

表 2. 37°C で保存したプロセスチーズ製品の腐敗率

製品	ナイシン 添加量 (mg/kg)	試料 10 個中腐敗した個数					
		保存週数					
		1	2	3	4	5	6
プロセスCHEDA チーズ	0	0	0	1	1	1	1(B)
	2.5	0	0	0	0	0	0
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスCHEDA チーズ付きハム	0	0	0	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	1	1	1(S)
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスCHEDA チーズスプレッド	0	0	3	3	4	5	7(B)
	2.5	0	0	2	2	2	2(B)
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスCHEDA チーズスプレッド付きハ ム	0	2	2	3	4	7	7(B)
	2.5	0	0	2	2	2	2(B+S)
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスエメンタール チーズ	0	0	0	1	2	3	3(B)
	2.5	0	0	0	0	0	0
	6.25	0	0	0	0	0	0
プロセスエメンタール チーズスプレッド	0	0	5	6	6	8	8(B+S)
	2.5	0	0	0	3	3	3(B+S)
	6.25	0	0	0	0	0	0

(B) = 主として酪酸生成クロストリジウム属による腐敗 ; (S) = 主として *Cl. sporogenes* による腐敗

4.2.1.4 プロセスチーズ製造および保存中におけるナイシン含量の変化⁽⁹⁾

プロセスチーズ製造中に添加したナイシンは、溶解工程で一定の割合で分解される。熱処理の程度とプロセスチーズの pH に左右されるが、通常 15~20% が失われる。プロセスチーズ中のナイシンは保存中にも減少する。

水分含量 54~58%、pH5.6~6.0 の低温殺菌プロセスチーズスプレッドを 20、25 又は 30°C で保存した時、ナイシンの活性は消失し、保存 30 週間後では 20°C で約 80%、25°C で約 60%、30°C で約 40% が保持され、保存温度の上昇に伴いナイシンの消失が促進された (図 1)。

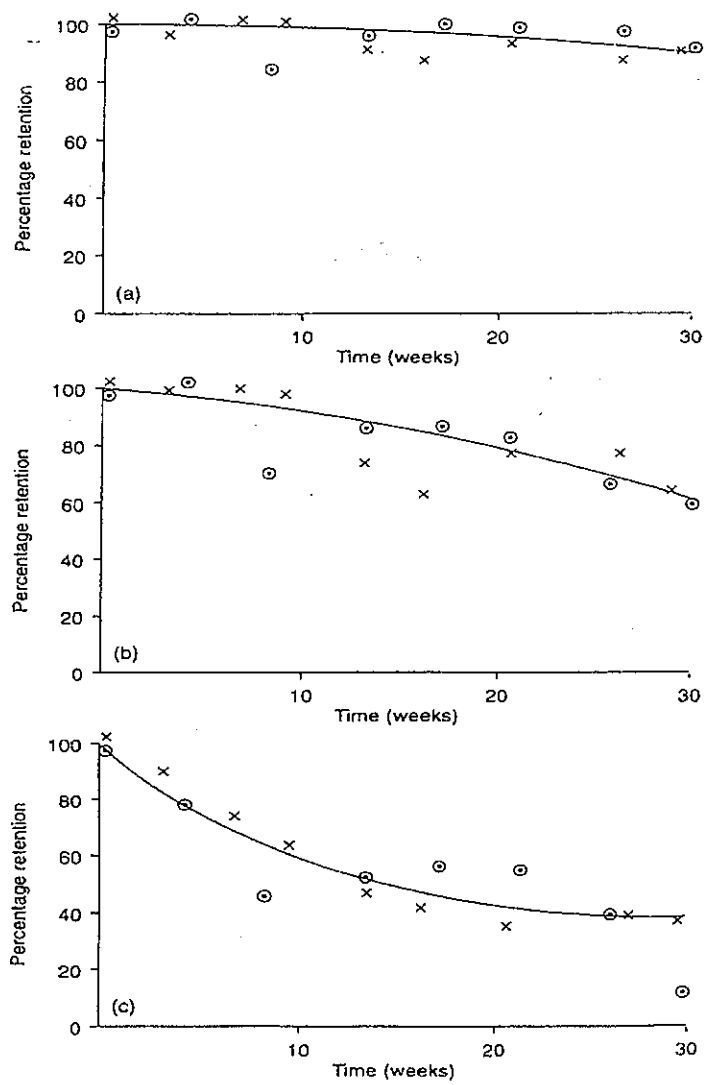


図1. 保存温度による低温殺菌プロセスチーズスプレッド（水分量 54~58%、pH 5.6~6.0）中のナイシン保持（6.25 mg/kg）への影響。
（製造工程でナイシン活性の15%が失われる。）
(a) 20°C、(b) 25°C、(c) 30°Cにおけるナイシン保持。

