

黄色ブドウ球菌の耐圧性に対する食塩の効果及びメカニズム解明

筒浦 さとみ

新潟大学研究推進機構超域学術院

概要 黄色ブドウ球菌は耐圧性や耐塩性の特徴を持ち、様々なストレス環境に耐えることができる。本研究では、高圧処理時に塩化ナトリウム(NaCl)を添加することで、黄色ブドウ球菌の増殖が効果的に抑制されるか調べた。液体培地において黄色ブドウ球菌に対する高圧処理とNaCl添加の併用による影響を調べたところ、高圧処理直後の菌数はNaClの添加時期に関わらず、同程度であった。しかし、培養後は15%以上のNaCl存在下で高圧処理後にNaClを添加したほうが、高圧処理前に添加した場合に比べて、菌の抑制に効果的であった。続いて、高圧処理とNaCl添加を併用し、米飯における菌の抑制効果を比較した。1.5%及び3% NaCl添加飯では、37°Cで4時間保存後までは高圧処理による菌の抑制効果が認められたものの、24時間後には高圧処理の有無やNaCl添加濃度に関わらず、同程度まで菌が増殖した。4時間保存後の米飯でも、高圧処理後にNaClを添加したほうが、高圧処理前に添加したものよりもわずかに菌は抑制された。さらに、1.5%食塩添加飯に、市販調味料として米酢、バルサミコ酢、マスタード、ローズヒップティーをそれぞれ加え、菌を植菌して高圧処理を施し、37°Cで48時間保存後の菌数を調べた。いずれの市販調味料においても、高圧処理直後の菌数は検出限界以下で、48時間保存後も菌はほとんど検出されなかった。高圧処理と併用しても米飯への食塩添加だけでは黄色ブドウ球菌抑制にはほとんど効果がなかったが、それに市販調味料を加えた場合には保存後にも効果が認められた。

1. 研究目的

高圧処理技術とは数千気圧の等方的な静水圧を利用する非加熱加工技術である^(1,2)。高圧処理は加熱処理に比べ、食品に与えるエネルギーが低く、共有結合の切断や生成のような化学変化が起こらない。高圧処理による微生物の不活化効果も認められてはいるものの、その程度は菌の種類により大きく異なる。黄色ブドウ球菌は細胞壁が厚く、圧力を分散しやすい球状の形であるため圧力にも耐性があり、600 MPaの圧力でも残存する場合もある^(3,4)。また、本菌は耐塩性の性質も持ち、2~21%の食塩存在下でも増殖が可能である^(5,6)。このような性質から、高圧処理及び食塩添加だけでは、黄色ブドウ球菌の増殖を抑制することは極めて難しい。また、高圧処理と食塩添加のそれぞれについて黄色ブドウ球菌に対する影響を調べた報告はあるものの^(7,8)、使用菌株や培地等条件がそれぞれ大

きく異なり、これらの報告の結果を直接的に比較することは困難である。そこで、本研究では高圧処理と塩化ナトリウム(NaCl)添加による黄色ブドウ球菌の制御を試みるため、これらを組み合わせた際の黄色ブドウ球菌の増殖に与える影響を明らかにし、増殖抑制に効果的なNaClの添加時期についても調べた。また、米飯においても本菌に対する高圧処理及びNaCl添加による影響を調べた。

2. 研究方法

2.1 液体培地を用いた黄色ブドウ球菌に対する高圧処理とNaClの併用による影響

2.1.1 供試菌株及び接種菌液の調製

本研究には *Staphylococcus aureus* NBRC12732 を用いた。本菌のコロニーをスラントから1白金耳とり、5 mLのBrain Heart Infusion (BHI)培地に植菌し、37°Cで24時間振盪培養した。その後、50 µLの培養液を5 mLのBHI培

地に植菌し、37°Cで15時間振盪培養した。この培養液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄後に希釈し、約 10^8 CFU/mLの菌懸濁液を調製した。

