 総 説

ナイシンの食品工業への応用

 慶 田 雅 洋*

加熱処理は食品の保存性を高めるために行なわれるもっとも有力な殺菌法である。しかしながら、微生物の生成する胞子は耐熱性が強いので通常の殺菌条件で完全に死滅させることはむずかしい。かん詰食品およびプロセスチーズなどでは殺菌を行なうと同時に、外部からの微生物の2次汚染を防ぐために密閉した状態で保存される。このような環境は胞子形成細菌 (*Bacillus* 属細菌および *Clostridium* 属細菌) にとっては絶好の繁殖条件を提供することになり、これらの胞子が生残している場合には発芽、増殖して製品の分解、膨張 (blowing or inflation) および変敗に導くことがあり、食中毒の原因となることも考えられる。この際に乳酸菌の生産する特殊抗生物質ナイシンを添加すれば胞子を抑制してこれらの変化を防止することができる。

ナイシンは数カ国で食品添加物として許可され、その使用は実用化されており、外国ではナイシンの利用に関する総説^{1)~5)}も認められるが、わが国では研究報告も少なく余り知られていないのでこの機会にその概要について紹介する。

ナイシンの発見の歴史およびその性質

ヨーグルトの製造の際に、スターターの *Lactobacillus bulgaricus* にある種の *Streptococcus lactis* を共生させて使用すると酸の生成が抑制されることが、1928年に ROGERS⁶⁾ によって認められた。1933年に WHITEHEAD⁷⁾ はニュージーランドチーズ製造の際にある種の streptococci (乳酸連鎖球菌) を乳酸菌スターターに混合した場合には酸生成が抑制されることを明らかにした。後者はのちに、この抑制物質の部分的濃縮に成功し、濃縮物の性質の一部を明らかにしている。英国でも1943年に同様の性質をもつ *S. lactis* を原料乳および農場の乳業機械装置などから分離することに成功した。1944年に MATTICK および HIRSCH⁸⁾ はついに発育抑制物質の単離

に成功しナイシン (nisin) と命名した。名称の由来は LANCEFIELD の免疫学的分類で、N 群に属する連鎖球菌の生産する発育抑制物質 (Group N Inhibitory Substance) の頭文字を取ったものである。

このようにナイシンは *S. lactis* の特殊の菌株の生産するものであるが、*S. lactis* はこのほかにも麦芽臭を生産するもの (*S. lactis* var. *maltigenes*)、ジアセチルを生産するもの (*S. diacetylactis*) など色々の変種が存在する。

ナイシンは分子量約10,000のポリペプチドであって、これは物理化学的性質の異なる5個のペプチドより成立しているといわれる。アミノ酸組成では、通常のアミノ酸以外に羊毛蛋白などに含まれているランチオニンおよびアロランチオニンなどの特殊アミノ酸 (いずれもL型) を含む。のちになって CHEESEMAN および BERRIDGE⁹⁾ は向流抽出法によりナイシンを精製して分子量7,000の単一ペプチド-ナイシン A を得ている。

ナイシンの抗菌性スペクトラは余り広くなく、*Staphylococcus* 属 (ブドウ状球菌)、*Streptococcus* 属 (連鎖状球菌)、*Clostridium* 属 (クロストリジウム、嫌気性胞子形成細菌)、*Bacillus* 属 (バチルス、好気性胞子形成細菌)、*Corynebacterium* 属 (コリネバクテリウム) および *Neisseria* 属 (りん菌) などの細菌に対して有効である。グラム陰性菌には効力を示さない。ナイシンの単位は READING (レディング、スコットランドの地名) の英国国立酪農研究所の BERRIDGE¹⁰⁾ によって定められた READING 単位 (R.U.) が広く用いられている。この方法は培養液中で供試菌株 (*Streptococcus agalactiae*) の発育を阻止する最低濃度を1 R.U. とするものである。ナイシンは1947年に BERRIDGE¹¹⁾ によって結晶化された。アルコールから再結晶した場合には典型的な針状結晶が得られ、その効力は $(50 \sim 100) \times 10^6$ R.U./g であった。実用向には精製されたきわめて濃度の高い製品が英国

* 東京大学農学部農芸化学科 (東京都文京区弥生 1-1)
Application of Nisin in Food Industry. By MASASHIRO IWAIDA.

の APLIN & BARRETT 社より、“Nisaplin (crystalline powder)”として発売されており、その効力は 40×10^6 R.U./g である。またチェコスロバキアでは効力を 10^4 R.U./g に調整したナイシン製剤を“Nislaktin”¹²⁾と称して製造しており、同国内の 10 カ所のプロセスチーズ工場で過去 10 年間にわたって使用しており、酪酸菌 (*Clostridium butyricum*) の抑制に効果をあげている。ナイシンの前にのべた細菌に対する効力は菌種によって異なり、基質 1g あたり 0.25~500 R.U. の範囲で添加することが必要である。

