

アサマ
NEWS

パート

2011-9 NO. 144

バイキン博士の衛生雑談

凍結と微生物

1. 低温での微生物増殖の限界

細菌がどの温度で増殖しなくなるか、ということは、古くから問題にされてきた。

0℃に保存してピンク～赤に着色したカキから分離した酵母が、サブロー培地に-34.4℃で増殖し、コロニーをつくったという報告がある (McCormack, 1950年) (資料1)。McCormackのピンクイーストと呼ばれるもので、追試はされていない。-34.4℃では培地は凍結しているので、その中で増殖したということには疑問が残るけれども、凍結を妨げれば、酵母などではかなり低温でも増殖する可能性はあるだろう。

細菌については-10℃前後が増殖温度の下限だろうと一般的には考えられている。中温細菌・高温細菌とされている好気性胞子細菌についても、凍結さえ防げば-10℃で増殖する。もっともその速度は極めて遅いけれども。

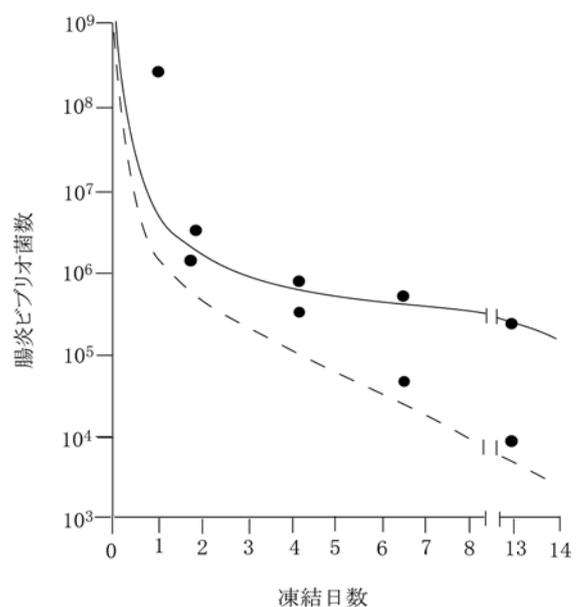
2. 凍結による微生物の死滅

体の水が凍結すれば、微生物の増殖は止まり、徐々にあるいは急速に死滅の過程をたどる。死滅の速度は、微生物の種類により、また、凍結の条件によって異なる。一般にグラム陰性細菌はグラム陽性細菌よりも凍結に弱い。とくに腸炎ビブリオは凍結によって速やかに死滅する。

図1は、腸炎ビブリオをカキのホモジェネートに混ぜて凍結・保存し、選択性の強い培養基 (TCBS) と弱い培養基 (TSA 培地に3%食塩を加えた培養基) で生き残る細菌を計数した結果である。(B. Ray et al., 1978) (資料2)。

-20℃での凍結保存中、4, 5日で菌数が3桁ほど下がっている。TCBS 培地ではさらに大きく減少している。これは、凍結により細胞が損傷を受け、選択性の強い培地には増殖できない状態にあるためである。凍結魚介類から、腸炎ビブリオを検出する際には、したがって、凍結障害を回復するために、選択性のない培地で、予備的に培養することが必要である。

図1. 凍結 (-20℃) による腸炎ビブリオの死滅
実線は非選択培地、破線は選択培地での計数



凍結による細菌の死滅は、細菌の種類・菌株によって差があるばかりではなく、凍結するさいの条件によって大きく変わるので、一般化することは難しい。しかし、極めておおざっぱに言えば、グラム陰性細菌は凍結することによって数日の間に1-2桁の生菌数減少があり、一方、グラム陽性細菌では50%から90% (1桁) の減少にとどまる。

細菌胞子は凍結に対して強く、-20℃前後の温度でも、1桁下がるのに数ヶ月、あるいは数年の時間がかかる。

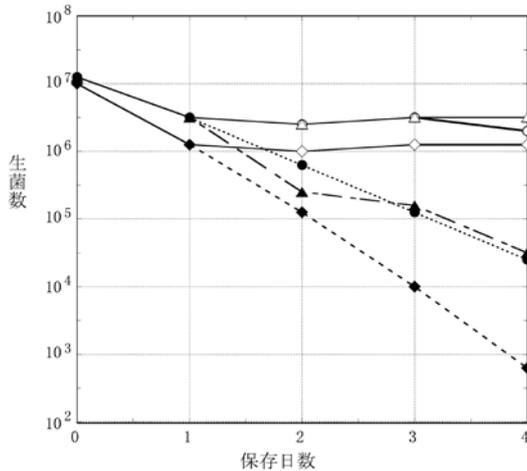
3. 凍結・融解の繰り返し

凍結による細菌の死滅は、凍結の過程、また融解の過程で著しい。しかし、いったん凍結されると、その後一定の温度で保存されている間は緩やかな死滅に変わる。ただし、氷点下-1℃から-5℃程度の温度帯では、速く死滅する。

