報　文

カタクチイワシ変敗菌の圧力発育抑制

青山康司・重田有仁・岡崎　尚・鈴木寛一*

Growth inhibition of microorganisms isolated from spoiled anchovy by pressurization treatment

Yasushi AOYAMA, Yujin SHIGETA, Takashi OKAZAKI and Kanichi SUZUKI *

Four bacteria were isolated from anchovy spoilt at atmospheric pressure at 50℃. These bacteria were absolutely anaerobic and gram positive, and produced spores, and therefore belonged to *Clostridium*. These bacteria grew at 40 MPa but did not grow at 50 MPa in GAM broth. Furthermore, the spore number of the bacteria decreased in more than 3-$\log_{10}$. These bacteria were added to the minced anchovies and they were incubated under 50 MPa for 48h. None of the pressurized anchovies were decomposed.

食品保存の目的で食塩を添加することは，古くから経験的に知られており，一般的な腐敗防止方法として広く利用されている．しかしながら，食塩の摂り過ぎは，高血圧症の原因とされており，食塩の摂取を減らすことが国民的関心事になっている．著者らは腐敗防止のために食塩の代わりに圧力を利用することを提案し[1)]，これを食品加工技術に取り入れている．例えば，魚の自己消化と組み合わせた圧力酵素分解技術は，食塩無添加で魚介類の自己消化を短時間で進めることができる[1)]．

これまで，圧力は微生物の殺菌技術として広く研究されているが[2)]，圧力による発育抑制については，古い研究がわずかにあるに過ぎない[3)]．圧力を安全で確立された加工技術として利用するためには，加圧下での各種微生物の発育挙動を明確にしておく必要がある．著者らは，これまでに食品に関係する代表的な微生物について，圧力による発育抑制を調べた[4)]．一方，一般的な微生物だけでなく，個々の食品や食材において，腐敗原因となる微生物の発育を確実に抑制できる圧力条件についても検討しておく必要がある．本報告ではカタクチイワシの自己消化中に腐敗を起こす微生物を分離し，加圧下での発育挙動を調べた．

実験方法

1．変敗原因微生物

(1) 菌の分離

漁獲場所が異なる3種類のカタクチイワシをそれぞれ簡易ミンチ機（貝印刃物，ミンサー）で均一に磨砕し，ポリエステル製の透明パウチに入れ，脱気包装後，常圧下の50℃で1日間自己消化させた[1)]．また，同様に50℃・60MPaで3時間処理した後常圧にもどして1日間自己消化させたものも調製した．いずれも約8時間後に変敗した．それぞれの変敗品を肝々ブイヨン[5)]（菌分離培地）に添加し，50℃で増菌培養を行い，GAM寒天培地で純粋分離した．

(2) 芽胞懸濁液の調製

分離株をGAMブイヨン培地（日水製薬㈱）（以下培地と略す）に接種し，50℃1日間培養した．この発育液体培地を寒天培地上に滴下し，表面に一様に塗布した後，50℃で5日間培養した．顕微鏡で芽胞形成を確認後，

*広島大学大学院生物圏科学研究科（〒739-8525　広島県東広島市鏡山1-4-4）

発育した集落を集菌し，1/15Mリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁後，遠心分離（1,400×g）によって3回洗浄し，芽胞懸濁液を得た．各芽胞懸濁液の芽胞数はいずれも10^5～10^7CFU/mlであった．

2．圧力処理装置

加圧下での発育抑制試験は，加圧加熱処理装置（光高圧器機㈱，広島）を用いた．加圧処理槽は10mmφ×300mmで，外部を覆ったリボンヒータ（450w）で温度を調整した．処理温度は50±2℃，処理圧力は0.1MPa～60MPaとした．昇圧には60MPaの場合で90秒を，除圧には10秒を要した．圧力の設定は，圧力計（Heise, Model-CC, USA）の目視によって行った．

