



Title	低温増殖性芽胞形成菌の性状と要冷蔵加工食品の保存性を向上させる加熱殺菌条件に関する研究
Author(s)	小林, 哲也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第15709号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15709
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92460
Type	doctoral thesis
File Information	Tetsuya_Kobayashi.pdf



低温増殖性芽胞形成菌の性状と要冷蔵加工食品の
保存性を向上させる加熱殺菌条件に関する研究
(Studies on characteristics of psychrotrophic spore-forming bacteria
and their spores pasteurizing conditions in refrigerated processed food)

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻
Division of Marine Life Science
Graduate School of Fisheries Sciences
Hokkaido University

小林 哲也
Tetsuya Kobayashi

2024年

目 次

緒言	1
第 1 章 冷蔵温度帯で増殖する低温増殖性芽胞形成菌の特性	5
第 1 節 要冷蔵加工食品から分離した低温増殖性芽胞形成菌の性状	6
試料および方法	6
結果および考察	11
第 2 節 <i>Paenibacillus</i> 属細菌および <i>Bacillus</i> 属細菌の芽胞の耐熱性と冷蔵温度帯 での増殖能力	20
試料および方法	20
結果および考察	22
第 3 節 <i>Paenibacillus</i> 属細菌および <i>Bacillus</i> 属細菌の硬質表面への付着	35
試料および方法	35
結果および考察	39
第 4 節 <i>Paenibacillus</i> 属細菌および <i>Bacillus</i> 属細菌のガス置換雰囲気 における増殖	49
試料および方法	49
結果および考察	52
第 2 章 低温増殖性 <i>Paenibacillus</i> 属細菌の制御方法の検討	61
第 1 節 有機酸による pH 調整と加熱処理の併用による <i>Paenibacillus</i> 属細菌の 増殖抑制	62
試料および方法	62
結果および考察	65

第2節 <i>Paenibacillus</i> 属細菌の芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液処理の 影響	76
試料および方法	76
結果および考察	78
第3章 予測微生物学を活用した要冷蔵加工食品の加熱殺菌条件の設定	84
第1節 レトルト殺菌機での加熱処理後の生残芽胞数の変動性	86
試料および方法	87
結果および考察	91
第2節 接種試験と生残芽胞数の変動性解析を組み合わせた加熱殺菌条件の設定	98
試料および方法	99
結果および考察	102
第3節 腐敗境界予測による要冷蔵加工食品の加熱殺菌条件の設定	114
試料および方法	115
結果および考察	119
第4章 要冷蔵水産加工食品への加熱殺菌条件の応用	127
試料および方法	128
結果および考察	130
第5章 総合考察	139
謝辞	151
文献	152

緒 言

日本国民の食料消費における加工食品への支出割合は、43.6%(1995)から52.1%(2015)に拡大し、2040年には59.2%に達する見込みである(農林水産省農林水産政策研究所, 2019)。1世帯当たりの調理食品への年間支出額も91,374円(2006)から122,327円(2021)に増加し、2006年比の増加率は、穀類や魚介類, 肉類, 野菜・海藻, 油脂・調味料への年間支出額のそれを上回る(総務省統計局, 2014; 2022)。調理食品への支出が増加する背景には、高齢化の進展や共働き世帯の増加, 世帯人数の減少といった要因が挙がる。すなわち、高齢世帯では生鮮食品からの調理そのものが体力的に難しくなること, 共働き世帯では調理に割ける時間が限られること, 単身世帯では調理に適した分量が必要量以上であることから、それぞれの食生活に調理食品が利用されていると推察される。

