

特任助教
筒浦 さとみ

経歴

2013年 お茶の水女子大学 大学院修了
博士（学術）取得
2013年 お茶の水女子大学 研究員
2017年 お茶の水女子大学 アカデミック・アシスタント
2018年 新潟大学 特任助教

高圧処理技術を用いた病原性微生物の制御及び

食品の腐敗抑制法の探索：食品ロス削減を目指して

1. 研究目的

現在、食べられる食品が捨てられる食品ロスが問題となり、持続可能な開発目標（SDGs）でも、食品ロスの削減が掲げられている。我が国でも年間600万トン以上の食品ロスがあり、その半数は事業所から廃棄される¹⁾。食品の保存期間の延長は食品ロス削減に直接つながることから、多くの食品企業が取り組み始めている。食品の保存期間の延長には、微生物の殺菌・静菌が必要不可欠であり、これにはいくつかの方法がある。加熱は微生物の殺菌に有効であるが、加熱の温度が高く、処理時間が長くなればなるほど、食品のダメージも大きい。また、生鮮食品や生に近い状態で加工される食品などには加熱殺菌は使用できない。高圧加工技術は1000気圧以上の高い圧力を食品にかけることで、加熱せずとも食品の物性等を変えることができる技術であり、世界中で利用され始めている²⁾。熱を加えないため、食品への影響は最小限に抑えられる（Fig.1）³⁾。しかし、耐圧性は微生物により異なり、加工された食品の安全性を確実にするためにはそれを科学的に裏付ける基礎的知見が必要である。非加熱の特徴を最大限に生かしながらも、微生物により異なる耐圧性を低下させて、製造から消費者に届くまで増殖させないよう確実に微生物を制御することが必要である。

本研究では、高圧処理時及びその後の環境が病原性及び腐敗細菌に与える影響を明らかにすることを目的とし、様々な環境下におけるこれらの細菌に対する高圧処理の影響を調べ、pH調整や温度制御との併用による効果的な菌の抑制条件も探索した。また、複数の加工食品を用い、食品におけるこれらの細菌に対する高圧処理の効果も調べた。



Fig. 1 高圧加工技術の利点³⁾

2. 内容・方法

本研究では、一般的な衛生指標菌である *Escherichia coli*、食中毒菌で人の手指からの汚染が食品加工現場で度々問題となる *Staphylococcus aureus*、自然界に広く存在する *Bacillus subtilis* 芽胞を用いて、複数の培地、バッファー及び食品における高圧処理の効果をそれぞれ調べ、食品または微生物間で比較した。*E. coli* と *S. aureus* はそれぞれ前培養を2回した後に、*B. subtilis* 芽胞は芽胞懸濁液をそのまま本試験に用いた。液体培地及びバッファーには、Brain heart infusion (BHI) 培地、Nutrient broth (NB) 培地、Trypticase soy broth (TSB) 培地、脱塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、緩衝ペプトン水 (BPW) を使用した。これらに、初発菌数 10^{1-2} CFU/mL または 10^{5-6} CFU/mL になるように菌または芽胞をそれぞれ植菌し、高圧処理を施した。高圧処理条件は200~600 MPa, 25~80°C, 10~30分間とした。高圧処理直後及びそれぞれの菌の至適温度 (*E. coli* では30°C; *S. aureus* 及び *B. subtilis* 芽胞では37°C) において24時間振盪培養後に、菌の増殖を確認した。菌の増殖は濁度測定またはBHI寒天培地を用いた平板培養法または混釈培養法によるコロニー係数法により調べた。それぞれの検出限界は 10^1 CFU/mL 及び 10^0 CFU/mL であった。さらに、*E. coli* と *S. aureus* では400 MPa, 25°C, 10分間、*B. subtilis* 芽胞では400 MPa, 80°C, 10分間の高圧処理条件にて、これらに対するpH 3.5-9.5調整BHI培地及びジュースやスープ等の約60種類の液体食品において高圧処理による影響を調べた。

3. 結果と考察

高圧処理による病原性及び腐敗細菌抑制効果に対する培地及びバッファーの影響

まず、様々な培地及びバッファー等における *E. coli*、*S. aureus*、*B. subtilis* 芽胞に対する高圧処理直後及び24時間培養後の効果についてそれぞれ比較した。*E. coli* は400 MPa、*S. aureus* は600 MPaの圧力により、高圧処理直後の菌数は大幅に抑制された

