

シンポジウムII 食品微生物の基礎知識の再構築

● Basic Knowledge Confirmation of Food Microbiology

主要な保存料・日持向上剤の抗菌メカニズム —どこまで解明されているか？

Food Additives to Control Microorganisms: Mechanisms and Current Status

小磯博昭[†]

(三栄源エフ・エフ・アイ株式会社)

Hiroaki KOISO

(San-Ei Gen F.F.I., Inc., Sanwa-cho, Toyonaka, Osaka 561-8588)

はじめに

食品メーカーのホームページを見ると、「食品の安全・安心のために無添加にこだわった…」、「安全な無添加食品を…」と、あたかも食品添加物を使わないことが品質の高い商品と思わせるようなキャッチコピーが使われ、なかでも保存料に対しては「お客様の健康を最優先するために保存料は使いません」、「健康的な生活を応援するために保存料を排除しました」、保存料を使用した食品は健康に悪いとイメージさせるメッセージであふれている。さらに食品の開発担当者には、できるだけ日持向上剤は使いたくないという思いがあるとのアンケート結果の報告もある⁷⁾。

これは食品添加物、特に保存料に対しての知識がなく、偏った情報を鵜呑みにしてしまったことにより起こっている現象と考えられる。このような誤解を正すためには、保存料の有用性、安全性を広く知ってもらう必要がある。

本稿では、抗菌メカニズムの面から、保存料および同じ目的で使用される日持向上剤はヒトの健康に悪影響を及ぼすことはなく、食中毒防止や廃棄の削減に役立つ重要な食品添加物であることを概説するとともに、添加物の併用効果について最近の研究結果を紹介する。

保存料・日持向上剤の抗菌メカニズム

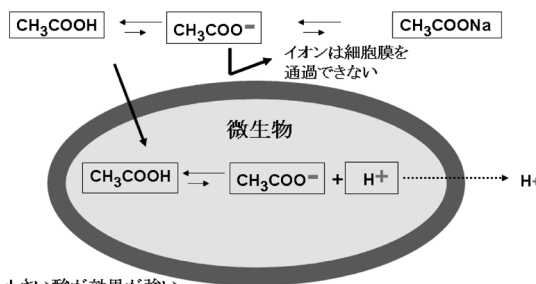
食品を保存する方法には、温度、水分、pH、気相調節などさまざまな方法が取られているが、保存料・日持向上剤の使用も、このようなさまざまな方法の一つに過ぎず過信は禁物である。保存料・日持向上剤を使っても、菌数の多い原料を使ったり、温度管理が不適切であったりした場合には、実用的な効果はほとんど期待できない。保存料・日持向上剤を有効に作用させるには一

般衛生管理が適切に実施されることが前提となる。

1. 有機酸

酢酸ナトリウムは水に溶解すると、解離し酢酸イオンとなるが、水の存在により酢酸分子と酢酸イオンの平衡状態となる。微生物の細胞膜は脂質で構成されており、イオン状態の物質は通過しにくい、イオン化していない酢酸分子は細胞膜を通過し、細胞内で解離し平衡状態が作られる。微生物が細胞内の水素イオンの排出にエネルギーを消費してしまうこと、細胞内のpH変化により、活動が妨げられる。このようなメカニズムで酢酸ナトリウムなどの有機酸類は微生物の活動を妨げると言われている¹⁷⁾ (図1)。代表的な有機酸の抗菌力と解離定数を比較すると、相関が見られる。有機酸は解離の程度によって効力が変化するため、解離しにくい環境(低pH)では、効力が強くなり、解離しやすい環境(高pH)では効力が弱くなる。食品の保存に有機酸類を使用するときには、その食品のpHが変化しないよう注意する必要がある。

有機酸は解離度と抗菌力に相関があるが、その説明だけでは理由が見つからない例外も多数存在する。酢酸、乳酸、クエン酸の*Lactobacillus*に対する各pHでの効果を図2に示した。pH 4ではクエン酸よりも乳酸、酢酸のほうが強い効果を示している。しかし、pH 6では抗菌



