

## 凍結高圧処理による大腸菌及び黄色ブドウ球菌への殺菌効果

田村吉史、酒井和吉\*、中野敦博、竹田誠一\*\*、渡辺義政\*

High-pressure sterilization of *E. coli* and *S. aureus* at freezing temperatures

Yoshifumi Tamura, Kazuyoshi Sakai\*, Atsuhiko Nakano, Seiichi Takeda\*\* and Yoshimasa Watanabe\*

The effectiveness of high-pressure sterilization of *Escherichia coli* JCM 1649T and *Staphylococcus aureus* IFO12732T at freezing temperatures was tested. At ambient temperature, the count of viable *E. coli* cells decreased in culture medium ( $10^6$  cfu/ml) at pressures exceeding 300 MPa, and sterilization was observed at 500 MPa. It took pressures exceeding 400 MPa to reduce the viable cell number of *S. aureus* in culture medium ( $10^6$  cfu/ml) and exceeding 600 MPa to sterilize the culture. Although no sterilization was observed at 200 MPa at ambient temperature, the count of viable cells decreased from  $10^6$  cfu/ml to  $10^4$  cfu/ml at  $-20^\circ\text{C}$ .

To test the practical applicability of this high-pressure sterilization method, we applied it to herring sashimi. With high-pressure treatment (200 MPa), the count of viable inoculated *E. coli* and *S. aureus* cells decreased at  $-20^\circ\text{C}$  but was unaffected at ambient temperature. On the sashimi, as was observed in the culture medium, the *E. coli* were more susceptible to high-pressure sterilization than were the *S. aureus*. The sterilization was less effective on the sashimi than on the culture medium. With high-pressure sterilization at 200 MPa at  $-20^\circ\text{C}$ , the viable cell count on the commercial herring sashimi was reduced to 1/50 of the presterilization figure. The moderately high pressure of 200 MPa pressure produced less prominent changes in sashimi physical properties than did the high pressures of 500MPa or 600MPa. The effect high pressure sterilization was augmented at  $-20^\circ\text{C}$ , and high-pressure sterilization at freezing temperatures is expected to become a commercially feasible method of extending the shelf life of raw seafoods like sashimi.

微生物の殺菌方法としては加熱が最も一般的な方法であるが、食品の中には加熱により物性が変化し、本来その食品が持つ価値が低下したり、あるいは消失してしまうものが少なくない。その代表的なものが魚や貝類を生で食べる「刺身」であり、通常冷凍により保存され、解凍後は速やかに消費されなければならない。刺身は極めて腐りやすく、常温での保存は困難で、冷蔵で保存しておいても保存期間は極めて短い<sup>1, 2)</sup>。また、冷凍前の扱いにより初発菌数に大きな変動があり、品質的には冷凍前

の菌数は少ない程良い。冷凍刺身を製造する上で、原料切り身の菌数の影響を受けづらくするためには、原料段階あるいは冷凍段階で、殺菌工程があることが望まれる。

熱に寄らない殺菌方法として、圧力による殺菌（加圧殺菌）がある。静水圧によって微生物の死滅や増殖の抑制を引き起こさせるもので、圧力によりタンパク質等の生体高分子が変性することや生体膜が破壊されることが大きな要因であると考えられている<sup>3, 4)</sup>。この技術を使って殺菌された製品も市販されている。加圧殺菌に関す

\*ほくれい株式会社（〒068-0751 北海道夕張市沼ノ沢510-11）

\*\*エコ&amp;フードシステム（〒047-0261 北海道小樽市銭函2-42-12）

事業名：民間等共同研究

課題名：魚貝類の凍結高圧処理による殺菌効果に関する研究

る報告はたくさんあるが、大腸菌、酵母、乳酸菌、芽胞形成菌（バチルス）に関するもの<sup>5, 6</sup>がほとんどで、黄色ブドウ球菌についてのデータは少ない。また、処理温度は常温あるいは加熱状態で行った場合が多く、凍結状態での高圧処理による殺菌効果を検討した事例は少ない<sup>7</sup>。凍結と高圧処理を併用することによって殺菌効果が増大すると言われているが、そのデータが少ないのが現状である。特に生鮮食品に付着した細菌に対する殺菌効果はほとんど検討されていない。

