

梅果汁粉末添加による食品中の細菌増殖抑制効果の検証 (2)

野村 卓正*・齋藤 佑衣*・坂口 芽生*・西川 知里*・千葉 歩美**・谷 政八***

仁愛大学人間生活学部健康栄養学科*・人間総合科学大学人間科学部ヘルスフードサイエンス学科**・仁愛大学名誉教授***

Verification of the Effect of Addition of Plum Juice Powder to Food on the Inhibition of Bacteria Growth in the Food (2)

Takamasa NOMURA*, Yui SAITO*, Mei SAKAGUCHI*, Chisato NISHIKAWA*,
Ayumi CHIBA** and Masahachi TANI***

*Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life, Jin-Ai University,

**Department of Health Food Sciences, Faculty of Human Sciences, University of Human Arts and Sciences Japan,

***Emeritus professor of Jin-Ai University

福井県産紅映梅果汁粉末が持つ細菌増殖抑制効果を利用して、梅果汁粉末を白飯へ添加することにより食中毒予防効果が期待できることをこれまでに報告してきた。本研究では、製品化にあたり残っている3つの課題について検証を行った。

最初に、未消毒の手指による不衛生な調理でにぎりめしに付着した手指由来の細菌に対しても増殖抑制効果があるか検証した。その結果、汚染指標菌の表皮ブドウ球菌とほぼ同等の増殖抑制効果が得られることが明らかになった。次に、炊飯後に添加する従来法では、大量の白飯に梅果汁粉末を均一に混和することは困難であったため、炊飯前の浸漬水に混和してから炊飯する方法を検討した。その結果、炊飯前に浸漬水へ添加することにより、炊飯加熱後に細菌増殖抑制効果を減弱させることなく、炊飯後の白飯全体に均一に混和させられることが証明された。最後に、梅果汁粉末および製品化された「Safety Ball の素」の細菌増殖抑制効果の有効時間を検証したところ、調理後、30℃で72時間保存した後も、検出された細菌数は食中毒発症の危険水準である 10^6 個/gを下回ることが明らかになった。

これらの検証成績から、手指等から持ち込まれる黄色ブドウ球菌に起因する食中毒を予防するための衛生効果を備えた備蓄食材として実用化できる可能性が示唆された。

キーワード：ブドウ球菌，食中毒予防，梅果汁粉末

1. はじめに

1.1. 昨年度の報告の概要

我々は、前年度(2021年)の報告で、実験的にヒトの体表面の常在細菌である表皮ブドウ球菌を 10^4 個/g接種し、30℃で24～48時間保存したにぎりめし中の表皮ブドウ球菌の増殖が、福井県産紅映梅由来の梅果汁粉末を添加することによって強く増殖抑制されることを報告した¹⁾。この研究では、手指からの汚染指標菌として

表皮ブドウ球菌を用いた結果であるが、食中毒起因菌の一つである黄色ブドウ球菌の増殖ならびに毒素産生を抑制し、食中毒予防効果を期待できることが示唆された。天然のクエン酸を主成分とする梅果汁粉末には、食品中の食中毒起因細菌の増殖を抑制する効果が認められ、手洗いや冷蔵保存等の衛生管理が難しい避難所などにおいて、手指等から持ち込まれる黄色ブドウ球菌に起因する食中毒事故を予防するための衛生効果を備

えた備蓄食材として有効に利用できる可能性が示唆された。

1.2. 本研究の目的

我々の先行研究では、梅果汁粉末による細菌増殖抑制効果が証明された¹⁾。しかし、その一方で、①実際に不衛生な手指で調理した場合でも増殖抑制効果が認められるのか、②大量調理時に梅果汁粉末を均一に混和することが困難であること、③さらに長時間の保存に耐えうるのかといった問題点が解決すべき課題として残った。

