高圧による大腸菌の殺菌

梶山 昇*・秋住啓二*・安部井孝蔵*

長田 優*・江頭辰昭*・三宅義章*

Sterilization of *Escherichia coli* by High Pressure

Noboru KAJIYAMA*, Keiji AKIZUMI*, Kouzou ABEI*

Masaru NAGATA*, Tatuaki EGASHIRA*

and Yoshiaki MIYAKE*

* Hayashikane Sangyo Co., Ltd., 2-4-8 Yamato-machi
Shimonoseki-shi Yamaguchi-ken 750

Sterilization of *E. coli* in foods under a high pressure was studied. *E. coli* cells cultivated at 37°C for 48 h were used in this study, because they were more resistant to a high pressure than the younger cells. Samples in a nylon bag containing the $10^7 \sim 10^8$ cells/ml were treated under 300 MPa or 400 MPa at 20°C for 10, 15 or 30 min. *E. coli* was sterilized in any solution of water, 10~20% protein or 1~10% sucrose at pH 7.0~8.8 after 10 min under 400 MPa or at pH 4.4~5.0 after 10 min under 300 MPa. In the presence of more than 50% of soybean oil sterilization requires 15 min under 400 MPa, as opposed to the treatment for 10 min under 400 MPa with lard (solid oil). *E. coli* in a emulsion made by mixing an oil and a protein was needed to be sterilized under 400 MPa for 30 min. The most effect method for the sterilization was to treat bacteria solution frozen at -20°C under 200 MPa for 10 min.

(Received Sep. 14, 1992)

高圧力下でタンパク質が変性することは古くから知られていた¹⁾。しかし、食品に利用するようになったのは近年のことである。高圧力はタンパク質を変性させると同時に殺菌することができ、菌単独の殺菌^{2)~4)}や、柑橘果汁⁵⁾、日本酒⁶⁾、食肉⁷⁾中での殺菌が研究されている。しかし高圧力処理した食品を実際に製品として市場に提供するためには食品成分の影響、加工方法による影響、保存方法の影響などさらに多くのデータの蓄積が必要である。

今回の報告では、菌の中でも加工食品に対して特に厳しい規則のある大腸菌⁸⁾について圧力殺菌の効果について検討した。大腸菌は加工食品から検出された場合その食品は不衛生とみなされ出荷は認められない。従って、高圧処理食品を製造するためには大腸菌に対する圧力殺

菌効果を正確に把握する必要がある。また、圧力は高ければ高いほど殺菌効果はあるが実用機の 400 MPa の圧力が限界である⁹⁾¹⁰⁾。そのため 400 MPa 以下の圧力下で、しかも作業効率を考慮できるだけ短時間で各食品成分中において完全に殺菌可能な圧力条件について検討した。

実験材料及び実験方法

1. 供試菌と菌懸濁液調整法

供試菌としては *Escherichia coli* ATCC 2592 を用いた。それを 10 ml の標準液体培地 (酵母エキス 2.5 g, ペプトン 5 g, ブドウ糖 1 g/1 リットル, pH 7.0) にて 37°C で 15~18 時間前培養した。この菌液 1 ml を 500 ml の同じ培地で所定の温度、時間培養した。培養後

* 林兼産業株式会社 (〒750 山口県下関市大和町 2-4-8)

8 000×g, 5 分間遠心分離にて集菌し, 得られた菌体を $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu/ml となるように O.D₆₀₀=0.5 に滅菌水で調節した.

この菌懸濁液に各種の添加物を添加した後, その 20 ml をナイロン製の袋にいれ, 空気を完全に除去した後, 熱シールにより密封し圧力処理を行った.

2. 圧力装置

高压処理装置は三菱重工(株)製 (MCT-150 FS, 最高圧力 700 MPa) を用いた. 昇圧速度は 1.6 MPa/s, 減圧速度は 6.4 MPa/s であった. 圧力処理時の温度は 20°C の恒温水を加圧容器を被っているジャケットに循環させることで 20°C の恒温とした.

3. 生菌数の測定

生菌数測定培地として標準寒天培地, デスオキシコレート培地, トリプトソイ寒天培地 (栄研化学), トリプトソイ寒天培地に酵母エキス (日本製薬) を 0.25% 添加したトリプトソイ-酵母エキス寒天培地, BGLB 液体培地 (栄研) を用いた.

