

一般論文

ガス置換包装における食品関連細菌の挙動

藤井建夫* 杉本和弘* 奥積昌世*

Growth and Survival of Food Related Microorganisms in Modified Atmosphere Packaging

Tateo FUJII*, Kazuhiro SUGIMOTO*, Masayo OKUZUMI*

The growth inhibitory effect of modified atmospheres of 100% CO₂, 60% CO₂ - 40% N₂ or 100% N₂ (v/v) at 10°C was evaluated on 20 strains of indicator/pathogenic and spoilage bacteria which were inoculated on agar plates. All of the tested organisms were inhibited in their growth by the presence of 100% CO₂: the strong inhibitory effect was shown for aerobes such as *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Alteromonas haloplanktis*, *A. putrefaciens* etc. and some facultative anaerobes such as *Staphylococcus aureus* and *B. cereus*, but the effect was somewhat lower for *Escherichia coli*, *Proteus morgani*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium botulinum* etc. The inhibitory effect was bacteriocidal for *Bacillus* strains and bacteriostatic for the rest.

The effect of modified atmosphere packaging on the growth and survival of 4 indicator/pathogenic bacteria which were inoculated into minced sardine meat was also examined during the storage at 10°C. Compared to 100% N₂ which permitted the growth of *E. coli* and *S. thyphimurium* by 0.5 - 2 logs unit during the storage, the presence of CO₂ inhibited the growth of both tested organisms, sustaining the initial inoculum load of 10⁶ /g level. Compared to these indicator/pathogenic bacteria, the numbers of *Staphylococcus aureus* gradually decreased in the presence of CO₂. In case of *Vibrio parahaemolyticus*, owing to low temperature effect, the initial load decreased rapidly irrespective of the kind of atmospheres.

Keywords: Modified atmosphere packaging, Fish, Carbon-dioxide gas, Food related bacteria, Spoilage bacteria, Foodborne pathogen, Growth

ガス置換包装の食品関連細菌の増殖に及ぼす影響を調べた。まず、供試菌20菌株を寒天平板上に接種し、4種の気相(100% CO₂, 60% CO₂ - 40% N₂, 100% N₂, 含気)で10°C培養した結果、CO₂は全供試菌株に対し増殖抑制効果がみられ、とくに*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Alteromonas haloplanktis*, *A. putrefaciens*, *Staphylococcus aureus*等の好気・通性嫌気性菌の増殖を阻止したが、*Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Proteus morgani*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium botulinum*等では培養後7~14日目には弱い増殖がみられた。CO₂の*Bacillus*に対する作用は致死的と考えられた。CO₂に比べN₂の抑制効果は弱かった。

次に、魚肉中での食品衛生細菌の増殖に及ぼすガス組成の影響を10°Cで調べた結果、*E. coli*と*S. thyphimurium*は100% N₂では生菌数の増加がみられたが、CO₂存在下では増殖が抑制された。*S. aureus*はCO₂存在下では菌数が徐々に減少した。*Vibrio parahaemolyticus*では低温による影響が大きく、いずれのガス組成でも生菌数は減少した。

キーワード: ガス置換包装、炭酸ガス、魚肉、食品関連細菌、腐敗細菌、食中毒細菌、増殖

* 東京水産大学食品生産学科 (〒108 東京都港区港南4-5-7) : Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo, 108

1. 緒言

ガス置換包装は密封容器内の気相を炭酸ガスや窒素ガスなどで置換して食品を貯蔵する方法であり、従来に比べ2倍近くシェルフライフが延長できるため、近年、鮮魚やその加工品の流通にも応用され始めている¹⁾が、これまで水産物のガス置換包装に関する微生物面からの研究は少なく、わが国の研究例としては、横関ら²⁾がねり製品の貯蔵効果を調べた例のほか、石川ら³⁾がマアジ開き干しについて、安田ら⁴⁾がハマチについて、木村ら^{5) 6)}がマダイ、マアジ、マサバについて、岡ら⁷⁾がスケトウダラについて、藤井ら^{8) ~11)}がマイワシ、はんぺんについて、山崎ら¹²⁾がスケトウダラについて調べた例がみられる程度である。