4.2.2 液状卵に対するナイシンの保存効果

4.2.2.1 背景

低温殺菌液状卵製品（全卵、卵黄、卵白）ならびに液状卵と小麦粉を含むベーカリング／ケータリングミックス食品（例、衣用生地、オムレツミックス食品、パンケーキミックス食品など）は便利で用途が広いことから、欧米の食品産業ではますます普及し、特にホテル、レストラン、公共施設領域において利用されている。液状卵製品は、概して殻内部の汚染物質、割られた卵殻の清浄度の結果および／または液中に落ちた殻の小片（後に濾過した場合でも）からの結果、汚染される（10）。加工卵産業における現在の低温殺菌法は、サルモネラ菌ならびに病原性を有する可能性があるその他の食物媒介病原体（food borne organism）を死滅させるために開発された。しかし、製品の特性から、蛋白変性を起こしたり、製品の機能に悪影響を及ぼしたりすることなく適用できる熱処理量が限られている。通常、低温殺菌法により生の液状全卵に存在する細菌の約99%は死滅するが、生き残った細菌の大部分は耐熱性グラム陽性芽胞形成菌（*Bacillus spp.*）で、少ないがグラム陰性菌もある（10、11、12、13）。これらの生き残った細菌の多くは、冷蔵庫の温度でも増殖可能である。低温殺菌液状卵製品の品質保持期間は7～28日と非常に大きくバラツキがあるが、これは最初の細菌量、採用された低温殺菌処理法、冷蔵保存温度に左右される。

液状卵製品におけるナイシンの使用についてはGRAS認可申請（GRASP 4G0408）がFDAに承認されている（14）。

4.2.2.2 液状卵および液状卵製品へのナイシン添加の技術的利点

液状卵および液状卵製品にナイシンを添加することにより、グラム陽性菌およびある種のグラム陰性菌がコントロールされる。これにより、水で戻した粉末卵中の芽胞の増殖がコントロールされるだけでなく、卵の遠心分離により得られた液状卵の細菌学的なコントロールも行える。その結果として、ナイシン添加により低温殺菌液状卵製品の品質保持期間は延長され、流通に自由度が増し、冷凍状態での流通を減少／なくすことができる。さらに、温度の逸脱（temperature abuse）を予防できるので、消費者により安全性を提供することができる。

4.2.2.3 ナイシンの液状卵に対する保存効果試験⁽¹⁵⁾

ナイシン5 mg/lを液状全卵に添加した後に滅菌（64.4℃、2.5分）した。次に無菌的に個分けした後、6℃で保存し、試験1では1～23日に総細菌数、嫌気性菌数、pH、性状および異臭を、試験2では1～21日に総細菌数、*Bacillus cereus*数、pH、性状および異臭を測定した。

細菌学検査

試験1（表3）：ナイシン非添加コントロール群では、4～6日で腐敗がみられ、この原因菌は*Bacillus cereus*と同定された。ナイシン添加群では17～20日で性状の変化がみられ、腐敗の原因菌はグラム陰性桿菌（*Pseudomonads*属）であった。

試験2（表4）：コントロール群の貯蔵期間は11日、ナイシン添加群では20日であった。コントロール群の腐敗原因菌は主に*Pseudomonads*であった。ナイシン添加群の腐敗菌

