

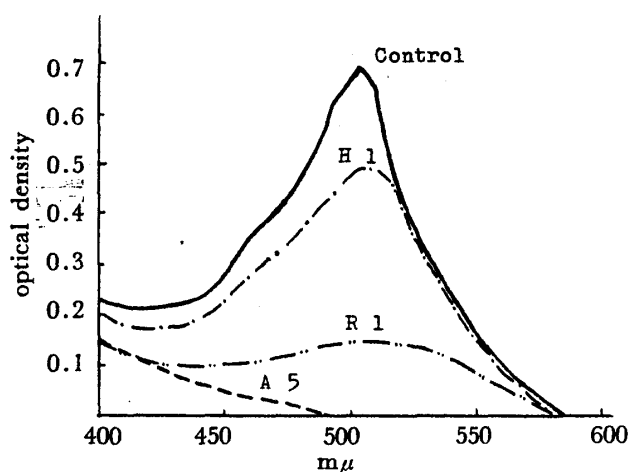


Fig. 3. Change in absorption spectrum of food red No. 101 (Ponceau R) added to cultures of some bacteria.

Culture medium : 0.5% peptone, 0.5% meat extract, 0.001% Ponceau R, adjusted at pH 7.0 with NaOH. Culture : 4 days at 37°C.

なわち実験条件下大部分の菌株では赤色101号の510 mμ 附近の吸収極大の低下ないしは消失が観察されたが, *B. circulans* Q1株, *B. coagulans* G2, *Ach. iophagus* II, S10株は変化を認めなかつた. 赤色106号色素はいずれの供試菌株によつても退色はみとめられなかつた.

分離菌株の大多数は *B. circulans* であり, 何れも胞子の形では魚肉ソーセージの殺菌条件にたえることより緑色斑点型腐敗の原因の主たるものは *B. circulans* による1次汚染であると云うことができよう. しかし耐熱性は弱い再現性のある *M. candidus* を唯一例であるが分離したことから2次汚染による緑色変敗のあることも否定できない.

要 約

魚肉ソーセージの緑色斑点型腐敗につき検討した結果次の事実を明らかにした.

1. 緑色斑点型腐敗は表在的なもので, 著者らが取扱つた大多数の試料では斑点部分に 10^4 /g以上の生菌数を認めた.
2. 緑色斑点部より分離した菌株は大部分 *Bacillus circulans* で他に *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Micrococcus candidus* ならびに *Achromobacter iophagus* が認められた.
3. 分離菌株のうち *B. circulans* の大部分, *B. subtilis*, *M. candidus* が魚肉ソーセージでの再現性が認められたが, 緑色斑点型腐敗の主たる原因細菌は *B. circulans* であると云うことができる.

本報告は昭和37年4月29日, 日本農芸化学会大会において講演した.

文 献

- | | |
|---|--|
| (1) 高田, 照井, 梶山: 本誌, 41 , 19 (1963). | ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore (1957). |
| (2) Smith, N.R., Gordon, R.E., Clark, F.E.: <i>Aerobic Sporeforming Bacteria</i> , 40, U.S. Department of Agriculture, Washington (1952). | (4) Gordon, R.E., Smith, N.R.; <i>J. Bact.</i> , 58 , 327 (1949). |
| (3) Breed, R.S., Murray, E.G. D., Smith, N.R.: <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> , 7th | (5) 赤松: 日水会誌, 25 , 549 (1959). |
| | (6) 横関, 内山, 馬見: 日水会誌, 24 , 156 (1958). (昭和 37, 11, 29 受付) |

[醸工 第41巻, 第1号, p. 31~39, 1963]

魚肉ソーセージの保存性に関する研究

(第 3 報) 魚肉ソーセージの斑点状変敗の防止について

芝 崎 勲・照 井 堯 造 (大阪大学工学部醸酵工学教室)

Studies on the Preservation of Fish Sausage (III)
On Some Preservatives Effective Against Spot-Type Spoilage

Isao Shibasaki and Gyoza Terui
(Dept. Ferment. Technol., Facult. Engin., Osaka Univ.)

Some nitrofuran derivatives and sorbic acid are widely used as preservatives in fish sausage-making. In the heat sterilization process in fish sausage-making, most of the microbial cells present in the raw materials are killed at a temperature higher than 80°C in the presence of these drugs, which are effective in preventing growth of survivors during storage.

Despite the fact that the use of these antimicrobial substances, especially nitrofuran derivatives, has contributed greatly to the preservation of the product, troubles have recently arisen over the spoilage of softening and spot-forming types.

