

ソーセージ保存中におけるAF-2の変化 および製品の VBN, TBA value, Microflora におよぼす影響

世良 尚・大橋登美男*
(広島大学水畜産学部食品工業化学科)

Changes of the AF-2 During the Storage of Sausage
and Influence of the Residues of Drug on the VBN, TBA Value
and Microflora in the Product

Hisashi SERA and Tomio OHASHI*

*Department of Food Chemistry and Technology, Faculty of Fisheries
and Animal Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama*

(Figs. 1-5; Tables 1-3)

2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2 と略称) は、西海枝によって合成¹⁾され 1966年以降わが国における肉製品などに法的使用が認められたニトロフラン系に属する合成殺菌料である。

AF-2の食品防腐剤としての研究は畜肉製品についての研究に関する限りきわめて少なく、今まで多くは魚肉製品についての研究であって、その研究報告によると研究者によって防腐効果のあらわれ方がかなりまちまちとなっている。このようにAF-2の防腐効果のあらわれ方に差を生ずるのは、原料肉の細菌学的、化学的および酵素学的性状、他の添加物、加工処理方法や保存条件など、その他多くの要因により複雑な影響をうけるためと思考されるが不明な点が多い。

防腐剤の作用効果を検討する場合、従来は肉加工および保存中における防腐剤そのものの変化について追及することはほとんど行なわれていなかったが、最近この点についての研究が進められるようになった。

AF-2の魚肉製品に対する防腐効果としては鮮魚の鮮度保持^{2),3)}、魚肉ソーセージの防腐³⁾、魚肉ソーセージの斑点状変敗⁴⁾などに有効なことが報告されているが、防腐効果のないものやAF-2を添加し細菌数が増加したものなどがある。

さきに、AF-2ならびに他の食品添加物のできるだけ合理的で有効な使用法を確立する目的で畜肉加工中に遭遇する各種条件について、水溶液系を用いた model system による基礎実験によりAF-2の失活現象に関与する各因子を明らかにし、ソーセージなどの肉加工では塩せき、調味、練出しの工程を終った充填直前にAF-2を添加することが最も有効であることを報告した⁵⁾。引続いて鶏、兎、豚、綿羊、牛および馬など

* 宮崎大学農学部畜産学科 (Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki)

6種類の肉を用いて実験した結果、AF-2を食肉に添加直後においてかなり失活すること、この失活の割合は肉の種類、筋肉の部位によって差異があること、ならびにこれらの肉を用いてソーセージ加工中におけるAF-2の挙動について報告した⁶⁾。

また、肉製品製造における合成殺菌料および合成保存料の作用機作について一部解説した^{7),8)}。

今回ソーセージ保存中におけるAF-2の挙動ならびにその作用効果について二、三の実験を行なった結果について報告する。

実験材料と実験方法

1. 実験材料

(1) AF-2

上野製薬株式会社から提供をうけた。

(2) 供試肉

ソーセージの原料肉はランドレース種去勢豚6カ月令のもので、と殺後一夜冷蔵した枝肉から最後肋骨直上部を中心とした外ロース1kgを供試した。

(3) 食品添加物

ソーセージ製造に用いた添加物は既報⁶⁾のものと同ーで調味料、発色剤、結着剤および香辛料などである。

2. 実験方法

(1) 供試ソーセージの製造法

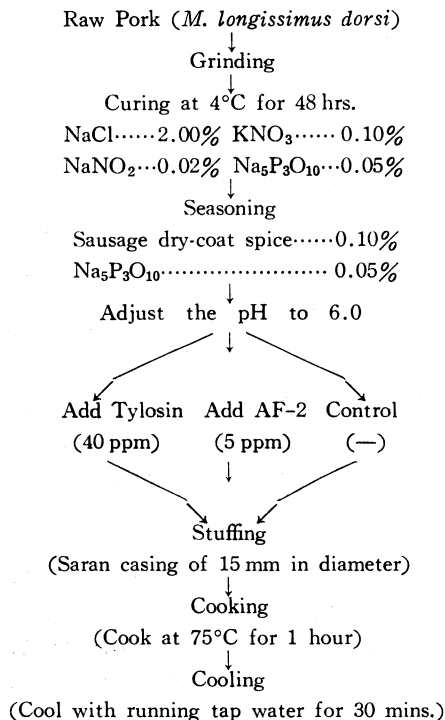


Fig. 1. Preparation of cooked sausage.

