ピクル液中の亜硝酸ナトリウムの消失に 関する微生物学的検討

深尾 正*・中村尚美*・大藪末和*

Bacteriological Study on Disappearance of Sodium Nitrite in Pickle Solution

Tadashi FUKAO*, Naomi NAKAMURA*
and Suekazu OHYABU*

*Food Technical Laboratories, Nippon Shinyaku
Co., Ltd., 14, Nishinosho-Monguchi-cho,
Kisshoin, Minami-ku, Kyoto, 601-8550

The disappearance of sodium nitrite was observed in a pickle solution which was kept in a refrigerator at a particular meat product manufacturing outlet. The purpose of this study was to examine the cause of the disappearance of sodium nitrite added to the pickle solution which was used in the manufacturing process of ham. A strain isolated from this pickle solution was identified as *Serratia liquefaciens* biovar Clab YD-6. Although the optimum growth temperature for the isolated strain was about 35°C, it was discovered that it could proliferate at 5°C. When the isolated strain was inoculated into the model pickle solution, sodium nitrite decomposed completely after being kept at 10°C for 5 days. However, it was found that *S. liquefaciens* JCM1245 could not decompose sodium nitrite in the model pickle solution. Furthermore, the addition of preservatives as shelf life expander to the pickle solution prevented the isolated bacteria from decomposing sodium nitrite. Thus, it is concluded that the effective use of preservatives is feasible to prevent the decomposition of sodium nitrite in pickle solution.

(Received May 30, 2001 ; Accepted Aug. 29, 2001)

亜硝酸ナトリウムは、食品衛生法にて食肉製品、魚肉ハム・ソーセージ、いくら、すじこおよびたらこ等に発色剤としての使用が認められている¹⁾。食肉製品では、添加された亜硝酸ナトリウムは、血色素と結合し、赤色

のニトロソミオグロビンを形成して肉色が固定される²⁾³⁾。この発色作用のほか、微生物に対する抗菌作用^{4)~6)}、特にボツリヌス菌に対する増殖と毒素産生阻害⁶⁾⁷⁾が知られており、さらに食肉製品特有のフレーバーの改良並びに付与作用^{8)~11)}もある。

食肉製品の一つであるロースハムは、豚ロース肉にピクル液と呼ばれる調味たん白溶液を注入して作られることが多い。このピクル液の構成成分は、一般的には、保水性向上と食感改良の目的で使用される卵たん白、乳たん白、大豆たん白、カゼインナトリウム等の副原材料類と食塩、リン酸塩、調味料および亜硝酸ナトリウムなどで成り立っている。実際の食肉製品の製造現場では、調製したピクル液を、その日のうちに使いきらず、作業後残ったピクル液は、冷蔵庫に保存して翌日に再使用される場合がある。また、作業前日にピクル液を調製し、冷蔵庫に保存することもある。

今回、実際に食肉製品の製造現場で冷蔵庫に保管されたピクル液中の亜硝酸ナトリウムが消失するといった現象に直面した。そこで、その原因究明を試みたところ、微生物による亜硝酸ナトリウム分解消失の可能性が推定されたので、その結果を報告する。

1. 実験方法

(1) 試料

ピクル液中の亜硝酸根消失問題が発生している某食肉製品製造メーカーより、インジェクション作業中の戻り液が混入したピクル液（以下、戻りピクル液とする）を入手した。本品は、製造現場よりサンプリングし直ちに凍結、実験の開始時に解凍して使用した。また、亜硝酸ナトリウムは、7項に示すモデルピクル液で使用了もの以外は和光純薬(株)製の特級試薬を用いた。

(2) ピクル液の保存試験

戻りピクル液を滅菌したビーカーに入れて10°Cに静置し、経日毎に生菌数および亜硝酸根量を測定した。生菌数は標準寒天培地（日水製薬(株)製）を使用した混釈法を用いて、30°Cで48時間の培養後に形成されたコロニー数を計測した。また、亜硝酸根量の測定は、衛生試験法・注解に記載されているジアゾ化法¹²⁾に準じた。

(3) 亜硝酸ナトリウム還元菌の分離

滅菌した普通ブイヨン（栄研化学(株)製）に亜硝酸ナトリウムを10μg/ml濃度となるように添加した後、戻りピクル液0.02mlを上記培地10mlに加えた。これを、30°Cにて24時間静置した後、上記のジアゾ化法にて培養液の赤色発色を調べ亜硝酸根の有無を判定した。

