

【原著論文】

釜揚げしらす由来分離株の系統解析および釜揚げしらすと
その分離株に対する紫外線 LED の影響安友 優子¹, 葉田 敬子², 田端 京子³,
菅野 由佳¹, 白井 昭博^{1*}Phylogenetic Analysis of Bacterial Isolates from Boiled Sardine and the Effect of
Ultraviolet Light-Emitting Diode Light on ThemYu-ko YASUTOMO¹, Keiko HADA², Kyoko TABATA³, Yuka KANNO¹, and Akihiro SHIRAI^{1*}¹Department of Bioscience and Bioindustry, Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University, 2-1 Minamijosanjima-cho, Tokushima 770-8513, Japan²WDB Co., Ltd., Nissei Tokushima Bld. 2F, 2-11 Yaoyamachi-cho, Tokushima 770-0841, Japan³Faculty of Bioscience and Bioindustry, Tokushima University, 2-1 Minamijosanjima-cho, Tokushima 770-8513, Japan

Boiled young sardines produced in Tokushima Prefecture are untreated and additive-free, and it is difficult to maintain their quality since they can stay at their best for only 2 to 3 days. In this study, we examined the growth of bacteria in the boiled young sardines irradiated with ultraviolet light from an ultraviolet light-emitting diode (UV LED; peak wavelength, 280 nm). First, numbers of bacteria in general and various genera of the bacteria in the packaged boiled young sardines were determined using standard agar, mannitol salt agar with egg yolk, violet red bile agar, X-SAL agar, and ES Vibrio agar. From the boiled sardine were isolated 50 strains growing on the standard agar and 10 strains growing on the mannitol salt agar with egg yolk. The strains were phylogenetically analyzed, and four groups of isolates were found to be dominant, and related to *Psychrobacter* species, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus sciuri*, and *Macrococcus caseolyticus*, respectively. These four dominant isolates were irradiated with the UV LED for 3 s, and 99% of the bacteria died. Boiled sardine irradiated for over 60 s contained bacteria in general at significantly smaller numbers than the non-irradiated boiled sardine. Furthermore, the numbers of bacteria in general in the irradiated boiled sardine after storage for 48 hours in a refrigerator were smaller than those in the non-irradiated samples stored under the same conditions. These results demonstrated that UV LED irradiation has a bactericidal effect, and can suppress the growth of bacteria in boiled sardine. (Accepted 9 January 2019)

Key words : Ultraviolet light emitting diode (UV LED)/280 nm/Boiled sardine (釜揚げしらす)/Additive-free (無添加)/Non-thermal (非加熱)/Bactericidal effect (殺菌効果)/Growth suppression (増殖抑制).

緒 言

食品の品質と安全性を維持するために、微生物の殺菌処理は重要な工程である。食品の製造から運搬、その後の保管状態によっては微生物が増殖し、腐敗を引き起こすことによりその価値が失われる。特に魚介類は、生鮮食品であるにもかかわらず水揚げされてから消費者の元に届くまでの時間が長い傾向にあり、その他の食品に比べ腐敗が進みやすい素材である¹⁾。

食品の殺菌処理方法は、加熱による殺菌や、次亜塩素酸などの消毒剤による殺菌が一般的である。加熱殺菌は、微生物を抑制する有効な手法であるが、食品中のビタミンが失われることや、味覚、色、風味の変化による品質

の低下が問題である²⁾。また、消毒剤による殺菌では、添加した薬剤の残留や、有毒な副生成物が形成される恐れがあり、さらに、消毒剤の効かない耐性菌を生む可能性がある³⁾。

今日の生鮮魚介類の加工現場における微生物数を減少させるための手法には、食品製造用水や滅菌海水による洗浄、または、次亜塩素酸水などの食品添加物(殺菌料)として認可された殺菌剤による処理があり、これらの処理の後に低温保存されている^{4, 5)}。しかしながら近年では、消費者の健康指向の高まりにより、殺菌剤での処理や添加物の使用された食品を避ける傾向にあり、なおかつ加熱処理のように食品の嗜好性や機能性を損なうことのない、新たな殺菌処理技術の開発が求められてい

¹徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域 〒770-8513 徳島県徳島市南常三島町2-1 ☎088-656-7519²WDB(株) 〒770-0841 徳島県徳島市八百屋町2-11 ニッセイ徳島ビル2F ☎088-623-5222³徳島大学生物資源産業学部 〒770-8513 徳島県徳島市南常三島町2-1 ☎088-656-7519

