ウインナーソーセージの保存性に関する 衛生細菌学的研究 (第3報)

ウェルシュ菌に対するフリルフラマイドおよびソルビン酸の発育阻止効果

(昭和 48 年 9 月 30 日受函)

小 沼 博 隆* 鈴 木 昭*

A Bacteriological Study on the Preservability of Vienna Sausage (III)

Inhibitory Effects of Furfylfuramide, Sorbic Acid, and Nitrite
upon Growth of *Clostridium Welchii*

Hiroataka KONUMA and Akira SUZUKI

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

1. Anaerobes were isolated from samples of commercial vienna sausage and identified as thermolabile *Clostridium welchii*.
2. Furfylfuramide (FF) and sorbic acid (SOA) were examined for inhibitory effect upon growth of the isolated *Clostridium welchii* *in vitro*. This effect was observed when 0.31~1.25 ppm of FF or 0.2% of SOA had been added.
3. Addition of 5 ppm of FF was effective for preventing thermostable *Clostridium welchii* inoculated into tentatively prepared samples of vienna sausage.
4. When FF was used simultaneously and an optimal pH value (less than 5.9) maintained, it was possible to determine such amount of nitrite to be added as to make the residual amount of this substance 17.5 ppm or less.

(Received September 30, 1973)

まえがき

前報^{1),2)}において、フリルフラマイド (以下 FF と略記) とソルビン酸 (以下 SOA と略記) のウインナーソーセージの主要細菌に対する発育阻止効果について報告した。

今回はその研究の一環として、食肉製品の原料肉中に高頻度に検出されるウェルシュ菌³⁾を対象とし、まずウインナーソーセージから本菌の分離を試み、当該分離菌株および当研究室保存の標準菌株を用いて、試験管内実験によって FF, SOA および亜硝酸塩の本菌に対する発育阻止効果について、さらに標準菌の一部を実験的試作品に接種し、それに対して FF および SOA が試験管内と同様の効果を示すか否かを検討し、若干の知見を得たので報告する。

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

実験方法

1) 供試ウインナーソーセージ

実験に用いたウインナーソーセージは某二社の製品で FF, SOA とともに無添加の製品 3 種と某社の協力によって試作した無添加品, FF 1.25 および 5 ppm 単独添加品, FF 1.25 ppm と SOA 0.05% 併用添加品, FF 5 ppm と SOA 0.2% 併用添加品の 5 種類を、それぞれ製品の pH を 6.5 および 5.7 に調製したものの二群に分けて製造した 10 種類で、合計 13 種について検討した。

2) 供試菌株

保存料無添加の製品および試作品中の保存料無添加品から分離、同定した易熱性ウェルシュ菌 11 株のうちの 6 株と東京都立衛生研究所分与の標準菌 2 株 (NCTC 8238, 8798) の計 8 株を供試した。このうち試作品に接種したのは標準菌の 2 株である。

3) 供試薬剤

フリルフラマイド [2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)-
アクリル酸アミド (上野製薬)]

ソルビン酸カリウム (上野製薬)

亜硝酸塩 (和光純薬)

4) ウェルシュ菌の分離および同定法

分離法: 分離法については善養寺ら⁴⁾の方法にほぼ準拠した。すなわち、一般生菌数測定のためにあらかじめ用意した試料原液 (検体の10倍希釈液) 各 1 ml を別に用意した 5 本のチオグリコレート培地 (栄研) に接種し、37°, 24時間培養後、その一白金耳をカナマイシン 200 g/ml 加 CW 卵黄寒天に画線塗抹し、37°, 24時間嫌気培養後集落を観察した。なお試料原液はさらに一万倍まで希釈したものについても培養した。CW 卵黄寒天上に認められた集落のうち、直径 2 mm 前後のボタン状のやや隆起した乳黄色の集落で、その周囲に直径 3~8 mm のレンチナーゼ反応陽性のものをウェルシュ菌の疑あるものとして釣菌し、クックドミート培地に培養保存し、その後の実験に供した。

同定法: CW 卵黄寒天上でウェルシュ菌の疑ありと認められた集落について、次のような生物学的性状を示すものをウェルシュ菌と同定した。すなわち、グラム陽性の大桿菌で、運動性がなく、インドール反応陰性、乳