は *Bacillus* 属 (長さ 3~8 μ m) で、カタラーゼ陽性、ムコイド形成コロニーを示した。分離株に芽胞は存在しなかった。

pH、性状、異臭

試験 1 (表 3) : コントロール群では、強い異臭、退色、卵の凝固、pH の低下がみられた。一方、ナイシン添加群では、退色及び pH の低下程度が低かった。

試験 2 (表 4) : コントロール群では果物臭、粘稠、pH の低下がみられた。ナイシン添加群では明確な異臭、pH 低下はみられなかった。

以上より、ナイシン 5 mg/l の添加により滅菌液状全卵の冷蔵温度における貯蔵期間の延長が明らかとなった。又本試験から、滅菌操作、及び卵に含まれるリゾチームの作用により、グラム陰性細菌 *Pseudomonads* 属に対してもナイシンが相乗的に作用することが示唆された。

表3 試験1：滅菌液状全卵を6℃で保存した時の細菌数、pH、性状、異臭発生に対するナイシンの効果

日	総細菌数	嫌気性菌	pH	性状	異臭
1.ナイシン添加 (5 mg/l)					
1	3	3	7.67	良好	なし
4	10*	<10	7.55	良好	なし
7	$4.0 \times 10^{2*}$	<10	7.46	良好	なし
10	$2.0 \times 10^{1*}$	50	7.72	良好	なし
14	$7.0 \times 10^{4*}$	<10	7.68	良好	なし
17	2.0×10^2	<10	7.67	良好	なし
21	—	—	7.74	やや退色	なし
22	$>10^{7*}$	<10	7.46	やや退色	なし
23 (1)	$>10^{7*}$	<10	7.59	やや退色	なし
23 (2)	$>10^{7*}$	<10	7.56	やや退色	なし
23 (3)	$>10^{7*}$	<10	7.59	やや退色	なし
2.コントロール (ナイシン非添加)					
1	90 [†]	2.7×10^2 [‡]	7.59	良好	なし
4	2.4×10^4 [†]	3.0×10^2 [‡]	7.55	良好	なし
7	5.3×10^6 [†]	5.0×10^3	6.88	やや退色	弱い
10	7.3×10^7 [†]	3.0×10^2	6.23	完全な退色/ 分離/凝固	強い

* グラム陰性桿菌 (*Pseudomonads*)

† *Bacillus* (*Bacillus cereus* と同定)

‡ グラム陽性球菌

表4 試験2：滅菌液状全卵を6℃で保存した時の細菌数、pH、性状、異臭発生に対するナイシンの効果

日	総細菌数	<i>Bacillus cereus</i> /ml	pH	性状	異臭
1.ナイシン添加 (5 mg/l)					
1	<10	<10	7.72	良好	なし
4	<10	<10	7.71	良好	なし
5	<10	<10	7.67	良好	なし
6	10	<10	7.71	良好	なし
7	<10	<10	7.66	良好	なし
8	10	<10	7.68	良好	なし
9	10	<10	7.70	良好	なし
10	10	<10	7.72	良好	なし
11	50	<10	7.69	良好	なし
12	10	<10	7.71	良好	なし
13	15	<10	7.74	良好	なし
14	100*	<10	7.70	良好	なし
15	25*	<10	7.72	良好	なし
16	2×10^3 *	<10	7.72	良好	なし
17	4.8×10^3 *	<10	7.72	良好	なし
18	1.5×10^4 *	<10	7.74	良好	なし
19	1.0×10^4 *	<10	7.67	良好	なし
20	5.0×10^3 *	<10	7.71	良好	なし
21	3.3×10^6 *	<10	7.71	良好	なし
2.コントロール (ナイシン非添加)					
1	8.3×10^2 †	<10	7.67	良好	なし
4	1.2×10^3 †	<10	7.64	良好	なし
5	1.1×10^3 †	<10	7.68	良好	なし
6	8.0×10^2 † ‡	<10	7.64	良好	なし
7	1.3×10^3 †	<10	7.65	良好	なし
8	1.9×10^3 † ‡	<10	7.67	良好	なし
9	1.5×10^3 †	<10	7.61	良好	なし
10	1.5×10^3 †	<10	7.66	良好	なし
11	1.6×10^3 * †	<10	7.68	良好	なし
12	1.7×10^8 §	10	7.57	良好	わずかな果実臭
13	1.9×10^8 §	<10	7.58	良好	弱い果実臭