ナイシンは水には非常に溶けにくく、pH 7 付近における溶解度は $75 \mu\text{g/ml}$ にすぎないが、酸性側ではよくとけ、pH 5.6 で $1,000 \mu\text{g/ml}$ 、pH 4.2 では $12,000 \mu\text{g/ml}$ の溶解性を有する。ただし蛋白質が存在するとナイシンがその表面に吸着するので溶解度が增加する。アルカリ性では急速に分解するので pH 6.5 以下で使用する事が望ましい。けんだく液と溶液状態ではその効力も異なり、後者は前者の 1~2 倍 (平均 1.7 倍) の効力があるといわれる。したがって使用にあたっては 0.05~0.2 規定の塩酸に溶かすことが多く、また大部分の食品の場合にはこのようなうす酸の添加は製品の pH にほとんど影響を与えないものと考えられる。ナイシンは加熱にはきわめて安定であり、 $50 \mu\text{g/ml}$ を含む 3% 蛋白溶液について実験したところ、pH 2~6 では 100°C で 30 分間加熱しても効力には変化はないが、アルカリ性では弱く pH 8 で 2 時間、pH 9 で 1 時間または pH 10 で 30 分間の加熱により完全に失活する。ただしこれらは溶液状態の場合であって食品の形態によって熱安定性も異なって来る。 γ -線照射を行なった場合には、 200 R.U./ml の濃度でナイシンをけんだくさせた脱脂乳に 0.5 Mrad を照射したところ 80% が失活し、 2.7 Mrad では 100% が失活することが報告されている。しかもこの失活率はけんだく媒体およびナイシン濃度に無関係である¹³⁾。

ナイシンはそれ自体、分子量が大きく蛋白質に近い性質を持っている。低濃度で強い効力を発揮する治療用医薬品—ペニシリン、ストレプトマイシンなどの低分子の抗生物質—と比べるとその効力も微弱であり、著しく性質を異にするものである。乳酸菌を使用した発酵乳製品には多少の差はあるにせよ天然に含まれており、牛乳中のラクテニン、卵白中のアビジンなどと同様に考えてよい。

ナイシンの作用メカニズムについては RAMSEIER¹⁴⁾ は *Cl. butyricum* の細胞を M/15 リン酸緩衝液にけんだ

くさせたものにナイシン溶液を添加してその作用効果を調べた。ナイシンは細胞および発芽した胞子を破壊することができるが、未発芽の胞子に対しては効力をもたない。細胞および発芽した胞子に対する作用は陽イオン表面活性剤や他のポリペプチド抗生物質ズブチリン (subtilin, *Bacillus subtilis* の生産する特殊抗生物質) などと同様に、表面に吸着して細胞膜の半透性の機能を破壊するものである。発芽後 6 時間の幼細胞に対する作用を電子顕微鏡により観察した結果は第 1 図に示すとおりであって、幼細胞は完全に溶解してしまっていることが認められる。ただし発芽 17 時間後の細胞に対してはこのような強力な作用を示さず、細胞膜周辺のかげが薄くなることにより細胞質の一部が吸出されたことを認めうるのみであったが、24 時間後の細胞は表面において自己消化を起こすことが確かめられている。このことからナイシンはすべての時期の細胞に対して破壊力を有するが、幼細胞と老細胞では作用の仕方が形態学的に異なることが認められる。また GARCIA¹⁵⁾によれば、*Cl. butyricum* の増殖を抑制する程度に加えられたナイシンは、菌の炭水化物代謝には影響しないと報告されている。また発芽した胞子に対する作用について、GOULD¹⁶⁾ は *Bacillus cereus* などを使用して詳細に検討した結果、ナイシンは発芽段階を抑制しないが、次の胞子膜の溶解または破壊の段階に移る前の状態において作用することを

第1図 *Clostridium butyricum* に対する
ナイシンの作用

(a) 対照, (b) ナイシン添加 (60 R.U./ml)
注. 発芽後 6 時間の幼細胞, 拡大倍率 8,100×

明らかにした。ナイシンに限らずズブチリン、ペニシリン、クロルテトラサイクリンなどの抗生物質、~~カ~~塩化メルクリ安息香酸、亜ヒ酸、アジドなどの化学物質もすべて胞子の発芽には影響せず、発芽後に作用するものであることが知られている。これは胞子の発芽は比較的簡単な化学反応であって環境条件にほとんど影響されないものと考えられ、これを抑制する物質としては現在までのところ D-アラニン、高濃度の重金属塩 (Cu, Zn, Ni など) がわずかに知られている程度である。

ナイシンの検出と定量

ナイシンの検出法として SNELL ら¹⁷⁾ はペーパークロマトグラフィーにより他のグラム陽性菌に作用するポリペプチド抗生物質から分離確認する方法について報告している。

定量 (検定) 法は現在までのところすべて微生物定量によるものであって、最初に行なわれた方法は *Streptococcus agalactiae*¹⁸⁾ または *Streptococcus cremoris*¹⁹⁾ を供試菌とする希釈法、比濁法または拡散法によるものであって、これらの方法は現在でも標準法として使用されているが、これらとは別に還元酵素レサズリン (resazurin) を指示薬として用いる方法²⁰⁾、ペニシリンにならってカップ法によって行なう方法²¹⁾ などが簡易検定法として知られている。

レサズリン法は牛乳の細菌学的品質の判定に通常用いられているレサズリン試験を応用したもので、供試菌としてはすみやかに生育する *S. cremoris* を使用する。検定結果は *S. agalactiae* による希釈法、比濁法とよく一致するばかりでなく、他の方法が 15~48 時間かかるのに対してわずか 1 時間で済む上に、培養時間が短いために器具の滅菌その他の無菌的操作をとくに必要としない点も有利であり、0.5 R.U./ml まで測定しうる。