解離度の小さい酸が効果が強い。
食品のpHにより効力が変化する。

細胞内のpH低下による酵素の不活化。
H⁺排出のためのエネルギーの消耗。

- 抗菌力
クエン酸<グルコン酸<アジピン酸<酢酸
- 解離定数(pKa)
クエン酸<グルコン酸<アジピン酸<酢酸
(3.09) (3.86) (4.42) (4.76)

図1. 有機酸(酢酸ナトリウム)の作用

[†] 連絡先

☎ 561-8588 豊中市三和町1-1-11

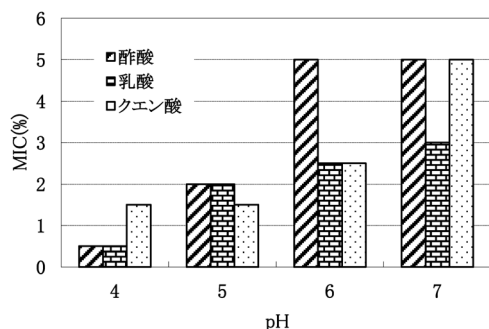


図2. *Lactobacillus casei*に対する各有機酸の効果
松田敏生: 食品微生物制御の化学, p. 104-132, 幸書房, 東京 (1998) を元に改編.
MIC: 最小発育阻止濃度

力が強いといわれている酢酸の効力が一番弱く、pH 7では乳酸が一番強い結果となっている。このように、pHによって有機酸の効力の順位が変わることがあり、さらに対象とする微生物によっても効力の順位が変わることがよくある。それぞれの有機酸に特徴があることに注意が必要であり、流通している日持向上剤には酢酸ナトリウムだけでなく、他の有機酸を配合する事例が多い⁹⁾。

有機酸のなかでもクエン酸はキレート効果を持っていることより、*Bacillus*のD値を下げる効果を示す場合があり、クエン酸三ナトリウムを添加すると芽胞からMgイオンの漏洩が増え、D値の低下が観察されたと報告されている¹³⁾。しかし、この効果もすべての芽胞に同じ効果を示すわけではなく、微生物の種類によってその効果には強弱があり、クエン酸三ナトリウムを添加すればすべての微生物のD値を下げるわけではない。われわれの行った実験では、*B. cereus*に対してはクエン酸三ナトリウムだけではほとんどその効果を確認することができなかった。

2. グリシン

グリシンが過剰に存在するとアラニンの代わりにペプチドグリカン前駆体に取り込まれ、ペプチドグリカン合成酵素との反応が弱まり、ペプチドグリカンの合成が阻害され、さらにはペプチドグリカン自身の構造が不安定になることより、微生物の生育を阻害すると報告されている⁵⁾ (図3)。グリシンはペプチドグリカンに作用するため、この構造を持たない真菌類には効果を示さない。もちろんヒトの健康に悪影響を与えることはない。

グリシンは微生物も栄養源として利用できるため、グリシンはある一定量以上添加しないとその効果は期待できない。われわれの経験ではグリシンだけで実用的な保存効果を出す場合には、0.1~0.2%程度では効果は期待できず、1%程度は必要だと考えている。卵焼きなどでは2%前後使用される場合もある。しかしグリシンを多く添加すると、食品が焦げやすくなったり、グリシン特有の味が風味を損なったりするなどのデメリットを生じやすくなる。

