ブタ小腸保存中の悪臭発生と微生物叢の関係

灘 本 知 憲*, 川 村 正 純**

浦 部 貴美子*, 安 本 教 傳***

* 滋賀県立大学人間文化学部

** 滋賀県立大学看護短期大学部

*** 京都大学食糧科学研究所

Relation between Evolution of Offensive Odor and Microbial Flora during Storage of Porcine Small Intestine

Tomonori NADAMOTO,* Masazumi KAWAMURA,** Kimiko URABE* and Kyoden YASUMOTO***

* School of Human Cultures, the University of Shiga Prefecture, Hikone 522

** College of Nursing, the University of Shiga Prefecture, Hikone 522

*** Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 50, 161~167 (1997)

Porcine small intestine (PSI) develops a specific offensive odor after storage for only 0.5 to 1 day at 20°C, and bacterial counts increase exponentially during this storage period. Pretreatment at 500 MPa for 10 min at 20°C was found to drastically reduce microbial counts and maintain PSI freshly for at least 1 day after the treatment in terms of microbial counts, amounts of volatiles, and organoleptic features. Anaerobic storage of PSI was unable to inhibit offensive odor development, but gave a gas chromatographic pattern similar to that observed when PSI was stored under control storage conditions. Some chemicals, including those listed as legal food additives, retarded the evolution of the offensive odor and bacterial growth. However, these chemicals, added at levels below the legally permitted limits, were unable to effectively suppress development of the offensive odor. In storage experiments, the amount of methyl mercaptan (MM), the main volatile responsible for the offensive odor, was found to correlate significantly with the count of anaerobic bacteria. Furthermore, inoculation of anaerobes, among the various microbial groups separated from PSI, onto fresh PSI that had been pasteurized by high-pressure pretreatment led to development of the same, typical offensive odor (MM) as that produced by control PSI after storage. These results indicate that evolution of the offensive odor of PSI during storage is mostly, if not completely, attributable to the growth of anaerobes.

Key Words porcine small intestine, storage, methyl mercaptan, anaerobes.

(Received November 9, 1996)

ウシやブタの小腸、大腸は栄養に富んだ食用素材¹⁾であるが、鮮度低下に伴う悪臭発生の早さが²⁾、その有効利用を妨げる要因になっている。

著者らはブタ小腸 (PSI) を対象とし、その保存中に生じる悪臭をヘッドスペースガス法を用いて分析した結果、揮発性成分中に著量のメチルメルカプタン (MM)、エタノールを始めとする種々のイオウ化合物、アルコール、カルボニル化合物などを認めた²⁾。またいくつかの食

品³⁾や天然物⁴⁾、殺菌、抗酸化、キレート効果を有する試薬⁵⁾に悪臭発生を抑制する効果を見いだした。このとき、試薬類による悪臭抑制効果と一般細菌数との間に逆比例的な関係が観察されたことから、悪臭発生と微生物の因果関係が示唆された。

本報ではブタ小腸保存中の悪臭発生が微生物に起因することを明らかにする目的で実験を行った。

実 験 方 法

1. 実 験 材 料

実験材料のブタ小腸は既報^{2)~4)}と同様、屠場で直接入

* 〒522 彦根市八坂町 2500

** 〒522 彦根市八坂町 1900

*** 〒611 宇治市五ヶ庄

手後、ただちに冷凍保存し、必要量を解凍して実験に用いた。

2. 試 薬

培地に用いた Plate Count Agar, Potato Dextrose Agar, Violet Red Bile Agar は Difco 社 (Detroit, USA) より, BL 寒天培地は栄研化学(株) (東京) より, ウマ無菌脱線維素血液は(株)日研生物医学研究所 (京都) より, また M.R.S. Agar は Unipath 社 (Hampshire, England) よりそれぞれ購入した。その他の試薬は和光純薬(株) (大阪) の特級またはそれに準ずる標品を用いた。

3. 揮発性成分の測定

所定の時間 20°C に保存したブタ小腸 50 g を 150 ml の生理食塩水中で磨砕した。磨砕液 50 ml を 100 ml 容バイアル中で 60°C, 30 分間加温し, そのヘッドスペースガス 3 ml をガラスシリンジを用いて採取し, 直接ガスクロマトグラフに供した。分析条件, 各ピークの同定方法は既報²⁾に準じて行った。

