

高圧処理による殺菌技術の開発（第2報）

藤田雅彦 酒井美希 朝倉将斗 渡部将也 森松和也*¹ 畑 明寿*² 太田奈保美*²

宮前二郎*² 藤谷 登*²

Development of sterilization method by high pressure treatment (Part2)

FUJITA Masahiko, SAKAI Miki, ASAKURA Masato, WATANABE Masaya,

MORIMATSU Kazuya, HATA Akihisa, OHTA Naomi, MIYAMAE Jiro and FUJITANI Noboru

食品の殺菌には加熱が一般的に用いられるが、食材が本来もつ風味、外観、成分等が損なわれることが課題であり、温度変化が小さく食品の品質保持に役立つ殺菌技術として高圧処理が注目されている。

本研究では、鶏肉やかんきつ果汁に対する種々の条件における殺菌効果や、高圧処理時に発生する軟化等の課題の解決を図った。その結果、鶏肉に付着する菌に対しては菌種によって 300MPa または 500MPa 以上の処理が有効であった。かんきつ果汁については、大腸菌や黄色ブドウ球菌への殺菌効果と pH の関係、腐敗に関与する菌への殺菌効果が明らかになった。また、高圧処理によって発生するキウイフルーツの軟化に対する強化剤の効果の程度や、銅酵母による果実の緑色保持を図った場合の果実中の適切な銅含有量を明らかにした。

キーワード：高圧処理、殺菌、鶏肉、河内晩柑、かんきつ果汁、キウイフルーツ、マスカット

はじめに

高圧処理は加熱殺菌と比較して温度の変化が小さい殺菌工法であり、食材の風味や成分を保持した加工食品の製造を可能とすることが期待される。一方で、高圧処理による殺菌は、対象とする食品の状態（糖、pH、浸透圧、水分活性、食品添加物等）が効果に影響することが知られているほか、圧力が食材の外観や物性等に影響を与える可能性がある。

そこで、本研究では、鶏肉や果汁を対象に種々の処理条件下における殺菌効果を検証した。鶏肉については、生の物性を維持しつつ殺菌し、食中毒の危険性のある鳥刺しを安全に提供することが可能かを併せて検討した。また、高圧処理を活用した食品の開発に向けて、高圧処理の過程で発生する果実の軟化や退緑といった現象に付随する課題の解決を図った。

実験方法

1. 高圧処理技術を用いた鶏肉汚染菌の低減

(1) 加圧用試料の作製

被験菌には次の株を用いた；カンピロバクター属菌 (*Campylobacter jejuni*, ATCC 29428)、大腸菌 (*Escherichia coli*, ATCC 25922)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)。各細菌をコロンビア羊血液寒天培地（日本 BD）にて 37℃ で一晚培養後、滅菌生理食塩水に懸濁させ、濁度計（ビオメリユー・ジャパン製：デンシマツト）で McFarland 2.0 に調整したものを添加菌液とした。なお、カンピロバクター属菌は湿潤環境で微好気培養を行い、他は好気条件で培養を行った。

鶏肉には市販の愛媛県産鶏の胸肉を用いた。皮と辺縁部を除いた肉塊を次亜塩素酸ナトリウム系の消毒液に浸漬して表面汚染菌を除去し、水洗したものを一定の重量にカットし試験に用いた。

ナイロンポリエステル製の食品保存用規格袋（旭化成）に鶏肉片を入れ、その上に一定量の菌液を添加した。これの空気を抜きながらシーラーで封じたものを加圧用試料とした。

* 1 愛媛大学大学院農学研究科 * 2 岡山理科大学

この研究は、「令和 4 - 6 年度戦略的試験研究事業（えひめ食品賞味期限延長技術開発事業）」の予算で実施した。

(2) 鶏肉汚染菌の高圧処理試験

高圧処理装置として Dr. CHEF（神戸製鋼所製）を用いた。設定温度は 10℃、昇圧および減圧時間は 1 分、加圧時間は 15 分に固定した。加圧は 100 MPa 刻みに 600 MPa まで行った。