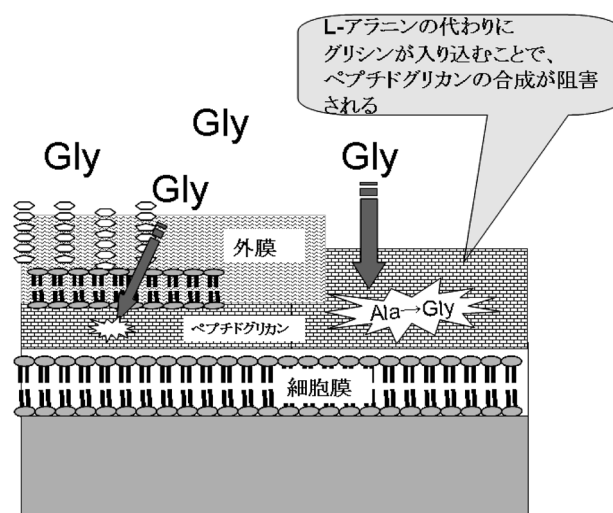


図3. グリシン (Gly) の作用

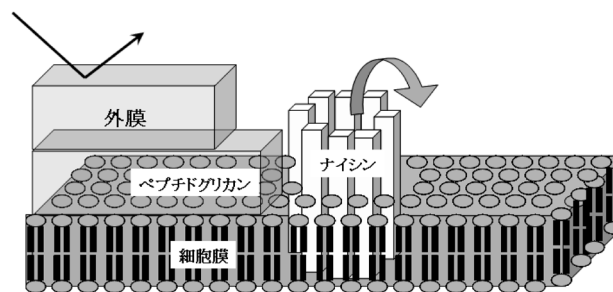


図4. ナイシンの作用

ナイシン分子がLipid II (ペプチドグリカン前駆体) を介して細胞膜にくさび状に突き刺さり、膜に穴を開ける。細胞内からATPやアミノ酸などの細胞内物質の漏洩により、微生物が活動できなくなる。

グラム陰性菌では、ペプチドグリカン層の外側に外膜 (リポ多糖) により細胞膜までナイシンが到達できないため効果を発揮できない。

3. ナイシン

ナイシンは乳酸菌が作る抗菌ペプチドで、細胞膜に穴を開け、形成された細穴からATPやアミノ酸などが流れ出し、微生物の活動を阻害すると言われている⁴⁾ (図4)。

しかし、ナイシンが直接細胞膜に突き刺さるのではなく、ペプチドグリカンの前駆体と結合することで効率良く、細胞膜に細穴を形成する¹⁾。ナイシンは細胞膜に細穴を形成するため殺菌的にも作用する。しかし、グラム陰性菌はペプチドグリカン層の外側に、リポ多糖の外膜を持っており、ナイシンはこの外膜を通過できず、グラム陰性菌には有効でない。グリシンと同様にカビや酵母には効力が弱い。

ナイシンは低pHでは安定であるが、pHが高くなると安定性が悪くなることが知られている²⁾。この安定性は、エタノールや食品成分の存在で改善される。中性付近の緩衝液中では95℃で5分間加熱するだけで、その活性は10%以下となるが、エタノール溶液中では、非常に安定で活性低下は認められなかったことが報告されて

表1. 食品（ホワイトソース pH 7.0）中のナイシンの安定性

加熱条件	残存率 (%)
未処理	100
70℃ 20分	89
90℃ 5分	83
90℃ 10分	84
90℃ 20分	75

ホワイトソースを調整し、ナチュラルキーパー®（ナイシン 400 ppm）を添加し、各条件で加熱処理した後、ナイシン活性を測定した。

ナイシン活性は、微生物学定量法（食品中のナイシン分析方法：平成21年3月2日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知参照）に基づいて測定した。

表2. ハンバーグの保存試験

試験区	保存日数 (25℃) 一般生菌数 (cfu/g)		
	0日	1日	2日
無添加	<10	1.1×10 ⁵	>10 ⁶
グリシン・酢酸ナトリウム製剤 0.4%	<10	1.4×10 ³	2.0×10 ⁵
グリシン・酢酸ナトリウム製剤 1.0%	<10	<10	<10
ナチュラルキーパー® 0.25%	<10	<10	<10

いる¹⁰⁾。またわれわれの行ったホワイトソース (pH 7) への応用試験において、90℃ 20分間加熱しても活性が75%残存することが確認された。緩衝液のようなシンプルな液体中では安定性は高くないが、食品中では蛋白質などの食品成分による保護作用で安定性が高まるのではないかと推定している。

ナイシンは、加工食品で問題となる乳酸菌や *Bacillus* などのグラム陽性菌に、ごく微量で効果を示すことより、非常に使いやすい保存料ではあるが、使用できる食品の範囲が定められている¹²⁾ので、使用する際は、対象とする食品が使用基準に含まれているか確認することが必要である。