しかし、この貯蔵法は従来とは異なる貯蔵原理による方法であるため、とくに、食品中での食中毒菌の挙動など微生物学的安全性についての検討は不可欠であるが、これら食品衛生学的な観点からの研究^{13) ~16)}はほとんど行われていない。

そこで、ここでは代表的な腐敗細菌、食中毒菌および衛生指標細菌等について、平板上および魚肉中での増殖に及ぼすガス置換包装の影響を調べた。

2. 実験方法および材料

2.1 供試魚肉

鮮魚店で購入したマイワシ *Sardinops melanostictus* の表皮を剥ぎ、包丁で5mm角程度に砕いたミンチ肉を用いた。

2.2 供試菌株

Staphylococcus aureus 209P, *S. aureus* IAM1098, *Escherichia coli* IAM12119, *Bacillus subtilis* IAM1026, *B. subtilis* IAM12118, *B. cereus* S6, *Clostridium botulinum* S20, *Vibrio parahaemolyticus* S7, *Vibrio* S8, *Photobacterium phosphoreum* N156, *Salmonella typhimurium* S9, *Proteus morganii* S10, *Pseudomonas fluorescens* IAM12022, *Alteromonas haloplanktis* IAM12915, *A. putrefaciens* IAM12089, *P. aeruginosa* IAM1514, *Streptococcus faecalis* IFO8033, *Acinetobacter* S16, *Saccharomyces cerevisiae* IAM4512, *Torulopsis* B261を用いた。これらのうち、*S. aureus*と*P. phosphoreum*はBPGブイヨン⁸⁾で25℃2日間、*S. cerevisiae*, *Torulopsis*はPDA寒天培地で15℃2日間、*C. botulinum*はGAMブイヨンで15℃2日間、その他の菌株はBPGブイヨンで15℃2日間培養後、いずれもさらに10℃で3時間培養し、以下の実験に用いた。

2.3 寒天培地上での増殖試験

上記の供試菌株のうち *S. cerevisiae* と *Torulopsis* はPDA寒天平板培地に、*C. botulinum* はGAM寒天平板培地に、その他の菌株はBPG寒天平板培地に画線接種し、嫌気ジャー中に脱酸素剤とともに入れ、3種の気相(CO₂:N₂=100:0, 60:40, 0:100)下で10℃、2週間培養し、その際の増殖を経時的に調べた。これらの平板は2週間後に含気条件下に移し、その後の増殖を調べた。なお以上3区のほか、含気区として各平板を密封せずに10℃で培養した。

2.4 魚肉中での増殖試験

V. parahaemolyticus, *S. typhimurium*, *S. aureus* (209P), *E. coli*をそれぞれ初発菌数が 10^6 /gになるように魚肉のコンポジット試料に接種し、ポリ袋(ストマッカー80形用、オルガノ社製)に5gずつ分け入れたもの(開封のまま)を嫌気ジャー(三紳工業製)に脱酸素剤(ケブロン1号DL型、ケブロン社製)とともに密封後、真空ポンプを用いて3種の気相($\text{CO}_2:\text{N}_2=100:0, 60:40, 0:100$)で2回置換し、 10°C に貯蔵した。なお、以上の3区のほか、含気区としてポリ袋に入れた同試料を密封せずに 10°C に貯蔵した。これら貯蔵中の各試料より5gずつを経時的に取り出し、その生菌数をそれぞれ、好気性菌用にはBPG寒天培地⁹⁾(25°C 5日間培養)、嫌気性菌用にはGAM寒天培地(30°C 48時間培養)、*V. parahaemolyticus*用にはTCBS培地(35°C 24時間培養)、*S. typhimurium*用にはDHL寒天培地(35°C 24時間培養)、*S. aureus*用にはマンニット食塩培地(35°C 24時間培養)、*E. coli*用にはデスオキシコーレイト培地(35°C 24時間培養)を用いて測定した。対照として上記菌株を接種しない魚肉試料についても同様に生菌数を測定した。