加圧処理後の試料に滅菌生理食塩水を加えてホモジナイズしたものを適宜希釈し、上記の血液寒天培地に塗抹して培養を行った。カンピロバクター属菌は 37℃の湿潤環境で好気培養を、他は 25℃の好気条件下で 48 時間培養を行い、生育したコロニー数を計数した。殺菌効果は、加圧処理後の生菌数 (N) を、無加圧試料の菌数 (N₀) で除した値の対数として示し、それぞれの細菌に対する目標値は、市販鶏肉の汚染状況調査^{1)~3)}等を参考に、カンピロバクター属菌と大腸菌は-4 log、黄色ブドウ球菌は-3 log とした。

2. 高圧処理による殺菌効果に対する果汁 pH の影響

(1) 果汁試料の調製方法

県内小売店で購入した河内晩柑全果（外果皮+果肉）をスロージューサーにより搾汁し、原液果汁 (pH 3.6) に塩酸または水酸化ナトリウムを添加することで pH 5.0、pH 4.0、pH 3.0 に調整した。また、対照区として、pH 7.0 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を調製した。

(2) 菌懸濁液の作製方法

供試菌として、大腸菌 (*Escherichia coli* NBRC 3301) と黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* NBRC 13276) を用いた。凍結保存した菌液 0.1 ml を解凍し、TSB (Tryptic soy broth) 20 ml へ植菌し、37 °C・130 rpm で 24 時間の振盪培養をそれぞれ行った。得られた培養液は蒸留水で 25 °C・3500 rpm・10min の遠心分離を行い、上澄み液を除去することで菌体の洗浄を行った。同様の遠心分離処理を合計 3 回行い、最終的に 10 ml の蒸留水で沈殿物を懸濁した。菌懸濁液を 9 倍量の果汁または PBS へ接種し、パウチに熱密封することで高圧処理に用いる試料とした。

(3) 高圧処理方法

高圧処理は、高圧処理システム（山本水圧工業所製）を用い、エアコンプレッサーと増圧装置により水を圧力槽内に給水していくことで加圧を行った。25 °C に保温した圧力槽内に試料を沈め、500 MPa まで加圧を行い、1 分間の圧力保持後、常圧まで減圧した。

(4) 生菌数の測定方法

未処理または高圧処理を施した試料を適宜希釈し、菌液 0.1 ml を標準寒天培地に塗布した。なお、希釈作業は氷水で冷やしながらい行った。培地を 25 °C・7 日間培養し、形成されたコロニー数の計数を行い、生菌数を算出した。

3. 高圧処理技術を用いた柑橘果汁腐敗菌の低減

(1) みかん果汁腐敗菌の選定

愛媛県産柑橘の腐敗箇所から複数の真菌を単離し、DNA シーケンス解析により菌種同定を行った。これらの真菌のうち、みかん果汁腐敗能の優れていた *Fusarium pseudoanthophilum*、*Pichia cecembensis*、*Muchor phayaensis* の 3 種を殺菌試験に利用した。

(2) みかん果汁腐敗菌の高圧殺菌試験

各真菌をサブロー寒天培地（栄研化学）で約 1 週間培養し、これを滅菌生理食塩水に懸濁して McFarland 3.0 に調整し添加菌液とした。ナイロンポリエステル製の食品保存用規格袋（旭化成）に市販の愛媛県産みかんジュース (pH3.6、加熱殺菌品) を注ぎ、ここに一定量の菌液を添加した。これの空気を抜きながらシーラーで封じたものを加圧用試料とした。

高圧処理装置は Dr. CHEF（神戸製鋼所製）を用いた。設定温度は 10℃、昇圧および減圧時間は 1 分、加圧時間は 5 分または 5 分処理後に一旦減圧し、再度 5 分加圧とした。圧力は 300MPa と 600 MPa とした。