2. 1. 2 黄色ブドウ球菌の植菌、高圧処理及び培養後の菌数測定

0~21% NaCl添加BHI(Difco)液体培地に、*S. aureus* 懸濁液を約 10^6 CFU/mLになるように植菌し、高圧処理(400 MPa, 25°C, 10~30分間)を施し、37°Cで24時間培養した(高圧処理前NaCl添加試料)。また、0% NaCl添加BHI液体培地に*S. aureus* 懸濁液を 10^7 CFU/mLになるように植菌した。先と同様の条件で高圧処理後、これを8~21% NaCl添加BHI液体培地に、高圧処理前NaCl添加試料の高圧処理後の菌数と同程度の 10^{5-6} CFU/mLになるように加え、37°Cで24時間培養した(高圧処理後NaCl添加試料)。菌数測定はPBSでこれらの試料を適宜希釈し、BHI平板培地を用いて検出した(検出限界: $< 1.0 \times 10^1$ CFU/mL)。高圧処理後の菌の損傷を確認するために、一部の試験については、BHI培地とマンニット食塩培地で同時に検出し、損傷菌の有無を確認した。

2. 2 米飯を用いた黄色ブドウ球菌に対する高圧処理とNaClの併用による影響

2. 2. 1 米飯の調製

米は精白米(コシヒカリ)を新潟市内のスーパーマーケットにて2020年8月~2021年3月に購入し、本研究に使用した。飯重量の0%、1.5%及び3%のNaClを米に加え、121°Cで10分間オートクレーブし、炊飯した。37°Cで30分~1時間保温してから本試験に用いた。

2. 2. 2 供試菌株及び接種菌液の調製

供試菌株は2.1.1と同様とし、約 10^7 CFU/mLの菌懸濁液を調製した。

2. 2. 3 黄色ブドウ球菌の植菌、高圧処理及び米飯保存後の菌数測定

米飯(2.4g)に*S. aureus* 懸濁液を 10^6 CFU/gになるように接種して高圧処理(400 MPa, 25°C, 10分間)を施し、37°Cで4時間及び24時間保存した。保存後の米飯にPBSを加えてスマッキング、適宜希釈し、平板培養法にて菌数を測定した(検出限界: $< 2.0 \times 10^2$ CFU/g)。また、0% NaCl添加飯の一部試料は、高圧処理後に飯重量の1.5%及び3%になるようNaClを添加し、先と同様に保存及び菌数測定を行った。

2. 3 食塩及び市販調味料添加飯における黄色ブドウ球菌に対する高圧処理による影響

2. 3. 1 米飯の調製

米に食塩を飯重量の1.5%になるように加え、家庭用圧力IH炊飯器(NP-BJ18, 象印マホービン株式会社)で炊飯した。炊飯後、しゃもじでよく混ぜ、米酢、バルサミコ酢、マスタード、ローズヒップティーをそれぞれ飯重量の6%、5%、14%、2%になるよう添加し、よく混ぜた。ローズヒップティーは、ティーバック2つ(4g)を熱湯40 mLで5分間抽出した後にその抽出液18 mLを米飯50 gに加えた。

2. 3. 2 供試菌株及び接種菌液の調製

供試菌株及び接種菌液の調製は2.2.2と同様とした。

2. 3. 3 黄色ブドウ球菌の植菌、高圧処理及び米飯保存後の菌数測定

2.2.3の方法を一部改変し、保存は37°Cで48時間とし、菌数測定には平板培養法及び混濁培養法を用いた(検出限界: $< 2.0 \times 10^1$ CFU/g)。

2. 4 統計処理

統計処理には統計処理ソフトStatcel statistical package (Statcel 3; OMS Inc.)のソフトウェアを用い、*t*検定またはTukey-Kramer法による多重比較検定を行った。有意差検定では危険率 $p < 0.05$ とした。

3. 研究結果

3. 1 BHI液体培地における高圧処理時の処理時間及びNaCl濃度の影響

NaCl添加BHI液体培地におけるNaCl濃度と高圧処理直後または培養24時間後の菌数の関係をFig. 1に示す。高圧処理により、 $10^{0.5-1}$ CFU/mLの菌数低減がみられた。菌数の減少率は食塩の濃度依存的に減少する傾向があった。培養の有無に関わらず、処理時間を10分から30分に延長しても菌に対する効果に大きな差はなかった。また、0% NaCl添加高圧処理後のマンニット食塩培地及びBHI培地に検出された菌数から損傷菌の菌数を算出したところ、 1.5×10^1 CFU/mL程度の損傷菌が確認された。損傷菌も含め、検出可能なすべての菌を検出することとし、今後の実験のコロニーの検出にはBHI培地を用いた。