4. 微生物叢の測定

上記磨砕液を生理食塩水で対数的に希釈し, 以下の菌数測定のための試料とした。一般細菌, 酵母, 乳酸菌および大腸菌群の生菌数は, それぞれ Plate Count Agar, Potato Dextrose Agar, M.R.S. Agar, Violet Red Bile Agar を培地として用いた混釈平板培養法 (37°C, 2 日間) で測定した。嫌気性菌数は 5% ウマ無菌脱線維素血液を含む BL 寒天培地を用いたスチールウール法⁵⁾ (37°C, 2 日間) で測定した。

5. ブタ小腸の高圧処理

新鮮ブタ小腸 50 g をナイロン包装 (三菱樹脂(株) (東京) 製ダイアミロン M 301) 内に脱気, 封入し, 食品用加圧試験装置 (三菱重工業(株) MFP-7000) を用いて, 25°C 下で 500 MPa, 10 分間加圧した。

6. ブタ小腸高圧処理試料への微生物接種

前述の 4. 記載の方法に従って, 20°C に 2 日間保存したブタ小腸からおのおのの菌叢を得た。10⁶ 希釈シャーレで得られたコロニーすべてを釣菌し, 10 ml の生理食塩水に懸濁して接種のための調製液とした。100 ml 容バイアル中の高圧処理した新鮮ブタ小腸 50 g に調製液 2 ml を添加, 攪拌することで各微生物群の接種を行った。なお, 接種生菌数はブタ小腸 1 g 当り, 一般細菌では 4.8×10⁷, 酵母では 3.8×10⁷, 嫌気性菌では 1.4×10⁷, 乳酸菌では 9.6×10⁶, 大腸菌群では 1.0×10⁷ であった。

実 験 結 果

1. ブタ小腸保存中の微生物叢の変化

ブタ小腸を 20°C に保存すると, 半日から 1 日で特異的な悪臭を発生する。Fig. 1 に微生物叢と揮発性成分量 (総量と主要な成分である MM, エタノール量) の経時変

Fig. 1. Change in microbial flora and volatiles during storage of porcine small intestine.

Porcine small intestine (PSI), 50 g, was stored at 20°C for predetermined period in the same way as described in previous studies,²⁾⁻⁴⁾ then homogenized with 150 ml of saline. A portion (50 ml) of the homogenates was transferred into a capped 100 ml-vial and incubated for 30 min at 60°C. Three milliliters of the head-space gas was directly injected into a gas chromatograph (Shimadzu Co., Ltd., GC-15 APF). Amounts of volatiles were expressed in terms of integrator counts. Remaining portion of the homogenates was diluted serially with saline. Plate count agar, potato dextrose agar, M.R.S. agar and violet red bile agar were used as media for determination of living cells of total bacteria, yeast, lactobacilli and coliform bacilli, respectively. Count of anaerobes was determined by steel wool method,⁵⁾ using BL-agar medium containing 5% horse blood. —○—, total bacteria; —△—, yeast; —●—, anaerobes; —□—, lactobacilli; —*—, coliform bacilli; □, total volatiles; ■, methyl mercaptan (MM); ▨, ethanol.

化を示した。いずれの微生物群も保存開始より 1 日後にかけて指数的な増殖を示した。また, 嫌気性菌は保存時間が長くなるほど優勢となる傾向が認められた。一方, MM とエタノールの発生経過を比較すると, 新鮮物では両者のピークともほとんど認められないが, MM は保存早期, すなわち官能的に感知される悪臭発生の開始時期, から顕著なピークが観察されるのに対し, エタノールのピークは保存 1 日目以降に顕著となる傾向が見られた。

2. 高圧処理による悪臭発生への影響

新鮮ブタ小腸を高圧処理し, その後 20°C に保存したときの微生物叢の変化を Table 1 に示した。一般細菌, 酵

Table 1. Sterilizing effect of high pressure treatment on PSI.