そこで、本研究では、最初に汚染指標菌である表皮ブドウ球菌を一定量実験的に接種するのではなく、未消毒の不衛生な手指、あるいは消毒済の衛生的な手指で調理した場合の汚染菌の増殖抑制効果を検証した。次に、大量調理時に梅果汁粉末を均一に混和することが困難である問題に対して、従来は炊飯後に梅果汁粉末を混和していたが、本研究では炊飯前の浸漬水に混和して炊飯を行うことで均一に梅果汁粉末が混ざるかどうか、また、細菌増殖抑制効果が減弱しないかどうかを検証した。さらに、既報より長く72時間まで保存して検証することにした。

2. 材料と方法

2.1. 細菌培養用培地類および試薬類

- ・平板寒天培地：普通寒天培地、パールコア標準寒天培地あるいはパールコアマンニト食塩培地の粉末を三角フラスコに秤量し、蒸留水を加えて溶解した。オートクレーブにて高圧蒸気滅菌 (121℃, 15分) 後、無菌的に滅菌シャーレに分注し固化させた。
- ・滅菌済PBS (-)：試薬瓶 (500mL) にPBSタブレット1つにつき100mLの蒸留水を加えて、完全に溶けるまで攪拌した。溶解後、オートクレーブ (121℃, 15分) にて高圧蒸気滅菌した。
- ・滅菌済0.9%生理的食塩水：試薬瓶 (500mL) に塩化ナトリウム4.05gを秤量し、蒸留水450mLを加えて溶解後、オートクレーブにて高圧蒸気滅菌 (121℃, 15分) した。

2.2. 食材

本研究では、炊飯時に使用する精白米として福井県産コシヒカリ (無洗米) を用いた。梅果汁粉末は、若狭産「紅映」果汁を粉末化した梅果汁粉末製剤を用いた (カワイマテリアル株式会社, 福井)。また、白飯に混和した食塩および旨味調味料類は、以下の通りである。

- ・食塩 (アジシオ, 味の素株式会社, 東京)
- ・食酢 (酢酸)
- ・サバ節粉末 (さば節【枕崎産】, ハーベスト有限会社, 静岡)
- ・混合だし粉末 (食べられるかつお椎茸昆布だし【無添加】, ハーベスト有限会社, 静岡)

また、紅映梅果汁粉末を用いて製品化された「SafetyBallの素」(カワイマテリアル株式会社, オグラヤ商事株式会社, 福井) を用いた。「SafetyBallの素」の原材料組成を表1に示した。

表1 「Safety Ball の素」の原材料組成

紅映梅果汁パウダー	70.00%
食塩	17.00%
L-グルタミン酸ナトリウム	11.67%
5'-リボヌクレオチド二ナトリウム	1.04%
L-アスパラギン酸ナトリウム	0.26%
コハク酸二ナトリウム	0.03%

2.3. 本試験

2.3.1. 不衛生調理による汚染の検証

炊飯後の白米200gに食塩 (塩化ナトリウム), 食酢, 紅映梅果汁粉末をそれぞれ2.0g (1%) および6.0g (3%) 添加し, 均一になるようによく混和した。未消毒の不衛生な手指あるいは消毒した衛生的な手指でそれぞれ各群6個ずつにぎりめしを調理した。無添加の白米に市販梅干しを1粒加えて梅にぎりめしも調理した。30℃で24時間保存後, 各にぎりめしの外側2か所および内側1か所から2.0gずつ, 無作為に秤量・採取して, それぞれ滅菌バッグに移して, 一般生菌数検査¹⁾を行った。

2.3.2. 炊飯前添加による均一性の検証

精白米1合 (150g, 炊飯後, 約300g) を計量した後, 家庭用炊飯器 (アイリスオーヤマ株式会社, 圧力IHジャー炊飯器米屋の極み) に入れて, 水道水150mLを

加水して30分浸漬した。その後、梅果汁粉末及び調味料を配合・混和した後、炊飯した(図1左)。炊飯後の白飯重量を1合あたり約300gと想定して配合比率(炊飯後の白飯中における最終濃度)を表2に記す。

