

Paenibacillus terrae 芽胞の圧力および加熱連続処理による死滅挙動

重田有仁, 渡邊弥生, 青山康司, 岡崎 尚*

Inactivation of *Paenibacillus terrae* spores by hydrostatic pressure and subsequent heat treatment

Yujin Shigeta, Yayoi Watanabe, Yasushi Aoyama and Takashi Okazaki*

Sterilization of *Paenibacillus terrae* spores by the sequential process of cooking, pressure treatment, and heating or by intermittent sterilization was investigated. Cooking (at 75°C for 30 min), pressure treatment (400 MPa at 60°C for 30 min), and heating (at 90°C for 10 min) reduced viable *P. terrae* spores by 6 logs. In contrast, treatment at 0.1 MPa and 90°C for 10 min killed few spores. The sterilizing effect of the sequential process did not change when the pressure was decreased from 400 MPa to 250 MPa. A significant effect was not observed by intermittent sterilization compared to heat sterilization. The sequential process described above has a significant sterilizing effect on *P. terrae* spores, which are both heat and pressure resistant. The sequential process has the potential to extend the shelf life of food products.

キーワード：圧力処理, 耐熱性芽胞, 殺菌, 日保ち延長

殺菌工程は食品の安全性や日持ちを確保する上で極めて重要な工程である。芽胞菌の形成する芽胞は耐熱性が高く、殺菌するためには一般にレトルト処理等の高温加熱が必要となる。これらの高温加熱処理は食品の品質を劣化させることから、著者らは100MPa程度の圧力と緩やかな加熱による芽胞の発芽現象を利用した新規殺菌技術を提案してきた¹⁾²⁾。本技術は圧力により芽胞の発芽を誘導した後、60～80°Cといった低温加熱処理によって殺菌するもので、比較的緩やかな条件での殺菌ができるため、食品の品質を維持したまま日保ちの延長や日持ち向上剤の使用量の削減が可能となる。

一方、圧力処理後に60～80°Cの加熱処理を行ってもごく一部の芽胞が生残することが明らかとなっている。これら未発芽の残存芽胞は本技術により殺菌処理した食品の日保ちに大きく影響するため、その耐熱性について検討することは極めて重要である。

これらの未発芽芽胞は圧力処理によって何らかの損傷を受け、耐熱性が低下している可能性がある。すなわち、圧力処理後の加熱温度をさらに高くする(80°C以上)ことで、未発芽芽胞を殺菌できる可能性がある。近年、超高压と高温加熱の同時併用による芽胞の殺菌に関する幾つかの報告³⁾⁴⁾がなされており、また、当センターでも高压・高温同時併用に関する研究⁵⁾を行ってきたが、圧力処理後の残

存芽胞の耐熱性に関する研究報告はこれまでにない。

本技術の食品製造工程への導入方法として、加熱調理された食品を圧力処理した後、発芽芽胞を加熱殺菌する工程が考えられる。あるいは、加熱調理および圧力処理した食品を、一旦常圧で保持した後に加熱殺菌する(間歇殺菌処理)する方法も考えられる。そこで、本報告では、食品より分離された*Paenibacillus terrae* 芽胞について、加熱調理処理、圧力処理、加熱殺菌処理あるいは間歇殺菌処理した際の殺菌効果について検討を行った。

実験方法

1. 供試菌

大和製罐株より提供された*P. terrae* 芽胞を試験に供した。本菌は、400MPaの圧力処理を行った食品に残存していた未発芽芽胞として分離された菌である。

2. 圧力処理装置

芽胞の圧力処理(静水圧処理)は、圧力処理容器(光高压機器製)を用いて行った。加圧媒体には水を使用した。容器は常圧～500MPaの範囲で処理が可能で、Φ30×L75 mmの試料室を有する。処理室の加熱は容器を所定の温度に設定した恒温水槽に浸漬することで行った。昇圧は高压ハンドポンプ(KP-5-B型, 光高压機器製)、圧力調整は圧力ゲージ(Model-CC, Heise社製)を用いて行った。