3. 結果および考察

種々のガス組成下における平板上での各供試菌株の増殖をTable 1に示す。好気性菌の*B. subtilis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *A. haloplanktis*, *A. putrefaciens*, *Acinetobacter*, *Torulopsis*は炭酸ガス存在下では増殖がまったく確認できなかったが、このうち*Torulopsis*を除いては、窒素ガス区では弱い

増殖がみられた。これらを含気区に移した場合には、*B. subtilis* IAM1026の炭酸ガス区および混合ガス区、*B. subtilis* IAM12118の炭酸ガス区では増殖がみられなかったが、その他は増殖を示した。

通性嫌気性菌のうち、*S. aureus*と*B. cereus*では上記の好気性菌と同様、炭酸ガス存在下では増殖がみられなかった。*V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*は炭酸ガス区および混合ガス区で弱い増殖を示し、*P. morganii*, *E. coli*および*P. phosphoreum*は混合ガス区でも含気区とほぼ同等の増殖がみられたが、炭酸ガス区では弱い増殖を示した。*Vibrio* sp.は炭酸ガス区より混合ガス区の方が増殖が速かった。*E. coli*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*および*S. cerevisiae*は窒素ガス区では対照区より増殖が遅く、その他の菌株では両区における増殖の差異はみられなかった。これらを含気区へ移した場合には、炭酸ガス区および混合ガス区の*B. cereus*では増殖が確認できなかったが、その他の菌株では徐々に増殖が認められた。

微好気性菌の*S. faecalis*は対照区より窒素ガス区および混合ガス区の方が増殖が速かった。含気区に移した場合にも増殖に影響はみられなかった。

嫌気性菌の*C. botulinum*は好気条件下では増殖しなかったが、窒素ガス下では良好な増殖を示し、炭酸ガス存在下でも弱い増殖が認められた。

寒天平板上での食品関連細菌の増殖に及ぼすガス組成の影響を調べた例として、星野ら¹⁰⁾は各種細菌に対する脱酸素剤嫌気下での炭酸ガスの影響を寒天平板法で検討し、 37°C 培養時における炭酸ガスの影響は、好気性菌

Table 1 Effect of modified atmospheres (MA) on the growth of food related microorganisms at 10°C

