 総 説

冷 蔵 ・ 冷 凍 と 微 生 物

石 田 祐 三 郎

Microorganisms in Refrigerated Storage and Freezing

 YUZABURO ISHIDA

緒 言

微生物の増殖とそれにとまなう食品成分の質的变化を防止することは、食品保蔵の基本的な目的である¹⁾。

微生物が増殖できる環境条件の範囲は非常に広く、年中氷点下にある極地²⁾、高温の温泉³⁾、水圧が数百気圧もある深海⁴⁾など、全生物圏が微生物の棲かとなっている。しかし、個々の種類の微生物の生存 (survive) および増殖 (growth) は、狭い範囲に限定される。すなわち、ある一定の環境に限って見ると特定の微生物群のみが生存し増殖していることがわかる。たとえば、海水中にはグラム陰性桿菌が支配的であり⁵⁾、海産魚類腸管では特定種の *Vibrio* のみが生息する⁶⁾ などである。これらの環境は栄養などの化学的因子、pH・温度などの物理的因子が複雑に作用し合って形成されるのであるが、温度はその最も主要な因子の一つである。

食品保蔵の手段として、近年とくに、低温流通機構に関連して、広く用いられている冷蔵および冷凍は、微生物の増殖を緩慢にし、抑止する効果をもつが、現実には低温とその他の環境因子とが相まって、特定の微生物群の生存または増殖に適した環境が形成されることになる。

ここでは、このような環境における微生物の増殖と生存について述べる。

低温における微生物の増殖限界

微生物は、ふつう 15°C 以上にそれぞれ増殖最適温度*があり、その温度から離れるにしたがって増殖は低下し、遂には増殖し得なくなる。増殖しうる最低温度が、

0°C またはそれ以下にある微生物を、一般に低温微生物 Psychrophilic microorganisms (または好冷微生物) と呼んでいる。1964 年までに報告されている 0°C 以下の貯蔵食品中において増殖しうる微生物を示すと第1表のようである⁷⁾。-17.8°C に増殖する red yeast はある種の培地中では -34°C においても増殖することが報告されている⁸⁾ が、これは極端な例であり、低温微生物の多くは、-10°C 以下では増殖しえないと考えてよい。とにかく、ここに示した微生物のすべてが食品の変質をもたらすとは限らない。食品保蔵の立場からは、低温における増殖の緩徐期 (lag phase) が非常に長く、また対数期 (logarithmic phase) における増殖速度が遅いものは、悪変の原因とはならない場合が多い。したがって、低温において食品保蔵上重要な意味をもつグループは「0°C で1週間以内に、肉眼で見える大きさのコロニーを形成する微生物⁹⁾」ということになる。最近では、海洋¹⁰⁾、魚類¹⁰⁾、冷凍食品¹¹⁾ から多くの偏性低温微生物 (p(34)脚注) が分離されている。ここに述べる増殖最低温度はその微生物のおかれている環境条件、すなわち、環境の水分、溶質の濃度・種類、pH などによって変動する。なかでも水分は、低温における微生物の挙動にもっとも大きい影響を与える因子である。カビは、細菌、酵母に比べて低い水分含量の環境にも増殖しうる。25°C におけるこれら微生物の最低水分活性 (Aw)* は種類に

* 一般に、増殖の程度を表示する方法として増殖率と最大細胞収量が用いられる。増殖の最適温度は後者の方が前者より低い温度にあるのがふつうであるが、細菌や酵母では、前者によることが多い。カビでは後者の表示が一般的に用いられている。

* 京都大学農学部水産微生物学教室 (京都市舞鶴市字長浜)
Department of Fisheries, Kyoto University, Maizuru, Kyoto.

第1表 食品中における微生物の増殖最低温度

Product	Organism or group	Temperature* (°C)
Meats		
Mutton	<i>Mucor mucedo</i>	-1
Beef fat	Bacteria and yeasts ^a	-1
Beef	Molds, yeasts, bacteria	-1.6
Meat and potatoes	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i>	-3
Pork	Psychrophilic bacteria	-4
Meat	Molds, yeasts ^b	-5
Meat	Molds, yeasts	-5
Mutton	Molds, yeasts, rarely <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i>	-5
Meat	<i>Cladosporium herbarum</i>	-5.5
Meat	<i>Cladosporium herbarum</i>	-6
Meat	<i>Pseudomonas</i>	-7
Meat	<i>Sporotrichum carnis</i> , <i>Thamnidium</i> sp.	-7.8
Home-grown foods	Molds	-7.8
Meat	Molds	-8
Cured meats		
Liver sausage, bologna	<i>Micrococcus</i>	>5
Liver sausage	Unidentified bacterium	5
Cured meats	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>	3.5
Hams	<i>Clostridium putrefaciens</i>	2 to 1
Bacon, no salt	Psychrophiles	-5
Bacon, 4.3% and 5.9% salt	Psychrophiles	-6.7
Bacon	Halophilic bacteria	-10
Fish		
Fish	Phosphorescent bacteria	0
Haddock	Normal spoilage flora	-4 ^c
Fish	Psychrophiles	-5
Fish	Bacteria	-6.7
Fish	<i>Pseudomonas</i>	-7
Fish	Bacteria	-11
Oysters	Pink yeast	-17.8

