

<平成24年度助成>

高品質・高効率な蒸気殺菌技術の開発

根 井 大 介

(独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所)

1 はじめに

食品の製造過程において、殺菌処理は病原菌を死滅させて食中毒リスクを下げる上で重要な役割を果たすとともに、腐敗をもたらす細菌の汚染を低減させる効果が期待できる。加熱処理は古典的な殺菌方法であり、高い殺菌効果が期待できるが、生鮮野菜や各種の食品原料などの加熱に不向きなものには適用できない。一方で、非加熱殺菌として広く使用されている次亜塩素酸処理などの薬剤処理は、その殺菌効果は限定的である。生鮮野菜および野菜の原料種子等に適用した場合、菌数の低減効果は1-3 log CFU/gにとどまる¹⁻²⁾。また、処理条件によっては十分な殺菌効果が得られないことがある。例えば、生鮮野菜を殺菌処理する際に泥などが多く付着していると、洗浄液中の塩素濃度が大きく低下し、殺菌能力が著しく下がる³⁾ことがある。他の非加熱殺菌技術として放射線照射があり、高い殺菌効果をもち病原細菌の制御に有効であるものの、日本国内では食品の殺菌目的に使用することは食品衛生法により禁止されている。食品の安全性に対する関心が高い昨今の情勢を踏まえると、特に非加熱で高い微生物制御能力をもつ効果的な殺菌方法の開発が強く望まれる。

本研究ではこれまでに、ガス化させた酢酸を利用した殺菌技術を開発し、主に芽もの野菜の原料種子を対象に殺菌試験を行ってきた³⁾。その結果、アルファルファ種子およびカイワレ種子に接種した大腸菌O157:H7およびサルモネラの菌数を5.0 log CFU/g以上低下させることが可能

であり、高い殺菌効果が得られることが明らかとなった。また、商用規模の装置を使用した試験を行い、アルファルファ種子の表面に付着させた大腸菌を効率的に殺菌できることを明らかにしてきた⁴⁾。一方で、実際の食品の製造ラインに組み込むためには、コスト・処理量および作業環境等の観点から、可能な限り低濃度のガスで短時間のうちに食品の殺菌処理を終える必要があるが、この課題については未だ解決できていないのが現状である。本研究課題では、殺菌効果を有するガスを複数使用し、より低濃度で食品類を効果的に殺菌する技術の開発を試みた。殺菌試験の対象として、世界的に食中毒事例が多い芽もの野菜の原料種子を選択した。芽もの野菜の食中毒は日本国内では事例が少ないものの、アメリカなどを中心に世界的にほとんど毎年のように食中毒が発生しており、2009年から2011年にかけて米国内で少なくとも5例以上の食中毒事例が報告されている⁵⁻⁶⁾。2011年に欧州を中心に発生したフェヌグリークスプラウトのアウトブレイクのように、多数を死者が報告された例もある⁷⁾。このような食中毒の特徴として、灌漑水や動物あるいは未熟たい肥等を経由して原料種子の段階ですでに病原菌に汚染されているケースが多いことが挙げられる。したがって、芽もの野菜の食中毒を防止するためには、原料種子を確実に殺菌することが重要である。本研究課題では、原料種子表面に接種した大腸菌O157:H7およびサルモネラの殺菌試験を行い、原料種子の殺菌の一手段として、ガス処理技術の適用性を検討した。さらに、本ガス処理

技術を香辛料類の殺菌に応用することを試みるため、フェヌグリーク種子およびブラックペッパーの殺菌試験を行った。このような香辛料は食肉製品および魚肉ねり製品などに使用する場合、1g当たりの芽胞数を1,000以下にする必要がある⁸⁾。これらの用途に用いる香辛料に関しては効果的な殺菌処理が不可欠であり、香辛料に接種した芽胞への殺菌効果も合わせて検討したので報告する。

2. 実験方法

2-1 実験材料

実験材料には市販のアルファルファ種子、フェヌグリーク種子およびブラックペッパーを使用した。これらの材料は実験に使用するまで5℃のインキュベータ内に保存した。

2-2 供試菌株

供試菌株にはリファンピシン耐性を付与した大腸菌 O157:H7 (CR3, Mn28, My29)、サルモネラ (血清型 Enteritidis : SE1, SE2) を使用した。菌株は 50 μ g/mL の濃度でリファンピシンを添加した Trypticase Soy Broth (TSB: ニッスイ) 培地により 37℃ で 24 時間培養した。培養後、菌懸濁液から遠心分離 (3,000g, 4℃) により集菌し、等量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: pH7.2) に懸濁した。この操作を 2 回繰り返すことで、接種用の菌懸濁液を得た。最終的な菌懸濁液の濃度は 8.0-9.0log CFU/mL とした。