一般社団法人日本惣菜協会は、調理食品のうち、弁当や惣菜など家庭外で調理・加工され、調理加熱することなくすぐに喫食できる調理食品(冷凍食品やレトルト食品を除く)を惣菜と定義して市場動向を調査している。その調査では、惣菜は米飯類(弁当, おにぎり, 寿司等), 調理パン(サンドイッチ, コロッケパン等), 調理麺(調理済焼そば, うどん, そば, スパゲティ等), 一般惣菜(和・洋・中華惣菜, 煮物, 焼き物, 炒め物, 揚げ物, 蒸し物, 和え物, 酢の物, サラダ等)および袋物惣菜(パウチ入りポテトサラダ等のサラダ, 肉じゃが, 焼魚, 煮魚等)の5つに分類される。袋物惣菜とは、樹脂製のパウチやトレイへの密封と加熱殺菌を組み合わせることで冷蔵(10℃以下)で1ヶ月前後の保存性を付与した惣菜を指し、2012年から調査項目に追加された。2012年に8兆7,132億円であった惣菜市場は、2017年に10兆円を突破し、2021年には10兆1,149億円まで拡大した(日本惣菜協会, 2014; 2019; 2022)。このうち、2012年の袋物惣菜のシェアは2.3%(売上高: 1,996億円)であったが、2021年には8.7%(同: 8,832億円)まで拡大した。一方、一般惣菜の2012年および2021年のシェアは、それぞれ42.6%(売上高: 3兆7,115億円)および34.9%(同: 3兆5,284億円)であった。このことから、数日で消費しなければならない一般惣菜よりも、冷蔵庫で長期間保存できる袋物惣菜を選択する新たな消費者層が増えていることが推察される。その消費者層の一つは家庭での調理時間が限られる共働き世帯であると考えられ、今後も女性の社会進出や男性の家事・育児参加が進み共働き世帯の増加が予測されることから、袋物惣菜は消費者需要が期待できる惣菜である。

2018年6月の食品衛生法改正によって、2021年6月から加工食品の製造には HACCP に沿った衛生管理が求められている。HACCP とは、喫食することで人体に健康被害が生じる食中毒細菌や金属異物などの危害を取り除く工程 (重要管理点) について、管理基準を設定してモニタリングすることにより、最終製品の安全性を高める工程管理手法である。また、HACCP に沿った衛生管理が正しく機能するためには、その土台となる一般衛生管理が重要になる。一般衛生管理の中には、製造機器の衛生管理や原材料の微生物管理なども含まれる。袋物惣菜の基本的な製造工程は、原材料の洗浄・殺菌、内容物の調理・調合、樹脂製パウチやトレイ等の容器包装への充填、真空包装やガス置換包装による密封、レトルト殺菌機やボイル殺菌槽、スチーマーでの加熱殺菌、冷却、冷蔵保管の順で進む。この工程の中では、加熱殺菌が食中毒細菌を殺滅するための重要管理点である。重要管理点の管理基準は、事業者自らで設定する必要があるが、製造基準や成分規格に定めがある加工食品ではその定めに基づいて管理基準を設定すれば良いが、定めがない加工食品もある。袋物惣菜には加熱殺菌条件の定めがなく、管理基準は科学的根拠を以って事業者自らで設定する必要がある。

特定の加工食品等の製造基準や成分規格を定めた「食品、添加物等の規格基準」(昭和34年厚生省告示第370号)において、袋物惣菜と類似した製造工程(容器包装への密封と加熱殺菌、10℃以下での冷蔵保管)をもつ加工食品の加熱殺菌条件を参照すると、魚肉ソーセージおよび魚肉ハムは少なくとも80℃で45分間、特殊包装かまぼこは80℃で20分間、加熱食肉製品は63℃で30分間中心部分を加熱することが定められている。袋物惣菜に類似した加工食品は、欧米でも製造・販売されており、refrigerated and processed foods of extended durability (REPFEDs) や extended shelf-life (ESL) refrigerated ready-to-eat foods と呼ばれる (Mossel and Struijk, 1991; Reddy et al., 2021)。REPFEDs や ESL refrigerated ready-to-eat foods では、冷蔵温度帯でも増殖するタンパク質非分解性のボツリヌス菌が重要な危害細菌であり、その芽胞を殺滅するために、一般的には90℃で10分間の加熱殺菌がなされる。特に、イギリスでは本菌の制御に関するガイドラインが策定されている (Food Standards Agency, 2020)。

