

【原著論文(一般論文)】

タンパク質分解および有機酸生成能に及ぼす発酵ソーセージの スターター菌株の影響

島田 謙一郎¹・菅野 紗彩¹・伊藤 綾¹・長谷川 隆則²・
韓 圭鎬¹・永田 龍二¹・福島 道広¹

¹ 国立大学法人北海道国立大学機構 帯広畜産大学, 北海道帯広市 080-8555

² 日本ハム株式会社中央研究所, 茨城県つくば市 300-2646

(2023.10.11 受付, 2023.10.16 受理)

要 約

発酵ソーセージは原料肉を発酵, 乾燥および熟成して製造する非加熱食肉の製品のため, 品質の安定化や安全性を保持するため細菌をスターターとして利用している。今回, 単菌のスターター菌株を接種した際に生成される有機酸の構成および濃度と, タンパク質分解との関係を検証するため, 市販されている菌株として *Staphylococcus carnosus* MIII, *Staphylococcus xylosus* DD-34 および *Lactilactobacillus sakei* D-1001 に加えて, 市販されていない *Lactilactobacillus sakei* H1204, *Levilactobacillus brevis* C1101 および *Lactiplantibacillus plantarum* HSK201 を使って発酵ソーセージを製造し, 一般生菌数, 乳酸菌数, 大腸菌群, pH, 有機酸分析, SDS-PAGE, ペプチド量および遊離アミノ酸を分析した。*S. xylosus* DD-34 および *S. carnosus* MIII 以外は, 熟成7日目の pH が5まで低下した。併せて乳酸菌数も最大となり, 菌叢は乳酸菌が優勢になっていることが推察された。pH の低下が著しいスターターでは有機酸のうち酢酸の割合が多かった。タンパク質分解ではペプチドの産生量および遊離アミノ酸の産生量でも *S. carnosus* MIII が最も優れていたが, それに準ずるペプチドおよび遊離アミノ酸の増加量を示した *L. plantarum* HSK201 および *L. sakei* H1204 もタンパク質分解活性が強いスターターとして期待できることが推察された。

食肉の科学 64(2), 119-126, 2023

キーワード: 発酵ソーセージ, スターター, 有機酸, タンパク質分解

緒 言

発酵ソーセージはドライソーセージまたはセミドライソーセージの一種であり, ヨーロッパ地中海沿岸を起源とする伝統的な発酵食肉製品である。発酵ソーセージは, 原料肉が非加熱の状態を発酵し, 熟成および乾燥されるため, その品質は原料肉あるいは製造過程において混入した微生物によって大きく影響を受ける。このため, 品質の安定化, 熟成期間の短縮および有害微生物の生育阻止などを目的として, 良質な発酵ソーセージより分離した細菌をスターターとして摂取する試みが1955年に初めて行われ, 以後工業的には微生物スターターカルチャーを使用する方法が一般化されている。これらのスターターカルチャーとしては, 乳酸菌, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, 酵母, カビなどが利用されるが,

中でも乳酸菌が最も重要であり, 多くの場合不可欠と考えられている^{1, 2)}。スターターとして接種された乳酸菌は, ソーセージ中で速やかに増殖して優勢となり産出される乳酸などの有機酸によって製品の pH が低下し, 他の微生物の生育しがたい環境を形成する¹⁾。また *Lactococcus* などの乳酸菌は, 乳酸以外にバクテリオシンなどの抗菌性物質を生産する³⁾。一般的に, 食肉は $10^3 \sim 10^4$ cfu/g の細菌に汚染されており, *Pseudomonas* などのグラム陰性菌や *Coryneforms* などのグラム陽性菌の比率が高い⁴⁾。また, *Salmonella* 菌や病原性のある *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* などの食中毒細菌が検出される場合もある。乳酸菌がもつ抗菌作用は, これらの腐敗原因菌や食中毒細菌の増殖を阻止し, 発酵ソーセージの安全

連絡者: 島田謙一郎 (fax:0155-49-5577, e-mail: kshimada@obihiro.ac.jp)

性を向上させるのに極めて重要である。

発酵ソーセージにおいても乾燥・熟成中にペプチドや遊離アミノ酸が増加することが知られている。Hierroら⁵⁾は、発酵ソーセージの乾燥・熟成工程におけるタンパク質分解は、ソーセージの食味性に関与する低分子ペプチドや遊離アミノ酸を増加させると報告しており、PezackiとPezackaら⁶⁾は、熟成中のタンパク質分解に伴う遊離アミノ酸の増加と蓄積が風味に関連するものとして重要であると報告している。