Organism	During MA storage												Air holding after MA storage*1											
	3*2				8				14				(3)*3				(8)				(14)			
	A	N ₂	M	CO ₂	A	N ₂	M	CO ₂	A	N ₂	M	CO ₂	A	N ₂	M	CO ₂	A	N ₂	M	CO ₂	A	N ₂	M	CO ₂
<i>Bacillus subtilis</i> IAM1026	W	-	-	-	+	W	-	-	+	W	-	-	W	-	-	W	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> IAM12118	W	-	-	-	+	W	-	-	+	W	-	-	W	-	-	W	-	-	W	-	-	W	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM12022	+	W	-	-	++	W	-	-	++	W	-	-	+	W	+	+	W	+	+	++	++	++	++	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM1514	W	W	-	-	+	W	-	-	+	W	-	-	+	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Alteromonas haloplanktis</i> IAM12915	+	W	-	-	++	W	-	-	++	W	-	-	+	-	-	++	+	+	++	++	++	++	++	
<i>Alteromonas putrefaciens</i> IAM12089	+	W	-	-	+	W	-	-	+	W	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Acinetobacter</i> sp. S16	+	W	-	-	+	W	-	-	+	W	-	-	+	W	W	++	+	+	++	++	++	++	++	
<i>Torulopsis</i> sp. B216	W	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	+	+	+	++	+	+	++	++	++	++	++	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	W	W	-	-	W	W	-	-	W	W	-	-	W	-	-	W	W	W	+	+	W	W	W	
<i>Staphylococcus aureus</i> IAM1098	W	W	-	-	W	W	-	-	W	W	-	-	W	-	-	W	W	W	+	+	W	W	W	
<i>Bacillus cereus</i> S6	W	W	-	-	+	W	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Escherichia coli</i> IAM12119	+	+	W	W	+	+	W	++	+	+	W	++	+	+	W	++	+	+	++	++	++	++	++	
<i>Salmonella typhimurium</i> S9	W	W	-	-	+	+	W	W	+	+	W	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Proteus morgani</i> S10	W	W	W	W	+	+	+	W	+	+	+	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> S7	++	W	W	W	++	W	W	W	++	+	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Vibrio</i> sp. A403	+	+	-	W	+	+	W	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	
<i>Photobacterium phosphoreum</i> N156	+	+	W	-	+	+	W	W	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM4512	+	+	-	W	+	+	W	W	++	+	+	+	++	+	+	++	+	+	++	++	++	++	++	
<i>Streptococcus faecalis</i> IF08033	W	+	-	W	+	W	-	W	+	+	W	+	+	W	+	+	W	+	+	W	+	+	W	
<i>Clostridium botulinum</i> S20	-	+	W	W	-	+	W	W	-	+	W	W	+			+			+			+		

*1 Transferred from MA storage into air except for *C. botulinum* which was transferred from air into nitrogen.

*2 Storage period under MA at 10°C (days).

*3 Air holding period at 10°C after MA storage (days).

Symbols: A, air; M, mixed gas (N₂:CO₂=40:60); -, no growth; W, weak growth within 1mm width on streaked line; +, 2~3mm; ++, more than 4mm.

に対しては菌の種類によって異なるが、*Lactobacillus viridescens* などの微好気性細菌と *C. perfringens*, *Bacteroides fragilis* などの偏性嫌気性細菌では嫌気状態で炭酸ガスがゼロまたは低濃度のときに増殖が顕著に抑制されることを報告している。また、木村ら⁶⁾ は平板上での供試菌の増殖に及ぼすガス組成の影響を5°Cで調べた結果、*E. coli*, *C. perfringens* は培養6日目にも菌数は変化しなかったが、*S. aureus* はわずかに増加し、*V. parahaemolyticus* ではいずれの区とも6日目には1/10以下に減少することを報告して

いる。

魚肉試料に各供試菌株を接種し、種々のガス組成下で貯蔵した際の供試菌株の消長を Fig. 1 に示す。*S. aureus* の菌数は、含気区を除いてはいずれも貯蔵後減少の傾向を示した。貯蔵13日目以降に、炭酸ガス区以外の実験区で生菌数の増加がみられるが、これは供試菌株未接種魚肉のマニット食塩培地での生菌数変化の傾向(データ未掲載)と一致することから、試料中の好塩性細菌の増加によるものと思われた。*S. typhimurium* は含気区と窒素ガス区では増加したが、炭酸ガス存

