

研究論文

ナisinを利用した浅漬の微生物増殖抑制

近藤温子^{*1}、石川健一^{*1}、矢野未右紀^{*1}、鳥居貴佳^{*1}

Bacterial Growth Control of Lightly-pickled Vegetables Using Nisin

Atsuko KONDO^{*1}, Kenichi ISHIKAWA^{*1}, Miyuki YANO^{*1} and Takayoshi TORII^{*1}Food Research Center^{*1}

浅漬は加熱殺菌工程がなく、塩分濃度が低いことから微生物制御の難しい漬物の一つとされている。本研究では、抗菌性物質であるナisinを用いて浅漬の微生物制御を試みた。ナisinの効果を有効活用するためには、ナisinが殺菌効果を示さないグラム陰性菌の増殖を抑制する必要がある。そこで、酢酸緩衝液及びクエン酸緩衝液とナisinの併用について検討したところ、ナisinと酢酸緩衝液を併用することにより浅漬における微生物の増殖を抑制することができた。

1. はじめに

愛知県は漬物の生産が盛んであり、漬物の出荷額は日本全国の漬物（野菜、果実）の出荷額の約 5%を占めている。また、近年は健康志向や消費者の好みから浅漬やキムチの生産量が多い。これらの漬物は加熱による殺菌工程がなく、塩分濃度が約 2%と低いことから微生物制御が難しい。そのため、漬汁の白濁や pH の低下、膨張、異臭、退色などの微生物トラブルが起こりやすく、また商品のシェルフライフが短いなどの課題がある。

ナisinは *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が生産する抗菌性ペプチドである。日本では 2009 年 3 月にチーズや食肉製品など特定の食品への使用が認可されているが、漬物への使用はまだ認められていない。ナisinは大部分の乳酸菌や *Bacillus* 属、*Clostridium* 属などのグラム陽性菌に対して殺菌効果があり、無味無臭であることから漬物の微生物制御の有効手段の一つになると考えられる。そこで本研究では、微生物制御が難しい浅漬に対するナisinの有効性の検証を行い、ナisinを用いた漬物の微生物制御について検討した。

2. 実験方法

2.1 原材料と原料の洗浄

県内の量販店で入手したきゅうり（産地不特定）を使用した。きゅうりを水洗いし、100 ppm に調整した次亜塩素酸ナトリウム水に 15 分間浸漬させた。その後、10 分間水洗いした。

2.2 下漬処理と本漬処理

洗浄したきゅうりを約 1 cm 幅に細断し、きゅうりの 1/3 重量の 10%食塩水に浸漬させ、10℃で 24 時間下漬

けた。下漬後に水を切り、きゅうりと同重量の漬汁を加えて本漬けとし、10℃にて保存試験を行った。

2.3 漬汁の調製

2.3.1 ナisinの効果の検討

蒸留水に食塩を 1.5%、グルタミン酸ナトリウムを 0.1%となるように加えた。この溶液にナisinの濃度が 0.25 ppm、2.5 ppm、6.25 ppm 及び 12.5 ppm となるようにナisin製剤(シグマ社製)を添加して漬汁とした。また、ナisin無添加区を以降の試験との共通の対照区とした。

2.3.2 ナisinと pH 緩衝液の併用効果の検討

pH5.2 に調製した 0.05 M 酢酸緩衝液及び 0.05 M クエン酸緩衝液に食塩を 1.5%、グルタミン酸ナトリウムを 0.1%となるように加えた溶液を漬汁とした。また、これらの漬汁にナisinの濃度が 12.5 ppm となるようにナisin製剤を添加して漬汁とした。