市販の発酵ソーセージ用スターターカルチャーでは、乳酸菌 (*Lactobacillus* と *Pediococcus*) とグラム陽性カタラーゼ陽性球菌 (*Staphylococcus* と *Kocuria*) を混合したものが多く、これらは発酵期間中に望ましい微生物反応を促すものが多い⁷⁾。しかし、スターター接種の有無に関わらず、完成品の主要細菌叢は乳酸菌で占められ⁸⁾、さらに乳酸菌を単独で用いた発酵ソーセージにおいても肉タンパク質の分解が生じ⁹⁾、非タンパク態窒素や遊離アミノ酸の増加を促進したこと¹⁰⁾が報告されている。以前、我々は市販の単一および混合スターター菌株を用いた際のタンパク質分解と遊離アミノ酸量について報告している¹¹⁾。しかし、乳酸菌が生成する有機酸の構成や濃度がどのような影響を与えるかよくわかっていない。

本研究では、スターター菌株を用いた独特な呈味の形成に重要なタンパク質分解に関して、ペプチド量および遊離アミノ酸の比較を行い、スターターのタンパク質分解能について検討した。さらにスターターにより生成される有機酸との関連性について検討した。

材料および方法

スターター

単菌のスターターとして、市販されているものは *Lactilactobacillus sakei* D-1001 (MMF-161, サンエイ糖化, 知多), *Staphylococcus carnosus* MIII (S-B-61 Bacterm, Chr. Hansen GmbH, Polheim) および *Staphylococcus xylosum* DD-34 (S-SX Bacterm, Chr. Hansen GmbH, Polheim) を用いた。 *Lactiplantibacillus plantarum* HSK201, *Levilactobacillus brevis* C1101 および *Lactilactobacillus sakei* H1204 は日本ハム中央研究所より供試された。これらの供試菌株は MRS プロス (CM0361, OXOID) 10 ml に菌液 10 μ l を懸濁し、37°C で 24 時間前培養を行い、さらに 500 ml の MRS プロスに前培養液を懸濁し、3 日間・37°C で培養した。これを滅菌チューブに移し遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 40 分) を行い、上澄みを取り除き、滅菌水を加えて懸濁し、さらに遠心分離 (3000 rpm, 4°C, 40 分) を行った。

沈殿した菌株を採取し、スターターとした。

発酵ソーセージの製造

原料肉は豚モモ肉 (赤身 85% ブツ切り) をやまさミート (帯広) から購入した。これを 5 ~ 6 cm 角にカットし、この肉重量に対して食塩 2%, ブドウ糖 0.5%, オニオンパウダー 0.3%, ガーリックパウダー 0.2%, 黒コショウ 1%, 亜硝酸ナトリウム 0.001% になるように加えて塩漬し、1.5 kg ずつ小分けにして凍結した。また豚背脂肪についても 2 cm 角にカットした後、同様のスパイス配合で塩漬を行い 500 g ずつ小分けにして凍結した。次に半解凍した塩漬肉 1.5 kg と背脂肪 200 g をサイレントカッター (OMF-500D, 株式会社大道産業, 前橋) で 5 回転カットし、これにスターターカルチャードライ粉末を (市販品は用法通りに、供試菌株も肉 1 kg あたりに $10^9 \sim 10^{11}$ cfu) 30 ml 程度の水に溶かした懸濁液を加え、さらにサイレントカッターで 30 ~ 40 回転カットを行い細切・混和した。出来上がったソーセージミートをプラスチックバックに入れて、真空包装機で脱気した後スタッファーでファイブラスケーシング (4/5SDS, Viskase 社) に充填し、温度と湿度を制御した熟成庫 (Bio TRON, 株式会社日本医化器械製作所, 大阪) で 21 日間熟成を行い完成品とした。熟成工程は 25°C, 湿度 85 ~ 90% で 3 日間, 4 日 ~ 21 日目まで 15°C, 湿度 84 ~ 88% に設定した。懸垂場所は 1 日 1 回移動した。

