

[報文]

殺菌済み香辛料に生残する微生物の食肉中における 増殖動態の解析

古田雅一¹⁾, 石川悦子¹⁾, 保科美幸¹⁾, 富井恵奈美¹⁾, 小池佳都子¹⁾, 鵜飼光子²⁾

¹⁾ 大阪府立大学理学系研究科 (〒 599-8570 堺市中区学園町 1-1)

²⁾ 北海道教育大学函館校 (〒 040-8567 北海道函館市八幡町 1-2)

Analysis of growth behavior of survived microorganisms from decontaminated spices within meat products

Furuta Masakazu¹⁾, Ishikawa Etsuko¹⁾, Hoshina Miyuki¹⁾,
Tomii Enami¹⁾, Koike Kazuko¹⁾ and Ukai Mitsuko²⁾

¹⁾ *Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-1, Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570 Japan*

²⁾ *Department of Environmental Science, Hokkaido University of Education, 1-2, Hachiman-cho, Hokkaido 040-8567 Japan*

Summary

The purpose of the study is to investigate the condition of microbial growth recovery from the damage of killing stresses such as heating and ⁶⁰Co-gamma irradiation especially within the processed meat products. Black pepper powder treated by each process in which less than 1000 microbial loads was enumerated by aerobic plate counts was mixed with minced sausage and incubated at 30°C for several days. Outgrowth of microorganism was monitored according to the procedure described by Japanese Food Hygiene Law.

Sausage samples containing the treated black pepper powder showed the similar microbial growth from less than 1000 CFU/g of the sample to approximately the order of 10⁹ CPU/g of the sample during the incubation at 30°C, irrespective of gamma-irradiation or superheated-steam treatment. There were no significant differences between gamma-irradiation and superheated-steam treatment in outgrowth of the surviving microorganisms when the treated black pepper or sage was mixed and pulverized with sausage. In case paprika, growth delay of the super-steamed survivors was observed within 1 day after incubation.

Key words: Spices, ⁶⁰Co gamma-irradiation, survived microorganisms, growth behavior, meats

はじめに

香辛料は雑菌に汚染されている場合が多く、これらが殺菌処理を受けた場合、通常は一定の生残菌が存在する。香辛料の利用については食品衛生法上規

格基準があり、「食肉製品、鯨肉製品、魚肉ねり製品を製造する場合、香辛料、砂糖及びでん粉は、その1g当たりの芽胞数が、1,000以下でなければならない」ため、それらの用途に使用する香辛料の殺菌は不可欠である¹⁾。殺菌された香辛料のなかには一定の損傷

菌が存在する可能性があり、このような生残菌を含む香辛料を生菌数が少ない食材に添加し、加工した場合、予測しがたい増殖挙動を示す恐れがある。

すでに実用化されている香辛料の過熱水蒸気殺菌、放射線殺菌に関する殺菌効果、安全性に関しては数多くの研究により確立されている²⁾。しかし一部の消費者からは放射線殺菌の安全性や品質について疑問が呈されていることもあり、殺菌法の違いによる成分、品質の比較は現在でも研究が行われている³⁾。殺菌後の香辛料の残存菌が食品中での異常な増殖挙動によりヒトに害を及ぼさないか、という懸念も一部の消費者からは発信されているが、実際に検討された研究例は報告者の知る限りみられない。すなわち、殺菌処理を受けた香辛料に残存する微生物がどのような条件で損傷から回復し、増殖の促進や抑制が起こるのかを検討することは、食品加工工程の衛生確保に資する知見を得るだけでなく、放射線殺菌に対する消費者の懸念に答えるという意味でも意義あることと考える。

本研究においては、放射線殺菌に加えてわが国で普及している過熱水蒸気殺菌により処理された香辛料をハム、ソーセージ加工に添加する場合を想定し、殺菌処理を受けた微生物の食品内での増殖回復の実態について比較検討した。

実験方法

1. 殺菌済み香辛料の生残菌数測定

わが国で流通している香辛料の中から代表的なものとして市販の未殺菌及び過熱水蒸気殺菌済みの黒コショウ、パプリカ、セージをそれぞれ購入し、未殺菌の香辛料は大阪府立大学産学官連携機構放射線研究センターの⁶⁰Coガンマ線照射施設において10 kGyまでの異なる線量を照射した。