* 広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター

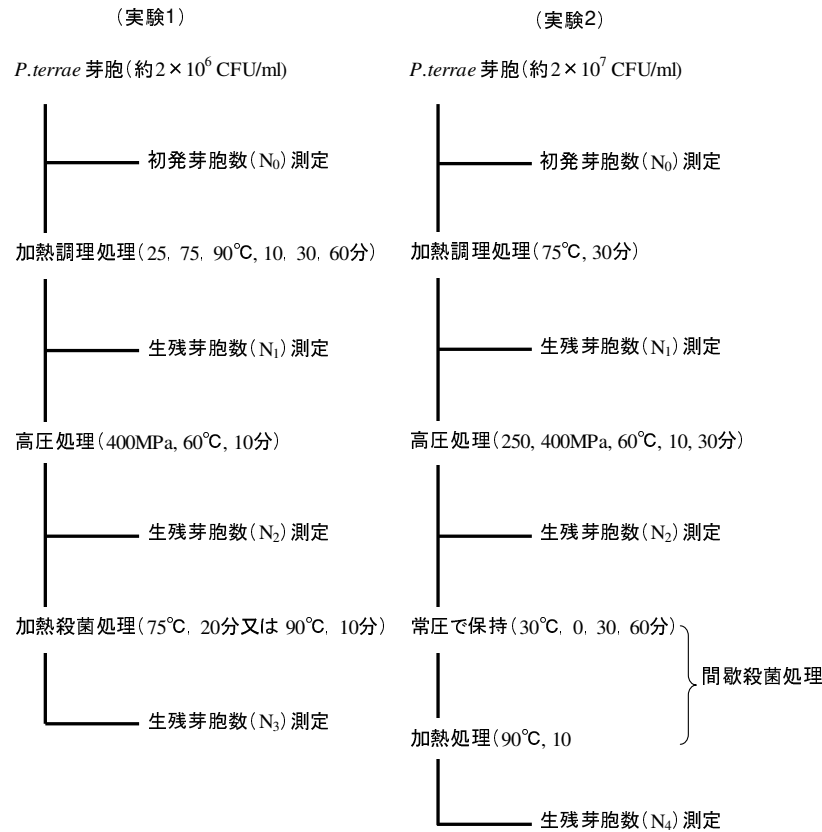


図1 高圧処理の実験手順

3. 圧力処理

加熱調理処理条件および加熱殺菌処理条件の影響について検討した試験（実験1）の手順および圧力処理条件および間歇殺菌処理条件の影響について検討した試験（実験2）の手順を図1に示した。

実験1は以下の手順に従って行った。すなわち、グルコースブロス培地3mlを充填したフレキシブルパウチ（約2cm×6cm）に、*P.terrae*芽胞を約 $2 \times 10^{6-7}$ CFU/mlとなるよう接種した。グルコースブロス培地の組成は表1に示した。パウチよりシリンジを用いて無菌的に芽胞懸濁液を採取し、初発芽胞数（ N_0 ）を測定した。続いて、パウチを所定の条件（25, 75, 90°C, 10, 30, 60分間）で加熱（以降では加熱調理処理と表記）した後、25°Cまで冷却し、加熱調理後の生残菌数（ N_1 ）を測定した。続いて、パウチを60°Cに設定した圧力処理容器の試料室に入れ、圧力が400MPaに到達してから10分間保持した後、除圧した。

表1 グルコースブロス培地の組成

成分	濃度(g/L)
Dried Yeast Extract-S（日本製薬）	3
LAB-LEMCO powder (Oxoid)	3
Bacto-pepton (Difco-Laboratories)	10
NaCl（和光純薬工業）	5
D(+)-glucose（和光純薬工業）	5

昇圧に要した時間は250, 450MPaでそれぞれ約1分間、約3分間である。圧力処理後、試料を25°Cまで冷却し、加熱調理-圧力処理後の生残菌数（ N_2 ）を測定した。さらに、パウチを90°C, 10分間あるいは75°C, 20分間加熱（以降では加熱殺菌処理と表記）し、加熱調理処理-圧力処理-加熱殺菌処理後の生残菌数（ N_3 ）を測定した。