今回は、食塩のみを1%配合した群(食塩群)、食塩

表2 白飯1合あたりの配合量

	精白米(1合=150g)			
	食塩	梅果汁粉末	サバ節	混合出汁
	1.0%	5.0%	1.0%	1.0%
食塩群	3.0g			
梅果汁群	3.0g	15.0g		
サバ節群	3.0g	15.0g	3.0g	
混合出汁群	3.0g	15.0g		3.0g

1%に梅果汁粉末5%を加えた群(梅果汁群)、さらに梅果汁群にサバ節粉末1%を配合した群(サバ節群)、梅果汁群にカツオ、昆布、椎茸の混合だし粉末1%を配合した群(混合出汁群)の4群を検討した。

既報では、炊飯後に混和する梅果汁粉末の最終配合比率を0.3、1.0、3.0%で予備検討し、最も細菌増殖抑制効果の高かった3.0%を採用した(0.3%および1.0%では有効な抗菌効果は発揮されなかった)。一方、炊飯前に混和する本研究では、梅果汁粉末の最終配合比率を3.0、5.0、7.0%で予備的に検討した。その結果、3.0%および5.0%では炊飯後に梅の風味が減弱していたが、7.0%では梅の風味がかなり残留して食べにくかった。この予備試験の結果から、5.0%がより強い細菌増殖抑制効果を期待でき、青梅の風味がほどよく残り、かつ

旨味調味料と相乗効果を発揮しうる濃度と考えられたため、本研究での梅果汁粉末の配合比率(最終濃度)を5.0%と設定した。

炊飯後、水洗後にアルコール消毒していない不衛生な手指でそれぞれ各群4個ずつにぎりめしを調理した(4名で各4個ずつ)。にぎりめしは30℃で24時間保存後に各にぎりめしの外側2か所および内側1か所から2.0gずつ、無作為に秤量・採取して、それぞれ滅菌バッグに移して、一般生菌数検査¹⁾を行った(図1右)。

2.3.3. 長時間保存の検証

炊飯前の精白米150g(炊飯後300g)に食塩(塩化ナトリウム)3.0g(1%)、食塩3.0g(1%)+紅映梅果汁粉末15.0g(5%)あるいはSafetyBallの素18.0g(6%)を添加し、均一になるようによく混ぜ30分間浸漬した。炊飯後、アルコール消毒していない不衛生な手指でそれぞれ各群12個ずつにぎりめしを調理(9名で各4個ずつ)し、30℃で0~72時間まで保存した。経時間的に0および24、48、72時間後に、各群3個のにぎりめしの外側2か所および内側1か所から2.0gずつ、無作為に秤量・採取して、それぞれ滅菌バッグに移して、一般生菌数検査¹⁾を行った(図1)。

2.4. pH測定

食塩、食酢あるいは梅果汁粉末を添加して調理したにぎりめしのpHを以下の方法で測定した。にぎりめしから2.0gを秤量・採取し、滅菌バックに入れ破碎した。蒸留水を18mL加え、よく混和した(10倍希釈原液)。簡易型pH測定器を用いて、各破碎原液のpH