2.3.3 酢酸緩衝液におけるナisinの添加量の検討

前項に示した酢酸緩衝液を用いた漬汁に、ナisinを 1.5 ppm、3.1 ppm 及び 6.25 ppm となるように添加して漬汁とした。

2.4 微生物菌数の測定

生菌数の測定には、標準寒天培地を使用した。混釈法により 35℃で約 48 時間培養し、出現したコロニーの数を測定した。

グラム陰性菌数の測定には、CVT 寒天培地を使用した。塗抹法により 25℃で約 72 時間培養し、出現したコロニーの数を測定した。

乳酸菌数の測定には、炭酸カルシウムを 0.5%となるように添加した MRS 寒天培地 (MRS 白亜寒天培地) を使

^{*1} 食品工業技術センター 保蔵包装技術室

用した。混釈法により 30℃で約 72 時間培養し、ハローを形成したコロニー数を測定した。

2.5 ナイシン活性

B. subtilis ATCC19659 株を指標菌とし、agar well diffusion assay 法¹⁾にて漬汁のナイシン活性を測定した。ナイシン活性は、指標菌の増殖が抑制されたことを示す阻止円の形成が認められたものを活性があると判定した。

2.6 プロテアーゼ活性の定性試験

標準寒天培地上に出現したコロニーを、スキムミルクを 1%含む標準寒天培地に釣菌して 35℃で 24 から 48 時間培養した。プロテアーゼ活性は、スキムミルクの分解によりハローの形成が認められたものを活性があると判定した。

2.7 漬汁の透過率測定

漬汁の濁りの指標として、波長 660 nm における透過率を測定した。

2.8 有機酸の定量

有機酸分析システム（ポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法、(株)島津製作所製）により、漬汁に含まれる酢酸、乳酸、クエン酸及びリンゴ酸含量を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 ナイシンの効果の検討

2.3.1 項に示した漬汁を用いて浅漬を調製し、10℃で保存した。経時的に生菌数を測定したところ、ナイシンの添加量に関わらず対照区と同様な増殖を示し、保存 9 日には生菌数が 1×10^7 /g 以上に達した（図 1）。このことから、ナイシン添加による生菌数の抑制効果は認められなかった。また、漬汁のナイシン活性は、ナイシンの添加濃度が低い試験区ほど早く消失した（表 1）。

ナイシンを 12.5 ppm 添加した試験区は保存 9 日目までナイシン活性が存在しているにも関わらず生菌数の増殖が対照区と同様の傾向を示していることから、ナイシン感受性のない微生物が増殖していると考えられた。そこで、標準寒天培地上に形成されたコロニーを採取して劉の方法²⁾によりグラム染色性を調べたところ、グラム陰性菌の割合が増加していた。さらに、これらの微生物のプロテアーゼ活性を調べたところ、プロテアーゼを生産する微生物が複数存在していた。

これらの結果から、ナイシン添加量による生菌数の抑制効果が認められなかったことは、ナイシン感受性のないグラム陰性菌の増殖と微生物が生産するプロテアーゼによるナイシンの分解によるものと思われる。従って、浅漬におけるナイシンの使用では、グラム陰性菌の増殖抑制とナイシンの分解抑制が必要であると考えられる。

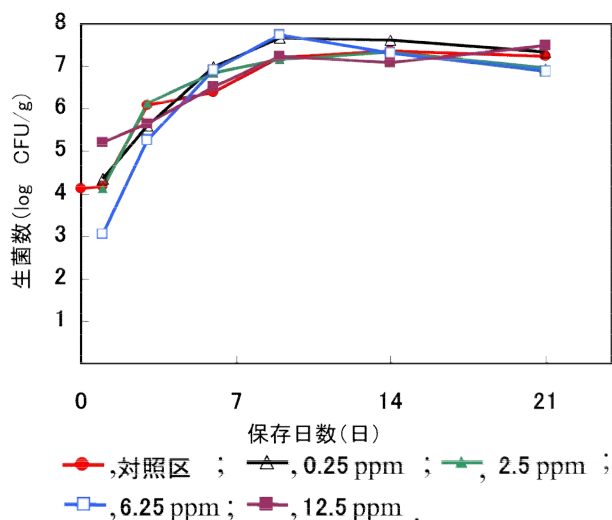


図 1 浅漬の生菌数におけるナイシン添加量の影響

表 1 漬汁のナイシンの添加量とナイシン活性の経時変化

	保存日数				
	1 日	3 日	6 日	9 日	14 日
0.25ppm	—	—	—	—	—
2.50ppm	+	—	—	—	—
6.25ppm	+	+	—	—	—
12.5ppm	+	+	+	+	—