* 日本新薬(株) テクニカルセンター (〒601-8550 京都市南区吉祥院西ノ庄門町14)

その中で、赤色発色を認めない培養液 0.02 ml を標準寒天培地に滴下し、コンラージ棒にて画線した後 30℃ で培養した。得られた単一コロニーを数回純粋培養した後、亜硝酸ナトリウム添加普通ブイオンに植菌し、亜硝酸ナトリウム還元能を確認した。

(4) 分離株の同定

各分離株について、形態、運動性、グラム染色、カタラーゼおよびオキシターゼ活性、O-F テストによるグルコースの資化形式およびグルコースからのガス産生能を駒形¹³⁾ および COWAN らの方法¹⁴⁾ によって調べた。これらの生理試験結果を Diagnostic table¹³⁾¹⁴⁾、臨床材料より分離されるグラム陰性桿菌同定への手引き¹⁵⁾ (以下、GNR コードとする) および Bergey's manual of Systematic Bacteriology¹⁶⁾ に照合して菌名を決定した。

(5) 分離株の温度別生育能

普通ブイオンに分離株を植菌し、微生物増殖自動測定装置であるバイオスキャナー (大岳製作所製) にて所定の培養温度における生育を、OD 650 nm における濁度の経時変化を調べるにより測定した。また、各培養温度での OD 650 nm における吸光度が 0.1 から 0.2 に達するまでに要した時間を求めて簡易的な世代時間とし、分離株の各培養温度での生育能を比較した¹⁷⁾。

(6) インビトロ系での分離株の亜硝酸根還元能試験

滅菌した液体培地に亜硝酸ナトリウムを添加溶解 (亜硝酸根として 200 $\mu\text{g/ml}$) した後、供試菌を植菌して 10℃ での培養を行い、経日毎に培地中の亜硝酸根量および生菌数変化を上記 2 の方法にて調べた。尚、液体培地としては、普通ブイオン (栄研化学(株)製)、チオグリコール酸培地 II (栄研化学(株)製) およびクックドミートブイオン (メルク社製) を用いた。また、供試菌としては、ピクル液からの分離株と標準株として *Serratia liquefaciens* JCM1245 株 (以下、本株を JCM 株とする) を用い、それぞれ普通ブイオンに接種し、30℃ で 24 時間振とう培養した。得られた前培養液を、生理食塩水で段階希釈して所定菌数となるよう培地に植菌した。

(7) モデルピクル液での亜硝酸根消失試験

乾燥卵白 (日本新薬(株)製): 5%, 乳たん白 (日本新薬(株)製): 5%, 粉末水あめ (日澱化学工業(株)製): 2%, 食塩 (日本たばこ産業(株)製): 1.5%, 調味料 (たん白加水分解物, 協和発酵工業(株)製): 1%, トリポリリン酸ナトリウム (日本化学工業(株)製): 0.2%, ピロリン酸四ナトリウム (太平化学工業(株)製): 0.2%, 亜硝酸ナトリウム (日産化学工業(株)製): 0.015%, 水: 85.085% よりなるピクル液を調製し、脱気処理を施し

た。これに分離株を植菌 (上記 6 と同様の方法) して 10℃ に保存し、経日毎にピクル液中の亜硝酸根量および生菌数変化を上記 2 の方法にて調べた。尚、脱気処理は、ピクル液を真空ミキサーに入れ、減圧下で攪拌することにより行った。また、制菌剤として、日本新薬(株)製の食品加工用複合製剤である SW-113 (リゾチーム; 1.5%, 酢酸ナトリウム; 38.5%, メタリン酸ナトリウム; 18.0%, アジピン酸; 17.0%, フマル酸; 9.0%, ケン酸三ナトリウム; 6.0%, 食品素材; 10.0%) を 1% 量添加して調製したピクル液についても同様に供試した。

2. 実験結果および考察

(1) ピクル液の保存試験結果

食肉製品製造メーカーより入手した戻りピクル液を 10℃ に保存すると、保存開始時に 227 $\mu\text{g/ml}$ 存在していた亜硝酸根が、10℃ 保存・4 日後には 0.8 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ完全に消失した。この時、ピクル液中の生菌数は保存開始時の $7.1 \times 10^4 \text{ cfu/ml}$ から $2.2 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ に増加したことより、微生物による亜硝酸根還元分解の可能性が推定された。そこで、戻りピクル液からの分離菌の同定を試みた。

