021 (0.9)	0.032 (0.6)	0.094 (4.3)
3-ヒドロキシ-2-ブタノン	0.503 (17.6)	1.421 (43.1)	1.920 (46.4)	5.863 (58.9)	0.092 (4.0)	0.187 (3.5)	0.665 (30.3)
酸類							
酢酸	0.157 (5.5)	0.187 (5.7)	0.243 (5.9)	0.579 (5.8)	0.381 (16.5)	0.972 (18.1)	0.117 (5.3)
酪酸	0.034 (1.2)	0.060 (1.8)	0.063 (1.5)	0.078 (0.8)	0.076 (3.3)	0.118 (2.2)	0.037 (1.7)
3-メチル酪酸	N.D.	0.027 (0.8)	0.022 (0.5)	0.077 (0.8)	0.130 (5.6)	0.350 (6.5)	N.D.
エステル類							
酢酸エチル	0.094 (3.3)	0.034 (1.0)	0.031 (0.7)	0.073 (0.7)	0.089 (3.8)	0.161 (3.0)	0.024 (1.1)
酪酸エチル	0.026 (0.9)	0.097 (2.9)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3-メチル酪酸エチル	N.D.	0.008 (0.3)	N.D.	N.D.	0.014 (0.6)	0.044 (0.8)	N.D.
カプロン酸エチル	0.024 (0.8)	N.D.	N.D.	0.015 (0.2)	0.005 (0.2)	0.013 (0.2)	N.D.
炭化水素類							
4,4-ジメチルヘプタン	0.005 (0.2)	N.D.	0.015 (0.4)	0.020 (0.2)	0.014 (0.6)	N.D.	0.017 (0.8)
2,2,4,6,6-ペンタメチルヘプタン	0.205 (7.2)	0.130 (3.9)	0.133 (3.2)	0.275 (2.8)	0.168 (7.3)	0.248 (4.6)	0.155 (7.1)
n-ドデカン	0.083 (2.9)	0.074 (2.3)	0.113 (2.7)	0.111 (1.1)	0.087 (3.8)	0.095 (1.8)	0.096 (4.4)
6,6-ジメチルウンデカン	0.014 (0.5)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
メチルベンゼン	0.008 (0.3)	N.D.	0.008 (0.0)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5-エチル-2,2,3-トリメチルヘプタン	N.D.	0.026 (0.8)	N.D.	0.043 (0.4)	0.016 (0.7)	0.022 (0.4)	N.D.
2,6,6-トリメチルオクタン	0.031 (1.1)	N.D.	N.D.	0.062 (0.3)	N.D.	0.022 (0.4)	N.D.
エチルベンゼン	0.056 (2.0)	0.044 (1.3)	N.D.	N.D.	0.037 (1.6)	N.D.	N.D.
1,2-ジメチルベンゼン	0.031 (1.1)	N.D.	N.D.	0.023 (0.2)	0.035 (1.5)	0.021 (0.4)	N.D.
含硫化合物							
二硫化炭素	0.017 (0.6)	0.027 (0.8)	0.032 (0.8)	0.040 (0.4)	0.079 (3.4)	0.056 (1.0)	0.054 (2.5)
その他							
アセトニトリル	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.026 (0.5)	N.D.
未同定成分①	0.041 (1.4)	0.026 (0.8)	0.045 (1.1)	0.038 (0.4)	0.048 (2.1)	0.048 (0.9)	0.056 (2.5)
未同定成分②	0.063 (2.2)	0.049 (1.5)	0.057 (1.4)	0.089 (0.9)	0.055 (2.4)	0.079 (1.5)	0.064 (2.9)
合計 (含エタノール)	9.528	8.747	7.466	13.693	6.119	10.16	6.016
合計 (抜エタノール)	2.860 (100)	3.292 (100)	4.138 (100)	9.953 (100)	2.315 (100)	5.356 (100)	2.195 (100)