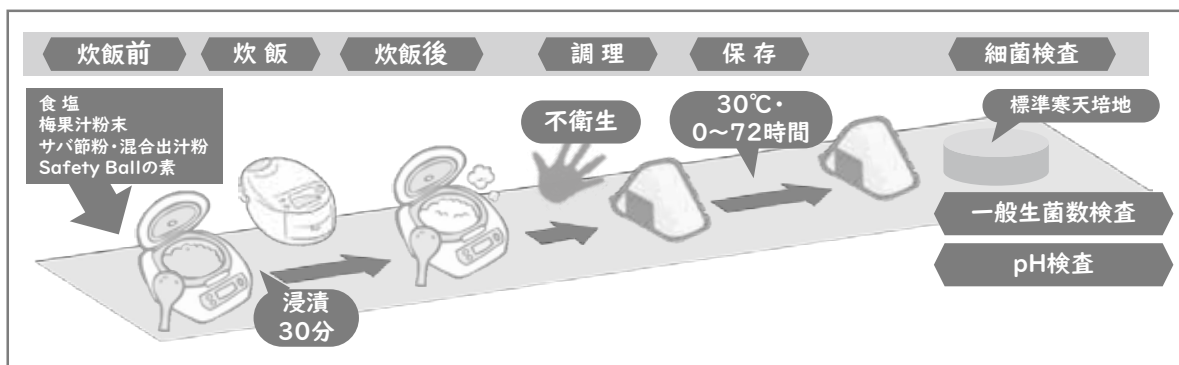


図1 本試験の実験工程図

を測定した。

2.5. 統計処理

対照群と各実験群の2群間の有意差を、マイクロソフトExcelによるt検定で検定した。p=0.05未満の場合、有意差ありとした。

3. 結果と考察

3.1. 不衛生な手指で調理した場合の汚染菌の増殖抑制効果の検証

先行研究では、不衛生な手で調理したにぎりめしには、ばらつきはあるが、おおむね外側(3ヵ所の平均値)で約 $10^1 \sim 10^4$ 個/g、内側からは約 $10^0 \sim 10^3$ 個/gの細菌が付着することがわかった¹⁾。ブドウ球菌も被験者間でばらつきが見られ、外側(3ヵ所の平均値)で約 $10^0 \sim 10^3$ 個/g検出されたが、内側からは1人を除いて検出されなかった。一方、衛生的に調理した場合、細菌がどの程度付着するのか検討していなかった。そこで、不衛生な手指で調理した場合とアルコール消毒済の衛生的な手指で調理した場合の汚染度の差異を検証した。その結果、消毒した手指で衛生的に調理した無添加のにぎりめしでは、細菌数が30℃で24時間保存後でも外側で約 10^3 個/g、内側で約 10^1 個/gと食中毒を発症しうる危険水準の 10^6 個/gを大きく下回っていた(図2)。一

方、不衛生な手指で調理した無添加のにぎりめしでは、細菌数が30℃・24時間保存後に外側で約 10^6 個/g、内側でも 10^5 個/gと衛生的に調理した場合の約1,000倍多く検出され、食中毒を発症しうる危険水準に達していた(図2)。

この不衛生な調理による24時間保存後の細菌増殖は、食塩添加あるいは具材として梅干しを加えても抑制されることはなかった(図2)。一方、食酢を添加(酢飯)した場合、24時間保存後の細菌汚染は外側で約 10^3 個/g、内側 10^1 個/g、梅果汁粉末を添加した場合でも、外側で約 10^4 個/g、内側 10^3 個/gと、24時間保存後の細菌増殖が強く抑制され、食中毒発症の危険水準を下回っていた(図2)。

したがって、不衛生な手指で調理せざるをえないよりリスクの高い現実的なシチュエーションにおいても、梅果汁粉末の添加によって、食中毒を予防しうる可能性が示された。

3.2. 炊飯法の検証

不衛生な手で握り飯を調理した結果、食塩のみの群(食塩群)では、30℃・24時間保存後の細菌数が平均で外側約 10^7 個/g、内側 10^6 個/gとなり、外側で黄色ブドウ球菌による食中毒発症の危険基準である 10^6 個/gを上回った(図3)。一方、食塩に加えて梅果汁粉末を添

