

氷核活性細菌を用いた難凍結性食品の凍結乾燥

APPLICATION OF ICE NUCLEATION ACTIVE BACTERIUM FOR EFFICIENT FREEZE-DRYING OF FOODS

荒井 綜一（東京大学農学部）

Soichi ARAI

Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113

ABSTRACT

Factors affecting the development of the ice nucleation activity of *Erwinia ananas* IN-10 were examined, using the degree of supercooling (DS) as a parameter. An aqueous suspension of the bacterial cells or the outer membrane fraction showed two particular DS values, *i. e.*, near 0°C and 3°C. The development of the DS of 0°C required two conditions: a high cell population (or membrane concentration) and the presence of a water/glass interface in the system. Sugars inhibited the development of this type of supercooling. The ice nucleation activity was stable in the pH range of 5 to 9. On the basis of these data, a possible mechanism for the ice nucleation activity development was proposed. The application of the ice nucleation activity of the cells to the freeze-drying of high salt containing foods was attempted. It led to a shortening of their freezing times and an efficient formation of powdered products. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **9**, 10-15, 1988.

氷核活性細菌は随所にみられる細菌として知られ¹⁾, なかでも *Erwinia ananas* IN-10 は効率よく水を凍らせる細菌であるといわれている²⁾。氷核活性細菌に関する研究は霜害防止を目指したものが多いのが現状であるが, 一方, 食品工業の分野では凍結乾燥過程で水を殆ど過冷却させないで凍結させる技術が望まれている。本研究は, 氷核活性細菌を食品に添加することによって食品中に存在する水を過冷却させることなく凍結すれば, 凍結乾燥の効率化が期待できるというアイデアのもとになされたものである。

実験方法

材料

市販のコーンスターチ(日本食品化工), 分離大豆たん白質(不二製油), しょうゆ(キッコーマン), みそ(タケヤ)を凍結乾燥素材として用いた。菌体および外膜固定化剤としてアルギン酸ナトリウム(関東化学)を用いた。ガラスビーズ(直径 5 μm)は大新理工から

購入した。その他の試薬類はすべて試薬級のものを用いた。

氷核活性細菌

Erwinia ananas IN-10 は静岡農業試験場の牧野氏から提供を受けた。本細菌を Pseudomonas Agar F (Difco) 培地で20°Cで16時間培養し, 生理食塩水で洗浄してから660 nm の吸光度が 1.0になるように水に懸濁した。この懸濁液 2 ml には 1.6×10^{10} 細胞の菌体が存在している。この懸濁液を水で希釈して菌体濃度を調整し, 2 ml のサイズで以下の過冷却度と凍結頻度の測定を行った。添加物は希釈時に加えた。全操作は20°C以下で行った。

外膜

上記の氷核活性細菌を液体培地で20°C, 16時間培養した。液体培地の組成は Bacto-Trypton (10 g, Difco), Bacto-Proteose Peptone No. 3 (10 g, Difco), リン酸二ナトリウム(1.5 g), 硫酸マグネシウム (1.5 g), 水 (1 l) である。カルチャーを8000×

g, 20分間4℃で遠心分離して菌体を集め、生理食塩水で洗浄した。湿菌体12 gを0.75 M しょ糖の10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)に懸濁させ、超音波照射(日本精機 US-300, 120 μ A, 10分間, 0 ~10℃)後, Miura および Mizushima のしょ糖密度勾配法⁷⁾で外膜を調製した。外膜画分は2 lの水に対して20時間透析する操作を3回繰り返して精製してから水で適宜希釈した。

菌体および外膜の固定

菌体懸濁液 (10⁸細胞/2 ml) および外膜分散液 (280 nm の吸光度が 5×10^{-2}) を5℃まで冷却し、それぞれの懸濁液または分散液 (5 ml) を4%アルギン酸ナトリウム (10 ml) と混合した。この段階で、必要に応じて、ガラスビーズを加えた。この混合物 (2 ml) を0.1 M 塩化カルシウム (50 ml) にゆっくりと落し入れて凝固させた。菌体 (または外膜) とアルギン酸ナトリウムの混合物および菌体 (または外膜) と塩化カルシウム溶液の混合物を対照として用いた。