a. *Achromobacter*, *Pseudomonas* と無孢子酵母, これらのグループのある菌株は -1°C で牛脂を加水分解する。

b. *Thamnidium chaelochadioides*, *Dematium pullulans*, *Cladosporium herbarum* と *a* *Penicillium* を含む。

c. 凍結より過冷却の方が -2°C で増殖が速い。(from MICHENER ら (1964))

よって異なるが、細菌ではおよそ 0.90、酵母では 0.88、カビでは 0.80 である。しかし、いずれの場合も温度が低下すると、この値は高くなるのがふつうである¹²⁾。細菌の *Pseudomonas fluorescens* と酵母の *Candida* sp. についての例を第1図に示した。 0°C 以下の環境では水の凍結がおこり、水分活性 (Aw) は -5°C で 0.953, -10°C で 0.907, -15°C で 0.864, -20°C で 0.823 と温度に比例して低下するため、温度の低下とあいまって微生物の増殖は、急激に抑制される¹³⁾。また、凍結にともなって溶質の濃度が高くなることによっても微生物

* 水分活性は $A_w = P/P_0$ で示される。 P_0 は溶媒の蒸気圧で、P は溶質の蒸気圧である。

第1図 低温細菌 (*Pseudomonas fluorescens*) と低温酵母 (*Candida* sp.) が増殖し得る最低温度と水分活性 (A_w) の関係

A—B は凍結点を示す (from SCOTT (1962))

第2表 低温性 *Bacillus* が -7°C と -10°C (26日培養) で増殖しうる培地の種類

Organism	Media*	
	-7°C	-10°C
<i>Bacillus insolius</i> , strain W16B	NG†	NG†
<i>B. globisporus</i> , strain T38C	3	1, 2, 3
<i>B. psychrophilus</i> , strain W16A	1, 2, 4, 5	1, 2, 4, 5
<i>Bacillus</i> sp., strain T3A	3	NG‡

* Media are as follows: (1) TSA plus 10% glycerol; (2) TSA plus 15% glycerol; (3) TSA plus 20% glycerol; (4) TSA plus 10% glycerol and 5% ethylene glycol; (5) TSA plus 15% glycerol and 5% ethylene glycol.

† NG is no growth.

‡ All cultures froze.

TSA: Trypticase-soyagar.
(from LARKIN ら (1967))

の増殖阻害が促進される。しかしある種の溶質、すなわち、グリセリン・糖・塩などの添加は、氷点降下をとめない凍結による A_w の低下を防ぐとともに、他の溶質の濃縮を妨げるために、増殖の最低温度がさらに低くなることが多い。ちなみに 60% (W/W) グリセリンは -30°C , 40% メタノールは -40°C , 23% 食塩は -21°C で凍結する¹⁴⁾。これらの溶質は微生物の種類によっては阻害的に作用する場合もある¹⁴⁾ので、結果は単純ではない。第2表からわかるように、培地にグリセリンやエチレングライコールを加えると、それらの濃度によっても異なるが -7°C では4株の低温性 *Bacillus* のうち3株が、 -10°C では2株が増殖する。菌株によってはこれら不凍剤の濃度が高くなると多少増殖に阻害的に作用するらしい¹⁵⁾。

第2図 微生物の増殖最低温度と溶液の物理的状態および温度、水分活性 (A_w) と溶質濃度の影響についての図式

(from MICHENER ら (1964))

第3図 種々の温度で培養した低温性 *Candida* の 0°C における増殖の経時的変化

液体培地での前培養の温度は ●, 0°C;
○, 5°C; ◐, 10°C; ◑, 15°C; △, 20°C;
▲, 10°C (寒天培地)
(from FARRELL ら (1967))

第3表 食中毒細菌の増殖最低温度と毒素生産

Organisms	Lowest temperature (°C)		
	Growth	Toxin production	Survival
<i>Salmonella</i> sp.	5.5~6.8	—	5.1~5.9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5.0~8.0	—	5~8
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.6	18	0°C
<i>Clostridium perfringens</i>	15		"
<i>Cl. botulinum</i> type A	10	10	"
" B	10	10	"
" C	15	10	"
" D	3.3	3.3	"

(from data of LISTON, ら (1969) and MICHENER, ら (1964))