In this paper, antibacterial activities of some drugs (cf. Table 2) are investigated employing bacteria isolated from spots having various appearances. As expected, the isolates are highly resistant to nitrofurazone (F), nitrofurylacrylamide (Z) and other food preservatives which have been used in making fish sausage. But, these organisms are relatively sensitive to tylosin. Also 2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF2) has the remarkable bacteriostatic effect on the above isolates. The effects of pH and the concentration of spores upon the effective inhibitory concentration of nitrofuran-derivatives and tylosin, and the effect of these drugs used in combination with other food preservatives are presented in Table 5, 6.

AF2 and tylosin are shown to be very effective preservatives for the present purpose through experiments with fish sausage previously inoculated with spores of the above bacteria; at a concentration between 10 and 20 µg/g, the sausage can be preserved for 30 days or more at 37°C (Table 7, 8).

緒 言

魚肉ソーセージの腐敗型式については清水¹⁾, 相磯²⁾により5つに区分せられ, 夫々その原因細菌としては *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* が示されている (Table 1 参照).

種々の型式による魚肉ソーセージの変敗は加熱処理と共に食品添加物として許可されているナイトロフラン誘導体およびソルビン酸(その塩類)

の添加により防止することができ, 魚肉ソーセージ生産に多大の貢献をなしてきた.

しかし防腐剤添加魚肉ソーセージにおいても時に軟化や2次汚染による変敗の起る場合も認められ, また最近ソーセージ表面に生ずる斑点型変敗も問題視されている. 軟化現象の防止に関しては内山ら³⁾の研究があり, 最近谷川ら⁴⁾も検討を加えている.

斑点型変敗に関しては未だ十分なる研究がなされていないし, したがってまた適確な防止法も確立されていない.

高田らは1961年以来斑点状変敗の原因細菌を多数分離し, これらの菌学的諸性質を検討して分類学上の位置を決定した⁵⁾. 著者らはこれら原因細菌に対する防腐について基礎的な研究を行い, さきに報告した新ナイトロフラン誘導体 (AF2)⁶⁾ならびに最近食品防腐剤として注目されている抗生物質 tylosin⁷⁾の添加によりこれら変敗を防止することができたので, ここにその結果の概要を報告する.

実験方法

供試薬剤は Table 2 に示した. AF2, AF5 は上野製薬, tylosin は Eli Lilly & Co. より提供されたものであ

Table 1. General types of spoilage in fish sausage.

Type	Spoilage	Bacteria isolated
Swelling	Natural putrefaction producing ammonia and other gases	<i>Lactobacillus</i> ; <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>butyricum</i> ; <i>Micrococcus</i>
Sour	Production of acids and sour taste	<i>Lactobacillus</i>
Softening	Softening to the muddy state	<i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus</i> sp.
Discoloration	Change in color (yellowish white color)	<i>Streptococcus</i>
Slime formation	Secondary spoilage	<i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>

Table 2. Drugs employed.

Abbreviation	Drug
F	Nitrofurazone
Z	5-Nitro-2-furylacrylamide
AF2	2-Furyl-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide
AF5 (panfuran)	3-Amino-6-(5'-nitro-furyl-2'-ethenyl) 1, 2, 4-triazine hydrochloride
BpHB	Butylp-hydroxybenzoate
S	Potassium sorbate
DHA	Sodium dehydroacetate
B	Benzoic acid or its sodium salt
K ₈	2-Methyl-1, 4-naphthoquinone
EDTA	Ethylenediamine tetraacetate
Tylosin	Tylosin lactate (Eli Lilly and Co.)

Table 3. Antibacterial activity of drugs employed on various bacteria isolated from brown spot.

a) Medium : glucose-bouillon (pH 6.8), 45-48°C, 4 days.

Test organism	Complete inhibition concentration (μg/ml)				
	F	Z	AF2	BpHB	S
<i>B. megaterium</i> E	100	12.5	6.25	200	2000
<i>B. megaterium</i>	100	25.0	1.6	200	2000
<i>B. megaterium</i> B	100	12.5	3.2	>200	2000
<i>B. coagulans</i>	100	12.5	6.25	>200	2000
<i>B. coagulans</i> J	100	12.5	6.25	>200	>2000
<i>B. coagulans</i> F	100	25.0	12.5	>200	2000
<i>B. coagulans</i> K	>100	12.5	1.6	200	2000
<i>B. cereus</i> Q	>100	25.0	3.2	>200	2000
<i>B. cereus</i> G	100	25.0	12.5	>200	>2000
<i>B. subtilis</i> O	100	6.25	3.2	200	2000
<i>B. subtilis</i> P	6.25>	1.6>	0.8>	200	2000
<i>B. subtilis</i> L	12.5	1.6>	0.4>	>200	1000
<i>B. subtilis</i> N	6.25>	1.6>	0.4>	200	2000
<i>Cellulomonas fimi</i> S*	>100	12.5	6.25	>200	>2000
<i>Cellulomonas fimi</i> M*	100	25	3.2	200	2000
<i>Pr. rettgeri</i> H*	50	25	3.2	>200	1000

* incubated at 37°C.

b) Medium : glucose-bouillon (pH 6.6), 37°C, 2-4 days.