ナイシンが優れた保存料であると評価される理由の一つに、ごく微量で保存効果を示し、食品の風味を全く変えないことが挙げられる。ハンバーグの保存試験について一般的なグリシン・酢酸ナトリウム製剤とナイシンとの比較を表2に示した。コンビニエンスストアなどの一般的な保存条件、25℃ 48時間保存後の菌数が10⁵cfu/g以下の条件をクリアするには、グリシン・酢酸ナトリウム製剤では1%の添加が必要だが、ナチュラルキーパー®（ナイシン10%配合製剤）の場合0.25%であった。このハンバーグを味覚センサーで分析した結果、ナチュラルキーパー®は、無添加区と同じプロファイルであったが、グリシン・酢酸ナトリウム製剤添加区は酢酸ナトリウム由来の酸味と旨味（エグミ）が強く感じることを示された。ナイシンは食品の味を全く変えることなく、保存性だけを高めることが可能な保存料である。

4. リゾチーム

リゾチームは、ペプチドグリカン加水分解する溶菌

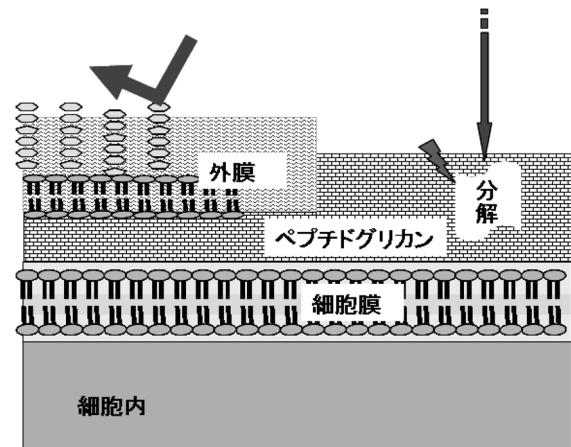


図5. リゾチームの作用

ペプチドグリカンを分解することで微生物の活動を抑える。

グラム陰性菌では、ペプチドグリカン層の外側に外膜（リポ多糖）により細胞膜までナイシンが到達できないため効果を発揮できない。

キレート剤で外膜を取り除くと効果を発揮する。

表3. リゾチームの最小発育阻止濃度

供試菌株	MIC(ppm)
<i>Escherichia coli</i> IAM 12119	>1,000
<i>Staphylococcus aureus</i> IAM 12544	>1,000
<i>Bacillus cereus</i> NBRC 15305	>1,000
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC 13719	250
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ATCC 49025	250
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	>1,000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC 10217	1,000
<i>Pichia anomala</i> NBRC 10213	>1,000

S. cerevisiae, *P. anomala* はポテトデキストロース寒天培地、その他は標準寒天培地を用い測定した。

酵素として知られている¹⁸⁾ (図5)。グラム陰性菌の場合、ナイシンと同じようにリゾチームが外膜を通過できないため、効果を示さない。グラム陽性菌であれば、すべてのグラム陽性菌に効果を発揮するように思われるが、食品の保存に役立つ程度に効果を発揮するのは、ごく限られた微生物だけである。いろいろな微生物に対するリゾチームの最小発育阻止濃度を表3に示した。グラム陽性菌の中でも効果を示す菌が限定されており、同じ *Bacillus* 属でも、*B. subtilis* には強い効果を示しても *B. cereus* には効果が弱く、菌種によってその効果は大きく変化する。

リゾチームは加熱すると酵素活性がなくなり抗菌力も失われると信じられてきたが、最近の研究では、酵素活性を失っても抗菌力は残ることが明らかとなってきた^{3,8)}。中性の緩衝液中で80℃ 20分間加熱すると、リゾチーム活性は0となる。しかし、加熱により酵素活性0となったリゾチームと未加熱のリゾチームの抗菌力を同じ蛋白質量で比較すると、加熱処理したリゾチームのほ

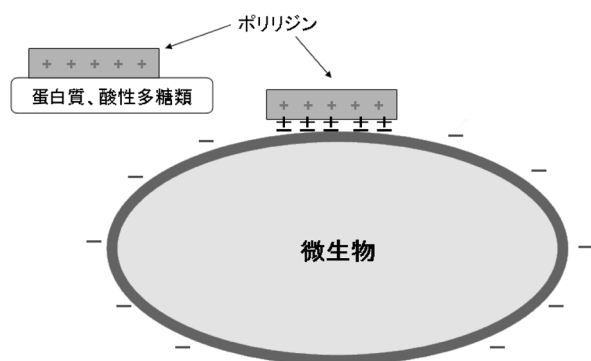


図6. ポリリジンの作用

微生物表面に吸着することで、電気的なバランスを崩し、外膜が破壊され細胞に障害が生じる。食品中の蛋白質やカラギナンのような酸性多糖類にも吸着し効果が低下する場合がある。