加圧処理後の試料を適宜希釈し、サブロー寒天培地に塗抹して 22℃で数日間培養を行い、生育したコロニー数を計数した。殺菌効果は、加圧処理後の生菌数 (N) を、無加圧試料の菌数 (N₀) で除した値の対数として示した。殺菌効果の比較対照として、65℃、10 分の加熱処理 (pH4 未満 清涼飲料水の加熱殺菌条件) を施す試料も作製した。

4. 強化剤を利用した高圧処理キウイフルーツの軟化防止効果の検討

(1) 果実試料

県内小売店で購入した適熟のキウイフルーツを剥皮して厚さ 1 cm の輪切りにし、果芯部と種子部分を除いて 1 cm 角の立方体状となるようカットした。その後、表 1 のとおり強化剤水溶液へ事前浸漬ま

たは加圧処理時の封入液への強化剤の添加を行った。事前浸漬は、塩化カルシウム 2 水和物、乳酸カルシウム 5 水和物の 2 種の強化剤を用いて室温で 1 時間行い、流水で洗浄後、30g の果実と 13 g の封入液を透明レトルトパウチに真空包装した。封入液の配合は表 2 のとおりとした。封入液には、緑色保持のために 5 %銅酵母（メディエンス）を加えた。封入液に強化剤を加える処理は、表 2 の配合に 1 %（w/w）の乳酸カルシウム 5 水和物を加え、事前浸漬の場合と同様に真空包装した。

表 1 キウイフルーツに対する各試験区の強化剤処理方法

試験区	強化剤溶液への事前浸漬	強化剤の封入液添加
①事前浸漬（塩化カルシウム）	1.0%（w/w） 塩化カルシウム 2 水和物	-
②事前浸漬（乳酸カルシウム）	2.1%（w/w） 乳酸カルシウム 5 水和物	-
③封入液（乳酸カルシウム）	-	1 %（w/w） 乳酸カルシウム 5 水和物
④対照（強化剤不使用）	-	-

表 2 封入液配合割合

材料名	割合（%（w/w））
5 %銅酵母	0.50
L(+)-アスコルビン酸	0.05
クエン酸	0.20
クエン酸三ナトリウム	0.10
グラニュー糖	16

(2) 高圧処理方法

高圧処理には、まるごと殺菌 TFS6-5（株式会社東洋高圧製）を用いた。処理条件は、400MPa、10℃、10 分間とした。処理後は、5℃の冷蔵庫で保存した。

(3) 評価方法

処理 4 日後に開封した高圧処理果実と同日に剥皮した生果実を対象に、レオメーター（パーカーコーポレーション製：PC-200N）を用い、直径 3 mm の円柱状金属製プランジャーで圧縮速度 1.00 mm / 秒、測定ひずみ 90%で貫入試験を行い、食感（かたさ）への影響を評価した。

5. 銅酵母を利用した緑色保持方法におけるマスカット果実中の銅含量の推移

(1) 果実試料

シャインマスカットを一粒ずつ房から外し、流水で洗浄後、赤道面に対して垂直に 4 分割した。果実 30 g を封入液（配合は表 3）9 g と一緒に透明レトルトパウチに入れ、真空包装した。

表 3 封入液配合割合

材料名	割合（%（w/w））
5 %銅酵母	0.50
L(+)-アスコルビン酸	0.10
クエン酸	0.12
クエン酸三ナトリウム	0.10
グラニュー糖	15

(2) 高圧処理方法

高圧処理は 4. と同様に行い、処理後は 5℃の冷蔵庫で保存した。

(3) 銅含量の分析方法

処理 2 日後、4 日後、7 日後に開封して果実を取り出し、ザルで水分を取り除いた後、ホモジナイズした。その後、希酸抽出法によって試料溶液を調製した。即ち、果実試料約 2 g を分取し、50 ml の 1 %塩酸溶液 50 ml を加えて 30 分間振りまぜ抽出し、No. 5 B ろ紙によりろ過して試料溶液とした。試料溶液の分析には原子吸光高度計（日立ハイテクノロジー製：Z-2310）を用いた。