放射線殺菌済みの試料25 gと回収液(0.05% Tween80, 0.1% ペプトン水)250 mLをフィルター付ストマッカー用袋に入れ、ストマッカー(サンプル容量400 mL, 200ストローク/分)により2分間ブレンディングした。得られた試料を食品衛生検査指針に基づき、一般生菌数、大腸菌群、真菌類に属する微生物コロニーをそれぞれ、標準寒天平板培地、デソキシコレート平板培地、ポテトデキストロース平板培地を用いてコロニー計数法により求めた。未殺菌、過熱水蒸気殺菌済みの資料についても

同様に生残菌数を求めた。

2. 殺菌処理を受けた微生物の食品中における増殖挙動解析

未殺菌、過熱水蒸気殺菌済み、放射線殺菌済み(10 kGy照射)黒コショウ、パプリカ、セージ種子を調製し、それぞれ25 gを市販のコーヒーミルで15秒粉碎し、また市販の加熱加工したソーセージ(95 g×3袋)を市販のフードプロセッサーで20~30秒すりつぶした。これら粉碎した黒コショウ試料4 gとソーセージ試料17 gをサンプル瓶に入れ、良く混合させて30℃で培養した。経目的に一瓶ずつ回収し、前述の方法により一般生菌数、大腸菌群、真菌類に属する微生物コロニーの変化を測定した。

3. 過熱水蒸気殺菌及び放射線殺菌後の香辛料からの生残微生物の分離及び同定

過熱水蒸気殺菌及び放射線殺菌後の香辛料の菌数測定において各平板培地上に現れた抵抗性の高いと思われる生残菌のコロニーについては、コロニーの形状に応じて分離培養し、顕微鏡観察を行い、芽胞形成の有無を調べた。さらに「好気性芽胞形成菌の図鑑」⁴⁾などを参考にしながら微生物種の同定を試み、BBLクリスタルGP(産業用)同定検査キット(BD社製)を用いて可能な限り菌種の同定確認を行った。本製品は個々の菌種の持つ代謝酵素系の違いを発光性の生化学基質・酵素基質を用いて簡単に検出することにより、Bacillus属細菌に代表される好気性グラム陽性細菌を簡易に同定することを目的に開発されたものである。同定の原理は以下のとおりである。

キットに含まれる容器、“ベース”に細菌のけんだく液を添加すると、ベースに含まれる発光基質が細菌の懸濁液により溶解し、微生物の代謝酵素系により利用・化学分解され、微生物種により異なる発酵、酸化が生じ、指示薬が反応する。その結果を比色判定することにより香辛料から頻りに分離されるBacillus属細菌13種を含む130余りの微生物種が同定可能である。

実験結果および考察

1. 香辛料の殺菌効果

食品衛生検査指針に基づき、未殺菌の黒コショウ、

表1 黒コショウ、セージ、パプリカの微生物汚染と殺菌効果

試料	微生物群	殺菌法		
		Control	⁶⁰ Co ガンマ線	過熱水蒸気
黒コショウ	一般生菌	1.6E+06	4.1E+02	1.0E+00
	酵母カビ	1.4E+06	3.3E+02	ND
	大腸菌群	ND	ND	ND
セージ	一般生菌	2.3E+04	2.0E+01	6.0E+01
	酵母カビ	5.2E+04	2.0E+01	2.0E+01
	大腸菌群	7.0E+03	ND	ND
パプリカ	一般生菌	3.9E+05	5.0E+01	6.0E+01
	酵母カビ	4.9E+05	5.0E+01	2.0E+01
	大腸菌群	9.9E+00	ND	ND

それぞれの数値は試料1gに含まれる汚染菌数を表す。

パプリカ、セージの汚染菌数を調べたところ、一般生菌、酵母・カビ類ともにすべての試料において1g当り 10^4 以上の菌数が得られた(表1)。一方、過熱水蒸気殺菌後の試料の菌数はすべて100個未満であった。大腸菌群に関しては未殺菌のセージ、パプリカには菌が検出されたが黒コショウには菌が検出されなかった。加熱水蒸気殺菌済みの試料はすべてに菌は検出されなかった。