カップ法はナイシンが Tween 80 添加寒天培地中に拡散することを利用した方法であり、試験菌としては *S. cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus* または *Bacillus megatherium* などを使用する。ナイシンの 5℃ における寒天培地中への拡散に 14 時間、培養に 18 時間を要する。

以上の 2 法が日常検定のために APLN & BARRETT 社などで通常使用されている方法であるが、このほかに最近 *Bacillus stearothermophilus* による平板培養法²²⁾、高温菌 *Thermobacillus tarbellicus* (発育適温 68℃) を使用する方法²³⁾、pH 6.0 で *S. cremoris* を 30℃ で 60 分間培養したのちに対照が 240 秒で凝固するようにレン

ネット剤を添加し、凝固時間の遅延からナイシン含量を求める方法²⁴⁾ などが報告されている。ただしこれらの微生物定量法において注意すべきことは、ペニシリンなどの他の抗生物質の存在により影響されないことを確かめておくが必要である。

食品への応用

1. かん詰食品

加熱殺菌されたかん詰のなかでも、胞子は完全に破壊されずに残存している場合がある。これは胞子がきわめて耐熱性であり、これを完全に殺滅するような条件ではかん詰食品の組織自体も破壊されてしまうからである。いろいろなかん詰について調べた結果は、胞子 (かん菌の菌体内胞子を含む) の残存率は 8~23% であるという。残存胞子のうちで多いのは *B. stearothermophilus*, *Bacillus coagulans* および関連細菌、あるいは *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Cl. butyricum* および関連細菌であって、*Bacillus* 属はガスを発生することなく酸を生成するので “flat-sour” 型変敗と呼ばれ、*Clostridium* 属はガス発酵を伴って酸を生成するので “hard swell” 型変敗と呼ばれており、外見的にはかんが膨張するのが特徴である。これらの胞子の残存したかんは殺菌後の急速冷却が行なわれなかったり、あるいは熱帯地方に輸出されて外気温で保存された場合に変敗を起こしやすい。なお、かん詰内に非胞子形成細菌の存在する場合には、殺菌の不十分あるいは巻きしめの不完全によるものであり、このような汚染細菌 (雑菌) にはナイシンの作用を受けないものが多い。したがってナイシンの添加は決して不完全、不衛生な処理の代用にはならないのである。

ナイシンの添加は耐熱性胞子の発芽による変敗を防止すること、および胞子の耐熱性を減少せしめることにあり²⁵⁾、ナイシンの添加により加熱条件を緩和することも可能であり、これはトマトジュースなど加熱により変質するおそれの大きいかん詰製品の場合にはとくに効果的である。

アメリカでは近年食品の自動販売機の普及とともにスープやマカロニなどを長時間保温貯蔵する場合が多くなっているが、SEGMILLER ら²⁶⁾ はその際にナイシンおよびタイロシン (tylosin *Streptomyces fradie* の浸漬培養によって得られる抗生物質、アメリカで実用の目的を以て最近検討されている) の保存剤としての効果について比較検討した結果、121℃ で 60 分間殺菌したクリームチキンスープ (低酸度食品) を 54.2℃ に保温した場合にはナイシンを 0.424~2.18 ppm 添加しても *B. stearo-*

thermophilus による変敗を抑制することはできないが、タイロシンの場合には 0.85 ppm の添加により 10 週間は完全に保存でき、2 年間でも大丈夫であると報告している。これとは逆にマカロニ (macaroni Creole, 酸性食品) の場合にはナイシンは 2.73 ppm の添加で *B. coagulans* による変敗を完全に防止することができるが、タイロシンでは 2.79 ppm まで添加しても無効であることを認めた。以上の結果からナイシンは酸性食品の *B. coagulans* による変敗に対しては防止効果を有すること、およびタイロシンは *B. stearothermophilus* による低酸度食品の変敗に対して有効であることが知られる。ただしナイシンはクリームチキンスープにも添加量を著しく増強すると効力を現わすが、タイロシンはいくらふやしてもマカロニには効かないのである。

ナイシンは正常の状態の胞子には効かないが、加熱によって部分的に破壊された胞子には効力を発揮するということも²⁷⁾ 加熱併用への強いささえとなっている。HALÁSZ および EUHASZ²⁸⁾ は *B. subtilis* に対する加熱、X線照射およびナイシン添加の3つの処理の及ぼす影響、およびその相乗効果について比較した結果、ナイシン単独の効力はほとんど無視しうる程度であり、加熱によって完全に破壊するには 85°C で 45 分間加熱して蓄積熱によって始めて効果を示すが、ナイシンをけんだく液 1 ml 当たり 25 R.U. 添加すると 85°C での加熱は 15 分間で十分であることを認めた。また X線照射の場合には 800 Krad で 99.9% まで破壊されるが、ナイシンを 25 R.U./ml 添加した場合には 400 Krad で十分である。したがってかん詰工業において使用するには加熱殺菌と組み合わせることが必要である。

ただしナイシンはボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) には無力である。したがって神経毒でしかも高い致死率を示しているボツリヌス中毒 (ソーセージのかん詰などでよく起こる) をナイシン添加により防止することはできない。したがって本菌の胞子の存在の可能性のある場合には加熱殺菌を十分に行なわなければならない。実際問題としてナイシンが効力を発揮する低い pH の食品では *Cl. botulinum* の発芽、増殖するおそれはないので加熱を緩和することが可能である。トマトジュース、ナシ、パインアップルなど加熱により変性するおそれのある酸性食品にはナイシンの使用が適している。CAMPBELL ら²⁹⁾ はトマトジュースに対するナイシンおよびズブチリンの効果についても比較検討した。その結果は第1表に示すとおりである。ナイシンはズブチリンよりも効力の高いことが知られる。