しかし、0°C 以上の温度においては、一定量以上の溶質の添加は、かえって A_w を低下させ最低温度の上昇をまねくことになる（好塩微生物を除く）。これらの関係を図式化したのが、第2図である⁷⁾。図によると低温での温度低下とともに低温微生物の増殖しうる水分活性は次第に高くなる。しかし、培養基中の溶質濃度が高い場合は (D-E, グリセリンなどの添加による)、凍結点

第4図 増殖最高温度またはそれ以上の温度における低温細菌の生菌数*

*5°C で3日間前培養した試料を指示温度で培養した
(from HAGEN ら (1964))

が低下し (B→E) 低温でも増殖できるようになることがわかる。この他、一般に最適 pH 以下における pH の低下は最低温度を高くし¹⁶⁾、酸素・炭酸ガスの有無は好気性・嫌気性の微生物の最低温度に影響する。また、低温微生物の増殖最低温度が氷圧によって上昇することも見出されている¹⁷⁾。

一方、低温に対する適応現象がとくに低温微生物に顕著に見出される¹⁸⁾。この場合、増殖速度はもととほとんど変わらないが増殖緩徐期が短縮される最低温度が下がることが多い。第3図は、低温性 *Candida* を種々の温度で前培養したのち、0°C での増殖を調べたものである。このように適応が一回の継代培養で起こる場合もあるが、数十回の継代培養を必要とする場合もある。ふつう中温性である *Bacillus* 属の細菌が低温保蔵食品などから低温性細菌として分離されているのは¹⁹⁾、恐らく長期間のうちに低温に適応したものか変異したものであろう。

上記以外に、食品保蔵上重要な現象は、(1)食中毒細菌や腸内細菌グループの増殖最低温度および毒素生成限界温度が 0°C 以上にある (第3表)²⁰⁾ こと、(2)熱抵抗性の高い細菌胞子の発芽は 0°C 附近でも起こるが、その温度では増殖を伴わない²¹⁾ こと、(3)低温微生物のうち約 20°C 以上で増殖しえない偏性低温微生物*は、それ以上の温度に長時間曝すと次第に死滅していく (第4図)²²⁾ ことなどである。

低温微生物は中温微生物に比べて、より低い温度に増

* STOKES⁹⁾ は低温微生物をさらに2つに分け、20°C 以上に最適温度を有するものを通性低温微生物 (facultative psychrophiles)、20°C 以下に最適温度を示すものを偏性低温微生物 (obligate psychrophiles) と呼んでいる。

第5図 通性および偏性低温細菌 *Pseudomonas* sp. の比増殖率の Arrhenius plot
(from HARDER ら (1968))

第4表 中温性 (mesophilic) と低温性 (psychrophilic) *Pseudomonas* 細胞中の脂肪酸組成におよぼす増殖温度の影響

Fatty acid* (x:y)	Fatty composition (%) Growth temperature (°C)			
	30		10	
	Mesophile	Psychrophile	Mesophile	Psychrophile
10:0	—	—	—	—
11:1	—	—	—	—
12:0	—	—	0.18	0.10
13:1	—	—	0.42	0.49
14:0	1.0	0.95	0.65	0.92
15:0	—	—	—	—
16:0	29.6	28.1	20.6	18.6
16:1	18.8	23.1	27.6	28.3
17:1	—	—	—	—
18:0	—	—	—	—
18:1	50.9	48.0	50.7	51.5
18:2	—	—	—	—

* 16:0, Palmitate; 16:1, Hexadecenoate; 18:1, Octadecenoate.

x, 脂肪酸の炭素数; y, 1分子当りの二重結合数
(from FARRELL ら (1968))

殖しうる。これを Arrhenius 式に表わすと第5図のようになる²³⁾。すなわち、低温微生物は中温微生物より、より低い温度においても Arrhenius plot が直線性を保つことが特徴となっている。この理由としては、(1)細胞膜の基質透過性²⁴⁾、(2)細胞内における酵素活性とその調節機構²⁵⁾、(3)酵素合成とその調節機構²⁶⁾、などの低温における両者の相違が挙げられる。とくに最近では、微生物の細胞膜にほとんどが分布し膜機能に重要な役割をもつ脂質の、不飽和脂肪酸 (シス型) に対する飽和脂肪酸の割合が、中温微生物より低温微生物において、また高温で増殖した細胞より低温で増殖した細胞において高いと

第5表 高温性 (*C. thermosaccharolyticum* と *C. tartarivorum*)、中温性 (*C. pasteurianum*) および低温性 (*Clostridium* sp. 69) 細菌に存在する高融点脂肪酸^{b)}と低融点脂肪酸^{c)}の割合