結果と考察

1. 高圧処理技術を用いた鶏肉汚染菌の低減

詳細な結果については省略するが、各細菌の殺菌効果目標値を達成するためには、カンピロバクター一属菌と大腸菌では 300 MPa 以上、黄色ブドウ球菌では 500 MPa 以上の加圧が必要であった。

既報¹⁾では、100MPa 刻みで 100MPa~600MPa の高圧処理を行った場合、鶏肉の色調は 200MPa 以上、破断強度は 400MPa 以上の圧力で処理することにより、生肉と明確な差が見られた。このことから、生肉の物理的性状をすべて保ちつつ、高い殺菌効果を得るには、高圧処理単体では難しいことが示唆された。

2. 高圧処理による殺菌効果に対する果汁 pH の影響

(1) 大腸菌

図 1 に大腸菌の初菌数を示す。大腸菌では、河内晩柑果汁へ接種した時点で生菌数が低下した。PBS やクエン酸溶液、イヨカン果汁溶液では、pH 5.0-3.0 の溶液中における大腸菌の生菌数低下が見られなかった（データ未掲載）。そのため、このときの大腸菌の生菌数低下は河内晩柑果汁のなんらかの成分が殺菌作用を示したものと考えられる。また、河内晩柑の pH が低い果汁では生菌数の減少が大きくなったことから、河内晩柑果汁中の殺菌成分は酸性領域でその効果が高まるものと考えられる。図 2 に河内晩柑果汁中の大腸菌に対する 500 MPa の高圧処理による殺菌効果を示す。なお、pH 3.6 および pH 3.0 では初菌数が低すぎたため、正確な殺菌効果を定量することができなかった。高圧処理による殺菌効果について、対照区の pH 7.0・PBS では 3.5 log の菌数減少量が示された。一方、対照区に比べ、pH 5.0 の河内晩柑果汁では高圧処理による殺菌効果が低くなった。一方、対照区に比べ、pH 4.0 以下では高圧処理による殺菌効果が高まった。以上のことから、河内晩柑果汁では、pH 4.0 以下に pH 調整を行うことで高圧処理による殺菌効果を高めることができると考えられる。

(2) 黄色ブドウ球菌

図 3 に示すように、黄色ブドウ球菌では、河内晩柑果汁へ接種しても生菌数は一定となった。大腸菌と異なり、黄色ブドウ球菌では生菌数の低下が示されなかった。大腸菌と黄色ブドウ球菌では細胞壁の構造が異なることが知られており、これにより河内晩柑果汁成分による殺菌効果の違いが生じたものと考えられる。図 4 に河内晩柑果汁中の黄色ブドウ球菌に対する 500 MPa の高圧処理による殺菌効果を示す。高圧処理による殺菌効果について、対照区の pH 7.0・PBS では 0.3 log の菌数減少量となり、殺菌効果がほとんど示されなかった。黄色ブドウ球菌は、物理的ストレスに対して非常に耐性があるとされるため、高圧処理による殺菌効果が示されなかったと考えられる。一方、対照区に比べ、河内晩柑果汁では、pH 5.0 で 1.9 log、pH 4.0 で 4.2 log、pH 3.6 で 5.7 log、pH 3.0 で 8.2 log となり、pH の低下と共に高圧処理による殺菌効果が高まった。以上の結果から、河内晩柑果汁の pH を下げることで高圧処理による殺菌効果を大きく高めることができると考えられる。