そこで本報では、凍結と高圧の併用によって大腸菌と黄色ブドウ球菌がどの程度殺菌されるか、また両菌が刺身に付着している場合の効果について検討することを目的に、培養液中及びニシンの刺身に付着したの細菌を凍結あるいは非凍結状態で高圧処理し、両者の間での殺菌効果を比較検討した。

## 実験方法

### 1. 使用菌株

本試験では、大腸菌は *Escherichia coli* JCM1649T、黄色ブドウ球菌は *Staphylococcus aureus* IFO12732T を供試菌株として用いた。

### 2. 凍結及び圧力処理

凍結処理のみの場合は、0、-10、-15、-20 の各温度で、24 時間保存した。

高圧処理には Dr. CEFF（神戸精鋼製）を用いた。本装置は 80℃ の高温から -20℃ の凍結状態まで、幅広い温度で 700MPa までの高圧処理が可能である。0 及び -20℃ の温度条件で 24 時間保存した試料を、0、100、150、175、200MPa で 10 分間処理した。

### 3. 高圧処理試料

大腸菌は普通ブイヨン培地に食塩 0.5% (W/V) 添加した培地を用い、黄色ブドウ球菌は普通ブイヨン培地を用いて、30℃ で培養を行い 10<sup>8</sup>cfu/ml の菌液を作成した。これを滅菌生理食塩水で 100 倍に希釈して高圧処理用培養液とした。

ニシンの刺身試料は冷凍ニシンの刺身（株式会社ほくれい製）を流水中で解凍後、直ちに一切れずつ無菌ポリエチレン袋に入れ真空包装し調製した。菌液付着ニシン刺身は、一切れずつ小分けしたニシンの刺身試料に、大腸菌及び黄色ブドウ球菌培養液を各 0.1ml を加え良く刺身に付着させて調製した（一切れ当たり約 10<sup>7</sup>cfu の菌を付着させた）。

### 4. 菌数測定

大腸菌、黄色ブドウ球菌の培養液を加圧処理した場合

は、処理試料を適度に希釈後、標準寒天培地上に塗抹し、好氣的に 37℃ で培養を行った。菌付着ニシン刺身の場合は、試料をストマッカー袋に移した後、試料袋の中を滅菌生理食塩水 100ml を用いて洗浄し、洗浄液をストマッカー袋に合わせた。これをストマッカーを用いてノーマルスピードで 1 分間処理した。一般生菌数の測定には標準寒天培地を用い、大腸菌検出にはデソキシコレート培地、黄色ブドウ球菌検出にはクロモアガースタッフを用いた。

本試験では、高圧処理後菌数測定までの間に起こる菌の増殖等を最小限に留めるため、各試料は処理後直ちに氷水中に保存した。すなわち、0℃ 処理試料は氷水中に保存した。凍結状態で高圧処理した試料は、流水により解凍した後、直ちに氷水中に移した。

## 実験結果および考察

凍結高圧処理を行う前に予備試験としておこなった常温における高圧殺菌の結果を図 1 に示した。供試菌株の培養液を常温で高圧処理したところ、大腸菌は 200MPa ではほとんど菌数低下は生じず、300MPa で約 1/25、400MPa で約 1/10000 に減少して、500MPa でほぼ死滅した。一方黄色ブドウ球菌では、300MPa までは菌数にほとんど変化無く、400MPa で約 1/5、500MPa で 1/1000 に減少し、600MPa でほぼ死滅した。このように両菌株とも常温において 200MPa 程度の圧力では、ほとんど殺菌効果はないことが示された。また、大腸菌に比べ黄色ブドウ球菌は圧力に対して耐性が高いことが示された。球菌であるため細胞全体に均等な圧力が掛かることにより耐性があるのかもしれない。

次に、両菌株の凍結のみによる菌数変化を図 2 に示した。大腸菌の場合は凍結のみで菌数が低下し、-20℃ による凍結で 1/10 に低下した。大腸菌は凍結により死滅しやすいことがこれまでも知られており、本の試験においても同様の結果を示した。これに対し黄色ブドウ球菌の場合は凍結だけでは菌数低下はほとんど起こらず、凍結に対しても黄色ブドウ球菌は耐性が高いことが示された。0℃ と -20℃ における高圧処理による菌数変化を図 3 に示した。0℃、200MPa による高圧処理で大腸菌はほとんど殺菌されなかったが、-20℃ の凍結条件下による同高圧処理では約 1/100 に菌数が低下した。この菌数低下は凍結処理による低下の 10 倍であり、圧力処理との相乗的効果の結果であると考えられる。これに対し黄色ブドウ球菌の場合は 0℃、200MPa では大腸菌と同様に菌数の低下はみられないが、-20℃ の凍結下では約