る。

農林水産省が公表している平成29年の漁業・養殖業生産統計における徳島県のしらす漁獲量は、全国8位(生産量2,800 t)であり⁶⁾、特に徳島県産の釜揚げしらすは、無処理、無添加の製法で作られ、消費者の要望に応える商品である。しかしながら、その賞味期限がおよそ3日間と短いために大都市圏での販路確立には至っていない。徳島県同様、しらすの生産量の多い鹿児島県では、しらすの生食を目的とした場合の洗浄処理による微生物除去の試みがある⁷⁾。また、静岡県では、冷蔵の釜揚げしらすの鮮度保持を目的として、好気性微生物の増殖に必要な酸素のない状態での包装の開発が進められており⁸⁾、しらすにおける非加熱殺菌技術は発展の途上にある。

本研究では、釜揚げしらすの鮮度保持期間の延長を目標とし、非加熱かつ残留性のない殺菌処理法の確立のため、UV LED (Ultraviolet light-emitting diode) の照射による釜揚げしらすの殺菌効果を検討した。

紫外線は、その波長ごとに、UVA (320–400 nm)、UVB (280–320 nm)、およびUVC (200–280 nm) の3領域に区分される⁹⁾。中でも、UVCは最も高い殺菌力を有しており、これまでに水銀ランプを光源として、空気や水、および様々な物の表面殺菌に用いられてきた。しかし、2017年8月16日に水俣条約が発効され、特定水銀使用製品中、一般照明用の高圧水銀ランプについては輸出入および製造の禁止が決定した(2020年12月31日規制開始)。これらの水銀ランプの代替として、LEDの殺菌への応用が期待されている。水銀ランプは、壊れやすく水銀の漏出の危険性があることに加えて、温度依存性があり高温下でなければ最大出力を発揮できないが、LEDは衝撃に強く、低温下でも高出力を発揮することが可能である。さらに、低圧水銀ランプは185 nmおよび254 nmが主波長であるのに対し、LEDは主波長を調整可能であることから、様々な有用性を持つ半導体光源であるとして、研究および開発が進められている¹⁰⁾。

我々は、まず釜揚げしらすの微生物汚染状況を調査し、分離された菌株の系統解析を行った。次に、特に多く分離された優占4グループの代表株に対して、UV (280 nm) による殺菌効果を検討した。そして、釜揚げしらすにUV (280 nm) を直接照射し、その殺菌および細菌の増殖抑制効果を評価した。

実験方法

1. 試験試料

釜揚げしらすは、徳島県内の水産加工業者により冷凍保存されていたものを使用した。実験前日までは、研究室既設の一般的なフリーザー(−30℃)で冷凍保存し、

用時解凍し用いた。

2. 釜揚げしらすホモジナイズ懸濁液の調製

全ての実験における釜揚げしらす試料は、3℃に設定した冷蔵庫(クールインキュベータCN-25C, 三菱電気エンジニアリング(株))内で16時間解凍後に使用した。解凍した釜揚げしらす試料を、無菌パックに25 g(殺菌試験では1 gとした)秤量し、pH 7.2に調整した0.3 mMリン酸緩衝希釈水225 ml(殺菌試験では9 mlとした)を加え(10倍希釈となる)、15分間ホモジナイズした⁴⁾。数分間静置後のホモジナイズ液の上澄みを、遠心分離(8590×g, 5分間, 4℃)し、0.3 mMリン酸緩衝希釈水で10倍濃縮となるように調製し、これを釜揚げしらすホモジナイズ懸濁液とした。なお、しらすの殺菌試験におけるしらす試料保有細菌数の測定には、ホモジナイズ液の上澄みを原液とし用いた。

3. 釜揚げしらす保有細菌数測定

2. に準じて調製した釜揚げしらすホモジナイズ懸濁液を、標準寒天培地(日水製薬(株))、卵黄加マンニット食塩培地(日水製薬(株))、バイオレットレッド胆汁寒天培地(OXOID)、X-SAL寒天培地(日水製薬(株))、ESビブリオ寒天培地(栄研化学(株))に塗布し培養を行った。培養温度と培養時間は各々、標準寒天培地は35℃で48時間、卵黄加マンニット食塩培地は37℃で48時間、バイオレットレッド胆汁寒天培地は37℃で24時間、X-SAL寒天培地は37℃で18–24時間、ESビブリオ寒天培地は37℃で18–24時間とした。卵黄加マンニット食塩培地に発育したコロニーで、黄色のコロニーであり周辺に卵黄反応による白濁が見られる株、それ以外の白または赤色のコロニーを形成する株を分けて計数した。バイオレットレッド胆汁寒天培地による大腸菌群の鑑別、X-SAL寒天培地によるサルモネラ属菌の鑑別およびESビブリオ寒天培地によるビブリオ属の鑑別は、各培地の判定基準に準じて行なった。各培地で生育したコロニー数を計数し、釜揚げしらす1 g当たりの保有細菌数を求めた。