糖、白糖、ブドウ糖をそれぞれ分解し、牛乳を凝固し、ガスを産生する菌について、レンチナーゼ抑制試験により完全にレンチナーゼ反応が抑制されたものである。

5) 供試菌に対する試験管内の FF, SOA, および亜硝酸塩の発育阻止効果の測定法

クックドミート培地に保存した供試菌の 0.1 ml をトリプテースソイブロス (BBL) に移植し、37°, 24時間嫌気培養後、その一白金耳をあらかじめ用意した培地、すなわち、トリプテースソイブロスに Table 4 に示すような所定の濃度になるように FF, SOA, 亜硝酸塩を、それぞれ添加した培地 10 ml に移植し、37°, 96時間嫌気培養後、菌発育の有無により阻止濃度を判定した。

ウェルシュ菌の分離、同定ならびに発育阻止効果測定試験における供試菌の培養はすべて嫌気ジャー (トミー精工製) を使用し、水素ガス充てん Deoxo⁵⁾ (室温で働く触媒) を使用した。

6) 一般生菌数などの測定

一般生菌数の測定法: カビ発生の有無の判定および pH の測定法は前報¹⁾に準じた。

7) ウェルシュ菌の菌数測定法

MPN 法: すでに述べたように、各試料の希釈液をチオグリコレート培地に移植し、培養したチオグリコレ

Table 1. Results of Bacteriological Examination, Sensory Test and Measure of pH in Commercial Vienna Sausage (Non Additive)

Sample No.		Stored day			
Examination		0	1	2	3
Plate counts	A	<300	17×10 ⁶	37×10 ⁷	*
	B	<300	30×10 ⁵	15×10 ⁷	*
	C	<300	13×10 ⁶	*	
Neto	A	—	—	+	*
	B	—	—	+	*
	C	—	+	*	
Fungi	A	—	—	—	*
	B	—	—	—	*
	C	—	—	*	
pH	A	6.30	6.30	6.75	*
	B	6.20	6.05	5.85	*
	C	6.45	5.85	*	
<i>C. welchii</i>	A	0	3,400**	24,000	*
	B	0	0	0	*
	C	0	24,000	*	

Stored at 30°C

*, spoilage; **, count is MPN

Table 2. Results of Bacteriological Examination in Commercial Vienna Sausage (Non Additive)

Sample No.		Stored day				
Examination		0	3	6	9	12
Plate counts	A	<300	80×10^2	70×10^3	56×10^4	30×10^7
	B	<300	30×10^2	35×10^4	83×10^7	140×10^7
	C	<300	96×10^3	61×10^5	70×10^7	200×10^7
Neto	A	—	—	—	—	+
	B	—	—	—	+	+
	C	—	—	—	+	+
Fungi	A	—	—	—	+	+
	B	—	—	—	+	+
	C	—	—	—	+	+
pH	A	6.35	6.50	6.20	6.30	6.05
	B	6.20	6.40	6.32	6.00	5.90
	C	6.05	6.01	5.99	5.81	5.80
<i>C. welchii</i>	A	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0

Stored at 10°C

ト培地に菌の発育が認められたものをそれぞれ CW 卵黄寒天に画線塗抹し、平板上にウェルシュ菌の認められたものを陽性とし、ウェルシュ菌陽性のチオグリコレート培地の本数から大腸菌群の MPN 法にならって MPN 値を算出した。

実験結果

1. FF, SOA 無添加ウインナーソーセージからの一般細菌、ウェルシュ菌などの検出状況

FF, SOA 無添加市販品からの一般細菌、カビ、ネット発生の有無、およびウェルシュ菌の検出状況を30°と10°の各保存品について検討した。その結果は Table 1 と 2 に示した。

すなわち、30°保存品では2日で一般生菌数が、 $10^7/g$ にも達し、ネットも発生し、3日で腐敗を起こし測定不能となり、pH の変動が認められた。

一方、ウェルシュ菌は、1日で Table 1 に示すような結果を得、2日ではさらに菌数は増大していた。

10°保存品では、一般生菌数の増加、ネットおよびカビの発生などについては前報¹⁾の10°保存品と同様の傾向であったが、ウェルシュ菌は検出されなかった。

2. 分離したウェルシュ菌の生物学的性状および血清学的性状ならびに耐熱性

FF, SOA 無添加の一般市販品より分離した嫌気性桿菌の生物学的性状および血清学的性状ならびに耐熱性に

ついて検討した。その結果は Table 3 に示した。

すなわち、分離した11菌株はいずれも同定法記載の性状に一致し、さらにα抗毒素血清によるレンチナーゼ抑制試験陽性の結果からウェルシュ菌と同定された。血清学的性状については、市販の Hobbs 型診断用血清を用いて型別を行ったが、いずれの菌株も Hobbs 型 I-17 型に型別されるものはなかった。