REPFEDs や ESL refrigerated ready-to-eat foods では、冷蔵温度帯で増殖する低温増殖性のセレウス菌も危害細菌と見なされている (Daelman et al., 2013; Reddy et al., 2021)。大抵の場合、低温増殖性セレウス菌芽胞の90℃における耐熱性 ($D_{90℃}$) は0.7分から19.1分で

あり、90 °C で 10 分間の加熱殺菌では耐熱性の高い低温増殖性セレウス菌芽胞は生残する可能性が高い (Membré et al., 2008; Luu-Thi et al., 2014)。さらに、低温増殖性セレウス菌の中には、 $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 90.9 分や 100 分以上の芽胞を形成する菌株も発見されている (Dufrenne et al., 1995; Samapundo et al., 2011)。このことから、低温増殖性セレウス菌が形成する芽胞の耐熱性には幅があることが推察される。

REFPEDs や加熱済の惣菜には、セレウス菌以外にも様々な芽胞形成菌が生残している (Carlin et al., 2000; Samapundo et al., 2014; 堀川ら, 2005)。さらに、このような加工食品を冷蔵保存するとセレウス菌だけでなく、その他の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌も増殖する (Carlin et al., 2000; Choma et al., 2000; Guinebretiere et al., 2001; Hamasaki et al., 2006; Helmond et al., 2017)。これらのことから、低温増殖性の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌の中には、低温増殖性セレウス菌芽胞と同程度の耐熱性をもつ芽胞を形成し、冷蔵温度帯において低温増殖性セレウス菌よりも速く増殖する菌株が存在することが推察される。また、セレウス菌以外の低温増殖性の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌が増殖した製品では、酸敗や異臭、離水、容器の膨張といった腐敗現象が観察される (Carlin et al., 2000; Guinebretiere et al., 2001; Hamasaki et al., 2006)。製品腐敗は喫食による健康被害に直結しないが、製造企業は当該製品の回収や製造工程の改善を迫られ、経済的損失が大きい。すなわち、袋物惣菜の製造においては、低温増殖性セレウス菌以外の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌も制御すべき重要な属種である。

セレウス菌では、増殖温度と形成する芽胞の耐熱性には正の相関関係が観察されている (Choma et al., 2000; Luu-Thi et al., 2014)。我が国の冷蔵温度の上限 (10 °C) は欧米のそれよりも高い。したがって、欧米の研究事例では、芽胞として生残しても冷蔵保管中に増殖しなかったために着目されなかった芽胞形成菌が、我が国の保管条件では増殖する可能性がある。

関連法令やこれまでの研究事例を整理すると、袋物惣菜の製造では、タンパク質非分解性のボツリヌス菌の芽胞を殺滅するために少なくとも中心部分を 90 °C で 10 分間加熱殺菌する必要がある。低温増殖性セレウス菌が形成する芽胞は、この加熱殺菌条件では生残する可能性が高く、その他の低温増殖性 *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌の芽胞も生残することが推察される。冷蔵保管中にこれらの芽胞が発芽・増殖すると食中毒や様々な品質低下を引き起こす可能性があるため、袋物惣菜においてはこれらの細菌を制

御しなければならない。一方で、低温増殖性セレウス菌芽胞の耐熱性には幅があり、殺滅に必要な加熱殺菌条件は示されていない。また、その他の低温増殖性 *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌においては、増殖温度や増殖 pH、芽胞の耐熱性といった制御条件の設計に必要な性状に関する報告は限られている。さらに、欧米と我が国の冷蔵温度の違いを考慮すると、Dufrenne ら (1995) や Samapundo ら (2011) が発見した低温増殖性セレウス菌よりも耐熱性の高い芽胞を形成する新たな芽胞形成菌が問題となる可能性もある。すなわち、これまでに蓄積された知見を整理するのみでは、袋物惣菜の加熱殺菌条件や製品処方の設定は難しい。