実験2では、実験1と同様に芽胞懸濁液を加熱調理処理（75°C, 30分間）、圧力処理（250, 400MPa, 60°C, 10, 30分間）した際の初発芽胞数（ N_0 ）ならびに生残菌数（ N_1 , N_2 ）を測定し、続いて常圧下、30°Cで0, 30, 60分間静置した後、90°C, 10分間の加熱処理（以降では間歇殺菌処理と表記）を行い、生残菌数（ N_4 ）を測定した。

4. 芽胞数の測定

初発芽胞数ならびに各処理における生残菌数は以下の方法により測定した。パウチより採取した芽胞懸濁液を滅菌した生理的食塩水で適宜段階希釈した。初発芽胞数および25°Cの加熱調理試験区についてのみ、芽胞を加熱活性化するため75°C, 10分間加熱したのちに生理食塩水で段階希釈した。希釈した試料液1mlを、標準寒天培地（日水製薬株製）を用いて混釈培養（30°C, 2~3日間）し、発現したコロニー数を計測した。

各処理における芽胞の死滅度（1~4）は以下の式で表すこととした⁶⁾。

$$\text{死滅度 (1) [加熱調理処理による死滅度]} = \text{Log} (N_0/N_1)$$

死滅度 (2) [加熱調理処理-圧力処理による死滅度]=
 $\text{Log}(N_0/N_2)$

死滅度 (3) [加熱調理処理-圧力処理-加熱殺菌処理による死滅度]= $\text{Log}(N_0/N_3)$

死滅度 (4) [加熱調理処理-圧力処理-間歇殺菌処理による死滅度]= $\text{Log}(N_0/N_4)$

実験結果

1. 加熱調理および加熱殺菌処理条件の影響

加熱調理および加熱殺菌処理条件の影響について検討した結果を図2a~2dに示した。25~90℃、10~60分間の加熱調理を行った結果、死滅度(1)については、25℃、75℃の試験区ではいずれの条件でも芽胞は殆ど死滅せず、90℃、10分間および30分間の処理で約0.6オーダーの死滅が観察された。また、90℃、60分間の処理では2.0オーダーの死滅が観察された。

各種の加熱調理処理を行った後に400MPa、60℃、10分間の圧力処理を行った結果、死滅度(2)については、いずれの調理加熱処理条件においても死滅度(1)の値とほぼ同等であった。

一方、加熱調理処理、圧力処理に加え、加熱殺菌処理を行ったところ、75℃の加熱殺菌処理区において、75℃および90℃の加熱調理処理区における死滅度(3)は、

死滅度(1)と比較して0.7~1.8オーダーの増加が確認された。25℃の加熱調理処理区では、死滅度(1)と死滅度(3)はほぼ同等であった。

90℃の加熱殺菌処理区においても同様に、25℃の加熱調理処理したものでは死滅度は増加しなかったが、75℃の加熱調理処理区で3.1~3.7オーダー、90℃の加熱調理処理区で3.2~4.0オーダーの死滅度の増加が認められた。

2. 圧力処理条件、間歇殺菌処理条件の影響

圧力処理条件、間歇殺菌処理条件の影響について検討した結果を図3a~3dに示した。図には示していないが、実験1の結果と同様に、75℃、30分間の調理加熱処理では *P.terrae* の芽胞は殆ど死滅しなかった。

死滅度(2)については、250、400MPa処理区の死滅度はほぼ同等、あるいは250MPaの方がやや高い程度で、大きな差は認められなかった(図3a)。一方、圧力処理時間を10分間から30分間に延長することにより、死滅度が高くなる傾向が認められた。

間歇殺菌処理の影響について検討した結果、死滅度(4)についてはいずれの処理区の死滅度もほぼ同一であり、間歇処理による殺菌効果の向上は確認できなかった(図3b~3d)。また、死滅度(2)と同様に250MPaと400MPaの処理区において死滅度に大きな差はなく、圧力処理の時間が長いほど死滅度が高い傾向にあった。