第1表 *Bacillus coagulans* を接種したトマトジュースの加熱処理と変敗の関係に対するナイシンおよびズブチリンの影響

添加物の種類	96.1°Cにおける加熱時間 (分)	変敗率 (%)	貯蔵期間 (月)
無添加	38	77	1
ナイシン	6	0	18
"	12	0	18
"	23	0	18
ズブチリン	6	18	18
"	12	1	18
"	23	1	18

注: 胞子接種量は各かんとも 1.5×10^6 , ナイシンおよびズブチリンの添加量は 1.4 ppm, 貯蔵温度は常温

現在までのところナイシンをかん詰工業において大規模に使用している例は見当たらないが、その利用はかん詰の品質改良の点からも有望視される。

2. プロセスチーズ

プロセスチーズは2種以上のナチュラルチーズを粉砕してこれに乳化剤 (リン酸ナトリウム, クエン酸ナトリウムなど) を2~3%, 少量の水および必要に応じて着色料, 香辛料などを加えて加熱かくはんして混合し成型したものであって水分は通常 44% 以下である。合成樹脂膜 (パラフィンシール), アルミ箔などで包装する, 水分が 44% を超えるものはプロセスチーズブレッドまたはチーズブレッドと呼ばれ, ぬりチーズとして使用される。

プロセスチーズは 70~80°C またはそれ以上の温度で加熱, 融解するので含まれる微生物は殺菌されるので, 衛生的に製造した場合には原料チーズより移行した好気性および嫌気性の微生物の胞子のみが残存する。プロセスの際の加熱条件では胞子を完全に破壊することは不可能であり, むしろ胞子に発芽のための適当な刺激 (heat shock) を与えることになる。加熱温度を 105°C まで上昇させても蛋白質および脂肪の保護作用のために胞子を完全に破壊することはできない³⁾, 実際問題としてこのような高温処理は風味の低下および製品の変色などをもたらすので好ましくない。

プロセスチーズは気密な組織をもっており, 酸化還元電位も低いのでかびや好気性細菌の胞子の発芽には不適当な状態にあり, 嫌気性胞子形成細菌 (*Clostridium* 属) のみが発芽, 増殖しやすい状態にある。*Clostridium* 属はグラム陽性のかん菌であり, 大部分が偏性嫌気性である。糖を分解して酪酸や酢酸などの有機酸および CO_2

H₂ または CH₄ などのガスを発生するので外見的にはプロセスチーズの膨張をもたらす。*Clostridium* 属細菌は一般に土壌および動物の消化管内に生息するので牛乳中には大体において存在する。プロセスチーズ中には 10 種類以上が見いだされている。*Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum* (チーズに特有の菌でギリシャ語でチーズを意味する単語 “tyrus” にちなんで命名), *Cl. perfringens* (発見者 WELCH にちなんで *Cl. welchii* と呼ばれる。ウェルシー中毒菌またはガスエソ菌としても知られている), および *Cl. sporogenes* などが主な菌であり, なかでも *Cl. perfringens* がもっともガス発酵が盛んである。HOOD および SMITH⁸⁰⁾ はチェダーチーズの 92% はガス発酵性 *Clostridium* を含むと報告している。それにもかかわらず大部分のプロセスチーズで保存中に膨張を起こさないのは酸度および食塩の効果によるものである。ヨーロッパ原産のチーズでたとえばエメンタル (Emmenthal) およびグリュエール (Gruyère) などのスイス型のチーズおよびエダム (Edam, 赤玉), パルメザン (Parmesan) チーズなどは一般に低酸度型であって, これらを使用した製品は膨張しやすい。このような *Clostridium* の発芽, 増殖は pH を低く, 食塩含量を高くしてやれば抑制することができるが, 人為的な pH の低下は組織の変化および品質の低下を招き, 食塩の増加は風味の点で好ましくない。これに対して硝酸塩, 過リン酸塩, 塩素酸塩あるいは亜塩素酸塩などを添加すればチーズの酸化還元電位を上昇させ *Clostridium* を抑制することが知られている⁸¹⁾が, これらの物質の添加は有毒であり許可される見込みがないばかりでなく, 好気性細菌の胞子の発芽を可能にし, その結果蛋白分解, 成分の分離を起こすのみならず, 場合によっては *Bacillus polymyxa* の発芽, 繁殖によるガス発酵および *Bacillus cereus* による食中毒を起こすおそれもでて来る⁸²⁾。またイタリアではパルメザンチーズの製造の際にホルマリンを添加して熟成期間 (12~24 ヵ月) 中の膨張を防止しているが, このような方法では製品中にホルマリンの残存するおそれもあり, 衛生的見地からも好ましくない。

以上のべたとおりプロセスチーズの膨張は工場環境衛生に十分注意して行なった場合でも起こるわけであるから, このような突発的な事故は工場における検査でも予防することはできず, メーカーはつねに不良品の出現による消費者の抗議を受ける危険にさらされているわけである。しかしながらナイシンを添加すればこのような危険をほぼ完全に回避することができる。すなわち津郷⁸³⁾はスイス産エメンタルチーズおよびニュージーラ

