

## 生ハムの呈味に影響を与える菌叢の変化

## Change of Bacteria Flora to Affect the Taste of Dry Crude Ham

砂原 千寿子 多田 芽生

Chizuko SUNAHARA Megumi TADA

田淵 賢治<sup>1</sup> 川口 政司<sup>1</sup> 白川 武志<sup>2</sup>

Kenji TABUCHI Seiji KAWAGUCHI Takeshi SHIRAKAWA

## 要 旨

香川県試験研究機関共同研究で「讃岐黒豚を利用した特徴ある非加熱食肉製品の開発」について研究を実施し、分担研究課題として生ハムの呈味に影響を与える菌叢の変化について調査した。非加熱で摂取する食品は様々な危険性を含んでいるが、試作品は全て非加熱食肉製品の規格基準に適合しており、また汚染の可能性のある病原細菌(腸管出血性大腸菌, リステリア, ボツリヌス菌, ウエルシュ菌, エルシニア・エンテロコリチカ等)も検出されず安全性が確認された。検出された細菌は *Staphylococcus* 属が多く、生肉の表皮に常在する潜在的な腐敗菌であるが、高い蛋白分解活性を持つ *S. xylosus* は良質な発酵食肉製品を作るスターターとして報告されており、これらの微生物が風味に影響を与えている可能性が示唆された。また、菌叢は生ハムの塩分により差がみられた。低塩分の場合、菌叢が生ハムの呈味の向上を図ると同時に、病原細菌の汚染の危険性も示唆された。

キーワード：非加熱食肉製品, *S. xylosus*, *P. chrysogenum* 群

## I はじめに

県産特産畜産物である讃岐黒豚を利用し、需要拡大を図るために高品質の生ハムを開発することを目的として、産業技術センター食品研究所及び畜産試験場で試作した生ハムの呈味に影響を与える菌叢の変化の調査と、製品の安全性を確保するために規格基準検査、厚生労働省により提示されている食肉製品で微生物学的に制御すべき危害原因物質(黄色ブドウ球菌, カンピロバクター ジェジュニ/コリー, クロストリジウム属, サルモネラ属菌等)について、14, 15, 16年度を通して検査を実施し解析したのでその結果を報告する。

## II 方法

14年度7試作品(部位ごとに分けて17)と他県での試作対照生ハム1検体(同2), 15年度2試作品(同12), 環

境調査17箇所, 16年度2試作品(同8)について熟成した生ハムの菌叢の探索を行うと共に、製造工程での危害の要因把握と汚染防止を検討した。また製品の規格検査、安全性確認のための検査(腸管出血性大腸菌, カンピロバクター属, リステリア, エルシニア, ウエルシュ菌, ボツリヌス菌, 大腸菌群, 一般細菌数, 低温細菌数, 乳酸菌数, 酵母, 真菌)も実施した。

非加熱食肉製品の規格基準(*E. coli* が検体1gにつき100以下でなければならない。黄色ブドウ球菌が、検体1gにつき、1,000以下でなければならない。サルモネラ属菌陰性でなければならない。), 腸管出血性大腸菌の検査は食品衛生法に則っておこなった。リステリア, ボツリヌス菌, ウエルシュ菌, エルシニア等の病原細菌については食品衛生検査指針に則っておこなった。

乳酸菌はMRS培地, BL寒天培地, BCP培地で36°C培養, 低温細菌はCTV培地, 標準寒天培地, 血液寒天培地を使用し, 25°Cで培養した。また, 優勢菌種をみるために,

1 畜産試験場 2 産業技術センター食品研究所

MRS 培地, 標準寒天培地, 血液寒天培地, BL 寒天培地を用い, 4 区画した各平板培地に試料液を 10 倍段階希釈で 4 段階希釈し, 各々 50  $\mu$ l 塗抹し好気と嫌気で 36°C で培養した。36°C と 25°C 培養の血液寒天培地に発育した集落の形状を比較すると, 菌数に違いはみられたがほぼ同様の集落を形成していたので, 36°C 培養の高希釈で優位に発育している集落を同定し優勢菌種とした。また培地上で異なる形状を示す集落をそれぞれ釣菌し同定した。