4. 16S rDNAの塩基配列を用いた系統解析

標準寒天培地で生育した一般細菌50株、ブドウ球菌選択培地である卵黄加マンニット食塩培地で生育した10株(卵黄反応が陽性または陰性であったそれぞれ5株)を釣菌し、5 ml LB培地(ナカライテスク(株))で35℃, 24時間振盪培養した。培養後、標準寒天培地へ画線し、35℃で18時間以上培養した。生育した単一コロニーを釣菌し、再度5 ml LB培地を用い同条件で培養した。その培養菌液50–100 μlを遠心分離(8000×g, 3分間, 4℃)し、得られた菌体から、SimplePrep

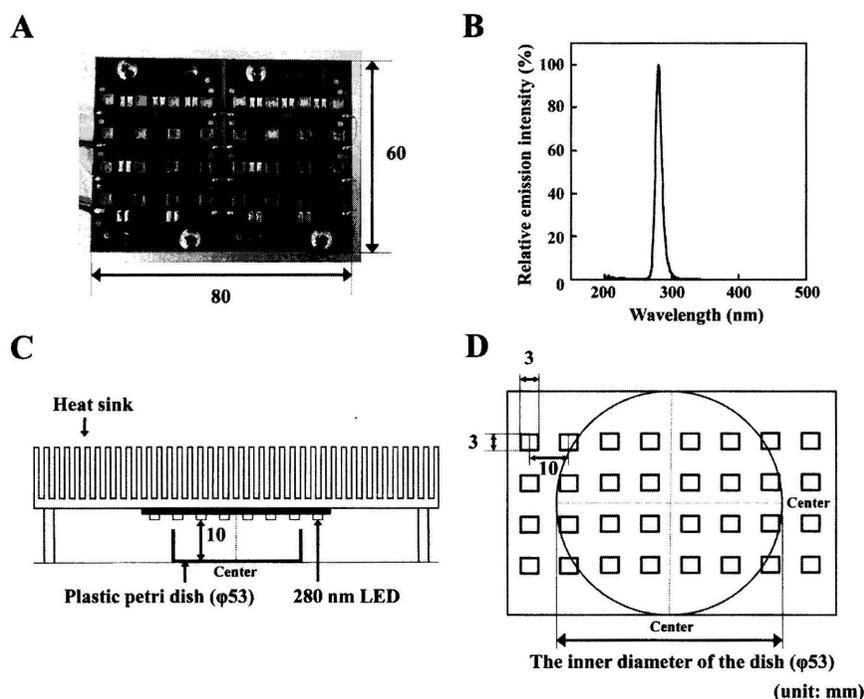


Fig. 1. UV-LEDs used in this study. A. Illumination source with 32 LEDs emitting light with a peak wavelength of 280 nm. B. UV-LED radiation spectrum. C. Diagram of the UV-LED irradiation setup. D. Diagram of the positions UV-LED for light application to the surface of an experimental sample.

reagent for DNA (タカラバイオ株) を用いて DNA 抽出を行い, Bacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ株) のプライマーを用い, 同キットの使用方法に準じて PCR 反応を行った。1% アガロースゲルでの電気泳動後, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ株) を使用して PCR 増幅断片の抽出を行った。塩基配列の決定は, Bacterial 16S rDNA PCR Kit のプライマーを用いて, シークエンシングを外注した (ユーロフィンジェノミクス株)。得られた 16S rDNA 塩基配列について, National Center for Biotechnology Information および DNA Data Bank of Japan の Basic Local Alignment Search Tool を用いて相同性検索し, 系統解析に用いた。

5. UV LED (280 nm) 照射装置

LED は, NCSU234AE (日亜化学工業株) を用い, その LED を基板に実装した照射装置 (サン電子工業株) を実験に使用した (Fig. 1 A)。放射スペクトルは, マルチチャンネル分光検出器 (MCPD-3700A, 大塚電子株) を使用して測定した (Fig. 1 B)。その放射ピークは 280 nm であり, 半値全幅は 275–285 nm であった。280 nm における放射照度は, フォトダイオードセンサー (PD-300-UV, 株オフィールジャパン) を備えた照度計 (NOVA II, 株オフィールジャパン) で測定した。1 個の LED (IF=300 mA) 直下, 照射距離 10 mm で測定した結果, 11.1 mW/cm² であった。試験では,

LED20個により試料への照射を行ったため (Fig. 1 D), 照射エネルギー量は, 1 秒間照射で 2200 J/m², 3 秒間照射で 6700 J/m², 5 秒間照射で 11000 J/m², 10 秒間照射で 22000 J/m², 20 秒間照射で 44000 J/m², 30 秒間照射で 67000 J/m², 60 秒間照射で 130000 J/m², 120 秒間照射で 270000 J/m² であった。