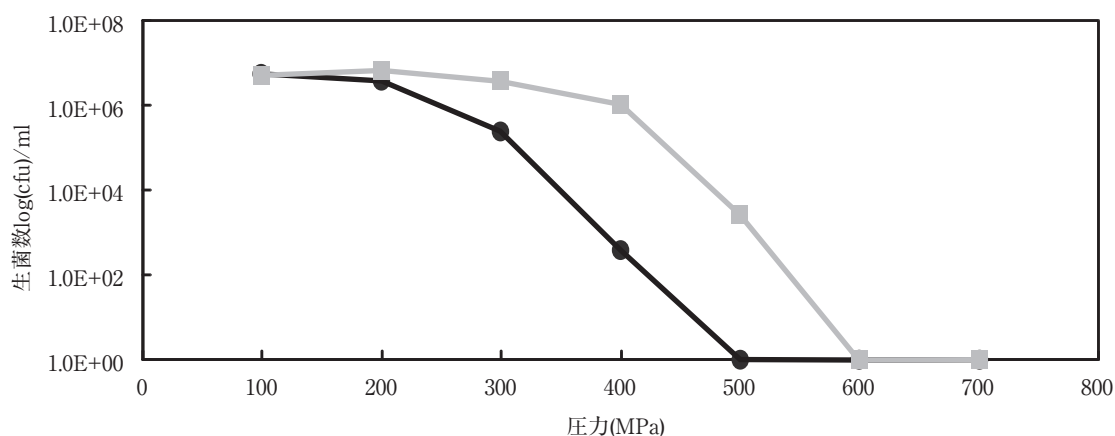


図1 常温圧力処理による大腸菌及び黄色ぶどう球菌の殺菌効果

培養液中の菌を対照に常温状態で100MPa~700MPaで10分間圧力処理を行った。  
大腸菌では300MPa, 黄色ぶどう球菌では500MPaで明確に殺菌効果が認められた。

● 大腸菌    ■ 黄色ぶどう球菌

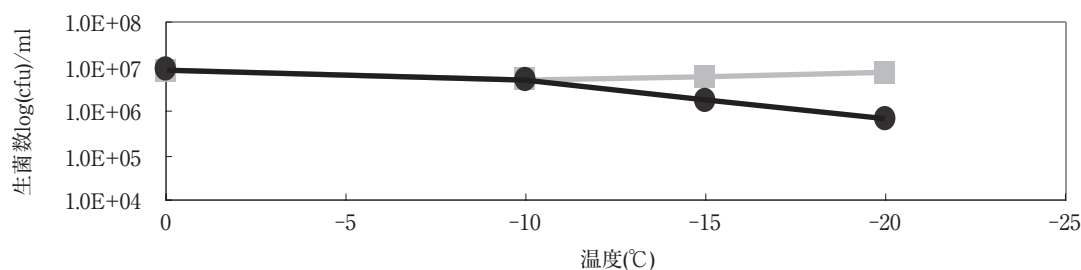


図2 凍結による大腸菌及び黄色ぶどう球菌の生菌数変化

培養液を各温度で24時間保存した後、流水中で解凍した時の生菌数を測定した。  
-20°Cによる凍結だけで大腸菌数は約1/10に低下したが、黄色ぶどう球菌は菌数の低下は起きなかった。

● 大腸菌    ■ 黄色ぶどう球菌

1/100に菌数が低下した。黄色ブドウ球菌は凍結や高圧処理のみでは菌数の減少が起らなかったことから、やはり両処理の相乗効果により菌数低下が生じてたと考えられる。これらのことから、通常では殺菌効果の認められない低圧処理に於いても、凍結と併用することにより殺菌効果が増大することが示された。

培養液では認められた凍結と高圧の相乗効果が、実際に刺身に付着している細菌においても同様に認められるかどうか検討するため、菌付着ニシンを調製して、培養液と同様に凍結高圧処理を行った。この結果を図4, 5に示した。ニシンの刺身に付着させた場合、黄色ぶどう球菌のみならず大腸菌の場合も凍結のみによる菌数低下