試料採取

試料採取は製造日から 0, 3, 7, 14 および 21 日目に行った。微生物検査用および pH 測定用の試料は凍結せずに、採取当日に分析を行った。試料から有機酸、ペプチド量、遊離アミノ酸および筋漿タンパク質の SDS-PAGE 用の試料を採取し、分析まで -20°C で凍結保存した。

ペプチド量および遊離アミノ酸分析用の試料調製

細切した試料 5 g に 9 倍量の超純水を加えてヒスコトロン (NS-60, マイクロテックニチオン) によりホモジナイズし、この懸濁液を遠心分離した (1,2600 \times g, 0°C, 20 分)。上澄みは東洋ろ紙 No. 5C でろ過し、このろ液 4 ml と 4% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液 4 ml を混合し、37°C で 30 分間保持した。これを東洋ろ紙 No. 5C でろ過したものを 2% TCA 可溶性画分とした。ペプチド量はこれを試料とし、遊離アミノ酸量は、0.45 μ m でフィルターろ過したものを試料とした。

筋漿画分の試料調製

細切した試料 5 g に 3.5 倍量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) を加えてヒスコトロン (NS-60, マイクロテックニチオン) によりホモジナイズし, この懸濁液を遠心分離した (12,600 × g, 0°C, 20 分)。得られた上澄みは東洋ろ紙 No. 5C でろ過し, 筋漿画分とした。タンパク質濃度はビュレット法を用い, 検量線には牛血清アルブミン標準物質 (A3059, Sigma-Aldrich) を用いた。

SDS-PAGE 用試料調製

Ahn らの方法¹²⁾に従って, タンパク質濃度を測定した筋漿画分が 5 mM EDTA および 5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈し, 溶液組成が 1% SDS, 1% βメルカプトエタノール, 10%グリセリン, 5 mM EDTA および 5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) の組成になるように可溶化し, 攪拌後に沸騰水中で 2 分間加熱後, 速やかに冷却し, 0.1%プロモフェノールブルーおよび 50%グリセリンから成る溶液を 1/5 量加えて, 電気泳動用試料とした。筋漿タンパク質の最終濃度は 3 mg/ml とし, 分析まで -80°C で凍結保存した。

細菌検査用試料調製

試料 10 g を測りとり, 90 ml の滅菌生理的食塩水を加えてスマッカー (エクスナイザー 400, オルガノ株式会社) で 2 分間均質化を行い, 10 進希釈法で順次希釈し以下のように各種の細菌検査を行った。一般生菌数, 乳酸菌数および大腸菌群は培養後集落を計測し, 1 平板に 30 ~ 300 個の集落が得られたシャーレを採用し, 計測数に希釈倍数を乗じて検体 1 g 当たりの菌数とした。

一般生菌数

希釈試料 1 ml をシャーレに注加し, これに予め加温溶解しておいた約 40°C の標準寒天培地 (栄研器材株式会社) 15 ~ 20 ml を無菌的に流し込み, 試料とよく混和させた培地が完全に凝固した後シャーレを静置し, 37°C, 48 時間好気培養を行った。

乳酸菌数

MRS 寒天培地 (OXOID CM0361) を用い, 一般生菌数と同様に希釈平板法を用い, 37°C, 72 時間培養した。

大腸菌群数

クロモカルト COLIFORM 寒天培地 (MERCK) を用い, 希釈平板法で 37°C, 24 時間好気培養を行った。

pH 測定

細菌検査で用いた 10 倍希釈のホモジネート溶液を pH メーター (F-51, HORIBA) で測定した。

有機酸の測定

試料調製は Visessanguan らの方法に従い¹³⁾, 細切した試料 5 g に 9 倍量の蒸留水を加えてヒスコトロン (NS-60, マイクロテックニチオン) によりホモジナイズし, この懸濁液を遠心分離した (3,000 rpm, 25°C, 10 分)。その上澄み 0.9 ml に 0.1 ml のギ酸 (10 mg/ml) を内部標準として加え, さらに 0.5 N 過塩素酸 2 ml を加えて攪拌して 5 分放置し, 12,000 × g で 10 分間遠心分離を行い, フィルターろ過し (0.45 μm, Tosoh), プロモチモールブルーポストカラム法で HPLC 分析した (LC-10AD, Shimadzu)。