しょうゆおよびみそ試料の調製

10¹⁰細胞/2 ml の菌体懸濁液 (10 ml) をしょうゆ (1 l) またはみそ (1 kg) とよく混合した。菌体懸濁液の代わりに水を同様の操作で加えたものを対照試料とした。凍結開始温度および融点測定には2 gの試料を、凍結曲線作成および凍結乾燥には50 gの試料を用いた。

凍結開始温度、融点および過冷却度の測定

各試料 2 ml (しょうゆおよびみその場合は2 g) をガラス管またはスチロール管 (内径10 mm) に入れ、-5℃に冷やしたエチレングリコール浴中で冷却した。しょうゆとみその場合は浴の温度を-35℃にした。試料には温度センサーを挿入しておいた。試料温度は自動記録温度計 (宝熱学, D-641) で記録した。急激な温度上昇が認められる直前の温度を凍結開始温度 (T_f) とした。凍結試料を徐々に暖めて、融点 (T_m) を測定した。過冷却度は $T_m - T_f$ で表した⁸⁾。 T_f , T_m および過冷却度は5回の独立した測定で得られた値の平均値に標準誤差をつけて表した。

凍結頻度

菌体または外膜の水分散液 (2 ml) をパイレックスガラス管 (内径10 mm) に入れてゴム栓をし、-5℃で24時間静置した後、凍・不凍の別を判定した。1条件当り10個の独立した測定を行った。凍結頻度は全試料数 (10) に対する凍結した試料数の比で表した。

サーモグラフ

10⁸細胞/2 ml の菌体懸濁液または280 nm の吸光度が 5×10^{-2} の外膜分散液を試料とした。各試料を熱量計 (東京理工, MPC-11) のステンレス容器にい

れ、その上にガラスビーズ (500 mg) と水 (1 ml) を封じ込めたガラスアンプルをつるした。試料室を1晩10℃に保ち、Fujita および Kim の方法⁹⁾でアンプルを割って試料とガラスビーズを混ぜ、熱の収支を記録した。

プロトン NMR スペクトル

280 nm の吸光度が 5×10^{-2} の外膜水分散液を試料とした。NMR 装置 (JOEL FX-100) を用いてパルスフーリエ変換プロトン NMR スペクトルを記録した。装置を内部重水でロックするため、分散液の調製に30%重水を用いた。8192データポイント、スペクトル幅 1 kHz, パルス間隔20.89秒の90°パルスで1024回の自由減衰を積算した。

凍結曲線

菌体添加および無添加のしょうゆ試料 (50 g) をパイレックスガラスシャーレ (内径10 cm) に入れ、-45℃に冷やした凍結乾燥機 (共和真空 RL-50) の棚に置いた。そのまま-45℃で30分間静置して、菌体添加および無添加の試料の品温の変化を同時に記録した。

凍結乾燥

凍結曲線をとった後、温度センサーを抜取り、0.05~0.2 torr で凍結乾燥した。棚の温度は、はじめの4時間は0℃、その後20時間は20℃とした。みそについても同様の操作で凍結乾燥した。菌体添加および無添加のしょうゆ (50 ml) およびみそ (50 g) をスチロールのシャーレに入れて、同様に凍結乾燥した。

走査型電子顕微鏡観察

凍結乾燥したしょうゆおよびみそをかみそりでシャーレの底に対して水平に切断し、観察用試料とした。日立走査型電子顕微鏡 (S-510) を使い、倍率は40倍とした。

結果と考察

まず、菌体の水懸濁液を用いたモデル系で水が氷点下温度でどのような挙動を示すかをしらべた。*Pseudomonas syringae* や *Erwinia herbicola* は典型的な氷核活性細菌である。Lindow¹⁰⁾は前者の細菌には10²細胞以上存在するときに氷核活性があり、過冷却度は3℃であると報告している。後者の細菌では少し様子が違って、10⁸細胞以上存在すると過冷却度は2℃となり、それ以下の菌数では過冷却度は4℃となる。*E. ananas* を用いた本研究の結果では、菌数によって0℃と3℃という2つの異なった過冷却度が認められ、臨界菌数は単位容量 (2 ml) あたり10⁶~10⁷であった (Table 1)。