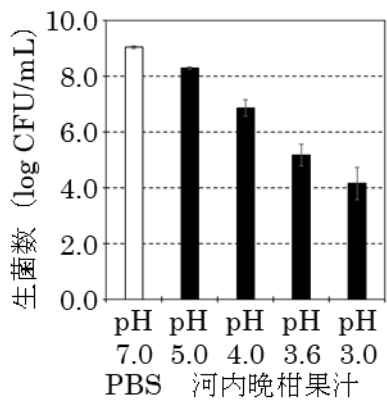


図1 河内晩柑果汁中の大腸菌の初菌数

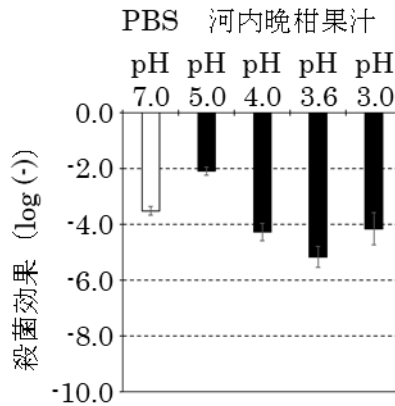


図2 河内晩柑果汁中の大腸菌に対する高圧処理による殺菌効果

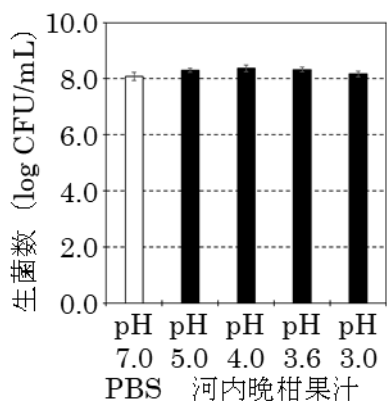


図3 河内晩柑果汁中の黄色ブドウ球菌の初菌数

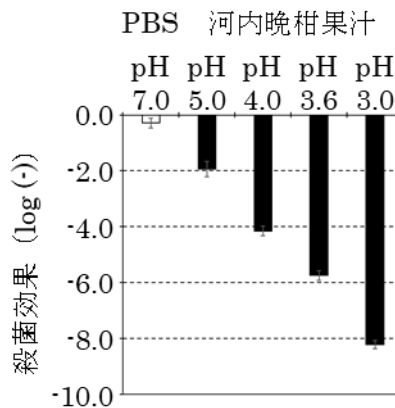


図4 河内晩柑果汁中の黄色ブドウ球菌に対する高圧処理による殺菌効果

3. 高圧処理技術を用いた柑橘果汁腐敗菌の低減

詳細な結果については省略するが、いずれの被験菌も、加熱処理後は発育がみられなかった。一方、高圧処理試料では、600 MPa、5分以上の処理により加熱処理と同等の殺菌効果がみられた。

このことから、高圧処理技術は愛媛県産みかん果汁の風味を活かした殺菌法として有用であると考えられる。

4. 強化剤を利用した高圧処理キウイフルーツの品質保持方法の検討

レオメーターによって測定した試験力 (N) -変位 (mm) の関係の例を図5に示す。処理方法に関わらず複数回の破断を繰り返していることから、単一の破断点を明確に定義することが困難であったため、試験力が最大となる点の試験力 (N) によって各処理方法間の比較を行った。その結果を図6に示す。生果の最大試験力が最も大きく、これは喫食時の感覚とも一致していた。また、高圧処理を行った試験区の中では乳酸カルシウムによる事前浸漬を行った試験区が最も大きく、強化剤を使用していない対照区が最も小さかった。

このことから、高圧処理の過程でキウイフルーツ果実の軟化が発生するが、強化剤の使用によってかたい食感を保つ効果が一定程度あると考えられた。しかし、最も効果の高かった乳酸カルシウムの事前浸漬を行った場合でも、その最大点試験力は生果の6割弱程度であり、喫食時にも明確な違い(高圧処理果実の軟化)が感じられた。本研究では、高圧処理によって生の風味を保持するという目的があるため、適熟の果実を使用した。一般に、加工用途で果実の硬い食感や作業性が求められる場合、より未熟な果実を使用する場合がある。よって、果実の熟度の違いによる軟化発生の程度や強化剤の効果の差についても考慮する必要があると考えられる。