(Fig. 2)。栄養の異なる培地を用いたが、培地間の差はほとんどなかった。一方、バッファーでは、PBS と BPW よりも脱塩水で *E. coli* と *S. aureus* の両方が減少する傾向がみられた。*B. subtilis* 芽胞ではいずれの培地及びバッファーでも高圧未処理 (0.1 MPa) の試料と同程度の菌数となり、600 MPa でも不活性化されず、残存した。

高圧処理後 24 時間培養後には、いずれの菌でも 200 MPa 及び 400 MPa で十分に増殖したのに対し、600 MPa では *E. coli* で BHI 培地と NB 培地では検出限界以下、*S. aureus* では BHI 培地で増殖に大幅な遅れがみられた (データ示さず)。この結果から高圧により受けた損傷の回復時に必要となる栄養及び塩類が菌種や損傷の度合いにより異なる可能性が示唆され、さらに詳しく検討する必要があると考えられる。一方、バッファーでは、PBS で高圧処理直後に *E. coli* や *S. aureus* がわずかに検出されたものの 24 時間後には菌は増殖できずに検出限界以下となった (Fig. 3)。BPW では 400 MPa の圧力により一度は検出限界以下になったこれらの菌が培養後に高圧未処理試料と同程度まで増殖したが、600 MPa ではこれに比べてわずかに増殖が遅れた。*B. subtilis* 芽胞では脱塩水や PBS でも増殖はしなかったものの、600 MPa の高圧処理後にも残存し、BPW では他の菌と同様に増殖した。本研究では損傷菌についても考慮し、コロニーの検出には BHI 寒天培地を用いた。一般的に損傷菌は非選択培地と選択培地のコロニー数の差から算出されることが多いが、予備的に確認したところ、本研究でも非選択培

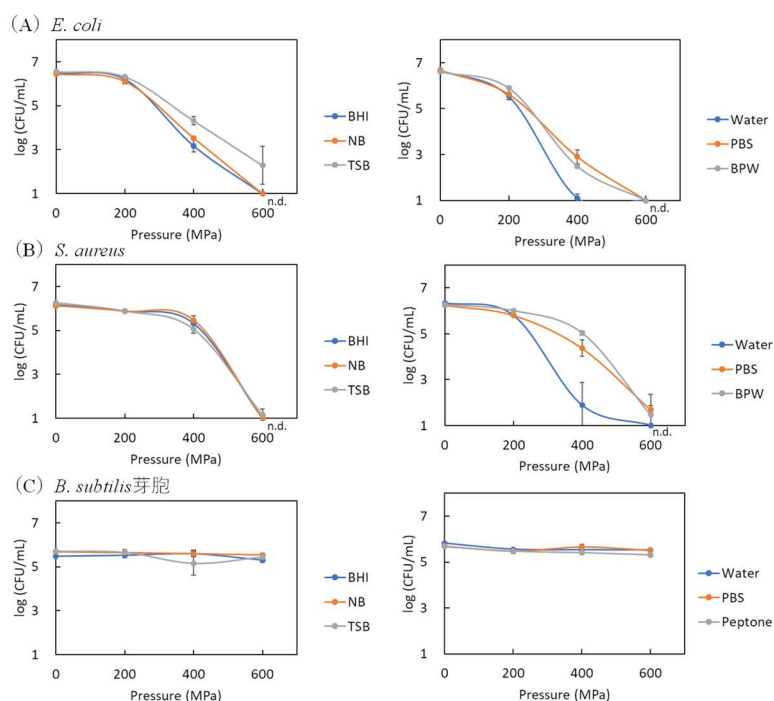


Fig. 2 様々な培地 (左) 及びバッファー (右) における高圧処理直後 (200-600 MPa, 25°C, 10 分間) の病原性及び腐敗細菌に対する圧力の影響

地では選択培地よりもわずかに多くコロニーが検出された（データ示さず）。*E. coli* では PBS でも菌同士の共食いにより栄養源を確保する可能性があることから⁴⁾、本研究では培養を 24 時間としたが、食品の保存を考慮する場合にはさらに長期的・経時的に培養する等、より詳細に検討する必要がある。