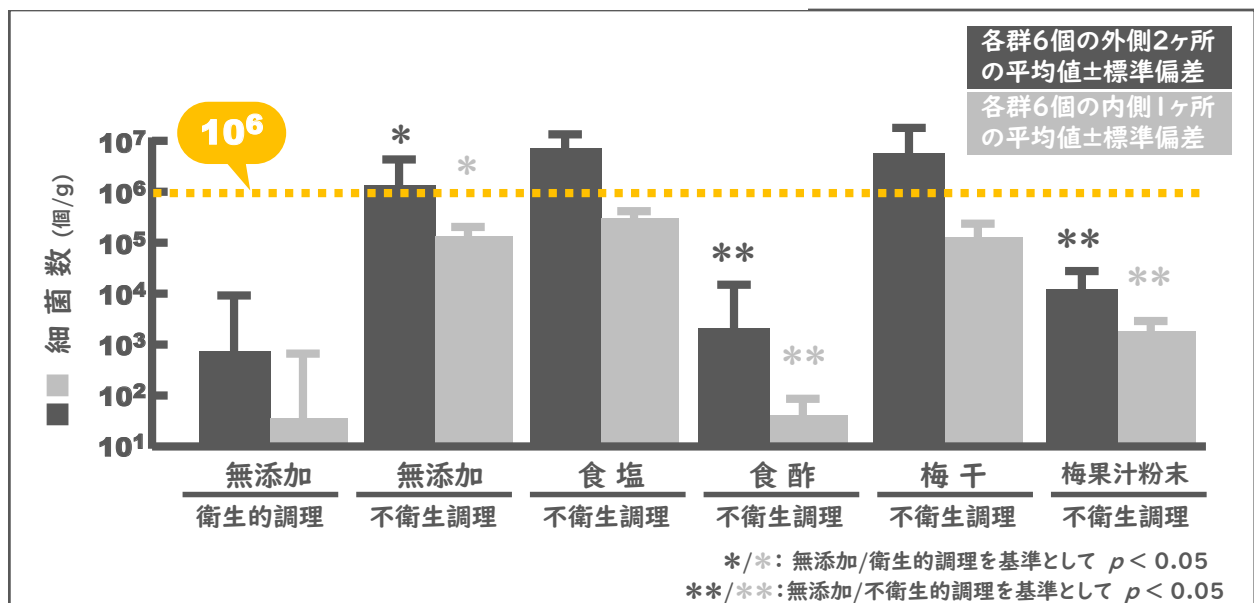


図2 不衛生な手指あるいは衛生的な手指による調理による汚染度の検証

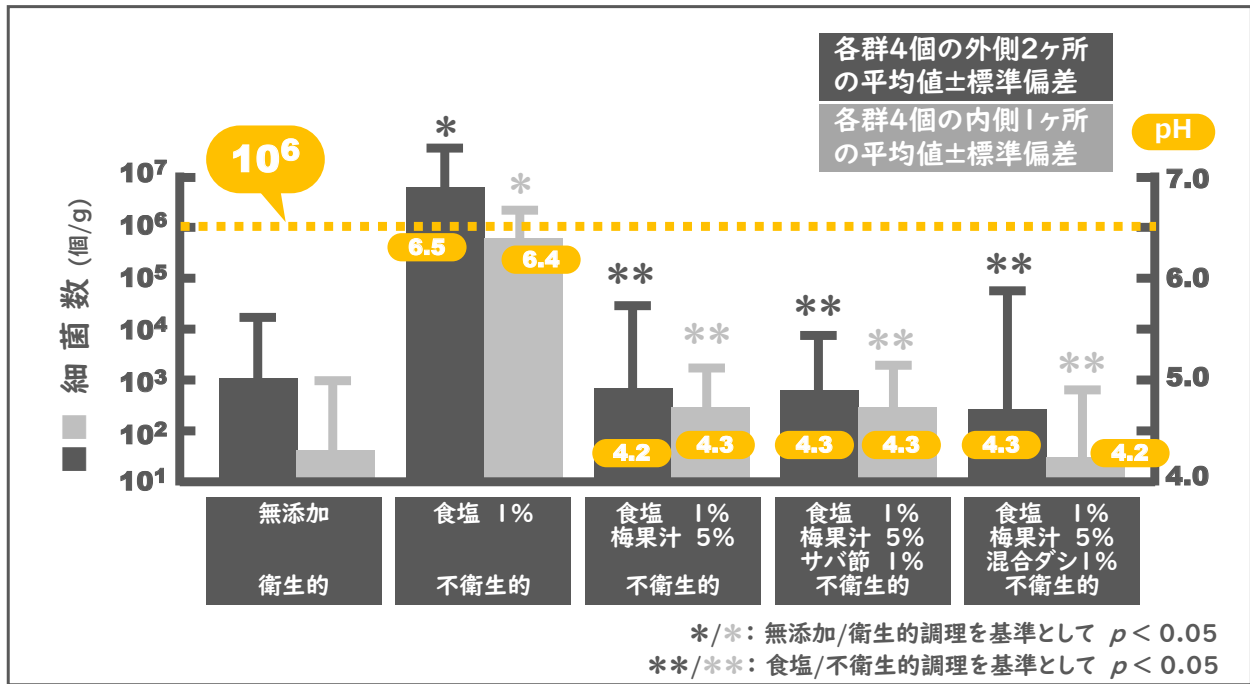


図3 炊飯前添加による調理後の均一拡散性の検証

加した群(梅果汁群)では外側 10^3 個/g, 内側 10^3 個/g, 梅果汁群にサバ節を添加した群(サバ節群)では外側 10^3 個/g, 内側 10^3 個/g, 梅果汁群に混合出汁を添加した群(混合出汁群)では外側 10^3 個/g, 内側 10^2 個/gの細菌数が検出され, 梅果汁粉末を加えない群(梅果汁群, サバ節群, 混合出汁群)でも $30^{\circ}\text{C}\cdot 24$ 時間後でも食中毒の危険基準を下回っていた(図3)。また, 検査したすべての部位で食中毒のリスク基準を下回っていた。

各検査群のpHは, 食塩群は内側pH 6.5 ± 0.1 , 外側pH 6.4 ± 0.3 と中性だったが, 梅果汁粉末が混和されている梅果汁群, サバ節群, 混合出汁群ではそれぞれ(梅果汁群)内側pH 4.3 ± 0.1 , 外側pH 4.2 ± 0.1 (サバ節群)内側pH 4.3 ± 0.1 , 外側pH 4.3 ± 0.1 (混合出汁群)内側pH 4.3 ± 0.1 , 外側pH 4.2 ± 0.1 といずれもpH4.5以下を維持していた(図3右軸)²⁾。