Organism	Higher melting fatty acids ^{a)}	Lower melting fatty acids ^{a)}
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	78.4	18.8
<i>C. tartarivorum</i>	73.1	25.9
<i>C. pasteurianum</i>	39.0	55.3
<i>Clostridium</i> sp. strain 69	40.8	54.0

a. 値は % で示す。

b. 主に C₁₅~C₁₈ 飽和の直鎖とイソ脂肪酸で 51~107°C の融点をもつ。

c. 主に C₁₅~C₁₈ 不飽和のサイクロプロパンやアンチシン脂肪酸で 0~48°C の融点をもつ。
(from CHAN ら (1971))

いう事実 (第4表)²⁷⁾ から、基質透過性に関連して低温性の機構の一部が次のように説明されている。たとえば、高温性、中温性、低温性の *Clostridium* の場合 (第5表) のごとく²⁸⁾飽和脂肪酸 (融点が高い) の割合が高い細胞膜脂質は低温で凝固するために膜の機能が失なわれやすいが、脂質脂肪酸の不飽和度が高くなると融点が低下し、低温においても液状 (液晶様状態) を保ち、細胞膜の生理機能が維持されるのだらうと。いずれにしても上記3点が総合された結果の表現として低温性が発現されるものと考えられる。

増殖限界以下の温度における微生物の挙動

増殖の最低温度以下 (増殖しえない温度) においては、微生物は休止状態にあるか、死滅するだけである。前節に示したように、低温で増殖しうる微生物は低温微生物に限られているが、増殖最低温度以下、とくに凍結点以下においては、低温微生物のみならず、ほとんどの微生物が条件によっては生存可能である。すなわち、極度に低い温度の方がかえって高い生存率を与える。たとえば、5.5°C に増殖温度限界をもつ *Salmonella* は 5.1°C でそのほとんどが死滅する (第3表)²⁹⁾ が、-78°C 以下においては 100% 近い生存率を示す³⁰⁾。前者においては、酵素の一部がまだ活性を維持するために代謝異常が起こり死滅するが、後者においては、すべての酵素活性が停止し、その生死は凍結にともなう物理的作用にのみ依存するためであろう。一般に微生物の増殖は -10°C 附近で止まるが、酵素活性は -25°C でも認められている³¹⁾。

1. 凍結・解凍速度

凍結による微生物の傷害および死滅は、おもに細胞内液の凍結、細胞外液の濃縮と細胞内液の脱水に起因すると推定される。細胞内に氷晶を形成するには急速凍結によって、ふつう $-10 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却しなければならない。細胞内氷晶を生ずるに必要な凍結の速度は細胞の大きさ (第6図)⁸³⁾ および水の透過しやすさによって異なる。すなわち、細胞が大きいほど、水が透過しにくいほど遅い凍結速度でも細胞内凍結が起こる。通常、酵母・カビ (分生孢子) では、 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上、細菌では $100 \sim 500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上とされている。しかしながら、細

第6図 直径の異なる球形細胞の 0°C 以下における細胞内水分量の計算値

---, 直径 25μ の細胞; - - - -, 直径 6μ の細胞, —, 直径 1μ の細胞; V_i , 初期細胞内の水分含有量; $10^{\circ}/\text{min}$ と $1000^{\circ}/\text{min}$, 凍結速度; E_q , 各温度における水中の水分含有量で標準の脱水過程に相当する。これより高くなるほど細胞は過冷却状態となるが、ふつうその状態は細胞内凍結を意味する。
(from MAZUR (1963))

胞内凍結によって微生物が死滅するのは、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と細菌 (*Pasteurella tubarensis*) の例からわかるように (第7図)^{83, 84)}, 解凍速度が緩慢な場合 ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) であり、急速解凍 ($100 \sim 500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上) を行なえば、ほとんどが生存可能となる。これは急速凍結で、細胞内に形成した微小な氷晶が緩慢解凍中に成長し、細胞を破壊するためであるが、急速解凍によっては氷晶の生長する時間がなくなることによると推定される。このような現象は、多くの酵母、細菌 (孢子を除く) のみならず数種のカビ (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* など) の孢子 (第6表) に

第7図 *S. cerevisiae* (A) と *P. tubarensis* (B) の生存率におよぼす凍結・解凍速度の影響

(A) は dist. water に, (B) は gelatine saline soln. に懸濁されている。
(from data of MAZUR (1961) and MAZUR ら (1957))

第6表 *Aspergillus flavus* の孢子の生存率におよぼす解凍速度の影響

Medium	Temp.	Cooling rate	Warming rate	Survival(%)
water	-75°C	rapid	slow	3.2
air-dry	"	"	"	75
water	"	"	rapid	67
air-dry	"	"	"	79

(from data of MAZUR (1966))

第7表 細菌・カビ・酵母の超急速凍結・解凍後の生存率 (-196°C)

Organism	Medium	No. of expts.	Cell density (frozen)	per cent survival*
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Burk's Medium	3	no./ml 9×10^7	28 ± 8
<i>Escherichia coli</i>	Tryptose Broth	4	9×10^8	100 ± 4
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tryptose Broth	3	1×10^9	91 ± 11
<i>Aspergillus niger</i> †	Frie's Medium	3	1×10^8	22 ± 1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tryptose Broth	4	9×10^9	42 ± 7

* Average ± 1 SD.