ペプチド量の測定

ペプチド量はローリー法を用い¹⁴⁾, 検量線作成には, 牛血清アルブミン標準物質 (A3059, Sigma-Aldrich) として用いた。

遊離アミノ酸量の測定

遊離アミノ酸量はニンヒドリン法¹⁵⁾によるアミノ酸分析計 (H8800F, 株式会社日立ハイテクフィールドイジング, 東京) を用いて測定した。標準物質には, アミノ酸混合標準液 H 型 (和光純薬, 大阪) を用いた。

SDS-PAGE

20 μg の SDS-PAGE 試料は, 12.5% ポリアクリルアミドの分離ゲルと 4% ポリアクリルアミドを濃縮ゲルとして Laemmli 緩衝液システムにより電気泳動に供試した¹⁶⁾。ゲルの染色は 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50%メタノールおよび 10%酢酸溶液で染色し, 脱色は 5%メタノールとおよび 7.5%酢酸溶液で行った。

統計処理

多重比較検定は SAS の Tukey 多重比較検定を用いて統計処理を行った。P 値は 5%未満を有意差ありとした。

結果および考察

6 種の単菌スターターで製造し, 熟成 21 日目までの pH, 一般生菌数および乳酸菌数の結果を図 1 に示した。pH の結果では, 熟成 0 日目では群間で差は見られず pH 5.78 ~ 5.97 を示した。熟成 3 日目にかけて *Lactilactobacillus* 属, *Levilactobacillus* 属および *Lacti-*

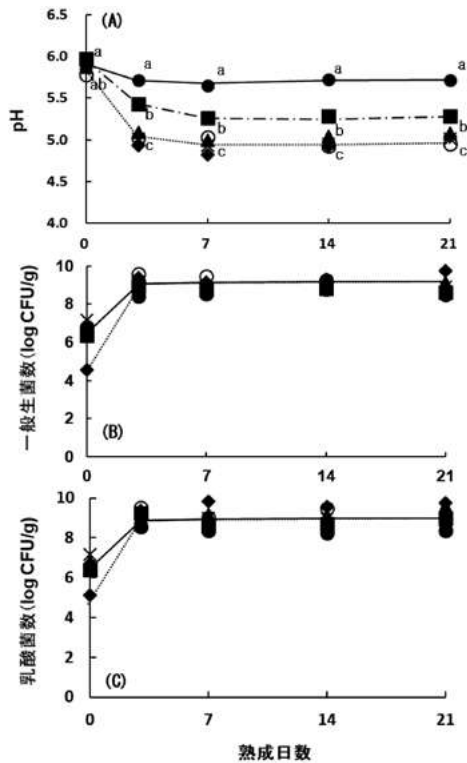


図1 熟成期間中のpH, 一般生菌数および乳酸菌数の変化 (A) はpH, (B) は一般生菌数および (C) は乳酸菌数の結果を示す。横軸は熟成期間を示し, 異なるアルファベットは Turkey 多重比較検定による有意差 ($p < 0.05$) を示す。平均値 ($n=6$) のみで示した。シンボルは● *S. xylosoy* DD-34, ■ *S. carnosus* MIII, ○ *L. sakei* D-1001, ◆ *L. sakei* H1204, × *L. brevis* C1101, ▲ *L. plantarum* HSK201 を示す。

plantibacillus 属の旧 *Lactobacillus* 属のスターターはすべて pH 4.93 ~ 5.09 まで急激に低下した。*S. xylosoy* DD-34 はほとんど pH の変化は認められなかったが, *S. carnosus* MIII は pH 5.43±0.04 まで低下した (図 1A)。一般生菌数は熟成 0 日目 4.54 ~ 7.16 log₁₀ CFU/g 程度から熟成 3 日目まで 8.40 ~ 9.58 log₁₀ CFU/g 程度まで増加し, 熟成 21 日目まで一定で推移した (図 1B)。乳酸菌数は熟成 0 日目 5.13 ~ 7.18 log₁₀ CFU/g 程度から熟成 3 日目まで 8.54 ~ 9.51 log₁₀ CFU/g 程度まで増加し, 熟成 21 日目まで一定で推移した (図 1C) ことから, 乳酸菌が優勢になっていることが示唆された。これらの変化は, これまでの発酵ソーセージの報告と一致する¹¹⁾。一方, 結果には示さないが, 大腸菌群についてはいずれも検出されなかった。