また、ガス処理による芽胞細胞の殺菌効果を評価するため、*Bacillus subtilis* (IFO13722) を使用した。芽胞の形成は Hamanaka *et al.*⁹⁾ を参考にを行った。TSB 培地を使用して 35℃ で 24 時間培養した後、Trypticase Soy Agar (TSA: ニッスイ) に塗布した。塗布した培地を 35℃ で 7 日間培養することにより胞子を形成させた。胞子形成後、スプレッターを使用して回収し PBS に懸濁させたのち、遠心分離 (3,000g, 4℃) と PBS により洗浄を 3 回繰り返した。その後、懸濁液を 70℃

で 60 分間加熱し栄養細胞を死滅させた。胞子懸濁液の濃度を PBS により 7.0log CFU/mL に調整し、試験に使用するまで 4℃ で保存した。

2-3 接種方法

滅菌済みのステンレスコンテナ内に 600 mL の菌懸濁液を入れた後、300 g の試料を浸漬させ、5 分間緩やかに攪拌させた。排水した後、試料をステンレスコンテナ内に静置し、クリーンベンチ内で 8 時間乾燥させた。乾燥後、試験に使用するまで試料は 5℃ の定温庫内に保存した。各々の試験対象で問題となる細菌を選択して接種した。すなわち、アルファルファ種子については大腸菌 O157:H7 およびサルモネラを接種し、フェヌグリーク種子には大腸菌 O157:H7、ブラックペッパーには *Bacillus subtilis* 胞子を接種し、殺菌試験に使用した。

2-4 ガス処理方法

ガス処理装置 (大生機械、AG1000-AS) を図 1 に示した。試料 300 g を回転ドラム内に入れたの

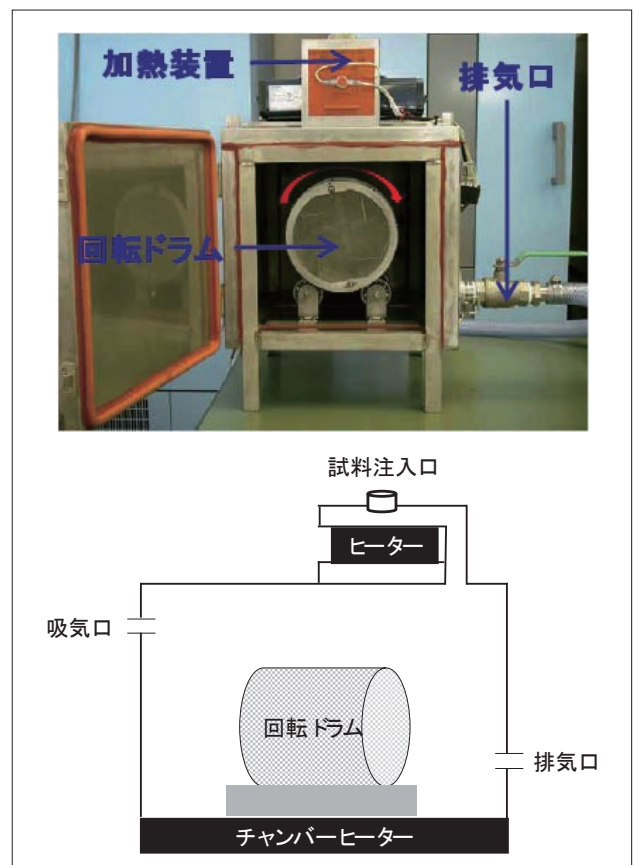


図 1 ガス処理装置の概略

ち、30Lのチャンバー内に静置し密閉させた。その後、チャンバー内を55℃まで昇温させた。ガス処理装置の上部に設けた挿入口から酢酸およびアリルイソチオシアネート(AIT)を0.5mLまたは1.0mL注入し、10分間の加熱処理により各々を気化させた。ガス処理中、試料の入ったドラムを2rpm以下で緩やかに回転させ、殺菌ガスと試料を接触させた。処理時間は1、2および3時間とし、処理終了後にチャンバー内を30分間強制通気させることで殺菌ガスを排気した。排気処理を終えたのち、試料を回収し、直ちに菌数測定および発芽率測定を行った。