6. 釜揚げしらす分離株の殺菌

供試菌には, 釜揚げしらすから分離した *Psychrobacter* sp. (*P. faecalis*, *P. pulmonis*), *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus suciuri*, *Macrococcus caseolyticus* と近縁な株を使用した。分離株を 5 ml LB 培地で 35°C, 16–18 時間振盪培養後, 遠心分離 (6570×g, 3 分間, 4°C) により集菌し, 0.85% (w/v) 生理食塩水で洗菌, 集菌操作を 2 回行った。菌懸濁液の OD₆₆₀ をもとに, 0.85% 生理食塩水で 10⁶ cells/ml に調製し, これを試験菌懸濁液とした。調製した菌懸濁液 7 ml を, 30°C で 5 分間加熱後, プラスチックシャーレ (φ53 mm; IWAKI 無処理ディッシュ, 株三商) に分注し, フタを外し, 照射装置を上から被せ照射距離を 10 mm に設定した (Fig. 1 C)。LED は, シャーレの直径内に 20 個均一に並ぶようにした (Fig. 1 D)。30°C に設定したインキュベーター内で, 上から下方向に 1, 3, 5, 10, 20 秒間照射を行った。照射後, 菌液を 0.85% 生理食塩水で 10 倍段階希釈し, 各希釈液を SCDLP 寒天培地に塗布し, 35°C で 48

時間培養後の生菌数を残存生菌数とした。初発生菌数 (N_0) と t 秒後照射後の生菌数 (N_t) にもとに、式 (1) から計算される Log survival ratio を殺菌力の指標とした。

$$\text{Log survival ratio} = \text{Log} (N_t / N_0) \quad (1)$$

全ての実験は3回測定し、数値は平均値 \pm SD で表した。

7. 釜揚げしらすの殺菌

解凍した釜揚げしらす試料 1 g を、 ϕ 53 mm のプラスチックシャーレに重ならないように並べ、6. に記載したように、25°C に設定したインキュベーター内で UV (280 nm) を 5, 10, 30, 60, 120 秒間照射した。照射後、2. で記載したようにホモジナイズを行い、上澄みを標準寒天培地に塗布し、35°C で 48 時間培養後生育したコロニーを、一般細菌残存生菌数とした。同様にして、無照射試料の生菌数を計数し、照射後の試料の生菌数と比較した。また、無照射および照射後の試料を解凍に使用した冷蔵庫内で 48 時間保存 (3°C) し、同様に生菌数を測定した。全ての実験は 3 回測定し、数値は平均値 \pm SD で表した。

実験結果及び考察

1. 釜揚げしらすの微生物汚染調査

釜揚げしらすの微生物汚染状況を調査するために、パッケージ品を対象とし、標準寒天培地と各種鑑別培地を用いて一般細菌、ブドウ球菌属、大腸菌群、サルモネラ属菌、ビブリオ属菌の生菌数を推定した。Table 1 に、釜揚げしらすの 1 g 当たりの各培地上で形成されたコロ

ニー数を表した。一般細菌数は 6,280 CFU/g、ブドウ球菌属生菌数は、2,800 CFU/g であった。この内、卵黄反応を示した生菌数は 900 CFU/g であった。この結果から、ブドウ球菌と推定される細菌数は一般細菌の 45% を占めることが分かった。なお、一般細菌数は、食品衛生法で定められた基準 (一般細菌数が検体 1 g 当たり 100,000 個以下であること) を満たしており、食品衛生法の規格基準で検出の有無が重要である大腸菌群、ビブリオ属菌、サルモネラ属菌は不検出であった。

2. 釜揚げしらす由来分離菌株の系統解析

一般細菌 50 株、および卵黄加マンニット食塩培地から分離されたブドウ球菌推定株 10 株 (卵黄反応が陽性または陰性であったそれぞれ 5 株) について、16S rDNA (約 1.5 kb) の塩基配列を解析することにより系統解析を行った (Table 2)。その結果、試験した菌株 60 株の中で 16S rDNA 塩基配列を解析することができた 57 株は、7 属 12 種に分類され、ヒトへの病原性を持

Table 1. Numbers of the isolates from packaged boiled sardine growing on each selective medium.

Standard agar ^a	CFU/g				
	Mannitol salt agar with egg yolk ^b		Violet red bile agar ^c	X-SAL agar ^d	ES Vibrio agar ^e
	EY - ^f	EY + ^g			
6,278	1,900	900	0	0	0

The number of bacterial colonies was counted after cultivation on agar specific for the growth of each bacterial species :

^a standard agar for bacteria in general ;

^b mannitol salt agar with egg yolk for *Staphylococcus* sp. ;

^c violet red bile agar for coliform bacteria ;

^d X-SAL agar for *Salmonella* sp. ;

^e ES Vibrio agar for *Vibrio* sp.