酵母はクロラムフェニコールを添加したポテトデキストロース寒天培地, 真菌はサブロー寒天培地を用いた。

ハム表面部の検査については 14 年度は拭き取り法によって行った。15 年度からは他部位との比較のため表面部分を薄く削り取って検体とした。

### III 結果及び考察

検査した全ての試作品は食品衛生法による非加熱食肉製品の規格基準に適合していた。また, 腸管出血性大腸菌, リステリア, ボツリヌス菌, ウエルシュ菌等の病原細菌も検出されなかった。

低温細菌の多くは *Pseudomonas* 属等のグラム陰性菌で, 食肉を冷蔵保存する場合の微生物汚染の目安とされているが, 生ハムは塩漬の工程があり, 高い塩分濃度のためグラム陰性菌の発育は抑制されたと考えられる。

初年度食品研究所で試作した, 検体 No14S1 スペイン・イタリアタイプ(長期タイプ)と検体 No14S2 ドイツタイプ(短期タイプ)の検査結果は, 短期タイプのものが検出された細菌数も  $10^7$  オーダーと多く, 数種の *Staphylococcus* 属を主体とする汚染が見られた。長期タイプも *Staphylococcus* 属による汚染は見られたが菌数は少なかった。この試作品の塩分は 9%以上, 水分活性は 0.8 以下(食品研究所データ)のため発育できる細菌が限られており, 耐塩性の強い *Staphylococcus* 属が検出された。短期タイプは肉ブロックの大きさが小さいため, 浸漬液や水洗作業等の製造工程で汚染を受けやすかったと考えられた。また, この製造条件で発育できる酵母が温度, 湿度管理が不適切であったため長期, 短期両タイプから多く検出された。

一般細菌数, 酵母数について図 1, 2, 3 に示す。

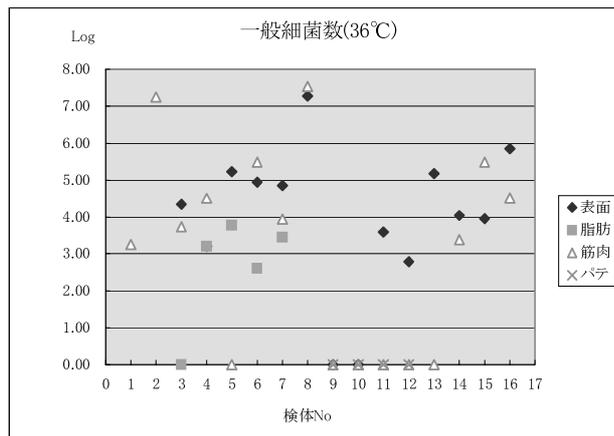


図 1

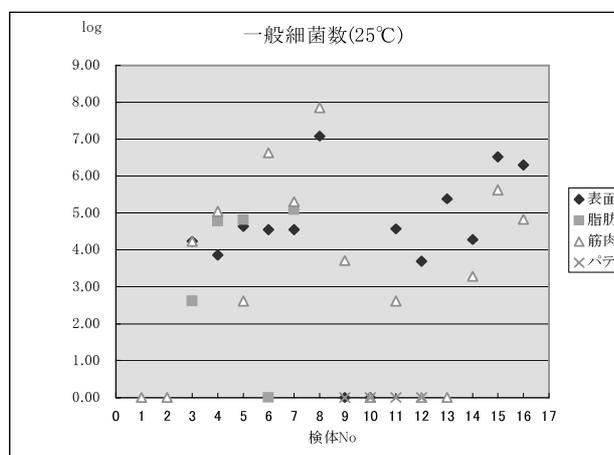


図 2

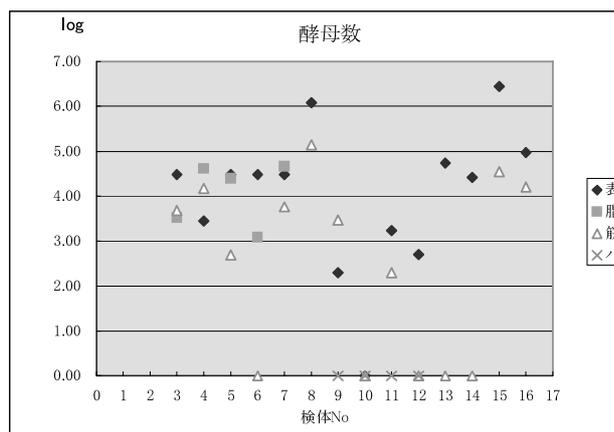


図 3

図のNoは下記の検体に相対する。

No	検体	S:食品試験場試作品 T:畜産試験場試作品
1	14S1	最初の数字は検査年度
2	14S2	
3	14T57	
4	14T58	
5	14T59	
6	14T1	
7	14T2	
8	14T0	
9	15S 足先	
10	15S 腿	
11	15T66 足先	
12	15T66 腿	
13	16T178 足先	
14	16T178 腿	
15	16T62 足先	
16	16T62 腿	