Test organism	Complete inhibition concentration (μg/ml)		
	Tylosin	AF 2	AF 5
<i>B. megaterium</i> E	0.62≥	12.5	5
<i>B. coagulans</i> F	0.62≥	15	5
<i>B. cereus</i> Q	1.25	2.5	2.5
<i>B. megaterium</i> B	1.25	5.0	5.0
<i>B. subtilis</i> 8039 *	1.0	0.25-0.5	0.1
<i>B. "</i> 8104 *	1.0	"	"

* From the culture collection in our department.

る。何れも無菌水またはプロピレングリコールに溶解したものを原液とした。

供試細菌は高田ら⁵⁾が市販魚肉ソーセージより分離、同定した褐色および緑色斑点変敗細菌である。

試験管内での抗菌作用は主として常法による倍数希釈法を採用し、培地としては pH 6.6~6.8 に調整した加糖ブイヨン、またはこれに酵母エキスを添加したものをを用いた。前培養は同上寒天斜面培地で、適温、1~2 日培養したものを無菌水に浮遊せしめたものより 1 白金耳宛を 5 ml 培地に接種した (接種量約 10²/ml)。また胞子は同上寒天斜面培地で、適温、7 日培養し、これを pH 7.0 の磷酸緩衝液に浮遊せしめ、

90°C 5~10 分加熱処理したものを一定量宛接種した。

魚肉ソーセージは工場の原料配合をそのまま用い、これに孢子浮遊液と薬剤粉末あるいはその濃厚溶液を添加し、5~7 分混和後、手動充填機にてクレハロンケーシングに充填し、90°C 60 分間殺菌した。試料の保存温度は 37°C とし、主として官能検査により防腐効果の判定を行なった。

実験結果

1. 褐色斑点形成細菌に対する抗菌作用

褐色斑点変敗試料より分離、同定された 16 菌株を供試して試験管内での供試薬剤の静菌作用について検討した結果を Table 3 に示した。これら 16 菌株の内、*B. subtilis* 4 株と *Proteus rettgeri* とは斑点形成の再現性は認められていないが、他はすべて再現性が確認されたものである。

これらは何れもナイトロフラン誘導体添加魚肉ソーセージより分離されたものであるから当然これらに対し抵抗性を示すものと予想される。Table 3 a) より明かな様に 45~48°C (ただし *Cellulomonas*, *Proteus* は 37°C)、4 日後の完全発育阻止濃度は F...≥100, Z...12.5~25, AF2 1.6~12.5, BpHB≥200, S...≥2000 μg/ml

Table 4. Antibacterial activity of some drugs on various bacteria isolated from green spot.

a) Medium : glucose-bouillon (pH 6.8), 37°C, 4 days.

Test organism	Drug	Complete inhibition concentration (μg/ml)							
		F	Z	AF2	S	DHA	BpHB	B	K _s
<i>B. circulans</i> O-1		50	12.5	1.25	>2000	>2000	200	—	—
<i>B. circulans</i> S-1		50	25	1.25	>2000	>2000	200	—	—
" O-7		50	6.2	0.62	>2000	1000	200	>2000	50
" B-2		50	3.1	1.25	>2000	2000	200	>2000	50
" M-1		50	12.5	0.62	>2000	>2000	200	>2000	50
" U-1		50	25	0.8	>5000	5000	100	>4000	100
" Y-1		50	25	1.6	>5000	5000	200	>4000	50
" A-5		25	12.5	0.8	>5000	5000	200	>4000	50
" H-3		100	12.5	1.6	>5000	2500	200	4000	25
<i>B. subtilis</i> T-4		25	3.1	0.4	>5000	5000	200	4000	25

b) Medium : glucose-bouillon (pH 6.6), 37°C, 4 days.