うが菌数を減らす効果が高かったと報告されている。この効果はグラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌でも観察されている。このメカニズムとしては、加熱することで疎水性のアミノ酸がリゾチーム表面に露出し、変性したリゾチームが微生物の細胞膜表面に吸着することで、膜の機能を阻害するためではないかと報告されている。

しかし、疎水性部分が表面に露出すれば、リゾチームの凝集や他の蛋白質への吸着などを生じ食品中での効果は期待できない場合がある。このリゾチームの性質を利用するには何らかの改良方法が必要であり、今後の研究課題である。

5. ε-ポリリジン

ε-ポリリジンはアミノ酸のリジンが25~30個鎖状につながった構造をしており、プラスに帯電している。プラスに帯電していることより、微生物表面に吸着し、微生物表面の電気的なバランスを崩すことによって微生物の増殖を抑えると報告されている⁶⁾(図6)。電気的な力で微生物に吸着するため、食品中にカラギナンやキサンタンガムのような酸性多糖類が存在すると、ε-ポリリジンは酸性多糖類に吸着し、効力が低下する。ドレッシングのような液状食品にキサンタンガムとε-ポリリジンを併用すると、キサンタンガムとε-ポリリジンの複合体が沈殿し、保存効果もなくなってしまう。また、酸性多糖類だけでなく、蛋白質にも吸着してしまうため、蛋白質の多い食品では、効果が低下することがある。さらに、塩濃度の影響も受ける。ポリリジン製剤の効果に、出汁がどの程度影響するかを調べた結果を表4に示した。出汁の添加量が増えると、ε-ポリリジンの効果が低下することが示されている。ε-ポリリジンは、食品中の成分との相互作用があるので、実際の食品でその効果を確認する必要がある。

保存料・日持向上剤に使用される代表的な抗菌物質の作用部位のモデルを図7に示した。ε-ポリリジンは蛋白質分解酵素で分解され効力を失う。グリシン、リゾチーム、ナイシンは細菌特有の構造に作用するものであり、

表4. 出汁を添加した培地でのε-ポリリジンの抗菌試験

出汁エキス添加量 (%) ()内は食塩濃度 (%)	製剤の添加量 (%) ()内はε-ポリリジン濃度 (ppm)				
	0 (0)	0.05 (144)	0.1 (288)	0.15 (342)	0.2 (456)
0 (0.00)	+	+	0	0	0
2 (0.36)	+	+	0	0	0
4 (0.71)	+	+	+	17	0

接種菌数: *Escherichia coli* NBRC3972 10^5 cfu/シャーレ
シャーレ中のコロニー数をカウントできる場合はその数値を記載し、コロニーが多くカウントできないものは+で表した。

ε-ポリリジン製剤: ε-ポリリジン22.8%, エタノール7.4%, 乳酸ナトリウム1%, デキストリン22.8%, 水46.0%

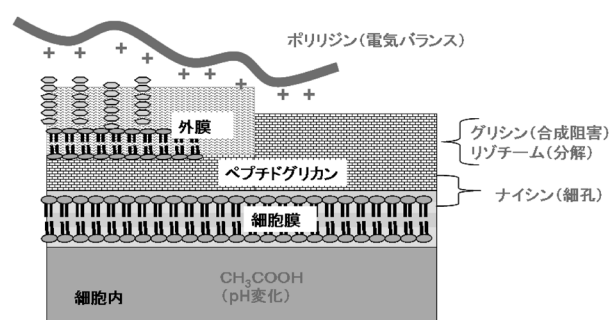


図7. 細菌の膜構造と保存料・日持向上剤の作用部位

人には作用できないし、有機酸で細胞内のpHを変化させるほど摂取することは事実上不可能である。

ここで示された抗菌物質を食品添加物として使用される適正量を人が摂取したとしても、人体に悪影響を及ぼすような物質ではないことが理解できると思う。

併用効果

これまで、保存料・日持向上剤に使用される成分について各論を述べたが、実際の食品では、各成分を単独で使用することは少なく、効果を高めるために複数の成分を併用して使用することが多い。