そこで本研究では、袋物惣菜に代表される要冷蔵加工食品の製造における管理基準の設定に資する知見を蓄積するため、10 °C 以下で増殖する低温増殖性芽胞形成菌の性状や制御条件を明らかにすることを目的とした。第 1 章では、パウチ詰要冷蔵加工食品の変敗事例について分離菌株の性状を示すとともに、原材料や加工食品、製造環境等から分離・収集した 10 °C 以下で増殖する低温増殖性芽胞形成菌の冷蔵温度帯での増殖能力と芽胞の耐熱性を明らかにした。さらに、硬質表面へ芽胞の付着性やガス置換雰囲気におけるコロニー形成を比較し、制御対象とすべき細菌属種として *Paenibacillus* 属細菌を見出した。第 2 章では、低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌の具体的な制御方法として、有機酸による pH 調整と加熱処理の併用効果や次亜塩素酸ナトリウム処理の芽胞に対する耐熱性低下作用を示した。第 3 章では、加熱殺菌条件の新たな設定方法として予測微生物学の応用に着目した。すなわち、低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌の芽胞を接種したカレーの保存性に対する加熱殺菌の効果を確認する保存試験に、確率分布を使った生残芽胞数の変動性解析を組み合わせることで、冷蔵で長期間保管したときに腐敗に至る生残芽胞数を予測した。また、様々な低温増殖性芽胞形成菌が芽胞として分布すると推察される未殺菌カレーおよびスープを対象に、様々な温度および時間条件で加熱した後の保存性を明らかにするとともに、加熱殺菌前の試料情報および加熱殺菌条件をパラメータとした加熱殺菌後の腐敗確率予測モデルを作成・検証した。第 4 章では、カレー・スープで検討した加熱殺菌条件を水産加工食品に応用し、保存性や品質変化を明らかにした。

第1章 冷蔵温度帯で増殖する低温増殖性芽胞形成菌の特性

加工食品の賞味期限は、当該食品を特定の環境条件下で保存したときの風味や色調などの品質劣化や微生物の増殖を理化学試験や微生物試験によって定量的に分析し、品質が保たれる期間内で設定される (厚生労働省・農林水産省, 2005)。すなわち、加工食品の賞味期限を延長するためには、品質劣化や微生物の増殖を従来の保存期間を超えて抑制する必要がある。

微生物の増殖を制御して従来製品よりも保存期間を延長するためには、製品中での微生物の増殖抑制だけでなく、加熱処理等による微生物の殺滅や、原材料や加工機器の洗浄による微生物の低減も検討する必要がある。いずれの微生物制御を検討する際にも、対象とする微生物の選択が非常に重要となる。微生物の耐熱性や耐酸性、耐冷性など、制御を効率よく実施するために把握すべき微生物の特徴は、属レベルだけでなく、種・株レベルでも異なる (Guinebretière et al., 2008; Luu-Thi et al., 2014; 中條・森山, 1991)。そのため、制御対象の選択を誤ると想定した通りの微生物制御効果が得られないことに繋がる。

本章では、10 °C で増殖する低温増殖性芽胞形成菌の特性を比較し、要冷蔵加工食品の微生物学的な保存性の向上において、*Paenibacillus* 属細菌の制御が重要であることを見出した。第1節では、賞味期限を超過して冷蔵保管した要冷蔵加工食品で *Paenibacillus* 属細菌が増殖することを示した。第2節では、広く収集した低温増殖性芽胞形成菌株の冷蔵温度帯における増殖能力と芽胞の耐熱性を調査し、低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌は *Bacillus* 属細菌と比べて低温での増殖能力が高く、また、芽胞の耐熱性も高い傾向にあることを示した。第3節では、一部の低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌が形成する芽胞は表面疎水性が高く、硬質表面に付着しやすいことを、第4節では、低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌は *Bacillus* 属細菌と比べて二酸化炭素濃度の高いガス置換冷蔵環境下で増殖可能なことを明らかにした。

第1節 要冷蔵加工食品から分離した低温増殖性芽胞形成菌の性状

森 (1987) は, 要冷蔵加工食品の微生物制御において, 加熱殺菌工程のある製品では 10 °C 以下で増殖する芽胞形成菌の制御が重要であると述べている。この主張の通り, 腐敗した要冷蔵加工食品からは 10 °C 以下で増殖する芽胞形成菌が頻繁に分離される (Hamasaki et al., 2006; 稲津ら, 2017)。しかし, 国内における芽胞形成菌を原因する要冷蔵加工食品の腐敗に関連した事例の公表は少ないのが現状である。そのため, 冷蔵保管中に増殖する芽胞形成菌の種類やその性質に関する知見は乏しい。このことは, 要冷蔵加工食品の微生物制御技術を構築するために必要な指標菌の選定を困難にさせている。