耐熱性については、Kim ら²⁾の培地を用いて検討したが、いずれも75°、20分(浴槽中)加熱では生残し、100°、60分加熱では死滅した。

3. 試験管内における FF および SOA のウェルシュ菌に対する発育阻止効果

分離した易熱性ウェルシュ菌11株のうち無作意に選んだ6株と、保存標準菌(耐熱性菌)2株の計8株を対象に試験管内における FF および SOA の発育阻止効果を検討し、その結果を Table 4 に示した。

発育阻止効果は培地の pH によって若干異なり、FF 単独添加では pH 5.9 以上の場合、0.31 ppm で完全に発育を抑制したにもかかわらず、pH 7.3 の場合には、抑制に4倍濃度の 1.25 ppm を必要とした。

SOA 単独添加では、pH 5.5 の場合0.1~0.2%で発育が阻止され、両者併用の場合は FF 単独添加の場合と同一結果であった。なお対照に用いた標準菌株はいずれも分離菌株と同一態度を示した。

Table 3. Biological and Biochemical Characters of Anerobic Bacteria Isolated from Vienna Sausage

Strain No.	Gram stain and morphology	Aerobic incubation	Gelatin	Glucose	Lactose	Sucrose	Mannitol	Indol	Motility	Milk	Lecithinase	Inhibition by <i>C. welchii</i> α-antitoxin	Serotype of Hobbs (1~17) (type)	Heat resistance	
														75°C for 20 min	100°C for 60 min
31	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	Untypable	+	-
32	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
34	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
36	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
37	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
39	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
40	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
61	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
62	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
80	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
81	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	"	+	-
NCTC 8238	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	Type 2	+	+
NCTC 8798	+ Rod	-	+	+	+	+	-	-	-	St	+	+	Type 9	+	+

St, stormy fermentation

Table 5. Effects of FF and SOA on the Growth of *C. welchii*

Food preservatives	Stored temp.		30°C	10°C
	Isolated method	pH		
Control		5.7	+	+
		6.5	+	+
FF 1.25 ppm		5.7	+	+
		6.5	+	+
FF 5.0 ppm		5.7	—	—
		6.5	—	—
FF 1.25 ppm + SOA 0.05%		5.7	+	+
		6.5	+	+
FF 5.0 ppm + SOA 0.2%		5.7	—	—
		6.5	—	—

30°C, stored for 1 week; 10°C, stored for 3 weeks

4. 試作ウインナーソーセージ中に接種したウェルシュ菌 (NCTC 8238) に対する FF, SOA の発育阻止効果

試作したウインナーソーセージの加熱前に NCTC 8238 株の24時間培養菌の希釈液を注射器を用いて 10⁸/g になるように接種し, 所定の加熱を行って製品とした検体を用いて, FF, SOA の制菌の効果について検討した. その結果を Table 5 に示した.

30°, 10°保存とも FF 1.25 ppm, SOA 0.05% 添加以下の場合, 製品の pH に関係なくいずれも検出されたが, FF, 法的許容限界の 5 ppm 添加では30°, 10°保存とも検出されなかった.

5. 試験管内におけるウェルシュ菌に存する FF, 亜硝酸塩併用添加の発育阻止効果

最近食肉製品などに発色剤 (欧米においてボツリヌス菌の発育抑制のためにも使用している) として古くから使用されている亜硝酸塩が食品中の第二級アミンと反応して, 発ガン物質であるニトロソアミンを生成することが問題となっている^{7)~10)}. そこでウェルシュ菌に対して発育阻止効果のある FF に亜硝酸塩を併用することにより, 亜硝酸塩の添加量を減少することが可能であるか, 否かについて検討した. その結果を Table 6 に示した.

供試菌としては, 分離菌 1 株と標準菌 2 株を用いた. 培地中の FF の添加量は Table 4 に示した結果を参照して, 最少発育阻止濃度前後 (0.62 ppm) を上限とし, 倍数希釈法によって 0.0025 ppm までの 9 段階とした. 亜硝酸塩の添加量は法的許容限界の 70 ppm を上限と

し, 倍数希釈法によって 8.8 ppm までの 4 段階とした.

Table 4 に示したとおり FF, 亜硝酸塩とも単独添加では FF の一部を除いては, 発育阻止効果はいずれも認められなかったが, 両者の併用によって, はじめて相乗効果が認められ, 特に培地の pH が5.9以下の場合に顕著であった.