† 菌糸懸濁液

(from DOEBBLER ら (1963))

ついて明らかにされている⁸⁴⁾から、細胞内凍結を起こすための凍結速度が種類によって違っている点を除けば微結・解凍共通しているのであろう。なお、超急速凍生物一般に(1,000°C/min以上)を行なうと死滅率は極端に減少する(第7表)⁸⁵⁾。このような凍結細胞は放射線に対しても抵抗性が高い⁸⁶⁾。

一方、凍結速度が緩慢になると生存率は、解凍速度に影響されなくなる。また緩慢凍結後に急速凍結を行なっても、もはや急速凍結の影響が現れない(第8表)⁸⁷⁾。これらの場合微生物は急速凍結による細胞内の機械的破壊と異なり、緩慢凍結によって細胞外にのみ氷晶を生じ、もっぱら脱水と濃縮された細胞外溶質による傷害を受けるのだらう。凍結速度の緩・急によって細胞内凍結か細胞外凍結かを区別する境界は、細胞の大きさなどのほか凍結温度もそれに影響するので明確ではない。細菌のように小さい細胞は酵母やカビ(孢子)より低い凍結温度で細胞内凍結を起こす。急速凍結において解凍速度が微生物の生存に影響をおよぼさない凍結温度(細胞内に氷晶を作らない温度)は酵母やカビでは-10~-30°C以上であるが、細菌では種類によって大きく異なり、*Pasteurella tubarensis*では-30~-40°C以上⁸⁸⁾、*Escherichia coli*ではほぼ-79°C以上⁸⁹⁾である。微生物

第8表 *S. cerevisiae* の生存率におよぼす緩慢凍結(0.5°C/min)とそれに続く急速凍結の影響*

Temperature(°C)	Subsequent temperature(°C)	Survival(%)
-5	-196	8
-10	-196	20
-20	-196	40
-20	none	40

* 急速解凍を行なった。
(from data of ARAKI ら (1962))

第8図 *S. cerevisiae* と *E. coli* の生存率におよぼす凍結解凍速度に関する図
(from MAZUR (1966))

第9図 5種の溶質*の細菌懸濁液を-11°Cと-30°Cに凍結保存した場合3菌種の生菌数

* PO₄, 0.3 mM リン酸緩衝液; RF, 4% 脂性米粉, EW, 4% 卵白; CS, 4% トウモロコシ汁; NaA, 4% Na-alginate
(from WOODBURN ら (1960))

物の生存と凍結・解凍速度の関係は、Mazurの図(第8図)⁸⁴⁾によってうまく表現されている。

2. 保存期間と細胞懸濁液

さきに述べたように、緩慢凍結によってうける傷害は主に脱水と溶質濃縮によるものと考えられ、急速凍結による細胞内氷晶の機械的作用による細胞膜の破壊とは異なる。保存期間の長短や細胞懸濁液中の溶質の種類が生存率に影響する程度は前者の場合にとくに大きい。一般に保存期間が長くなると生存率は低下し、その程度は保存温度が低いほど小さくなる*。第9図は-11°Cと-30°Cに10週間保存した *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* および *Streptococcus faecalis* の生存率を示してある。その他のデータからも桿菌・球菌を問わず栄養細胞では-20°C~-30°Cより高くなると生存率が次第に低下する⁸⁹⁾が細菌孢子ではほとんど死

* 微生物は-20°C前後での保存によって適応や遺伝的变化(DNAは凍結によって損傷を受けないともいわれているが)を受け低温に生存しやすくなることがある。

滅しない⁴⁰⁾ことがわかる。しかし、種・株の相違・保護物質の種類によってこの傾向が変わることがある。また、*Saccharomyces cerevisiae*を -150°C に急速凍結した場合でも、 -90°C 以上で保存すると温度の上昇とともに生存率は低下する³⁴⁾。これは、緩慢解凍と同じく細胞内氷晶の成長によって細胞膜が破壊するためと考えられる。一方、超緩慢凍結($0.05\sim 0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)は長時間の保存に匹敵するため、生存率の低下をまねく。上記のような -20°C 附近での保存による微生物の死滅は、細胞膜の傷害とくに膜脂質の固化化にともなう傷害によって、細胞内容物(低分子物質や酵素などの高分子物質)の流失が³⁹⁾時間とともに増加するため代謝傷害ひいては死滅に及ぶと考えられる。この代謝傷害は必要な栄養を増殖試験培地に補充すれば多くの場合回復する⁴¹⁾。