ピーク面積比=検出成分のピーク面積/内部標準 (0.1 mg/mlシクロヘキサノール) のピーク面積

相対割合=検出成分のピーク面積 / (ピーク面積比の合計-エタノールのピーク面積比) ×100

N.D.: Not Detected (検出限界未満)

2-メチル-1-ブタノールは、*S. xylosus*接種試料で検出されなかった一方、*S. carnosus*接種試料で相対的に生成量が多く、No.168株接種試料で17%を占めた。3-メチル-1-ブタノールは、*S. xylosus*接種試料およびNo.161株接種試料で7~8%を占める一方、No.168株接種試料で検出されなかった。ケトン類では、2,3-ブタンジオンならびに3-ヒドロキシ-2-ブタノールの生成に差があり、いずれ

の成分も*S. carnosus*接種試料は相対的に生成量が少ない一方、*S. xylosus*接種試料は相対的に多く、3-ヒドロキシ-2-ブタノールは全体の40~60%程を占めた。酸類では、酢酸ならびに3-メチル酪酸の生成に差があり、*S. xylosus*接種試料は相対的に少ない一方、*S. carnosus*接種試料は相対的に多くを占め、酢酸は全体の20%程であった。エステル類では、酢酸エチルの生成に差があり、*S. xylosus*接種試料

は1%以下であった一方、*S. carnosus*接種試料は4%程度であった。炭水素類や含硫化合物類などの成分には明瞭な差はなかった。*S. xylosum*と*S. carnosus*が培地やソーセージ中で生成する揮発性成分は、菌種による特徴を示す。ケトン類では、2,3-ブタンジオンや2-ブタノン、3-ヒドロキシ-2-ブタノンの生成に差があり、いずれも*S. carnosus*より*S. xylosum*の方が多い。アルコール類では、2-および3-メチル-1-ブタノールの生成に差があり、前者は*S. carnosus*のみで見られる。後者は*S. carnosus*よりも*S. xylosum*の方が多い。また、2-および3-メチルブタナールや3-メチル酪酸の生成は、*S. carnosus*で多く見られる。このような差は本研究でも同様に観察されており、真空包装下で生成する揮発性成分はこれまでの報告^{3, 20)}と類似することが示唆された。

揮発性成分に大きな差の見られたNo.120株およびNo.168株接種試料の香りは、三点識別法において、パネル20人のうち12人が正しく識別でき ($p < 0.05$)、官能上も異なる香りであった。また、香りの特徴の自由記述では、No.120株接種試料は、「ヨーグルト様の香り、ジアセチルやアセトインの香り、強い発酵臭」、No.168株接種試料は、「酒や味噌様の香り、強い酸臭、腐敗臭」と表現された(データ省略)。生成に差があった揮発性成分のにおい記述子は、No.120株接種試料で多くを占めた2,3-ブタンジオンが「バター」や「カラメル様」、「クリーム様」、3-ヒドロキシ-2-ブタノンが「バター」や「クリーム様」、3-メチル-1-ブタノールが「チーズ」や「発酵」と示された。また、No.168株接種試料で多くを占めた酢酸エチルが「酸っぱい」や「カラメル様」、「刺激臭」、2-メチルブタナールが「モルト」や「焦げ臭(強い)」、「青草様」、3-メチルブタナールが「モルト」や「トースト臭」、「青草様」、「ハーブ様」、2-メチル-1-ブタノールが「モルト」や「オニオン(熟成)」、「ワイン」、酢酸が「刺激臭」や「酢」、3-メチル酪酸が「酸っぱい」や「腐敗臭」、「汗臭い」と示された。自由記述で得た「ヨーグルト様の香り、ジアセチルやアセトインの香り、強い発酵臭」は2,3-ブタンジオンや3-メチル-1-ブタノール、3-ヒドロキシ-2-ブタノンの特徴を表現していること、「酒や味噌様の香り、強い酸臭、腐敗臭」は酢酸エチルや2-メチルブタナール、3-メチルブタナール、酢酸、3-メチル酪酸の特徴を表現していることが示唆された。