圧力処理した懸濁液は滅菌希釈水にて $1/10 \sim 1/10^8$ に段階希釈を行い, その 1 ml をシャーレにいれ上記の寒天培地で混濁培養した. 37°C で 2~5 日間培養し, 菌数の最大時にコロニー数を計測した. BGLB 液体培地にて菌数を測定する場合は最確法 (Most Probable Number, MPN 法)¹¹⁾ に準じた. 菌が死滅したかどうかは, 菌懸濁液 10 ml を 2 倍濃度の 10 ml BGLB 培地にいれ, 37°C で 5 日間培養しダーラム管にガスが発生したかどうかで判断した. 1 回の試験に 6 検体以上から菌の生死を調べ, 少なくとも 3 回同様の試験を行い 20 本以上の BGLB 培地のガス発生を調査した. その 20 本以上の培地の中でガス発生しなかった割合を死滅率として示した.

4. 各種添加物の影響調査

添加物の圧力殺菌に及ぼす影響を調べる場合 2 倍濃度の各溶液を調整しオートクレーブで滅菌後等量の菌液を入れ密封し圧力処理した.

カゼイン, 塩化ナトリウム, ショ糖, 塩化マグネシウム, 硫酸マグネシウム, 塩化カルシウム, 塩酸は片山化学工業, ペプトンは日本製薬, 大豆油は味の素, ラードは大洋漁業製を用いた.

5. 乳化溶液の調製法

15% タンパク溶液 (ペプトン, カゼイン溶液) 50 ml に大豆油 5~15 ml を加え 15 000 rpm., 22 分間ホモジナイズ (日本精機, ホモジナイザー DX-3) を行い乳化溶液を得た. 乳化の型は電気抵抗を測定することで

求めた.

6. 菌の凍結の影響調査

菌液は低温恒温水槽 (池田理化, 温度 -35°C) を用いて -5°C, -20°C に冷却した. 冷却速度は 6°C/min であった. これらの冷却した菌は解凍しないように素早く圧力処理を行った. 実験は以下の 4 区で行った.

(1) 対照は未処理の菌液とした, (2) 菌液を上記の速度で -20°C に凍結し, 20°C の室温下に 1 時間放置し自然解凍した, (3) 未処理の菌に 400 MPa, 10 分間の圧力処理を行った, (4) 菌液を -20°C に凍結し, 凍結したまま 20°C, 400 MPa, 10 分間圧力処理した. それぞれの処理液を, 8 000×g, 5 分間遠心分離し菌体を除去し上清を得, それを分光光度計 (日本分光工業, UVDEC-610 型) により 660, 280, 260 nm の吸収値を測定し, 菌体からの漏洩物を検討した. (4) の -20°C に凍結後圧力処理した菌液は 11~13°C に上昇した.

結果と考察

1. 培養温度及び時間が *E. coli* の圧力耐性に及ぼす影響

前培養した *E. coli* を培地に移すと誘導期, 対数期, 定常期と経過し, やがて死滅期に向かう. それらの期間は培地組成, pH, 温度などの環境因子により大きく変化する. そこで芝崎¹²⁾の方法に準じて各期を見だし, 各期における *E. coli* の圧力耐性について調査した. 300 MPa の圧力に対しては培養 9 時間の対数増殖期が圧力耐性が低く培養 50 時間の定常期がもっとも耐性が強かった (Fig. 1). これは乳酸菌¹³⁾, 酵母¹⁴⁾でも同じ傾向が確認されており対数増殖期の外部刺激の感受性の高さとも一致している. Fig. 1 の結果より *E. coli* の培養は耐圧性が最も高くなる 37°C, 48~50 時間行った. (但し, Fig. 9 の実験には対数増殖期の菌を用いるため, 37°C, 5 時間培養した菌を用いた).

菌の殺菌には圧力保持時間が大きく影響している. 低い圧力でも圧力保持時間が長ければ殺菌効果はより増大する. しかし前述したように圧力装置の大型化が困難である現状では, できるだけ短時間で回数を増やすことが好ましい. そこで, *E. coli* を殺菌する最短保持時間を検討した (Fig. 2). *E. coli* を完全に殺菌するには 300 MPa, 20 分間以上もしくは 400 MPa, 10 分間以上の圧力が必要であった. 以下の実験において圧力保持時間は 10 分間とし殺菌状況を調べた. 400 MPa, 10 分間の圧力で殺菌できない場合は保持時間を延長し殺菌を行った.