^f Egg-yolk reaction : negative.

^g Egg-yolk reaction : positive.

Table 2. Numbers of the isolates related to the bacterial species based on phylogenetic analysis using 16S rDNA sequences.

Media	Species	No. of isolates	(%)	Subtotal	(%)
SA ^a	<i>Psychrobacter</i> spp. (<i>P. pulmonis</i> or <i>P. faecalis</i>)	19	(38)	19	(38)
	<i>Kocuria rhizophila</i>	15	(30)	15	(30)
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	5	(10)	8	(16)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	(6)		
	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	3	(6)	3	(6)
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	(4)	2	(4)
	Unidentified	3	(6)	3	(6)
Total		50	(100)	50	(100)
MSEY ^b	<i>Staphylococcus equorum</i>	2	(20)	6	(60)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	(20)		
	<i>Staphylococcus lentus</i>	1	(10)		
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	(10)	2	(20)
	<i>Planococcus maritimus</i>	2	(20)		
	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	1	(10)		
	<i>Kushneria indalinina</i>	1	(10)		
Total		10	(100)	10	(100)

^a standard agar ; ^b mannitol salt agar with egg yolk

つ菌種は検出されなかった。一般細菌50株中19株(38%)と最も多く検出された *Psychrobacter plumonis*, および *Psychrobacter faecalis* と近縁な株は, 16S rDNA 配列解析では, ほぼ同一の塩基配列を有しており判別できなかったため, *Psychrobacter* sp. とした¹¹⁾。*Psychrobacter* 属は, ガンマプロテオバクテリア綱に属する *Moraxella* 科のグラム陰性の球桿菌で, 耐塩性の低温菌であり, 海水や海水, 魚の皮膚やエラ, 低温保存した加工肉製品, 鶏肉, ヒトの組織などの多様な環境から分離される¹¹⁻¹³⁾。釜揚げしらす分離株と近縁な *P. plumonis* CCUG 46240^T 株は, 子羊のうっ血性の肺から初めて単離され¹⁴⁾, 同じく近縁な *P. faecalis* DSM 14664^T 株は, ハトの糞便で汚染された部屋の清掃によって生成されたバイオエアロゾルから単離されている¹⁵⁾。次に多く分離された株と近縁な *Kocuria rhizophila* (30%) が属する *Kocuria* 属は, グラム陽性の球菌であり, 哺乳類の皮膚から土壌, 根圏, 農作物, 真水や海底質などから分離される¹⁶⁾。3番目に多く分離された株と近縁な *Staphylococcus sciuri* (10%) は, オキシダーゼ陽性のブドウ球菌で, 主に動物由来の細菌種であり, 土壌, 砂, 水, 湿原などの環境からも分離される¹⁷⁾。*S. sciuri* と同じく分離株中10%の割合で認められた株と近縁な *Macrococcus caseolyticus* は, グラム陽性の球菌で, 牛乳, 牛の臓器, 食品加工場などから分離される¹⁸⁾。

鑑別培地で生菌数を決定した結果, ブドウ球菌属と判定された株がおよそ45%を占める優占属菌であることが示唆されたが (Table 1), 16S rDNA による系統解析の結果では, 標準寒天培地で分離された株の16%程度であった。また, *Staphylococcus* 属の選択分離培地である卵黄加マンニット食塩培地から分離した10株中, *Staphylococcus* 属と近縁な株は6株であり, その他に *Planococcus maritimus* と近縁な株が2株, *M. caseolyticus* と近縁な株が1株, *Kushneria indalinina* と近縁な株が1株分離された。卵黄加マンニット食塩寒天培地は, 7.5%の食塩耐性を利用して *Staphylococcus* 属以外の細菌の発育を抑制する鑑別培地であり, *P. maritimus* は0-17%のNaCl存在下で生育¹⁹⁾, *M. caseolyticus* は10%のNaCl存在下で生育²⁰⁾, *K. indalinina* は5-17.5%NaClで生育可能であり²¹⁾, 全て好塩菌であることから, これらが生育したと考えられた。

3. 分離株に対するUV LED (280 nm) の殺菌力評価

優占的に分離された株は4つの分類群に分けられ, それぞれの代表4菌株に対するUV (280 nm) の殺菌力を評価した。菌種が推定された一般細菌の中で, 最も多検出であった *Psychrobacter* sp. と近縁な株は, 10秒間の照射で検出限界以下にまで殺菌された (Fig. 2A)。ついで検出数が多かった *K. rhizophila* と近縁な株は, 20秒