Test organism	Drug	Complete inhibition concentration (μg/ml)		
		Tylosin	AF2	AF5
<i>B. circulans</i> Y-1		2.5	0.62	0.31
" H-3		1.25	1.25	0.31
" S-1		5.0	0.62	0.31
" U-1		5.0	0.62	0.31

Z...3.1~25.0 μg/ml であったが, AF2 に対しては比較的感受性がたかく, 1.0 μg/ml 前後で発育が阻止された。その他の薬剤に対しては褐色斑点細菌と同様で, S, B, DHA...≥2000, BpHB...200, K_s...25~100, EDTA...250~500 μg/ml の発育阻止濃度を示した。Table 4 b) には AF2, AF5, tylosin の三者を比較した結果を示したが, AF5 は AF2 の 1/2 濃度で有効であったが, tylosin では 1.25~5.0 μg/ml と少々高い値が示された。

Table 5. Antibacterial activity of some drugs on spores of bacteria from brown spot.

(a)

<i>B. subtilis</i> 8104				<i>B. cereus</i> Q			
Condition	Drug	Inoculum No./ml	Complete inhibition conc. (μg/ml)	Condition	Drug	Inoculum No./ml	Complete inhibition conc. (μg/ml)
Glucose-bouillon-yeast extract agar medium (pH 6.8), 37°C, 5 days	F	2.1 × 10 ⁶	10.0	Glucose-bouillon-agar medium (pH 6.8), 43-44°C, 6 days			100 >> 40
		2.1 × 10 ⁴	5.0				
		2.1 × 10 ²	5.0				
	Z	2.1 × 10 ⁶	5.0		Z	4.5 × 10 ⁶	20
		2.1 × 10 ⁴	0.6 >			4.5 × 10 ³	10
		2.1 × 10 ²	0.6 >			4.5 × 10 ¹	5
Glucose-bouillon-yeast extract medium (pH 6.8), 37°C, 7 days	AF2	2.1 × 10 ⁶	0.5		AF2	4.5 × 10 ⁶	2.5 ≥
		2.1 × 10 ⁴	0.25 ≥			4.5 × 10 ³	1.25 ≥
		2.1 × 10 ²	0.25 ≥			4.5 × 10 ¹	
	F	2.1 × 10 ⁶	40	Glucose-bouillon medium (pH 6.8), 43-44°C, 6 days			40
		2.1 × 10 ⁴	5				
		2.1 × 10 ²	5				
	Z	2.1 × 10 ⁶	10		Z	4.5 × 10 ⁶	40
		2.1 × 10 ⁴	0.6 ≥			4.5 × 10 ³	40
		2.1 × 10 ²	0.3 ≥			4.5 × 10 ¹	20
	AF2	2.1 × 10 ⁶	2.5		AF2	4.5 × 10 ⁶	10
		2.1 × 10 ⁴	0.1 ≥			4.5 × 10 ³	5
		2.1 × 10 ²	0.1 ≥			4.5 × 10 ¹	5

であつたが, *B. subtilis* では 4 菌株のうち 1 株を除いてはナイトロフラン誘導体に対し感受性が大であつた。

AF5 は一般保存菌株に対しては AF2 の 1/2~1/4 の低濃度で有効であるが, 供試褐色斑点細菌に対しては 2.5~5 μg/ml の完全発育阻止濃度を示した。

Tylosin は 0.62~1.25 μg/ml で完全発育阻止し, これは J.M. Mc Guire¹⁾などの示している値と同レベルであつた (Table 3 b) 参照)。

2. 緑色斑点形成細菌に対する抗菌作用

緑色斑点より分離し, かつ再現性の認められた 10 菌株に対する供試薬剤の完全発育阻止濃度は Table 4 に示した。F, Z に対しては何れも抵抗性が大で阻止濃度は F...25~100,

(b) Glucose-bouillon-yeast extract medium (pH 6.8), 43–44°C, 6 days.

<i>B. megaterium</i> E			<i>B. coagulans</i> K		
Drug	Inoculum No./ml	Complete inhibition conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Drug	Inoculum No./ml	Complete inhibition conc. ($\mu\text{g/ml}$)
Z	1.1×10^5	$100 \gg 40$	Z	1.4×10^5	$100 \gg 40$
	1.1×10^8	40		1.4×10^8	20
	1.1×10	20		1.4×10	10
AF2	1.1×10^5	20	AF2	1.4×10^5	20
	1.1×10^8	20		1.4×10^8	5
	1.1×10	5		1.4×10	2.5

3. 細菌胞子に対する作用

魚肉ソーセージはかまぼこと異なり80°C以上の高温にて加熱処理されるため、2次汚染がなければ細菌胞子のみが防腐剤の対象となるとみて差支えない。そこで細菌胞子に対する防腐剤の作用について胞子濃度、培地 pH などの影響を検討した。

a) 胞子濃度の影響

市販魚肉ソーセージの製造直後の生菌数は $10^2/\text{g}$ あるいはそれ以下である。今これをすべて胞子と見做し、こ

Table 6. Influence of pH on the antibacterial activity of nitrofurantoin derivatives and tylosin.

a) Test organism : spores of bacteria from brown spots ($1-2 \times 10^4$ spores/ml).