真空包装して18.5°Cで4週間保存した試料の総遊離アミノ酸およびグルタミン酸は、ブドウ球菌非接種試料も含めてそれぞれ410~430mg/100g, 40mg/100gであった(データ省略)。加藤は、発酵ソーセージ中の遊離アミノ酸

の増加には微生物由来の酵素よりも肉由来の酵素の影響が大きいこと報告している²¹⁾。接種菌株による差がなかった本研究の結果もこのことに由来すると推察された。

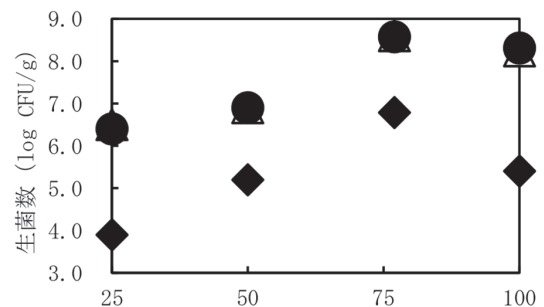
3. ブドウ球菌を接種した生ハムの風味成分

No.120株と*P. pentosaceus*を接種した試料は、全期間において酸生成菌が優占種であり、耐塩性菌は酸生成菌の1/100~1/1,000程度であった。No.168株と*P. pentosaceus*を接種した試料も、同様の傾向を示し、耐塩性菌は酸生成菌の1/10~1/100程度であった(図1)。

乳酸菌とブドウ球菌を接種したソーセージでは、製造工程中に乳酸菌が優占種となり、ブドウ球菌は乳酸菌の1/10~1/100程度で推移する^{22, 23)}。肉塊中での挙動もこれまでの報告されているソーセージ類と同様であった。

試作した生ハムの揮発性成分の総量における接種菌株や熟成温度の影響はほとんどなかった(表4)。両試料の揮発性成分の構成に注目すると、酢酸、吉草酸、酢酸

(A) *P. pentosaceus*, No.120株接種



(B) *P. pentosaceus*, No.168株接種

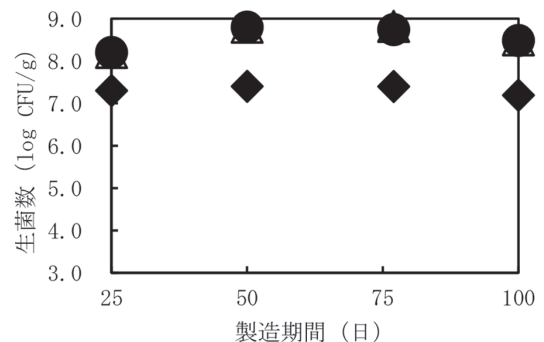


図1 *P. pentosaceus*とNo.120株 (A) もしくはNo.168株 (B) を接種した生ハムの製造期間における生菌数の推移

シンボルは一般生菌 (●), 酸生成菌 (△), 耐塩性菌 (◆) を示す。25日目までは5°Cで塩漬, 50日目までは18.5°C, 相対湿度83~60%で乾燥, 51日目以降は真空包装して10°Cで熟成した。