は生じなかった(図4)。非凍結状態である0°Cでの高圧の処理(~200MPa)では、大腸菌、黄色ブドウ球菌のいずれの場合も培養液と同様にほとんど殺菌効果は得られなかった。-20°Cで高圧をかけた場合は、両菌株とも殺菌効果が認められ、200MPの高圧処理により大腸菌では菌数が約1/50となり、黄色ブドウ球菌では約1/15となったが、培養液の場合に比べ殺菌効果は低下した(図5)。油の中にある微生物は殺菌が困難であると言われ、本試験に於いてもニシンの刺身に付着させた両菌は魚油中などに埋もれることにより凍結損傷や圧力損傷から保護され、殺菌効果が低下したものと推察した。

次いで実際の刺身の殺菌状況を確認するため、菌付着

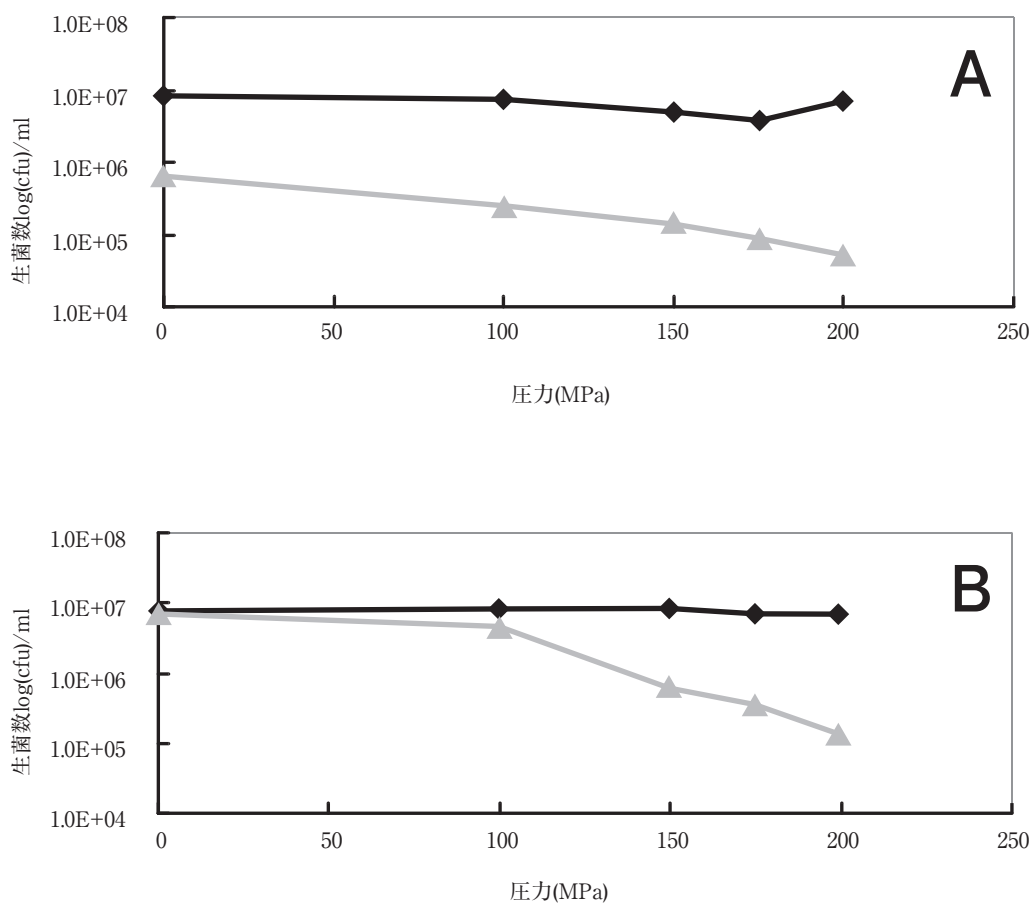


図3 0°Cと-20°Cにおける大腸菌及び黄色ブドウ球菌の高圧処理による生菌数変化

培養液を0°Cと-20°Cの各温度で加圧処理を行った後、培養液中の生菌数を測定した。圧力処理時間は10分間。0°Cでは両菌共にいずれの圧力処理においても菌数低下は起きなかったが、-20°Cでは低下した。