2-5 細菌数検査

大腸菌O157:H7およびサルモネラの細菌数検査は平板混釈法により行った。未処理および殺菌処理後の試料10gをストマック袋に入れ、90mLのPBSを加えた。その後、1分間のストマック処理を行った。処理後の懸濁液をPBSにより10倍段階希釈し、検出培地に混釈した。検出培地にはリファンピシン加TSA培地を使用した。混釈後、培地を35℃で24時間培養し、発育したコロニー数を計測した。なお、生菌数が検出限界以下(<1.0log CFU/g)であった場合、殺菌処理済み試料10gに90mLのリファンピシン加TSBを加え、35℃で24時間増菌培養したのち、検出培地に塗布することにより接種菌の生存の有無を判定した。*Bacillus subtilis*の生菌数測定には塗抹法を用いた。上述と同様の方法で懸濁液を得たのち、加熱処理を行った。その後、懸濁液0.1mLをTSA培地に塗抹し、検出培地を35℃で24時間培養した。培養後の発育コロニー数を測定することにより、*Bacillus subtilis*の生菌数を得た。

2-6 発芽率測定

アルファルファ種子およびフェヌグリーク種子について、ガス処理が種子の発芽能力に及ぼす影響を評価した¹⁰⁾。約300個の種子をペーパータオルの上に置き、これをプラスチックシャーレ内に

静置した。適量の蒸留水を加えて25℃で4日間保存し、発芽種子の数から発芽率を算出した。なお、発芽率の測定には未接種の原料種子を使用した。

2-7 統計処理

全ての試験区は独立に3回反復した。生菌数のデータは3反復の平均値と標準偏差で表記し、発芽率は3反復の平均値で表した。生菌数について、各試験区間の平均値の差はTukey法により有意水準5%で検定した。

3. 結果および考察

3-1 アルファルファ種子

図2に酢酸ガスおよびAITガスがアルファルファ種子に接種した大腸菌O157:H7の生菌数に及ぼす影響を示した。未処理の種子からは大腸菌O157:H7が6.1log CFU/g検出された。酢酸ガス処理を加えることにより、大腸菌O157:H7の生菌数は有意に低下し($p<0.05$)、1時間のガス処理で生菌数は3.2-3.4log CFU/gにまで低下した。処理時間が長くなるに従い、生菌数が大きく低下する傾向が見られ、3時間処理後の生菌数は1.5-1.9log CFU/gとなった。酢酸の投入量を0.5mLと1.0mLに変化させた条件では、濃度による殺菌効果の有意な差は認められなかった($p>0.05$)。AIT処理に関しても、大腸菌O157:H7の生菌数は有意に減少し($p<0.05$)、1時間処理後の生菌数は2.9-3.2log CFU/gとなった。酢酸と同様に、処理時間が長くなるにもなって生菌数は大きく低下した。AITの投入量を0.5mLと1.0mLに変化させて殺菌効果を検討した結果、AIT投入量は生菌数の低下に有意に影響し($p<0.05$)、投入量1.0mLの方が生菌数は大きく低下した。AIT投入量を1mLとして3時間処理を行った場合、大腸菌O157:H7の生菌数は検出限界以下(<1.0log CFU/g)にまで低下した。しかしながら、増菌培養した結果、接種した大腸菌O157:H7が全ての試料から検出され、完全に死滅させること

はできなかった。アルファルファ種子を1mLの投入量の酢酸およびAITで同時処理した条件では、各々を単独で処理するよりも菌数は大きく低下し、2時間以上処理することにより生菌数を検出限界以下にまで低下させることができた。しかしながら、投入量を0.5mLに低下させた場合では、同時処理と単独処理に顕著な差は見られなかった。

図3にガス処理がアルファルファ種子表面のサルモネラの生菌数におよぼす影響を示した。未処理の種子からは約5.9log CFU/gのサルモネラが

検出された。酢酸ガスおよびAITで1時間処理することにより、サルモネラの生菌数は各々3.1-3.3log CFU/g および3.3log CFU/g にまで低下した。大腸菌O157:H7と同様に、処理時間が長くなるに従い生菌数は大きく低下し、3時間処理後の生菌数は酢酸ガス処理で1.7-2.0log CFU/g、AITでは2.0-2.1log CFU/gとなった。サルモネラについては酢酸ガスおよびAITの両者ともに、投入量0.5mLと1.0mLの間に殺菌効果の差異は認められなかった。投入量1mLで酢酸ガスとAITを同時に3時間処理した条件では、各々