表4 *P. pentosaceus*とNo.120株もしくはNo.168株を接種して試作した生ハムの揮発性成分のピーク面積比と相対割合

検出成分	No.120			No.168		
	5°C	10°C	15°C	5°C	10°C	15°C
アルデヒド類						
アセトアルデヒド	0.082 (0.5)	0.057 (0.3)	0.071 (0.5)	0.118 (1.0)	0.143 (0.9)	0.118 (0.8)
2-メチル-ブタナール	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.012 (0.1)
3-メチル-ブタナール	0.014 (0.1)	0.030 (0.2)	0.059 (0.4)	0.070 (0.6)	0.092 (0.6)	0.104 (0.7)
プロパナール	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.006 (0.0)	0.013 (0.1)
ヘキサナール	0.036 (0.2)	0.161 (1.0)	0.217 (1.4)	0.224 (1.9)	0.798 (4.9)	1.367 (9.3)
アルコール類						
エタノール	6.003	8.171	7.898	9.713	9.786	8.551
2-メチル-1-プロパノール	0.066 (0.4)	0.077 (0.5)	0.077 (0.5)	0.123 (1.1)	0.161 (1.0)	0.072 (0.5)
1-メトキシ-2-プロパノール	0.012 (0.1)	0.019 (0.1)	0.011 (0.1)	0.031 (0.3)	0.020 (0.1)	0.020 (0.1)
1-ブタノール	0.023 (0.3)	0.032 (0.3)	0.031 (0.3)	0.050 (0.4)	0.049 (0.3)	0.057 (0.4)
3-メチル-1-ブタノール	0.424 (2.8)	0.717 (4.3)	0.544 (3.5)	0.744 (6.4)	0.872 (5.4)	0.701 (4.8)
1-プロパノール	0.012 (0.1)	0.019 (0.1)	0.033 (0.2)	0.076 (0.7)	0.075 (0.5)	0.141 (1.0)
1-ペンテン-3-オール	0.030 (0.2)	0.072 (0.4)	0.059 (0.4)	0.107 (0.9)	0.092 (0.6)	0.126 (0.9)
3-メチル-3-ブテン-1-オール	0.019 (0.1)	0.019 (0.1)	0.022 (0.1)	0.020 (0.2)	0.021 (0.1)	0.018 (0.1)
3-メチル-2-ブテン-1-オール	0.012 (0.1)	0.019 (0.1)	0.020 (0.1)	0.015 (0.1)	0.029 (0.2)	0.030 (0.2)
1-ペンタノール	0.076 (0.5)	0.183 (1.1)	0.123 (0.8)	0.306 (2.6)	0.293 (1.8)	0.415 (2.8)
3-ペンタノール	N.D.	0.009 (0.1)	0.009 (0.1)	N.D.	N.D.	N.D.
1-ヘキサノール	0.086 (0.6)	0.263 (1.6)	0.109 (0.7)	0.209 (1.8)	0.522 (3.2)	0.926 (6.3)
ケトン類						
2-プロパノン	0.281 (1.9)	0.468 (2.8)	0.431 (2.8)	0.189 (1.6)	0.146 (0.9)	0.208 (1.4)
2-ヘプタノン	0.013 (0.1)	0.040 (0.2)	0.039 (0.3)	0.029 (0.2)	0.058 (0.4)	0.100 (0.7)
2-ペンタノン	N.D.	N.D.	N.D.	0.138 (1.2)	0.166 (1.0)	0.227 (1.5)
2,3-ペンタジオン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.022 (0.2)
2,3-ブタンジオン	0.147 (1.0)	0.159 (1.0)	0.249 (1.6)	N.D.	N.D.	N.D.
3-ヒドロキシ-2-ブタンオン	2.864 (19.1)	2.824 (17.0)	2.692 (17.4)	0.880 (7.6)	1.077 (6.6)	0.755 (5.1)