例えば, pH 7.3 の場合, FF 0.16~0.31 ppm と亜硝酸塩 35~70 ppm の併用で発育阻止効果が認められたのに対し, pH 5.9 以下では, FF 0.04 ppm と亜硝酸塩 8.8 ppm 添加で同様の発育阻止効果が認められた.

考 察

市販品から FF, SOA 無添加品を入手し, ウェルシュ菌の検出, 分離を試み, さらに分離菌および標準菌を用いて, 法的に許可されている FF, SOA の発育阻止効果について, 試験管内実験および試作品への接種試験によりその効果を再確認するとともに, 亜硝酸塩の本菌に対する発育阻止効果について検討した.

そもそも食肉およびその加工品, 鶏肉などの未調理食品には, その原料と汚染源との関係からウェルシュ菌が容易に検出されるであろうことは想像される. すでに MacKillop ら²⁾は, これらの食品原料などの約72%以上は易熱性ウェルシュ菌の汚染を受けていることを報告し, 善養寺ら⁴⁾も市販肉から23, 加工品から19%, 本菌が検出されたことを報告している. また易熱性ウェルシュ菌による食中毒の危険性は, すでに Hall ら¹¹⁾, Sutton ら¹²⁾によって指摘され, Hauschild¹³⁾は人体実

Table 6. Inhibitory Effects of FF and NaNO_2 on the Growth of *C. welchii*

[illegible]

験によってこれを実証し、我が国でも中津川¹⁴⁾が易熱性菌による食中毒例を報告しているなど、本菌による食中毒発生の危険性が十分あることは想像にかたくない。その意味で畜産食品に対しては本菌による汚染防止のための十分な対策樹立が必要と思われる。

この点今回の成績では検出されたウェルシュ菌が易熱性であり、いわゆる Hobbs の型別には属さないものであったが、製品中に本菌に対して発育阻止効果のある物質が添加されていない場合にのみ検出され、添加品からは検出されなかったことから、FF および SOA は本菌に対して発育阻止効果を有することが示唆された。

ウインナーソーセージから 75°, 20 分の加熱で生残するような易熱性ウェルシュ菌が検出されたことは、原料中にウェルシュ菌の汚染を受けた場合、現在の製造基準が低温殺菌またはそれと同等の加熱殺菌が義務づけられていることを考えれば、易熱性とはいえ、その程度の加熱では死滅しない菌が検出されるのは当然である。

しかし本菌の耐熱性を検討する場合、すでに西田¹⁵⁾が指摘しているように、特に芽胞形成の有無、数について十分な注意のもとに実験を行わないと、耐熱性菌を易熱性菌と誤って判定する可能性が大きい。この点今回の分離菌に対する耐熱性試験において、芽胞形成のための最適培地といわれている Kim の培地を種々検討しながら実験を行ったが耐熱性菌ではなかった。また対照として供試した標準菌は耐熱性菌であるにもかかわらず、100°, 60分加熱ではしばしば死滅する結果を得、この種の試験に当たっては芽胞形成に対する十分な配慮のもとに実験を行うべきであることを痛感した。

FF や SOA などの細菌に対する発育阻止効果を検討する場合、その活性が培地の組成、pH などにより著しく影響を受けることは、すでに多くの研究者^{16)~18)}によって指摘されているが、河端¹⁹⁾は嫌気性菌に対する発育阻止効果と培地成分の影響に関する実験において、FF の本菌に対する最少発育阻止濃度は、チオグリコレート培地では 4 ppm であるのに対し、ブレインハートインヒュージョンブロスでは 0.5~1 ppm であり、この相違は前者の培地中に含まれている還元物質によって FF が失活させられるためであると指摘している。我々が本実験にチオグリコレート培地を用いなかったのは、上記の理由によるものであるが、従来この一連の研究に用いてきたトリプチケースソイブロスはブレインハートインヒュージョンブロスと同様に使用できるものと考えられる。

FF, SOA のウェルシュ菌に対する発育阻止効果はウインナーソーセージ中の他の常在菌と同等に期待できるところであるが、pH が酸性側の場合、特に効果が顕著である点を考慮して、製品の保存性に対して大きく役立っている至適 pH 5.7~5.9 の設定は、ウェルシュ菌に対しても同様の効果を発揮するものと思われる。