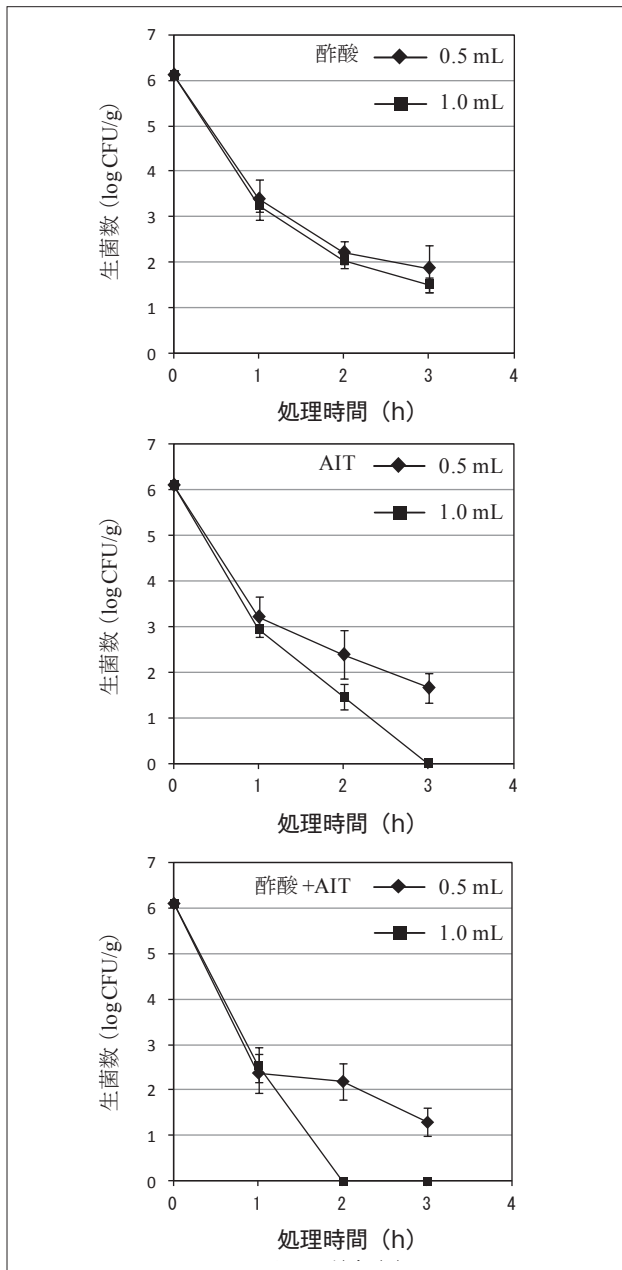


図2 酢酸ガスおよびAIT処理がアルファルファ種子に接種した大腸菌O157:H7の生菌数に及ぼす影響

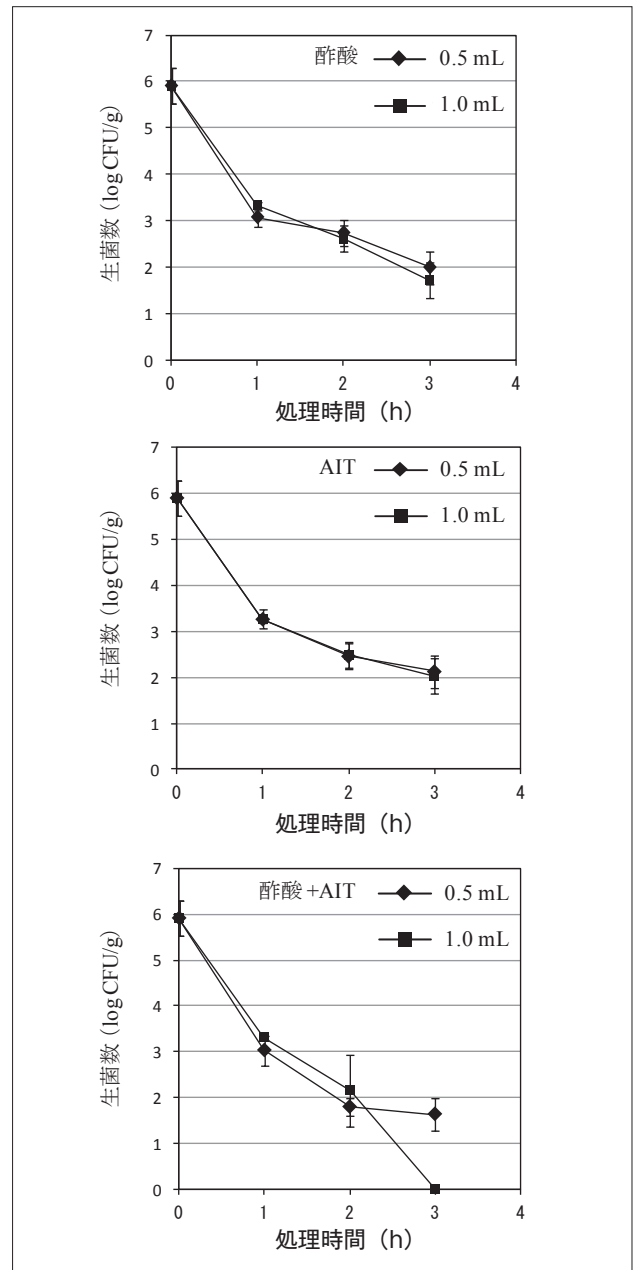


図3 酢酸ガスおよびAIT処理がアルファルファ種子に接種したサルモネラの生菌数に及ぼす影響

を単独で処理する場合と比較して、サルモネラの生菌数は大きく低下した。しかしながら、処理時間が2時間以内の場合には同時処理と単独処理の間に殺菌効果の顕著な差は見られなかった。また、投入量が0.5mLの場合についても、同時処理と単独処理に顕著な差は認められなかった。表1にガス処理がアルファルファ種子の発芽率に及ぼす影響を示した。酢酸ガスおよびAIT両者ともに、ガス処理にともなう発芽率の大きな変化は見られず、未処理種子と同等の発芽能力が維持された。アルファルファ種子では、ガス処理により病原菌の生菌数が大きく低下させることが可能であり、処理条件次第では生菌数を6 log CFU/g以上から1.0 log CFU/g以下にまで下げることができた。また、ガス処理による生産性の顕著な低下は起こらず、微生物的な安全性の高い原料種子を提供する手段として期待できる。しかしながら、ガス処理後の種子には匂いが明らかに残っており、これ

を除去する工程を検討する必要がある、今後の重要な検討課題である。

3-2 フェヌグリーク種子

図4にガス処理にともなうフェヌグリーク種子に接種した大腸菌O157:H7の生菌数の変化を示す。未処理の種子からは7.5 log CFU/gの大腸菌O157:H7が検出された。酢酸ガス処理により生菌数は有意に低下し($p < 0.05$)、処理1時間後には生菌数は3.4-4.7 log CFU/gとなった。