3．加圧下での発育抑制試験

⑴ 液体培地における分離株の発育挙動

液体培地100mlをポリエステル製透明パウチに充填して加熱殺菌したものに，80℃で10分間加熱活性化した分離株の芽胞懸濁液2mlを，無菌的に注射器で接種した．このとき初発芽胞数は2×10^3～2×10^5CFU/mlであった．加圧条件は50℃で0.1MPa，40MPaおよび50MPaとした．経時的に液体培地を取り出し，菌数を測定した．

なお，加圧・常圧併用処理は液体培地に分離株を接種後，最初の24時間60MPaで加圧処理を行い，続いて24時間常圧処理を行って菌の発育挙動を調べた．

⑵ 生カタクチイワシにおける分離株の発育挙動

生カタクチイワシの自己消化中の菌の発育挙動については，ミンチ機で均一に磨砕したカタクチイワシに分離株を接種後，ポリエステル製透明パウチに脱気充填し，圧力処理（50℃・50MPa・48時間）を行い，分離株の発育挙動を調べた．

4．菌数測定

分離株の菌数測定はGAM寒天培地（日水製薬㈱）を用い，50℃で2，3日間嫌気培養後，発育集落数を測定した．嫌気培養は簡易嫌気培養キット（三菱ガス化学㈱，アネロパック）を用いた．

結果と考察

1．変敗原因微生物の分離

ミンチにしたカタクチイワシを50℃で自己消化させたところ，1日後にいずれの試料も容器の膨張が見られ変敗した．また，3時間60MPa処理後，常圧に戻して1日間自己消化させたカタクチイワシも同様に変敗した．これらの変敗カタクチイワシから4株を分離した．すべての分離株は水素ガスを発生し，グラム陽性の桿菌で，好気的発育陰性，嫌気的発育陽性，芽胞を形成した．以上のことから，*Clostridium*に属する細菌と考えられた．いずれの分離株も，イワシの最適自己消化温度（50℃）[1]で旺盛に発育した．

2．加圧下での発育抑制試験

⑴ 液体培地における分離株の発育挙動

分離した4種類の菌株の芽胞について液体培地における加圧下での発育挙動を調べた（図1）．いずれの菌株も，0.1MPaでは添加直後から非常によく発育したが，40MPaでは12時間まで徐々に菌数が減少した後，15時間以降再び菌数が増加した．50MPaでは徐々に菌数が減少し24時間後10CFU/ml以下となった．この結果から，いずれの分離株も50MPaで発育抑制できることが分かった．

⑵ カタクチイワシにおける分離株の発育挙動

次に分離株を実際にカタクチイワシに添加し，50MPa・48時間加圧処理を行い，腐敗の有無を調べた結果，自己消化中には腐敗しなかった．菌数測定結果を表1に示した．好気性菌，嫌気性菌のいずれも検出されなかった．したがって分離株は培地中と同様に，カタクチイワシ中でも50MPaの加圧条件で発育が抑制されることが分かった．