Microbial flora	Bacterial counts (/g) after storage for		
	0 day	1 day	2 days
High pressure treatment			
Total bacteria	4.0×10^1	1.5×10^3	5.0×10^6
Yeast	1.0×10^1	1.3×10^2	4.8×10^6
Anaerobes	1.8×10^3	2.2×10^4	5.5×10^5
Control (no treatment)			
Total bacteria	2.0×10^5	5.4×10^8	1.8×10^9
Yeast	6.2×10^4	1.8×10^8	6.0×10^8
Anaerobes	1.7×10^5	4.5×10^8	1.6×10^9
Lactobacilli	1.0×10^4	1.2×10^8	3.7×10^8
Coliform bacilli	6.0×10^3	9.0×10^7	3.0×10^8

Fresh PSI, 50 g, in a sealed nylon bag was subject to 500 MPa for 10 min at 25°C, then stored for indicated days at 20°C. The methods for microbial analysis are the same as in Fig. 1.

Fig. 2. Effect of high pressure treatment on the evolution of ethanol and MM during storage of PSI.

Experimental procedures are as described in Table 1. Amounts of volatiles were determined in the same way as in Fig. 1. □, control; ■, high pressure treatment.

母の生菌数は高圧処理によって1/5,000~1/6,000に激減した。これに比べて嫌気性菌の減少率は若干低く、約1/100であった。その後さらに保存を続けるとすべての生菌数とも増加したが、1日後では新鮮物(無処理)の値を下回る程度の増加にとどまった。保存2日後ではかなりの増加が認められ、無処理の2日保存試料と比べるとはるかに低いとはいえ、いずれの生菌数も新鮮物の値を超えた。

Fig. 2 は主要な揮発性成分量の経時変化を示している。高圧処理試料では保存1日後のエタノール、MM発生量が新鮮物と同程度に抑えられた。2日後では、エタノールが対照の保存1日後程度に、またMMもごく少量

Fig. 3. Microbial flora of PSI after storage for 1 day under anaerobic condition.

PSI was stored at 20°C for 1 day under conventional laboratory condition as in Fig. 1 or under anaerobic condition by steel-wool method as described in Fig. 1. □, stored under conventional laboratory condition (control); ■, stored under anaerobic condition.

ではあるが発生することが観察された。

官能的には、保存1日後の高圧処理試料には新鮮物と同様まったく悪臭が感じられず、また2日後においても悪臭は微弱であった。

3. 嫌気状態で保存したブタ小腸の悪臭発生

新鮮ブタ小腸をスチールウール嫌気培養法と同一の嫌気状態で20°Cに1日間保存した場合の微生物叢、主要揮発性成分の変化を Fig. 3, 4 に示した。

Fig. 3 に示したように、嫌気状態においても測定したすべての微生物群数は増加した。嫌気状態におけるおの

Fig. 4. Evolution of ethanol and MM after storage of PSI under anaerobic condition.

Experimental conditions are as described in Fig. 3. Amounts of volatiles were measured in the same way as in Fig. 1. □, stored under conventional laboratory condition (control); ■, stored under anaerobic condition.

おのの微生物群の増殖を対照と比較してみると、一般細菌、酵母は抑制されたが、大腸菌群ではほとんど差異がなく、嫌気性菌、乳酸菌では逆に促進された。とくに嫌気性菌の生菌数は対照の2.3倍に達した。

このときのエタノールとMMの発生量をFig. 4に示

した。エタノールの発生は嫌気状態で著しく抑制され、対照の1/7量の発生に過ぎなかった。一方、MMの発生量は対照と同程度であった。官能的にも、嫌気状態に置かれたブタ小腸には対照と同様の特異的な悪臭が観察された。

4. 試薬添加による影響

数種の食品添加剤や試薬類の添加効果をTable 2に示す。食品添加剤(BHA, DHA, EDTA)は高濃度の添加でMMの発生や微生物増殖を抑制したが、食品添加物の使用基準濃度では十分な抑制効果は得られなかった(BHA:0.1%, DHA:0.05%, NaNO_2 :0.01%, EDTA:0.025%, ただしいずれもブタ小腸は直接の使用対象とはなっていない)。