処理時間は殺菌効果に影響し、3時間の処理では生菌数は2.3-3.1 log CFU/gにまで低下し、処理条件次第では5.0 log CFU/g以上の殺菌効果が期待できる。米国内の種子殺菌では、付着した病原菌の生菌数を5.0 log CFU/g以上低下させることが推奨されており¹¹⁾、本処理方法はこれを満たしている。酢酸の投入量を0.5mLと1.0mLに変化させた場合、投入量が多い方が殺菌効果は高かった。AIT処理に関しても大腸菌O157:H7に対す

表1 ガス処理がアルファルファ種子およびフェヌグリーク種子の発芽率に及ぼす影響

処理条件	アルファルファ		フェヌグリーク	
	発芽率 1 ^a (%)	発芽率 2 ^b (%)	発芽率 1 (%)	発芽率 2 (%)
未処理	80	76	96	94
酢酸				
0.5mL 1時間	77	74	96	92
0.5mL 2時間	78	74	95	92
0.5mL 3時間	80	74	97	94
1.0mL 1時間	80	77	95	93
1.0mL 2時間	79	72	96	93
1.0mL 3時間	80	72	94	91
AIT				
0.5mL 1時間	80	76	94	90
0.5mL 2時間	81	78	98	95
0.5mL 3時間	83	76	95	92
1.0mL 1時間	82	78	94	91
1.0mL 2時間	83	75	95	92
1.0mL 3時間	79	73	95	91
酢酸 +AIT				
0.5mL 1時間	80	74	93	90
0.5mL 2時間	77	72	98	95
0.5mL 3時間	77	76	95	92
1.0mL 1時間	79	76	98	91
1.0mL 2時間	78	72	95	91
1.0mL 3時間	76	71	94	92