次に, pH の低下の原因としてスターターが生成する有機酸が影響していると推察されるため, 熟成日数ごとに有機酸 (乳酸, クエン酸, コハク酸, 酢酸) を分析した。これら 4 種の有機酸の総量を図 2 に示した。いずれの単菌スターターにおいても熟成 7 日目まで増加し,

それ以降は一定に推移した。pH では旧 *Lactobacillus* 属のスターター群が低い値を示し, 総量が多いものに相当しており, pH の低下が殆ど見られない *S. xylosoy* DD-34, もしくは中程度の *S. carnosus* MIII は総量が少ないことがわかった。さらにそれぞれの有機酸組成が影響を及ぼしているかを検討するため, 図 3 に熟成 21 日目における有機酸組成を示した。いずれの単菌スターターにおいても乳酸が 90% 程度を占めており, 次いでクエン酸, 酢酸の順に多く認められ, 各菌株により産生されたと示唆された。コハク酸については *S. carnosus* MIII 以外の発酵ソーセージで認められた。従って, *S. carnosus* MIII はコハク酸を産生しないと考えられた。また, pH が主に低下したスターターでは有機酸総量および酢酸の割合が多いものと一致しているように見受けられた。

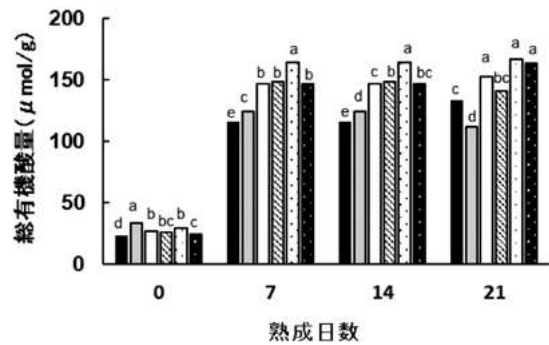


図2 熟成日数に伴う総有機酸量の変化

シンボルは■ *S. xylosoy* DD-34, □ *S. carnosus* MIII, ○ *L. sakei* D-1001, ◆ *L. sakei* H1204, × *L. brevis* C1101, ▲ *L. plantarum* HSK201 を示す。異なるアルファベットは Turkey 多重比較検定による有意差 ($p < 0.05$) を示す。値は平均値 ($n=9$) で示した。

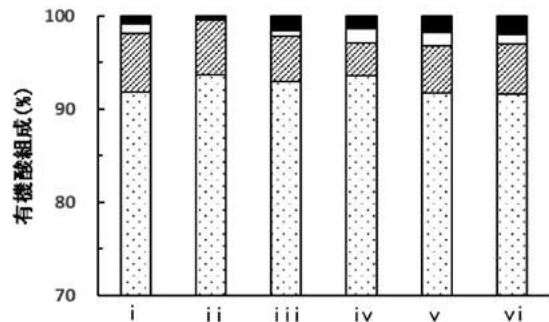


図3 熟成 21 日目の有機酸組成

i は *S. xylosoy* DD-34, ii は *S. carnosus* MIII, iii は *L. sakei* D-1001, iv は *L. sakei* H1204, v は *L. brevis* C1101, vi は *L. plantarum* HSK201 を示す。■は乳酸, ■はクエン酸, □はコハク酸, ■は酢酸を示す。値はそれぞれの有機酸の平均値 ($n=9$) から算出した割合で示した。

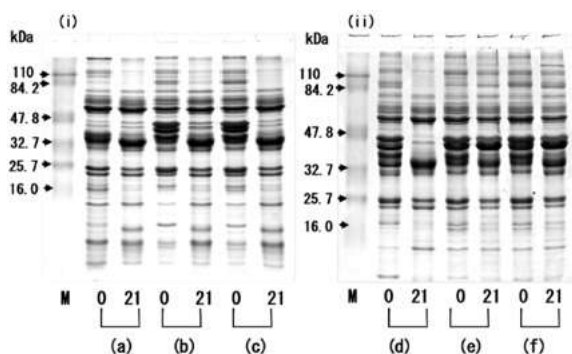


図4 筋漿画分の SDS-PAGE 像 (熟成 0 日目, 21 日目) 単菌スターターを用いて製造した発酵ソーセージの筋漿画分を 12.5% の SDS-PAGE に供した。(i) は *L. sakei* D-1001 (a), *L. sakei* H1204 (b), *L. brevis* C1101 (c) の 3 菌種を, (ii) は *L. plantarum* HSK201 (d), *S. carnosus* MIII (e), *S. xyloso* DD-34 (f) の 3 菌種を示し, それぞれ熟成 0 日目および 21 日目とした。M は分子量マーカー (MP-0120, protein marker prestained low range, Sigma Genosys) で, 上から phosphorylase B, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase II, soybean trypsin inhibitor A, lysozyme である。