実験に供試したソーセージの製造は前報⁶⁾に準じたが、その調製法の概要を Fig. 1 に示す。

原料肉は表面に付着している脂肪、結合組織などをできるだけいねいに除去し、市販ウイナソーセージの製法に準じ調製した。この場合、ソーセージ保存中におけるAF-2の変化を調査する実験においてはAF-2の挙動をわかりやすくするためAF-2を50 ppm添加したが、その作用効果を調査する実験においては Fig. 1 に示した法定使用量を添加した。また、参考までに Tylosin を添加した試験区を設け AF-2 と作用効果を比較した。この Tylosin は英国エランコ社製のものを用い、その添加量は AMANO ら (1968)⁹⁾ が魚肉ソーセージについて行なった実験結果を参考にして決定した。

(2) AF-2測定用検体試料の調製法

ソーセージ中のAF-2の抽出法は松田ら (1965)¹⁰⁾ 小島ら (1965)¹¹⁾ が魚肉ソーセージについて行なった方法を検討し、つぎのように改変し実施した。すなわち、ソーセージ10gを採取し veronal buffer (pH 6.0, DMF 2.5%含有) 40 ml を添加し殺菌乳鉢中で5分間よく磨砕混合したものをそのまま検体試料とした。これらの実験は直射日光、光線の照射などに特に注意し無菌室内に

おいて行ない、試料調製後すみやかに褐色びんに入れ実験に供した。

(3) AF-2の測定法

AF-2の測定法には、紫外吸光度測定法¹²⁾、ポーラログラフィ法¹³⁾、ガスクロマトグラフィ法¹⁴⁾その他の chemical assay と抗生物質の微生物学的測定法に準じた bioassay¹⁰⁾などがある。しかし、AF-2には幾何異性体が存在し、その極大吸収波長は *trans* 型 388 m μ 、*cis* 型 401 m μ と近接しその吸光度は前者 0.588、後者 1.035 と約 2 倍の差があることが知られている。青山ら (1967)¹⁴⁾ は魚肉製品から AF-2 を抽出する場合、容易に異性化するので分析には十分注意することを指摘し、松田ら (1963)¹⁵⁾、岩原ら (1966)¹⁶⁾ は AF-2 は日光照射や加熱により当初の試料で認められた 395 m μ の極大吸収波長が 420 m μ に移動し吸光度が増大するので特異吸収を利用する測定法は危険で bioassay その他の定量法がより安全であることを報告している。

肉製品に防腐剤を添加する目的は抗菌作用を利用することが主目的であるので、本実験においては前報⁶⁾と同様、著者が考案した *B. subtilis* 孢子懸濁液を利用する bioassay によった。

(4) 揮発性塩基窒素 (VBN; Volatile Basic Nitrogen)

ソーセージ 10 g を採取し蒸留水 20 ml を加え、氷水で冷却しながら 3 分間ブレンダーにかけ、得られたホモジネートを蒸留水 30 ml で 100 ml 容ビーカーに洗いこみ、よく攪拌し 30 分間静置後 10% 過塩素酸水溶液 10 ml を加えてタンパク質を沈殿させ、10 分間放置後上澄液を口過し 2% 過塩素酸水溶液 10 ml を用い沈殿を口紙上に移し、さらに 2% 過塩素酸水溶液 10 ml を用い沈殿を洗い、口液と洗液を 100 ml メスフラスコに入れ蒸留水を加えて標線までみたし検液とする。この検液 1 ml について CONWAY の微量拡散法^{17), 18)}により VBN を測定した。

(5) TBA value

TURNER ら (1954)¹⁹⁾の方法により波長 535 m μ における吸光度を測定し TBA value とした。

(6) Microflora

ソーセージについての細菌学的実験はすべて無菌室内において常法に従い行なった。生菌数の測定は好気性菌と嫌気性菌に大別し安藤ら (1966)²⁰⁾の報告した方法に準じて実施し、37°C、48 時間培養後のコロニーを自動コロニーカウンターを用い計測した。嫌気性菌の場合は好気性菌と同様に処理したペトリ皿をデシケーターに入れ内部気圧を水銀柱 10~15 mm として培養し生じたコロニーを嫌気性菌とした。