また、高圧処理したキウイフルーツを喫食した結果、苦みの発生が認められた。これは、銅酵母や強化剤の使用に関係なく発生したため、高圧処理によるものと思われる。このことから、キウイフルーツに高圧処理を適用する場合、苦みのマスキングまたは発生原因の究明と対策を行う必要があると

考えられる。

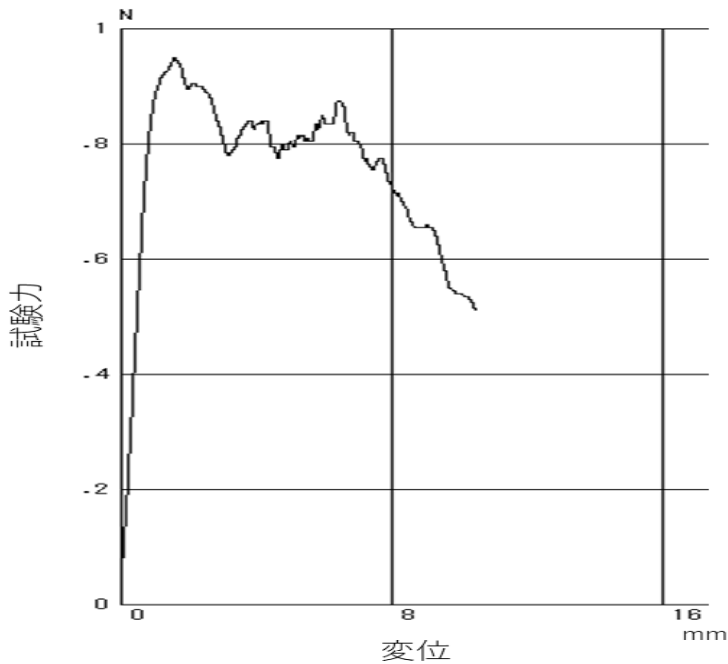


図5 キウイフルーツ果実の試験力と変位の関係

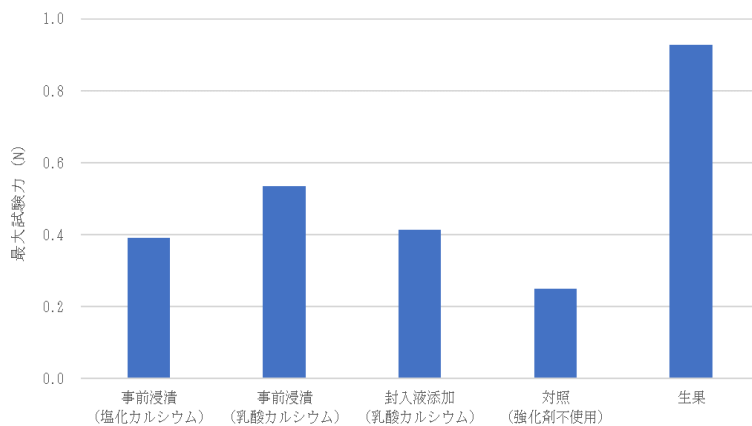


図6 強化剤の処理方法の違いによる最大試験力への影響

5. 銅酵母を利用した緑色保持方法におけるマスカット果実中の銅含量の推移

既報⁴⁾では、銅酵母の利用がマスカット果汁等の緑色保持に有効であることを報告しており、本試験ではこの手法を果実に応用する場合の果実中銅含量の推移について検証した。処理後の銅含量の推移を図7に示す。処理後の果実中の銅含量は日数の経過に概ね比例して増加し、7日後には5.1mg/100gに達した。