本実験の結果にTable 2, Fig. 2~5の結果を加え、一般細菌、嫌気性菌、酵母のおのの菌数に対してMMの発生量をプロットしたのがFig. 5である。生データ(A-1~3)と対照に対する比率(B-1~3)の両者をプロットしたが、嫌気性菌群数とMM発生量の間に高い有意な相関関係が認められた。また、いずれの実験においても、官能的に見た悪臭の程度とMMの発生量は比例的であった。

5. 嫌気性菌群の接種による悪臭発生の再現

新鮮ブタ小腸の高圧処理試料に、実験方法6.に従って保存ブタ小腸から調製した5種の微生物群を接種し、そ

Table 2. Evolution of MM and microbial flora after 1 day storage of PSI with some food additives or reagents.

	Integrator Counts of		Counts of		
	MM	total area	total bacteria	anaerobes	yeasts
EXP. 1					
Control	2934	5205	1.5×10^7	4.3×10^7	1.7×10^7
0.1% BHA	2664	6592	4.6×10^7	1.1×10^8	1.2×10^7
1% BHA	0	4693	4.5×10^6	2.5×10^6	4.0×10^6
EXP. 2					
Control	13074	25126	3.6×10^8	8.4×10^8	3.0×10^8
0.1% Phenol	3454	8257	2.7×10^7	2.0×10^8	2.7×10^7
EXP. 3					
Control	5156	14162	7.6×10^8	6.4×10^7	2.8×10^8
0.05% DHA	2797	7237	4.1×10^7	6.0×10^7	3.3×10^7
0.5% DHA	759	6728	6.0×10^5	2.5×10^5	1.9×10^5
EXP. 4					
Control	5168	14359	2.8×10^8	2.8×10^8	1.5×10^8
0.01% NaNO_2	1559	32516	8.2×10^7	4.4×10^7	5.7×10^7
EXP. 5					
Control	9775	18260	5.3×10^8	3.4×10^8	2.9×10^8
0.025% EDTA	4556	13203	2.7×10^8	2.0×10^8	2.3×10^8
0.25% EDTA	683	3251	5.6×10^7	3.6×10^7	3.2×10^7

Fresh PSI was stored with indicated additives. The experimental procedures are the same as described in Fig. 1. BHA, butylhydroxyanisole; DHA, dehydroacetic acid sodium salt; EDTA, ethylenediaminetetraacetate disodium salt.

Fig. 5. Correlation between bacterial counts and evolution of MM after 1 day storage of PSI under various experimental conditions.

Data were cited from Figs. 2, 3 and 4, and Tables 1 and 2. Raw data ($n=17$) are plotted in the figures from A-1 to A-3. Ratios to control values ($n=10$) are plotted in the figures from B-1 to B-3.

の後 20°C に保存したときの微生物叢と揮発性成分量を測定した。

Fig. 6 は各接種試料を保存した際の微生物叢を確認した結果である。酵母、乳酸菌、大腸菌群接種試料は、無処理対照の微生物叢パターンとは明らかに異なり、接種菌叢の占める割合が大きくなっていた。一般細菌、嫌気性菌接種試料の菌叢パターンは比較的対照と近似したものであった。接種菌数に差があるため単純な比較はできないが、総体的に見て 1 日後に生菌数が最も多かったのは嫌気性菌接種試料であった。

Fig. 7 はエタノール、MM の発生量を示したものである。どの菌群の接種試料においてもエタノール、MM は多少なりとも発生したが、対照と比肩しう程度の MM の発生量が認められたのは嫌気性菌接種試料のみであった。なお、このときのガスクロマトグラムは典型的な悪臭発生期のパターンを示していた。さらにおおの試料を官能的に比較すると、嫌気性菌接種試料は対照と同等に悪臭が強く、それ以外の接種試料は比較的軽微に感じられた。定量的な検討は行わなかったが、悪臭の強さは明らかに MM の発生量に依存するように思われた。

Fig. 6. Change in microbial flora of PSI after storage for 1 day by inoculation of various microbes.