高圧処理による病原性及び腐敗細菌抑制効果に汚染状況が与える影響

異なる汚染状況として初発菌数を 10^{1-2} CFU/mL 程度（低汚染）及び 10^{5-6} CFU/mL 程度（高汚染）になるようそれぞれの菌を PBS に接種し、高圧処理後の菌数を比較した。*E. coli* 及び *S. aureus* は低汚染のほうがより低い圧力で検出限界以下になったが、菌数減少の挙動の傾向はいずれの汚染状況でも似ていた（Fig. 4）。*B. subtilis* 芽胞は低汚染で 600 MPa の圧力を施しても検出限界以下にはならなかった。

病原性及び腐敗細菌抑制により効果的な高圧処理条件（時間及び温度）の検討

続いて、高圧処理の圧力を 400 MPa と一定にして、高圧処理の時間と温度が菌に与える影響を調べた。*E. coli* のみ、処理時間が長くなるにつれ、高圧処理直後の菌数は減少傾向にあったが、その他の菌では処理時間の影響はほとんどみられなかった（Fig. 5）。培養 24 時間後には、*E. coli* の 600 MPa で 25°C で処理した高圧処理試料のみ菌数がわずかに減少したものの、他の菌については高圧未処理試料と同程度まで増殖した（データ示さず）。処理時間の延長による菌数低減効果は少なかった。一方で、処理温度の影響は大きく、通常多くの菌は死滅しないと考えられる 60°C で 10 分間の

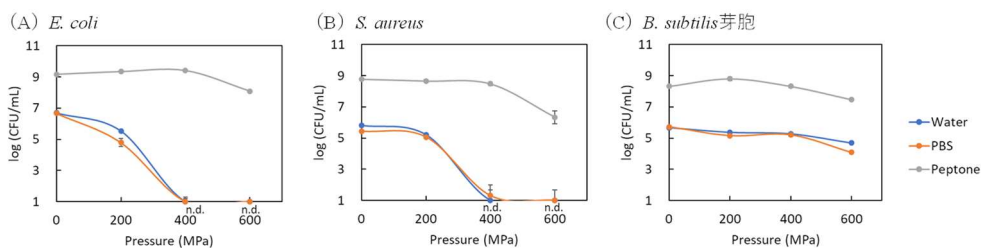


Fig. 3 高圧処理（200~600 MPa, 25°C, 10 分間）後に至適温度で 24 時間培養後の病原性及び腐敗細菌の菌数

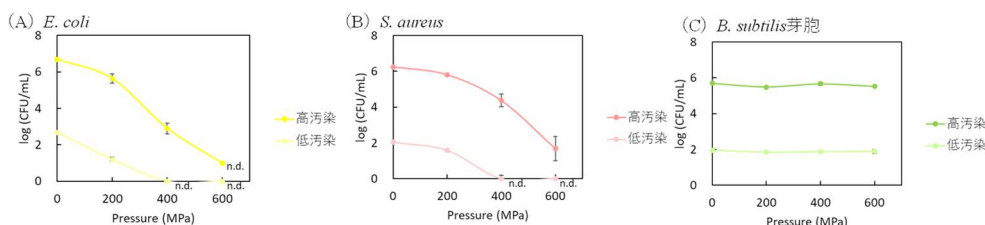


Fig. 4 初発菌数 (10^{1-2} CFU/mL 及び 10^{5-6} CFU/mL) が高圧処理（200~600 MPa, 25°C, 10 分間）直後の病原性及び腐敗細菌に及ぼす影響