したがって、凍結・融解を繰り返すと微生物は急速に死滅する。

図2は病原大腸菌 O157:H7 の3つの菌株をペプトン水中で凍結(-20±2℃),そのまま4日間保存したとき,および毎日凍結・融解を繰り返しながら保存したときの死滅の様子を示したものである(Yamamoto & Harris, 2001のデータから作図)(資料3).

図2. 凍結と融解の繰り返しによる病原大腸菌 O157:H7の死滅



4. 急速凍結と緩慢凍結

微生物を凍結する際,冷却速度の大小,すなわち,急速に冷却するか,緩やかに冷却するかによって,死滅率に大きな差のあることも,以前から知られている。

この問題は,食品の凍結保存という,実用的な問題とも関係している。

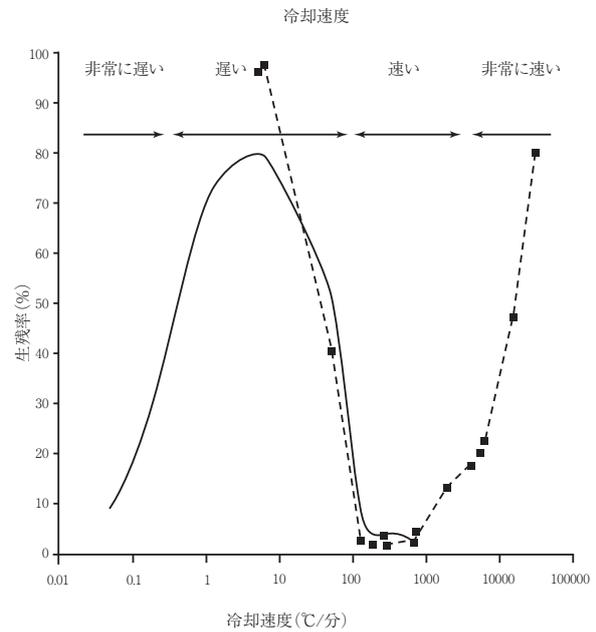
図3に示したのは,酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)について,冷却速度と生残率を示したものである(Dumont et al., 2003 図3から)(資料4)。図にみるように凍結速度と死滅との関係は極めて複雑である。しかし,冷却速度を速めて,毎分100-1000℃にすると酵母の生残率が落ちている。同じような現象は,大腸菌についてもみられる。しかし,食品では急速凍結といっても,その冷却速度はせいぜい毎分1℃程度なので,冷却速度を速くして細菌を殺すというのは無理である。

凍結した微生物の融解についても,融解速度との関係が研究されている。非常に速い冷却速度で凍らせ,細胞内部に氷晶ができていたような細胞では,緩慢な融解で細胞は損傷を受け,生残率が低下する。しかし,食品に使われているような,凍結・融解の速度範囲では,融解の速度が微生物の生残率に大きな影響を与えることはない。

5. 超低温での微生物

どの温度から下を超低温と呼ぶかは,人により様々で,また,冷凍機器の発達の段階によっても異なっている。現在でも決まった定義はないけれども,-50℃以下を便宜的に超低温と呼ぼう。

図3. 異なる冷却速度で凍結したさいの,酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の生残率。点線はDumont et al., 2003, 実線はMazur, 1961のデータから



この温度では,微生物の死滅は極めて緩やかである。このことは微生物の保存の方法として-50℃,-80℃の超低温冷蔵庫での保存,あるいは-196℃の液体窒素中での保存が行われていることによっても分かる。微生物菌株を維持するために,以前は液体窒素中で保存することが一般的だったけれども,操作が面倒であり,冷凍技術の進展によって,-50℃或いは-80度のフリーザーが多く用いられるようになった。

6. 凍結によって,なぜ微生物は死ぬか

凍結によって細菌が死滅する原因については,少なくとも5つのメカニズムが考慮されてきた

1. 膜の損傷:凍結による細胞膜の損傷によって塩・アミノ酸などの低分子物質だけでなく,ペプチド,多くの酵素を含むタンパク質が細胞外へもれる。また,外部からも様々な物質が流入し,これらによって,細菌の生理機能は著しく損なわれる。