+: 活性あり —: 活性なし

3.2 ナイシンと pH 緩衝液の併用効果の検討

3.2.1 菌数と漬汁の透過率の経時変化

2.3.2 項に示した漬汁を用いて浅漬を調製し、10℃で保存した。生菌数とグラム陰性菌数の経時変化を図 2 に示す。対照区は保存 14 日で生菌数が 3.0×10^7 /g であったのに対し、酢酸緩衝液のみを用いた試験区は保存 21 日目で生菌数が約 3.0×10^5 /g であり、わずかに抑制効果が認められた。これに対し、酢酸緩衝液にナイシンを 12.5 ppm 添加した試験区は保存 21 日目でも生菌数が 3.0×10^3 /g に抑えられ、高い抑制効果が認められた。一方、クエン酸緩衝液を用いた試験区及びクエン酸緩衝液にナイシンを 12.5 ppm 加えた試験区は、保存 21 日で生菌数が約 3.0×10^7 /g であり、クエン酸緩衝液による生菌数の増殖抑制は認められたが、ナイシンとの併用効果は認められなかった。グラム陰性菌は、酢酸緩衝液により増殖が抑えられ、ナイシンとの併用によりさらに増殖を抑制する傾向があった。クエン酸緩衝液を用いた試験区は、クエン酸緩衝液による増殖抑制は認められたが、ナイシンとの併用効果は認められなかった。

漬汁の透過率の経時変化を図 3 に示す。一般に漬汁の

透過率は 75%程度まで低下すると肉眼で濁りを認識できるようになり、浅漬の賞味期限を設定するうえで指標の一つとされている。対照区は保存 7 日で透過率が約 50%となったが、酢酸緩衝液を用いた試験区は保存 21 日目でも透過率約 80%を維持していた。また、ナイシンと酢酸緩衝液を併用すると保存 28 日目でも透過率が 80%であり、生菌数の結果と同様にナイシンと酢酸緩衝液の併用効果が認められた。クエン酸緩衝液を用いた試験区及びクエン酸緩衝液にナイシンを 12.5 ppm 添加した試験区は、保存 14 日には透過率が 75%以下に低下し、クエン酸緩衝液による透過率の低下抑制は認められたが、ナイシンとの併用効果は認められなかった。