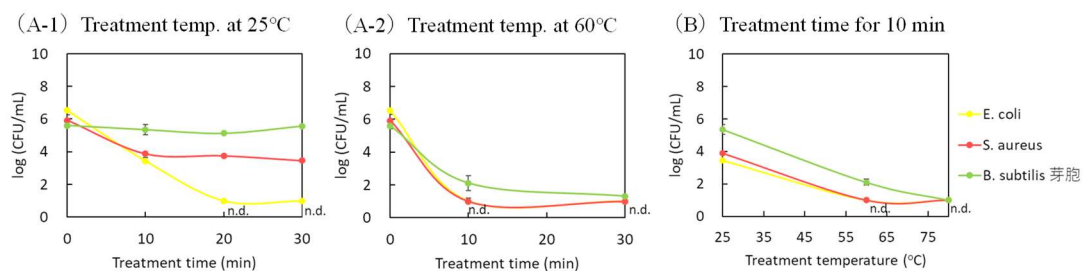


Fig. 5 BHI 培地における病原性及び腐敗細菌に対する高圧処理 (400MPa) の時間 (A) 及び温度 (B) の影響

比較的穏やかな加温条件でも高圧処理との併用により、菌の抑制に効果的であった。60°Cの高圧処理では *B. subtilis* 芽胞以外の菌は死滅し、24 時間後にも増殖しなかった。*B. subtilis* 芽胞は 60°Cでは残存し、80°Cで検出限界以下となった。これらの検討結果を踏まえ、食品ではそれぞれの成分が影響することや芽胞はできる限り残存させないように考慮し、以降の実験の高圧処理には *E. coli* と *S. aureus* は 400 MPa, 25°C, 10 分間、*B. subtilis* 芽胞は 400 MPa, 80°C, 10 分間の条件を用いた。

高圧処理と pH 調整の併用及び培養時の温度制御による病原性及び腐敗細菌の増殖抑制

上記で決定した高圧処理条件を用いて、高圧処理と pH 調整及び培養時の温度制御の併用による菌の抑制を試みた。*E. coli* と *S. aureus* では高圧処理のみでは 10^2 CFU/mL 程度の菌数の減少にとどまったが、pH 調整を併用するとそれ以上の菌数減少及びその後の増殖抑制に効果的であった (Fig. 6)。いずれの菌も pH 3.5 では高圧処理直後に検出限界以下になった一方、pH 4.5 では処理直後に菌が検出されたものの、24 時間後には検出限界以下になったことから、培地の pH 調整により高圧損傷を受けた菌の増殖を培養中で抑制させたことが示唆された。*B. subtilis* 芽胞は 80°Cで高圧処理を施したため、高圧処理直後に検出限界前後まで減少したが、pH 6.5 ではわずかに残存する場合もあった。しかし、pH 調整培地ではいずれでも菌が検出されなかった。損傷菌が後に検出される可能性を考慮し、シャーレの培養日数を数日延長する、低 pH の培養液の一部をを新たな BHI 液体培地に加えて培養する等により回復・増殖の確認を行ったが、菌の増殖は認められなかった (データ示さず)。また、高圧処理後の培養温度を冷蔵温度 (10°C) とした際の検討も同様に行ったが、pH 6.5 以外の pH 調整培地では、いずれでも菌の増殖が抑制された (データ示さず)。このように、高圧処理と pH 調整の併用とともに温度制御も同時に組み合わせることで、pH 5.5 や 8.5 の比較的穏やかな pH 調整でも効果的に菌の増殖を抑制させ、増殖に要する時間を遅延させることができると考えられる。

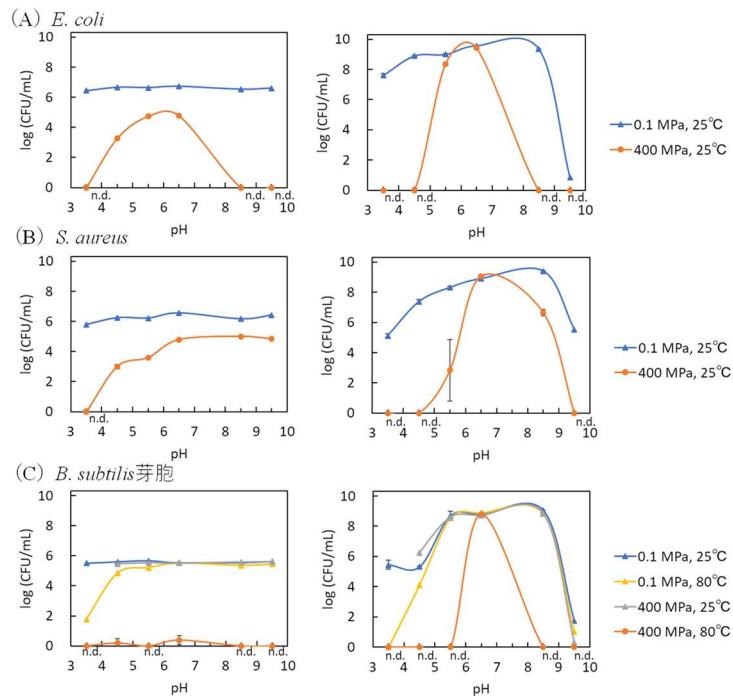


Fig. 6 BHI 培地における高圧処理直後 (400 MPa, 25°C または 80°C, 10 分間 ; 左) 及び至適温度で 24 時間培養後 (右) の病原性及び腐敗細菌に対する pH の影響

