

細菌の高圧不活性化における損傷・回復

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	山本,和貴 木村,啓太郎 稲岡,隆史 森松,和也 中浦,嘉子
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	65巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 154-162
発行年月	2018年3月

シリーズ特集「損傷菌」

解説

細菌の高圧不活性化における損傷・回復

山本和貴^{1*}, 木村啓太郎¹, 稲岡隆史¹, 森松和也², 中浦嘉子¹

¹ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

² 国立大学法人愛媛大学大学院農学研究科

Injury and Recovery in Bacterial Inactivation Induced by High Hydrostatic Pressure

Kazutaka Yamamoto^{1*}, Keitarou Kimura¹, Takashi Inaoka¹,

Kazuya Morimatsu² and Yoshiko Nakaura¹

¹ Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

² Graduate School of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566

Food processing by high hydrostatic pressure (HHP) has several characteristic aspects, including homogeneous and almost spontaneous transmission of pressure; inactivation of viruses and microbes; suppressed deterioration of nutrients, flavors, and pigments; denaturation of food biopolymers such as proteins and starch; enhanced liquid impregnation and air bubble dissolution; and shucking of bivalves and crustaceans. Among these, microbial inactivation has been intensively studied for practical applications in processing agricultural produce with minimal quality loss and reduced risk of pathogenic and/or spoilage microbes, especially bacteria. HHP treatment, as well as other intervention technologies, may inactivate bacteria lethally and sublethally. However, sublethal inactivation of bacteria has not been elucidated sufficiently. This paper reviews bacterial inactivation by HHP with a focus on bacterial injury and recovery.

(Accepted Dec. 12, 2017)

Keywords : high hydrostatic pressure, bacteria, injury, recovery, inactivation

キーワード : 高圧, 細菌, 損傷, 回復, 不活性化

1. はじめに

食品加工においては、熱的加工と非熱的加工とがあり、非熱的加工の一つが、食品高圧加工 (high pressure food processing)¹⁾ である。高圧加工には、爆破、衝撃波等により極めて短い時間で高圧力を印加する動的な高圧加工 (high dynamic pressure processing) と、徐々に圧縮した後に高圧力を比較的長い時間印加する静的な高圧加工 (high static pressure processing) とがある。水が圧力媒体として用いられ、食品産業界で実用化されている後者は、特に、高静水圧加工 (high hydrostatic pressure processing) と呼ばれる。高圧加工を簡略的に「HPP (high pressure processing)」と呼ぶ場合もあるが、近年は、衝撃波による食品加工技術²⁾ も出現しているので、高静水圧加工との区別に注意する必要がある。

食品高圧加工は、実用化提言³⁾ 以降、1990 年の高圧加工ジャム⁴⁾ 実用化を契機として発展し、処理技術としては成

熟しつつある。しかしながら、熱加工技術と比べると、未解明な現象が多い一方で、その分期待も高く、それ故に解決すべき課題も多い。食品製造においては、加熱、冷却、凍結等の熱加工技術でなければならないこともあり、一方、高圧加工技術でしかできないこともあるので、それぞれの特徴を理解する必要がある。

基礎および応用の両面から着目されてきた食品高圧加工の特徴は、均一かつ瞬時の圧力伝達、ウイルス・微生物の不活性化、栄養成分・香気成分・色素成分の損耗抑制、食品高分子 (澱粉、蛋白質等) の変性、液体含浸および気泡分散の促進、貝類・甲殻類の開脱殻等である⁵⁾。この中で、当初から重要視されているのが、鮮度低下を抑えつつ農畜水産物の加工を行う際の微生物不活性化であり、とりわけ産業的に重要なのは、食中毒または腐敗の原因となる細菌の不活性化である。

本稿では、食品高圧加工における衛生確保の視点で細菌不活性化を概観し、細菌の損傷および回復の特性に焦点を

¹ 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12, ² 〒790-8566 愛媛県松山市樽味 3-5-7

*連絡先 (Corresponding author), kazutaka@affrc.go.jp

当てて解説する。

2. 高圧処理における細菌不活性化因子

従来型の食品加工においては、熱的操作により細菌を不活性化する。一方、非熱的操作の一つである高圧処理においては、処理圧力 600 MPa での高圧処理が一般的であり¹⁾、細菌を始めとする微生物の他に、ウイルスの不活性化が可能である。高圧処理による微生物不活性化の要因としては、蛋白質変性および細胞膜損傷がある⁶⁾。これらは、細菌細胞内外の化学反応が抑制されながらも、細胞内の特殊な環境にある生体高分子内/間に水が浸入⁷⁾し、水和が促進されて起きると考えられる。その結果として、蛋白質の解離・変性、脂質の相転移、DNA の構造変化等が誘導され、これら生体成分の変化を一つの契機として、微生物細胞の活性が低下する。ストレス水準に応じて、細胞は、亜致死的不活性化により損傷する、あるいは致死的不活性化により死滅すると考える。

以下、これら因子について、個別に概説する。

2-1 化学反応

食品を熱処理で加熱することにより、色素成分、香気成分等の加熱生成物が生じたり、分子結合が切れて有用成分が失われたりする等、様々な化学反応が起きる。これは、分子運動が活発になることで、化学反応が促進されるからである。加熱生成物は、Maillard (註:「マイヤール」と書くのが原語の仏語に近い。) 反応により、独特な風味および色合いの元となるし、それは時として、加熱臭として不快な臭いを発する原因になる。また、活発な分子運動の結果として、蛋白質のような巨大分子では、分子内・分子間の水素結合等が切断され、元の立体構造が崩れて変性が起こる。

高圧処理においては、分子運動が抑制されるため、一部の例外を除き、化学反応は原則的には促進されない。よって、農畜水産物の新鮮な風味の低下を最小限にする加工が可能である。生体高分子の分子内・分子間の水素結合等の「分子運動に起因する」切断に限ってはむしろ抑制の方向に働くと考えられるが、高圧処理による密度最大化の効果と併せて考える必要がある。

2-2 密度最大化

熱処理では、温度が高い程分子運動が活発になるので、密度は低下する。一方、高圧処理では、分子運動抑制効果よりも、圧縮による密度最大化(体積最小化)効果が勝り、生体高分子の巨視的・微視的な物理的变化が起こることができると考えることができる。例えば、高圧処理により、巨視的には、気泡分散系で気体が液体に溶解する均一化により密度が最大化して気泡が消失し、微視的には、分子内もしくは分子間にある空隙を埋めるように水が浸入しつつ生体高分子が詰め込まれて密度が最大化する。