実験結果と考察

ソーセージを 10°C において 4 週間保存し、製品中の AF-2 の挙動ならびにその作用効果を検討するためソーセージ中の VBN, TBA value および Microflora についてそれぞれ実験を 5 回行なった平均値について取纏めると下記のとおりである。

1. ソーセージ保存中における AF-2 の変化

ソーセージ保存中における AF-2 の消長を調査した結果は Table 1, Fig. 2 に示す。

Table 1. Changes of the AF-2 residues in sausage during the storage at 10°C.

Material of sausage	Dose		Residues of AF-2 in sausage				
			Just * after prepa- ration	Time of storage in week			
				1	2	3	4
Pork (Loin)	ppm	50	23.38	13.60	11.88	11.50	10.10
	%	100	46.76	27.20	23.76	23.00	20.20

* Time of storage is 0

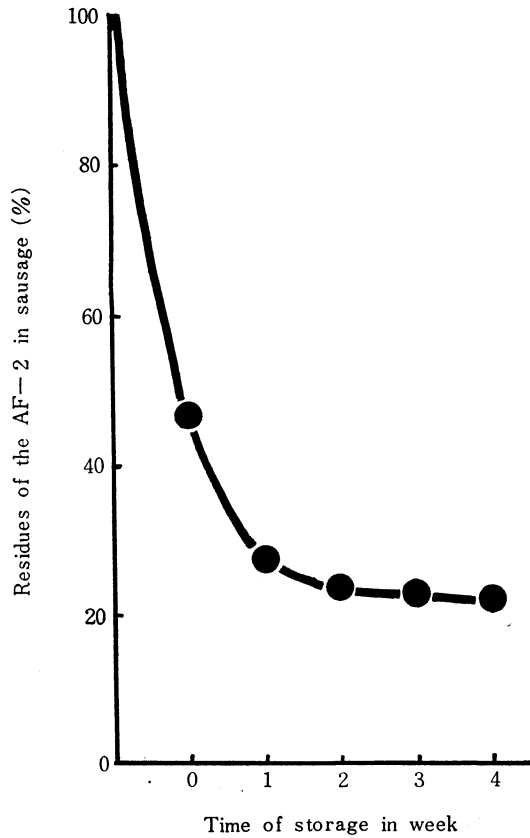


Fig. 2. Changes of the AF-2 residues in sausage during the storage at 10°C for 4 weeks.

Table 1, Fig. 2 によれば,

製造直後におけるソーセージ中AF-2有効残量は、最初添加した量の46.76%を示し10°Cで1週間保存後かなり失活し27.20%となり、その後保存期間の進むにつれ漸減し、4週間後に20.20%を認めた。前報⁶⁾においては製造直後に41.00%のAF-2有効残量を認めほぼ近似した数値を示した。

PAUL, H. E. (1960)²¹⁾は、ニトロフラゾン (5-Nitro-2-fural semicarbazone) はフラン核の5の位置にあるニトロ基が加水分解、化学物質、酵素などによって還元、開環離脱、ポリマーの状態(褐変)などに変化した場合は抗菌作用が減少または消失するという。AF-2の場合もフラン核の5の位置にニトロ基を有し、肉中に存在するシステインその他の還元物質および肉加工の添加物、微生物などによりAF-2の消長にいろいろ複雑な影響をおよぼすものと思ふ。われわれも *in vitro* の実験において、加熱褐変したAF-2溶液は bioassay で抗菌作用が消失することを認め、すでに報告⁵⁾した。

2. AF-2添加がソーセージ保存中におけるVBNにおよぼす影響

Fig. 1 に示した方法により製造したソーセージを10°Cで4週間保存中におけるVBNを測定した結果をTable 2, Fig. 3 に示す。

Table 2. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) and TBA value during the storage of sausage.