(2) 亜硝酸根還元菌の分離と同定

亜硝酸根が消失した戻りピクル液より亜硝酸根を還元分解する細菌を 6 株分離し同定を実施した。その結果、Table 1 に示すように、分離株のうち No. 1, 2, 3 および 6 の 4 株が *Serratia liquefaciens*, No. 4 が *Klebsiella oxytoca* と同定され、No. 5 の 1 株が GNR コードでは同定に至らなかった。*S. liquefaciens* 4 株中の 3 株 (No. 1, 2, 3) は、各種生理試験の結果が全て一致したが、No. 6 は、尿素の分解能、ラクトースの利用性およびブドウ糖からのガス産生能について相違がみられた。

S. liquefaciens などの Enterobacteriaceae には、亜硝酸根還元分解能を有する菌株の存在が知られており¹⁸⁾、これら分離株は、ピクル液の亜硝酸根消失の原因になる可能性があるとして推定された。一方、製造現場では、ピクル液は冷蔵保管されることより、ピクル液の亜硝酸根消失には、原因菌の低温での生育能が大きく係わっている可能性がある。そこで、分離株の低温生育性について調べたところ、No. 6 株が最も低温での生育能を示した (詳細は次項 3) ので、No. 6 株の詳細同定を実施した。即ち、No. 6 株のバイオタイプの決定を試みたところ、Table 2 に示すように *S. liquefaciens* biovars Clab と同定された。

Table 1 Characteristics differentiating the isolated nitrite reducing strains in the returned pickle solution

Characteristics	The isolated strains in the pickle solution ^a					
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
Morphology	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Gram reaction	—	—	—	—	—	—
Catalase	+	+	+	+	+	+
Cytochrome oxidase	—	—	—	—	—	—
Deoxyribonuclease	+	+	+	—	—	+
Breakdown of urea	+	+	+	+	+	—
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	—	—	+
Indole production	—	—	—	+	+	—
H ₂ S production	—	—	—	—	—	—
Gas from glucose	—	—	—	+	+	+
Utilization of sodium citrate	+	+	+	+	+	+
Acid formation from lactose	—	—	—	+	+	—
Acid formation from arabinose	+	+	+	+	+	+
IPA reaction	—	—	—	—	+	—
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	+	+
Oxidation-fermentation test ^b	F	F	F	F	F	F
Motility	+	+	+	—	+	+
Identification	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	N.I. ^c	<i>Serratia liquefaciens</i>

Symbols : +, positive ; —, negative

^a : Strain numbers (No. 1~No. 6) are the same as indicated in Table 2.

^b : F, fermentation

^c : N.I., this comes under no existing species name by GNR code.

(3) 分離株の温度別生育能

分離菌 6 株の 10℃ における生育能を調べたところ、No. 6 の生育性が最も好ましく、培養 30 時間後の OD 650 nm が 1.0 以上という優れた低温生育性が認められた。そこで、No. 6 株の温度別生育能を調べたところ、Fig. 1 に示すように 35℃ 付近に生育至適温度があるものの 5℃ でも生育が可能であった。一般的に、No. 6 株が属する Enterobacteriaceae は中温性菌¹⁶⁾である。No. 6 株も、生育至適温度から察するに中温性菌の部類となるが、特に低温での生育能が優れた株と考えられる。一方、JCM 株は 10℃ では全く生育しない。即ち、同じ *S. liquefaciens* であっても No. 6 株と JCM 株とは低温生育性が大きく異なる。この低温での生育能が、ピクル液保存中における亜硝酸根消失に大きく影響していると推定される。

(4) インビトロ系での No. 6 株の亜硝酸根還元消失

試験

No. 6 株を植菌した普通ブイヨン中の亜硝酸根量は、培養 1 日目には殆ど変化しなかったが、2 日目では培養開始時の約 10 分の 1 量となり No. 6 株によって亜硝酸根が還元消失されていることが確認された (Fig. 2)。この No. 6 株による亜硝酸根還元性には一つの特徴がみられる。即ち、生菌数が増加する過程で亜硝酸根が減少していくのではなく、菌数が増加した後、亜硝酸根が一揆に減少消失する傾向が認められた。培養 1 日目では、生菌数が 10⁸ オーダー/ml となり、培地中では微生物の生育により嫌気的な雰囲気が強くなっていると推定される。微生物による亜硝酸根の還元は、一般的に嫌気的な雰囲気下で行われる¹⁹⁾。但し、これら微生物の多くは、通性嫌気性であり、生育条件によっては好気的呼吸も行っている²⁰⁾。即ち、No. 6 株の生育に伴い酸素が消費され、培地が嫌気的な状態になった培養 1 日目以降に、No. 6