本節では, 北海道で生産された農産物を主原料とする要冷蔵加工食品に生残する芽胞形成菌と, 当該食品の冷蔵保管中に増殖する芽胞形成菌の種類を明らかにするとともに, その増殖可能温度や芽胞の耐熱性などの特性を調べた。

試料および方法

1-1-1. 供試試料

要冷蔵加工食品には, 北海道内の企業が製造したホワイトアスパラガス水煮 (原材料: 北海道産ホワイトアスパラガス) を用いた。本製品は, カット整形後, 90 °C で 2-3 分間ブラッシングしたホワイトアスパラガス 120 g と調味液 (食塩, 砂糖, クエン酸) 155 g を樹脂製パウチに充填・密封した後にボイル殺菌槽で加熱殺菌した製品であり, 賞味期限は製造後 30 日 (0-10 °C 保管) であった。

1-1-2. ホワイトアスパラガス水煮からの生残微生物の分離

製造後 10 °C で 31 日間保管した試料 (内容液の混濁や容器の膨張は観察されなかった。以下, 正常品) および 10 °C で 64 日間保管した試料 (内容液の混濁が観察された。以下, 変敗品) からホワイトアスパラガス 2 本 (約 20 g) を無菌的にフィルター付ストマックバッグ (PX0020P, ELMEX) に採取し, 9 倍重量の滅菌希釈水 (ORP-2000, アズワン) を加えてストマッカー (BagMixer 400, InterScience) でストマッキング (480 rpm, 60 秒間) して 10 倍希釈乳剤を調製した。また, 正常品から無菌的に抜き取ったホワイトアスパラガス 2 本 (約

20 g) を普通ブイヨン培地 (栄研化学) 100 mL に浸漬し, 10 °C で 20 日間保管して培地が白濁した試料 (以下, 増菌品) からホワイトアスパラガスを採取して同様に 10 倍希釈乳剤を調製した。それぞれの 10 倍希釈乳剤について, 9.0 mL の滅菌生理的食塩水で 10 倍希釈液列を調製し, 0.1 mL を標準寒天平板培地 (島津ダイアグノスティクス) に塗抹して 30 °C で 3 日間培養した。出現したコロニーは標準寒天平板培地を用いて純粋分離した後, 普通ブイヨン培地 (pH 5.0, 5 N 塩酸で調整) に接種して 12 °C で培養し, 増殖した菌株を選抜した。

1-1-3. 分子生物学的手法による選抜菌株の同定

選抜菌株の同定は, 16S rDNA の 5'末端から約 500 bp の配列を解析し, GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) に登録されている塩基配列と比較して推定した。

選抜菌株の純粋分離寒天平板から滅菌爪楊枝で菌体を採取し, TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) 50 µL に懸濁し, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) にて 99 °C で 8 分間加熱して菌体内から DNA を抽出し, Template DNA とした。16S rDNA の 5'末端から約 500 bp の増幅には, プライマー A (pA, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 8-28, 長島ら, 1998) およびプライマー D* (pD*, 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-3', 536-518, 長島ら, 1998) を用い, PCR 反応液は, Go Taq Green Master mix (M712B, Promega) 12.5 µL, 20 µM pA 0.5 µL, 20 µM pD* 0.5 µL, Template DNA 5 µL および滅菌水 (Nuclease Free, P119C, Promega) 6.5 µL を混合して調製した。PCR 反応は, 93 °C で 3 分間の熱変性後, 36 サイクル (93 °C-30 秒間, 50 °C-15 秒間, 72 °C-30 秒間, 最終伸長のみ 72 °C-7 分間) でサーマルサイクラーにより行った。PCR 反応液に等量の Binding buffer (7 M Guanidine-HCl, 0.2 M MES, pH 5.6) 加えた後, 全量を 96 穴フィルタープレート (MultiScreen, MSFBN6B10, Merck Millipore) の各ウェルに添加し, 遠心分離 (951×g, 5 分間) して PCR 増幅産物をフィルターに捕集した。70 %エタノール 200 µL による遠心洗浄 (951×g, 5 分間) を 2 回行った後, TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) 35 µL を各ウェルに加えて遠心分離 (951×g, 5 分間) し, 精製された PCR 増幅産物を含む濾液を回収した。得られ PCR 増幅産物のシーケンシング反応には pA を用い, シーケンシング反応液は, BigDye Terminator v.1.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) 2 µL, 5×Sequencing buffer (Applied Biosystems) 3 µL 1.6 µM pA 1 µL, PCR 増幅産物 1 µL お