これらは、澱粉を例に考えると理解しやすい。澱粉は、

グルコースから構成される高分子のアミロースおよびアミロペクチンが主成分であるが、主としてアミロペクチンがその結晶性に寄与する。澱粉は、十分量の水がある条件では、熱糊化または圧力糊化しうる。熱糊化では、加熱により水および澱粉分子の分子運動が活発になり、アミロペクチン結晶が水和して解れ、熱糊化する。一方、高圧処理では、分子運動が抑制される一方で、密度が高いアミロペクチン結晶と密度が低い十分量の水とが、全体として密度が最大となるように圧縮され、水が分子内・分子間に浸入して結晶を水和して解し、圧力糊化⁸⁾すると考えられる。

2-3 分子クラウディング

高圧処理においては、密度の視点が極めて重要になることから、分子クラウディング⁹⁾の影響も考慮しなければならない。

生化学実験で取り扱う生体分子の濃度は、高々 1~10 mg/ml 程度であり、分子量 1 万を想定すると、0.1~1 mM の希薄系である。一方、細胞内では DNA、蛋白質等の様々な生体分子および構造体が密に詰め込まれ、300~400 mg/ml に達し、希薄系より数十倍密な濃厚系とされる。このような状態が、細胞内での生体分子の存在状態であり、分子クラウディング (molecular crowding) である。希薄溶液系とは全く異なる濃厚状態では、分子クラウディングによる立体障害のため、生体分子の占有体積が大幅に減少して分子活性が増加する一方で、分子の運動および構造が制約を受ける。それ故、均一希薄水溶液では影響が弱い弱い相互作用でも重要な役割を担う。また、分子の拡散速度は大きく低下し、生体分子の結合反応・化学反応の速度が低下する可能性もある。更に、希薄系の主成分である水以外の分子が多く存在するため、生体分子を囲む溶媒の性質も大きく変化する。分子の占有体積、活性、拡散速度、溶媒の性質等がそれぞれ変化し、生体分子のフォールディング、分子間相互作用における熱力学的安定性および反応速度が影響を受ける。よって、希薄系での高圧処理実験の結果を、分子クラウディングの状態にある細胞内の現象にそのまま置き換えて考えることはできない。分子クラウディングの状態を再現しつつ高圧処理の影響を調べる場合には、クラウディング剤(例: ポリエチレングリコール、親水性多分岐中性多糖 Ficoll、アルブミン)を利用する方法がある。

2-4 蛋白質

熱処理においては、分子運動の活発化による蛋白質の解離・変性があり、高次構造が破壊され、最終的にはランダムコイルになる。このような蛋白質の解離・変性により、酵素活性が失われたり、受容体が機能しなくなったりすることがある。また、過度な加熱では、分子の切断による一次構造変化を想定することもある。

高圧処理においては、分子運動が低下する一方で、密度最大化による水和が重要と考えられる。蛋白質内または蛋

白質間の疎水/静電相互作用は、圧力に感受性が高いため、三次構造または四次構造が破壊されて変性するとされるが、この効果は蛋白質の種類に依存する¹⁰⁾¹¹⁾。その際、化学反応が抑制されているので、分子運動に起因した分子断片化が起こることはないと考えられる。

蛋白質の変性は¹²⁾、熱変性または高圧変性のいずれの場合でも、単純系では可逆とされるが、複雑系である食品では、変性後に各種成分と相互作用することにより、不可逆となりうることに注意が必要である。

2-5 膜

生体膜を構成するリン脂質は、圧力が高い程、相転移温度が上昇する傾向がある¹³⁾。つまり、高圧下では、常圧下よりも高い温度で転移するので、リン脂質で構成される膜は安定化すると考えることができる。

一方、常圧から高圧領域にまで加圧すると、密度最大化のために、細胞質は圧縮されて若干小さくなり、それを取り巻く膜は、分子間隙が最小化して密になると考えられる。また、脂質と膜蛋白質とでの圧縮率の違いに起因して相分離が起こる¹⁴⁾¹⁵⁾。減圧時には、細胞質が膨張し、周囲の引き締まった膜を圧迫するのが原因であろうか、細胞膜が損傷を受けることがある。死菌では、細胞膜透過性の無い蛍光試薬が損傷した膜を透過して細胞内に達するので、細胞膜透過性が有り生細胞および死細胞の両者を染色する蛍光試薬と併用することにより、膜損傷の程度を調べることができる¹⁶⁾。

2-6 DNA

細胞中で、DNAが標準的 (canonical) な二重鎖構造以外に、非標準的 (noncanonical) 構造としての三重・四重鎖構造を形成することを考慮する必要がある¹⁷⁾¹⁸⁾。これら非標準的構造の形成によって、遺伝子の転写制御が行われることがあり、テロメアの伸長制御にも関与しているとされる¹⁸⁾。希薄系では標準的な二重鎖構造が安定であっても、細胞内での分子クラウディング状態では、非標準的構造が安定になりうる。また、分子クラウディング状態にあっても、高圧処理によって、DNAの非標準的構造が壊れて、標準的構造の二重鎖に戻りうる。この他にも、DNAもしくはRNAと制御蛋白質との相互作用、DNA・RNA合成に関与する酵素の高次構造破壊等、高圧処理によって、遺伝子発現制御に影響があることにも着目すべきである。

2-7 酸化ストレス

高圧処理は、細菌の細胞膜損傷と、その他の速い未知反応とを惹き起こし、致死的不活性化に繋がると考えられる。酸素存在下で細菌を高圧処理すると、損傷した膜の酸化酵素 (oxidase) によって活性酸素種が生成するため、酸化ストレスとなる¹⁹⁾。活性酸素消去能がある物質として、ピルビン酸、カタラーゼ、 α -ケトグルタル酸等が知られるが、例えば、ピルビン酸は、致死的不活性化効果を抑制し、高圧損傷菌の回復を促進する¹⁶⁾。