Table 2 Comparison of isolated strain No. 6 with *S. liquefaciens* biovars described on BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology Volume 1

Characteristics	Strain No. 6	<i>S. liquefaciens</i> biovars ⁽⁶⁾						
		Clab	Clc	Cld	EB	RB	RQ	Adc
Growth on ^a								
trans-Aconitate	—	—	+	—	+	—	+	+
Adonitol	—	—	—	—	+	—	—	—
Benzoate	—	—	—	+	+	+	—	—
meso-Erythritol	—	—	—	—	+	—	—	—
D-Malate	+	+	—	d	—	—	d	d
Quinate	—	—	—	—	—	—	+	—
L-Rhamnose	—	—	—	—	—	+	d	—
meso-Tartrate	+	+	—	—	—	—	d	—
Arginine decarboxylase	—	—	—	+	—	—	—	+
Tetrathionate reduction	+	+	+	+	+	+	d	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	—	+

Symbols : +, positive ; —, negative ; d, 6%–75% positive

^a : Carbon source utilization tests.

Fig. 1 A relation between incubation temperature and growth activity of strain No. 6

株が還元性を発揮している可能性が推定された。そこで、培地の酸化還元電位を嫌気性菌の発育が可能なレベルまで低下させたチオグリコール酸培地Ⅱおよびクックドミートブイヨンを用いて、No. 6 株の亜硝酸根還元性を調べたところ、培養 24 時間以内に添加した亜硝酸根が完全に消失 (Fig. 2) しており、No. 6 株による亜硝酸根の還元消失には、より低い酸化還元電位、即ち嫌氣的雰囲気が必要であることが示された。

(5) モデルピクル液中での亜硝酸根消失試験

Fig. 2 Changes in NO_2^- content (-----) and viable counts of strain No. 6 (——) in nutrient broth (●), thioglycollate medium II (○) or cooked meat medium (△) at 10°C

分離した No. 6 株が、実際にピクル液中で亜硝酸根を還元消失するかどうかについて確認実験を行った。その結果、Fig. 3 に示すように、No. 6 株を植菌したピクル液では、10°C 保存・5 日目にはピクル液中に配合した亜硝酸根が完全に消失した。そこで、微生物による

Fig. 3 Changes in NO_2^- content (-----) and viable counts of strain No. 6 (——) in the model pickle solution with shelf life expander (▲) or without addition (control, ●) at 10°C

ピクル液中の亜硝酸根消失防止対策の一考として、原因菌である No. 6 株の生育抑制について検討した。モデルピクル液へ制菌剤である SW-113 を 1% 量添加することにより、No. 6 の生育が抑制され、亜硝酸根の減少も起こらなかった (Fig. 3)。従って、微生物による亜硝酸の還元消失防止には、原因菌に抗菌性を示す制菌剤をピクル液へ添加することが、一つの方策であると考えられる。このような制菌剤の利用は、亜硝酸根の消失防止ばかりでなく、ピクル液の静菌対策、更には仕上がり食肉製品の保存性向上対策としても有効であると考えられる。

食肉製品製造現場で製造されたロースハム等の製品が、鮮やかなピンク色に全く発色せず、亜硝酸ナトリウムの添加忘れといった製造上のトラブルとして経験的に言われてきている。このピクル液中の亜硝酸根消失の問題については、統計的な調査はなされていないものの、複数のメーカーで発生している。しかも、ある時突然発生し、いつしか解決するといった不規則な発生状況であり、その原因については解明されていない。今回、亜硝酸根消失が発生したピクル液からの分離菌によって、モデルピクル液での亜硝酸根消失が再現された。微生物による窒素化合物の酸化・還元サイクルについては多くの研究がなされており²¹⁾、今日、環境や農業上の観点から注目されている。しかし、微生物による亜硝酸