Analysis	Item	Drug	Just * after preparation	Time of storage in week			
				1	2	3	4
VBN	mg %	None **	17.76	18.31	18.46	18.75	19.09
		AF-2	17.24	17.40	16.84	16.90	16.50
		Tylosin	16.45	16.20	16.00	15.85	15.05
TBA value	Absorbance (535 m μ)	None **	0.121	0.125	0.126	0.130	0.137
		AF-2	0.113	0.116	0.118	0.118	0.122
		Tylosin	0.110	0.112	0.115	0.116	0.118

* Time of storage is 0

** Control

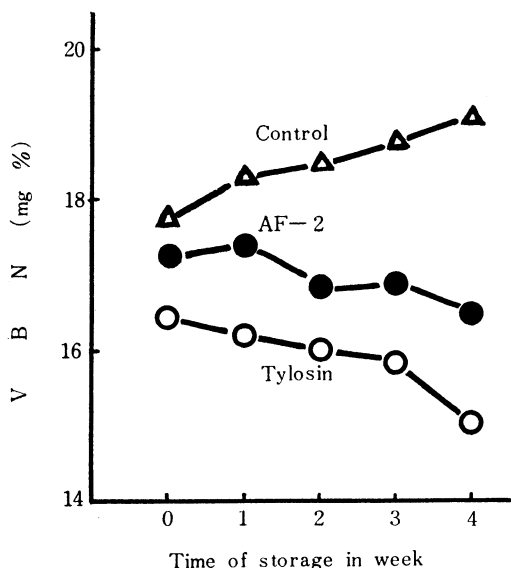


Fig. 3. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) in sausage during the storage at 10°C.

Table 2, Fig. 3 によれば,

製造直後におけるソーセージ中の VBN は防腐剤を添加しない対照区 17.76, 防腐剤を添加した AF-2 区 17.24, Tylosin 区 16.45 mg % であるが, 10°C において 4 週間保存中の変化をみると AF-2 区は 17 mg % 前後を示し保存中大きな変動は認められないが対照区は保存中, 期間の進むに従い漸増したのに反し Tylosin 区は反対に漸減する傾向をあらわし, 4 週間保存後において対照区 19.09, AF-2 区 16.50, Tylosin 区 15.05 mg % を認め各試験区の間の特徴的差異を示している。

安藤ら (1966)²⁰⁾ は牛の肩肉 (Chuck) を用い AF-2 を 5, 10, 20 ppm 添加しクックドソーセージを製造し 4°C, 20°C において 4 週間保存し, 保存中の VBN を調査した結果 4°C においては AF-2 を添加したのも添加しないものも一般に肉類の腐敗の初期といわれている 30 mg % 以下であって各試験区の間には差異が認め

られなかったが, 20°C において 4 週間保存後に対照区 47.10, AF-2 (10 ppm) 区 24.10 mg % を示し防腐剤の作用効果があらわれたという。

しかし, 彼等の実験においては牛肉を用いたこと, AF-2 の添加時期が異なること, 保存条件が異なることなどが今回の実験結果と異なる原因の 1 つと思われるが詳細については不明である。

また, 参考までに添加した Tylosin 区においては, かなり低値を示し 4 週間保存中において VBN が 1.40 mg % 減少しているが, この現象は Tylosin の抗微生物作用とソーセージ中の Microflora の様相との間に何等かの関連があるかもしれないので現在検討中である。

3. AF-2 添加がソーセージ保存中における TBA value におよぼす影響

ソーセージ保存中における TBA value の変化は Table 2, Fig. 4 に示す。

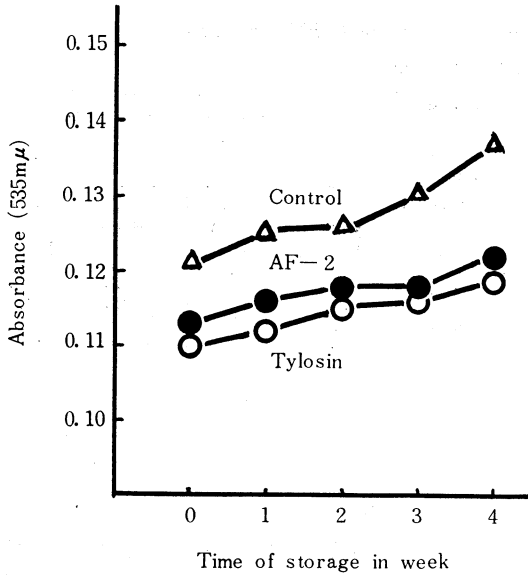


Fig. 4. Changes of the TBA value in sausage during the storage at 10°C.