3. 食品高圧加工による微生物の不活性化²⁰⁾

食品高圧加工により、細菌を始めとする微生物を不活性化するには、上記の不活性化因子が関与しうることを踏まえて、食品安全性確保に努める必要がある。以下、食品高圧加工の各場面、各視点において配慮すべき事項について述べる。

3-1 食品高圧加工に独自の視点

食品高圧加工によって十分な生物学的リスクの低減ができたとしても、原材料に、基準値以上の物理的・化学的ハザードが含まれていては意味を成さない。また、殺菌等による十分なリスク低減を達成するためには、原材料ができる限り清浄でなくてはならない。そのためには、食品原料に付着する家畜糞便等の洗浄、収穫、保管、切断等の操作に用いる装置、器具の消毒等に十分に配慮した上で、できる限り清浄な原料を密封包装し、介入技術の一つである高圧加工に供して、殺菌 (もしくは可能であれば滅菌) する必要がある。

生物学的リスクとして最も重要なものは微生物であり、特に細菌の不活性化についての研究は、1899年²¹⁾以降、食品高圧科学に於いて最も歴史が長く、食品高圧加工が実用化して以降、知見が飛躍的に増大した。細菌の中には、病原性細菌と腐敗細菌とがあるが、いずれもが加工時の殺菌対象であり、特に病原性細菌についての研究事例が多い。一方、黴 (カビ)、酵母については、これらが品質劣化に関与するのは勿論であるが、黴毒生産等による健康被害に直ちに繋がる事例が少ないため、知見が限られている。

微生物またはウイルスの不活性化の評価において、注意すべきことは、その効果が、生物種、細胞の形状・状態、食品マトリックス、検出手法、装置、その他の影響を受けるということである。

高圧処理による微生物不活性化においては、凡そではあるが、耐圧性が芽胞>グラム陽性菌>グラム陰性菌・酵母・カビの順に高く、これは、熱処理における傾向と類似している²²⁾。細菌の形状については、棒状の桿菌が圧力に最も弱く、球菌が最も強いという傾向²³⁾もあり、確かに *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌; グラム陽性) の耐圧性は高い²⁴⁾が、例外はある。細菌の状態によっても耐圧性が異なり、定常期の細菌の方が、対数増殖期のものよりも、耐圧性が高い²⁵⁾。また、これらを含む食品マトリックスに糖質、蛋白質等が多く含まれると、微生物は不活性化し難い傾向があり、これら共存成分以外にも、pH、水分活性、浸透圧等の影響を受ける。損傷菌の検出時に、選択培地と非選択培地とを用いて差分を求める場合があるが、健常菌であっても条件により検出菌数が異なりうる。更に、高圧処理装置の圧力校正、容器形状および容器内試料設置位置、水以外の圧力媒体の利用等によって、時には実験結果に大きな差異が生じることもあるので、異なる実験系で得られ

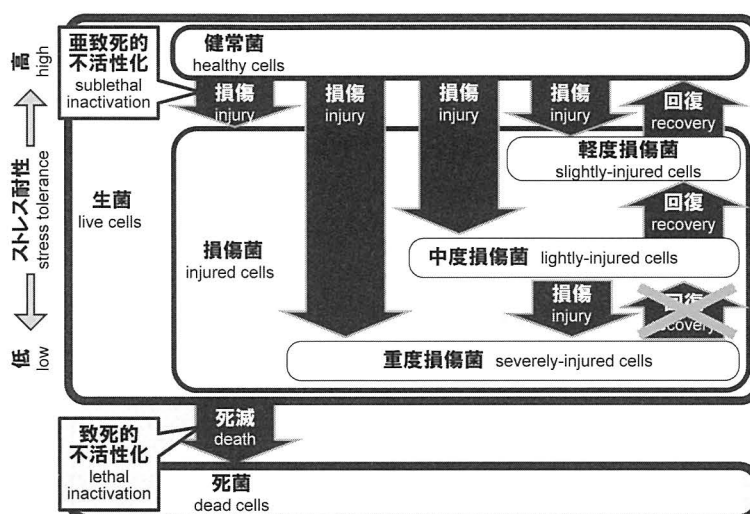


Fig. 1 Conceptual diagram for healthy, injured, and dead cells of bacteria²⁰⁾

The concept by Tsuchido²⁶⁾ has been modified by adding a concept of lightly-injured cells between slightly- and severely-injured cells.

たデータの直接比較には注意が必要である。実験室によっては、零度以下での実験を想定してエタノールを圧力媒体として用いることがあるが、エタノールは圧縮率が水より遥かに高いので、断熱昇圧/減圧時の加熱/冷却の影響が大きい。

3-2 高圧損傷

健全な細菌（健全菌）にストレスを与えると、それが強度であれば死滅して死菌となり、そうでなければ損傷して損傷菌となることが知られている。損傷菌は、その損傷程度に応じて、軽度損傷菌（亜致死損傷菌）および重度損傷菌（致死損傷菌）となること、狭義の損傷菌は軽度損傷菌であり、広義の損傷菌は、「修復前には準安定または不安定な状態にあり、ストレスの程度やその後の保存条件によってその生存が左右され、従って培養の可否もその結果として決まる」ものとして、前者および後者を含めて「半致死損傷菌」とする考え方がある²⁶⁾。また、「中度損傷菌」の概念を加え、「準安定または不安定な状態」にある中度損傷菌が、軽度損傷菌に回復したり、損傷が進んで重度損傷菌となって死滅したりする考え方もある（Fig. 1）²⁰⁾。今後の検証により、損傷菌の考え方を更に精査する必要があるかも知れない。

次亜塩素酸処理、超音波処理、両性界面活性剤処理、電子線処理等と、熱処理とを、逐次または同時に組み合わせることによって、健全菌が軽度損傷菌または重度損傷菌を経て死滅する過程は、土戸らによって纏められている²⁷⁾。

高圧処理によっても損傷菌は発生する²⁸⁾。具体的には、例えば、 $8 \log \text{CFU/ml}$ 程度の大腸菌を高圧処理（500-600 MPa, 25℃, 10 分間）すると、処理後には検出できなくなるが、その後異なる保存温度で静置する間に、回復したり、死滅したりすることが示されている（Fig. 2）²⁹⁾。また、