表1　カタクチイワシから分離した変敗菌の添加試験

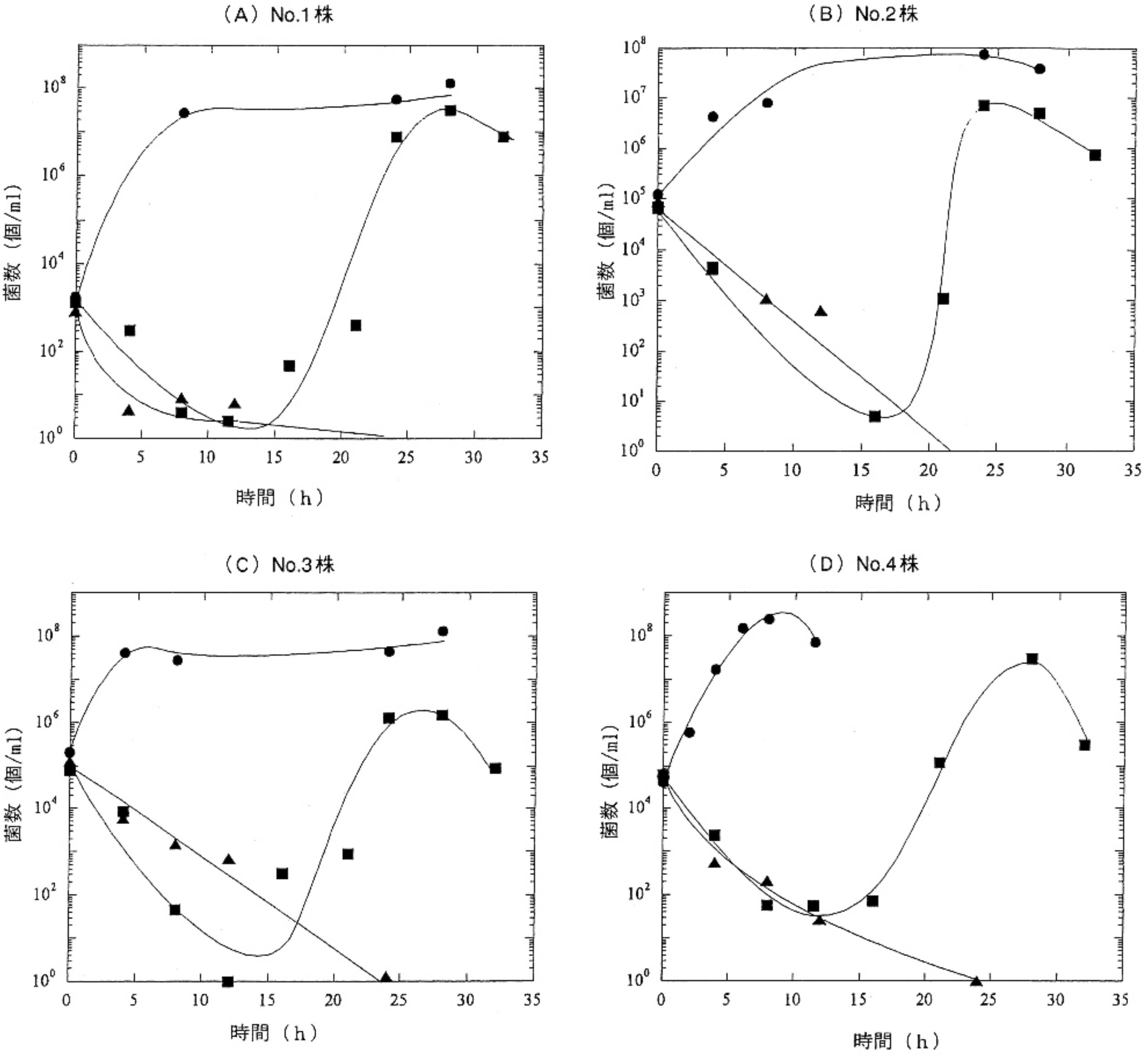
試　料	初発菌数* (CFU/g)	加圧処理後の菌数* (CFU/g)
無添加	2.5×10^3**	0
No.1株	5.4×10^3	0
No.2株	9.0×10^4	0
No.3株	2.2×10^5	0
No.4株	9.4×10^4	0

*　嫌気性菌数
**一般生菌数
処理条件：50℃・50MPa・48時間

これらの結果から，安全率を加味し，60MPaの加圧下でカタクチイワシを自己消化させることとした．

3．加圧・常圧併用処理における分離株の発育挙動

圧力によって自己消化する場合，装置の稼働率がコストに大きな影響を及ぼす．また，図1に示したように



●、0.1MPa；■、40MPa；▲、50MPa

図1　加圧下におけるカタクチイワシ変敗菌の発育挙動（50℃）

50MPa・24時間で菌数はほぼ0CFU/mlまで低下した．さらにカタクチイワシへの添加試験の結果から50MPa・48時間の加圧処理では圧力処理終了時点で微生物は検出されなかった（300CFU/ml以下）．これらのことから，圧力装置の挙動率を上げるために，48時間の加圧処理を24時間に短縮し，その後24時間常圧処理でも安全に自己消化を行うことが可能かどうかの試験を行った．試験には最も発育の良かった分離株No. 3を用いた．