バルク水と接しているのは菌体の外側なので、氷核

活性は外膜に存在するはずである。外膜を用いて得られた結果 (Table 1) はこの考え方を支持している。外膜の場合にも、濃度によって2つの異なった過冷却度が認められた。過冷却度の菌数 (あるいは外膜濃度) 依存性は *Erwinia* 属細菌の特性なのかも知れない。凍結頻度のデータ (Table 1) は1細胞でもバルク水を -5°C 以上で凍らすものができるということを物語っている。過冷却度は容器の材質によっても影響を受けた (Table 2)。 10^8 細胞以上の菌体が存在する場合、容器がガラスであると殆んど過冷却しないで水が凍ったのに対して、スチロール容器では水は過冷却した。菌体

Table 1. Effects of the cell population and the outer membrane concentration on degree of supercooling and the freezing incidence¹

Population or concentration	Degree of supercooling ($^{\circ}\text{C}$)	Freezing incidence
Cells		
Cell number in 2 ml	Av. $\pm$ s. e.	
10^{10}	0.3 ± 0.2	10/10
10^9	0.2 ± 0.3	10/10
10^8	0.3 ± 0.2	10/10
10^7	0.2 ± 0.2	10/10
10^6	1.3 ± 0.4	10/10
10^5	3.4 ± 1.0	10/10
10^4	3.6 ± 0.9	10/10
10^3	3.2 ± 1.0	10/10
10^2	3.8 ± 0.7	10/10
10	3.7 ± 1.0	10/10
1	—	7/10
10^{-1}	—	1/10
Outer membrane		
OD at 280 nm	Av. $\pm$ s. e.	
5×10^{-1}	0.7 ± 0.5	10/10
5×10^{-2}	0.8 ± 0.2	10/10
5×10^{-3}	0.8 ± 0.5	10/10
5×10^{-4}	2.2 ± 0.3	10/10
5×10^{-5}	2.4 ± 0.5	10/10
5×10^{-6}	3.2 ± 0.2	10/10
5×10^{-7}	3.3 ± 0.4	10/10
5×10^{-8}	—	1/10

¹A Pyrex glass tube was used for the measurements.

Table 2. Effects of the container material on degree of supercooling¹

Container material	Degree of supercooling ($^{\circ}\text{C}$)
	Av. $\pm$ s. e.
Pyrex glass	0.3 ± 0.2
Styrol	2.8 ± 0.4

¹The cell population was set at 10^8 in the unit volume (2 ml).

がガラスと接触するのを防ぐために、菌体をアルギン酸ゲル中に固定化すると、過冷却度が 3°C になった (Table 3)。外膜でも同様の現象が観察された。外膜が存在しても水のプロトン NMR スペクトルには変化が認められなかった (Fig. 1)。さらに、菌体または外膜をガラスビーズと混合すると、明瞭な発熱が観察された (Fig. 2)。これらの結果から、菌体が存在しても水の存在状態には変化がなく、水とガラスの界面に

Table 3. Effects of entrapping cells and outer membrane in alginate gel with or without glass on degree of supercooling¹

State of sample	Degree of supercooling ($^{\circ}\text{C}$)	
	Cell	Membrane
	Av. $\pm$ s. e.	Av. $\pm$ s. e.
Entrapped with glass	1.1 ± 0.8	1.0 ± 0.7
Entrapped without glass	3.5 ± 0.2	3.0 ± 1.0
Dispersed in alginate	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.2
Dispersed in CaCl_2	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2

¹The cell population and membrane concentration were set at 10^8 and 5×10^{-2} in the unit volume (2 ml), respectively. A Pyrex glass tube was used.

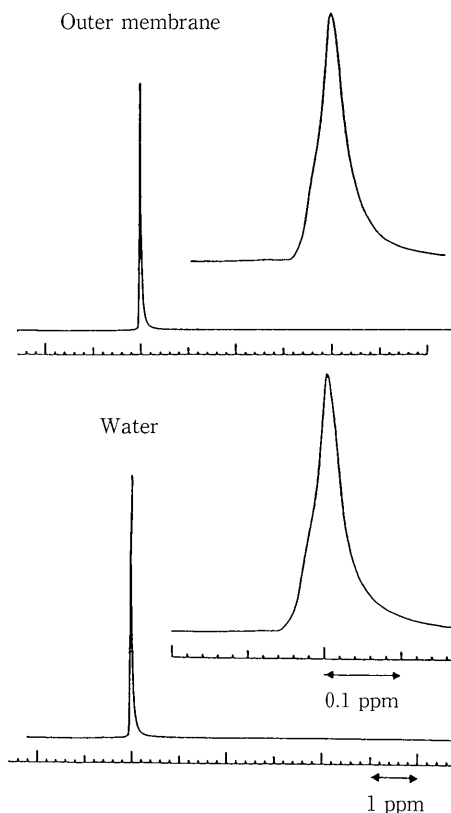


Fig. 1. ^1H NMR spectra of water protons in the presence and absence of *E. ananas* outer membrane.