このような種々の傷害から細胞を保護するために、古くから保護物質として、塩、糖、アルコール、有機酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質その他の高分子物質、培養基などが用いられている。そのおもな化合物は食塩、グリセリン、ブドウ糖、ジメチルスルフォキシ

ド、ポリビニールピロリドン、グルタミン酸、血清アルブミン、肉タンパク、細菌抽出物などである。これらの効果は微生物の種類によって異なるが、とくに食塩の効

第10図 *Saccharomyces cerevisiae* の凍結後の生存率 (a) と凍結前の細胞内水分含量 (b) におよぼす食塩濃度の影響*

* 凍結温度 -33°C で急速凍結・緩慢解凍を行なった。
(from MAZUR (1966))

第9表 各種懸濁液中での *Aerobacter aerogenes* の生存率

Experiment*	Medium	Viability (%)	
		Control	Frozen
1a	Distilled water	97	63
1b	Aqueous 10% glycerol	97	96
1c	Basal medium without carbon source	97	39
1d	As 1c but equiv. 1 mg. dry wt. organism/ml.	97	32
1e	Basal medium+10% glycerol	97	70
2a	10% glycerol	97	96
2b	As 2a, but equiv. 1 mg. dry wt. organism/ml.	97	95
2c	As 2a but 0.1 mg. organism/ml.	97	95
3a	10% glycerol; stationary phase organisms from agar slope	90	89
4a	10% diethylene glycol	97	95
4b	10% glucose	91	88
4c	10% sucrose	98	95
4d	10% polyethylene glycol, mol. wt. about 10,000	92	89
4e	10% <i>i</i> -erythritol	97	95
4f	Tryptic meat broth	93	48
4g	As 4f+15% glycerol	92	91
5a	M-NaCl (5.6%)	95	12
5b	0.4 M-NaCl	97	5
5c	0.1 M-NaCl	97	11
5d	0.05 M-NaCl	96	25
5e	0.005 M-NaCl	96	23
5f	'Saline tris buffer'	98	15
5g	'Saline phosphate buffer'	99	36

* 10 mg dry wt. cells/ml (EXP. 1 と 2) または 1 mg dry wt. cells/ml (EXP. 3, 4 と 5) の各種細胞懸濁液約 0.05 ml を液体窒素中に滴加し、3~10 min 後室温の saline buffer 中で解凍し、生菌数をスライド培養法で計数した。
(from POSTGATE ら (1961))

第10表 *Aerobacter aerogenes* の生存率におよぼす凍結速度と食塩添加の影響*

Suspending medium	Cooling rate	Cooling temperature (°C)	Survival (%)
0.12 M saline phosphate buffer	18°C/min	-79	1>
"	100°C/sec	-196	36
distilled water	100°C/sec	-196	63

* 第8表参照
(from data of POSTGATE ら (1961))

果は酵母と細菌とは反対の結果を与えていることが知られている。すなわち、酵母では食塩濃度の増加とともに生存率は高くなる(第10図)⁸⁴⁾が、細菌では逆に低下している⁴⁸⁾。*aerobacter aerogenes* の例を第9表に示した。この塩阻害は凍結速度を緩慢にすることによってさらに生存率は低下することが第10表からわかる。この阻害が細菌に共通したものかどうかは増殖に高濃度の食塩を必要とする海洋細菌や好塩細菌についての研究が十分行われていない⁴⁸⁾ので断定することはできないが、細菌に対する塩阻害について、伊藤⁴⁴⁾は細菌細胞膜粒子の電子伝達系についての研究から、凍結による傷害は膜の内側の系に起こるが、食塩による阻害は細胞膜の外側に近い系に起こると推定し、食塩は凍結とは別種の傷害を膜系におよぼすことを示唆している。塩阻害は食塩以外でも見出され、2°Cで1モル以上の1価カチオンの間では $\text{Li}^+ > \text{Cs}^+ > (\text{Rb}^+, \text{Na}^+) > \text{K}^+$ の順に、ハロゲン化物の間では $\text{F}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ の順に低下している⁸⁴⁾。2価カチオンでは細菌の cold osmotic shock (3°C, 2 min) の場合に Mg^{2+} , Ca^{2+} , や Mn^{2+} が微量 ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) で保護効果を示す⁴⁵⁾ことが知られている。もっとも一般的な保護物質であるグリセリンはときには細菌の増殖を阻害するが、多くの微生物で非常に効果的な物質である。この保護作用については、細胞内に自由に透過し電解質の溶媒となり高い水素結合性によって、細胞内水分の凍結を阻げるもの⁴⁶⁾と推定されている。細胞内に自由に透過し得ないが高い水素結合性をもつ高分子物質(ポリビニルピロリドンなど)も同様に保護作用を示すが、これらは低分子化合物とは逆に細胞外から細胞膜を保護しているものと考えられる⁴⁷⁾。その他、MORICHI ら⁴¹⁾は、L-グルタミン酸が細菌に効果的な保護物質であって、その3つの官能基はいずれも保護効果に必須であり、いずれか1つを欠く化合物では無効であることを示している。これら多くの化合物の保護効果は微生物の種類や株によって異なる⁴⁸⁾。それらがどのような作用機作で凍結