未殺菌の試料に⁶⁰Coガンマ線を照射したのち、汚染菌数の変化を調べると、放射線量の増加に伴い生残率は低下し、10kGy照射後には加工食品への添加の基準である1g当り1000個未満のレベルを容易に満たすことが明らかとなった。表1に10kGy照射後のそれぞれの試料1g当たりの生残菌数を示す。それぞれの放射線量における生残率の常用対数値をグラフにプロットし、黒コショウ、パプリカ、セージの生残曲線を求めた(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3)。黒コショウ、パプリカ、セージから得られた生残曲線は、すべて一般生菌は酵母・カビ類に比べてわずかに放射線抵抗性であることを示した。黒コショウ、パプリカの一般生菌の生残曲線は直線に近く、これらの D_{10} 値は約2kGyであった(Fig. 1, Fig. 2)。一方、セージの一般生菌の生残曲線は、低線量域に肩を持つ、よりシグモイド型に近いパターンを示した(Fig. 3)。これらの D_{10} 値が既報⁴⁾の*Bacillus*属細菌芽胞

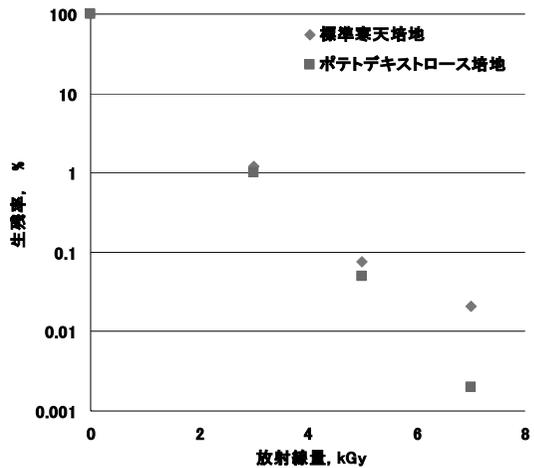


Fig. 1 ⁶⁰Coガンマ線照射黒コショウの汚染菌の生残曲線

の D_{10} 値と類似していることから、今回用いた試料の汚染菌には*Bacillus*属の細菌芽胞が多く含まれている可能性が示唆された。実際にこれらの生残菌の顕微鏡観察の結果、大多数の生残菌が芽胞形成菌であることが判明した。一部の菌について「好気性芽胞形成菌の図鑑」⁴⁾及びBBLクリスタル簡易同定キットにより菌種の同定を行ったところ*Bacillus licheniformis*など*Bacillus*属の細菌が多く含まれていることが示された(Fig. 4)。