炊飯前の浸漬水に梅果汁粉末を混和することで, すべての検体で24時間後でも黄色ブドウ球菌による食中毒発症の危険基準である 10^6 個/gを下回った。各検体のpHもすべての検体で4.5以下を維持しており, 検体間の誤差も小さかった。これらの検査成績から, 混和した梅果汁粉末は, 有機酸を添加した場合と同程度に, 炊飯後の白飯中に拡散されていると考えられた³⁾。

細菌増殖抑制試験による検証の結果, 炊飯前の水に混和・浸漬してから加熱炊飯しても, 炊飯後に混和する既報の結果と同様な細菌増殖抑制効果が観察されたことから, 炊飯前に梅果汁粉末を混和しても, 炊飯加熱中に抗菌成分(クエン酸)が揮発したり失活することなく, 細菌増殖抑制効果が維持されることが明らかになった⁴⁾。さらに, 風味改善のために少量のサバ節粉や混合出汁粉等の旨味調味料を添加しても, 梅果汁粉末の細菌増殖抑制効果にはほとんど影響がないことも明らかになった。

3.3. 長時間保存時の細菌増殖抑制効果の検証

我々の先行研究を含め, これまでは調理後, $30^{\circ}\text{C}\cdot 24$ 時間以内の保存後の細菌増殖を検証してきたが, 実際の災害避難ではさらに長く常温保存する可能性も否定できない。そこで, 調理後から72時間後(3日後)まで経時的に細菌数を定量検査した。

炊飯前の精白米150g(炊飯後300g)に食塩(塩化ナトリウム)3.0g(1%)だけを添加した場合, 調理直後(0時間)に外側約 10^2 個/g, 内側約 10^1 個/g付着した細菌数は, 24時間後には, 外側約 10^7 個/g, 内側約 10^6 個/gと食中毒発症の危険水準まで増殖し, 48時間後, 72時間後もほぼ同数の細菌数が維持されていた(図4)。