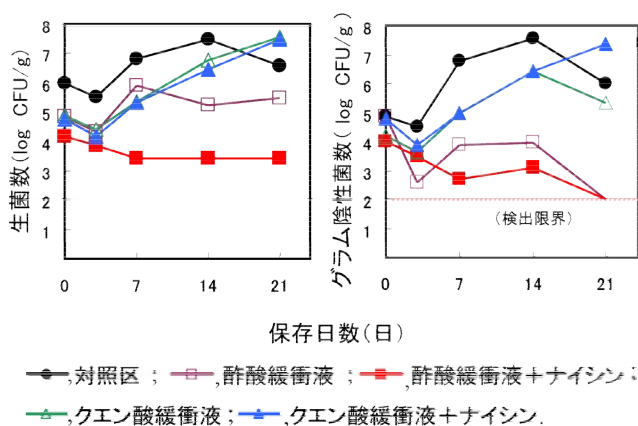


図2 緩衝液及び緩衝液にナイシンを 12.5 ppm 添加した浅漬の生菌数とグラム陰性菌数の経時変化

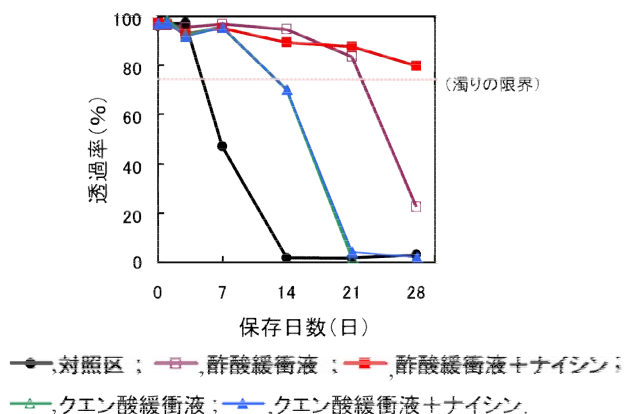


図3 緩衝液及び緩衝液にナイシンを 12.5 ppm 添加した漬汁の透過率の経時変化

3.2.2 ナイシン活性の経時変化

酢酸緩衝液及びクエン酸緩衝液にナイシンを 12.5ppm 添加した試験区のナイシン活性の経時変化を表 2 に示す。表 1 に示した緩衝液を使用していない試験区のナイシン 12.5 ppm 添加区は、保存 9 日から 14 日の間にナイシン活性が失活していたが、酢酸緩衝液及びクエン酸緩衝液にナイシンを 12.5 ppm 添加した試験区は、

保存 21 日目までナイシン活性が残存していた。

また、酢酸緩衝液中のナイシンの添加量に応じてナイシン活性の消失日数が異なっていた (表 3)。これらの結果から、pH 緩衝液とナイシンの併用によりナイシンの分解は抑えられるが、ナイシンの添加量に応じて活性が維持される日数が異なるため、目標とする品質保持期間に応じてナイシンの添加量の調整が必要と考えられる。

表2 ナイシンを 12.5 ppm 添加した漬汁(酢酸緩衝液及びクエン酸緩衝液)のナイシン活性の経時変化

	保存日数			
	1 日	7 日	14 日	21 日
酢酸緩衝液	+	+	+	+
クエン酸緩衝液	+	+	+	+

+ : 活性あり, - : 活性なし

表3 酢酸緩衝液を用いた漬汁中のナイシンの添加量とナイシン活性の経時変化

	保存日数			
	初発	7 日	14 日	21 日
1.50ppm	+	+	-	-
3.10ppm	+	+	-	-
6.25ppm	+	+	+	-

+ : 活性あり, - : 活性なし

3.2.3 漬汁の有機酸含量の経時変化

有機酸の濃度や組成は風味に影響するため、有機酸を風味の変化の指標とし、酢酸緩衝液を用いた試験区、酢酸緩衝液にナイシンを 12.5 ppm 添加した試験区及び対照区の漬汁の有機酸含量の経時変化を測定した (図 4)。

酢酸緩衝液及び酢酸緩衝液にナイシンを 12.5ppm 添加した試験区は、初発から保存 3 日目の間に酢酸含量の減少が見られたがそれ以降の酢酸含量は一定であった。乳酸、クエン酸及びリンゴ酸含量はわずかな変化が見られたが特徴的な傾向は得られなかった。一方、対照区は保存 3 日目以降に酢酸の増加が起こり、保存 7 日から 14 日の間に乳酸含量が漬汁 100g あたり約 8 mg から 85 mg に増加し、リンゴ酸の含量が約 110 mg から 0.5 mg と急激に低下した。一般に酢酸や乳酸は代謝産物であり、3.2.1 項の結果では対照区は保存 3 日から 14 日の間に生菌数が 1×10^7 /g 以上に達し、漬汁の透過率が 75%以下に低下していることから、有機酸含量の変化は微生物の増殖に伴う代謝が影響していると考えられた。以上の結果から、酢酸緩衝液や酢酸緩衝液とナイシンとの併用により微生物の増殖が抑えられ、漬汁の有機酸含量の変化を緩和できることが示唆された。