Table 2, Fig. 4 によれば防腐剤を添加しない対照区, 添加したAF-2区, Tylosin区の各区とも10°Cにおいて4週間保存中にソーセージ中のTBA valueは漸増している。しかし, 防腐剤を添加しない対照区とAF-2区, Tylosin区との間にはかなりの差があり防腐剤の作用効果が認められるがAF-2区とTylosin区との間には顕著な差異を認め難く近似した数値を示している。

一般に豚肉のTBA valueは0.5以上になると官能テストにおいて酸敗臭を感知できるが, 生豚肉のTBA value 0.13であったものを5°Cにおいて10日間冷蔵してもTBA valueは0.13~0.14の範囲であったものが, 食塩を添加したり加熱処理をすると10日間保存中にTBA valueが3.10に上昇したという報告がある^{19), 22)}。

しかし, ソーセージの加工においては発色剤, 結着剤などの添加物, 塩漬工程によ

り肉色を固定するなど生肉の場合よりもTBA valueの上昇を抑制する作用が加わるので今回の実験においてはこのような低値を示したものと思考する。

4. AF-2添加がソーセージ保存中におけるMicrofloraにおよぼす影響

ソーセージ保存中におけるMicrofloraの調査は好気性菌と嫌気性菌とについて行ない, その結果はTable 3, Fig. 5に示す。

Table 3. Changes of the bacterial counts in sausage during the storage at 10°C for four weeks.

Bacteria	Drug	Just * after preparation	Time of storage in week			
			1	2	3	4
Aerobes	None **	3.30	3.40	3.55	3.75	3.90
	AF-2	3.10	2.75	2.25	2.10	1.80
	Tylosin	3.25	3.05	2.45	2.25	1.85
Anaerobes	None **	3.15	3.20	3.30	3.45	3.55
	AF-2	3.00	2.70	2.40	2.25	2.00
	Tylosin	2.35	2.20	1.70	1.40	1.20

* Time of storage is 0

** Control

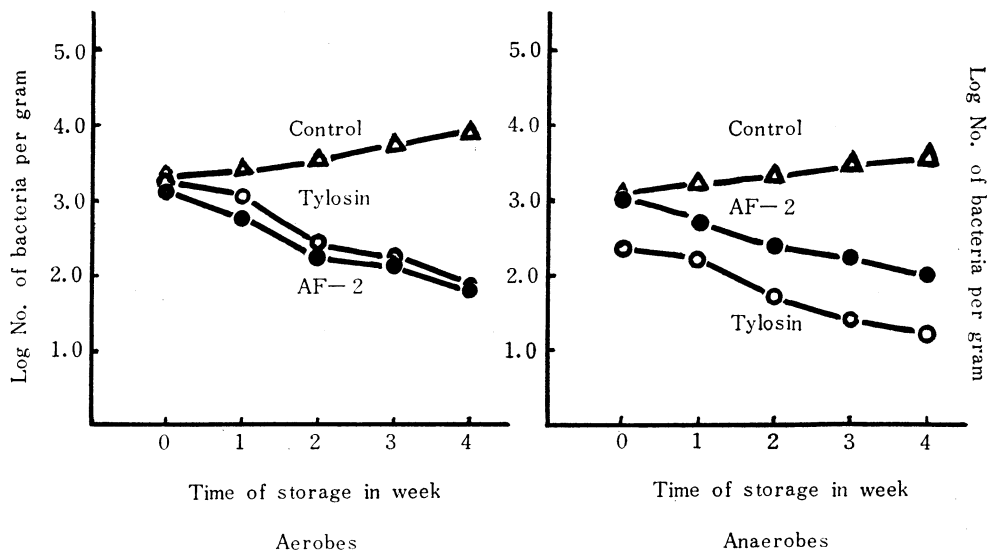


Fig. 5. Changes of the bacterial counts in sausage during the storage at 10°C for 4 weeks.