様々な食品における高圧処理による病原性及び腐敗細菌抑制効果の比較

上記の結果から、高圧処理と pH 調整により病原性・腐敗細菌も十分に抑制される可能性があったため、続いて、様々な食品の pH において高圧処理の影響を調べた。およそ 60 種類の液体の食品を用いて、それぞれの菌を付着させ、高圧処理直後及び 24 時間保存後の菌数を測定した。食品にはフルーツや野菜、コーラ、炭酸、コーヒー、ビール、牛乳、豆乳などの飲料やおかゆ・おしるこ、ドレッシング・ソース類まで幅広く用いた。まず、高圧処理直後に食品ごと高圧処理の影響の受けやすさを確認した。菌により多少異なるものの、*E. coli* 及び *S. aureus* の高圧処理直後の菌数が 10^4 CFU/mL 以上の食品には、ごまドレッシング、はちみつやチョコレートソース、甘酒やおしるこ、牛乳、豆乳等があり、これらでは高圧処理時の菌数低減効果があまりみられなかった。糖質やタンパク質等が多く含まれると、微生物は失活しにくい傾向があることから⁵⁾、これらが影響した可能性もありうる。牛乳では高圧処理の効果が出にくいことは既に知られており、本研究の結果は既報⁶⁾と一致した。牛乳に含まれるタンパク質含量等もこれらに影響する可能性があったが、本研究で用いた普通牛乳や低脂肪乳等の複数の牛乳では菌数低減効果に差は認められなかった。一方で、コーラや炭酸飲料、コラーゲンドリンクやエナジードリンク等 pH 3.5 以下の食品では高圧処理直後に検出限界以下となり、菌数低減効果が高い傾向があった。また、コーヒー

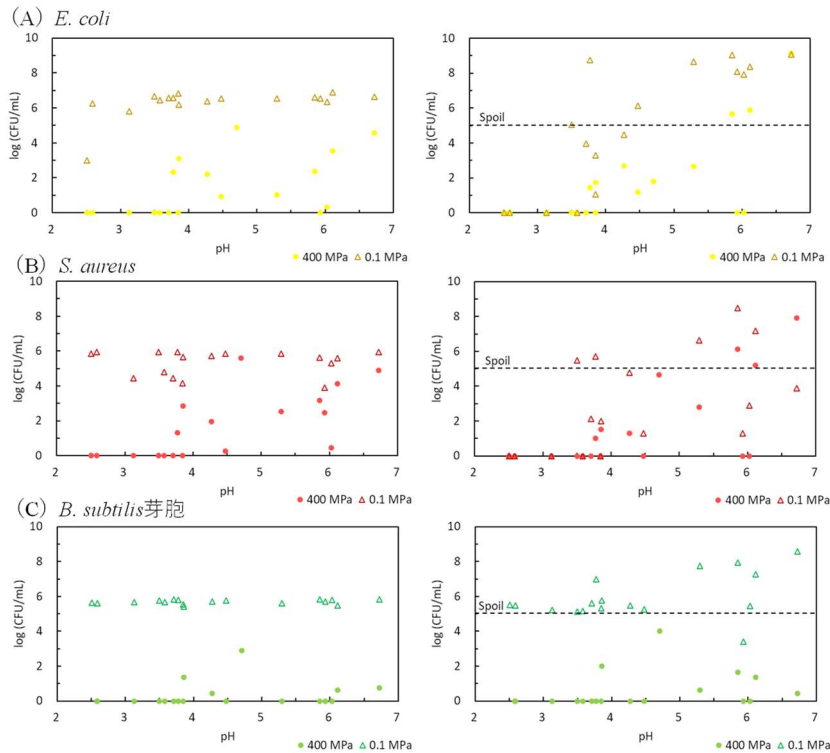


Fig. 7 様々な食品の pH と高圧処理直後（400 MPa, 25°Cまたは 80°C, 10 分間；左）及び至適温度で 24 時間保存後（右）の病原性及び腐敗微生物の菌数の関係