外膜の一部が吸着されて0℃付近で安定な氷晶核が形成されることが分る。界面での相互作用は糖やグリセロール以外の添加物では阻害されなかった (Table 4)。糖やグリセロールなどのポリオールの水素結合形成性から考えて、界面での相互作用は、水素結合を介して起こるものと考えられる。おそらく、ガラスと水の界面に存在する特殊な状態の水が菌体外膜のある部分と相互作用することによって氷点付近で安定な氷晶核ができあがるのだろう。筆者は、上述のような様式

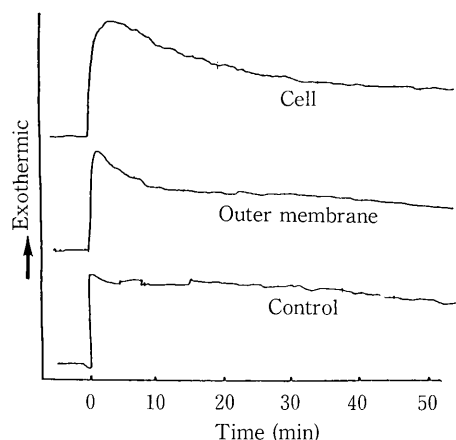


Fig. 2. Thermograms observed when *E. ananas* cells and the outer membrane fraction were mixed with glass beads.

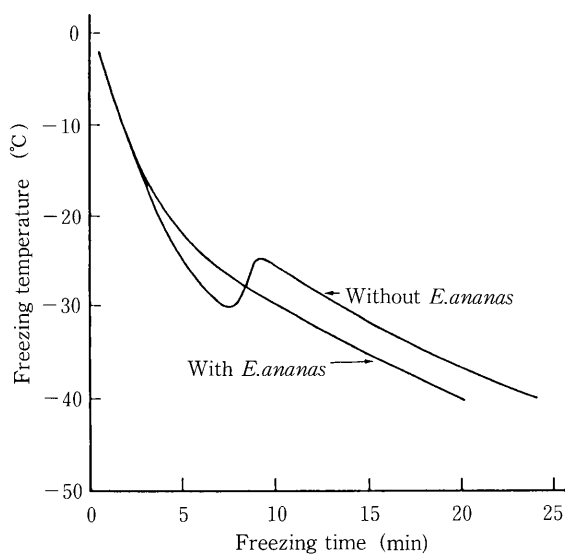


Fig. 3. Changes in temperature of soy sauce samples with and without *E. ananas* during freezing at -45°C .

で親水性の異物の上に水のクラスターができるという仮説を提唱する。このような相互作用は統計的に起こるので、菌体数が多いほど過冷却度が小さくなることも理解できる。菌体濃度が低かったり、菌体とガラスが接触しない状態 (スチロール容器を用いたり、菌体を固定化した場合) では菌体外膜とバルク水が相互作用して -3°C 付近で安定な水のクラスターができるのだろう。このように考えると、 3°C で水を凍結させる *Pseudomonas syringae*¹⁰⁾などはガラスとの相互作用がないのかも知れない。

溶媒の pH の影響をしらべた結果を Table 5 に示した。菌体の氷核活性は5～9の広い pH 領域で安定であった。このことは広範囲の食品素材の凍結に氷核活性細菌が応用できることを示唆している。本研究では、難凍結性食品の代表例として、しょうゆとみそを取りあげた。 -45°C にセットした凍結乾燥機の棚でしょうゆを凍らす過程での品温の変化を Fig. 3 に示した。菌体を加えた試料では -20°C 以上で凍りはじめ、菌体無添加の試料では -30°C 付近まで過冷却してから凍り始めた。実用的には、菌体を加えることによって