ンド産 チェダー チーズを 1:1 の割合で配合して, *Cl. perfringens* を原料チーズ 1g あたり 4.3×10^3 添加してプロセスチーズ (225g 詰) を製造し, ナイシンを 1g あたり 50 R.U. 添加したもの (P' 群), 無添加のもの (P 群) について 37°C で貯蔵実験を行ない, 胞子およびナイシン無添加のもの (C 群) を対照として膨張性を比較検討した。結果は第 2 図に示すとおりである。*Cl. perfringens* の発芽, 増殖の結果 P 群においてはガスが生成し貯蔵 7 日目ごろにはチーズ内に相当の容積を占め, その結果チーズは外観的にも明らかに膨張が認められる。10 日目になると内部に包含しきれなくなったガスは上方に抜け始める。14 日目には P 群のガス発酵は最大に達する。P' 群は安定であって, 10 日目までは対照と同様に全然変化が認められず, 14 日目にわずかに小孔が 1 個現われたのみであった。したがって 50 R.U./g のナイシンの添加によって *Cl. perfringens* による膨張をほぼ完全に抑制することができる。37°C に 3 週間以上放置すると C 群および P' 群においても膨張が認められる。これはエメンタルチーズに必然的に含まれて来る酪酸菌によるものであるが, 実際問題としてわが国では盛夏でも 37°C が昼夜にわたって 3 週間も続くことはないのので, 酪酸菌の膨張による被害は起こらないものと推定される。

酪酸菌に対するナイシンの効果に関して MAXA および TEPLÝ⁸⁴⁾ はチェコスロバキア産のプロセスチーズについて検討し, 原料に酪酸菌をとくに多量に含むナチュラルチーズを使用した場合には, ナイシン無添加区では 18~27°C に貯蔵した際に 5 日以内に膨張したが, ナイシンを 180~200 R.U./g 添加した場合には 13~28 日目まで膨張を抑えることに成功している。これに対して通常の品質のナチュラルチーズでは 100 R.U./g の添加で十分である。季節の影響については一般に夏季には多量のナイシンを添加することを必要とする。また 20~50 R.U./g 程度の添加では効力はほとんど認められず, むしろ逆に発芽を促進する効果を示すこともある。いっぽう, 逆に酪酸菌を完全に抑制するためには 1,000 R.U./g の添加でも不十分であることが示されている⁸⁵⁾。

ナイシンのプロセスチーズ製造の際の応用についてはスエーデン, ノルウェー, 英国, オランダ, スペイン, ポルトガルなどにおいても実施した報告があり, いずれも満足すべき結果を得ている。ただし, 気をつけなければならないことは, ナイシンの添加は粗悪な原料チーズの使用による品質の低下を補償することはできない点, および製造, 包装または保存の管理が不完全なときに汚

第2図 37°C に貯蔵したプロセスチーズの断面図

C: 対照区, P: *Clostridium perfringens* 孢子添加区 (4.3×10^3 /g チーズ) P': *Cl. perfringens* 孢子添加 (4.3×10^3 /g チーズ), ナイシン (50 R.U./g チーズ) 添加区

原料チーズの組成: スイス産エメンタルチーズ, ニュージーランド産チェダーチーズ (1:1), 貯蔵開始時の水分 41.8%

注. 使用したナイシンは英国 Aplin & Barrett 社の Nisaplin.

染する腐敗性中温菌に対してはナイシンは無効である点⁹⁶⁾の2つの問題である。

3. ナチュラルチーズ

ナイシンの使用が考えられるチーズとしては前項にも述べたとおりヨーロッパ原産の低酸度チーズが考えられる。これらのチーズでは乳糖が残っており, pH も高いので *Clostridium* によるガス発酵を起こしやすい条件にある。ナチュラルチーズの場合のナイシンの使用法としては, プロセスチーズの場合と同様にナイシン製剤を添加する方法, およびナイシン生産性の *S. lactis* をチーズスターターとして使用する方法の2つが考えられるが, 前者の場合には添加されたナイシンが *Clostridium* の孢子が発芽するまで残存していて *Clostridium* を破壊する

ことが必要であるが, プロセスチーズと異なりナチュラルチーズでは乳酸菌その他の細菌が生きたままで存在しており, これらの菌の生産したナイシン分解酵素ナイシナーゼによってナイシンが分解されて徐々に消失するのが難点である。後者の場合にはナイシン生産性 *S. lactis* は酸生成力が低いのでチーズの製造能率を遅延せしめ, これを救うために酸生成力の強い乳酸菌スターターと混ぜて使用すると, 生産されたナイシンのために混ぜられた乳酸菌の発育が阻害されること, グルイエールチーズおよびエメンタルチーズでは製造の工程において高温性乳酸菌の作用を必要とするが, ナイシン生産性 *S. lactis* は耐熱性の菌株を得ることができず, これは *Lactobacillus* 属乳酸菌で代用することができるが, その際

に添加された菌がナイシンにより発育を阻害されるかあるいはナイシナーゼを生産してナイシンを破壊するかのいずれかの場合が多いこと、ナイシン生産性 *S. lactis* はバクテリオファージにおかされやすいこと、および植継による継代培養の際に突如としてナイシン生産力を失なうことのある点などが難点として挙げられる。