2. 氷晶の生成による細胞の物理的な損傷:凍結中,細胞内外の水が凍り,細胞膜を傷つける。とくに細胞内にてできる氷晶の害が大きいと言われる。

3. 細胞液の濃縮:ふつう,細菌細胞内の浸透圧は細胞外液(水・培養基)よりも高いので,細胞内よりも外部の液がまず凍る。氷が析出すると,外液は濃縮され,浸透圧が高くなる。そのため,細胞膜を通して,水が外に流出する。結果として,細菌の細胞は脱水状態になる。

4. 代謝の障害

5. DNAの損傷:凍結・融解によってDNAが損傷を受ける。DNAに対する損傷はもちろん微生物にとっては致命的であり,この損傷が修復できなければ,細菌は死を免れない。

このようないくつかの説の中で、どれが正しいかは、現在の所、まだ明らかではない。また、1から5までの原因は、それぞれ相反するものでもない。たとえば、細胞内の氷晶、細胞の濃縮、さらに膜を通しての物質の出入りなどが、DNAの不可逆的な損傷を招く、というような筋書きも描けるだろう。

(清水 潮 元東京大学・広島大学教授)

資料

- McCormack, G. 1950: "Pink yeast" isolated from oysters grows at temperatures below freezing. *Comm. Fisheries Rev.* 12: 28
- Ray, B. et al. 1978: Method for the Detection of Injured *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 1121-1127.
- Yamamoto, S. A. and L.J. Harris 2001: The effects of freezing and thawing on the survival of *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 67: 89-96.
- Dumont, F. et al. 2003: Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rate. *Cryobiology* 46: 33-42

食品加工と微生物

容器包装食品のガス膨張

食品は土壌、水、空中など自然環境からの微生物汚染、食品工場における原料処理・加工あるいは流通過程から微生物汚染を生じる。ときには、食中毒菌が汚染し、増殖することにより、ヒトの健康を損ねるなどの大きな被害を与えることもある。したがって、食品の微生物管理を行っていくには食品を汚染する微生物の性質を良く理解し、それに対応した対策を選択することが大切である。

農産加工食品の変敗事例を表1に示したが、なかでも非加熱農産加工品の調味液の濁りの発生や酸敗、袋詰め品のガス膨張などが良くみられる。非加熱農産加工品の変敗に関与している微生物のほとんどは原料野菜に由来しているもので、製造直後はシェードモナス (*Pseudomonas*) 属菌などのグラム陰性菌が多い傾向がみられる。保存経過にしたがい、乳酸菌の増殖がみられるようになり、酵母も出現するようになる。これらの微生物の増殖によって調味液の白濁化、酸度の上昇、野菜の退色が生じ、結果的に風味の低下を招くことになる。

ガス膨張は、小袋包装、カップ詰、あるいは瓶詰された製品がガス生成によって膨張し商品性を損ねる場合で、比較的クレームの多い事例である。ガス膨張が激しい場合には、容器が破損し、内部の調味液が外に漏洩することもまれではない。その結果、他の正常品まで汚染し、被害が拡大することになる。ガス生成による容器包装食品の膨張原因は様々であるが、その多くは酵母である。通常、酵母のアルコール発酵にともなう炭酸ガスの生成によって生じるもので、その他には乳酸菌が原因となる場合もある。今回は、食品に見られるガス膨張の原因、

今回はその対策について述べる。

表1 農産加工食品の主な変敗とその原因菌

変敗の状態	主な原因微生物
調味液の濁り	乳酸菌、大腸菌群、 <i>Pseudomonas</i> 、 <i>Flavobacterium</i>
酸敗	乳酸菌、酢酸菌、 <i>Bacillus</i>
酢酸臭の発生	<i>Clostridium</i>
粘性化	<i>Pseudomonas</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Leuconostoc</i>
変色	<i>Pseudomonas</i> 、 <i>Micrococcus</i> 、 <i>Alcaligenes</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Candida</i>
着色	<i>Micrococcus</i> 、 <i>Rhodotorula</i> 、 <i>Halobacterium</i>
軟化	<i>Erwinia</i> 、 <i>Pseudomonas</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Penicillium</i> 、 <i>Cladosporium</i>
ガス膨張	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 、 <i>Lactobacillus brevis</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Saccharomyces</i> 、 <i>Zygosaccharomyces</i>
産膜	<i>Debaryomyces</i> 、 <i>Pichia</i> 、 <i>Kloeckella</i> 、 <i>Candida</i>
酢酸エチルの生成	<i>Hansenella</i>