Fig. 1 Effect of cultivation time on high pressure resistance of *E. coli*

Pressurization: 10 min, 20°C

Cultivation time at 37°C

- (●—●) 9 h
- (○····○) 24 h
- (×····×) 50 h
- (△---△) 7 days

2. タンパク溶液の圧力殺菌への影響

食品中においてタンパク質は重要な構成成分の一つである。しかも圧力の影響を最も受けやすい。食品によりタンパク含量は異なるが畜肉ハム・ウインナーで10～20%，魚肉練り製品で8～15%である¹⁷⁾。Fig. 3に15%溶液中で圧力処理した結果を示した。タンパク溶液としてカゼインとペプトン溶液を用いた理由として、カゼインは15%という高濃度のためゲル化するがペプトン溶液はゲル化しないために2通りのタンパクを用いた。また、ペプトン溶液はタンパク溶液というよりむしろペプチド溶液であるためタンパクとペプチドの比較を兼ねて行った。タンパク質が15%含まれていても圧力殺菌においてはタンパク無添加と差はなかった (Fig. 3)。10%、20%の濃度でも行ったが同様の結果であった。タンパク質自体は圧力そのものに影響されるが殺菌には影響を及ぼさなかった。

3. 糖、塩溶液の圧力殺菌への影響

糖、塩類は食品の味を整える以外に凍結変性防止や水分活性低下による保存性の向上などに用いられている。

Fig. 2 Effect of holding time on cell death under different pressures

Initial cell number: 1.5×10^8 cfu/ml

Death rate: more than 20 samples put into the BGLB liquid media and cultivated at 37°C for three days. The rate of BGLB without gas was defined as death rate.

- (○—○) 200 MPa
- (●····●) 300 MPa
- (×····×) 400 MPa

Fig. 3 Effect of high pressure on *E. coli* in sterilized water or protein solution

Pressurization: 10 min, 20°C

Initial cell number: 3.2×10^8 cfu/ml

- (○—○) 15% milk casein solution
- (●····●) 15% Peptone solution
- (△····△) sterilized water

Fig. 4 Effect of high pressure on *E. coli* in sucrose and sodium chloride solutions

Pressurization: 10 min., 20°C

Initial cell numbers: 3.2×10^8 cfu/ml (A)

: 7.4×10^7 cfu/ml (B)

(A) sucrose solution

(○—○) 0% (control)

(●·····●) 5%

(×·····×) 15%

(B) sodium chloride solution

(○—○) 0% (control)

(●·····●) 5%

(×·····×) 10%

ショ糖は5%以上、食塩は10%以上含まれると殺菌されにくかった (Fig. 4). これは *Bacillus licheniformis*¹⁸⁾ でも同様の結果が得られている。ショ糖と食塩を比較した場合ショ糖5%のほうが食塩5%より圧力殺菌に対する保護効果が大であった。従って、食塩よりショ糖の方が保護効果は大きいと推測される。

凍結変性を抑えるため、通常のスリ身には5%のショ糖が添加されている。スリ身を利用し加圧食品を製造する場合殺菌には注意しなければならない。食塩もショ糖同様10%以上の場合圧力効果が低下するので10%以上の食塩を用いる食品に利用する場合、注意が必要である。

4. pHによる圧力殺菌の影響

加工食品は原料の鮮度によりpHが大きく変動する。pHを一定に保つため食品の強度に適正なpHに調整するためpH調整剤を用いる。pH調整剤としてクエン酸、炭酸水素ナトリウム、リン酸塩など39種類が認められている¹⁹⁾。そのうち7種類がリン酸塩でありpH

調整剤として最も良く使用されている。リン酸ナトリウムを用いpH4.4~8.8の緩衝液で圧力処理を行った。pH7.0以上では圧力殺菌のpHの影響はなかった。pH4.4~5.0では*E. coli*発育可能pHであるにもかかわらず²⁰⁾容易に殺菌された (Fig. 5)。圧力下においてリン酸緩衝液はトリス塩酸、酢酸緩衝液と比較すると圧力下でのpH変化が最も大きい²¹⁾。そのため圧力下でpH4.4がさらに低いpHとなり*E. coli*の圧力殺菌の効果が増大したと考えられる。pH6.0でもその傾向がみられる。圧力殺菌を行う場合、pH調整剤としてリン酸塩を用いpHを中性より酸性にするほうが殺菌には効果的だと思われる。