Medium : glucose-bouillon, 43–44°C, 4 days.

pH of medium	<i>B. megaterium</i> E			<i>B. coagulans</i> K			<i>B. cereus</i> Q		
	F	Z	AF2	F	Z	AF2	F	Z	AF2
6.2	100	25	20	100	25	10	>100	50	20
6.5	100	25	20	100	50	25	>100	50	20
7.2	>100	25	20	>100	50	20	>100	50	20
7.5	>100	50	40	>100	50	20	>100	50	40
8.0	—	—	—	—	—	—	>100	>100	>40

b) Test organism : *B. circulans* U-1.

Medium : glucose-bouillon, 37°C, 3 days.

pH of medium	5.8	6.4	6.9	7.5	8.0
Drug employed	Complete inhibition concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
F	33	50	50	50	50
Z	12.5	12.5	12.5	25	25
AF2	0.625	0.625	0.625	1.25	2.5
AF5	0.31	0.31	0.62	2.5	2.5
Tylosin	10	5	2.5	2.5	1.25

c) Test organism : *B. cereus* Q vegetative cell and spores.

Medium : glucose-bouillon, 37°C, 3 days.

pH of medium Drug	Complete inhibition concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	5.8	6.4	6.9	7.5	8.0
AF2	10	10	20	20	20
AF5	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0
Tylosin	2.5	1.25	$0.31 \geq$	$0.31 \geq$	$0.31 \geq$

の前後の胞子濃度における薬剤の発芽阻止作用を検討した。この際ナイトロフラン誘導体に感受性のたかい *B. subtilis* の胞子を対照とし、褐色斑点細菌 *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. coagulans* の代表的菌株の胞子を供試した。この場合液体培地と固形培地とでは前者が少々抵抗性がたかく表われる傾向にあつた。これらの結果は Table 5 に示した。

胞子濃度が大となる程、薬剤の完全発芽阻止濃度は一般に大となるが、Table 5 より明かなように感受性菌と抵抗菌とではこの上昇割合が相違し、例えば *B. megaterium* の場合、阻止濃度は胞子数 $10^6 \sim 10^8/\text{ml}$ では感受性菌のそのの数倍であるが、低胞子濃度ではこの値が数十倍に達している。

褐色斑点細菌胞子の発芽阻止濃度は $10^1/\text{ml}$ 準位の胞子数でも Z...10~20, AF 2...2.5~5 $\mu\text{g/ml}$ を必要とすることが明かとなつた。

b) 培地pHの影響

培地 pH は薬剤の抗菌作用

に大なる影響を与えることが一般に認められており、ナイトロフラン誘導体⁶⁾では酸性に、tylosin⁷⁾ではアルカリ性に傾くにつれてその作用が増強されることが示されている。一方魚肉ソーセージでは原料魚種、その鮮度などにより pH の変動が大きく、磷酸塩などの添加によりある程度 control されているが、混合の不均一性のための局所的な pH の変動があるものと予想される。

Table 6 には褐色斑点ならびに緑色斑点細菌に対する pH の影響を調べた結果を示した。ナイトロフラン誘導体の発芽阻止作用は pH7.0 附近以上で著しい低下が認められた。Tylosin はすでに *St. aureus* について示されている結果⁷⁾と同様アルカリ側に傾くに従って作用力の増強がみとめられた。

Tylosin は pH5~7.5 の範囲ではきわめて安定であるが、AF2, AF5 は F, Z に劣り、とくに AF2 はアルカリ側では不安定であることが認められる。この点については十分の注意が必要である。

c) ナイトロフラン誘導体と他の薬剤との相互作用

褐色斑点細菌はナイトロフラン誘導体に対し著しい抵抗性を示すので、これが防腐作用の増強を計る目的で、他の薬剤の添加効果を検討した。すなわち孢子濃度 $10^4 \sim 10^5$ ml, 加糖ブイヨンあるいはこれに酵母エキスを添加した液体培地を用いて添加効果をしらべた。実験結果は省略するが、DHA, BpHB, EDTA が一応加成的あるいは相乗的な効果のある場合が多く、逆に $K_2S_2O_8$ は拮抗的な例が多かった。これらの結果よりナイトロフラン誘導体の防腐作用の増強が期待できるが、その有効性は魚肉ソーセージの防腐試験を行なつて確認する必要がある。