A: 大腸菌 B: 黄色ブドウ球菌 ◆ 0°C ▲ -20°C

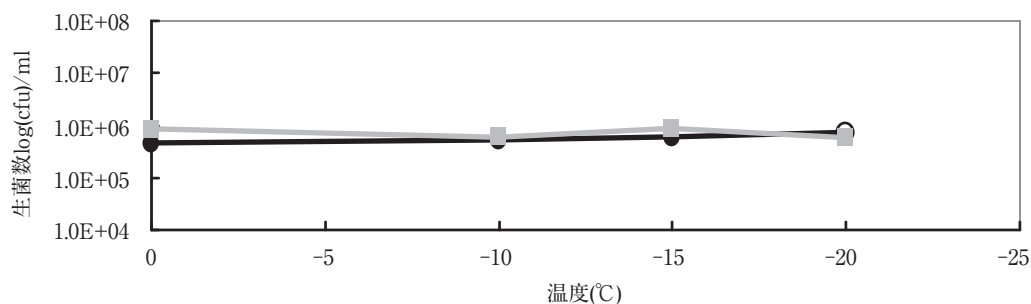


図4 ニシンの刺身に付着させた大腸菌及び黄色ぶどう球菌の凍結による生菌数変化

両菌をニシンの刺身に付着させ各温度で24時間保存し、流水中で解凍した時の生菌数を測定した。どちらの菌も凍結だけでは菌数の低下は起きなかった。

● 大腸菌 ■ 黄色ぶどう球菌

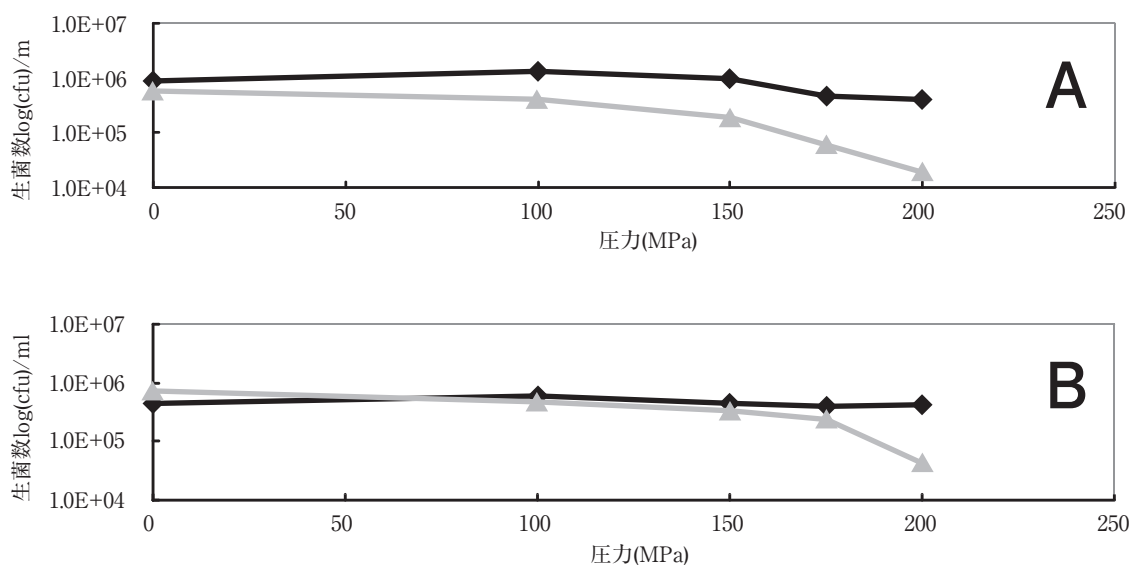


図5 ニシンの刺身に付着させた大腸菌及び黄色ブドウ球菌の0℃と-20℃における各圧力による生菌数変化

培養液をニシンの刺身に付着させ0℃と-20℃温度で各圧力による処理を行った後の生菌数を測定した。圧力処理時間は10分間。0℃では両菌共にいずれの圧力においても菌数低下は起きなかったが、-20℃では低下した。

A：大腸菌 B：黄色ブドウ球菌 ◆ 0℃ ▲ -20℃

処理を行っていないニシンの刺身を用いて -20℃凍結高圧処理を行った（図6）。-20℃，190MPaの高圧処理を行うと一般生菌数は約1/100に低下した。このように当該処理により実際の刺身で効果が確認されたことから、初発菌数の低下による日持ち性向上が期待出来る。