畜産試験場の試作品については試作品5検体と他県で試作された1検体(検体No14T57, 14T58, 14T59, 14T1,

14T2, 14T0)について、表面、脂肪部分、筋肉部分で菌叢の違いをみた。一般細菌数は表面部分で25℃より36℃の方が菌数が多く、脂肪と筋肉部分は25℃培養で多く検出された。検出された菌はグラム陽性菌を主体とし、ほとんどが *Micrococcus* 属, *Staphylococcus* 属だった。いずれも生肉の表皮に常在する潜在的な変敗菌で、耐塩性が強いので塩漬工程でも死滅せず検出されたと考えられる。*Staphylococcus* 属は多くが *S. xylosus* で一部 *S. lantus* が検出された。試作品の塩分は10%を越えており、発育できる細菌は限られてくる。ハム表面部分が最も汚染されていると考えていたが、25℃での一般細菌数は、筋肉部分の方が多くみられた。それも菌数にかなり差が認められた。風味に影響を与えられ乳酸菌は検出されなかった。表面部分では酵母が多く検出され、*Candida famata* が主体で、他に *C. parapsilosis* *C. krusei* が検出された。筋肉、脂肪部分でも酵母 (*Candida famata*, *C. parapsilosis* *C. krusei* *C. zeylanoides* *C. guilliermondii*) が検出された。

真菌(糸状菌)は表面部分と一部筋肉から検出された。

*Penicillium* 属が多く、他県での対照品からは *Aspergillus* 属も分離された。検出された *Penicillium* 属は様々で、表面部分からは主に *P. oxalicum* 群, *P. janthimellum* 群, 筋肉部分からは *P. chrysogenum* 群が検出された。

M. Rodriguez らは、dry-cured Iberian ham から48のグラム陽性、カタラーゼ陽性球菌、18の真菌、20の酵母を分離したが、グラム陽性球菌の多くは *S. xylosus* で、真菌は *P. chrysogenum* 群を含む *Penicillium* 属、酵母は *Debaryomyces hansenii*, *C. zeylanoides* 等だったと報告している。<sup>1)</sup> 畜産試験場試作品はほぼ同様の検出結果となった。*P. chrysogenum* 群と *S. xylosus* は高い蛋白分解活性をもち、良質な発酵食肉製品を作るスターターとなると報告されている。<sup>1)</sup> これらの菌が、試作品や環境から分離されたことは、汚染だけでなく、風味とか他の微生物制御にも関与している可能性が示唆されたが、畜産試験場が実施した遊離アミノ酸等の分析結果からはスターターとしての効果は窺えなかった。

ただ、カビについては風味を良くするカビもあるが、カビ毒を産生したり、異臭を与えたりする種類もあり、カビについては管理が難しく、湿度・温度管理が課題となる。

他県で試作された検体 No14T0 は切り取られたブロック小片で保管状況も異なるため比較しにくい、細菌数が  $10^7$  オーダー、酵母数も  $10^5 \sim 10^6$  オーダーと多く検出された。優位菌種は *S. xylosus* で畜産試験場試作品と同様の傾向だった。風味の点ではかなり検体 No14T0 が香り高かった。*S. xylosus* の様に蛋白分解に関与する菌種が多く発育すると風味に良い影響を与えることが窺えたが、検体 No14T1 は筋肉部分ではかなり多く *S. xylosus* が検出されているが、風味には関与があまりみられなかった。細菌によるプロテアーゼ、脂肪分解に関与するリパーゼの作用、蛋白質の化学的な分解等他にも様々な関与によると考えられた。

15年度は足先部分と腿部分に分けて調査した。各々パテ、肉表面、筋肉部分で菌叢をみたが、食品研究所の試作品(検体 No15S)は、足先部分で25℃培養で細菌と酵母が少数検出された他はほとんど細菌、真菌、酵母の発育がみられなかった。非加熱食肉製品の規格基準に適合しており、汚染の可能性のある病原細菌も検出されなかった。製造場所の環境調査では、塩漬け用槽、ハム保管棚、棚