添加したナイシンのエメンタルチーズに及ぼす影響については、WINKLER および FRÖHLICH⁸⁷⁾ はチーズ製造用牛乳に 44 R.U./ml のナイシンを添加してもチーズの熟成 14 日目に完全に消失してしまい、熟成後期に発芽する *Clostridium* に対する結果は認められず、むしろ酸生成に影響するので好ましくないことを明らかにした。チーズ製造用牛乳に添加せずに、チーズホエーまたは塩漬用食塩水にナイシンを加えてしみ込ませる方法についても試みたが、ナイシンがカード内に浸透しないので失敗に終わった。

ナイシン生産性 *S. lactis* のスターターとしての使用(ナイシン生産性スターター)についてはとくにオランダで熱心に研究されている。ナイシン生産性スターターに対するファージの影響は *S. lactis* の前培養にカルシウムを除去した牛乳を使用することによって克服することができる⁸⁸⁾。また継代培養の際に生成するナイシン生産性をそう失した変種について調べた結果、この変種はナイシン耐性であり、ナイシナーゼ生産性もないのでナイシンを破壊することもないことが明らかにされている。このような *S. lactis* のナイシン生産性の低下を防止するには定期的に平板培養を行なって菌を再選択することが必要である⁸⁹⁾。

オランダでは、ゴーダチーズおよびエダムチーズの製造にはナイシン生産性スターターが使用されている。殺菌乳を使用した場合に熟成中のナイシン含量はほとんど変わらなかった⁴⁰⁾。エダムチーズではナイシン生産性スターターを使用した場合には目 (cheese eye) の形成がしばしば不完全となり、熟成も遅れがちであるが、これはナイシンにより *Leuconostoc* 属乳酸菌が抑制されるためである⁴¹⁾。

エメンタルチーズの製造にナイシン生産性スターターまたはナイシン製剤を使用することは、不適当であると RITTER⁴²⁾ は指摘している。なぜならばナイシンによって乳酸菌の菌相がかく乱され、大腸菌群の発育による膨張を招くことがあるからである。スターターの *Lactobacillus helveticus* および *Lactobacillus lactis* をナイシン耐性にすることもできるが、同時に酸生産力も失なうので実用にはならない。

なお、フランスではナイシン生産性 *S. lactis* を 55.5°C に 30 分加熱→30°C に 12 時間培養の操作を反覆することにより、ナイシン生産性を失わず耐熱性のみを強化することに成功している⁴⁸⁾。

4. その他の製品

ハム、ソーセージ類は加熱滅菌することは組織を破壊するために不可能であり、簡単な殺菌が行なわれる程度である。これらの肉製品に残存する低温菌および中温菌に対しては残念ながらナイシンは全く無力である。またサルモネラ菌もナイシンによる作用を受けない。

ビックルスのなかには *Clostridium* および *Bacillus* 属細菌により変質することが多いが、これらの現象にはナイシンの使用の有効な場合が多い。キウリのビックルの黒変やオリーブ果実の塩漬の変敗 (zapatera と呼ばれており外国では問題になっている) への効果について報告されている²⁾。

し好飲料ではチョコレートミルクへの使用が有望である⁴⁴⁾。

食品工業のみならず飼料製造の分野においてもナイシンの応用に関する報告が認められる。ZEILINGER および BINDER⁴⁵⁾ はナイシン生産性 *S. lactis* を含むホエーペーストおよび糖蜜をサイレージ製造の際に添加すると酪酸菌含量が低く、pH が 4.0 以下のサイレージを製造しうることを報告している。酪酸菌の増殖は製造の初期にはナイシンによって、末期には繁殖した乳酸かん菌によって抑制される。

ナイシンの毒性

ナイシンはそれ自体蛋白質に近い性質を有するものであり、生理学的に異常な D-系列のアミノ酸を含まない。ナイシン生産性 *S. lactis* は酸乳および乳業器具のみならず乳牛の糞便、ヒトの口こうおよび糞便などからも検出される⁴⁶⁾。したがってナイシンは自然界に広く存在する物質であるということが出来る。MATTICK および HIRSCH⁴⁷⁾ はナイシン粗粉末のマウスへの皮下注射による LD₅₀ は体重 1 kg あたり 3.5 g であって、急性毒性はきわめて低いことを認めた。またマウスまたはモルモットに連日 50 mg/kg の静脈注射または 250 mg/kg の皮下注射を 50 日間行なっても異常なく、慢性毒性は認められなかった。また FRAZER ら⁴⁸⁾ は胃チューブを使用して体重 200 g のマウス 5 匹に 70,000 R.U./ml のナイシン溶液を 5×10⁵ R.U. まで流し込み、7 時間後に屠殺して剖検したが臓器になんら変化は認められなかったので急性毒性はないものと判断した。また慢性毒性試験

としてはナイシンを 10^4 R.U./g (通常のナイシン添加量の100倍) 含むプロセスチーズを唯一の蛋白源として全飼料中に 20, 30 または 40% 含む飼料によりマウスを2世代にわたって飼育し観察した結果, 異常を認めず慢性毒性もないものと判断した。