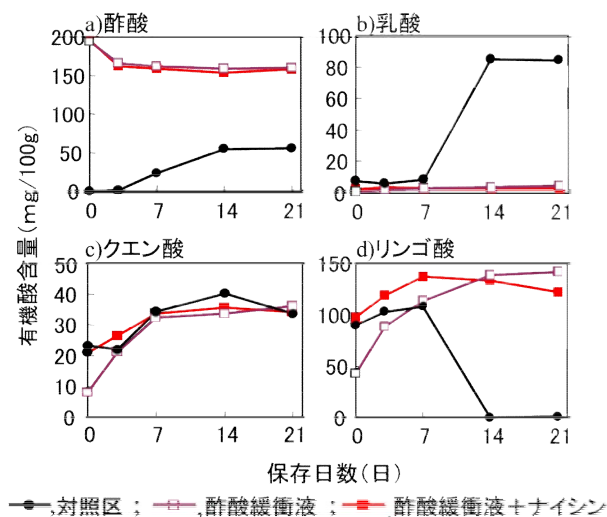


図4 漬汁の有機酸含量経時変化

3.3 市販品に対するナイシンの効果の検討

表4に示す酢酸濃度の異なる3種類の市販されているきゅうりの浅漬を用い、漬汁にナイシンを12.5 ppm添加して再充填を行い、10℃で保存した。市販品の漬汁の有機酸含量の経時変化を図5に示す。市販品Bと市販品Cは、保存3日以降にナイシン無添加区において著しい乳酸の増加とリンゴ酸の減少が確認され、ナイシン添加により乳酸の増加とリンゴ酸の減少は緩やかとなった。一方、酢酸含量の高い市販品Aは、ナイシン無添加区で保存10日以降に乳酸の増加とリンゴ酸の減少が起こり、ナイシンの添加により保存14日目まで乳酸の増加とリンゴ酸の減少は起こらなかった。これらの結果から、市販されている一般的な浅漬においても、ナイシンによる漬汁の有機酸含量の変化を緩和する効果が認められた。また、図4に示した対照区の有機酸含量と比較すると乳酸の増加が著しく多いため、市販品では乳酸菌の増殖が大きく関与していると考えられる。そこで、乳酸菌の経時変化を測定したところ、ナイシン添加区で乳酸菌数の増殖抑制が認められ、その効果は酢酸含量の多い市販品Aで顕著であった(図6)。

表4 使用した市販品

	市販品 A	市販品 B	市販品 C
漬汁の酢酸含量 (mg/100g)	1000	390	330
漬汁の pH	5.0	5.1	5.4
漬汁の食塩含量 (g/100g)	2.4	2.4	2.3

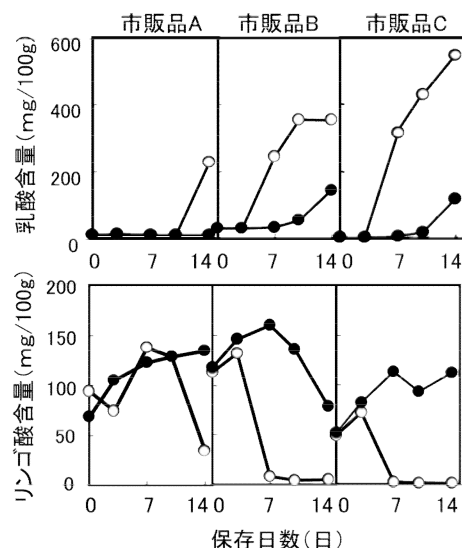


図5 市販品漬汁の乳酸及びリンゴ酸含量経時変化

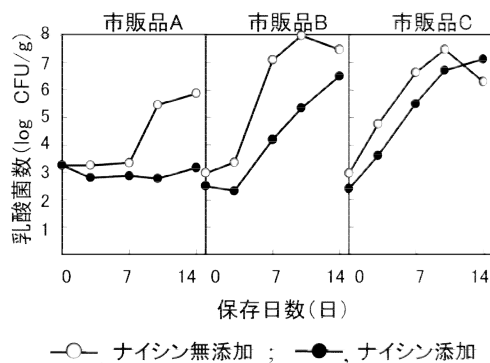


図6 市販品の乳酸菌数の経時変化

4. 結び

漬汁にナイシンと酢酸緩衝液を併用することにより、浅漬の微生物の増殖抑制及び漬汁の濁りを抑制する効果が得られた。また、ナイシンとpH緩衝液の併用によりナイシン活性の消失を抑える効果が認められた。

市販の浅漬においては、酢酸含量の多い浅漬でナイシンの効果が高い傾向が得られた。以上の結果から、浅漬の微生物増殖抑制には、ナイシンと酢酸の併用が有効であると思われる。

文献

- 1) T. Kato, K. Maeda, H. Kasuya, T. Matsuda : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(4), 642 (1999)
- 2) 森地敏樹：食品微生物検査マニュアル, 92(2009), 栄研化学株式会社