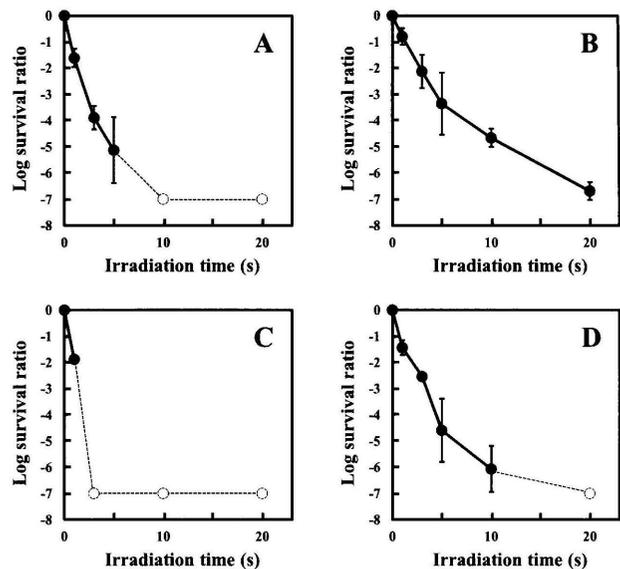


Fig. 2. Time-course changes in the survival rates of the four dominant strains after UV-LED irradiation. A. Strain related to *Psychrobacter* sp. B. Strain related to *Kocuria rhizophila*. C. Strain related to *Staphylococcus sciuri*. D. Strain related to *Macrococcus caseolyticus*. The cells were inoculated at 10^6 CFU/ml. Survival at <10 CFU/ml (lower limit of detection) is noted in the dotted line as 7-log unit reductions.

間の照射により検出限界近くまで殺菌され (Fig. 2B), 3番目に検出数の多かった *S. sciuri* と近縁な株は最も感受性が高く, 3秒間の照射で検出限界以下にまで殺菌された (Fig. 2C)。4番目に検出数の多かった *M. caseolyticus* と近縁な株は, *K. rhizophila* と近縁な株と同じく, 20秒間照射で検出限界以下となった (Fig. 2D)。なお, 本実験のUV照射以外の工程は, 蛍光灯照射下で行ったため, 細菌の光回復による影響が殺菌率に反映されている可能性が考えられる。しかしながら, 実際の釜揚げしらす製造工程においては暗室のみで作業することは困難である為, 実用化を考慮し本実験は蛍光灯照射下で行った。寒天培地については, 暗所にて培養を行った。

以上の結果から, 4分類群それぞれの代表株で, 3秒間の照射処理により99%以上の殺菌が可能であることが明らかとなった。これら4分類群は, 釜揚げしらすから分離された一般細菌50株中45株(90%)を占めており (Table 2), しらすに直接UV LED (280 nm) を照射することで, その保有細菌数を大幅に低減できる可能性が示唆された。

また, UV感受性の高かった株と近縁な *Psychrobacter* sp. (Fig. 2A) はグラム陰性菌であり, やや低い感受性を示した株と近縁な *K. rhizophila* と *M. caseolyticus* (Figs. 2B and D) は, グラム陽性菌である。UVCに対する細菌の感受性は, 主としてDNA損傷に起因し, グラム陰性菌がグラム陽性菌より高いと報告されている¹⁰⁾。従って, 本研究におけるこれら分離株に対する280 nm

のUV感受性は、その既報の感受性傾向と一致していた。

4. 釜揚げしらすにおけるUV LED (280 nm) 照射効果の検討

1. では、釜揚げしらすが保有する一般細菌数を決定し (Table 1), 2. で分離菌47株は、5属6種に近縁とされた (Table 2)。3. で記述した釜揚げしらすから優占的に分離された4つの分類群から選んだ各1株ずつに対するUV (280 nm) の殺菌力評価では、4菌株全てで、3秒間の照射処理により99%以上の殺菌が可能であることが明らかとなった (Fig. 2)。そこで次に、釜揚げしらすに直接UV (280 nm) を照射し、その微生物汚染の低減効果を検討した。

実験に使用した釜揚げしらすの加工工程では、生しらすとして水揚げ後直ちに釜揚げされ、冷凍保存された後、出荷に合わせて解冻工程を経てパッケージされる。そこで、釜揚げしらすの保存期間による細菌汚染の変化を調べるために、解冻直後を3℃で24時間、48時間、72時間保存した後の一般細菌数を決定した。その結果、解冻直後は5,990 CFU/gであったが、冷蔵保存24時間後で11,900 CFU/g (1.98倍) に増加し、48時間後では50,800 CFU/g (8.48倍) と顕著に増加し、72時間後には245,000 CFU/g (40.9倍) にまで増加することが分かった (data not shown)。この結果から、UV (280 nm) 照射による釜揚げしらすの微生物不活化効果の評価では、冷蔵保存48時間後の一般細菌数の生菌数を指標とした。