牛乳に接種したリステリア属菌は、高圧処理（550 MPa, 25℃, 5 分間）後には検出されないが、異なる保存温度で静置する間に、やはり回復したり死滅したりする。37℃, 40℃, 45℃, 50℃と保存温度が高い程、それぞれ4時間、3時間、1時間、5分間以上、静置すれば死滅し、それより短い静置時間では回復する（Fig. 3）³⁰⁾。

大腸菌を含め、各種細菌の数を評価するために平板培養法が従来から広く使われている。細菌を含む液体を希釈し、寒天培地表面に塗布するか、あるいは温かい寒天培地液と混釈するかして、多くの場合は35℃近傍に設定した培養器で1日以上培養し、細胞一つが増殖してコロニーとして肉眼で見えるようになってから計数する。

損傷菌の検出では、選択培地と非選択培地との両方で平板培養法により計数し、その差を議論することが多い。ストレスが高い選択培地には健全菌しか生えないが、栄養豊富な非選択培地には健全菌に加えて弱っている損傷菌も生えるという考え方である。高圧損傷菌も同様に検出することができるが、37℃で培養すると死滅して検出できないこともあるので¹⁶⁾²⁹⁾³⁰⁾、25℃での長時間培養、ピルビン酸添加による酸化ストレス軽減¹⁶⁾等を活用して、損傷菌を見逃さないような配慮も必要である。また、高圧損傷菌は、コロニー数の変化で調べることもできるが、コロニーの数のみならず、大きさの不均一性および増殖遅延による出現の遅さにも注意する必要がある¹⁶⁾（Fig. 4）。

高圧損傷菌は、フローサイトメトリーを活用して検出することもできる¹⁶⁾。STYO 9（緑色蛍光）および propidium iodide (PI; 赤色蛍光) は DNA を染色する蛍光試薬であり、STYO 9 は細胞膜透過性が高いため細胞の状態によらず染色するが、PI は低い膜損傷時にのみ染色する。よって、膜損傷のある死菌（Fig. 5 (A)）には両方が侵入し、膜

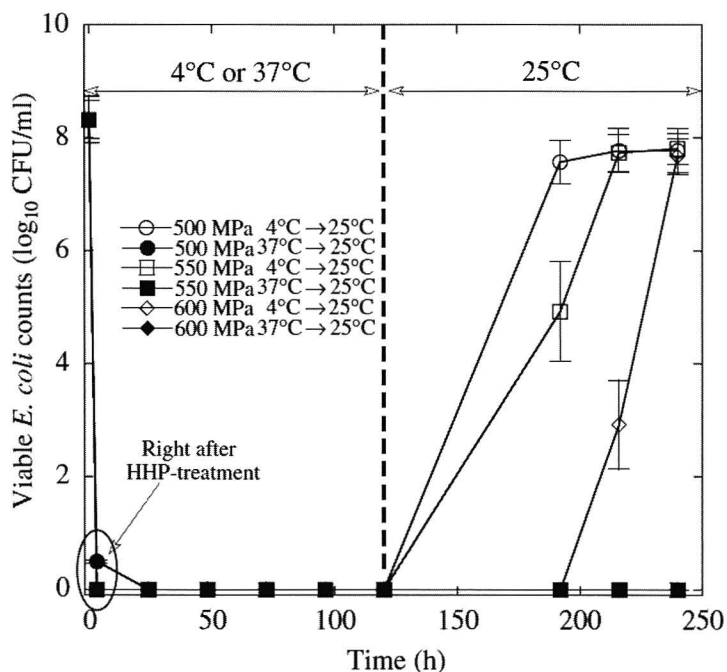


Fig. 2 Changes in the number of *E. coli* in phosphate-buffered saline (PBS) solution treated with high hydrostatic pressure (HHP; 500–600 MPa, 25°C, 10 min) during storage at 4 or 37°C for 120 h and successive storage at 25°C for 120 h²⁹⁾

Although no colony was formed during the storage at 4°C, the temperature shift to 25°C induced recovery. The lag time for the recovery depended on the level of HHP. No colony was formed during the storage at 37°C throughout.

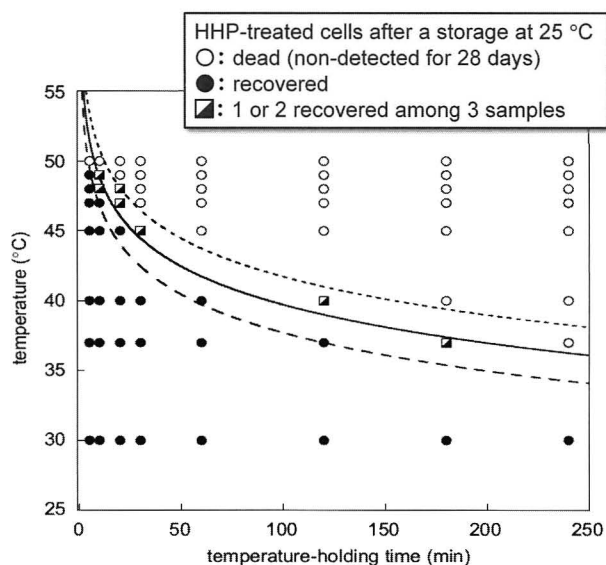


Fig. 3 Recovery of *Listeria monocytogenes* in milk (7 log CFU/g) after high hydrostatic pressure (HHP) treatment (550 MPa, 25°C, 5 min) followed by mild heat treatment³⁰⁾

The black and white circles represent recovery and no recovery in all three triplicate experiments, respectively. The black and white square represents different responses among three trials after 28 days.

損傷が無い健常菌 (Fig. 5 (B)) には STYO 9 しか侵入しない。一方、高圧損傷菌は、健常菌および死菌とは異なる染

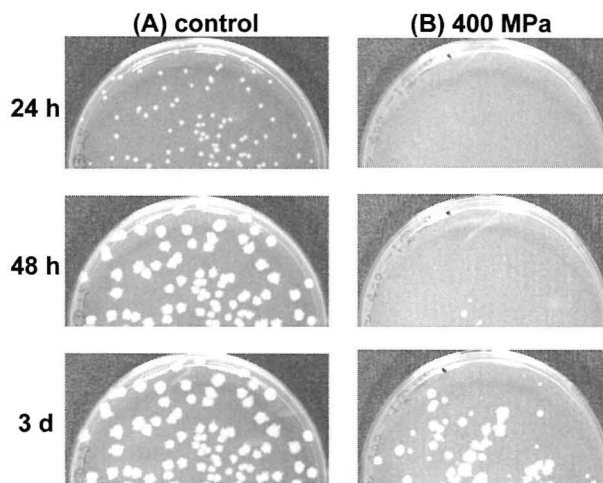


Fig. 4 Colony appearance of *E. coli* cells after HHP treatment (400 MPa, 25°C, 10 min)¹⁶⁾

Cells were appropriately diluted and spread on LB agar plates and incubated at 25°C. (A), control (no HHP treatment); (B), HHP-treated. Colonies were observed on LB plates after incubations for 24 h, 48 h, and 3 d.