Table 4. Effects of additives on degree of supercooling¹

Additive	Concentration	Degree of supercooling ($^{\circ}\text{C}$)
		Av. $\pm$ s. e.
Sucrose	1 M	4.2 ± 0.3
	0.5 M	2.8 ± 0.8
Glucose	2 M	4.3 ± 0.2
	1 M	2.7 ± 0.3
Glycerin	2 M	3.4 ± 0.1
	1 M	2.2 ± 0.7
NaCl	2 M	1.3 ± 0.5
	1 M	1.5 ± 0.9
KCl	2 M	0.8 ± 0.2
	1 M	0.7 ± 0.2
Alanine	1 M	0.6 ± 0.1
Serine	1 M	0.3 ± 0.1
Glutamic acid	1 M	0.8 ± 0.3
Lysine	1 M	1.1 ± 0.4
Corn starch paste	10%	0.3 ± 0.5
	5%	0.2 ± 0.2
SPI	10%	0.4 ± 0.7
	5%	0.4 ± 0.6
Ovalbumin	20%	0.8 ± 0.5
	10%	0.5 ± 0.4

¹The cell population was set at 10^8 in the unit volume (2 ml). A Pyrex glass tube was used.

凍結時間が短縮できるということが重要である (Fig. 3)。しょうゆとみその過冷却度を Table 6 に示した。液体のしょうゆでは菌体を加えることによって過冷却度は 2°C となったが、ペースト状のみそではしょうゆの場合より大きく過冷却した。

菌体とガラスとの相互作用を効率的にするために、まず、菌体をシャーレに塗り付けてからしょうゆとみそを入れ、凍結乾燥を行った。乾燥物の内部組織の電子顕微鏡写真を Fig. 4 に示す。菌体存在下で凍結乾燥した試料では穴のあいた構造が観察された。穴のあ

いた構造をした乾燥物は容易に粉碎できるという特性があった。

E. ananas を難凍結性食品の凍結乾燥に応用すると、凍結時間を短縮できるだけでなく、粉末化しやすい製品を得ることができる。Nagashima と Suzuki¹¹⁾ は、食塩を多量に含む難凍結性食品を効率よく凍らせるには水を添加する必要があると述べている。氷核活性細菌を用いれば、水で希釈することなく効率よく凍結することができ、製造コストの低減につながる。