Table 3, Fig. 5 によれば製造直後におけるソーセージ中の Microflora は好気性菌が嫌気性菌よりもやや優勢を示し、防腐剤を添加しない対照区は10°Cにおいて4週間保存中に生菌数が漸増したのに反し、AF-2, Tylosin などの防腐剤を添加した試験区は漸減し明らかに防腐剤の作用効果が認められる。しかし、防腐剤の作用効果のあらわれ方は好気性菌と嫌気性菌との場合において異なった傾向がうかがわれる。すなわち、好気性菌の場合は AF-2 と Tylosin とは近似した数値を示し AF-2 の方が Tylosin よりも作用効果が強くあらわれているのに反し嫌気性菌に対しては Tylosin の方が AF-2 よりも明らかに顕著な作用効果あらわしている。

また、防腐剤を添加した AF-2, Tylosin の両区とも好気性菌、嫌気性菌が10°Cにおいて4週間保存中において漸減する傾向を示したことは興味深い。

西田ら (1972)²³⁾は羊腸ウイナソーセージのネト (Slime) の細菌学的研究を行ない、*E. coli*, *Strep. faecalis*, *Sta. aureus*, *Sal. entiritidis* などの菌株を 10°C において保存し増殖状態を調査したところ各菌株とも保存日数の進むにつれ菌数が減少し特に *Sta. aureus* の場合は、初め 5 (Log. No.) のものが1週間後 2 (Log. No.) 以下に減少したと報告している。

安藤ら (1966)²⁰⁾は AF-2 を 5, 10, 20 ppm 添加した牛肉ソーセージを 4°C と 20°C で 4週間保存し細菌数を調査した結果、好気性菌の場合、4°C においては AF-2 の作用効果が認められないが 20°C においては作用効果が認められ、嫌気性菌の場合は 4°C において対照区 3.2, AF-2 (10 ppm) 区 0.7, 20°C において対照区 5.5, AF-2 区 (10 ppm) 3.0 といずれの保存条件の場合も AF-2 の作用効果が認められたと報告している。

本実験においては 10°C, 4週間保存し好気性菌、嫌気性菌ともに AF-2 の添加効果が認められるが彼等の実験と肉の種類、AF-2 の添加時期、保存条件などが異なり肉中の細菌数の多少によって添加防腐剤の作用効果のあらわれ方に差を生ずることはすでにのべた。

要 約

豚の外ロース (*M. longissimus dorsi*) を用い市販のウイナソーセージに準じ AF-2 添加ソーセージを

調製した。AF-2の添加は原料肉を塩せきしたのち調味、練出しのおわりに肉のpHを6.0に調整して添加した。このソーセージを10°Cで4週間保存し保存中のAF-2の挙動と作用効果について調査した。得られた結果の要点はつぎのとおりである。

1. ソーセージ保存中におけるAF-2の変化

製造直後においては最初の添加量の46.76%、保存1週間後にかなり失活し27.20%、その後保存中に漸減し4週間後20.20%のAF-2有効残量を認めた。

2. AF-2添加がソーセージ保存中における製品中のVBN, TBA value および Microflora におよぼす影響

ソーセージ保存中におけるAF-2の作用効果を明らかにするため、VBN, TBA value および Microflora について調査した結果、AF-2添加のものは無添加のものに比較し各実験項目とも低値を示しAF-2の作用効果が認められた。すなわち

(1) 揮発性塩基窒素 (VBN; Volatile Basic Nitrogen)

ソーセージ製造直後においてAF-2無添加区17.76、AF-2区17.24 mg %と近似した値を示したが、保存中においてAF-2区は顕著な変動が認められないで4週間保存後16.50を示したが無添加区は19.09 mg %と保存中漸増した。

(2) TBA value

ソーセージ製造直後において防腐剤無添加区0.121、AF-2区0.113を示したが、4週間保存後に無添加区0.137と漸増しAF-2区0.122を示し両区間に0.015の差を生じ作用効果が認められた。