緑色斑点細菌に対しては試験管内での実験を省略し、直接魚肉ソーセージの防腐試験により添加効果を試験した。

4. 魚肉ソーセージの防腐試験

以上の実験により種々の斑点細菌に対して AF2, AF5, tylosin がすぐれた静菌作用を示すことが明かとなったので、これら代表的な斑点細菌を $10^2 \sim 10^4$ 孢子/g 接種した魚肉ソーセージを試製して防腐試験を行なつた。この場合 F + Z 製剤あるいは Z 単独を許可濃度の数倍量を添加した試料を対照とした。さらに F + Z に対し 2, 3 の薬剤が加成的あるいは相乗的な作用のあることも明かであるので、これらの点の確認のための防腐試験をも併せ行なつた。

a) 褐色斑点細菌接種の場合

3~4 菌株の混合孢子を接種した場合の防腐試験結果の 1 部を Table 7 に示した。

Table 7. Preservation test for fish sausage inoculated with bacteria from typical brown spots.

Inoculum : mixed spore suspension of *B. megaterium*, *B. cereus* and *B. coagulans* ; $10^3 \sim 10^4$ spores per gram of fish sausage.

Storage : 37°C.

This type of spoilage was characterized mainly by the separation of slime, but typical brown spot formation occurred when inoculum size was very small.

Exp.	Drug	Spoilage				
		after 15 days	after 20 days	after 30 days		
1	F+Z (1:4) 80 μ g/g	++	+++	+++		
	F+Z (1:4) 80 μ g/g+S 2000 μ g/g	++	+++	+++		
	F+Z (1:4) 80 μ g/g+DHA 2000 μ g/g	++	+++	+++		
	AF2 40 μ g/g	—	—	—		
	AF2 20 "	—	—	+		
		after 20 days	after 30 days	after 40 days		
		spoilage	spoilage	pH	spoilage	pH

2	Z 100μg/g	+	++	4.6	##	4.6	
	Z 100μg/g+ AF2 20μg/g	—	++	5.6	##	4.8	
	“ + “ 10 “	++	++	4.7	##	4.6	
	AF2 40μg/g	—	—	6.4	—	6.4	
	20 “	—	—	6.2	—	6.3	
	Tylosin 20μg/g	—	—	6.4	—	6.3	
	10 “	—	—	6.4	—	6.3	
	5 “	—	—*	6.4	—*	6.2	
Exp.	Drug	after 15 days		after 25 days		after 40 days	
		spoilage	pH	spoilage	pH	spoilage	pH
3	F+Z(1 : 4) 80μg/g	++	4.6	##	4.6	##	4.4
	F+Z(1 : 4) 80μg/g+B2000μg/g	++	4.8	##	4.6	##	4.5
	F+Z(1 : 4) 80μg/g+B1000μg/g	++	4.8	##	4.5	##	4.6
	AF2 40μg/g	—	6.2	—	6.2	—	6.2
	20 “	—	6.3	—	6.2	+	5.7
	AF5 40 “	##	4.6	##	4.6	##	4.5
	20 “	++	4.6	##	4.5	##	4.4
	10 “	++	4.9	##	4.6	##	4.4
	Tylosin 20μ/g	—	6.4	—	6.2	—	6.3
	10 “	—	6.4	—	6.1	—	6.1

* formation of green spot

実験条件下ではとくに接種量の著しく少ない場合以外は外観的な変敗型式としては粘液の分離と pH の低下であった。対照とした Z あるいは F + Z (1 : 4) 添加試料は何れも 7 日～15 日で完全に変敗したが、AF2 の場合では 20 μ g/g 以上の添加で 37°C, 1 ヶ月以上防腐できた。S, DHA, B, EDTA などの添加は無効ないしは拮抗的にはたらくことが認められ、また Z + AF2 の場合も拮抗的な結果がえられた。

Table 8. Preservation test for fish sausage inoculated with bacteria from typical green spots.

Inoculum : mixed spore suspension of *B. circulans*, $10^8 \sim 10^4$ spores/g of fish sausage.

Storage : 37°C

This type of spoilage was characterized by the formation of light green spot on the surface of fish sausage.