1. ガス膨張と主な原因

食品に見られるガス膨張の中で、一般的な事例と主なガス膨張原因微生物を表2に示した。表からも明らかのように、食品のガス膨張のほとんどは微生物によるもので、加熱殺菌が不十分なものと非加熱食品の場合に生じる。ガス膨張の原因微生物は、味噌、ソース、漬物、つゆ・たれ類のように食塩や糖濃度が比較的高いので、浸透圧が高い言い換えれば水分活性が低い食品の場合は、細菌の増殖は困難となるので酵母による場合がほとんどとなる。酵母が原因となるガス膨張は急激なガスの生成がみられ、容器が変形したり、破損を起こすほどの大量のガスが生成されることが特徴である。原因となる酵母は *Saccharomyces* 属、*Candida* 属が多いが、食塩あるいは糖濃度が高い食品の場合は、*Zygosaccharomyces* 属のような耐塩性酵母が原因となることが多い。また、らっきょう漬やドレッシングのように酸濃度が高い食品の場合は、食塩濃度が低いのでガス膨張を生じる可能性があるが、細菌の生育は抑制されるので、乳酸菌による膨張は起こりにくい。しかし、酵母によるガス膨張を引き起こす可能性がある。

キムチなどは味噌やソース類などと異なり水分活性が高いものが多い。したがって、ガス膨張の原因は酵母以外に乳酸菌が関与している場合がしばしば見られる。このように乳酸菌が原因となって膨張がみられる食品は、加熱殺菌が不十分なものと非加熱の容器包装食品で生じることが多い。酵母は加熱に対して比較的弱いので殺菌され易いが、乳酸菌は加熱に対して抵抗性がみられるので加熱殺菌が不十分な場合は乳酸菌が生残り、それらの増殖によってガス膨張を引き起こすからである。ガス生成を行う乳酸菌は、ヘテロ(異型)乳酸発酵菌で、代表的なものは球菌の *Leuconostoc* 属菌、桿菌では *Lactobacillus brevis* などがある。乳酸菌によるガス膨張は酵母の場合と異なり、徐々にガスの生成が行われることが多いのが特徴である。キムチのように非加熱の漬物製品の場合は、酵母と乳酸菌が同時に生育する機会が多いのでガス膨張は乳酸菌と酵母が複合することによって起こる場合もある。

表2 ガス膨張を起こす容器包装食品事例と主な原因微生物

容器包装食品	主なガス膨張原因微生物
しょうゆ漬、刻み漬、キムチ、 トマトケチャップ	酵母 (<i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> など) 乳酸菌 (<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i>)
味噌、ソース、ドレッシング、 つゆ・たれ類	酵母 (<i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> など)
和洋生菓子類	酵母 (<i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> など)
飲料	酵母 (<i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> など)
牛乳・乳製品など	大腸菌群, <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , 酵母
缶詰	<i>Clostridium</i> など
ソーセージ・魚肉ソーセージ類	<i>Bacillus polymyxa</i> など

ガス膨張の多くは表3で示すようにアルコール発酵、ヘテロ乳酸発酵、ブタノール・アセトン発酵など、炭水化物の発酵により、エタノール、乳酸、酢酸、ブタノール、プロピオン酸などの生成にともなって生成するガスである。ガスとしては炭酸ガスの場合が多いが、水素の生成もみられる。表2, 3からも明らかのように、酵母や乳酸菌が原因となる場合がほとんどであるが、これら以外の微生物が原因となる場合もある。牛乳が変敗すると「ガス乳」と呼ばれる現象が起こることがある。これは、大腸菌群、*Clostridium* 属、*Bacillus* 属、酵母などが原因となって起こる。また、魚肉ソーセージのガス膨張は主に *Bacillus polymyxa* によるもので、缶詰の場合は *Clostridium* 属によるものであることが多い。