釜揚げしらす1gをφ53 mmのシャーレに広げ、UV (280 nm) を5-120秒間照射し、残存する一般細菌数を決定することによりその殺菌効果を検討した (Fig. 3)。その結果、60秒間および120秒間の照射により、無照射試料における生菌数と比較し有意に生菌数を減少させることが明らかとなった ($P < 0.05$ vs. 無照射試料生菌数)。また、無照射試料を3℃で48時間保存後の一般細菌数は、冷蔵保存前の無照射試料と比較して7.3倍に増加したが、一方、UV (280 nm) を60秒間以上照射した試料の48時間保存後における一般細菌数は、冷蔵保存前の無照射試料と比較し2倍程度に抑えられることが分かった。以上の結果から、釜揚げしらすへのUV LED (280 nm) の照射による殺菌効果および増殖抑制効果が証明され、食品の殺菌処理への応用性が示唆された。

既報においては、スライスチーズの表面に塗布した食中毒起因菌 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*) を対象に266 nm-279 nmの波長のLEDによる殺菌効果が検討されており⁹⁾、279 nmを主波長とするLEDを照射した結果では、300 J/m²の照射エネルギー量により3-4 logs (CFU/g) の減少が

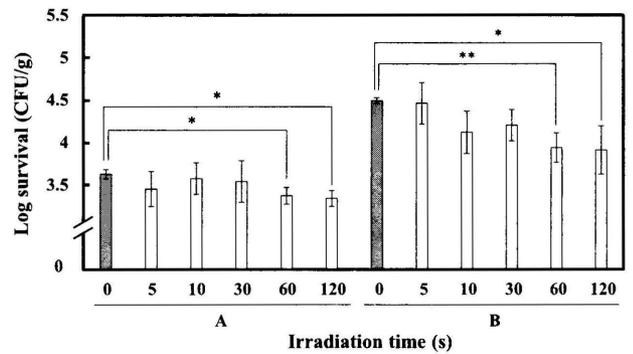


Fig. 3. A. Viable bacterial cell counts of the boiled sardine irradiated with 280-nm UV light for 5 to 120 s. B. Viable bacterial cell counts of the irradiated and non-irradiated samples after storage at 3°C in the dark for 48 hours. Bars indicate the standard deviation from three independent experiments. Significant differences (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$) are indicated relative to the viable bacterial cell counts of the non-irradiated samples.

報告されている。これに対し、釜揚げしらすの同レベルの殺菌には、130000 J/m² (60秒間照射) 以上の照射量を要した。これは、280 nmの光が物質の表面にしか吸収されないことに起因するものと考えられ、スライスチーズでは平らな表面上に塗布された細菌に対する照射であったために、少ないエネルギー量で効率的に殺菌されたことが考えられる。それに対して、釜揚げしらすでは照射面だけではなく、その内側および照射されていない裏側にも細菌が存在しているために、同レベルの殺菌効果を得るためには、照射場において釜揚げしらすを多方向から照射をすることなど、全ての試料表面上の細菌に万遍なく紫外線が吸収される必要があると推測した。また、280 nm UVの食品加工への応用においては、多方向からの照射により殺菌効率の上昇を狙う方法に加えて、工程別に照射方法を変化させることで殺菌効果を高めることが出来ると考えられる。例えば、ベルトコンベアを用いた異物除去ラインは短時間の工程であるため、LEDの照度を上昇させることで効果的な殺菌処理が可能ではないかと予想される。

結 論

釜揚げしらすから分離された優占菌株は4つの分類群に分けられ、それぞれ *Psychrobacter* sp., *K. rhizophila*, *S. sciuri*, *M. caseolyticus* と近縁であった。それぞれの分類群から選択した4菌株にUV (280 nm) を照射し、その殺菌効果を検討した。全ての菌株において3秒間の照射処理により99%以上の殺菌が達成され、釜揚げしらす保有細菌に対する強い殺菌効果が確認された。また、UV (280 nm) を釜揚げしらすに直接照射することによる殺菌効果および増殖抑制効果を評価した。60秒間の照

射で有意な生菌数の減少が認められ、なおかつ照射から48時間冷蔵保存後において増殖抑制効果があることを、本研究によって証明した。

現在、徳島県産の釜揚げしらすは、無処理、無添加製法であるために賞味期限がおよそ3日間と短く、販路の拡大が課題となっているが、本研究結果により、UV LED (280 nm) の照射による釜揚げしらす殺菌の有効性を明らかにした。従って、釜揚げしらすの品質を損なうことなく、鮮度保持期間を延長可能な殺菌技術の確立に向けて、今後、実用化を目指した応用研究が期待される。