* ムコイドコロニー、グラム陰性好気性桿菌（長さは主に3-4μm、最大7-8μm）、芽胞なし、カタラーゼ陽性 *Bacillus*

† 主に黄色コロニー、グラム多様小型桿菌、カタラーゼ陽性、コリネ型

‡ *Bacillus* コロニー。数は少ない。

§ グラム陰性、オキシダーゼ陽性 *Pseudomonads*

4.2.3 ナイシン製剤の低温殺菌豆腐に対する腐敗抑制効果⁽¹⁶⁾

豆腐製品は栄養学的価値が高いことから欧米においてもポピュラーになりつつあるが、大量生産、流通の増加に伴い、賞味期間の延長が望まれる。本試験では、市販滅菌豆腐を用いて耐熱性芽胞形成細菌 (*Bacillus* 及び *Clostridium*) の増殖に対するナイシンの保存効果を検討した。

市販豆乳を 80℃で加熱冷却後、ナイシン 50、125、250、500 IU/g (=1.25、3.125、6.25、12.5 mg/kg) を添加し、*Bacillus* 又は *Clostridium* 芽胞のいずれかを 10^3 CFU/g 接種させて豆腐を作り (図 2)、80℃で 3 分間殺菌後、室温まで冷却させて 8℃で保存した。保存開始時と週 2 回、生菌数を測定した。

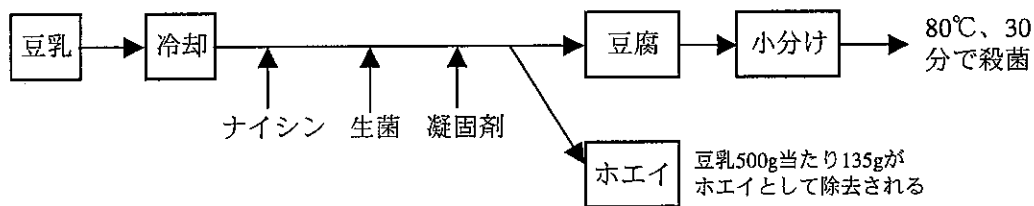


図2. 試験に用いた豆腐の製造工程図

結果

ナイシンは凝固した豆腐中に濃縮されるため、添加量の 2.4~5.4 倍の濃度で豆腐中に存在していた (表 5)。

ナイシンを添加していない豆腐では 7 日後に *Bacillus* が 10^6 CFU/g となったのに対して、ナイシン 125 IU/g を添加した豆腐では約 21 日後、250 IU/g 添加した豆腐では 40 日後に *Bacillus* が 10^6 CFU/g まで増殖し、500 IU/g 添加した豆腐においては 51 日後も 10^6 CFU/g とならなかった (表 6)。

Clostridium 芽胞 接種させた豆腐では 8℃のインキュベートで菌が成長しなかったため、37℃でインキュベートした。その結果、ナイシンを添加していない豆腐中の嫌気性菌数は、50 日後 2×10^7 CFU/g であったのに対して、ナイシンを添加した豆腐ではいずれの添加量においても保存開始時と同じ約 10^3 CFU/g であり、50IU/g で完全な増殖抑制がみられた。

表5 豆腐中に残存するナイシン濃度 (低温殺菌前の定量結果)

試料	ナイシン添加量 (IU/g)	残存ナイシン量 (IU/g) (添加量に対する比 (倍))		
		試験 1	試験 2	試験 3
ホエイ	50	2 (0.04)	1 (0.02)	2 (0.04)
	500	11 (0.02)	19 (0.04)	21 (0.04)
豆腐	50	213 (4.26)	213 (4.26)	272 (5.44)
	500	1204 (2.41)	1706 (3.41)	1656 (3.31)

表6 *Bacillus* 芽胞 と保存した豆腐中の好気性菌が 10^6 CFU/gになるまでの日数
およびナイシン残存量

ナイシン添加量 (IU/g)	好気性菌数が 10^6 CFU/gになる までの日数	残存ナイシン量 (IU/g)	
		0	8°C、51日後
0	7	0	0
50	10	198	140
125	21	469	380
250	40	969	769
500	>51	1779	1639