酸類						
酢酸	6.019 (40.2)	5.507 (33.2)	5.943 (38.5)	3.999 (34.5)	5.996 (36.9)	4.739 (32.3)
プロピオン酸	0.017 (0.1)	0.014 (0.1)	0.017 (0.1)	0.017 (0.1)	0.040 (0.2)	0.028 (0.2)
2-メチルプロピオン酸	0.118 (0.8)	0.146 (0.9)	0.078 (0.5)	0.071 (0.6)	0.080 (0.5)	0.104 (0.7)
酪酸	0.153 (1.0)	0.076 (0.5)	0.124 (0.8)	0.054 (0.5)	0.071 (0.4)	0.057 (0.4)
吉草酸	0.544 (3.6)	0.916 (5.5)	0.493 (3.2)	0.428 (3.7)	0.707 (4.3)	0.686 (4.7)
カプロン酸	N.D.	0.051 (0.3)	0.031 (0.2)	0.041 (0.4)	0.029 (0.2)	0.070 (0.5)
エステル類						
酢酸エチル	2.563 (17.1)	2.732 (16.5)	2.745 (17.8)	2.077 (17.9)	2.634 (16.2)	2.030 (13.8)
プロピオン酸エチル	0.013 (0.1)	0.010 (0.1)	0.008 (0.1)	0.025 (0.2)	0.038 (0.2)	0.025 (0.2)
酪酸エチル	0.123 (0.8)	0.083 (0.5)	0.086 (0.6)	0.052 (0.4)	0.068 (0.4)	0.042 (0.3)
2-メチル酪酸エチル	0.234 (1.6)	0.400 (2.4)	0.146 (0.9)	0.296 (2.6)	0.417 (2.6)	0.211 (1.4)
3-メチル酪酸エチル	0.307 (2.0)	0.696 (4.2)	0.361 (2.3)	0.447 (3.9)	0.620 (3.8)	0.515 (3.5)
酢酸-3-メチルブチル	N.D.	0.010 (0.1)	0.007 (0.0)	N.D.	N.D.	N.D.
カプロン酸エチル	0.059 (0.4)	0.124 (0.7)	0.073 (0.5)	0.110 (1.0)	0.108 (0.7)	0.129 (0.9)
カプロン酸ビニル	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.023 (0.2)
2-ヒドロキシ-プロピオン酸エチル	0.125 (0.8)	0.055 (0.3)	0.104 (0.7)	0.219 (1.9)	0.270 (1.7)	0.181 (1.2)
炭化水素類						
2,2-ジメチルデカン	0.432 (2.9)	0.499 (3.0)	0.346 (2.2)	N.D.	N.D.	N.D.
2,5-ジメチルウンデカン	N.D.	N.D.	N.D.	0.377 (3.2)	0.465 (2.9)	0.336 (2.3)
2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン	0.054 (0.4)	0.064 (0.4)	0.041 (0.3)	0.045 (0.4)	0.056 (0.3)	0.036 (0.2)
含硫化合物						
二硫化炭素	0.004 (0.0)	0.021 (0.1)	0.022 (0.1)	N.D.	N.D.	N.D.
その他						
dl-リモネン	0.009 (0.1)	0.006 (0.0)	N.D.	N.D.	0.010 (0.1)	N.D.
2-ベンチルフラン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.014 (0.1)	0.023 (0.2)
未同定成分①	0.018 (0.1)	0.014 (0.1)	0.018 (0.1)	0.018 (0.2)	0.020 (0.1)	0.016 (0.1)
合計 (含エタノール)	20.993	24.763	23.338	21.319	26.048	23.243
合計 (抜エタノール)	14.989 (100)	16.592 (100)	15.440 (100)	11.606 (100)	16.262 (100)	14.692 (100)

