

凍結昇圧装置を用いた殺菌に関する研究

上野 義 栄*¹

原 口 健 司*²

[要 旨]

生理食塩水に懸濁した芽胞は、凍結昇圧法を用いても生菌数の減少は認められなかった。

芽胞菌に対する静菌効果が確認されているグリシン水溶液、及び大腸菌に対して凍結による殺菌効果が確認されているアスコルビン酸水溶液に芽胞を懸濁させ、凍結昇圧処理を行ったが、生菌数の減少はほとんど認められなかった。

芽胞菌に対する静菌効果が確認されている酢酸ナトリウム水溶液に懸濁した芽胞を凍結昇圧処理することにより、生菌数が1/100に減少した。

1 緒 言

凍結昇圧法は、センターが特許を保有する新しい加工技術であり、加圧にポンプ等の機械設備を必要とせず、冷凍庫中で凍結昇圧容器ごと冷却するだけで高圧力での処理を行うことができることから、これまでの大型の高圧処理装置に比較して容易に導入できる技術である¹⁾。

また凍結昇圧法は、小型で簡便な方法で高圧力と同時に低温と凍結という3つの条件を同時に発生することより、タンパク質の変性、微生物の殺菌及びウイルスの不活化等の効果が期待できる。

酵母、カビ、乳酸菌及び大腸菌は、凍結昇圧法により死滅する²⁾が、一部のグラム陽性菌に対しては殺菌効果が弱く、また、*Bacillus*の芽胞に対しては、殺菌効果を示さなかった。そのため、特に*Bacillus*の芽胞に対する殺菌効果の向上を目指し、各種殺菌剤等の効果を検討した。

2 実験方法

2. 1 使用菌株

Saccharomyces cerevisiae IAM4274

Bacillus subtilis IFO1403

2. 2 酵母懸濁液の調製

S. cerevisiae IAM4274 をYM培地 (1% Glucose, 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 0.5% Polypeptone) で30℃、1日培養後集菌し、生理食塩水に懸濁した。

2. 3 芽胞懸濁液の調製

B. subtilis IFO1403 をSchaeffer培地³⁾で、37℃、3日間振とう培養し、得られた菌体を集菌後、生理食塩水に懸濁し、80℃、30分加熱処理した。

2. 4 生菌数測定

*B. subtilis*は、標準寒天培地 (0.1% Glucose, 0.25% Yeast extract, 0.5% Polypeptone, 1.5% Agar) を用い、*S. cerevisiae*は、YM寒天培地を用いて、希釈平板培養法で生菌数を測定した。

* 1 : 研究開発課主任

* 2 : 研究開発課主任研究員

2. 5 凍結昇圧処理

酵母懸濁液又は、芽胞懸濁液をPE製の袋に充填し、更に一回り大きな袋に水とともに入れて密封後、凍結昇圧容器に水とともに入れて密封した。本容器ごと-25℃の冷凍庫に入れ、16時間後冷凍庫から取り出し、自然解凍した。

3 実験結果

3. 1 凍結昇圧法による酵母及び芽胞菌の殺菌効果

生理食塩水に懸濁した *S. cerevisiae* 及び *B. subtilis* を凍結昇圧処理したところ、*S. cerevisiae* が死滅したのに対して、*B. subtilis* には、生菌数の減少は認められなかった (図1)。