5. 油脂の圧力殺菌への影響

食品には植物油のような液状の油とラード、ヘットのよう固形の油が含まれている。圧力殺菌における油の影響を調べるために0~75%の大豆油、ラード存在下で圧力処理を行った。大豆油の場合50%以上含まれると

Fig. 5 Effect of high pressure on *E. coli* in pH 4.4~pH 8.8, 0.1 M phosphate buffer

Pressurization : 10 min. 20°C

Initial cell numbers : 1.8×10^8 cfu/ml

(○—○) pH 4.4

(●—●) pH 6.0

(△—△) pH 7.0

(×—×) pH 8.8

400 MPa, 10 分間の圧力では殺菌できず処理時間を 15 分間延長しなければならなかった (Fig. 6 A). 一方, ラード (B) の場合 75% まで含量を増加させても圧力殺菌に影響はなかった (Fig. 6 B). ラードが圧力下で液状になっている可能性も考えられたため, ラードを円柱状に成形し水に入れ圧力処理した. 圧力下で液体になれば形が変形するはずであるが円柱状のままであった. さらに, チューブにラードを入れその上端に球形の重りを載せ圧力処理を行った. ラードが液状またはゾル状になれば重りが下に沈むはずであるが重りはそのままであった. 菌液の量を固定し油の量を増加させることで殺菌されにくくなったことから, 油と菌が接することで細胞膜に変化が生じたか菌体の水分含量が変化したかその他の理由で菌の保護効果が働いたと推測される. 滅菌した分液ロートに油と菌液をいれ, 激しく攪拌した後に静置し菌液と油を分離した. この菌液を圧力処理したところ対照と同じように容易に殺菌された. この実験より油による菌に対する圧力保護効果は菌体を油が被覆することによって生じていることが判明した.

6. 乳化溶液中での圧力殺菌

食品に液体油がそのままの状態で存在することはドレ

ッシング以外はみあたらない. 大部分の液体油はタンパク質と乳化された状態で存在している. 圧力保護効果のない 30% 以下的大豆油を乳化させ圧力に対する効果を調べた. 乳化用のタンパク質としてカゼイン, 脱脂大豆, ペプトンを用いたがタンパクの種類に差は認められなく, ほとんど圧力の効果はみられず完全に殺菌するには 400 MPa, 30 分間必要であった (Fig. 7). これは乳化することで多くの空気が乳化溶液に取り込まれるため圧力保護効果が生じたと思われる. 今回の条件下でタンパク質と油をホモジナイズすることで体積が 3~5% 増加したことからも溶液中に空気が取り込まれたことが容易に認められる. 空気による圧力保護の他に乳化により油が細片化され表面積が増加し菌と接する面が大きくなったために乳化溶液の圧力効果が消失したと考えられる. また, 圧力はタンパク質のイオン化とそれに伴う水和を促進させるため, 膜と水の界面の性質を変えることで菌体を不活化している²²⁾. しかし, 水の代わりに乳化液, 食塩水, ショ糖溶液などが膜と接した場合, 膜と水溶液の水和が妨げられ膜の変性が抑えられたため保護効果が生じたと考えられる. Fig. 7 に示した乳化の型は o/w で比較的油の少ない型であったが, マヨネーズのような w/o 型の乳化溶液を完全に殺菌するには 400 MPa, 40 分間必要であった. 乳化溶液の作成にはホモジナイザーを用いて高速で乳化させた. 実際の食品製造ではホイップ工程やサイレントカッターでのカッティングがこの乳化工程と考えられる. この工程を経た製品の圧力処理時間には十分に注意する必要があると思われる.

7. 凍結と圧力の併用による殺菌

37°C より 0°C に冷却して起こる冷却ショックに比べ凍結により, 細胞は大きな損傷を受けることはよく知られている¹²⁾. また, 凍結した食品に圧力処理を行い急速解凍することで最大氷結晶生成帯を迅速に通過させドリップの量を少なくし, 高品質の状態を保つ研究が行われている²³⁾.