傷害を保護しているかについてはまだ明確にはされていない。

上記のほか、微生物の凍結に対する感受性は、(1)対数初期の細胞の方が定常期の細胞より著しく高く⁸⁴⁾、(2)好気培養の細胞は嫌気培養のものより低い⁴⁹⁾、(3)懸濁液の細菌濃度が低いほど高い⁵⁰⁾、(4)いわゆる cold osmotic shock に対しては、ふつうグラム陽性菌はグラム陰性菌よりもその影響を受けにくい、凍結に関しては両者に感受性の差はなく、むしろ種および株の差が顕著であることなどが知られている。以上のように多くのすぐれた研究にかかわらず、微生物の凍結による傷害がどのような機構によっているかについてはまだ十分にわかっていないのが現状である。

3. ま と め

上述したように、低温においても一見、多くの微生物が増殖・生存するように見えるが、くわしく調べてみると、一定環境には適応したものも含めて数少ない特定の微生物のみが増殖するにすぎないことがわかる。微生物の増殖を低温下で阻止するには、0°C 附近においては、できるだけ低い温度(-10°C 以下)で、低い水分活性を保つことであり、また凍結温度下において微生物を死滅させるには、急速凍結・緩慢解凍を行なうか、緩慢凍結で微生物が増殖しない範囲内でできるだけ高い温度に保つことであろう。

しかし、低温による食品保蔵の意義は、微生物の増殖を抑えることであり、これによって加熱など同様の殺菌効果を期待することはできない。また一般的な問題であるが、冷凍・冷蔵にさいしても食品への微生物汚染をできるだけ少なくすることが大切であることはいうまでもない。

文 献

- 1) SHEWAN: *Fish as Food*, 1, 487 (1961); ELLIOT・MICHENER: Tech. Bull. No. 1320, Agr. Res. Serv., U.S. Dept. Agr. (1965); 門田・石田: 食品工業, 13, 73 (1970).
- 2) STRAKA・STOKES: *J. Bact.*, 80, 622 (1960); Di MENNA: *J. gen. Microbiol.*, 23, 295 (1960); SINCLAIR・STOKES: *Can. J. Microbiol.*, 11, 259 (1965); STANLEY・ROSE: *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 252, 199 (1967).
- 3) BROCK・FREEZE: *J. Bact.*, 98, 289 (1969); 吉田・大島: 生 化, 42, 544 (1970).
- 4) ZOBELL・JOHNSON: *J. Bact.*, 57, 179 (1949).
- 5) ZOBELL: *Proc. Low Temp. Microbiol. Sym.*, p. 109 (1962).
- 6) 瀬良・木俣: 印刷中(日水誌); SERA・ISHIDA: 印