色パターンを示す。例えば、400 MPa 処理直後には、死菌 (領域 a) とそれ以外のおそらく損傷菌 (領域 b) が観察され (Fig. 5 (C)), 2 日経過後には健常菌 (領域 c) が出現することが観察できる¹⁶⁾ (Fig. 5 (D))。

3-3 低温高圧処理による食品加工

世界の食品高圧加工では、5°C 近傍の低温で 600 MPa の

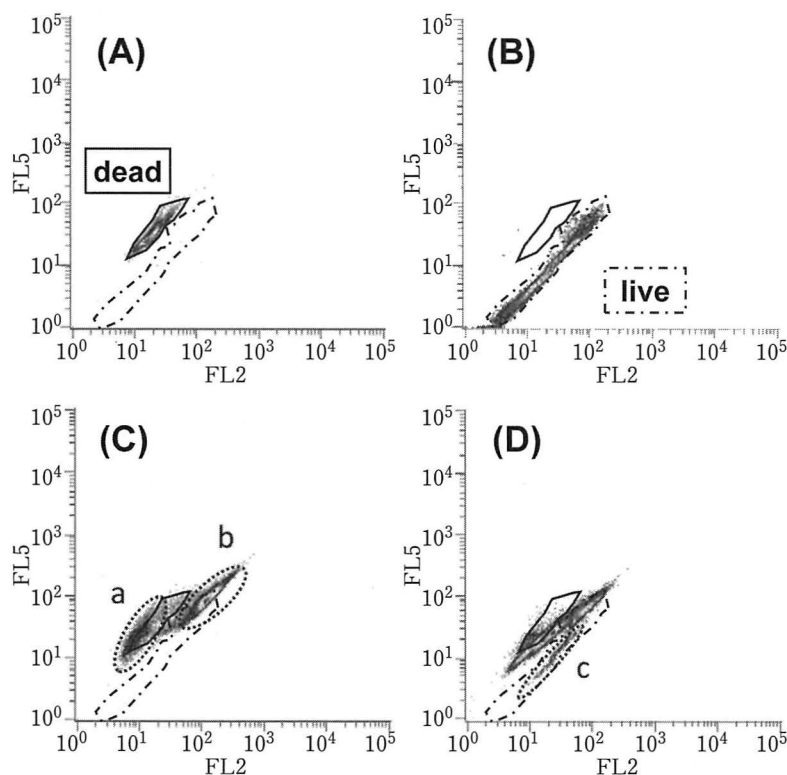


Fig. 5 Flow cytometer (FCM) analysis of *E. coli* cells treated by HHP at 400 MPa¹⁶⁾

(A), dead cells (heat-inactivated at 90°C for 30 min and stored at 25°C for 48 h) surrounded by solid line; (B), healthy cells (no HHP treatment, stored at 25°C for 48 h) surrounded by dotdash line; (C), HHP-treated (400 MPa, 25°C, 10 min) and no storage; (D), HHP-treated and stored at 25°C for 48 h.

高圧力を課す低温高圧処理が趨勢である。この低温高圧処理は、単に高圧処理と呼ばれることが多く、圧力保持時間は、目的にもよるが、概ね3~5分間である。この圧力保持時間は、数分間であっても、十分な微生物不活性化効果が期待できる。むしろそれ以上長く保持して処理しても、微生物不活性化効果が大幅に向上することは期待できず、作業効率が低下するだけである。また、600 MPaまでの昇圧には3分間程度が必要であるが、容器容量に応じて増圧機の台数を増やせば、昇圧時間は短くすることができる。減圧は、装置への負担が無い程度にまで早くすることができるが、早すぎると、MAP (modified atmosphere packaging) の容器にピンホール等が発生する問題も懸念される。昇圧および減圧の際には、それぞれ断熱圧縮および断熱膨張による加熱および冷却がある。製品への断熱圧縮による加熱が気になるところではあるが、これは初発温度が高い程大きく、低温では約2°C/100 MPaのものが、約80°C以上では5°C/100 MPaとされ、業界では、約3°C/100 MPaで推算することが多い。つまり、600 MPaまで加圧すると、10°Cの初発温度が最高で28°C程度に到達し、その後は容器への放熱と、減圧時の断熱膨張による冷却で、再び10°C近傍に戻る。加圧も力学的な仕事の一種であるので、昇圧・保持・減圧を繰り返すと徐々に温度が上昇する。それ故に、高圧処理を実施する際には、循環恒温水等で冷却することが、

製品の温度管理上重要である。

600 MPaでの高圧処理により、生物、特に微生物の細胞の活性が低下し、致命的に不活性化すると細胞死が誘導されると考えられている。特に、酵素・受容体として機能することがある蛋白質は、熱処理では殆どが失活するが、高圧処理では、その限りではない点に注意が必要である。また、細胞の構成成分は、蛋白質のみならず、DNA、脂質、糖質等の他の成分であるので、細胞活性低下に関与する生体成分に関する要因は、蛋白質自体の変性だけではなく、蛋白質と他成分との相互作用の変化、他成分の変性も考慮する必要がある。また、高圧処理では、成分変性、成分間相互作用変化以外にも、細胞膜等が損傷することも示唆されている。急速減圧時に水の衝撃波（伝播速度：約1500 m/s）により、耐熱性細菌芽胞が物理的に破壊されることが観察されている³¹⁾。