加圧食品を製造する場合原料に加工を施し凍結保存後, 出荷時に圧力殺菌及び圧力加工するという方法が考えられる. そこで菌液を凍結し常温で圧力殺菌及び解凍を行った. 菌液を凍結したほうがより低圧で殺菌できた. -5°C の半凍結と -20°C の凍結では温度の低いほうが圧力殺菌効果は高かった (Fig. 8). また, -20°C に凍結した菌液を 20°C に自然解凍し圧力処理を行うと -20°C に凍結したまま圧力処理をした場合と同様に 200 MPa, 10 分間の低い圧力で完全に殺菌された. -20°C の凍結では圧力処理前にすでに菌が大幅に死滅していると考え

Fig. 6 Effect of high pressure on *E. coli* in soybean oil or lard

Pressurization: 10 min. 20°C

*1: 15 min. 20°C

(A) soybean oil

(○—○) 0% (control)

(●·····●) 25%

(×·····×) 50%

(△---△) 75%

(B) lard

(○—○) 0% (control)

(×·····×) 50%

(△---△) 75%

Table 1 Ultraviolet absorption spectra of supernatant fluid frozen and pressurized *E. coli*

sample	wavelength		
	260 nm	280 nm	600 nm
①	0.235	0.192	0.608
②	0.251	0.213	0.592
③	0.249	0.201	0.581
④	0.273	0.256	0.601

①: control (no-treatment)

②: frozen at -20°C and thawed at 20°C

③: pressurized at 400 MPa for 10 min.

④: frozen at -20°C and pressurized at 400 MPa for 10 min.

①~④ samples were treated at 8000×g, 5 min. and their supernatants were measured at 260, 280 and 600 nm.

られたため、凍結前後で菌数の変化を調べた。凍結前が 6.9×10^7 cfu/ml であったが凍結後は 1.3×10^7 cfu/ml と減少が認められた。今回の実験では死滅率は 18.8% であったが、RAY²⁴⁾ の報告では -20°C に凍結した場合、死滅率は 38% であるが損傷率は 94% となっている。凍結による菌の損傷は 280, 260 nm の吸収物質が漏洩していることから細胞質膜が損傷していると考えられている。また、菌に圧力処理を行うと凍結した場合と同様に 280, 260 nm の吸収物質が漏洩する⁷⁾。凍結菌、圧力処理菌ともに 280, 260 nm の吸収物質は増加したが凍結後圧力処理した場合が最も高い値を示した (Table 1)。凍結により細胞質膜が損傷したため圧力による殺菌効果が増したためであると考えられる。

凍結、圧力ともに細胞質膜に作用し 280, 260 nm の吸収物質の漏洩をもたらすなど共通した点が多い細胞凍結による死滅に対する保護物質として二価金属イオンがあげられる。Fig. 9 に二価金属イオン存在下での圧力殺

Fig. 7 Effect of high pressure on *E. coli* in o/w type emulsion

Pressurization : 10 min., 20°C

*1: 20 min., *2: 25 min., *3: 30 min.)

(○—○) control

(●—●) 20% soybean oil, 80% casein solution

(×—×) 30% soybean oil, 70% casein solution

Fig. 8 Effect of high pressure on *E. coli* after frozen

Pressurization : 10 min, 20°C

Initial cell numbers : 2.2×10^8 cfu/ml

(○—○) cell's temperature : 20°C

(×—×) " : -5°C

(●—●) " : -20°C

(△—△) " : 20°C

after frozen at -20°C

Fig. 9 Effect of high pressure on *E. coli* in metal ion solutions

Pressurization : 10 min, 20°C

Initial cell numbers : 5.5×10^7 cfu/ml

(○—○) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

(●—●) " + 0.2 M $MgCl_2$

(△—△) " + 0.2 M $MgSO_4$

(×—×) " + 0.2 M $CaCl_2$

菌の影響を調べた。凍結とは異なり、マグネシウムイオンが存在しても殺菌には影響はなかった。圧力により細菌が死滅するのは内部物質が漏洩することが原因ではなく圧力で膜タンパクが損傷しその結果として内容物が漏洩したためだと考えられる。

食品に圧力殺菌を利用することを前提とし、様々な系において大腸菌の圧力殺菌について調べた。油とタンパク溶液の混合した系では殺菌されにくいなどの単独の系ではわからなかった事実も見いだされた。食品は多くの種類の物質がいろいろな量含まれているため実際に圧力処理してみなければわからない点も多く、食品の圧力殺菌を行うには今後もより多くのデータの蓄積が必要であると思われる。