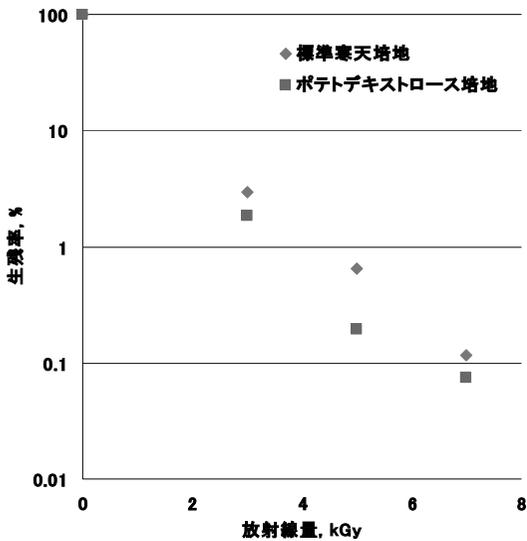


Fig. 2 ⁶⁰Co ガンマ線照射パプリカの汚染菌の生残曲線

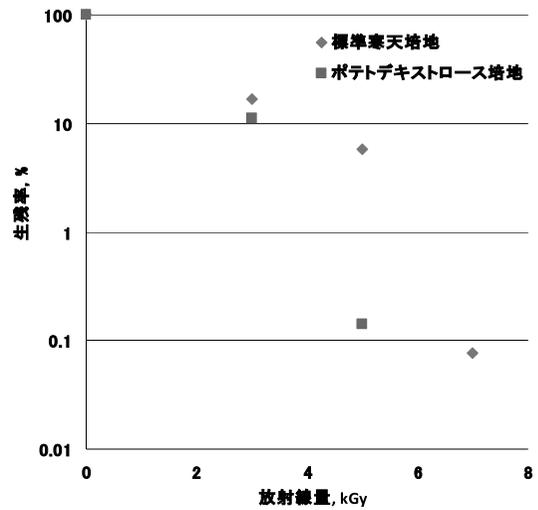


Fig. 3 ⁶⁰Co ガンマ線照射セージの汚染菌の生残曲線

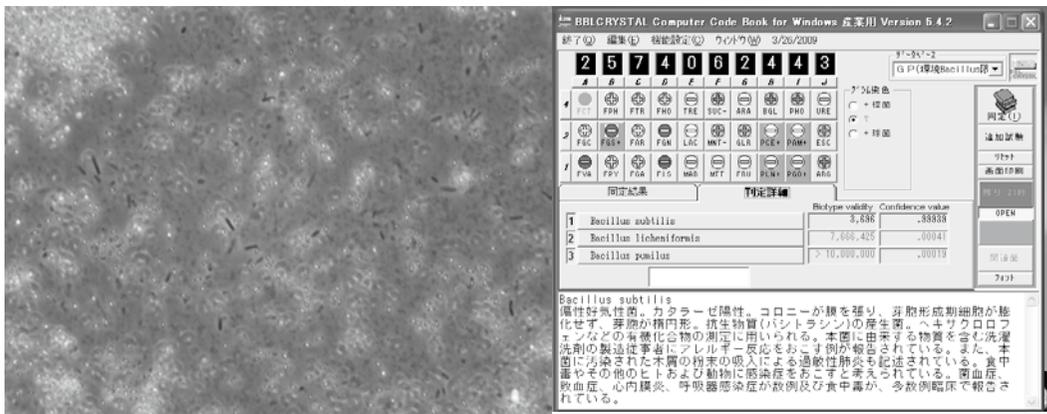


Fig. 4 ⁶⁰Co ガンマ線照射黒コショウから分離された芽胞形成菌の顕微鏡写真 (×1000) (左図) BBLクリスタル GP (産業用) 同定検査キットによる同定結果
右図中のプロファイル番号 2574062443 を専用 PC プログラムを用いてコードブックにおいて検索した結果, *Bacillus subtilis* と同定された。

2. 殺菌処理を受けた微生物の食品中における増殖挙動解析

黒コショウが殺菌処理を受けた場合、通常は一定の生残菌が存在し、前項における検討により明らかになったように、これらのなかには細胞膜や代謝機能に損傷を受けた微生物細胞が存在する可能性が

ある。さらに加熱、放射線処理など異なる殺菌処理において微生物細胞の損傷状態も異なる可能性があり、このような生残菌を含む香辛料を生菌数が少ない殺菌済み加工食品に添加した場合、それぞれ予測しがたい増殖挙動を示す可能性がある。これを検証するため市販の未殺菌及び加熱殺菌済み黒コショウ、パプリカ、セージ、さらに未殺菌の試料に

^{60}Co ガンマ線 10 kGy を照射した黒コショウ、パプリカ、セージをコーヒーミルで粉砕し、フードプロセッサーですりつぶした市販のソーセージと混合して 30°C で培養した。Fig. 5 ~ Fig. 13 にそれぞれの試料について培養日数と一般生菌、酵母・カビ類、大腸菌群の汚染菌数の増加の関係をグラフで示す。

今回用いた市販のソーセージからは一般生菌、酵母・カビ類、大腸菌群は共にまったく検出されなかったが、経目的にサンプリングして菌数を評価したところ、培養と共に一般生菌数、酵母・カビ類の菌数は急激に増加し、培養 2 日後には試料 1 g 当り 10^8CFU 以上に達した。一方、大腸菌群に関しては培養 3 日後も菌が検出されず、フードプロセッサーによる試料調製時においてソーセージには大腸菌群は存在しないことが示された。