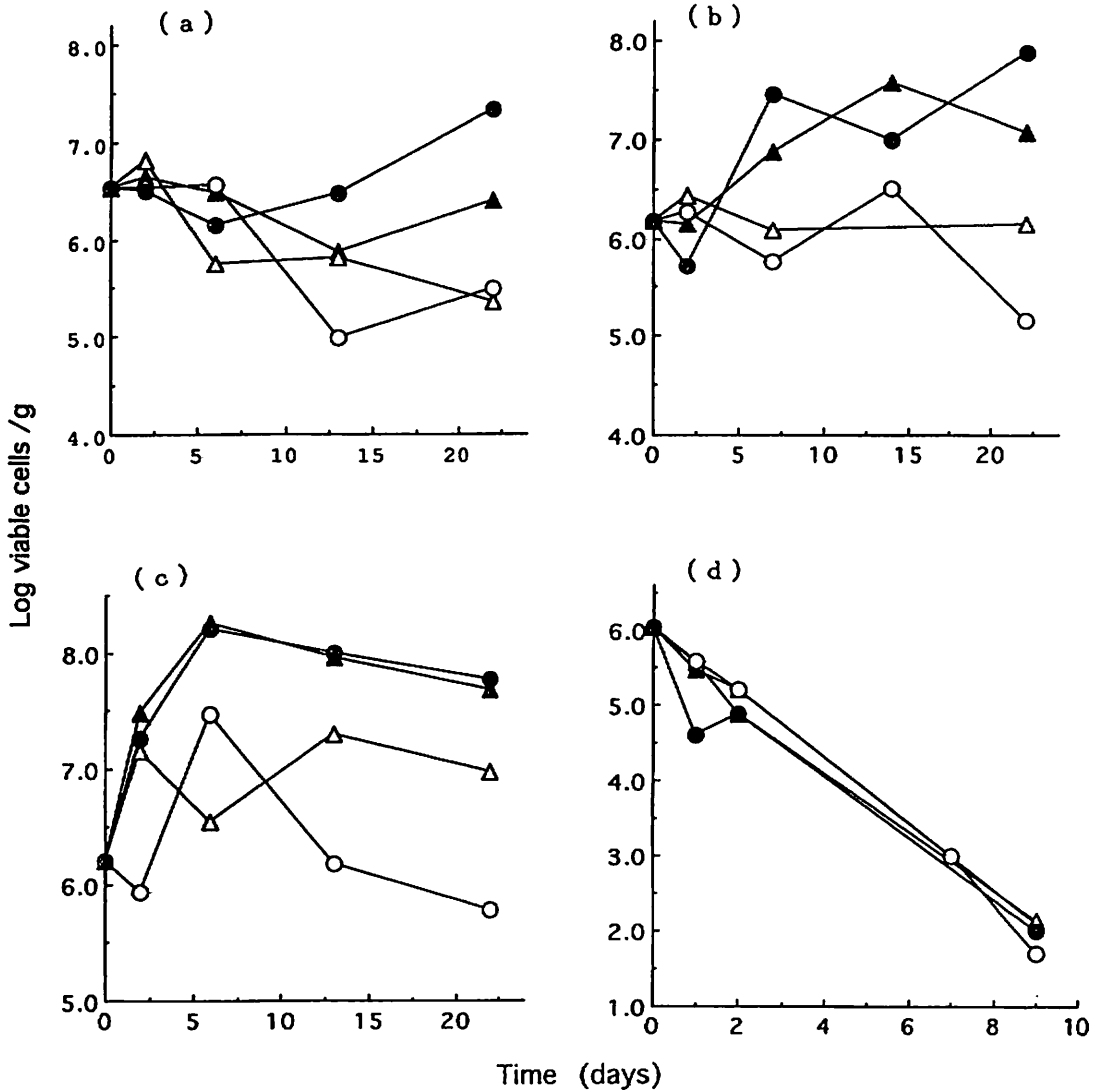


Fig. 1 Effect of modified atmospheres on (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Salmonella typhimurium*, (c) *Escherichia coli*, and (d) *Vibrio parahaemolyticus*.

●, Air; ▲, 100% N₂; △, 40% N₂ + 60% CO₂; ○, 100% CO₂.