Exp.	Drug	Spoilage				
		after 10 days	after 20 days	after 30 days		
1	F + Z (1 : 4) 80μg/g	++	+++	+++		
	F + Z (1 : 4) 80μg/g + BpHB 200μg/g	—	+	++		
	F + Z (1 : 4) 80μg/g + S 1000μg/g	—	+	++		
	F + Z (1 : 4) 80μg/g + DHA 1000μg/g	—	++	+++		
	AF2 40μg/g	—	—	—		
	20 //	—	—	—		
	10 //	—	—	—		
		after 15 days	after 25 days		after 40 days	
			spoilage	pH	spoilage	pH

2	F+Z(1:4) 80 μ g/g	++	++	5.2	++	5.8
	F+Z(1:4) 80 μ g/g+B 2000 μ g/g	—	—	6.2	—	6.1
	F+Z(1:4) 80 μ g/g+B 1000 μ g/g	—	+	6.2	++	5.9
	AF2 20 μ g/g	—	—	6.3	—	6.3
	10 "	—	—	6.2	—	6.1
	5 "	—	+	6.2	+	6.0
	AF5 20 μ g/g	++	++	5.6	++	5.4
	10 "	++	++	5.6	++	5.4
	5 "	++	++	5.8	++	5.6
	Tylosin 20 μ g/g	—	—	6.2	—	6.2
	10 "	—	—	6.2	—	6.2
	5 "	++	++	6.2	++	5.6

AF5は試験管内でえられた結果とは逆に40 μ g/gの添加濃度でも防腐効果は全くみとめられなかった。

Tylosin は10 μ g/g程度の濃度で有効なことが認められた。

b) 緑色斑点細菌接種の場合

緑色斑点細菌は褐色斑点細菌に比し薬剤抵抗性低く, Table 8 に示すように AF2, tylosin 何れも10 μ g/gで37℃, 1ヵ月以上防腐できた。しかしAF5の場合は前と同じく20 μ g/gでも対照のF+Zと大差がなかった。

F+Zの場合何れも37℃, 7~10日で緑色斑点の発生をみたが, これにS, Bを1000~2000 μ g/g添加するとき, 相当長期間斑点の発生を遅延せしめることができた。

以上の防腐試験の結果よりF+Zの添加許可濃度の4~5倍の高濃度の添加に依つても完全に防止できない褐色ならびに緑色斑点変敗がAF2, tylosinの添加により防止できることが明かとなった。さらに緑色斑点変敗はF+ZにSあるいはBを添加することによつてもある程度防止できることも認めた。

考 察

Table 1 に示したように従来報告されている魚肉ソーセージの変敗は普通の畜肉ソーセージやかまぼこの場合に類似する点が多いが, ケーシングの種類, 加熱処理条件の相違および防腐剤の添加などの点から変敗状況, 腐敗微生物の種類も異なるものと考えられる。

普通の *Clostridium* による自然腐敗や *Bacillus* による変敗は一般にナイトロフラン誘導体の添加により防止でき, その添加許可量の範囲内で相当長期間保存可能な魚肉ソーセージが製造市販されて来た。しかし原料や処理工程よりくる微生物の熱ならびに薬品抵抗性は必ずしも一定ではなく, 抵抗菌の混入や出現の可能性は十分考えられる。最近注目されている軟化現象やこの報文で取扱つた表在性斑点変敗はすべて十分な熱処理と充分量の防腐剤を添加した条件下で発生するもので, 明かに現用の防腐剤に抵抗性を有する細菌に起因するものと考えられる。従つてこれが防止対策としては新規な防腐剤の研究のみでなく, 原料, 処理工程などの面からも充分再検討をする必要がある。

著者らが取扱つた斑点状変敗は表面のみに起り, とくに保存温度の高い場合に頻発するものであるが, 変敗と云う点からみれば比較的軽微なものと云うことができる。分離, 同定された菌株は何れもナイトロフラン誘導体に抵抗性が強く, 就中褐色斑点細菌はナイトロフラン誘導体では第1級に属すると思われるAF2, AF5においても実験条件下で2~12.5 μ g/mlの高濃度を必要とすることが判明した。緑色斑点細菌はナイトロフラン誘導体に対し若干抵抗性は弱く, AF2, AF5では1.0 μ g/ml以下の低濃度で発育が阻止された。

Tylosin は *B. subtilis* に対しては0.39 μ g/ml, spore-forming aerobe (接種量(10⁴~10⁵))に対して2, 3の例外はあるが大体1~5.0 μ g/mlの完全発育阻止濃度が示されている⁷⁾。これらの値ならびにTable 3 b)の結果より, 斑点細菌はtylosinに対し特に抵抗性が大なるものでないといふことができる。唯ナイトロフラン誘導体とは逆に緑色斑点細菌の方が若干抵抗性が大であることが認められる。

その他の供試薬剤は一般に細菌に対し抗菌力の弱いものであるが, 斑点細菌はこれらに対し抵抗性がとくに強いとは云えない。

防腐試験では供試細菌の混合孢子をやや多量接種した条件下で行なつたが、対照の Z あるいは F + Z では 100 $\mu\text{g/g}$ 添加でも無効であつたが、AF2, tylosin は 10~20 $\mu\text{g/g}$ 添加にて相当長期の保存に耐えることが明かとなつた。