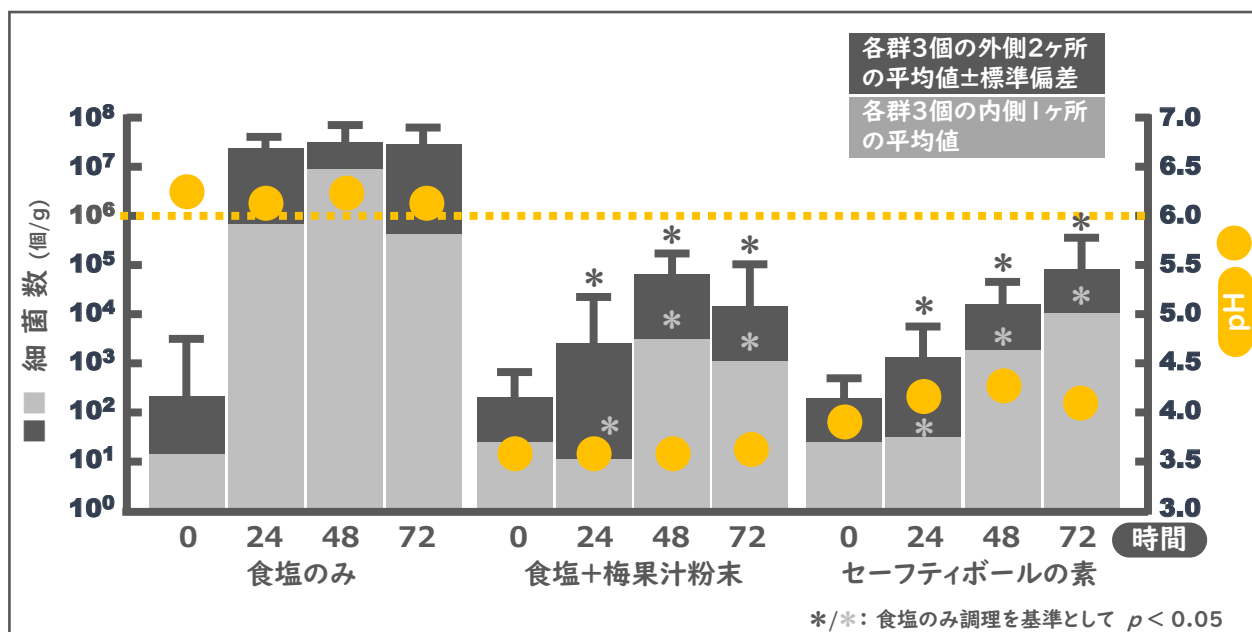


図4 長時間保存後の増殖抑制効果の検証

一方、食塩 (1%) + 梅果汁粉末 (5%) を添加した場合には、調理直後 (0時間) に外側約 10² 個/g、内側約 10¹ 個/g 付着していた細菌数は、24時間後には、外側約 10⁴ 個/g、内側約 10¹ 個/g、48時間後には、外側約 10⁵ 個/g、内側約 10⁴ 個/g、72時間後には、外側約 10⁴ 個/g、内側約 10³ 個/g と 72時間後まで食中毒発症危険水準を上回ることがないまま推移した (図4)。

さらに、SafetyBallの素 (6%) を添加した場合でも、調理直後 (0時間) に外側約 10² 個/g、内側約 10¹ 個/g 付着していた細菌数は、24時間後には、外側約 10³ 個/g、内側約 10² 個/g、48時間後には、外側約 10⁴ 個/g、内側約 10³ 個/g、72時間後には、外側約 10⁵ 個/g、内側約 10⁴ 個/g と緩やかな増殖が認められたが、72時間後まで食中毒発症危険水準を上回らないまま推移した (図4)。

以上の結果より、梅果汁粉末の添加により、24時間を超えても食中毒予防効果を期待できることがわかった。しかし、緩慢にはあるが増殖しており、完全に増殖抑制できているわけではないため、調理後のにぎりめしは、なるべく早く消費する方が安全であろう。