在下では増殖が抑制された。*E. coli*は *S. typhimurium*の場合と同様に、窒素ガスでの抑制効果はみられず、炭酸ガスによる抑制効果が認められた。*V. parahaemolyticus*では含気区を含めいずれの実験区とも生菌数が急速に減少することから、低温による影響が大

きいと思われた。

わが国でガス置換貯蔵中の魚肉における食品関連細菌の挙動について調べた例として、岡ら¹³⁾がメバチマグロ肉に *E. coli*, *S. aureus* および *C. perfringens* を接種し、25°C で貯蔵中の増殖パターンについて検討した結果に

よると、*E. coli* および *S. aureus* では混合ガス (CO₂ : N₂ = 60 : 40) 置換により弱い菌の増殖抑制効果が認められたのに対し、*C. perfringens* ではガス置換による菌の増殖抑制効果はみられなかったことを報告している。しかしこの例は 25℃ における結果であり、一般に低温貯蔵との併用が行われるガス置換貯蔵時の細菌の挙動を直ちに推定することは難しいと考えられる。

最近、木村ら¹⁵⁾ は窒素ガス、炭酸ガスおよび含気条件下で 5℃ 貯蔵したアジ肉中での食品関連細菌の消長を季節毎に調べているが、その結果では *S. aureus* は検出されず、*E. coli* 及び *V. parahaemolyticus* は夏季に検出される例がみられたが、その場合もその後いずれの貯蔵区でも減少し、貯蔵 6 日目には検出されなくなった。

これらの結果を総合して食品関連細菌に対する炭酸ガスの影響を考えると、*Bacillus* 属細菌に対しては致死的に作用し、その他の好気性腐敗細菌や *S. aureus* などに対しても増殖抑制効果がみられ、魚肉の保全に効果を発揮するが、*S. thyphimurium*, *E. coli* など腸内菌や *C. botulinum* に対しては、増殖抑制効果がみられるものの、好気性菌に対する場合ほどは期待できないようである。このような問題は、*Clostridium* 属細菌の孢子発芽が炭酸ガスによって促進されるという報告¹⁷⁾ もあり、今後検討すべき重要な問題と考えられる。

<文 献>

- 1) J. M. Farber, J. Food Prot., 54, 58 (1991)
- 2) 横関源延、内山均、天野慶之：日水誌、22, 35 (1956)
- 3) 石川宣次、中村邦典、藤井建夫、東海水研報、(110), 59 (1983)
- 4) 安田松夫、西野甫、千葉時子、中野久子、横山理雄：包装研究、8 (1), 1 (1987)
- 5) 木村凡、村上正忠：水産大学校研究報告、37, 129 (1989)
- 6) B. Kimura, M. Murakami, Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 573 (1991)
- 7) 岡重美、西沢洋一、高間浩蔵、北大水産彙報、40, 138 (1989)
- 8) 藤井建夫、平山昌広、奥積昌世、安田松夫、西野甫、横山理雄、日水誌、55, 1971 (1989)
- 9) T. Fujii, M. Hirayama, M. Okuzumi, M. Yasuda, H. Nishino, M. Yokoyama, Nippon Suisan Gakkaishi, 56, 837 (1990)
- 10) 藤井建夫、西忠嗣、奥積昌世、安田松夫、西野甫、横山理雄、日食工誌、12, 1124 (1991)
- 11) 藤井建夫、野間田泰、奥積昌世、安田松夫、西野甫、横山理雄、日本包装学会誌、1, 53 (1992)
- 12) 山崎浩司、川合祐史、猪上徳雄、信濃晴雄、北大水産彙報、43, 115 (1992)
- 13) 岡重美、伊藤博司、高間浩蔵、北大水産彙報、43, 105 (1992)
- 14) 荻原博和、蟹江誠、矢野信禮、春田三佐夫、日本食品衛生学会、第 62 回講要、p.71 (1991)
- 15) B. Kimura, M. Murakami, Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 1163~1169 (1993)
- 16) 星野純、藤波一男、上野一恵、食品と微生物、3, 95 (1986)
- 17) S. O. Enfors, G. Molin, J. Appl. Bacteriol., 45, 279 (1978)

(原稿受付 1993年5月20日)
(審査受理 1993年6月16日)