a: 全種子数に対する発芽した種子の割合を表す。その後正常に生育しなかった種子も含む。

b: 全種子数に対して、発芽およびその後正常に生育した種子の割合を表す。

る殺菌効果が認められ、1時間の処理で2.4-2.8 log CFU/gの殺菌低下が得られた。処理時間を3時間に延長した条件では、生菌数は約4.0 log CFU/g低下した。本報告書の試験条件内では、フェヌグリークに接種した大腸菌O157:H7に関して、酢酸ガスとAITの同時処理による優位性は認められなかった。殺菌効果自体は高いものの、酢酸ガスの単独処理と菌数低減効果はほぼ同じであった。表1にガス処理がフェヌグリーク種子の発芽率に及ぼす影響を示した。酢酸ガスおよびAITはいずれもフェヌグリーク種子の発芽率に影響を与えず、未処理の種子とほぼ同等の発芽率が保たれた。

2011年にはフェヌグリーク種子の汚染が原因

の腸管出血性大腸菌のアウトブレイクが欧州を中心に発生し多くの死者が報告され、効果的な種子殺菌方法の開発が望まれている。本報告で検討したガス処理方法は、殺菌対象物によりその殺菌性能が大きく異なることが示唆されるが、フェヌグリーク種子に付着した病原菌に対して大きな殺菌効果をもつことを初めて明らかにした。アルファルファ種子と同様に匂いの吸着が明確に確認されたが、今後原料種子の安全性を高める手段として十分な可能性をもつものと考えられる。