Indicated microbes, separated from PSI after storage for 2 days, were inoculated onto 50 g of fresh PSI sterilized by high pressure treatment as described in Table 1. After storage for 1 day at 20°C, the samples were homogenized and determined their bacterial counts in the same way as indicated in Fig. 1. Inoculated cell counts of total bacteria, yeast, anaerobes, lactobacilli and coliform bacilli were 4.8×10^7 , 3.8×10^7 , 1.4×10^7 , 9.6×10^6 and 1.0×10^7 (/g of PSI), respectively. □, total bacteria; ▨, yeast; ■, anaerobes; ▩, lactobacilli; ■, coliform bacilli.

考 察

新鮮ブタ小腸はむしろ無臭に近いが、室温 (20°C) に置くと半日後には特異的な悪臭が感じられ、1 日後には強い特異臭となる。著者らは、ヘッドスペース法による揮発性成分分析の結果、イオウ化合物、アルコール、カルボニル化合物などを検出し、とくに MM、エタノールが主要な成分であることを明らかにした²⁾。また種々の添加物による悪臭抑制効果を見た実験³⁾において、揮発性成分量と一般細菌数の間に比例的な関係が認められたことから、ブタ小腸保存中に生じる悪臭が微生物に由来することが示唆された。

Fig. 1 に示したように、20°C 保存下のブタ小腸では、既報²⁾の一般細菌数のみならず、今回測定した 4 種の微生物群ともに保存 1 日目にかけて生菌数が指数増加することが確認された。とくに、嫌気性菌群が保存期間を通じて高い増殖率を示したことから、保存ブタ小腸は嫌気的な状態にあったと考えられる。このことに、市販の脱酸素剤に悪臭発生防止効果が認められなかったこと³⁾

Fig. 7. Change in evolution of ethanol and MM from PSI after storage for 1 day by inoculation of various microbes.

Experimental conditions are as described in Fig. 6. Amounts of volatiles were measured in the same way as in Fig. 1.

を考え合わせると、嫌気性菌の増殖が悪臭発生に最も深い関わりをもつものと推論できる。

ブタ小腸中の生菌数を簡便に減少させる方法は幾通りか考えられる。オートクレープ処理で滅菌すると特異的な悪臭発生は認められなかったが、この方法ではブタ小腸に含まれる分解酵素群の悪臭発生への関与が否定できない。ブタ小腸への影響はできる限り避けながら生菌数を減少させる方法として、本実験では常温下における高圧処理法を用いた。確認していないが、採用した実験条件では(25°C, 500 MPa, 10分)酵素などは大きな影響を受けず、微生物の死滅効果が期待できるとされている⁶⁾。

Table 1, Fig. 2 に示したように、高圧処理によって新鮮ブタ小腸中の生菌数は激減し、その後の20°Cにおける保存において少なくとも1日間は生菌数、揮発性成分量ともに無処理の新鮮物より良好な状態を維持できた。

また、殺菌効果が期待される薬品類の高濃度の添加も保存中の生菌数、揮発性成分(とくにMM)量の増加を抑制した(Table 2)。これらの結果から、ブタ小腸保存中に発生する悪臭が微生物に由来することが確認された。なお、薬品類は食品添加物の使用基準量程度の濃度では抑制効果は小さく、これまでいくつか見いだされた天然物の抑制効果⁹⁾には及ばなかった。

これらの実験を通して、MMの発生量は嫌気性菌群数と最も相関が強く(Fig. 5)、嫌気状態における保存が悪

臭発生には無効であったこと(Fig. 4)と考え合わせると、悪臭の原因となるMMの発生が嫌気性菌群に由来する可能性が高い。

さらに高圧処理を施したブタ小腸試料に、ブタ小腸より分離した種々の微生物群を接種し、悪臭発生の再現を試みた。その結果、主要揮発性成分の発生量と官能的な比較でとくに典型的な悪臭発生を再現したと判断されるのは嫌気性菌を接種した場合のみであった。