銅の食事摂取基準は、18歳以上の男性で0.9 mg/日、女性で0.7 mg/日が推奨量であり、耐容上限が7 mg/日となっている⁵⁾。処理7日後の果実を食品中に20 g使用した場合、銅の摂取量は約1 mgとなり、耐容上限は大きく下回っているものの、推奨摂取量を超えることとなる。緑色保持のために銅を利用した場合、果実の使用量によっては、風味や外観などの品質的要因や微生物的要因に加えて、食品中の銅含量を考慮する必要がある。

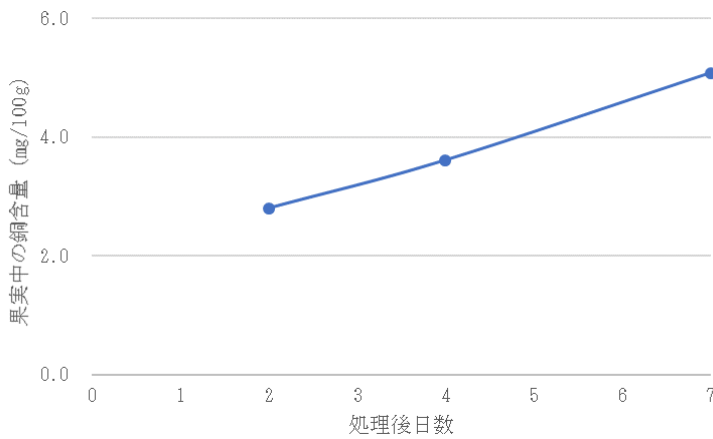


図7 シャインマスカット果実中の銅含量の推移

ま と め

鶏肉や果汁を対象に種々の処理条件下における殺菌効果等を検証した結果、以下のことが分かった。

1. 鶏肉汚染菌に対して十分な殺菌効果を発揮するには、カンピロバクター属菌と大腸菌では 300 MPa 以上、黄色ブドウ球菌では 500 MPa 以上の加圧が必要であった。
2. 河内晩柑果汁では、pH を 4.0 以下に調整することで、大腸菌に対して高圧処理による殺菌効果を高めることができると考えられる。
3. 河内晩柑果汁の pH を下げることで、黄色ブドウ球菌に対して高圧処理による殺菌効果を大きく高めることができると考えられる。
4. みかん果汁の腐敗を発生させ得る菌 (*Fusarium pseudoanthophilum*、*Pichia cecembensis*、*Muchor phayaoensis*) に対して、600MPa の高圧処理によって加熱殺菌と同等の殺菌効果が得られた。
5. 高圧処理の過程でキウイフルーツの軟化が発生するが、強化剤を使用することで一定程度硬さを維持する効果があった。
6. 果実と銅酵母液を同封して高圧処理を行い、緑色保持を図った場合、徐々に果実中の銅含量が増加するため、製造する食品中の銅含量への留意点をまとめることができた。

文 献

- 1) 古川一郎, 伊達佳美, 相川勝弘, 浅井良夫, 尾上洋一: 市販鶏肉におけるカンピロバクター・ジェジュニの汚染状況および分離菌株の解析, 神奈川県衛生研究所研究報告, **37**, 24-27 (2007)
- 2) 安川章, 外村佳子, 北瀬照代, 伊藤重朗, 西村頼之: 市販食肉の細菌汚染について, 生活衛生, **18-5**, 150-155 (1974)
- 3) 所光男, 亀山芳彦, 北川裕子, 堀ゆかり, 野田紅人, 奥村直尊, 岩田好博, 熊崎孝雄: 岐阜県における食鳥肉の微生物汚染の現状, 食品と微生物, **10-2**, 89-94 (1993)
- 4) 朝倉将斗, 開俊夫: 高圧処理による殺菌技術の開発ー緑色果実及び鶏肉への高圧加工の影響ー, 愛媛県産業技術研究所研究報告, **62**, 60-65 (2024).
- 5) 厚生労働省: 「日本人の食事摂取基準 (2020 年版)」策定検討会報告書 (2019).