黄色ブドウ球菌の耐塩性メカニズムは未だ不明な点が多いものの、細胞壁の構造的強度の増強や細胞膜構成リン脂質の組成変化浸透圧調節機構によるものと考えられ

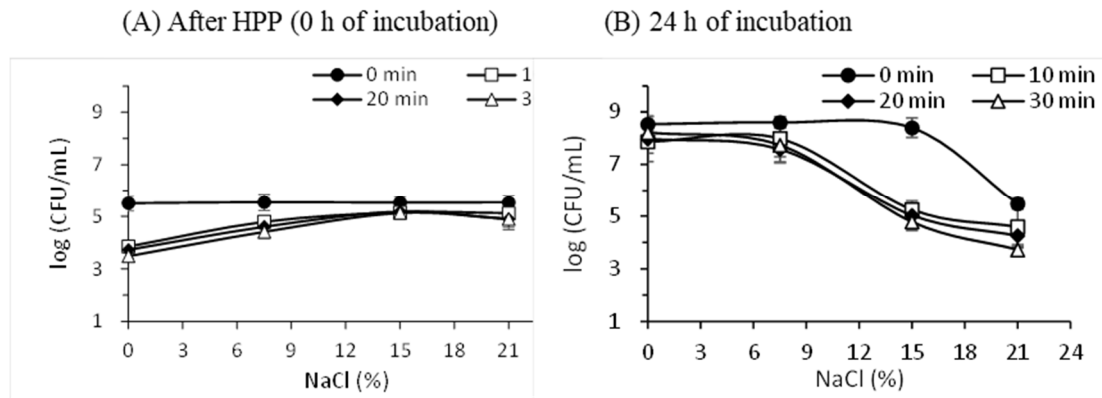


Fig. 1 Growth of *S. aureus* NBRC 12372 after high-pressure treatment (HPP) and 24 h of incubation at 37°C in NaCl-added BHI broth (n = 3). The detection limits of bacterial number were about 101 CFU/mL.

ている⁽⁹⁻¹¹⁾。本研究では高濃度の NaCl 環境下では高圧処理による菌数低減効果が低下したことから、これらの塩に対する菌体の変化により圧力下でより耐えることができたと推察された。

3. 2 BHI 液体培地における高圧処理前後の NaCl 添加時期の違いによる効果の比較

次に、NaCl 添加時期を高圧処理前後とし、高圧処理時の黄色ブドウ球菌抑制効果に対する添加時期の影響に

ついて調べた (Fig. 2)。高圧処理をしなかった場合には 15% NaCl 存在下では 24 時間培養後に NaCl 添加なしと同程度まで増殖したものの、21%では減少し、添加時期による差はなかった。高圧処理前に NaCl を添加した場合のみ、高圧処理直後に菌の減少がみられ、NaCl を添加した場合はいずれの濃度でも菌数の減少はなかった。15%以上の NaCl 存在下では高圧処理により菌数が減少したが、