3.3 ブラックペッパー

図5にブラックペッパーに接種した *Bacillus subtilis* の生菌数を示した。未処理の種子では5.9

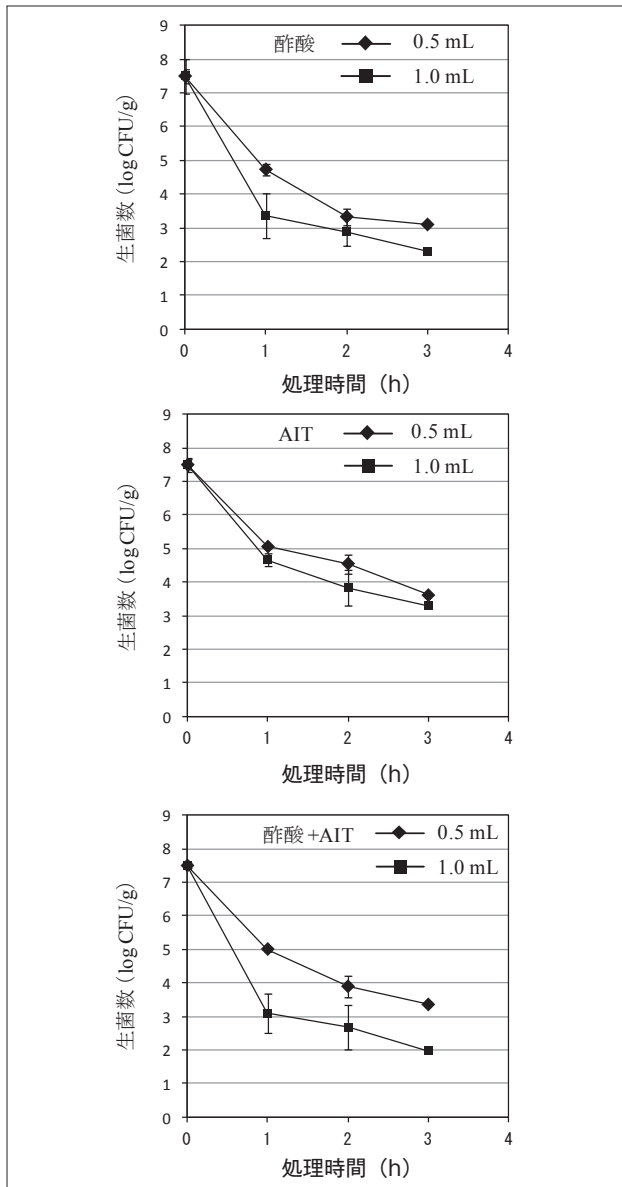


図4 酢酸ガスおよびAIT処理がフェヌグリーク種子に接種した大腸菌O157:H7の生菌数に及ぼす影響

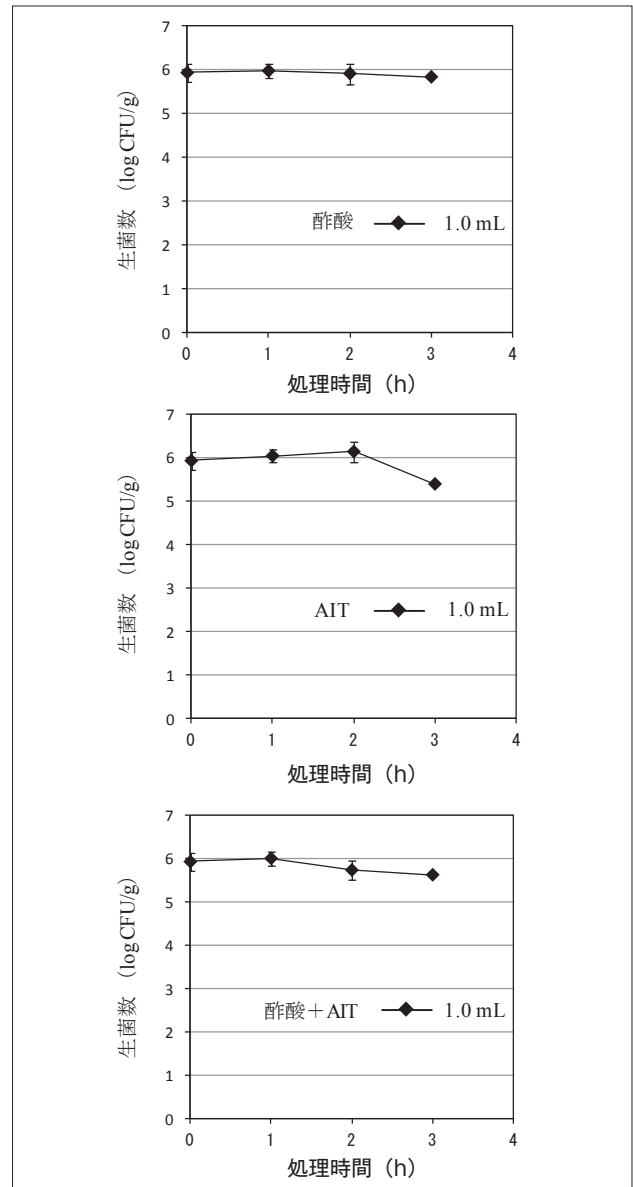


図5 酢酸ガスおよびAIT処理がブラックペッパーに接種した *Bacillus subtilis* 胞子の生菌数に及ぼす影響

log CFU/g の *Bacillus subtilis* が検出された。大腸菌 O157:H7 およびサルモネラと異なり、本報告の処理条件内では酢酸ガスおよびAITは両者ともに *Bacillus subtilis* の芽胞細胞に対して有意な殺菌効果を示さなかった ($p>0.05$)。この結果は酢酸ガスとAITの同時処理についても同様であり、有意な生菌数の変化は認められなかった ($p>0.05$)。

4. まとめ

酢酸ガスおよびAITを用いた原料種子と香辛料の殺菌技術の開発を試みた結果、アルファルフア種子およびフェヌグreek種子に接種した病原菌の菌数を大きく低下させる効果が認められ、処理条件によっては病原菌の生菌数を 5.0 log CFU/g 以上減少させることが可能であった。この処理方法は安全性の高い原料種子を生産する技術として期待できるものの、処理直後の種子に匂いが残存するなどの解決すべき課題がある。また、殺菌の対象食品・原料および細菌の種類によって殺菌効果が異なることが明らかとなり、汎用性のある処理条件を明らかにすることは現状では困難であるものと推測される。殺菌対象に応じて処理条件を最適化する必要があると考えられる。さらに、本報告で行った処理条件の範囲では、芽胞細胞に対する殺菌効果が得られず、芽胞を効果的に殺菌する手法の探索が今後の課題である。施設的な点に関して、殺菌ガスが漏れいしない密閉した構造が労働衛生の観点から不可欠であることに留意する必要がある。

謝 辞

本研究課題を遂行するにあたり、(公財)浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆様に多大な研究所性を賜りました。心より感謝の意を申