- 刷中 (日水誌).
- 7) MICHENER • ELLIOT: *Adv. Food Res.*, **13**, 367 (1964).
- 8) McCORMACK: *Com. Fisheries Rev.*, **12**, 28 (1950).
- 9) STOKES: in *Recent Progress in Microbiology VIII*, p. 187 (1963).
- 10) MORITA • HAIGHT: *Limnol. Oceanogr.*, **19**, 103 (1964).
- 11) 駒形: 醗協誌, **23**, 152 (1965).
- 12) SCOTT: *Adv. Food Res.*, **7**, 83 (1957); SCOTT: *Proc. Low Temp. Microbiol. Sym.*, **89** (1962); WODZINSKI • FRAZIER: *J. Bact.*, **79**, 572 (1959); **81**, 353, (1961); **81**, 359 (1961).
- 13) Tappel: in *Cryobiology*, p. 163 (1966).
- 14) MARSHALL • OHYE • CHRISTIAN: *Appl. Microbiol.*, **21**, 363 (1971).
- 15) LARKIN • STOKES: *Can. J. Microbiol.*, **14**, 97 (1967).
- 16) EMODI • LECHOWICH: *J. Food Sci.*, **34**, 78 (1969); ALFORD • PALUMBO: *Appl. Microbiol.*, **17**, 528 (1969).
- 17) JANNASH, et al.: *Science*, **171**, 672 (1971).
- 18) HESS: *Can. Biol. Bd. J.* **1**, 109 (1934); CHISTYAKOV • NOSKOVA: *IX Inst. Congr. Refrig. Proc.* **2**, 4230 (1955); FARRELL • ROSE: in *Thermobiology*, p. 147 (1967).
- 19) SHAHATA • COLLINS: *Appl. Microbiol.*, **21**, 466 (1971); MARSHALL • OHYE: *J. gen. Microbiol.*, **44**, 41 (1966); LARKIN • STOKES: *J. Bact.*, **91**, 1667 (1966); SINCLAIR • STOKES: *J. Bact.*, **87**, 562 (1964).
- 20) LISTON, et al.: *FAO: FIC/69/0/31*, (1969); MATCHES • LISTON: *J. Food Sci.*, **33**, 641 (1969).
- 21) THORLEY • WOLF: *Spore II*, p. 1 (1960); HALVORSON: *Proc. Low Temp. Microbiol. Sym.*, p. 27 (1962).
- 22) HAGEN, et al.: *Can. J. Microbiol.*, **10**, 813 (1964).
- 23) HARDER • VELDKAMP: *J. appl. Bact.*, **31**, 12 (1968).
- 24) BAXTER • GIBBONS: *Can. J. Microbiol.*, **8**, 511 (1962); ROSE • EVISON: *J. gen. Microbiol.*, **38**, 131 (1965); CRANDALL • KOCK: *J. Bact.*, **105**, 609 (1971).
- 25) BROWN: *J. gen. Microbiol.*, **17**, 64 (1957); HAMON • PERON, *Ann. Inst. Pasteur*, **112**, 291 (1967); COUSIN: *Ann. Inst. Pasteur*, **113**, 309 (1967).
- 26) NG • INGRAHAM • MARR: *J. Bact.*, **84**, 331 (1962); UPADHYAY • STOKES: *J. Bact.*, **86**, 992 (1963); ISHIDA • MORITA, under contribution (*J. Bact.*).
- 27) KATES • BAXTER: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 1213 (1962); MARR • INGRAHAM: *J. Bact.*, **84**, 1260 (1962); KATES • HAGEN, *Can. J. Biochem.*, **42**, 481 (1964); FARRELL • ROSE: *J. gen. Microbiol.*, **50**, 429 (1968).
- 28) CHAN • HIMES • AKAGI: *J. Bact.*, **106**, 876 (1971).
- 29) SATO • TAKAHASHI: *J. gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 217 (1969).
- 30) YURCHENO, et al.: *Appl. Microbiol.*, **2**, 53 (1954).
- 31) MAIER • TAPPEL: *Anal. Chem.*, **26**, 564 (1954).
- 32) MAZUR: *J. gen. Physiol.*, **47**, 347 (1963).
- 33) MAZUR et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **71**, 31 (1957); MAZUR: *J. Bact.*, **82**, 662 (1961); *Biophys. J.*, **1**, 247 (1961).
- 34) MAZUR: in *Cryobiology*, p. 214 (1966).
- 35) DOEBBLER • RINFRET: *J. Bact.*, **85**, 485 (1963).
- 36) GRECZ, et al.: *Can. J. Microbiol.*, **17**, 135 (1971).
- 37) ARAKI • NEI: *Low Temp. Sci. Ser. B*, **20**, 57 (1962).
- 38) CLEMENT: *Can. J. Microbiol.*, **7**, 99 (1961).
- 39) WOODBURN • STRONG: *Appl. Microbiol.*, **8**, 109 (1960).
- 40) HAINES: *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **124**, 451 (1938).
- 41) MORICHI: in *Freezing and Drying of Microorganism*, p. 117 (1969).
- 42) POSTGATE • HUNTER: *J. gen. Microbiol.*, **26**, 367 (1961); SOKOLSKI • STAPERT • FERRER: *Appl. Microbiol.*, **12**, 327 (1964).
- 43) GREIG et al.: *J. app. Bact.*, **33**, 528 (1970).
- 44) 伊藤: 食糧研報, **34**, 31 (1968).
- 45) SATO • TAKAHASHI: *J. gen. Appl. Microbiol.*, **14**, 413 (1968).
- 46) MERYMAN: in *Cryobiology*, p. 1 (1966).
- 47) MAZUR: *Science*, **168**, 939 (1970).
- 48) MOSS • SPECK: *Appl. Microbiol.*, **11**, 326 (1963); MACLEOD, et al.: *Can. J. Microbiol.*, **12**, 61 (1966).
- 49) NEI • ARAKI • MATSUSAKA: in *Freezing and Drying of Microorganisms*, p. 3 (1969).
- 50) BRETZ: *Can. J. Microbiol.*, **7**, 793 (1961); MAJOR, et al.: *J. Bact.*, **69**, 244 (1955).