要 約

1) タンパク溶液中では *E. coli* は滅菌水中と差なく圧力の影響を受け 400 MPa, 10 分間の圧力で完全に死滅した。

2) 10% 以上の食塩, 5% 以上のショ糖中では *E. coli* は 300 MPa, 10 分間では不完全に, また 400 MPa, 10 分間では完全に死滅した。

3) pH が中性から弱塩基性側では弱く酸性側では強

い圧力殺菌効果でみられた。pH 5.0 では 300 MPa, 10 分間の圧力で完全に菌は死滅した。

4) ラードのような固形油脂は圧力殺菌に影響を及ぼさないが植物油などの液体は 50% 以上菌液に含まれると圧力保護効果がみられ、400 MPa, 15 分以上の圧力が完全殺菌には必要であった。

5) 油とタンパク溶液で乳化状態を形成すると圧力効果は全くなり 400 MPa, 30 分以上の圧力が必要であった。これよりは乳化形成を促すホイップやカッティング操作のはいる製品には殺菌に特に注意する必要がある。

6) -20°C の凍結と圧力を併用することで 200 MPa, 10 分の低圧で殺菌することが可能であった。品位に変化のない製品は凍結と併用することが望ましい。

本研究を行うにあたり多大なご助言を頂きました農林水産省食品総合研究所野口明德博士に深く感謝します。

文 献

- 1) P.W. BRIDGEMAN: *J. Biol. Chem.*, **19**, 511 (1914).
- 2) ZIMMERMAN, A.M.: *High Pressure Effects on Cellular Processes*, p. 96 ~ 101, Academic Press, New York (1970).
- 3) DOW, R.B. and MATHEWS, J.E.: *Phys. Rev.*, **56**, 215 (1939).
- 4) HOOVER, G.D., METRIC, C., PAPINEAU, M.A., FARKAS, F.D. and KNARR, D.: *Food Technol.*, **3**, 99 (1989).
- 5) 小川浩史・福久一馬・福本治次・堀 恵一・林力丸: 農化, **63**, 1109 (1989).
- 6) 原 昭弘・長浜源壮・大林 晃・林 力丸: 農化, **64**, 1025 (1990).
- 7) T. SHIGEHISA, T. OHMORI, A. SAITO, S. TAJI and R. HAYASHI: *International Journal of Food Microbiology*, **12**, 207 (1991).
- 8) 食品衛生小六法: 新日本法規出版 (1990).
- 9) 堀 恵一: 食品機械装置, **27**, 49 (1990).
- 10) 佐々木績・堀 恵一・井上 朗: 「食品への高圧利用」(林 力丸編), さんえい出版 (1990).
- 11) 食品衛生検査指針, (微生物編): 83~91, 社団法人日本衛生協会 (1990).
- 12) 芝崎 勲: 防菌防黴, **13**, 525 (1985).
- 13) 末永麻里・蒔田 薫: 防菌防黴, **18**, 129 (1990).
- 14) 落合信哉・中川喜博: 防菌防黴, **19**, 269 (1991).
- 15) KATSUI, N., TSUCHIDO, T., TAKANO, M. and SHIBASAKI, I.: *J. Gen. Microbiol.*, **122**, 375 (1981).
- 16) E.F. DELONG and A.A. YAYANOS: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 730 (1986).
- 17) 四訂標準食品成分表: 永岡書店 (1990).
- 18) 滝 妥恵・粟生武良・鳥羽 茂・光浦暢洋: 「高圧科学と加圧食品」(林 力丸編), さんえい出版 (1991).
- 19) 食品添加物マニュアル: 日本食品添加物団体連合会 (1988).
- 20) 芝崎 勲: 防菌防黴, **14**, 145 (1986).
- 21) NEUMAN, R.C., Jr., KAUFMANN, W., ZIPP, J.: *J. Phys. Chem.*, **77**, 2687 (1973).
- 22) 月向邦彦: 「加圧食品」(林 力丸編), さんえい出版 (1990).
- 23) 林 力丸・出内智子: 日本食品低温保蔵学会誌, **17**, 23 (1991).
- 24) RAY, B. and SPECK, M.L.: *Appl. Microbiol.*, **24**, 258 (1972).

(平成 4 年 9 月 14 日受理)