次にタンパク質分解について検討するため, 熟成日数が 0 日目と 21 日目のそれぞれの試料から筋漿画分を調製して, 12.5% の分離ゲルを用いて SDS-PAGE で解析した (図 4)。熟成 0 日目および 21 日目のいずれのスターターにおいても, 30 ~ 50 kDa にかけてのバンド

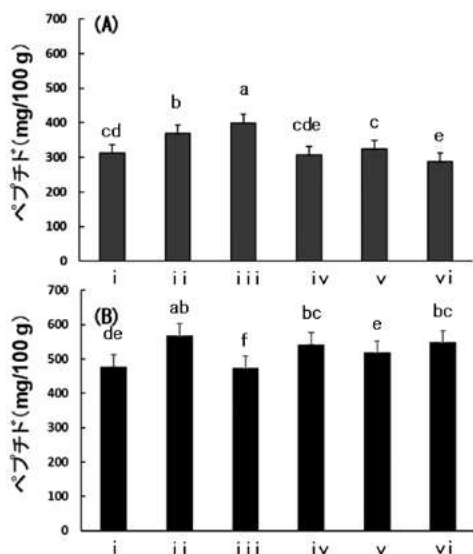


図5 熟成 0 日目と熟成 21 日目のペプチド量

(A) および (B) は熟成 0 日目および熟成 21 日目を示す。i は *S. xyloso* DD-34, ii は *S. carnosus* MIII, iii は *L. sakei* D-1001, iv は *L. sakei* H1204, v は *L. brevis* C1101, vi は *L. plantarum* HSK201 を示す。異なるアルファベットは Turkey 多重比較検定による有意差 ($p < 0.05$) を示す。値は BSA 換算とし, 平均値 ± 標準偏差 ($n=4$) で示した。

の染色強度が弱くなり, 16 kDa 付近のバンドの染色強度が強くなる傾向がみられた。また, 高分子のバンドが減少し, 低分子のバンドが増加する傾向が見られた。また, スターターごとに分離パターンが僅かに異なり, 同じ *L. sakei* であっても異なった (図 4 (i) の (a) および (b))。ただ, これら試料をさらに高分離の Tris-Tricine PAGE などの解析を行っていないために, これ以上のことは分からなかった。そこで, 遊離アミノ酸を分析するために調製した試料は除タンパク質操作を行った TCA 可溶性画分中を Lowry 法で測定した結果をペプチド量として図 5 に示した。熟成 0 日目を図 5A に, 熟成 21 日目を図 5B に示した。図 5A から分かるように単菌スターターごとにペプチド量はわずかに異なるが概ね 300 mg/100 g 程度であることが分かる。熟成 21 日目になると, 473.3 ~ 564.5 mg/100 g まで増加し, 中でも *S. carnosus* MIII, *L. sakei* H1204 および *L. plantarum* HSK201 が 550 mg/100 g 程度と高いペプチド量を示した。結果を図では示さないが, 熟成 21 日間におけるペプチドの増加量が最も高い単菌スターターは *L. plantarum* HSK201 で 260 mg/100 g で, 次に高い含量となったのは 235 mg/100 g の *L. sakei* H1204 であった。*S.*