よび滅菌水 13 μL を混合して調製した。シーケンシング反応は、96 $^{\circ}\text{C}$ で1分間の熱変性後、25 サイクル (96 $^{\circ}\text{C}$ -10 秒間, 50 $^{\circ}\text{C}$ -5 秒間, 60 $^{\circ}\text{C}$ -4 分間) でサーマルサイクラーにより行った。得られた DNA 増幅産物は、2.2 % SDS 溶液 2 μL を加えてサーマルサイクラーにて 98 $^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱した後、25 $^{\circ}\text{C}$ で10分間保持した。反応液は、滅菌蒸留水で膨潤したゲル (セファデックス G-50 superfine, Sigma-Aldrich) を充填した 96 穴フィルタープレート (各ウェル) に滴下し、遠心分離 (951 \times g, 10 分間) して精製した。精製した DNA 増幅産物は、ホルムアミドを加えてサーマルサイクラーにて 96 $^{\circ}\text{C}$ で2分間加熱して変性させた後、DNA シークエンサー (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) およびサンガーシーケンシングソフトウェア (Sequence Scanner Software v2.0, Applied Biosystems) で塩基配列を解析した。

1-1-4. 選抜菌株の芽胞形成と芽胞懸濁液の調製

選抜菌株の新鮮培養菌液を普通寒天平板培地 [普通ブイヨン培地 (栄研化学) + 1.5 % (w/v) 寒天 (細菌用, 富士フィルム和光純薬)] に塗抹し、30 $^{\circ}\text{C}$ で7-10 日間培養して芽胞を形成させた。芽胞形成は微分干渉顕微鏡 (BX-50, オリンパス) で観察した。芽胞はコンラージ棒で擦り取り、冷却滅菌蒸留水に懸濁した後に遠心洗浄 (2,000 \times g, 10 分間, 5 回) によって夾雑物を除いて芽胞懸濁液とした。芽胞懸濁液は 75 $^{\circ}\text{C}$ で15分間加熱してから各試験に用いた。

1-1-5. 増殖可能温度の測定

48 穴マイクロプレート (付着細胞培養用, AGC テクノグラス) の各ウェルに普通ブイヨン培地を 990 μL 分注し、5 log spores/mL となるように芽胞懸濁液を 10 μL 接種して 4, 6, 8 および 10 $^{\circ}\text{C}$ で4週間培養した。増殖の有無は、目視観察による培地の濁りの有無から判断し、濁りが観察された最も低い温度を増殖可能温度とした。なお、測定には各菌株 3 ウェルを使った。

1-1-6. 増殖可能 pH の測定

48 穴マイクロプレートの各ウェルに 5N 塩酸で pH 4.3, 4.6 および 4.9 に調整した普通ブイヨン培地を 990 μL 分注し、5 log spores/mL となるように芽胞懸濁液を 10 μL 接種し

て 30 °C で 4 週間培養した。増殖の有無は前項と同様に判断し、濁りが観察された最も低い pH を増殖可能 pH とした。なお、測定には各菌株 3 ウェルを使った。