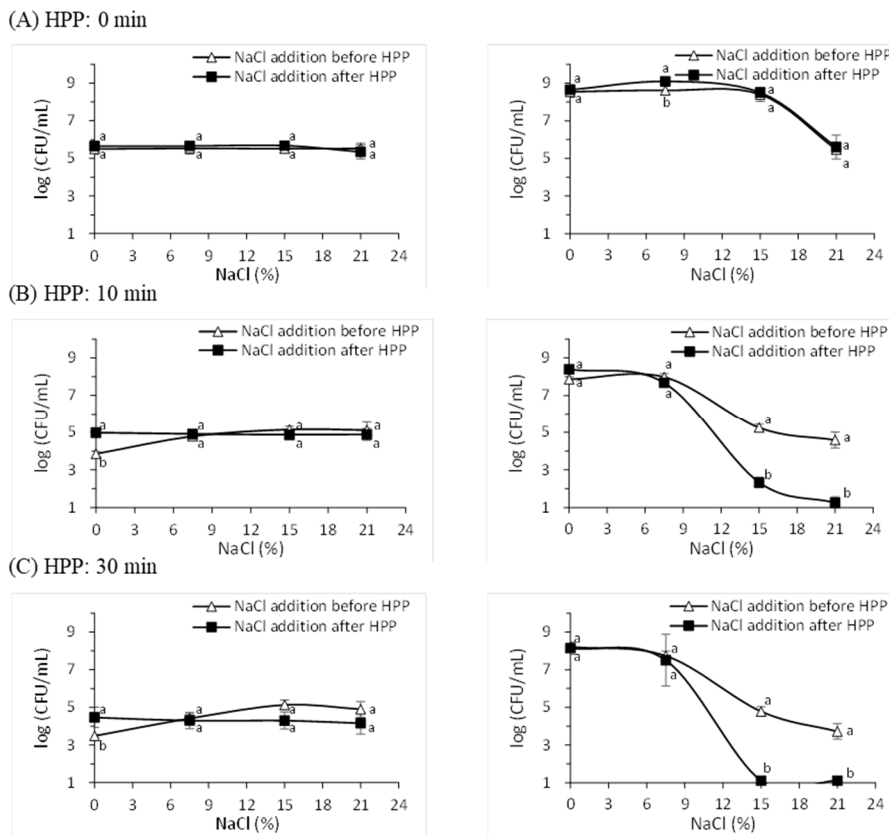


Fig. 2 Effect of NaCl addition timing during high-pressure processing (HPP) on *S. aureus* NBRC 12732 before (left) and after 24 h of incubation (right). The detection limits of bacterial number were about 101 CFU/mL. Values within the same column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$; n = 3).

高圧処理時にはNaClが含まれない方が菌の低減効果は高かった。高圧処理の処理時間 20 分間でも高圧処理直後及び24時間培養後の菌数の挙動は10分間のものと同様であった(データ示さず)。このように高圧処理時のNaClの添加時期がその後の菌の増殖抑制に影響を与えることが明らかとなり、食塩が高濃度で含まれる高圧加工食品の製造においては、食品への食塩添加のタイミングにより高圧損傷菌を効果的に抑制させることが示唆された。

3.3 米飯における黄色ブドウ球菌に対する高圧処理とNaCl添加の併用による効果

続いて、米飯において高圧処理とNaCl添加を併用し、37°Cで保存した際の黄色ブドウ球菌に対する影響を調べた(Fig. 3)。4時間保存後までは、米飯に3%の食塩が添加されていても食塩のみでは黄色ブドウ球菌の増殖に影響はほとんどなかったが、高圧処理を併用した場合には菌の増殖が抑えられた。しかし、24時間保存後には、高圧処理の有無及びNaCl濃度に関わらず、いずれの条件でも菌は同程度まで増殖した。また、4時間保存後には、高圧処理後にNaClを添加したほうが、高圧処理前に添加したものよりもわずかに菌数は少なかった。これは高圧処理直後の菌の減少率が高圧処理前NaCl添加試料では減少しにくかったことによる影響と考えられる。これらの結果から4時間のような保存初期の腐敗は高圧処理及びNaCl添加の併用処理により菌の増殖を一時的に抑えられる可能性が示されたが、24時間まで保存すると腐敗は抑制できないことが示唆された。高圧処理の条件によっては保存初期の増殖に要する時間をさらに延長させることができる可能性があることから、今後はこれらについてさら

に調べる必要がある。また、米飯における検討では米飯への食塩の添加濃度は3%までとしたが、培地で菌の抑制に効果がみられた15~21%の食塩が添加される醤油や味噌等をモデルとした研究も今後検討する必要がある。

3.4 米飯における高圧処理及び食塩と市販調味料添加による菌の増殖抑制効果

続いて、1.5%食塩添加飯に4種類の市販調味料(米酢、バルサミコ酢、マスタード、ローズヒップティー)を添加し、高圧処理直後及び37°Cで48時間保存した際の菌の抑制効果について調べた(Fig. 4)。バルサミコ酢以外の3種の市販調味料においては、48時間後にも高圧処理を施したほうが、高圧処理なしに比べて効果的に菌が抑制された。本研究とは使用した菌株が異なるものの、本研究で用いた食塩と市販調味料の組み合わせにより、高圧処理なしでも黄色ブドウ球菌の抑制効果がみられることを2019年度ソルト・サイエンス研究助成(No. 1943)で、既に我々が明らかにした。本研究にはその際用いた最大濃度よりも低濃度になるよう調味料の添加量を減らして、高圧処理と併用した。その結果、37°Cで48時間保存後にも菌は検出限界以下と十分に抑制されたことから、高圧処理との併用で、食塩及び市販調味料の添加濃度が低くても菌の抑制に十分な効果があることが明らかとなった。今後は効果的な市販調味料の濃度について検討するとともに、昨年度の研究助成において、菌の抑制効果は大きくないものの効果がみられた市販調味料についても、同様に検討する必要がある。また、本研究では一定期間保存した後に、菌数減少を調べたが、保存温度や期間を変えて、腐敗までの時間がどの程度延長されるかより長期的に調べる必要がある。