600 MPaでの高圧処理では、有害細菌の他に、腐敗菌も不活性化の対象である。いずれも、その菌種・菌株によって耐圧性が異なるので注意が必要である。例えば、腸管出血性大腸菌の耐圧性は、菌株によって大きく異なる³²⁾。

近年、低温高圧処理して微生物を制御し、絞りたての生ジュースのようで有りながら一ヶ月前後の賞味期限を保証した高圧処理ジュースの市場は、欧米、韓国、台湾等、国外で伸びている。一方、国内では、高級生搾りジュースの

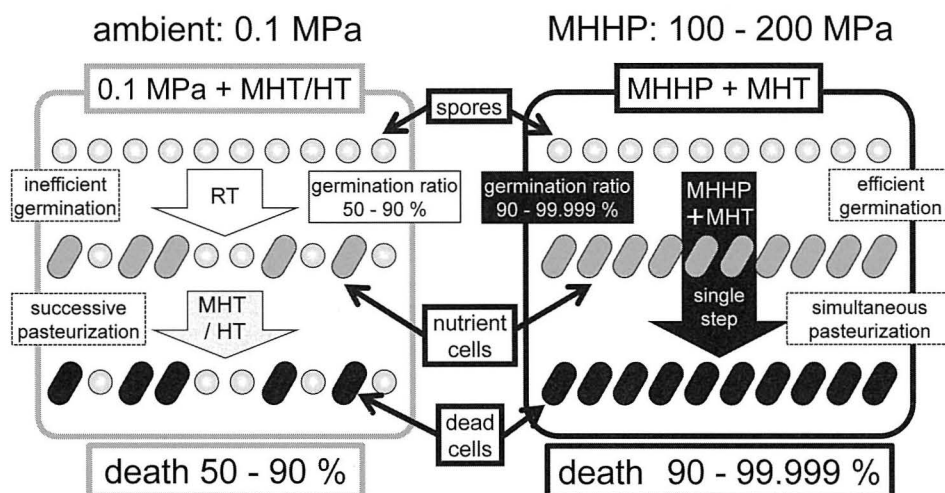


Fig. 6 Pasteurization based on suicidal germination induced by medium high hydrostatic pressure (MHHP)⁴⁰⁾

Physiological germination among some spores may be induced when bacterial spores are exposed to suitable environmental conditions under ambient pressure (0.1 MPa). Thereafter, the germinated nutrient cells can be pasteurized by heating at medium high temperature (MHT) or high temperature (HT). MHHP may induce more efficient physiological germination than under 0.1 MPa. The efficient germination can be induced even at MHT and thus MHHP-MHT treatment may lead the spores to suicidal germination.

店頭販売が人気を呼んでいることもあり、日本に輸出を希望する企業、日本国内生産を目論む企業も現れている。しかしながら、高圧処理ジュースが、日本の食品衛生法の清涼飲料水製造基準を満たすためには、熱殺菌との同等性を示して個別認可を得る必要がある。一方、殺菌効果における同等性の証明には、同等性を示すために必要な微生物の種類、その低減菌数等、必要条件の提示が不可欠であるが、それが文書として明示されていないので、個別に当局担当者に相談する以外には手立てがない。目下のところ、高圧処理ジュースの国際規格が存在しないことから、国際食品規格委員会 (Codex Alimentarius Commission) に於いて国際規格の策定が求められる可能性がある。

3-4 中高圧処理による静菌

100~300 MPa での中高圧処理は、日本で発展している。100 MPa 程度の中高圧下では、雑菌は死なずとも増殖が抑制されるので、つまり静菌されるので、酵素活性を抑制する食塩の添加量を下げることができる。この原理を利用して、塩無添加での魚醤促成製造法³³⁾³⁴⁾が提案され、無塩醤油の製造が実現している。酵母による醗酵がないため独特の香気に欠けるが、高級醤油を少量添加した減塩醤油として商品化した。同様の酵素反応促進による商品開発の進展は顕著であり、健康食品・化粧品として豚の胎盤を効率的に酵素分解して得たプラセンタエキスのみならず、スッポンエキス、ニンニクエキス等の各種エキス利用製品が実用化されている³⁵⁾。

3-5 高圧処理・中高圧処理による芽胞の不活性化

高圧処理で細菌の芽胞 (孢子) を死滅させるのは難しく、1 GPa でも生残しうる³⁶⁾。一方、高温処理と高圧処理とを組

み合わせる芽胞殺菌法として、2009年に米国で認可された圧力補助熱処理法 (PATP, pressure-assisted thermal process; または圧力補助熱滅菌法: PATS, pressure-assisted thermal sterilization) がある。予熱したスープ、マッシュポテト等の低酸性食品 (low-acid foods: pH4.6 以上 & 水分活性 > 0.85; 米国 FDA 定義) を、500~700 MPa に加圧する過程での断熱圧縮加熱を活用し、従来からの加熱温度 (90~121℃) への到達時間を短縮することで、品質劣化を抑制し、長期保存を可能とする³⁷⁾。

一方、高圧処理では、処理圧力に応じて、100~200 MPa 近傍での芽胞の生理的発芽と、400~600 MPa 近傍での非生理的発芽との2種類の発芽を誘導することができる³⁸⁾。生理的発芽は、圧力によりアミノ酸、糖類と同様に発芽レセプターが刺激されて開始する。非生理的発芽では、圧力によりジピコリン酸と共にカルシウム等の金属イオンの放出が誘導される。また、200 MPa 以上で処理した場合は、生理的発芽と非生理的発芽とが複合的に働き、更に、処理圧力が高くなると非生理的発芽のみが働くようになり、発芽誘導効果が低くなることが報告されている。発芽誘導により、コルテックスの加水分解、低分子量酸可溶性蛋白質の分解が進み、芽胞の耐熱性が低下する。つまり、熱および圧力により芽胞の不活性化が達成できる。

中高圧処理による生理的発芽誘導を利用して、細菌芽胞を効率的に自滅させることもできる (自滅的発芽)。100~200 MPa で 60℃ 以上の中高温をかけつつ処理することにより、生理的発芽と同時に熱死滅が可能であり、例えば、100 MPa, 65℃, 30 分間の処理で、*Bacillus subtilis* 168 株の芽胞を 4 桁以上死滅させることができる³⁹⁾。これは、中