表3 主なガス膨張型式と原因微生物

発酵型式	主な生成ガス	他の生成物質	主要な原因微生物
アルコール発酵	炭酸ガス	エタノール	酵母、カビ、細菌 (<i>Zymomonas</i>) など
ヘテロ (異型) 乳酸発酵	炭酸ガス	乳酸、酢酸、ギ酸、エタノール	乳酸菌 (<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i>) の一部など
混合酸発酵	炭酸ガス 水素	乳酸、酢酸、ギ酸、エタノール	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Erwinia</i> など
ブチレングライコール発酵	炭酸ガス 水素	2, 3-ブチレングライコール、乳酸、酢酸、ギ酸、エタノール	<i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> など
酪酸、ブタノール・アセトン発酵	炭酸ガス 水素	酪酸、酢酸、ブタノール、エタノール、アセトン、イソプロパノール	<i>Clostridium</i> の一部、 <i>Bacillus macerans</i> など
プロピオン酸発酵	炭酸ガス	プロピオン酸、酢酸	<i>Propionibacterium</i> など

ようであれば原因菌は細菌であり、乳酸菌や *Bacillus* 属菌、*Clostridium* 属菌であることが予想される。一方、酵母が原因菌と推定される場合は、加熱温度・時間などの条件について検討を行い、適正な加熱殺菌方法を設定することが必要となる。また、加熱殺菌条件は適正であっても包装容器のシールミスによって密閉が不十分な場合やピンホールを生じた場合は冷却処理中に外部の酵母が容器内に吸引され、後に酵母が増殖することによってガス膨張を起こす例もみられる。このような場合は、関連する機器類の調整を行うことが必要となる。

非加熱の食品の中でも浸透圧が高い (水分活性が低い) 場合は、細菌の生育は抑制されるため、ガス膨張の原因の多くは酵母である。したがって、エタノールなどを用いることによって浸透圧を高めに設定するか、あるいは有機酸を用いて、酸濃度を高めることによって、ガス膨張を抑制することが必要となる。しかし、食塩や糖類を使用して浸透圧を高めることや有機酸を加えることが味覚上困難な場合は、酵母やガス生成を行う乳酸菌、耐熱性芽胞菌に対して抗菌力を有する保存性向上物質を加えることが必要となる。一方、キムチや浅漬のように低塩で非加熱食品の場合は、浸透圧も低いので乳酸菌や酵母、さらには、その他の微生物が容易に増殖する。したがって、それらの微生物が複合的にガス膨張を起こしており、その場合には、低温保存を行うとともに乳酸菌や酵母に対して抗菌性を有する物質の添加を考慮する必要がある。

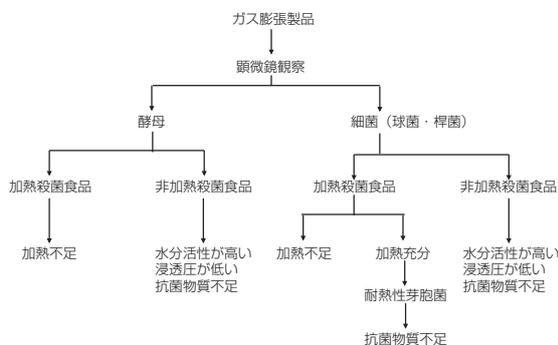


図1 ガス膨張原因の推定

(宮尾茂雄 東京家政大学教授)

2. ガス膨張原因菌の推定

ガス膨張対策を行うには膨張原因菌を明らかにすることが必要であるが、そのためには図1で示すような方法で原因菌を絞り込むことができる。加熱を行った食品であるにもかかわらず、何らかの事故で殺菌がうまく行えなかった食品の場合は、はじめにガス膨張を起こしている食品の一部を採取し、顕微鏡で観察する。特徴的な酵母が多数観察されるようであれば膨張原因は酵母であることが推定される。また、多数の球菌や桿菌が見られる

アサマ化成株式会社

E-mail : asm@asama-chemical.co.jp
<http://www.asama-chemical.co.jp>

●本社 / 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町20-3 TEL (03)3661-6282 FAX (03)3661-6285
 ●大阪営業所 / 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-6-13 御幸ビル TEL (06)6305-2854 FAX (06)6305-2889
 ●東京アサマ化成 / 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町16-5 TEL (03)3666-5841 FAX (03)3667-6854
 ●中部アサマ化成 / 〒453-0063 名古屋市千川区東宿町2-28-1 TEL (052)413-4020 FAX (052)419-2830
 ●九州アサマ化成 / 〒811-1311 福岡市南区横手2-32-11 TEL (092)582-5295 FAX (092)582-5304
 ●桜陽化成 / 〒006-1815 札幌市手稲区前田五条9-8-18 TEL (011)683-5052 FAX (011)694-3061