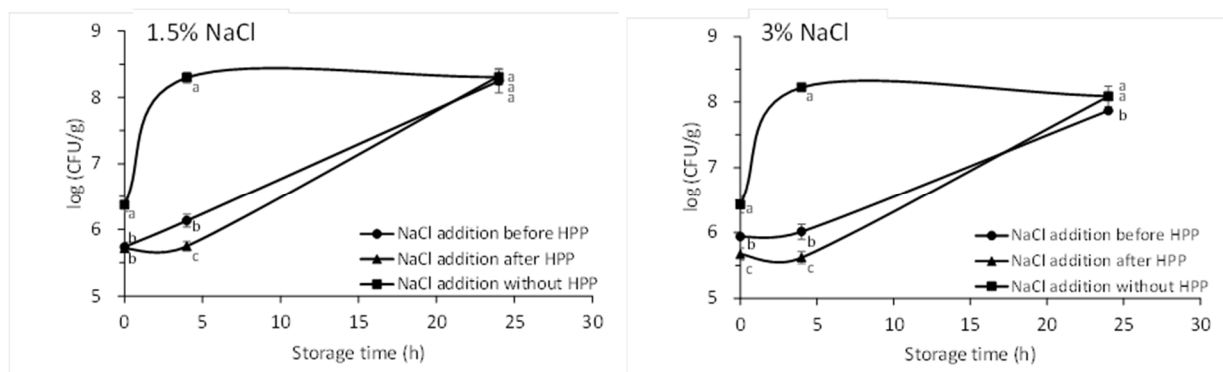


Fig. 3 Effect of high-pressure processing (HPP) on growth of *S. aureus* NBRC 12732 at 37°C in 1.5% and 3% NaCl-added cooked rice. Values within the same column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$; $n = 3$).

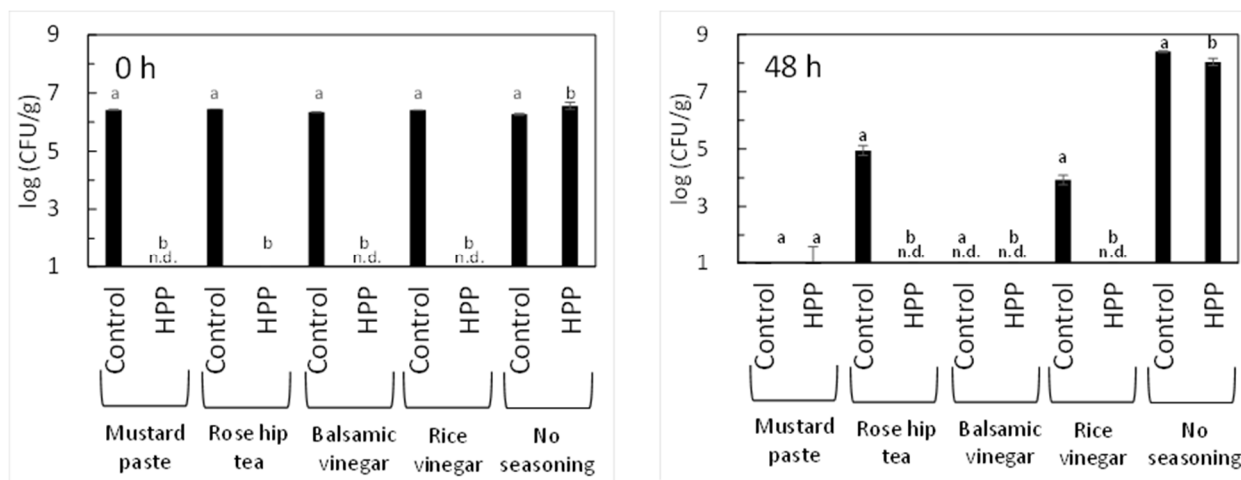


Fig. 4 Effect of high-pressure processing (HPP) on *S. aureus* NBRC 12732 before and after incubation at 37°C in 1.5% salt and commercial seasonings-added cooked rice. Values within the same commercial seasoning followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$; $n = 3$).