根の還元能とピクル液中の亜硝酸根消失を関連づけた報告はなく、新たな知見である。

3. 要約

ピクル液中の亜硝酸ナトリウムの消失原因究明検討を行い、次の結果を得た。

(1) ピクル液中の亜硝酸ナトリウム消失の一因として、微生物的要因があることを確認した。即ち、冷蔵保存中に亜硝酸ナトリウムが消失したピクル液より、亜硝酸ナトリウム還元能を有する細菌を 6 株分離した。これらの中で最も強い低温生育能を有する 1 株を *Serratia liquefaciens* Biovars Clab と同定した。本株は、 5°C でも増殖可能であり、強い低温生育性が認められた。

(2) 本株を植菌したモデルピクル液では亜硝酸根の消失が見られた。従って、ピクル液の亜硝酸根消失の原因として微生物の関与が示唆された。

(3) 本株に抗菌性を示す制菌剤の利用により、ピクル液中における亜硝酸根の還元消失を防止することができた。

文 献

- 1) 食品衛生関係法規集, 1 巻, 食品衛生研究会編 (中央法規, 東京), p. 3003 (1990).
- 2) 安井 勉: 食肉加工ハンドブック, 天野慶之・藤巻正生・安井 勉・矢野幸男編 (光琳, 東京), p. 289 (1980).
- 3) GRAY, J.I. and PEARSON, A.M.: *Adv. Food Res.*, **29**, 2 (1984).
- 4) McCLURE, P.J., KELLY, T.M. and ROBERTS, T.A.: *Intl. J. Food Microbiol.*, **14**, 77 (1991).
- 5) 鮫島 隆・竹下和子・三木為雄・有原圭三・伊藤良・近藤 洋: 日食微誌, **13**, 159 (1997).
- 6) HAUSCHILD, A.H.W., HILSHEIMER, R., JARVIS, G. and RAYMOND, D.P.: *J. Food Prot.*, **45**, 500 (1982).
- 7) TOMPKIN, R.B.: *Antimicrobials in foods*, chap. 6 Nitrite, 2nd ed. (Marcel Dekker, Inc), p. 191 (1993).
- 8) FOOLADI, M.H., PEARSON, A.M., COLEMAN, T.H. and MERKEL, R.A.: *Food Chem.*, **4**, 283 (1979).
- 9) MACDONALD, B., GRAY, J.I. and GIPPINS, L.N.: *J. Food Sci.*, **45**, 893 (1980).
- 10) MACDONALD, B., GRAY, J.I., STANLEY, D.W. and USBORNE, R.W.: *J. Food Sci.*, **45**, 885 (1980).
- 11) FROELICH, D.A., GULLET, E.A. and USBORNE, R.W.: *J. Food Sci.*, **48**, 152 (1983).
- 12) 西島基弘: 衛生試験法・注解 2000, 日本薬学会編 (金原出版, 東京), p. 311 (2000).
- 13) 駒形和男: 化学と生物, **10**, 332 (1972).

-
- 14) COWAN, S.T. and STEEL, K.J.: Manual for the Identification of Medical Bacteria (Cambridge University Press, London), (1965).
- 15) 土屋俊夫: 臨床材料より分離されるグラム陰性桿菌同定への手引 (GNR コード), 改訂第三版 (栄研化学, 東京), (1981).
- 16) KRIEG, N.R. and HOLT, J.G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1 (Williams and Wilkins, U.S.A.), p. 477 (1984).
- 17) 西浦康雄・深尾 正・杉本睦美・澤田玄道・伊藤政光・難波 護: 日食工誌, **37**, 687 (1990).
- 18) 相田徳二郎: 微生物の分離法, 山里一英・村地敏樹・宇田川俊一・児玉 徹編 (R&D プランニング, 東京), p. 480 (1986).
- 19) 小俣達男: 化学と生物, **38**, 196 (2000).
- 20) 吉村哲彦・城宜司: NO-化学と生物, 日本化学会編 (学会出版センター, 東京), p. 151 (1996).
- 21) CONRADO, M-V., PURIFICACION, C., MANUEL, M-L., RAFAEL, B. and FRAMCOSCO, C.: *J. Bacteriol.*, **181**, 6573 (1999).
- (平成 13 年 5 月 30 日受付, 平成 13 年 8 月 29 日受理)
-