未殺菌の香辛料を粉砕してソーセージと混合した試料については、試料調製時においてすでにそれぞれの試料に含まれる香辛料の汚染菌数とその菌数を反映した菌数測定結果が得られた。これらの菌数はソーセージのみの場合と同様、培養日数の増加に伴って急激に増加し、培養 3 日後には培養開始時の 10^5 倍程度までの菌数に達した。

過熱水蒸気殺菌済み香辛料を含む試料と放射線殺菌済み香辛料を含む試料の菌数増加の経日変化を比較すると、黒コショウ、セージの場合、一般生菌、酵母・カビ類の菌数増加のパターンには顕著な差はなく、両者とも 3 日後には 1g 当り 10^8CFU 以上のレベルに達した (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 11, Fig. 12)。

しかしながらパプリカの場合は、放射線減菌済み

パプリカを含む試料中の生残菌の増殖は培養開始直後から他の香辛料と同様に急速に進むのに対し、過熱水蒸気殺菌済みパプリカを含む試料の場合は培養開始後 1 日後までは生残菌の増殖は抑えられ、その後は急速に菌数が増加し、3 日後には両者ともほぼ同レベルまで菌数が増加することが明らかになった (Fig. 8, Fig. 9)。大腸菌群については、試料調製時に生残菌が検出されなかった黒コショウ、パプリカについては過熱水蒸気殺菌、放射線殺菌ともに培養 3 日後も汚染菌は検出されず、それぞれの殺菌処理により完全に不活化されていることが示された (Fig. 7, Fig. 10)。

一方、未殺菌試料の汚染菌数が 1 g 当り 10^9CFU 以上であったセージについては殺菌後及びソーセージとの混合試料作成時には生残菌が検出されなかったにも関わらず、培養日数の増加に従って過熱水蒸気殺菌、放射線殺菌ともに菌数の増加が見られた (Fig. 13)。さらに興味深いことには黒コショウ、パプリカと同様、過熱水蒸気殺菌済み試料の生残菌数の増加は放射線減菌済み試料の生残菌数の増加に比べて緩やかである傾向が見られた。

以上の結果から過熱水蒸気殺菌、放射線殺菌いずれの処理を受けた黒コショウ、パプリカ、セージの生残菌はソーセージ中で未処理の菌の増殖レベルを超える増殖は示さないことが確認されたが、パプリカに関しては両者の増殖パターンに若干の違いが生じる可能性が示唆された。過熱水蒸気殺菌と放射線殺菌が菌体に及ぼす損傷が互いに異なる可能性が高く、過熱水蒸気殺菌による損傷に限り、ソーセージ

標準培地(黒胡椒)

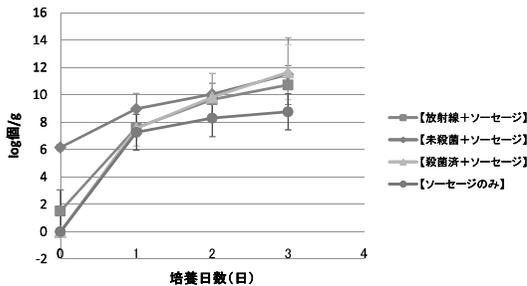


Fig. 5 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済み黒コショウの生残菌のソーセージ中での増殖

ポテトデキストロース培地(黒胡椒)

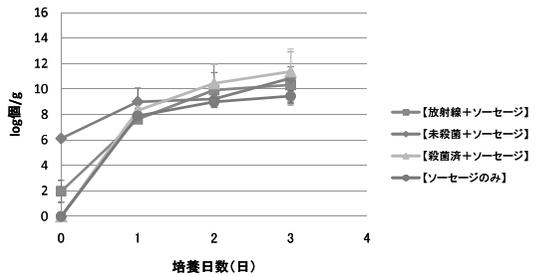


Fig. 6 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済み黒コショウの生残菌のソーセージ中での増殖 (ポテトデキストロース培地: 酵母・カビ類用)