ナイシンは口こう内のだ液線に含まれる消化酵素プリアリンにより不活性化される。CLAYPOOL ら⁴⁹⁾ はナイシンを 200 R.U./ml (通常の添加量の10倍) 含むチョコレートミルクを飲用した直後からのだ液中のナイシン量の変化をレサズリン法⁵⁰⁾により調べた。結果は第3図に示すとおりである。飲用直後のナイシン濃度は 50 R.U./ml であったが1分後にはほとんど失活し, 5分後に飲用前と同程度 (2 R.U./ml) の水準まで低下した。次に, この飲用前の水準ははたしてナイシン自体によるものか, それとも他の抗生物質の影響によるものかについて調べた。すなわちナイシンはきわめて耐熱性の強いことに着目し, だ液を 82.1°C で1分間加熱処理の前後の活性の変化を比較した。結果は第2表に示すとおりである。すなわちだ液中のナイシン活性は熱に不安定な他の物質による見掛け上のものであったことが知られる。またペニシリンを 200 I.U./ml 添加したチョコレートミ

第2表 加熱処理のだ液中のナイシン活性に及ぼす影響(加熱条件: 82.1°C , 1分)

試料	R.U./ml	
	加熱前	加熱後
だ液 (A)	2.6	0
だ液 (B)	1.0	0
対照ナイシン液	1.1	1.6

注: レサズリン法による

第3図 チョコレートミルク飲用後のだ液中のナイシンおよびペニシリン残存量

飲用前の水準, ナイシン: 1.5 R.U./ml, ペニシリン: 10 mm

第3表 ナイシンのパンクレアチンによる消化に対する pH の影響

pH*	作用時間 (分) (37°C)	残存ナイシン量** (R.U./ml)
6.0	0	64
	30	46
	60	35
	120	0
7.0	0	47
	30	0
8.0	0	53
	30	0

* 反応は 0.01 M リン酸緩衝液中で行なつた

** パンクレアチン添加前のナイシン濃度 80 R.U./ml

ルク 35 ml を口こう内に 30 秒間含み, 吐出したのちのだ液中のペニシリン量の変化も第3図に示してある。本図よりペニシリンはナイシンに比べてはるかに分解されにくく, 10 分後にも相当量が残存することが知られる。

口こう内を通過して消化器に入ったナイシンも腸管内においてパンクレアチンによって分解される。HEINEMANN および WILLIAMS⁵⁰⁾ は *in vitro* で pH 6.0~8.0 におけるナイシンのパンクレアチンによる消化性について検討した。結果は第3表のおとりである。pH 7.0 以上では 30 分で完全にナイシンは不活性化されるが, 6.0 では約半分が残存し完全に失活するには2時間をする。ヒトの腸管内の pH はアルカリ性であるから, 腸管内に入ったナイシンはスィーデンより分泌されるパンクレアチンによってすみやかに分解され, 腸内菌相には影響を及ぼさないものと考えられる。これに対してタイロシン, パチトラシン, クロルテトラサイクリン, オキシテトラサイクリンなどはパンクレアチンで分解されないの腸内菌相をかく乱する。このような事実からナイシンの使用は全く無害であると結論することができる。

む す び

ナイシンは元来英国においてペニシリンの不足を補なう目的で開発されたものであるが, その後の研究により医薬品としての応用は否定され, かわって食品工業への利用の道が開かれた。

一般に食品工業において使用される抗生物質は毒性のないことが要求されることはいうまでもないが, そのほかに食品の風味をそこなわぬこと, 熱安定性であって通常の加工処理条件で破壊されないことなどが要求されるが, ナイシンはこの目的にかなった物質である。

食品への抗生物質の使用に関しては英国では 1925 年の治療剤法 (Therapeutic Substance Act) により医学研究会議 (Medical Research Council) が重要と認めた物質に限って規制され、ナイシンはその適用を受けない。アメリカでは連邦食品医薬化粧品法 (Federal Food, Drug and Cosmetic Act) に「人の消費を目的とする食品に直接または間接に抗生物質を添加することを禁止する」と規定されているが、例外的にクロルテトラサイクリンの鶏肉処理への利用 (1955 年 11 月) およびテトラサイクリン類の魚貝類保存への利用 (1959 年 11 月) を認めている。わが国では食品衛生法 (昭和 37 年 9 月 15 日 改正法律 161 号) 第 7 条 1 項に「厚生大臣は公衆衛生上の見地から販売用に供する食品もしくは添加物の使用につき基準を定めることができる」と規定されており、昭和 32 年 5 月 14 日厚生省告示第 275 号および昭和 35 年 5 月 10 日の厚生省告示第 128 号でクロルテトラサイクリンによる魚類の保存を特定の漁業 (注. 遠洋漁業用、冷凍用氷の製造の際にクロルテトラサイクリン粉末を混合) に限って許可している。

ナイシンの使用の目的は食品の安定性を向上させ、品質を改良することであり、かん詰類、プロセスチーズ、チョコレートミルクなどに使用して有能な安全弁の役割を果たすものであり、わが国においても使用を許可することがのぞまれる。(ただしナチュラルチーズの製造にナイシン生産性 *S. lactis* をスターターとして使用するかぎりにおいてはとくに許可を必要としない。)