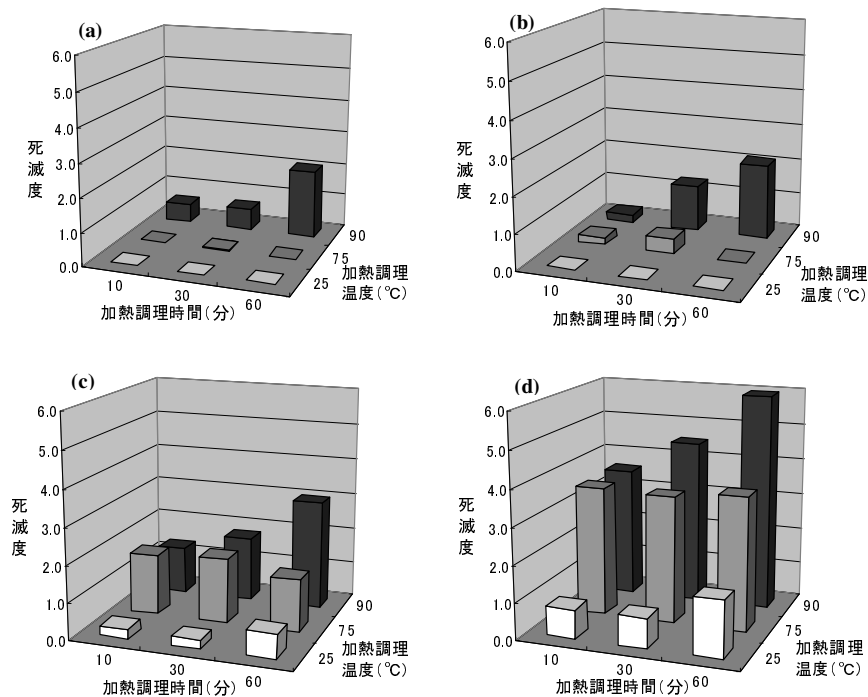


図2 *P.terrae* 芽胞の死滅度に及ぼす加熱調理処理条件及び加熱殺菌処理条件の影響

(a); 死滅度(1) (b); 死滅度(2) (c); 死滅度(3)75℃殺菌処理区
 (d); 死滅度(3)90℃殺菌処理区

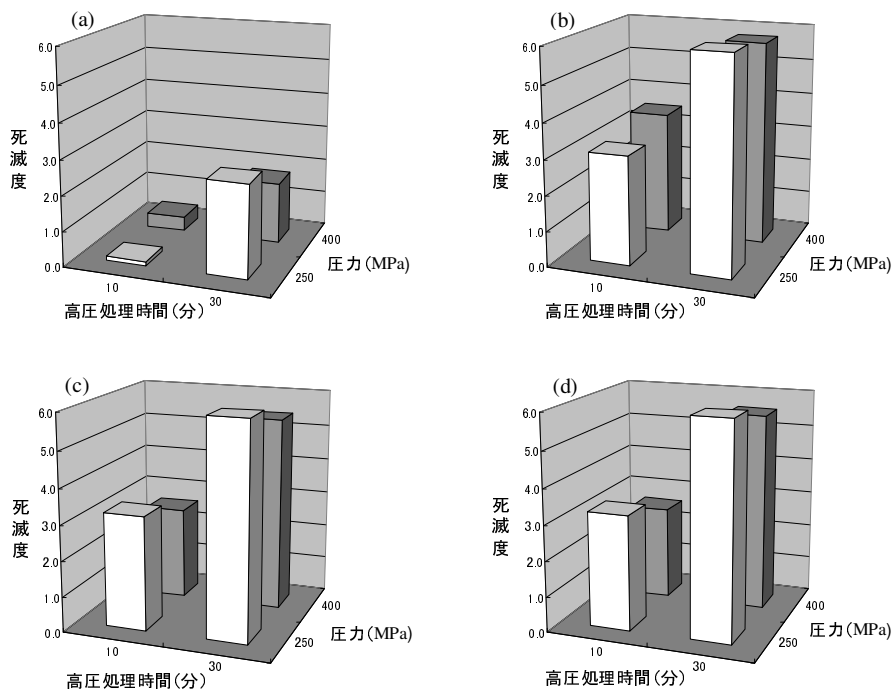


図3 *P. terrae* 芽胞の死滅度に及ぼす高压処理条件及び間歇殺菌処理条件の影響

(a); 死滅度(2) (b); 死滅度(4) 間歇殺菌処理なし
(c); 死滅度(4) 間歇殺菌処理30分 (d); 死滅度(4) 間歇殺菌処理60分

考察

1. 加熱調理および加熱殺菌処理条件の影響

本試験に供した *P. terrae* 芽胞は、75℃の調理加熱処理における死滅度(1)の結果より、75℃では殆ど死滅しないこと、また、90℃、60分間の加熱調理の死滅度が2オーダーであることから、90℃においても一定の耐熱性があることがわかる。

400MPa といった超高压処理には芽胞の殺菌効果があることが知られているが、死滅度(1)と死滅度(2)がほぼ同等であることから、本試験に供した *P. terrae* 芽胞は加熱調理処理を予め行っても圧力処理では殆ど殺菌できないことがわかった。

一方、75℃あるいは90℃の加熱調理処理に加え、圧力処理した芽胞をさらに加熱殺菌処理すると死滅度が増加したことから、3つの処理の併用により殺菌効果が相乗的に高まることがわかった。特に、90℃の加熱殺菌処理区における死滅度増加が顕著で、加熱調理処理と比較して約3オーダーの死滅度増加が確認された。

本試験において、死滅度(1)と死滅度(2)はほぼ同じ値であることから、本菌は400MPa、60℃、10分間の圧力処理において殆ど発芽しないことがわかる。また、60℃で圧力処理を行った場合、発芽した芽胞は発芽と同時に加熱によって死滅することから、圧力処理後の生残芽胞は未発芽芽胞である。