デゾキシコレート培地(黒胡椒)

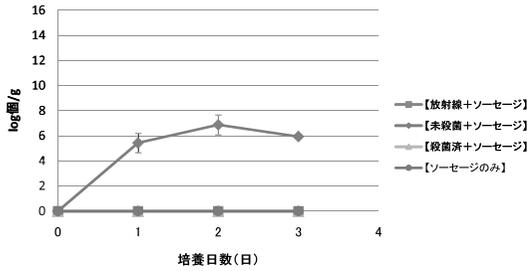


Fig. 7 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済み黒コショウの生残菌のソーセージ中での増殖(デゾキシコレート培地:大腸菌群用)

デゾキシコレート培地(パプリカ)

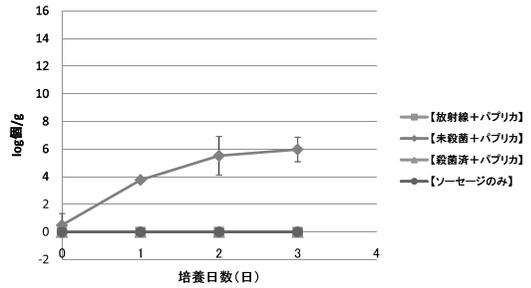


Fig. 10 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済みパプリカの生残菌のソーセージ中での増殖(デゾキシコレート培地:大腸菌群用)

標準培地(パプリカ)

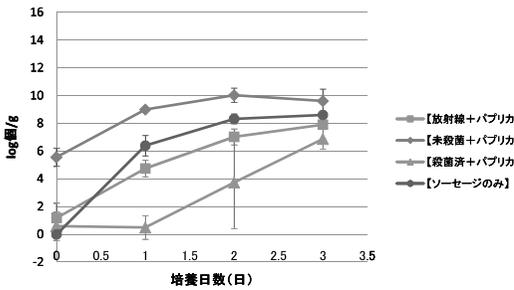


Fig. 8 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済みパプリカの生残菌のソーセージ中での増殖(標準寒天培地:一般生菌用)

標準培地(セージ)

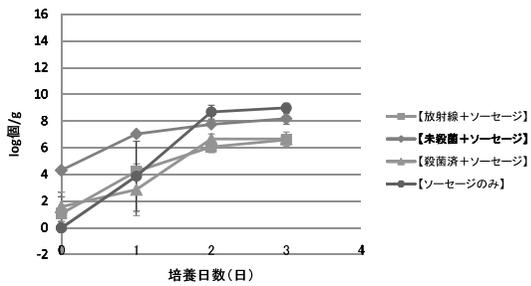


Fig. 11 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済みセージの生残菌のソーセージ中での増殖(標準寒天培地:一般生菌用)

ポテトデキストロース培地(パプリカ)

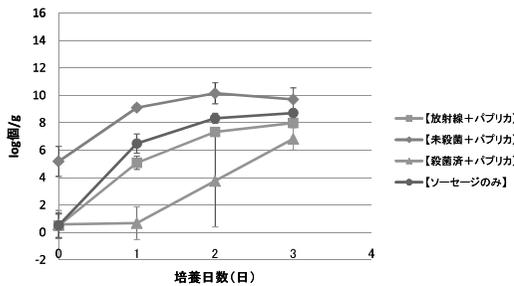


Fig. 9 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済みパプリカの生残菌のソーセージ中での増殖(ポテトデキストロース培地:酵母・カビ用)

ポテトデキストロース培地(セージ)

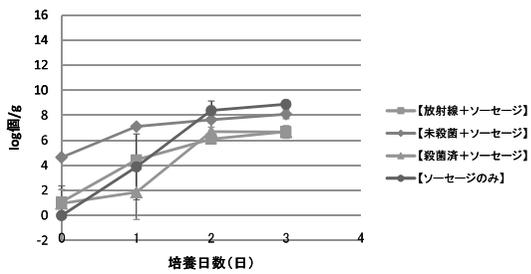


Fig. 12 ^{60}Co ガンマ線 10kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済みセージの生残菌のソーセージ中での増殖(ポテトデキストロース培地:酵母・カビ用)