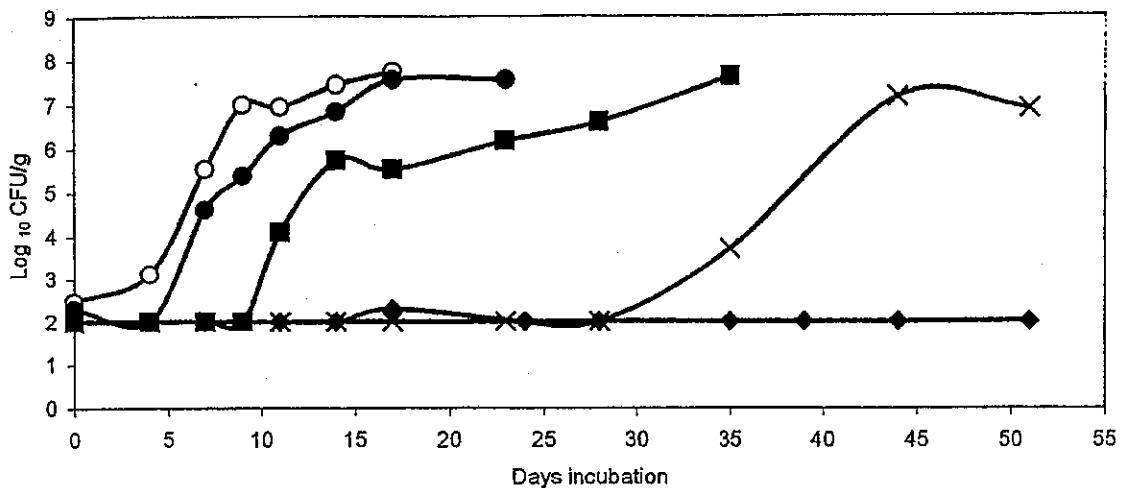


図3. *Bacillus* 芽胞を接種した低温殺菌豆腐中の好気性菌数の変化。豆乳へのナイシン添加量
: 0 IU/g (○) ; 50 IU/g (●) ; 125 IU/g (■) ; 250 IU/g (×) ; 500 IU/g (◆)

結論

豆腐を製造する際、原料である豆乳にナイシン 50 IU/g (=1.25 mg/kg) を添加することにより、*B.Clostridium* 芽胞汚染が万が一あった時でも冷蔵温度で保管された豆腐（豆腐中ナイシン濃度は 213~272 IU/g）中の *Bacillus* 芽胞および *Clostridium* 芽胞の成長を抑制することが示された。

4.2.4 味噌へのスターターカルチャーとしてのナイシン生産菌の利用

味噌・醤油業界において、*B. subtilis* をはじめとする有害微生物の除去が、長年の課題となっている。ナイシンは、*Bacillus* や *Micrococcus* などのグラム陽性菌全般に対して殺菌的に作用し、*Bacillus* や *Clostridium* の殺菌芽胞の発芽も阻止するので、味噌の微生物問題を解決する上で重要とされている。しかしながら、日本ではナイシン製剤の「保存料」としての利用は許可されていないことから、ナイシン生成菌をスターターカルチャーとして利用して、豆味噌、米麹および米味噌製造を行なう研究が報告されている。

4.2.4.1 豆味噌へのスターターカルチャーとしてのナイシン生産菌の利用⁽¹⁷⁾

豆味噌の製造工程において、大豆の蒸煮直後は無菌であるが、その後の工程で微生物汚染を受け、製麹中に微生物は急激に増殖する。

微生物汚染を受ける前の蒸煮・冷却した大豆をナイシン生産菌 (*L.lactis* IFO12007) によって乳酸発酵させることにより、乳酸菌の独占的菌叢を形成させ、さらに乳酸菌の生産するナイシンの蓄積により、その後の工程で大豆や麹を汚染する細菌の育成がどの程度阻止することができるか検討した。

その結果、*B.subtilis* を $10^{5\sim6}$ CFU/g 接種して培養した蒸煮大豆中に *B.subtilis* は接種直後から検出されず、ナイシンによって直ちに死滅したことが示された (表7)。一方、対照は、24時間培養後に強い悪臭と粘質物を生成して腐敗した。