ピーク面積比=検出成分のピーク面積/内部標準 (0.1mg/mlシクロヘキサノール) のピーク面積

相対割合=検出成分のピーク面積/(ピーク面積比の合計-エタノールのピーク面積比)×100

試料は、50日間の塩漬、乾燥後、真空包装して5~15°Cで50日間熟成させた生ハム

N.D.: Not Detected (検出限界未満)

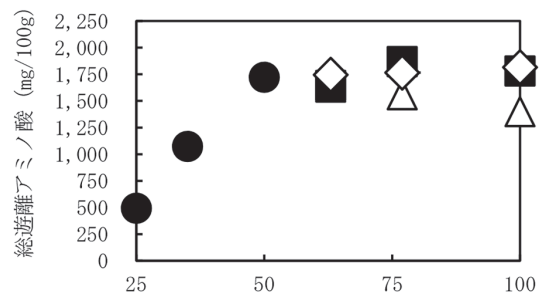
エチル、2-および3-メチル酪酸エチルは同程度の構成比を示し、それぞれ30~40%、3~5%、14~17%、1~3%、2~4%であった。一方、ヘキサナール、3-メチル-1-ブタノール、1-ペンタナール、1-ヘキサノール、2-プロパノン、2-ペンタノン、2,3-ブタンジオン、3-ヒドロキシ-2-ブタノン、2-ヒドロキシプロピオン酸エチル、2,2-ジメチルデカンおよび2,5-ジメチルウンデカンは異なる構成比を示した。すなわち、ヘキサナール、3-メチル-1-ブタノール、1-ペンタノール、1-ヘキサノール、2-ペンタノン、2-ヒドロキシプロピオン酸エチルおよび2,5-ジメチルウンデカンはNo.168株接種試料で比率が高く、No.120株接種試料では検出されない成分もあった。2-プロパノン、2,3-ブタンジオン、3-ヒドロキシ-2-ブタノンおよび2,2-ジメチルデカンはNo.120株接種試料で比率が高く、No.168株接種試料では検出されない成分もあった。また、挽肉モデル試料に接種した時の揮発性成分と比較すると、アルデヒド類やアルコール類、ケトン類の比率が低下した一方、エステル類や酸類の比率が増加した。特に、酢酸、酢酸エチルおよびメチル酪酸エチルの比率増加が顕著であった。

*P. pentosaceus*と*Staphylococcus*を接種して製造したソーセージの揮発性成分として報告された44成分¹²⁾のうち、半数程は本研究でも検出された。また、*P. pentosaceus*と*S. xylosum*もしくは*S. carnosus*を接種して3週間発酵させたソーセージの揮発性成分³⁾では、両試料に共通して比率の高い成分として、酢酸が45~50%、2,3-ブタンジオールが9~10%、酢酸エチルが3~4%を占めた。一方、2,3-ブタンジオンや3-ヒドロキシ-2-ブタノンは、*S. carnosus*接種試料より*S. xylosum*接種試料で比率が高く、3-メチルブタナールや2-および3-メチル-1-ブタノール、3-メチル酪酸は*S. xylosum*接種試料より*S. carnosus*接種試料で比率が高かった。本研究と比較すると、2,3-ブタンジオールや2-メチル-1-ブタノールの生成が見られなかったことや、3-メチルブタナールの比率が低かったこと、2-および3-メチル酪酸エチルの比率が高かったことは異なるが、2,3-ブタンジオンや3-ヒドロキシ-2-ブタノンの生成挙動は同様であった。また、海外産生ハムの揮発性成分と比較すると、パルマハムでは酢酸や、酢酸エチル、2-および3-メチル酪酸エチル、2,3-ブタンジオン、3-ヒドロキシ-2-ブタノンなども検出されるが、熟成工程ではアルデヒド類やエステル類の増加が顕著である^{24, 25)}。また、ハモンイベリコでは酢酸も検出されるが、酢酸エチル、2-および3-メチル酪酸エチル、2,3-ブタンジオン、3-ヒドロキシ-2-ブタノンは検出されず、熟成工程では、2-およ

び3-メチルブタナールや2-および3-メチル-1-ブタノールといったアルデヒド類、アルコール類の増加が顕著である²⁶⁾。このようなことから、ブドウ球菌を生ハムのスターターカルチャーとして用いた場合、生成される揮発性成分は、ブドウ球菌をスターターカルチャーに用いたソーセージの揮発性成分と概ね一致し、代表的な海外産生ハムとは異なる風味であることが推察された。

総遊離アミノ酸は、塩漬後(製造25日後)の400~500 mg/100 gから乾燥を経て1,700~1,800 mg/100 gまで増加した。その後の熟成では、保管温度に関わらず一定もしくは減少傾向を示した(図2)。グルタミン酸についても同様の傾向を示し、乾燥工程を経て5~8倍程度に増加したが、その後は一定もしくは減少傾向を示した。