F は魚肉ソーセージなどの食品成分による抗菌力の低下は少ないが Z はこれら成分の影響が大きく、すでにかまぼこなどについてよく認められている事実である。AF2, AF5 は化学構造からみても、Z との類似性が予想せられ、AF2 の場合試験管内での有効濃度の数倍量の添加を必要とし、AF5 では適用濃度範囲では全く無効であつた。AF2, AF5 共に F, Z に比し加熱、pH に対する安定性が劣る点は考慮すべきであるが、90°C, 60 分の熱処理程度では著しい抗菌力の低下はみとめられないので、魚肉ソーセージ中のある種成分の拮抗による低下とみるべきで、この点ナイトロフラン誘導体の化学構造と安定性 (拮抗物質に対する) との関係はもちろん、食品防腐剤検索上からも興味ある問題である。これらの点については目下詳細に検討中である。

AF2 は Z のように食品成分により抗菌力が拮抗され、加熱、pH 変化に対する安定性は Z に劣るものである。さらに AF2 は着色物質であつて 20 $\mu\text{g/g}$ 程度の添加では相当の着色を示す欠点がある。しかしその防腐効果と共に毒性、とくに慢性中毒作用が、F, Z に比し著しく少ない点を考慮するとき、魚肉ソーセージの防腐剤として一応注目に価する薬剤と考えられる。

Tylosin は褐色斑点細菌に対しては AF2 より低濃度で有効であり、かつきわめて安定な物質である。一方毒性も低く (LD50 (ラット, 経口投与) 5g/kg, 400mg/kg を犬に 2 ヶ年以上投与して安全), 食品防腐剤として有望視されているものである。しかし erythromycin と cross resistance を示し、また耐性獲得現象もこれと同程度である結果が示されており、この点については今後さらに検討を要する問題である。

以上のごとく魚肉ソーセージは AF2 ないしは tylosin の適用によりきわめて苛酷な条件下でも長期保存可能であるが、この間の品質の劣化の問題は今後に残された大きな課題と考えられる。

総 括

魚肉ソーセージに発生する斑点状変敗の原因細菌に対し各種防腐剤の抗菌力を検討し、とくにナイトロフラン誘導体に対しては従来示されている細菌に比して 10 倍以上の抵抗性を有することを認めた。これら斑点状変敗の防止については、原因細菌を接種した魚肉ソーセージの保存試験の結果、2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF2) ならびに抗生物質 tylosin がすぐれた効果を示し、3-amino-6-(5'-nitrofuryl-2'-ethenyl)-1, 2, 4-triazine hydrochloride (AF5) は適用濃度範囲では無効であることを認めた。

本報告は日本農芸化学会大会 (昭37, 4, 29), 日本醸酵工学会講演会 (昭37, 11, 1) において発表した。

防腐試験に多大の便宜を与えられた林業産業大阪工場池口工場長、梶山技師ならびに薬剤などを提供下さった Lilly Research Laboratories の Dr. Bernard Malin, 上野製薬株式会社に深謝します。

文 献

- | | |
|---|--|
| (1) 清水等: 食糧科学研究所報告, 19号, 35, 44 (昭32). | Hoehn, M.M., Stark, W. M., Westhead, J., Wolbe R.N.: <i>Antibiotics & Chemotherapy</i> , 11, 320 (1961); Hamill. R.L., Haney, M.E., Stamper, M., Wiley P.F.: <i>ibid</i> , 328; Denny, C.B., Sharpe L.E., Bohrer, C.W.: <i>Applied Micro.</i> , 9, 108 (1961); Denny, C.B., Reed. J.M., Bohrer, C.W.: <i>Food Tech.</i> , 15, 338 (1961); Greenberg R.A., Silliker J.H.: <i>J. Food Science</i> , 27, 60, 64 (1962). |
| (2) 相磯: 応用微生物研究所シンポジウム第 2 集, 「微生物の生態」, 127 (1961). | (昭和 37, 11, 29 受付) |
| (3) 内山, 天野: 日水産, 25, 531 (1959). | |
| (4) 谷川, 秋葉: 日本農学会 大会 水産部会 講演 (1962). | |
| (5) 高田, 照井, 梶山: 本誌, 41, 19 (1963), 高田, 芝崎, 照井: 本誌, 41, 26 (1963). | |
| (6) 芝崎, 笠原, 照井: 本誌, 40, 36 (1962). | |
| (7) McGuire, J.M., Bonniece, W.S., Higgins C.E., | |