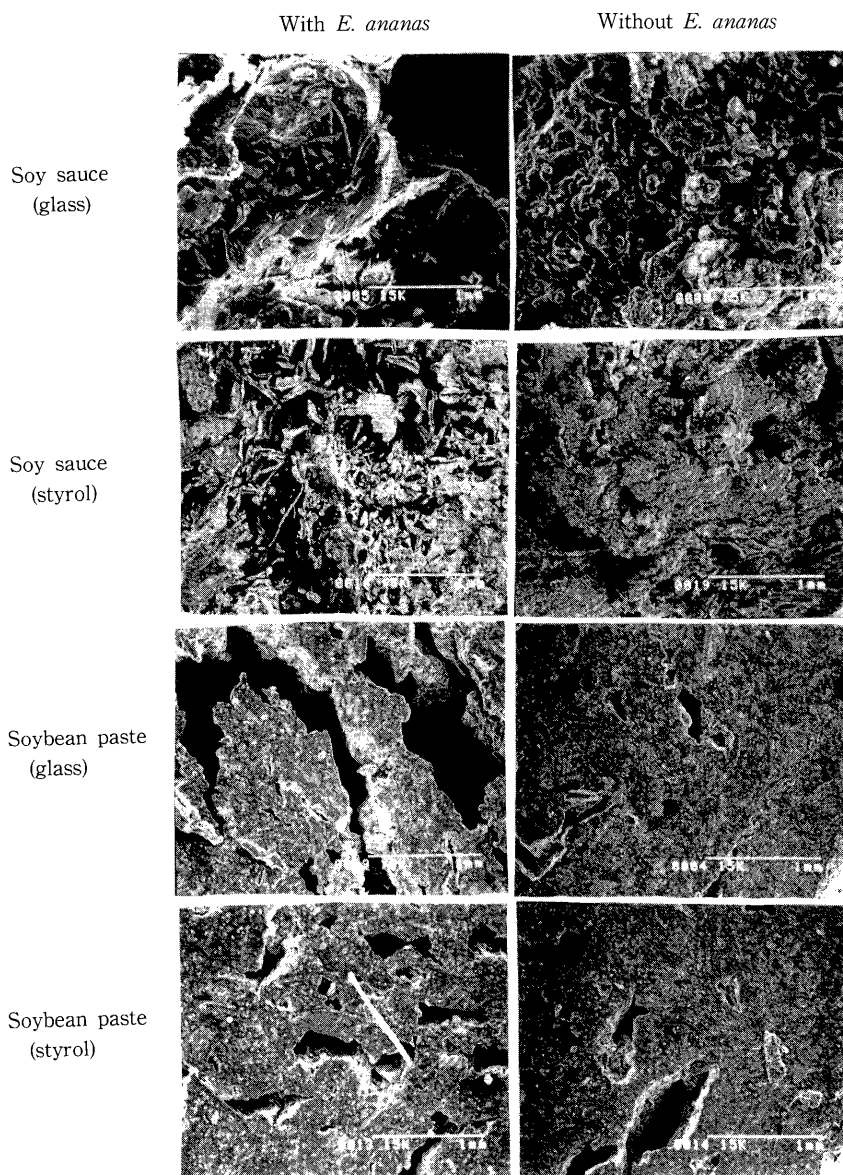


Fig. 4. Scanning electron micrographs of the freeze-dried products from soy sauce and soybean paste.

Table 5. Effects of the pH of the media on degree of supercooling¹

pH	Medium	Degree of supercooling (°C)	
		After 10 min	After 24 hr
		Av.±s. e.	Av.±s. e.
	0.1 M HCl		
	0.1 M acetic acid	3.0±1.0	3.4±0.2
3	0.1 M acetate	2.8±0.2	2.3±1.1
4	"	2.5±0.2	3.3±0.3
5	"	0.3±0.3	0.4±0.2
6	"	0.4±0.2	0.5±0.3
7	0.1 M phosphate	0.4±0.1	0.4±0.2
8	"	0.2±0.1	0.5±0.3
9	"	0.3±0.1	0.4±0.1
10	0.1 M carbonate	0.3±0.1	2.4±0.6
11	"	0.5±0.3	>5
	0.1 M NaOH	>5	>5

¹The cell population was set at 10⁸ in the unit volume (2 ml). A Pyrex glass tube was used. The cells were suspended in the respective media, and after 10 min or 24 hr storage degree of supercooling was measured.

Table 6. Freezing and melting temperatures of soy sauce and soybean paste with or without *E. ananas* cells¹

Sample	Cells	Freezing temp. (°C)	
		Melting temp. (°C)	
		Av.±s. e.	
Soy sauce	With	-20±1	-18
	Without	-30±4	"
Soybean paste	With	-23±4	-15
	Without	-29±2	"

¹The cell population was set at 10⁸ in 2 g of the sample. A Pyrex glass tube was used.

文 献

- 1) Lindow, S. E. (1983) : The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **21**, 363-384.
- 2) 牧野孝宏 (1985) : 茶樹新芽の霜害と氷核活性細菌. 植物防疫, **39**, 14-17.

- 3) Amy, D. C., Lindow, S. E. and Upper, C. D. (1976) : Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature*, **262**, 282-284.
- 4) Lindow, S. E., Amy D. C., and Upper, C. D. (1978) : *Erwinia herbicola* : an active ice nucleus incites frost damage to maize. *Phytopathology*, **68**, 523-527.
- 5) Lindow, S. E., Amy, D. C. and Upper, C. D. (1978) : Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 831-838.
- 6) Yankofsky, S. A., Levin, Z. and Moshe, A. (1981) : Association with citrus of ice-nucleating bacteria and their possible role as causative agents of frost damage. *Curr. Microbiol.*, **5**, 213-217.
- 7) Miura, T. and Mizushima, S. (1969) : Separation and properties of outer and cytoplasmic membrane in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 268-276.
- 8) Arai, S. and Watanabe, M. (1986) : Freeze texturing of food materials by ice-nucleation with the bacterium *Erwinia ananas*. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 169-175.
- 9) 藤田暉通, 金基淑 (1985) : 低水分食品の吸水に関する熱的研究. 凍結及び乾燥研究会誌, **31**, 19-23.
- 10) Lindow, S. E. (1984) : Reduction of frost injury to almond by control of ice nucleation active bacteria. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **109**, 48-53.
- 11) Nagashima, N. and Suzuki, E. (1985) : Computed instrumental analysis of the behavior of water in foods during freezing and thawing. in "Properties of Water in Foods", NATO ASI Series E, ed. by Simatos, D. and Multon, J. L., Martines Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 555-571.