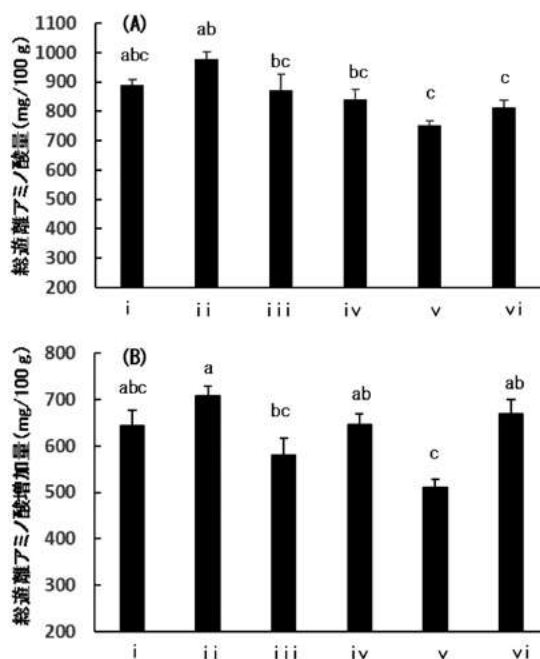


図6 総遊離アミノ酸量

(A) は熟成 21 日目の総遊離アミノ酸量を, (B) は熟成 0 日目から 21 日目にかけての増加量を示す。i は *S. xyloso* DD-34, ii は *S. carnosus* MIII, iii は *L. sakei* D-1001, iv は *L. sakei* H1204, v は *L. brevis* C1101, vi は *L. plantarum* HSK201 を示す。異なるアルファベットは Turkey 多重比較検定による有意差 ($p < 0.05$) を示す。値は平均値 ($n=3$) で示した。

carneus MIII は 195 mg/100 g となり、増加量では上述した 2 つに比べて劣る結果となった。*L. pluntarum* HSK201 及び *L. sakei* H1204 はいずれも pH が 5 を下回る程度まで減少し、ペプチドの増加量が多くなったことから内在性の酸性プロテアーゼであるカテプシン類の作用に依る可能性が考えられた¹⁷⁾。

ペプチド測定に用いた TCA 可溶性画分は遊離アミノ酸の分析に用い、17 種のアミノ酸を分析し、その合計を総遊離アミノ酸量とした。結果に示さないが熟成日数に伴い増加し、熟成 21 日目の結果のみを図 6A に示した。*S. carneus* MIII が熟成 21 日目の総遊離アミノ酸量は最も高い数値を示し、*S. carneus* MIII は *L. brevis* C1101 と *L. pluntarum* HSK201 に比べて有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。ペプチドの時と同様に熟成 0 日目から熟成 21 日目までの増加量で計算した結果を図 6B に示した。増加量でも *S. carneus* MIII が最も高い数値を示したが、*L. sakei* H1204 および *L. pluntarum* HSK201 も *S. carneus* MIII と統計的に有意差はなかった。Fadda らは発酵ソーセージより分離した *L. pluntarum* が筋漿タンパク質に高い分解活性を示したと報告¹⁸⁾しており、本研究で得られた SDS-PAGE に基づくタンパク質の分解性 (図 4) また、ペプチド増加量 (図 5) や遊離アミノ酸増加量 (図 6) の結果とよく一致すると思われた。

以上の結果より *S. carneus* MIII はペプチドおよび遊離アミノ酸の増加量はいずれも高い結果となり、*Staphylococcus carneus* を含む CNS (マイクロコッカス科のコアグラウゼ陰性ブドウ球菌) は硝酸還元能や脂質分解能の他にタンパク質分解能を有しており、食味性に関する重要な項目を向上させる働きをするという報告とも一致する^{19, 20)}。一方で、*S. carneus* MIII は 5.5 付近までしか pH の低下が見られなかったことから、*L. pluntarum* HSK201 や *L. sakei* H1204 などペプチドや遊離アミノ酸の増加量が多くなったが、pH が 5 以下近くまで低下したため、*S. carneus* MIII とは異なる酵素系が働いた可能性もある。単菌スターターのタンパク質分解という観点では *S. carneus* MIII が優れていたが、*L. pluntarum* HSK201 や *L. sakei* H1204 も同等の効果を持つことが推察された。有機酸産生との関係についても pH 低下には有機酸総量および酢酸の割合が関与しそうなこと、大部分が乳酸を占めることも明らかとなった。

謝 辞

本研究で使用した *Staphylococcus carneus* MIII (S-B-61 Bactoform, Chr. Hansen GmbH., Polheim) および *Staphylococcus xylosus* DD-34 (S-SX Bactoform, Chr.