以下に、組合せにより効果が高まる事例を紹介する。

よく知られている事例として、グリシンと酢酸ナトリウムの併用効果がある。それぞれを単独で使用するよりも、併用したほうが同じ添加量で、より高い効果を示すことが報告されている¹⁴⁾。

液卵の保存のためにグリシン単独とグリシン+酢酸ナトリウムの併用を比較したところ、グリシンを1%単独添加区とグリシン0.5%+酢酸ナトリウム0.2%併用添加区はほぼ同じ効果を示し、低コストで保存効果を得ることが可能であった。

ナイシンとの相乗効果が知られている物質に、リゾチームやシヨ糖脂肪酸エステルがある¹⁹⁾。

われわれは、通常腐敗防止目的ではあまり使われないアスコルビン酸ナトリウムが、ナイシンの効果を高める

表5. リゾチームとシヨ糖脂肪酸エステルの併用効果

供試菌株	最小発育阻止濃度 (ppm)		
	SE	リゾチーム	
		単独	SE 250 ppm 併用
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC 13719	>500	250	125
<i>Bacillus cereus</i> NBRC 15305	>1,000	>1,000	250
<i>Staphylococcus aureus</i> IAM 12544	>500	>500	188

SE: シヨ糖脂肪酸エステル

ことを明らかにした¹¹⁾。

また、われわれは、リゾチームとシヨ糖脂肪酸エステルの相乗効果を発見し¹⁵⁾、アートフレッシュ[®]50/50の製品名で販売している。リゾチームの項で述べたように、リゾチームが効果を示す微生物は限定されている。しかし、シヨ糖脂肪酸エステルと併用するとこれまで単独では効果を示さなかったセレウスやブドウ球菌に対しても効果を示すようになる(表5)。また、リゾチームの熱に対する安定性も高まる。

アートフレッシュ[®]50/50の使用例としてフラワーペースト(クリームパンのクリーム部分)への応用を紹介する。アートフレッシュ[®]50/50を250 ppm添加すると、グリシンの添加量を2%から半分以下の0.75%に減らすことができる。グリシンの添加量が少なくなることで、焦げの問題を少なくすることが可能となる。このようにアートフレッシュ[®]50/50は、保存効果を維持したまま従来の日持向上剤の添加量を減らすことで味や外観を改良することができる。

殺菌効率の向上

われわれは、微生物の増殖を抑えるだけでなく、殺菌効率を高める方法についても検討している。

保存料・日持向上剤は菌数の少ない、きれいな原料を使ったり、十分な殺菌が行われないと、その効果は激減する。言い換えれば、殺菌効率を高めることができれば、保存料・日持向上剤の効果を飛躍的に高めることができると考えられる。

*B. cereus*の芽胞懸濁液を加熱し、加熱後の残存率を調べたところ、日持向上剤としてよく用いられる酢酸ナトリウム、グリシンには殺菌促進効果はなく、一部の*Bacillus*で効果が確認されているクエン酸三ナトリウムでも効果は確認できなかった。しかし、アスコルビン酸ナトリウムは、*B. cereus*の殺菌促進効果(図8)があることが判明した。さらにアスコルビン酸ナトリウムにクエン酸三ナトリウムを併用するとその効果がさらに高まることも判明した。アスコルビン酸ナトリウム0.5%にクエン酸三ナトリウム0.3%併用すると加熱後の菌数(*B. cereus*)を1/100にする効果があった¹⁶⁾。