温中高压処理による自滅的発芽誘導殺菌法⁴⁰⁾である (Fig. 6). この手法を用いれば、栄養細胞が死滅する比較的低い温度でも、芽胞を効率的に殺菌できる可能性がある。一方、芽胞形成能が欠失した枯草菌株の栄養細胞を高压処理すると、300 MPa 以上の高压処理で顕著に不活性化し、増殖開始が遅れるとともに、100 mM 以上の KCl または NaCl が存在すると高压処理後に溶菌することが報告されている⁴¹⁾。海水の塩分濃度よりも遥かに低い濃度 (0.58~0.75%) の塩類により溶菌することからも、芽胞は、発芽さえ誘導してしまえば、高压処理により殺滅しやすいのかも知れない。

3-6 細菌以外への効果：真菌類 (黴, 酵母)・ウイルス・寄生虫

黴については、例えば、果実・果実加工品を汚染しうる *Byssoschlamys nivea* の子嚢胞子を、ブドウ果汁 (水分活性 0.97) もしくはビルベリージャム (同 0.84) に接種し、700 MPa, 70°C, 30 分間の非実用的に過酷な高压処理を施した報告がある⁴²⁾。ブドウ果汁では 4log が不活性化するが、ビルベリージャムでは 1log 未満の不活性化効果しかない。これは、上述した食品マトリックスの影響と考えられる。

酵母については、例えば、栄養細胞または子嚢胞子の各状態にある *Zygosaccharomyces bailii* を、各種果汁に接種して、300 MPa, 25°C, 5 分間の実用的条件での処理を施した報告がある⁴³⁾。栄養細胞では 5log が不活性化する一方で、子嚢胞子では 1log 未満しか不活性化しない。これは、上述の細胞の形状または状態による差異と考えられる。

食中毒の原因となるウイルスとしては、ノロウイルス、ピコルナウイルス (例えば A 型肝炎ウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、ヒトパレコウイルス)、E 型肝炎ウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスが知られるが、この中で特に問題となるのは、ノロウイルスと A 型肝炎ウイルスとである。ウイルスの高压不活性化⁴⁴⁾は、1929 年に Hite 等がタバコモザイクウイルスを用いた結果を報告している。タバコモザイクウイルスは、920 MPa で漸く不活性化するが、幸いなことに、殆どのヒトウイルス、動物ウイルスは、タバコモザイクウイルスよりも高压力に弱い。タバコモザイクウイルスの報告以降、特に食品高压加工が実用化して以降、ウイルスの高压不活性化の報告は増えている⁴⁴⁾。

アニサキス、サルコシステイス等の寄生虫による食中毒件数が年々増加する傾向がある。特にアニサキスは、食中毒の原因となる線虫であり、国内では 2012 年から寄生虫食中毒の届出が義務化し、実態把握が進みつつある。人間に健康被害を加えるのはアニサキスの第三期幼虫であるが、培養ができないため、寄生虫殺滅実験のためには、根気良く多数捕獲する努力が必要である。200 MPa, 0~15°C, 10 分間の処理でアニサキスは全滅し、それより低い圧力では最大 1 時間の処理が必要なこと、120 MPa 以上 10 分間以上の処理では殆どのアニサキスが死滅すること、繰

り返し処理が有効なこと等が、明らかにされている⁴⁵⁾。アニサキスは、熱処理 (60°C で数秒, 70°C で瞬時) もしくは冷凍処理 (-20°C で 24 時間以上) で死滅するが、熱処理では熱変性による品質劣化が不可避であるし、冷凍処理には長時間が必要である。従って、高压処理には、加減圧時の組織破壊の問題もあるが、変性無く短時間の処理で寄生虫を死滅させられる可能性がある。

4. おわりに

食品高压加工は、すでに実用化しているものの、その微生物不活性化過程については、未解明な点が多く残されている。蛋白質変性または膜損傷による損傷・死滅を考察する上では、化学反応抑制、密度最大化、分子クラウディング、水和促進、蛋白質の解離・変性、脂質の相転移、DNA の構造変化、酸化ストレス等の視点が重要である。これら変化を契機として、生物、特に微生物の細胞の活性が低下するが、その他のストレスによる損傷との対比により、高压処理による損傷およびそこから回復に関する基礎的理解を進める必要がある。高品質・安全な食品への消費者志向に応えつつ、高品質な国産農畜水産物の高压加工品の輸出に向けて産学官が連携し、研究開発を進める必要がある。

文 献

- 1) Yamamoto, K. (2017). Food processing by high hydrostatic pressure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 672-679.
- 2) Iwasa S., Maehara H., Nishi M., Tanaka, S., Watanabe, T., Itoh, S., and Hokamoto, K. (2013). Food processing trials using underwater shock wave by electrical discharge. *Mater. Sci. Forum*, **767**, 223-228.
- 3) 林 力丸 (1987). 調理・加工・殺菌・保存への高压利用の可能性. *食品と開発*, **22**, 55-62.
- 4) Kimura, K., Ida, M., Yoshida, Y., Ohki, K., and Fukumoto, T. (1994). Comparison of keeping quality between pressure-processed jam and heat-processed jam: changes in flavor components, hue, and nutrients during storage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1386-1391.
- 5) 山本和貴 (2013). 食品高压加工の動向. *ソフト・ドリンク技術資料*, **171**, 1-18.
- 6) Bartlett, D.H. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica Biophysica Acta*, **1595**, 367-381.
- 7) Nagae, T., Kawamura, T., Chavas, L.M.G., Niwa, K., Hasegawa, M., Kato, C., and Watanabe, N. (2012). High-pressure-induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase. *Acta Crystallographica, Section D* **68**, 300-309.
- 8) Yamamoto, K., Kawai, K., Fukami, K., and Koseki, S. (2009). Pressure gelatinization of potato starch. *Food*, **3** (Special Issue 1), 57-66.
- 9) 中野修一, 杉本直己. (2006). 分子クラウディング環境は生命分子の物性と機能をいかに変えるか. *生物物理*, **46** (267), 251-256.
- 10) Gross, M. and Jaenicke, R. (1994). Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 617-630.
- 11) Heremans, K. (1995). High pressure effects on biomolecules.