謝 辞

本研究は、平成28-30年度「とくしま新未来雇用創出プロジェクト」新成長産業創出基盤活用事業として実施した。

文 献

- 1) Gómez-Sala, B., Herranz, C., Díaz-Freitas, B., Hernández, P. E., Sala, A., Cintas, L. M. (2016) Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish : biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 223, 41-49.
- 2) Choudhary, R., and Bandla, S. (2012) Ultraviolet pasteurization for food industry. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2, (1), 12-15.
- 3) Song, K., Mohseni, M., Taghipour, F. (2016) Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection : A review. *Water Research*, 94, 341-349.
- 4) 厚生労働省 (1959) 食品、添加物等の規格基準. 昭和34年厚生省告示第370号.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部 (2013) 生食用鮮魚介類等の加工時における殺菌料等の使用について. 会議資料1.
- 6) e-Stat (2018) 平成29年漁業・養殖業生産統計. https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=data_list&toukei=00500216&tstat=000001015174&cycle=7&year=20160&month=0&tclass1=000001015175&tclass2=000001110615, 最終閲覧日 : 2018年12月26日.
- 7) 保 聖子, 稲盛重弘, 加治屋大 (2013) かごしまの水産物付加価値創出研究事業 -III (生シラスの非加熱食材化制試験). 平成25年度鹿児島県水産技術センター事業報告書.
- 8) 増田修一, 鳥村裕子 (2014) 静岡県産シラスを用いた新鮮チルド製品の開発. 地域課題に係る産学共同研究委託事業概要報告書.
- 9) Kim, S. J., Kim, D. K., Kang, D. H. (2016) Using UVC light-emitting diodes at wavelengths of 266 to 279 nanometers to inactivate foodborne pathogens and pasteurize sliced cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 11-17.
- 10) Kim, D. K., Kim, S. J., Kang, D. H. (2017) Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Research International*, 97, 280-287.
- 11) Deschaght, P., Janssens, M., Vanechoutte, M., Wauters, G. (2012) *Psychrobacter* isolates of human origin, other than *Psychrobacter phenylpyruvicus*, are predominantly *Psychrobacter faecalis* and *Psychrobacter pulmonis*, with emended description of *P. faecalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62, 671-674.
- 12) Juni, E. and Heym, G. A. (1986) *Psychrobacter irrunobilis* gen. nov. sp. nov. : Genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36, 388-391.
- 13) Vela, A. I., Collins, M. D., Latre, M. V., Mateos, A., Moreno, M. A., Hutson, R., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J. F. (2003) *Psychrobacter pulmonis* sp. nov., isolated from the lungs of lambs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 415-419.
- 14) Deschaght, P., Janssens, M., Vanechoutte, M., Wauters, G. (2012) *Psychrobacter* isolates of human origin, other than *Psychrobacter phenylpyruvicus*, are predominantly *Psychrobacter faecalis* and *Psychrobacter pulmonis*, with emended description of *P. faecalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62, 671-674.
- 15) Kämpfer, P., Albrecht, A., Buczolits, S. & Busse, H.-J. (2002) *Psychrobacter faecalis* sp. nov., a new Species from a bioaerosol originating from pigeon faeces. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 31-36.
- 16) Takarada, H., Sakine, M., Kosugi, H., Matsuo, Y., Fujisawa, T., Omata, S., Kishi, E., Shimizu, A., Tsukatani, N., Tanikawa, S., Fujita, N. and Harayama, S. (2008) Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *J. Bacteriol.*, 190, 4139-4146.
- 17) Dakić, I., Morrison, D., Vuković, D., Savić, B., Shittu, A., Ježek, P., Hauschild, T., Stepanović, S. (2005) Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 2782-2785.
- 18) Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T. and Hiramatsu, K. (2009) Complete genome sequence of *Macrocooccus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J. Bacteriol.*, 191, 1180-1190.
- 19) Yoon, J.-H., Weiss, N., Kang, K. H., Oh, T.-K. and Park, Y.-H. (2003) *Planococcus maritimus* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 2013-2017.
- 20) Kloos, W. E., D. N. Ballard, C. G. George, J. A. Webster, R. J. Hubner, W. Ludwig, K. H. Schleifer, F. Fiedler, and K. Schubert (1998) Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrocooccus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrocooccus equipercicus* Spm nov., *Macrocooccus bovicus* sp. nov. and *Macrocooccus carouselicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 48,

- 859–877.
- 21) Sánchez-Porro, C., de la Haba, R. R., Soto-Ramírez, N., Márquez, M. C., Montalvo-Rodríguez, R. and Ventosa, A. (2009) Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Halomonadaceae*, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 397–405.