以上のことから、-20℃の凍結状態における高圧処理は、常温による処理よりも高い殺菌効果が得られることが確認された。-20℃の凍結状態では常温でほとんど殺菌効果が得られない比較的低い圧力処理により菌数を低下させることが可能である。低圧処理で殺菌効果が得ら

れることのメリットは、対象となる食品に大きな物性変化を与えないこと、圧力処理コストの低減そして機械の小型化あるいは処理層の大型化を可能にすることなどが考えられる。-20℃，200MPaによる処理では若干の物性変化が起こるが、酢による表面の変化と同程度であり、刺身としての物性を失うことはない。酸味のない酢じめに近い物性であることから、刺身としてばかりでなく低酸味のマリネの具材としても利用可能である。

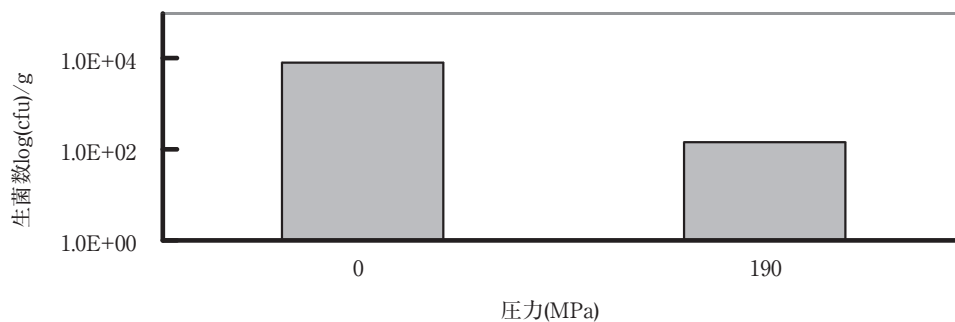


図6 -20℃冷凍ニシン刺身の圧力処理後の一般生菌数

-20で凍結しておいたニシンの刺身を凍結状態で非加圧あるいは190MPa，10分間の処理を行った後、解凍し生菌数を測定。凍結圧力処理により一般生菌数は約1/100に低下した。

## 要 約

大腸菌及び黄色ぶどう球菌を用いて-20℃での凍結高圧処理試験を行い、凍結状態による圧力処理が常温による処理よりも高い殺菌効果が得られることを培養液中のあるいはニシンの刺身に付着させた菌により確認した。非凍結状態では殺菌効果の得られない200MPaにおいても-20℃の凍結状態で処理することにより効果が得られた。実際にニシン刺身を凍結圧力処理することにより一般生菌数を1/100に低下させることが出来た。圧力処理による物性変化は小さく、酢じめ程度であった。

本研究では凍結高圧処理を行うため、北海道立十勝圏地域食品加工技術センターの高圧処理装置 Dr. CHFF (神戸精鋼製) を使用しました。本研究に協力いただいた北海道立十勝圏地域食品加工技術センター職員の皆様に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 楠 くみ子, 潮田 弘, 神 真智子, 新井輝義, 岩谷美枝, 石上 武, 山田澄夫, 東京都多摩地区における市販生食用魚介類の細菌汚染調査成績 (1986-1996), 日本食品微生物学会誌, 15, 161-165 (1998)
- 2) 野村秀一, 原賀壮勇, 花木秀明, 長山在明, 市販刺身の黄色ブドウ球菌による汚染状況調査-平板培養法と増殖培養法での比較検討-, 日本食品微生物学会誌, 19, 17-20 (2002)
- 3) 山崎 彬, 超高压処理による食品物性の改質と圧力殺菌の展望, 日本調理科学会誌, 35, 209-216 (2002)
- 4) 梶山 昇, 秋住啓二, 安部井孝蔵, 長田 優, 江頭辰昭, 三宅義章, 高圧による大腸菌の殺菌, 日本食品工業学会誌, 40, 406-413 (1993)
- 5) 早川 功, 野間誠司, グラム陰性菌の非加熱殺菌の一例, 食品工業, 43, 24-28 (2000)
- 6) 滝 妥恵, 粟生武良, 光浦暢洋, 高垣康雄, 高圧処理による Bacillus 属芽胞の殺菌, 「加圧食品」, (さんえい出版), 東京, pp,143-155 (1990)
- 7) 高橋観二郎, 石井久雄, 石川 宏, 低温域における高圧殺菌, 「高圧科学と加圧食品」, (さんえい出版), pp,225-232 (1991)