終りにのぞみ、本稿をまとめるのに協力いただいた川村短期大学の寺田高子、横山泰子の両嬢に感謝する。

文 献

- HIRSCH, A.: *J. Appl. Bacteriol.*, **16**, 100 (1953).
- HAWLEY, H.B.: *Food Manuf.*, **32**, 370, 430 (1957).
- NERI, A.: *Latte*, **31**, 341 (1957).
- HEINEMANN, B., VORIS, L. and STUMBO, C.R.: *Food Technol.*, **19**, 592 (1965).
- VAS, K.: *Deut. Lebensm. Rundschau*, **60**, 63 (1964).
- ROGERS, L.A.: *J. Bacteriol.*, **16**, 321 (1928).
- WHITEHEAD, H.R.: *Biochem. J.*, **27**, 1792 (1933).
- MATTICK, A.T.R. and HIRSCH, A.: *Nature*, **154**, 551 (1944).
- CHEESEMAN, G.C. and BERRIDGE, N.J.: *Biochem. J.*, **71**, 185 (1959).
- BERRIDGE, N.J.: *Biochem. J.*, **45**, 486 (1949).
- BERRIDGE, N.J.: *Lancet*, **ii**, 7 (1947).
- MAXA, V. and TEPLÝ, M.: *Průmysl Potravin*, **15**, 417 (1964).
- LAY, F.J. and HALL, R.H.: *Nature*, **188**, 1184 (1960).
- RAMSEIER, H.R.: *Arch. Mikrobiol.*, **37**, 57 (1960).
- GARCÍA, F.R.: *An. Fac. Vet. Leon*, **5**, 171 (1959).
- GOULD, G.W.: *1st Intern. Congr. Food Sci. & Technol.*, **2**, 247 (1965).
- SNELL, N., IJICHI, K. and LEWIS, J.C.: *Appl. Microbiol.*, **4**, 13 (1956).
- HIRSCH, A.: *J. Gen. Microbiol.*, **4**, 70 (1950).
- GALESLOOT, Th.E. and PETTE, J.W.: *Neth. Milk Dairy J.*, **10**, 137 (1956).
- FRIEDMANN, R. and EPSTEIN, C.: *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 830 (1951).
- MOCQUOT, G. and LEFEBVRE, E.: *J. Appl. Bacteriol.*, **19**, 322 (1956).
- STUMBO, C.R., et al.: *J. Food Sci.*, **26**, 859 (1964).
- RAIBAUD, P.: *Lait*, **37**, 378 (1957).
- CHEVALIER, R. and MOCQUOT, G.: *XVth Intern. Dairy Congr.*, **3**, 1436 (1959).
- O'BRIEN, R.T., et al.: *Food Technol.*, **10**, 352 (1956).
- SEGMILLER, J.L., XEZONES, H. and HUTCHINGS, I.J.: *J. Food Sci.*, **30**, 166 (1965).
- WHEATSON, E. and HAYS, G.L.: *Food Technol.*, **18**, 549 (1964).
- HALÁSZ, A. and EUHASZ, E.: *Elelm. Ipar.*, **17**, 160 (1963).
- CAMPBELL, L., SNIFF, E. and O'BRIEN, R.T.: *Food Technol.*, **13**, 462 (1959).
- HOOD, E.G. and SMITH, K.N.: *Sci. Agric.*, **31**, 530 (1951).
- GALESLOOT, Th.E.: *XIVth Intern. Dairy Congr.*, **II**, (2), 849 (1956).
- HAGUE, S.: *J. Appl. Bacteriol.*, **18**, 591 (1955).
- 津郷友吉, ち: 食衛誌, **3**, 356 (1962).
- MAXA, V. and TEPLÝ, M.: *Průmysl Potravin*, **15**, 469 (1964).
- FRÖHLICH, M.: *Milchwiss. Berichte*, **8**, 73 (1958).
- HAWLEY, H.B.: *J. Appl. Bacteriol.*, **18**, 388 (1955).
- WINKLER, S. and FRÖHLICH, M.: *Milchwiss. Berichte*, **8**, 87 (1958).
- GALESLOOT, Th.E.: *XVth Intern. Dairy Congr.*, **2**, 547 (1959).
- GALESLOOT, Th.E.: *Neth. Milk Dairy J.*, **11**, 74 (1957).
- GALESLOOT, Th.E. and HASSING, F.: *Neth. Milk Dairy J.*, **18**, 177 (1964).
- GALESLOOT, Th.E. and PETTE, J.W.: *Neth. Milk Dairy J.*, **11**, 144 (1957).
- RITTER, P.: *Schweiz. Z. allg. Path.*, **20**, 548

- (1957).
- 43) CHEVALIER, R., LEFEBVRE, E. and AUCLAIR, J.: *Lait*, 41, 1 (1961).
- 44) HEINEMANN, B., STUMBO, C.R. and SCURLOCK, A.: *J. Dairy Sci.*, 47, 8 (1964).
- 45) ZEILINGER, A. and BINDER, W.: *Milchwiss. Berichte*, 6, 197 (1956).
- 46) HIRSCH, A. and WHEATER, D.M.: *J. Dairy Res.*, 19, 179 (1951).
- 47) MATTICK, A.T.R. and HIRSCH, A.: *Lancet*, ii, 5 (1947).
- 48) FRAZER, A.C., SHARRATT, M. and HICKMANN, J.R.: *J. Sci. Food Agr.*, 13, 32 (1962).
- 49) CLAYPOOL, L., et al.: *J. Dairy Sci.*, 49, 314 (1966).
- 50) HEINEMANN, B. and WILLIAMS, R.: *J. Dairy Sci.*, 49, 312 (1966).
-