(3) Microflora

ソーセージ保存中におけるMicrofloraの状態を好気性菌、嫌気性菌に大別しAF-2の作用効果を調査した結果、製造直後においては好気性菌が嫌気性菌よりも優勢を示したがAF-2は両菌種に対し抗菌作用を示し作用効果が認められた。その作用効果のあらわれ方はVBN, TBA valueの場合と同様な傾向を示した。

本報の要旨は、肉製品の合成殺菌料に関する研究、第8報および第9報として第18回日本畜産学会、西日本支部大会(1967年10月、大分大学)および第21回西日本畜産学会大会(1970年10月、山口大学)において発表した。

文 献

- 1) 西海枝東雄：日本特許公告，昭和37-1901，出願34-8724，特許306438.
- 2) 篠山茂行：東海区水産研究所報告，**36**，11-19 (1963).
- 3) 小島 渥・松田敏生：日水誌，**31**，138-145 (1965).
- 4) 芝崎 勲・照井堯造：醸工誌，**41**，31-39 (1963).
- 5) SERA, H.: *Memoirs of the Fac. of Agr. Univ. of Miyazaki*, **4**, 2, 35-81 (1965).
- 6) 世良 尚：福岡医誌，**58**，6，514-530 (1967).
- 7) 世良 尚：モダンメディア，**10**，8，366-371 (1964).
- 8) 世良 尚：体系農業百科事典 N食品工業，農政調査委員会，東京，691-692 (1966).
- 9) AMANO, K., SHIBASAKI, I., YOKOSEKI, M. and KAWABATA, T.: *Food Technol.*, **22**, 881-885 (1968).
- 10) 松田敏生・小島 渥：日水誌，**31**，208-313 (1965).
- 11) 小島 渥・松田敏生：日水誌，**31**，214-218 (1965).
- 12) 菅野三郎・詫摩真澄・渡辺重信・村井絢子：食衛誌，**7**，140-144 (1966).
- 13) 菰田太郎・竹下隆三：食衛誌，**3**，292-296 (1962).
- 14) 青山敏信・吉柳節夫・井口定男：衛生化学，**13**，130-135 (1967).
- 15) 松田敏生・小島 渥・稲嶺成男・荒井一郎：日水誌，**31**，146-151 (1963).

- 16) 岩原滋利・荻野喜文・入江友子：食衛誌，7，449-454 (1966)。
- 17) CONWAY, E. J. and BYRNE, A.: *Biochem. J.*, 27, 419-429 (1933).
- 18) CONWAY, E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error Ied.* 87-123, Crosby Lock-wood & Son Ltd. London (1950).
- 19) TURNER, E. W., PAYNTER, W. D., MONTIE, E. J., RESSERT, M. W., STRUCK, G. M. and OLSON, F. C. : *Food Technol.*, 8, 326-328 (1954).
- 20) 安藤則秀・永田致治・平方義彦・大橋登美男・加香芳孝：日畜会報，37，2，82-86 (1966)。
- 21) PAUL, H. E., ELLS, V. R., KOPKO, F. and BENDER, R. C.: *J. Med. Pharm. Chem.*, 2, 563-567 (1960).
- 22) 安藤則秀：肉の科学，1，28-52 (1960)。
- 23) 西田 博・山口東十・富士川明彦・川出光生・坂本舞子：New Food Industry, 14, 12, 59-68 (1972)。

SUMMARY

The wiener sausage using pork loin (*M. longissimus dorsi*) was prepared according to the processing at commercial plants, adjusting the cured meat to pH 6.0 at the end of seasoning, and adding AF-2 (antiseptic) in the concentration of 5 ppm. An experiment on the storage of wiener sausage at 10°C was carried out for a period of 4 weeks, the behavior of AF-2 in the sausage during the storage, and the influence of the residues of drug on the volatile basic nitrogen (VBN), TBA value, and microflora in the product, were investigated in order to get fixed data on the effect of AF-2 as a preservative for the sausage.

The results obtained were as follows:

1. The residual concentration of AF-2 in the sausage were: 46.76% of the original amount, just after preparation; 27.20% after the storage for a week; and 20.20% after the storage for 4 weeks.
2. The effect of AF-2 as a preservative for the sausage during the storage for 4 weeks at 10°C could be observed on the VBN, TBA value, and microflora in the product.