3.4. 本研究のまとめ

我々の先行研究の課題として、①不衛生な調理 (未消毒の手指からの汚染) でも有効か検証されていない、②大量調理時に梅果汁粉末を均一に混和することが困難

である、③より長時間の保存でも有効か、という3つの問題点が実用化にあたり課題として残っていたため、今回、それぞれの課題について検証した¹⁾。

既報では、汚染指標菌として接種した表皮ブドウ球菌の増殖抑制効果があることを実証したが、「実際の不衛生な環境下での調理による細菌汚染に対して有効か」検証されていない。しかし、今回の検証実験で、災害避難現場を想定した、アルコール消毒していない不衛生な手指からの細菌汚染に対しても、細菌増殖抑制効果が認められたため、食中毒予防効果があると考えられる。

次に、実際の災害避難現場での炊き出しでは大量調理が行われることが想定されるが、炊飯後の大量の白飯に梅果汁粉末を均一に混和することは現実的にはかなり困難であると考えられる。そこで、「炊飯前の浸漬水に梅果汁粉末を混和」する新しい炊飯法によって、炊飯加熱後でも抗菌効果が全く減弱せず、炊飯後の白飯全体に均一に分散されるか検証したところ、検査したすべての部位で有効な抗菌活性が認められることが分かった。また、風味の改善のために出汁粉等の旨味調味料を添加しても、梅果汁粉末の細菌増殖抑制効果は影響を受けないことも明らかになった。これらの検査成績から、①細菌増殖抑制効果は炊飯加熱後でも減弱しない、②大量炊飯調理でもほぼ均一に混和することが

できることなどが実証されたため、炊飯後に混和する従来法の問題点を完全に改善できると同時に、製品化への可能性が示された。

最後に、実際の災害避難現場では、より長く常温保存してしまう可能性があるため、24時間以降でも細菌増殖抑制効果が保持されるか検証したところ、30℃で72時間保存しても、食中毒発症の危険水準を下回っており、安全性を維持できるものと考えられた。市販のにぎりめし商品には保存料としてグリシンが添加されているが、それでも消費期限が1日程度であることと比較すると、検証温度や安全係数(おおむね0.8)を考慮しても十分長い消費期限が得られると考えられた。

以上の検証結果から、大量調理時の炊飯における安全性(汚染細菌の増殖抑制効果)や簡便性(炊飯前に浸漬水に加えて均等に混ぜるだけ)、おいしさ(旨味調味料の添加が可能)をすべて両立できる新しい白飯調味料および炊飯法を開発することが可能になった。本研究の成果として、災害避難所や野外イベント、アウトドア等、衛生管理が困難な現場で、より安全・安心な白飯料理が提供可能になることが期待できるようになったと評価してよいであろう。

謝 辞

本研究を計画・実施するにあたり、小林恭一教授(仁愛女子短期大学・食物栄養専攻)、村中隆司博士(カワイマテリアル株式会社)に、多大な助言・御指導をいただいた。また、特許出願にあたり、ご尽力いただいた弁理士の川崎好昭先生(川崎特許事務所)に篤く御礼申し上げます。

利益相反

本研究は、本研究に供与していただいた梅果汁粉末を製造・販売しているカワイマテリアル株式会社との産学共同研究として実施した。

また、本研究の成果については、カワイマテリアル株式会社より「SafetyBallの素」の商標で製品化(製造:オグラヤ商事株式会社)されると同時に、特許庁に特許出願(出願番号:特願2018-186660)し、審査の結果、2022年6月23日に特許が承認された(特許第7093948

号、発明の名称:炊飯用粉末調味料及びそれを用いた炊飯方法、発明者:野村卓正・谷政八・小林恭一・山本誠一・村中隆司)。

参考文献

- 1) 野村卓正(2021年)「梅果汁粉末添加による食品中の細菌増殖抑制効果の検証(1)」仁愛大学紀要(人間生活学部篇)13:25-37
- 2) 松田敏生, 矢野俊博, 丸山晶弘, 熊谷英彦(1994)「有機酸類の抗菌作用—各種pHにおける最小発育阻止濃度の検討—」日本食品工業学会誌41(10):687-701
- 3) 七山征子(1996)「梅干し, 梅肉エキスの抗菌作用」日本食品微生物学会雑誌12(4):211-217
- 4) 前田康彦, 宮尾茂雄(2014)「食物と健康の化学シリーズ 漬物の機能と科学」, 105