表7. ナイシン生産菌による蒸煮大豆中の*B.subtilis*の生育阻止

<i>B.subtilis</i> 接種量 (cells/g)	培養時間 (h)			
	0	24	48	72
+ 10^5 接種				
<i>B.subtilis</i>	NI	<10	<10	<10
LAB	3.3×10^6	1.1×10^9	2.3×10^9	2.9×10^9
pH	6.4	6.1	5.5	5.4
+ 10^6 接種				
<i>B.subtilis</i>	NI	<10	<10	<10
LAB	3.2×10^6	1.1×10^9	2.6×10^9	2.8×10^9
pH	6.4	6.1	5.5	5.3
対照 (LAB無添加)				
<i>B.subtilis</i>	1.3×10^6	2.9×10^9	5.5×10^9	5.5×10^9 (腐敗)
pH	6.3	6.3	6.5	6.7

L.lactis IFO12007で24時間乳酸発酵した大豆に*B.subtilis*を接種して30°Cで培養した。

B.subtilis ATCC19659摂取量: $10^{5\sim6}$ cells/g,

LAB: *L. lactis* IFO12007

NI: 未接種

4.2.4.2 米麴および米味噌製造への応用⁽¹⁸⁾

米味噌に生残する細菌芽胞は豆味噌に比べて少ないものの、加工原料としては厳しい微生物基準が要求されている。ナイシン生成菌（抗菌性乳酸菌）による米味噌醸造中の有害細菌（*B.subtilis*）の生育阻止について検討した。

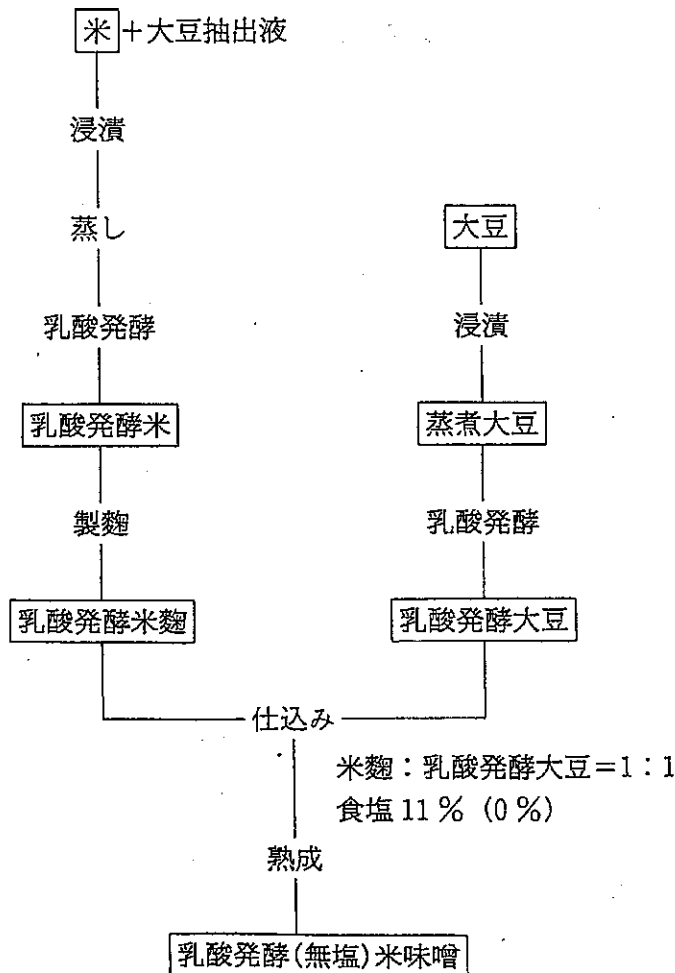


図4 ナイシン生産菌を利用した米味噌の実用的製造法

蒸し米と蒸煮大豆の両者を乳酸発酵する方法で無塩味噌を調製し（図4）、その結果を表に示した。熟成初期の味噌には乳酸発酵大豆由来のナイシンが存在するために、*B. subtilis* 及びその他の汚染細菌は検出されなかった。熟成初期にはナイシン生産菌が多数存在したが、28日後には死滅した。乳酸発酵大豆由来のナイシンも急速に分解され、21日後には消失した。以上の様に、米と大豆の両方をナイシン生産菌で乳酸発酵することにより、汚染細菌の存在しない無塩米味噌あるいは低食塩味噌を調製できることが示された。

以上より、ナイシン生成菌添加の代用としてナイシン 6400 IU/g を添加することにより無塩米味噌の製造が可能となる。