- In "High pressure processing of foods," ed. by D.A. Ledward, D. E. Johnston, R. G. Earnshaw and A. P. M. Hastings, Nottingham University Press, Nottingham, Leicestershire, United Kingdom, pp. 81-97.
- 12) 大前英司 (2017). 高圧処理による酵素の活性化と不活性化. 食品と容器, **58**, 404-410.
- 13) 松木 均 (2017). 高圧処理による脂質の状態変化. 食品と容器, **58**, 78-86.
- 14) Braganza, L.F. and Worcester, D.L. (1986). Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused hydrostatic pressure. *Biochem.*, **25**, 7484-7488.
- 15) Macdonald, A.G. (1984). The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, **304**, 47-68.
- 16) Kimura, K., Morimatsu, K., Inaoka, T., and Yamamoto K. (2017). Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400-600 MPa. *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 698-706.
- 17) Takahashi, S. and Sugimoto, N. (2013). Effect of pressure on the stability of G-quadruplex DNA: thermodynamics under crowding conditions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 13774-13778.
- 18) 高橋俊太郎, 杉本直己. (2015). 核酸構造の熱力学的安定性に及ぼす分子環境と高圧力の効果. 高圧力の科学と技術, **25**, 116-125.
- 19) Aertsen, A., De Spiegeleer, P., Vanoirbeek, K., Lavilla, M., and Michiels, C.W. (2005). Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2226-2231.
- 20) 山本和貴 (2017). 食品高圧加工における食品安全性確保. 食品と容器, **58**, 530-537.
- 21) Hite, B.H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull. West Virginia Univ. Agric. Exp. Station*, **58**, 15-35.
- 22) Daryaei, H., Yousef, A. E., and Balasubramaniam, V. M. (2016). Microbiological aspects of high-pressure processing of food: inactivation of microbial vegetative cells and spores. In: "High Pressure Processing of Foods," ed. by V.M. Balasubramaniam, G.V. Barbosa-Cánovas, H.L.M. Lelieved, Springer, New York, pp. 271-294.
- 23) Ludwig, H. and Schreck, C. (1997). The inactivation of vegetative bacteria by pressure. In "High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology," ed. by K. Heremans, Leuven University Press, Leuven, pp. 221-224.
- 24) Cebrián, G., Mañas, P., and Condón, S. (2016). Comparative resistance of bacterial foodborne pathogens to non-thermal technologies for food preservation. *Frontiers Microbiol.*, **7** (734), 1-17.
- 25) Mackey, B.M., Forestière, K., and Isaacs, N. (1995). Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.*, **9**, 1-11.
- 26) 土戸哲明 (2017). 損傷菌とその食品微生物制御における意義. イルシー, **130**, 11-17.
- 27) 土戸哲明, 坂元 仁 (2012). 殺菌処理における損傷菌・損傷胞子の発生と制御技術 (特集 殺菌技術). 食品工業, **55**, 45-53.
- 28) Wuytack, E. Y., Phuong, L. D., Aertsen, A., Reyns, K. M., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A. M., and Michiels, C. W. (2003). Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Prot.*, **66**, 31-37.
- 29) Koseki, S. and Yamamoto, K. (2006). Recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 in phosphate buffered saline after treatment with high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.*, **110**, 108-111.
- 30) Koseki, S., Mizuno, Y., and Yamamoto, K. (2008). Use of mild-heat treatment following high-pressure processing to prevent recovery of pressure-injured *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiol.*, **25**, 288-293.
- 31) Hayakawa, I., Furukawa, S., Midzunaga, A., Horiuchi, H., Nakashima, T., Fujio, Y., Yano, Y., Ishikura, T., and Sasaki, K. (1998). Mechanism of inactivation of heat-tolerant spores of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 by rapid decompression. *J. Food Sci.*, **63**, 371-374.
- 32) Alpas, H., Kalchayan and N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P., and Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4248-4251.
- 33) 岡崎 尚, 重田有仁, 青山康司 (2007). 静水圧を利用した食品の加工技術 (3). 食品と容器, **48**, 436-440.
- 34) 岡崎 尚, 重田有仁, 青山康司 (2007). 静水圧を利用した食品の加工技術 (4). 食品と容器, **48**, 508-516.
- 35) 森川篤史 (2016). 中高圧処理を活用したエクス化. 食品と容器, **57**, 82-87.
- 36) Cheftel, J.C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: "High Pressure and Biotechnology," ed. by C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson, Vol. 224, INSERM and John Libbey, Paris, pp. 195-209.
- 37) Daryaei, H., Balasubramaniam, V.M., Yousef, A.E., Legan, J. D., and Tay, A. (2016). Lethality enhancement of pressure-assisted thermal processing against *Bacillus amyloliquefaciens* spores in low-acid media using antimicrobial compounds. *Food Control*, **59**, 234-242.
- 38) 森松和也 (2016). 高圧処理における芽胞菌の発芽誘導. 食品と容器, **57**, 155-160.
- 39) Yamamoto, K., Morimatsu, K., Zhong, L., Baum, H., Inaoka, T., and Kimura, K. (2014). Factors affecting suicidal germination of *Bacillus subtilis* spores in medium high hydrostatic pressure food processing. Book of Abstracts, 8th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Nantes, France, 15-18 July, p. 73.
- 40) 山本和貴 (2016). 食品高圧加工による微生物不活性化の課題と展望. FFI ジャーナル, **221**, 291-296.
- 41) Inaoka, T., Kimura, K., Morimatsu, K., and Yamamoto, K. (2017). Characterization of high hydrostatic pressure-injured *Bacillus subtilis* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 1235-1240.
- 42) Butz, P., Funtenberger, S., Haberditzl, T., and Tauscher, B. (1996). High pressure inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. *LWT - Food Sci. Technol.*, **29**, 404-410.
- 43) Raso, J., Calderón, M.L., Góngora, M., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. (1998). Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices by heat, high hydrostatic pressure and pulsed electric fields. *J. Food Sci.*, **63**, 1042-1044.
- 44) Shearer, A.E. H., Kniel, K.F., Chen, H., and Hoover, D.G. (2016). High-pressure effects on viruses. In: "High Pressure Processing of Foods," ed. by V.M. Balasubramaniam, G.V. Barbosa-Cánovas, H.L.M. Lelieved, Springer, New York, pp. 295-315.
- 45) Molina-García, A.D. and Sanz, P.D. (2002). *Anisakis simplex* larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. *J. Food Prot.*, **65**, 383-388.

(平成 29 年 12 月 12 日受理)