分離株No. 3の芽胞を初発芽胞数が7.0×10^{0}，7.0×10^{-1}，7.0×10^{-2}CFU/mlの3段階になるように希釈して培地に添加し，60MPaで24時間処理後常圧で24時間処理及び比較対照として常圧のみで48時間処理を行った．それらの結果を表2に示した．培地の芽胞数が7.0×10^{-2}CFU/ml以下の場合，菌の発育が観察されなかった．一方，初めから常圧で処理した場合はいずれの芽胞数でも菌の発育が観察された．このことは，加圧・常圧併用処理を行う場合，原料として芽胞数7.0個/100g以下のも

表2　加圧・常圧併用処理における変敗菌の発育挙動

初発菌数（CFU/100ml）	60MPa24時間後常圧24時間	常圧48時間
700	＋	＋
70	＋	＋
7	－	＋

＋：発育，－：発育せず

のを使わない限り，腐敗を抑制できないことを示しており，このような芽胞数の少ない原料を入手することは困難である．また，常圧だけでの処理は不可能であることを示している．

圧力は芽胞の発芽を誘導することが知られている[6)7)8)]．さらに，発芽した芽胞は長時間の圧力付加によって死滅することが報告されている[4)]．図1や表1に示したように加圧処理中に菌数が減少したのはこれを反映していると考えられる．しかしながら，圧力処理によって全ての芽胞が発芽するのではなく，一部発芽しない芽胞が残存するので，表2に示したように常圧に戻すと菌が増殖する危険がある．

以上の結果から加圧処理（50MPa）によって自己消化を行う場合は微生物の増殖は防げるが，加圧・常圧併用処理や常圧だけの処理では微生物が発育する可能性があることを十分考慮しなければならない．

要　　約

1．カタクチイワシを50℃・常圧保存下で変敗させ，変敗原因菌を4株分離した．

2．分離された菌はいずれもグラム陽性の偏性嫌気性有芽胞菌であった．

3．4株の胞子を分離後，栄養培地中で圧力発育抑制試験を行った．その結果，40MPaでは発育したが，50MPaでは発育が抑制され，しかも生菌数が大幅に減少した．

4．ミンチにしたカタクチイワシに4株の変敗原因菌を添加し，50℃・50MPa・48時間加圧処理を行った結果，いずれの試料も腐敗せず，自己消化された．このことから，カタクチイワシ中では50MPaで発育が抑制されることが分かった．

文　　献

1）Okazaki, T., Shigeta, Y., Aoyama Y., and Namba, K., Autolysis of Unasalted Fish Protein under Pressurization. *Fisheries Sci.*, **69**, 1257-1262 (2003).

2）林力丸：高圧現象の食品分野への利用，林力丸編，食品への高圧の利用，さんえい出版，1-30 (1989)．

3）ZoBell,C.E. and JOHNSON,F.H. The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria, *J. Bacteriol.* **57**, 179-189 (1949).

4）Aoyama, Y., Shigeta, Y., Okazaki, T., Hagura, Y., and Suzuki K., Growth Inhibition of Microorganisms by Pressurization Treatment. *Food Sci. Technol. Res.*, (2004). Submitted for publication.

5）松田ら：変敗缶詰食品から分離した偏性嫌気性有芽胞細菌の簡易法による同定，日食工誌，**38**，391-398 (1985).

6）Clouston, J. G. and Wills, P. A. Initiation of Germination and Inactivation of *Bacillus pumilus* Spores by Hydrostatic Pressure. *J. Bacteriol.*, **97**, 684-690 (1969).

7）Furukawa, S. and Hayakawa, I. Effect of Temperature on the Inactivation of Batillus stearothermophilus IFO 12550 Spores by Low Hydrostatic Pressure Treatment. *Biocontrol Science*, **6**, 33-36 (2001).

8）Sale, A. J. H., Gould, G. W., and Hamilton, W. A. Inactivation of Bacterial Spores by Hydrostatic Pressure. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 323-334 (1970).