カバー内側について実施したが、病原性細菌、真菌は検出されず、また、汚染の指標となる一般細菌数も 36、25°C 培養いずれも <3 個/cm<sup>2</sup> で衛生面では適切な安全管理の元に製造されていた。

畜産試験場の試作品(検体 No15T66)も、規格基準に適合しており、汚染の可能性のある病原細菌も検出されなかった。パテ部分ではほとんど細菌の発育はみられなかった。筋肉部分でも細菌の発育は少なく、表面部分是一般細菌 36°C 培養で 10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup> オーダー、25°C 培養で 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> オーダーの発育がみられた。腿部よりは足先部の方が汚染が高かった。14 年度に検査した結果より細菌数、酵母数ともに低い傾向にある。酵母は乾燥不十分または低濃度の塩蔵で保冷された食肉の変敗フローラの重要な部分を占めるといわれている。食肉の呈味にプラスの働きをする酵母もあるがマイナスの要素が大きい。15 年度は特に酵母数が減少しており、熟成期間中の湿度、温度管理が良くなった結果と推測された。

表面(足先部、腿部)、筋肉足先部からは *Aspergillus glaucus* 群、*Wallemia sebi*、*P. chrysogenum* 群等の真菌が検出された。*Aspergillus glaucus* 群、*Wallemia sebi* は好稠性の高い真菌で、高い塩分濃度や糖度の環境でも発育できる。分離された細菌は 14 年度と同様ほとんどが *Staphylococcus* 属で、主体はやはり *S. xylosus* で一部 *S. capitis* subsp. *ureolyticus* が分離された。

製造場所の環境調査は、保冷库の取手を始め内部各所と作業台、流し台、作業シート等 14 箇所について拭き取り検査を実施した。病原細菌は検出されずまた、細菌数も保冷库取手、保冷库床面、保冷库内側 1 箇所、流し台を除いてはいずれも <3 個/cm<sup>2</sup> で、検出された箇所でも最大で 35°C 培養で 32 個/cm<sup>2</sup>、25°C 培養で 81 個/cm<sup>2</sup> と汚染は少なかった。分離された細菌は、*S. xylosus*、*S. hominis*、*Bacillus* spp. だった。真菌は *Cladosporium* spp.、*Aspergillus glaucus* 群が保冷库取手、保冷库床面で検出された。*Cladosporium* spp. は環境から良く分離される黒色真菌の一つである。*Aspergillus glaucus* 群は試作品からも分離されており、*S. xylosus* と共に環境汚染と試作品に関連がみられた。

16 年度は畜産試験場の試作品 2 検体(検体 No16T178、16T62)について昨年と同様足先部分と腿部分に分けて調査した。パテ部分は細菌による汚染はほとんどないと考えられたので、表面と筋肉部分について検査

した。これらの試作品は塩分が 3.87%、4.65%とこれまでの試作品と比べるとかなり低かった。いずれも規格基準に適合しており、汚染の可能性のある病原細菌も検出されなかった。

検体 No16T178 は表面部分の菌数、酵母数が筋肉部分より多くまた、25°C 培養で菌数が多く検出された。優位に分離されたのは *S. xylosus*、*Aerococcus viridans* 他に *S. wernerii* も分離された。検体 No16T62 は、細菌数が 36°C 培養で 10<sup>3</sup>~10<sup>5</sup> オーダー、25°C で 10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup> オーダーどの部位でも多く検出された。25°C での菌数は酵母数も計上されたため、酵母数が多かったことに影響されている。優勢菌種は表面足先部を除いて *Aerococcus viridans* ついで *S. xylosus*、*Staphylococcus* 属は他にも *S. epidermidis*、*S. hycus*、*S. wernerii* と数種検出された。また、ヒトや動物の腸管内に常在する一群の球菌で、土壌や水などの環境における分布が大腸菌に比べて少なく、外界での増殖率も低いことから糞便汚染の指標菌として注目されている腸球菌の *Enterococcus faecium* が検出された。このような菌が分離されるということは、腸管由来の病原細菌の汚染も可能性があるということで、塩分を抑えた製品は製造過程での安全性確保がより必要となる。

しかし検出された *Staphylococcus xylosus*、*Enterococcus faecium* は汚染菌でもあるが、一方で前者は良質の発酵食品を作るためのスターターとしての作用、後者はバクテリオシンを産生し、食肉を汚染する可能性があるリステリア、ウエルシュ菌、ボツリヌス菌等の細菌の発育を抑える働きもする。<sup>2)</sup>