(A) *P. pentosaceus*, No.120株接種



(B) *P. pentosaceus*, No.168株接種

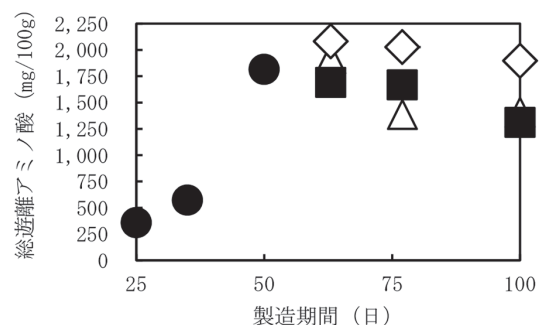


図2 *P. pentosaceus*とNo.120株 (A) もしくはNo.168株 (B) を接種した生ハムの製造期間における総遊離アミノ酸の推移

シンボルは、5°C、25日間の塩漬工程後の18.5°C、相対湿度83~60%での乾燥工程(●)、真空包装して5°C(△)、10°C(◆)、15°C(□)での熟成工程を示す。

要 約

本研究では、ブドウ球菌を接種した食肉製品の風味特性を明らかにした。

食肉製品製造環境から分離したブドウ球菌は、いずれも食肉製品のスターターカルチャーとしての基礎的要件を満たしていた。このうち、*S. xylosum*と推定されるNo.119株およびNo.120株、*S. carnosus*と推定されるNo.161株およびNo.168株は、真空包装したモデル試料でも良好に発育した。モデル試料の揮発性成分は、接種菌種によって異なり、No.119株およびNo.120株を接種した試料は、ケトン類が多くを占めた。No.161株およびNo.168株を接種した試料は、アルデヒド類やアルコール類、酸類が多くを占め、ケトン類はほとんど検出されなかった。この違いは、官能評価でも識別できた。No.120株およびNo.168株を肉塊内部に接種して試作した生ハムの揮発性成分は、両菌株の特性を反映した。すなわち、No.120株を接種した試作品は、No.168株を接種した試作品と比べてケトン類の生成が2倍程度であった。

これらの結果から、接種するブドウ球菌の選択によって生ハムの風味を調整できることが示唆された。

本研究を行うにあたり、ブドウ球菌を接種した生ハムの試作では札幌バルナバフーズ株式会社の松波真哉氏、田中達大氏、若林千春氏の御協力を賜った。ここに深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- Rodriguez, M., Nunez, F., Cordoba, J. J., Bermudez, M. E. and Asensio, M. A. (1998). Evaluation of Proteolytic Activity of Micro-Organisms Isolated From Dry Cured Ham, *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 905-912.
- Olmo, A. D., Calzada, J., Gaya, P. and Nunez, M. (2015). Proteolysis and Flavor Characteristics of Serrano Ham Processes under Different Ripening Temperature Condition, *J. Food Sci.*, **80**, C2404-C2412.
- Olesen, P. T., Meyer, A. S. and Stahnke, L. H. (2004). Generation of Flavor Compounds in Fermented Sausages-the Influence of Curing Ingredients, *Staphylococcus* Starter Culture and Ripening Time. *Meat Sci.*, **66**, 675-687.
- 伊藤肇躬 (2007). 食肉製品製造学, 光琳.
- Essid, I., Ismail, H., B., Ahmed, S. B. H., Ghedamsi, R. and Hassouna, M. (2007). Characterization and Technological Properties of *Staphylococcus xylosum* Strains Isolated From a Tunisian Traditional Salted Meat, *Meat Sci.*, **77**, 204-212.
- 芳賀聖一, 加藤丈雄, 小塚和弘 (1994). 低温性乳酸菌を利用した発酵ハムの品質に及ぼす塩漬発酵時間の影響. 日本食品工業学会誌, **41**, 797-802.
- 井上貞仁, 川上 誠, 河野慎一 (2007). 道産有用微生物を利用した新規食肉製品の開発, 北海道立食品加工研究センター平成18年度事業報告, 2-3.
- 地方独立行政法人北海道立総合研究機構 (2015). 乳酸菌発酵 北海道生ハムのレシピ, <http://www.hro.or.jp/dosorecipe/recipe/hokkaidonamahamu/index.html>, 参照 2018-8-15.
- 山中洋之, 金井 聡, 鮫島 隆, 有原圭三, 伊藤良 (2003). *Staphylococcus xylosum*を用いて調製した発酵豚肉エキスの注入によるロースハムの風味向上. 日本食品科学工学会誌, **50**, 272-277.
- Olesen, P. T and Stahnke, L. H. (2004). The Influence of Environmental Parameters on the Catabolism of Branched-Chain Amino Acids by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus*, *Food Microbiol.*, **21**, 43-50.
- Olesen, P. T and Stahnke, L. H. (2003). The Influence of Precultivation Parameters on the Catabolism of Branched-Chain Amino Acids by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus*, *Food Microbiol.*, **20**, 621-629.
- Sondergaard, A. K. and Stahnke, L. H. (2002). Growth and Aroma Production by *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus* and *S. equorum*-a Comparative Study in Model Systems, *Int. J. Food Microbiol.*, **75**, 99-109.
- 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸 (1998). 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ解析への応用, 日本食品科学工学会誌, **45**, 58-65.
- 田中 彰, 八十川大輔 (2017). ホエイを活用した水産糖漬けの呈味成分と香氣成分, 北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告, **12**, 37-41.
- Esther, M., Jasmin, B., Christophe, L. and Leo, M. (2012). Identification of Staphylococci and Dominant Lactic Acid Bacteria in Spontaneously Fermented Swiss Meat Products Using PRC-RFLP, *Food Microbiol.*, **29**, 157-166.