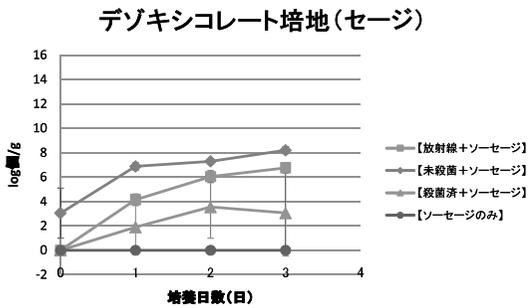


Fig. 13 ^{60}Co ガンマ線 10 kGy 照射及び過熱水蒸気殺菌済みセージの生残菌のソーセージ中での増殖 (デゾキシコレート培地: 大腸菌群用)

内における回復がパプリカに含まれる何らかの成分により阻害され、これがソーセージ中の菌数増加の遅延につながった可能性がある。

今回行った実験では、試料から抽出した微生物の増殖に栄養培地を用いるために、仮に殺菌済みの香辛料の汚染菌が損傷菌であり、ソーセージ中での増殖挙動に変化が見られていたとしても、ストマッカーによる抽出後、培地中で培養している間に損傷が回復してしまう可能性が高い。したがって、香辛料の殺菌処理による細胞損傷による生残菌の増殖パターンの変化を詳細に検討するためにはより貧栄養の合成培地を用いて検出される菌数を栄養培地と比較する必要がある。さらに熱測定法などの非破壊的な計測法⁵⁾も併せて検討する必要がある。

まとめ

本研究においては、香辛料の殺菌法としてわが国で広く用いられている過熱水蒸気殺菌と世界的に利用が拡大している放射線殺菌に着目し、殺菌された黒コショウ、パプリカ、セージをソーセージ添加した場合の微生物の増殖の実態について殺菌処理の違いが増殖に及ぼす影響について検討した。その結果、10 kGy の ^{60}Co ガンマ線照射で十分加工食品に使用可能なレベル (1000 個 /g 未満) まで殺菌できることを確認すると同時に生菌数が少ないソーセージ中

で 30℃ で培養した場合、3 日間で放射線照射後、加熱後の生残菌が未殺菌の生残菌とほぼ同レベルまで増殖することが明らかとなった。ただしパプリカの場合は過熱水蒸気殺菌後の生残菌は放射線殺菌後の生残菌に比べ培養初期での増殖が抑制される可能性が示唆された。この原因としては殺菌法の違いによる菌の損傷状態の差、さらに香辛料に含まれる抗菌成分の関与などが考えられるが、熱測定法による非破壊的計測法など新たな実験手法も含めたさらなる検討が必要であり、今後の課題としたい。

謝 辞

本研究の成果の一部は、文部科学省原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブにより実施された「実用化が予想される食品への放射線利用に関する基礎研究」及び浦上食品・食文化振興財団の助成によるものである。心より感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 古田雅一, 橋際正行. 香辛料の放射線殺菌をめぐる現況と今後. *ジャパンフードサイエンス*, **6**(9), p.54-59 (2007).
- 2) (独)日本原子力研究開発機構. 「現在取り組むべき食品照射対象に関する調査」報告書. p.31-32 (2006).
- 3) Waje, C. K.; Kim, Gui-Ran; Jeon, Eun-Ju; Ahn, Jae-Jun; kim, Dong-Gil; Park, Ju-Hwa; Kim, Kyoung-Moon; Kim, Hyun-Ku; Furuta, M.; Kwon, Joong-Ho. Effect of steaming and irradiation on the quality of dried red pepper (*Capsicum annum* L.). *Food Chemistry*, **119**(3), p.1012-1016(2010).
- 4) (社)日本アイソトープ協会甲賀研究所. 好気性芽胞形成菌の図鑑. 182p. (2004).
- 5) 古田雅一. 微生物の簡易迅速検出法ならびに同定法の現状と進歩 [11] ミクロカロリーメトリ. *防菌防黴*, **34**(7), p.417-426 (2006). (2010年7月16日受理)