上げます。また、貴財団の益々の発展をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) Montville R and Schaffner DW. Analysis of published sprout seed sanitization studies shows treatments are highly variable. *J Food Prot* 2004;67:758-765.
- 2) Bari ML, Nazuka E, Sabina Y, Todoriki S, Isshiki K. Chemical and Irradiation Treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa, Radish, and Mung Bean Seeds. *J Food Prot* 2003;66:767-774.
- 3) Nei D, Bari ML, Enomoto K, Inatsu Y, Kawamoto S. Disinfection of radish and alfalfa seeds inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* by a gaseous acetic acid treatment. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8:1089-1094.
- 4) Nei D., Enomoto K., Yamamoto K., Large-scale Gaseous Acetic Acid Treatment to Disinfect Alfalfa Seeds Inoculated with *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*, in press
- 5) [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. Reports of selected *E. coli* outbreak investigations. 2013a. Available at <http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>, accessed Dec 20, 2013. (Online)
- 6) [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. Reports of selected *Salmonella* outbreak investigations. 2013b. Available at <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>, accessed Dec 20, 2013. (Online)
- 7) WHO: Outbreaks of *E. coli* O104:H4 infection: update 30. Available at <http://www.euro.who.int/en/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>, accessed Dec 20, 2013. (Online)
- 8) 厚生労働省：食品別の企画基準について。 Available at http://mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/shoku-zen/jigyousya/shokuhin_kikaku/, accessed Dec 20, 2013. (Online)
- 9) Hamanaka D., Yamada, H., Trivittayasil V., Kadoyanagi T., Tanaka F., Uchino T., Effect of Different Heat Treatments on *Bacillus subtilis* Spores Inactivated by Ultraviolet Irradiation. *Food Sci Technol Res*, 2011;17:289-293.
- 10) Nei D, Bari ML, Inatsu Y, Kawasaki S, Todoriki S, Kawamoto S. Combined Effect of Low-Dose Irradiation and Acidified Sodium Chlorite Washing on *Escherichia coli* O157:H7 Inoculated on Mung Bean Seeds. *Foodborne Pathog Dis* 2010;7: 1217-1223.
- 11) National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *Int J Food Microbiol* 1999;52:123-153.

Disinfection of vegetable seeds and spices by a gas treatment

Daisuke Nei

*National Food Research Institute,
National Agriculture and Food Research Organization*

Disinfection plays an important role to reduce contamination levels of pathogenic and/or spoilage bacteria. The present study aimed to develop a novel disinfection technology by using gaseous acetic acid and allyl isothiocyanate (AIT) treatment. The gas treatment was tested for disinfection of vegetable seeds. The majority of sprout-related outbreaks have been associated with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. These outbreaks are ascribed to bacterial contamination of its seeds, and disinfection before sprouting is important to reduce the risks of outbreaks. The disinfection gases were made by heating 0.5 mL and 1.0 mL of acetic acid and AIT, and the alfalfa seeds inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis were treated with the disinfection gases at 55 °C for 1-3 hours. The both of gaseous acetic acid and AIT treatment significantly decreased the population of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* ($p < 0.05$). The populations of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* were reduced by 2.7-2.9 log CFU/g and 2.6-2.8 log CFU/g by the gas treatments for 1 hour, respectively. The reduction was higher with longer time treatments, and more than 3.8 log CFU/g reduction of the pathogens was obtained after 3 hours treatments. Combined treatments of gaseous acetic acid and AIT were effective to reduce the population of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* on alfalfa seeds, and the treatment with the disinfection gas produced from 1 mL of acetic acid and AIT for 2-3 hours reduce the pathogen population to less than the detectable limit (< 1.0 log CFU/g). The gas treatments were also tested to disinfect spices. The significant reduction in *E. coli* O157:H7 population inoculated on fenugreek seeds was observed ($p < 0.05$), and 3.9-5.2 log CFU/g reduction was obtained after 3 hours treatments of gaseous acetic acid and AIT. However, the disinfection ability of combined treatment of gaseous acetic acid and AIT was almost same as a single treatment of acetic acid. For disinfection of spices, spoilage bacteria are also important for food industry. Therefore, the present study attempted to kill *Bacillus subtilis* spores inoculated on black peppers. However, any gas treatment conditions in this study did not show significant reduction in *Bacillus subtilis* population ($p > 0.05$). Although the gas treatment is attractive to reduce the risks of foodborne illness caused by *E. coli* O157:H7 and *Salmonella*, it should be noted that further studies will be needed to kill spores, and to minimize residual smell on treated products.