3. 2 凍結昇圧法の抗菌剤等の併用による芽胞菌の殺菌効果

生理食塩水に懸濁した芽胞は、凍結昇圧処理しても生菌数の減少は認められない。芽胞菌に対す

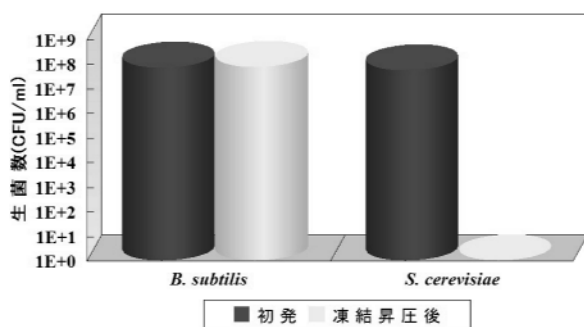


図1 凍結昇圧処理による殺菌

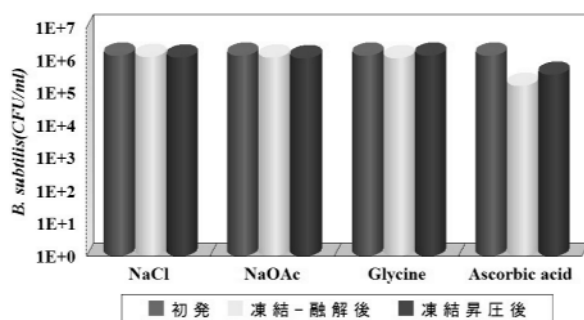


図2 抗菌剤の影響

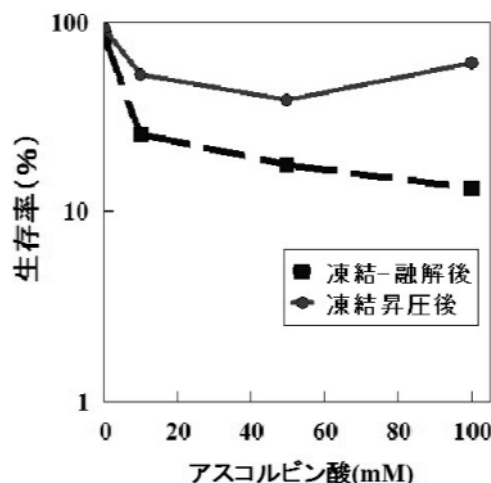


図3 アスコルビン酸水溶液の影響

る静菌効果が確認されている10mM酢酸ナトリウム及び10mMグリシン水溶液に懸濁させた芽胞を凍結昇圧処理しても、生菌数は減少しなかったが、10mMアスコルビン酸水溶液に懸濁した芽胞を凍結-融解処理することにより、生菌数の減少が確認された (図2)。

3. 3 凍結昇圧法のアスコルビン酸の併用による芽胞菌の殺菌効果

アスコルビン酸は、凍結-融解処理による大腸菌に対する殺菌効果が確認されている⁴⁾。凍結昇圧法へのアスコルビン酸水溶液の濃度の影響を検討した (図3)。10~100mMアスコルビン酸水溶液に懸濁した芽胞液を凍結昇圧処理することにより、生菌数が約1/2に減少した。しかし、凍結-融解処理のみでも、濃度依存的に生存率が低下し、100mMで生菌数が約1/10に低下した。

3. 4 凍結昇圧法の酢酸ナトリウムの併用による芽胞菌の殺菌効果に対するpHの影響

10mM酢酸ナトリウムは、芽胞菌に対して、通常酸性条件下で静菌効果を示す。そのため、pH5~7に調整した酢酸ナトリウム水溶液に懸濁した

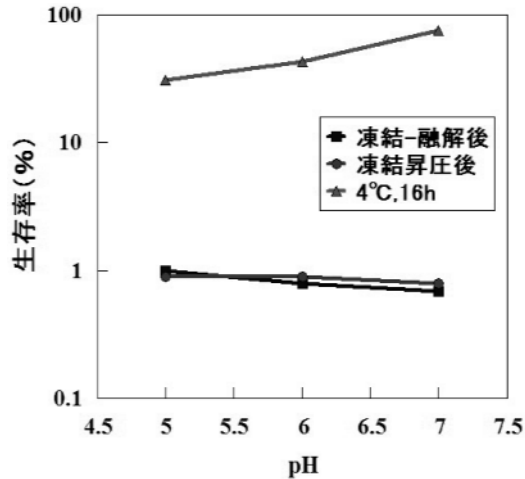


図4 酢酸ナトリウムの影響

芽胞の凍結昇圧処理による殺菌効果を検討した(図4)。

pH調整しない酢酸ナトリウム水溶液では、芽胞菌に対して殺菌効果を示さなかったが、酢酸ナトリウム水溶液のpHを5～7にすることにより、生菌数が1/100に減少した。

また、pHによる影響はほとんど認められなかった。

4 考察

凍結昇圧法による芽胞菌の殺菌効果の向上のために、各種水溶液を検討したが、芽胞菌を生理食塩水に懸濁したのみでは、生菌数は減少しないが、アスコルビン酸水溶液に懸濁させることにより、生菌数が約半分に減少した。しかし、アスコルビン酸の殺菌効果は凍結-融解処理によるものと思われ、凍結昇圧処理により、殺菌効果は減少した。

pH調整しない酢酸ナトリウム水溶液では、芽胞菌に対して殺菌効果を示さなかったが、酢酸ナトリウム水溶液のpHを5～7にすることにより、生菌数が1/100に減少した。pH調整しない酢酸ナトリウム水溶液は、弱アルカリ性であり、殺菌効果は、酸性から中性で作用することが示唆された。また、凍結させずに4℃、16時間保存したのみで

は、生菌数の減少は少ないことより、酢酸ナトリウム水溶液による芽胞菌の殺菌効果には、凍結が必要であると思われる。

芽胞菌以外の多くの微生物は、凍結昇圧処法により殺菌ができる。また、従来殺菌効果を示さなかった芽胞菌に対して、酢酸ナトリウムを併用することにより、生菌数の減少が期待できる。

また、多くの食品は弱酸性から中性のpH域にあることより、酢酸ナトリウム水溶液の併用により、食品の殺菌への利用範囲が広がることが期待される。

(参考文献)

- 1) 早川潔, 上野義栄, 河村真也, 嘉戸朋之, 林力丸: 高圧生物科学と高圧技術, さんえい出版, 179-185(1997)
- 2) K. Hayakawa, Y. Ueno, S. Kawamura, T. Kato, R. Hayashi: Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 415-418(1998)
- 3) J. M. Sterlini, J. Mandelstam: Biochem. J., 113, 29(1969)
- 4) 早川潔, 中西貞博, 上野義栄, 園府寺伸二, 特開平6-197683