は pH が 6 付近であるにもかかわらず、高圧処理直後の菌数は 10^2 CFU/mL 以下となり、pH 以外の要因が高圧処理時の菌数低減に影響したことも示唆された。

続いて、これらの食品を 24 時間保存して菌数を測定した。先の培地を用いた検討からも、高圧を受けた菌では培養中の pH の影響が大きいことが示唆されたため、高圧処理時に pH の大きな菌数低減効果がなくとも、そのまま保存することで pH の持続的な曝露により菌の増殖抑制及び静菌に影響を与えることを期待して研究を行った。トマトジュースやグレープジュース等 pH 4.5 以下の食品では菌の増殖が抑制され、おかゆ、スープ、牛乳、おしるこ等の pH が 6 付近で高圧処理直後に菌が残存した食品では保存後に菌数が増加した。また、茶は高圧未処理試料で pH による影響が少なかったにもかかわらず、pH 調整と高圧処理を併用した際には、保存後の菌数が検出限界以下となった。高圧処理を施した食品では pH が低くなるほど保存後の菌数が減少傾向にあり (Fig. 7)、*E. coli* 及び *S. aureus* では pH と菌数には相関 ($R=0.69$ 及び 0.67) が認められた。*B. subtilis* 芽胞については高圧処理の温度条件が他の菌とは異なるもののいくつかの食品では高圧処理直後及び 24 時間後に菌が残存したが、増殖はしなかった。また、高圧処理試料では保存後でも一般的な腐敗の基準である 10^5 CFU/mL を超えた食品の数を減らすことが示された。この結果から、本研究で検討した pH 調整を含むその他の微生物制御法を

高压処理と併用することにより、食品中での菌の増殖を遅延させ、食品の日持ち向上につながる可能性と食品保存に十分応用できる可能性があった。また、実際の加工食品は低 pH のものも多かったことから、高压処理を食品に用いると食品の pH や成分の影響も重なり、食品によっては加工したままの pH でも菌数が減少する場合もあることが確認された。菌数低減が現れにくい食品の原因や pH 以外のより強い効果が認められる微生物制御法の探索については培地等のモデル試料及び食品を用いてさらに行う必要がある。

本研究の結果から、高压処理技術と pH 調整及び温度制御等のその他の技術との併用により、一部の液体食品では病原性・腐敗細菌の十分な菌数低減を示す可能性が明らかになった。これらの制御が他の細菌の菌数低減が認められるかさらに多くの菌を用いて調べ、高压処理で菌数低減が比較的大きかったもののわずかに菌が残存した食品については、高压処理を繰り返す等食品へのダメージを考慮しながらも更なる検討が必要である。また、本研究では主に pH に着目したが、食品マトリックスの影響として浸透圧や水分活性等他の要因による影響も考えられる。これらと高压処理効果との関係性や保存中の菌数抑制に効果的な成分と食品との組み合わせについても、食品のおいしさと安全性の両方の視点から調べる必要がある。

4. 謝辞

本研究にご支援いただきました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。また、本研究の遂行に尽力していただいた研究室の学生諸氏に感謝申し上げます。

5. 参考文献

- 1) 農林水産省 食品ロスの現状（フロー図）平成 29 年度推計値, https://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syoku_loss/attach/pdf/161227_4-138.pdf (2021.4.20 閲覧)
- 2) 西海理之, Maksimenko A., 菊地凌, 筒浦さとみ (2020) 高压処理による低塩食肉製品製造技術の開発, 油空圧技術, **59**, 25-30.
- 3) 筒浦さとみ, 西海理之 (2020) 食品産業に資する高压微生物制御技術の新たな展開, 食品と容器, **61**, 250-258.
- 4) Morimatsu, K., Inaoka, T., Nakaura, Y., and Yamamoto, K. (2019) Injury and recovery of *Escherichia coli* cells in phosphate-buffered saline after high hydrostatic pressure treatment, *Food Sci. Technol. Res.*, **25**, 479-484.
- 5) 山本和貴, 中浦嘉子 (2017) 微生物制御, 澱粉糊化等を非熱的に可能とする食品高压加工技術, 応用糖質科学, **7**, 190-196.
- 6) 野田衛 (2019) 微生物制御を中心とした食品分野における高压処理の応用と課題, 日本食品微生物学会雑誌, **36**, 145-158.