16 年度の試作品は原材料がこれまでの黒豚と異なり、白豚となったため違いが出た可能性もあるが、塩分がこれまでより低く、水分量も多かったため発育を抑えられていた汚染菌が発育しやすい環境となったと考えられる。*Aerococcus* 属、*Enterococcus* 属はいずれも 6.5%の食塩濃度では発育できる。10%近くあった塩分が 4%前後になった今回、菌叢に違いがみられた。どちらかといえば汚染菌と考えられる菌種が増加しており、食品の安全性を考えれば、塩分が低濃度での熟成は製造過程を通してより一層の安全管理が必要となる。

食肉製品の製造基準で非加熱食肉製品は原料食肉の扱い、塩漬け(5°C以下)、燻煙・乾燥、(20°C以下または 50°C以上)保存温度(10°C以下水分活性 0.95 以上は 4°C以

下) 等厳しい製造基準が設定されている。この条件下では、風味に影響を与える細菌の発育も抑えられると考えられ、熟成期間中に微生物叢の働きで風味に影響を与えることは少ない結果となった。

検査した試作品は全て非加熱食肉製品の規格基準に適合しており、また病原細菌も検出されず、適切な管理のもとで製造されていることが確認された。

#### IV まとめ

試作品12検体(部位で39箇所)、環境調査17箇所を検査した結果、食品研究所及び畜産試験場双方の試作品から *Staphylococcus* 属の菌が検出された。これらの菌は、*Micrococcus* 属の菌と共に食肉製品のマイクロフローラだが、菌数が多くなると食品の劣化にも繋がる。

15年度には、これらの菌の汚染が生肉の段階で付着した菌の持ち越しか、加工過程での汚染なのか製造場所の環境調査を実施した。製造環境からは、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌等の病原細菌や汚染の指標となる大腸菌、大腸菌群は検出されなかった。一般細菌における汚染も少なかった。試作品から検出された *Staphylococcus xyloso* が保冷库や作業台等複数の製造環境から検出された。

16年度は試作品の塩分濃度がこれまでよりかなり低かったため、菌叢に変化がみられた。一部の製品から腸球菌の *Enterococcus faecium* が検出された。

いずれの試作品も、25℃の温度でも発育旺盛なグラム陽性球菌を主体とした菌叢で、その他に酵母、真菌がみられた。また、食品研究所及び畜産試験場の試作品の菌叢に差が見られた。塩漬方法、熟成場所等で菌叢に変化が見られることが確認された。畜産試験場試作品から検出された、*P. chrysogenum* 群と *S. xyloso* は高い蛋白分解活性をもち、良質な発酵食肉製品を作るスターターとなると報告されている。これらの微生物が、風味に影響を与えている可能性が示唆された。

食品の安全性が問われている昨今、リスクアナリシスが問題となる。非加熱で摂取する食品は、安全性の面では様々な危険性を含んでいるが、製造の塩漬工程でほとんどの腸管由来の病原細菌は発育を抑えることができる。塩漬後残る可能性がある菌としては低温、高濃度の食塩下でも増殖可能なリステリア、*Staphylococcus aureus*

が考えられるがどの試作品も検出されなかった。

検査をした全ての試作品が非加熱食肉製品の規格基準に適合しており、また汚染の可能性のある病原細菌(腸管出血性大腸菌、リステリア、ボツリヌス菌、ウエルシユ菌、エルシニア等)も検出されず安全性が確認された。

製品の塩分濃度の違いにより、菌叢の違いがみられたことから、常に安定した製品を製造するために湿度、温度の管理や特に塩漬条件等に注意を払う必要がある。

今後の課題としては、安全性の高い製品ができていることは3年間で確認されたが、より一層の製品の安全性を図るためと、風味に影響を与える意味で、近年注目されている微生物制御法の一つである、バイオプリザベーションを取り入れて、乳酸菌スターター等の利用も考えられる。

#### V 文献

- 1) Rodriguez, F. Núñez, J. J. Córdoba, M. E. Bermúdez and M. A. Asensio: Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham, Journal of Applied Microbiology, Volume 85, 905-912, (1998)
- 2) 細野明義, 沖谷明紘, 吉川正明, 八田一: 畜産食品の辞典, 426-430 437-439 467, 朝倉書店(東京都), (2002)