試験管内実験におけるウェルシュ菌に対する FF の最少発育阻止濃度 (0.31 ppm) と製品中に接種したウェルシュ菌に対する阻止濃度に約10倍以上のひらきがあり、FF 5 ppm 添加でなければ完全に発育が阻止できなかったのは、すでに小島^{20), 21)}が述べているとおり、FF の製品中の残存量は、加熱によって失活され約50%しか残存しないことと、今回の実験は液体培地を使用し、供試菌と薬剤の接触が十分均一に行われるようにしたのに対し、製品中ではこの点が必ずしも保証されていないためと考えられる。したがってもし寒天平板法によって検討すれば、薬剤と菌の接触面の相違から考えて、この両者の阻止濃度の差は縮小されるものと考えられる。

亜硝酸塩の食肉製品への添加は、発色剤およびボツリヌス菌の発育阻止剤として古くから使用されているが、食品中の第2級アミンと反応して発ガン物質を形成することから^{7)~10)}、現在の許容量 70 ppm (残存量として) をさらに少なくしようとする試みがなされ、すでに河端¹⁴⁾はボツリヌス菌を用いた実験で FF との併用により亜硝酸塩の添加量を減らすことが可能であると報告している。今回のウェルシュ菌について行った実験においても全く同じ傾向のあることが分かり、亜硝酸塩の添加は可能なかぎり減少させるべきである。

要 約

我々は、一般市販ウインナーソーセージのうちから FF, SOA を添加していないものを入手し、ウェルシュ菌の検出、分離を試み、分離菌などを用いて、試験管内における FF, SOA さらには亜硝酸塩の本菌に対する発育阻止効果および試作ウインナーソーセージに耐熱性ウェルシュ菌を接種して、実際の FF, SOA の効果について実験を行い、次のような結果を得た。

1. ウインナーソーセージから分離した嫌気性菌は 100°, 60分加熱で死滅するいわゆる易熱性ウェルシュ菌で、血清学的には Hobbs 型に型別されるものではなかった。
2. 試験管内実験において、分離菌株は FF 0.31~1.25 ppm, SOA 0.2% 添加により発育が阻止され、pH を 5.7~5.9 に設定することによりさらに阻止効果は増強した。
3. 試作ウインナーソーセージに接種した耐熱性ウェルシュ菌は、FF 5 ppm 添加により発育が阻止された。
4. 亜硝酸塩の添加は、FF の添加および至適 pH (5.7~5.9) の設定との併用により 17.5 ppm 以下にすることが可能である。

なお、本報の要旨は日本食品衛生学会第25回学術講演会(昭和48年5月、東京)において発表した。

文 献

- 1) 鈴木 昭, 小沼博隆: 食衛誌, 12, 1 (1971).
- 2) 小沼博隆, 鈴木 昭: 同上, 15, 232 (1974).
- 3) McKillop, E. J.: J. Hyg., 57, 31 (1959).

- 4) 善養寺 浩: 食品衛生研究, **19**, 546 (1969).
- 5) 赤真清人, 亀山昭一: メディアサークル, **56** (1969).
- 6) Kim, C. H., Cheney, R., Woodburn, M.: Appl. Microbiol., **15**, 871 (1967).
- 7) Magee, P. N., Barnes, J. M.: Adv. in Carser Res., **10**, 163 (1967).
- 8) Lijinsky, W., Epstein, S. S.: Nature, **225**, 21 (1970).
- 9) 石館守三: 食衛誌, **12**, 149 (1971).
- 10) 河村太郎, 堺 敬一, 宮沢文雄, 和田 裕, 伊藤 誉志男, 谷村顕雄: 同上, **12**, 394 (1971).
- 11) Hall, H. E., Argelotti, R., Lewis, K. H., Foster, M. J.: J. Bact., **85**, 1094 (1963).
- 12) Sutton, R. G. A., Hobbs, B. C.: J. Hyg., **66**, 135 (1965).
- 13) Hauschild, A. H. W., Thatcher, F. S.: J. Food Sci., **32**, 467 (1967).
- 14) 中津川修二, 赤羽荘資, 浅川 豊: 食衛誌, **13**, 542 (1972).
- 15) Nishida, S., Seo, N., Nakagawa, M.: Appl. Microbiol., **17**, 303 (1969).
- 16) 河端俊治, 植松智之, 古庄一夫: 日水誌, **32**, 892 (1966).
- 17) 谷口忠敬: 食衛誌, **11**, 103 (1970).
- 18) 松田敏生, 小島 渥: 日水誌, **31**, 208 (1965).
- 19) 岡田 稔, 横間源延, 高畑京二: 食品工誌, **13**, 172 (1966).
- 20) 小島 渥, 松田敏生: 日水誌, **31**, 214 (1965).
- 21) 小島 渥, 松田敏生: 同上, **31**, 459 (1965).