以上の結果からブタ小腸保存中に生じるMMを主成分とした悪臭の発生が嫌気性菌群に起因すると結論した。

一般に食品の腐敗現象は、増殖微生物によるアンモニア、硫化水素、メルカプタンなどの揮発性物質の発生を伴うため、悪臭を感じる。多くの場合、種々の嫌気性菌が悪臭発生の原因菌とされている⁷⁾。これらの菌は食肉やその加工品に分布し、悪臭発生を伴うことが確認されている⁸⁾。

一方、扇元⁹⁾によるブタ消化管内の部位別菌叢の調査結果によると、小腸には嫌気性菌が10⁹/g弱程度存在する。また、扇元¹⁰⁾ならびに光岡¹¹⁾は腸内菌の多くの種類がアミノ酸などの窒素化合物をアミン、アンモニア、硫化水素などに分解することを示している。

これらのことから、本実験でブタ小腸保存中の悪臭発生の主原因と考えられた嫌気性菌は、屠殺後の洗浄で残存したブタ小腸常在菌に由来するものと推測される。なお、MMの生産を担う主要な嫌気性菌の分離に関しては別報¹²⁾で報告する。

要 約

1) ブタ小腸を20°Cに保存すると、半日から1日後に特異的な悪臭が感じられた。このとき一般細菌、酵母、嫌気性菌、乳酸菌、大腸菌群のいずれもが増殖指数期にあった。主要な揮発性成分であるMMは半日後には、またエタノールは1日後以降に著しい発生量を示した。

2) 新鮮ブタ小腸を高圧処理すると生菌数は激減し、その後の20°C下での保存において少なくとも1日間は新鮮な状態を維持できた。

3) ブタ小腸を嫌気状態で保存しても特異的な悪臭は軽減されなかった。

4) 抗菌効果の期待される数種の食品添加剤は、高濃度では悪臭発生を抑制したが、添加許可基準量では効果がなかった。

5) 悪臭の主要成分MMの発生量と嫌気性菌群数の間に高い有意な相関が認められた。

6) 高圧処理した新鮮ブタ小腸にブタ小腸由来の嫌気性菌群を接種することで悪臭の再現が認められた。

以上の結果より、ブタ小腸保存中に発生する悪臭が嫌

気性菌の急速な増殖に伴って起こることが明らかとなった。

本研究にあたってブタ小腸試料を提供いただいた(株)松平天然物研究所に感謝いたします。また、高圧処理を行うにあたってご協力いただいた滋賀県工業技術センター主任技師の松本 正氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 日本食肉消費総合センター(編)：豚・牛内臓の栄養と調理変化, 190 (1990), (財)日本食肉消費総合センター(東京)
- 2) 灘本知憲, 川村正純, 浦部貴美子, 安本教傳：栄食誌, **45**, 147 (1992)
- 3) 灘本知憲, 浦部貴美子, 川村正純, 藤沢史子, 安本教傳：栄食誌, **45**, 347 (1992)
- 4) Urabe, K., Nadamoto, T., Kawamura, M. and Yasumoto, K.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 63 (1994)
- 5) 光岡知足：腸内菌の世界, 45 (1980), 叢文社(東京)
- 6) 滝 妥恵, 栗生武良, 光浦暢洋, 高垣康雄：加圧食品(林力丸編), 153 (1990), さんえい出版(京都)
- 7) 矢野信礼：食品微生物学(相磯和嘉監修), 275 (1976), 医歯薬出版(東京)
- 8) Brown, M.H.: *Meat Microbiology* (春田三佐夫, 森地敏樹, 矢野幸男(訳)：食肉微生物学), 214 (1987), 建帛社(東京)
- 9) 扇元敬司：畜産の研究, **34**, 791 (1980)
- 10) 扇元敬司：畜産の研究, **36**, 76 (1982)
- 11) 光岡知足：豚病学, 第3版(熊谷哲夫, 東 量三, 柏崎守, 河田啓一郎, 清水悠紀臣, 波岡茂郎, 吉本 正, 渡辺昭三編集), 114 (1988), 近代出版(東京)
- 12) 川村正純, 灘本知憲, 浦部貴美子, 林 賢一, 安本教傳：栄食誌, **50**, 169 (1997)

(1996年11月9日受理)