4. 今後の展望

本研究では高圧処理と NaCl 添加による黄色ブドウ球菌の制御を試みるため、これらを組み合わせた際の黄色ブドウ球菌の増殖に与える影響を明らかにした。15%以上の高濃度の NaCl 存在下では高圧処理との併用により黄色ブドウ球菌の抑制効果が期待された。一方で、菌の抑制に効果的な NaCl の添加時期は、高圧処理前よりも高圧処理後であることが明らかとなった。

また、米飯においても高圧処理と食塩・市販調味料の組み合わせにより黄色ブドウ球菌の抑制が認められたため、今後は可能な限りこれらの添加濃度を減らして実用化に向けた検討が必要である。また、他の加工食品の微生物の増殖抑制に本研究の結果が応用可能であるかについても調べる必要がある。

謝辞

本研究を実施するにあたり、研究助成金を賜りましたソルト・サイエンス研究財団に厚くお礼申し上げます。

5. 文献

- 1) 西海理之, Maksimenko, A., 菊地凌, 筒浦さとみ. 高圧処理による低塩食肉製品製造技術の開発, 油空圧技術, 2020, 59, 25-30.
- 2) 筒浦さとみ, 西海理之. 食品産業に資する高圧微生物制御技術の新たな展開, 食品と容器, 2020, 61, 250-258.

- 3) Gervilla, R., Ferragut, V., Guamis, B. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents, J. Dairy Sci., 2000, 83, 674-682.
- 4) Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods, J. Food Protect., 1995, 58, 524-529.
- 5) Seo, K.S., Bohach, G.A. Staphylococcal food poisoning, In: Pathogens and toxin in foods (ed by Juneja, V.A. and Sofos, J.N.), ASM Press, 2010, Washington, 119-130.
- 6) Gomez-Lucia, E., Blanco, J.L., Goyache, J., de la Fuente, R., Vazquez, J.A., Ferri, E.F., Suarez, G. Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* S6 in Manchego type cheese. J. Appl. Bacteriol., 1986, 61, 499-503.
- 7) Jofre, A., Aymerich, A., Bover-Cid, S., Garriga M. Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa, Int. J. Microbiol., 2010, 13, 105-112.
- 8) Wuytack, E.Y., Diels, A.M.J., Michiels C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high

- hydrostatic pressure, *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 77, 205-212.
- 9) Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M.J., Jonge, B.L.M., Wilkinson, B.J., Jayaswal, R.K. Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine, *J. Bacteriol.*, 1995, 177, 116-5,121.
- 10) Tsai, M., Ohniwa, R.L., Kato, Y., Takeshita, S.L., Ohta, T., Saito, S., Hayashi, H., Morikawa, K. *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. *BMC Microbiol.*, 2011, 11, 13.
- 11) Townsend, D.E., Wilkinson, B.J. Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation, *J. Bacteriol.*, 1992, 174, 2702-2710.

Effect of Sodium Chloride on the Pressure Resistance of *Staphylococcus aureus*

Satomi Tsutsuura

Institute for Research Promotion, Niigata University

Summary

Staphylococcus aureus has tolerance to various stress conditions because of its resistance to pressure and salt. In this study, we investigated whether the addition of sodium chloride (NaCl) during high-pressure processing (HPP) can effectively inhibit the growth of *S. aureus*. First, we examined the effect of the combination of HPP and NaCl addition on *S. aureus*. Before incubation, there was no difference in the bacterial counts when NaCl was added either before or after HPP. However, after 24 h of incubation at 37°C, the addition of NaCl after HPP was more effective on the inhibition of *S. aureus* than before HPP under the presence of 15% NaCl. Next, we examined the inhibition of *S. aureus* by the combination of HPP and NaCl addition in cooked rice. In 1.5% and 3% NaCl added-cooked rice, *S. aureus* did not grow up to 4 h of incubation. However, *S. aureus* grew regardless with or without HPP and the concentration of NaCl after 24 h of incubation. After 4 h of incubation, the addition of NaCl after HPP slightly inhibited *S. aureus* more than the addition before HPP in the cooked rice. In addition, *S. aureus* was inoculated into cooked rice to which 1.5% salt and commercial seasonings such as rice vinegar, balsamic vinegar, mustard paste, and rosehip tea were added, and bacterial counts were examined after HPP and 48 h of incubation at 37°C. In cooked rice added 1.5% salt and all commercial seasonings, the bacteria was not detected after HPP and even after 48 h. The combination of HPP and salt had little effect on the inhibition of *S. aureus*, however, the combination of HPP and addition of salt and commercial seasonings was effective on inhibition of *S. aureus*.