加熱や薬剤処理などの殺菌処理を行った後に生残した芽胞は、殺菌処理により損傷を受けている場合がある⁷⁾。一般的に損傷菌は代謝活性や細胞膜の選択透過性が低下し、発育速度が低下したり、保存料等に対する感受性が高まることが知られている。また、芽胞の加熱損傷による耐熱性低下を利用した殺菌方法も提案されている⁸⁾。本試験において死滅度(3)が増加した原因として、圧力処理によって芽胞が損傷し、加熱殺菌処理によって死滅した可能性が考えられる。

一方、損傷菌の場合、一般的な培養条件では検出されず、菌が見かけ上死滅していると判断される場合もある。これらの損傷菌は、適切な培地で培養期間を長くすると検出されることが多い⁷⁾。本試験においても、芽胞の損傷を考慮して培養期間を長くして測定を行っている。損傷が関与する以上、菌が完全に死滅しておらず、回復する可能性があることは考慮する必要があるが、食品の賞味期限延長の観点からすると、本技術による殺菌処理は意義があるものと考えられる。

2. 圧力処理条件、間歇殺菌処理条件の影響

本試験において、圧力を400MPaと250MPaの死滅度(2)および死滅度(4)がほぼ同等であったことから、本菌については圧力は250MPaであっても十分であることがわかった。

圧力による発芽誘導は比較的低い圧力域においても起こることが報告されている¹²⁾⁴⁾。また、*B. subtilis*について

400MPa よりも 200MPa において発芽率が高いという報告もある⁹⁾。死滅度 (2) は発芽が関与する死滅と推察されるため、250MPa においてやや死滅度が高かった可能性がある。また、これまでの研究で圧力発芽は処理時間を延長するにつれ発芽率が増加し、30~60 分間で発芽率が概ね一定になる傾向にあることが分かっている¹²⁾。実験 2 では圧力処理時間を 30 分間に延長したために死滅度 (2) が増加したものと推察される。

一方、実験 1 と同様に死滅度 (4) は圧力による芽胞の損傷が関与しているものと推察される。高い圧力の方が損傷の度合いも高くなることが考えられたが、本試験において 250MPa と 400MPa の死滅度 (4) はほぼ同等であった。また、図には示していないが、*B.cereus* を用いた試験において 100MPa であっても圧力処理後に加熱することで死滅度が増加することを確認している。以上の結果から、比較的低い圧力域であっても芽胞の損傷が生じる可能性が考えられるが、本現象のメカニズムを明らかにするためには、より詳細な検討が必要と思われる。