この殺菌促進効果を日持向上剤製剤に組み入れると力価の高い保存料・日持向上剤製剤が調製可能である。当社はこの技術を応用した日持向上剤製剤も販売している。

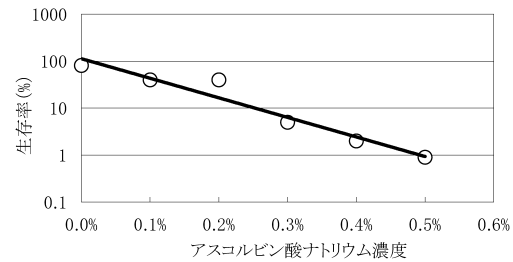


図8. アスコルビン酸ナトリウムによる殺菌促進効果

Bacillus cereus NBRC 15305の芽胞 3.0×10^4 cfu/ml懸濁液にクエン酸三ナトリウムとアスコルビン酸ナトリウムを添加し、90℃ 20分間の加熱後の残存率を示した。

アスコルビン酸ナトリウム濃度に依存し殺菌促進効果が高まった。

おわりに

保存料・日持向上剤は食中毒を防止し、より安全な食品を作ることが可能になるだけでなく、廃棄ロスを減らすことができる有用性の高い添加物であり、腐敗防止対策の有効な手段である。

しかし、食品の成分やpHによって効果が変化する場合が多く、また単独で使用するよりも併用することで効果が高まる場合もあり、個々の物質の特徴を理解したうえで使用すべきである。

保存料・日持向上剤は微生物特有の構造に作用することが多く、適切な添加量であれば、ヒトに影響することはない。食品開発に携わる者は保存料・日持向上剤が食品の安全を守るために必要な添加物であることをより広く伝えていくことが重要と考える。

文 献

- 1) Brotz, H. and Sahl, H.-G.: New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target. *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, 1-6 (2000).
- 2) Davies, E. A., Bevis, H. E., Harris, R., Potter, J., Williams G. C. and Delves-Broughton J.: The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**, 186-187 (1998).
- 3) Doring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkman, O. and Gieffers, W.: The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Lett.*, **449**, 93-100 (1999).
- 4) Gao, F. H., Abee, T. and Konings, W. N.: Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2164-2170 (1991).
- 5) Hammes, W., Schleifer, W. H. and Kandler, O.: Mode of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, **116**, 1029-1053 (1973).
- 6) 平木 純: ϵ -ポリリジンの基礎と応用. 防菌防黴誌, **23**, 349-354 (1995).
- 7) 本多芳彦: 消費者ニーズを満たした安全な食品の開発. *J. Rakuno Gakuen Univ.*, **35**, 1-19 (2011).

- 8) Ibrahim, H. R., Higashiguti, S., Juneja, L. R., Kim, M. and Yamamoto, T.: A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1416-1423 (1996).
 - 9) 稲津康弘, 川本信一: 天然物由来添加物による殺菌・静菌技術. *食科工誌*, **54**, 425-435 (2007).
 - 10) 川井 泰: エタノール中におけるナイシンの抗菌効果と感作菌体内物質の網羅解析. *Foods Food Ingredients J. Japan*, **218**, 142-148 (2013).
 - 11) 小磯博昭: 食品添加物としてのナイシンの利用. *Foods Food Ingredients J. Japan*, **215**, 440-448 (2010).
 - 12) 平成21年3月2日 厚生労働省告示第45号 (2009).
 - 13) 久寿米木一裕, 高橋武美, 宮城盛安: めんつゆの加熱殺菌へのクエン酸ナトリウム添加効果. *食科工誌*, **43**, 740-746 (1996).
 - 14) 松田敏生: 調味料 (グリシン), *食品微生物制御の化学*, p. 91-104, 幸書房, 東京 (1998).
 - 15) 三栄源エフ・エフ・アイ(株): 特許公報, 特許第4226242号 (2008).
 - 16) 三栄源エフ・エフ・アイ(株): 公開特許公報, 特開2013-165645 (2013).
 - 17) 指原信廣: 酸性条件下で受けるストレス・損傷に対する細菌の挙動とその制御. *日食微誌*, **26**, 81-85 (2009).
 - 18) リゾチーム. 第8版食品添加物公定書解説書. 谷村顕雄 / 棚本憲一監修, D1695-D1698. 廣川書店, 東京 (2007).
 - 19) Tomas, L. V., Clarkson, M. R. and Delves-Broughton, J.: Nisin. *Natural food antimicrobial systems*. A. S. Naidu (ed.), p. 463-524, CRC Press, USA (2000).
- ※ 「ナチュラルキーパー」, 「アートフレッシュ」は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社の登録商標です.