Hansen GmbH., Polheim) は株式会社ラクト・ジャパンおよびクリスチャンハンセンジャパン株式会社のご厚意により研究のため供与していただきましたことを深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Smith, J. L. and Palamobo, S. A., *J. Food Prot.*, **46**, 997-1006 (1983).
- 2) Bacus, J. N., and Brown, W. L., *Food Technol.*, **35**, 74-78 (1981).
- 3) 伊藤敏敏, 日本畜産学会報, **63**, 1276-1289 (1992). *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2499-2504 (1990).
- 4) 細野明義, 畜産食品微生物学, 5. 食肉・食肉製品の微生物, 124-125 (2000).
- 5) Hiero, E., Hoz, L.D.L., and Ordonez, J. A. *J. Agric. Food Chemistry*, **47**, 1156-1161 (1999).
- 6) Pezacki, W., and Pezacka, E. *Acta Aliment Pol.*, **12**, 1276-1289 (1986).
- 7) Cocconcelli, P., S. and Fontana, C., 2014. Bacteria. In: Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Sebranek JG, Talon R (eds), *Handbook of fermented meat and poultry 2nd edn*, pp. 117-128. Wiley Blackwell, Hoboken.
- 8) 三上正幸, Serjmyadag, D., 島田謙一郎, 関川三男, 福島道広, 山岸 真, 山腰和枝, 大湊 源, 北畜会報, **46**, 71-78 (2004).
- 9) Dierick, N., Vandekerckhove, P. and Demeyer, D. *J. Food Sci.*, **39**, 301-304 (1974).
- 10) Kato, T., Matsuda, T., Tahara, T., Sugimoto, M., Sato, Y. and Nakamura, R. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 408-410 (1994).
- 11) Aro Aro, J.M., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K., Fukushima, M. and Sekikawa, M. *Food Chem.*, **119**, 279-285 (2010).
- 12) Ahn, D.H., Shimada, K., and Takahashi, K. *J. Food Sci.*, **68**, 94-98 (2003).
- 13) Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S. and Thepkasikul, P. *Meat Sci.*, **66**, 579-588 (2004).
- 14) Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 15) Moore, S. and Stein, W. H. *J. Biol. Chem.*, **176**, 367-388 (1948).
- 16) Laemmli, U. K. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 17) 加藤文雄, 田原豊之, 杉本勝之, 佐藤 泰, 日本食品工業会誌, **37**, 715-721 (1990).
- 18) Fadda, S., Graciela, V., Holgado, A.P.R., Oliver G.

Meat Sci., **49**, 11-18 (1998).

- 19) Taron, R., Walter, D., Chartier, S., Barrière, C., Montel, M.C. *Int J. Food Microbiol.*, **52**, 47-56 (1999).
- 20) Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., Villani, F., *Meat Sci.*, **67**, 149-158 (2004).

Effect of a starter strain of dry-fermented sausage on proteolysis and producing ability of organic acid

Kenichiro SHIMADA¹, Saya KANNO¹, Aya ITO¹, Takanori HASEGAWA², Kyu-Ho HAN¹,
Ryuji NAGATA¹, Michihiro FUKUSHIMA¹

¹ Department of Life and Animal Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan

² Research & Development Center, NH Foods Ltd., 3-3 Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646, Japan

Abstract

Dry-fermented sausages are unheated meat products produced through fermenting, drying, and aging. Bacterial starter cultures are incorporated during preparation to stabilize quality and maintain safety. Commercially available starter strains, including *Staphylococcus carnosus* MIII, *Staphylococcus xylosus* DD-34, and *Lactilactobacillus sakei* D-1001 were studied to evaluate the relationships between organic acid composition, organic acids concentrations, sarcoplasmic protein proteolysis, and amounts of peptide and free amino acids produced when sausages are inoculated with a bacterial starter strain during aging period. In addition to commercially available bacterial culture strains, we assessed *Lactilactobacillus sakei* H1204, *Levilactobacillus brevis* C1101, and *Lactiplantibacillus plantarum* HSK201 strains. The pH decreased to 5 from 6 on day 7 of aging in sausages with added Lactobacilli. Starters that resulted in marked decreases in pH yielded high amounts of total organic acids. *S. carnosus* MIII resulted in the highest peptide and free amino acid production. *L. plantarum* HSK201 and *L. sakei* H1204 yielded similar increases in peptide and free amino acid production, suggesting that *L. plantarum* HSK201 and *L. sakei* H1204 are highly proteolytic. *L. plantarum* HSK201 and *L. sakei* H1204 would exhibit strong proteolytic activity.

Japanese Journal of Meat Science and Technology, **64**(2), 119-126, 2023

Key words: dry-fermented sausage, starter, organic acid, proteolysis