- 16) Sabine, L., Philippe, G., Paul, C. J., Isabelle, L. and Regine, T. (2010). Biodiversity of Indigenous Staphylococci of Naturally Fermented Dry Sausages and Manufacturing Environments of Small-Scale Processing Units, *Food Microbiol.*, **27**, 294-301.
- 17) Corbiere, M. B. S., Leroy, S. and Talon, R. (2007). Monitoring of Staphylococcal Starters in Two French Processing Plants Manufacturing Dry Fermented Sausages, *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 238-244.
- 18) Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi A., Tofalo, R. and Parente, E. (2004). Diversity and Dynamics of Communities of Coagulase-Negative Staphylococci in Traditional Fermented Sausages, *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 271-284.
- 19) 加藤丈雄, 土井梅幸, 米山由紀子, 杉本勝之, 中村良 (1994). 低温性乳酸菌の分離と発酵肉製品への利用. 日本食品工業学会誌, **41**, 108-115.
- 20) Sondergaard, A. K. and Stahnke, L. H. (2002). Growth and Aroma Production by *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus* and *S. equorum*-a Comparative Study in Model Systems, *Int. J. Food Microbiol.*, **75**, 99-109.
- 21) 加藤丈雄 (1991). 乳酸菌を利用した発酵ソーセージに関する基礎的研究, 日本食品工業学会誌, **38**, 1063-1069.
- 22) Fonseca, S., Cachaldora, A., Gomez, M., Franco, I. and Carballo, J. (2013). Effect of Different Autochthonous Starter Cultures on the Volatile Compounds Profile and Sensory Properties of Galician chorizo, a Traditional Spanish Dry Fermented Sausage, *Food Cont.*, **33**, 6-14.
- 23) 三上正幸, 川島寿子, 関川三男 (1998). 細菌性スターターカルチャーを添加した非加熱発酵ソーセージの微生物学および理化学的性状について, 日本畜産学会報, **69**, 53-61.
- 24) Pinna, A., Simoncini, N., Toscani, T. and Virgili, R. (2012). Volatile Organic Compounds of Parma Dry-Cured Ham as Markers of Ageing Time and Aged Ham Aroma, *Italian Journal of Food Science*, **24**, 321-331.
- 25) Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M. and Mangia, A. (1992). Flavor Compounds of Dry-Cured Ham, *J. of Agric. Food Chem.*, **40**, 2389-2394.
- 26) Jurado, A., Carrapiso, A. I., Ventanas, J. and Garcia, C. (2009). Changes in SPME-Extracted Volatile Compounds from Iberian Ham During Ripening, *Grasas y Aceites*, **60**, 262-270.