間歇殺菌処理は加熱活性化した芽胞を発芽に適切な温度帯で保持した後に、発芽した芽胞を加熱殺菌する手法である。本試験においても、40℃で保持することにより圧力処理後に残存する未発芽の芽胞が一部発芽するのではないかと期待したが、本菌については間歇処理の効果は確認できなかった。本菌は圧力処理においても発芽率の低い菌であるため、間歇処理でも発芽しなかった可能性が考えられる。

本研究では、加熱調理した包装済みチルド食品を圧力処理した後に低温殺菌する工程を想定して試験を行っている。本試験の結果から、耐熱性、耐圧性の高い芽胞であっても、圧力処理に続けて 90℃程度の低温殺菌処理を行うことで、レトルト処理のように高温加熱することなく殺菌し、消費期限を延長できる可能性が示唆された。今後は、実際の食材中での殺菌処理や、使用する圧力域を更に低くする方法、日持ち延長効果、損傷芽胞回復の可能性等について検討する必要がある。

要 約

- 1) 加熱調理処理、圧力処理、加熱殺菌処理の連続処理による殺菌効果について検討した結果、75℃、30 分間加熱した *P.terrae* 芽胞を圧力処理 (400MPa、60℃、30 分間) し、さらに 90℃、10 分間加熱することで、約 6 オーダー殺菌できることがわかった。常圧下で 90℃、10 分間の加熱殺菌処理を行った場合は殆ど殺菌効果がなかった。
- 2) 圧力を 400MPa から 250MPa に低下させても殺菌効果に大きな違いはなく、250MPa の方がやや死滅度が高い傾向にあった。また、間歇殺菌処理には効果が認められなかった。

められなかった。

- 3) 本処理により、耐熱性、耐圧性の高い芽胞を低温殺菌処理で殺菌できることがわかった。本処理による殺菌効果には芽胞の損傷が関与している可能性があるため、損傷芽胞の回復についても検討する必要があるが、食品の日持ち延長技術として利用できる可能性がある。

本研究は大和製罐(株)より委託されて実施したものです。供試菌の提供を始め、種々の情報を提供して下さった大和製罐(株)の方々に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Aoyama, Y., Shigeta, Y., Okazaki, T., Hagura, Y. and Suzuki, K., Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores under combined conditions of hydrostatic pressure and medium temperature. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 101-105 (2005).
- 2) Shigeta, Y., Aoyama, Y., Okazaki, T., Hagura, Y. and Suzuki, K., Hydrostatic pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus* spores in the presence and the absence Nutrients. *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 193-196 (2007).
- 3) Margosch, D., Ehrmann, M.A., Buckow, R., Heinz, V., Vogel, R.F., Gänzle, M. G., High-Pressure-Mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3476-3481 (2006).
- 4) Black, E. P., Setlow, P., Hocking, A. D., Stewart, C. M., Kelly, A. L., Hoover, D. G., Response of spores to high-pressure processing. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, **6**, 103-119 (2007).
- 5) Okazaki, T., Kakugawa, K., Yoneda, T., Suzuki, K., Inactivation behavior of heat-resistant bacterial spores by thermal treatments combined with high hydrostatic pressure. *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 204-207 (2000).
- 6) Opstal, I. V., Bagamboula, C.F., Vanmuysen, S.C. M., Wuytack, E. Y. and Michiels, C. W., Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. *Int. J. Food Microbiol.*, **92**, 227-234 (2004).
- 7) 森地敏樹, 食品と微生物の損傷, 「食品のストレス環境と微生物」, 第1版, (サイエンスフォーラム, 千葉), pp.18-27 (2004).
- 8) 鬼頭幸男, 間瀬雅子, 長谷川撰, 藤井正人, 耐熱性芽胞菌による菓子変敗の防止に関する研究 - 芽胞の熱損傷促進物質の検索 -, 愛知県産業技術研究所研究報告, 1-4 (2002).
- 9) Wuytack, E. Y., Boven, S., Michiels, C. W., Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3220-3224 (1998).