1-1-7. 芽胞の耐熱性の測定

芽胞懸濁液を 6 log spores/mL となるように調味液モデル (80 mM ショ糖, 850 mM 塩化ナトリウム/5 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0) に接種し, その 500 μ L をガラス管 (内径: 7 mm, 外径: 9 mm, 全長: 120 mm, 岩田硝子工業) に分注して酸素炎で開口部を溶封した。溶封したガラス管はアンプル保持用ケーン (全長 29 cm) の最下段に保持し, ポリエチレングリコール (KO10002000, キング工業) を満たしたオイルバス (ヒーター: TR-4AR, アズワン; 水槽: SB-24, 幅 459 mm \times 奥行 255 mm \times 深さ 162 mm, 東京理化器械) に浸漬して 95 °C で 15 分間加熱した。加熱後は直ちに氷水冷し, 無菌的にアンプルカッターで開封し, 適宜 10 倍希釈液列を調製した後, 標準寒天平板培地に塗抹して 30 °C で 2-3 日間培養して生残芽胞数を測定した。

さらに, 加熱処理後の生残率が異なる菌株は, 95 °C で加熱した時の生残芽胞数の経時変化を測定して D 値を算出した。すなわち, 同様に調製したガラス管をオイルバスにて 95 °C で加熱し, 所定時間経過毎に試料を取り出して同様の方法で生残芽胞数を測定した。生残芽胞数の経時変化を最小二乗法で線形回帰して生残曲線を得た。

1-1-8. 芽胞の耐熱性に対する加熱温度および加熱 pH の影響

芽胞の耐熱性に対する加熱温度の影響は, 芽胞懸濁液を 6 log spores/mL となるように調味液モデル (pH 5.0) に接種し, 90, 100 および 105 °C で加熱して前項と同様の方法で生残芽胞数を測定して評価した。加熱 pH の影響は, pH を調整した調味液モデル (pH 4.0, 4.5 および 5.5) に同様に芽胞懸濁液を接種し, 95 °C で加熱して評価した。

1-1-9. 加熱処理後の生残芽胞数に対する培養条件の影響

芽胞懸濁液を 6 log spores/mL となるように調味液モデル (pH 5.0) に接種し, 500 μ L をガラス管に溶封した。溶封したガラス管はオイルバスにて 90 °C および 95 °C で加熱し, 所定時間経過毎に抜き取って直ちに氷水冷した。開封して適宜 10 倍希釈液列を調製した後, 5 N 塩酸で pH 6.7 または pH 5.0 に調整した標準寒天平板培地 [酵母エキス (BD): 2.5

g, ペプトン (BD): 5.0 g, グルコース (富士フイルム和光純薬, 特級): 1.0 g, 寒天 (富士フイルム和光純薬, 細菌培地用): 15.0 g, 蒸留水: 1 L] に塗抹して 30 °C で 2-3 日間および 12 °C で 7 日間培養した。

結果および考察

1-1-1. ホワイトアスパラガス水煮に生残する低温増殖性の微生物

ホワイトアスパラガス水煮に生残する微生物群から低温かつ酸性条件 (12 °C, pH 5.0) で増殖する菌株として 20 菌株を分離した。分離菌株の 16S rDNA 部分配列を解析して簡易同定したところ, 全て *Paenibacillus* 属細菌と推定された (Table 1-1-1)。正常品由来菌株は *Paenibacillus* sp. や *P. taichungensis*, *P. terrae*, 変敗品由来菌株は全て *P. terrae*, 増菌品由来菌株は *P. polymyxa* と推定された。

Paenibacillus 属細菌は自然界に広く分布しており, 腐敗した要冷蔵加工食品や魚肉練り製品, トマトペースト, サツマイモを原料とした発酵食品から分離されている (Hamasaki et al., 2006; 堀川ら, 2005; 熊谷ら, 2015; 松田, 1985; 長田ら, 2015)。特に, *P. terrae* は土壌やミミズの消化管から, *P. taichungensis* も土壌から分離されている (Horn et al., 2005; Lee et al., 2008; Yoon et al., 2003)。原材料のホワイトアスパラガスは, 若茎萌芽前に培土を行い, 土中で若茎を軟白化させる培土法 (地子・田中, 2009) で栽培される。すなわち, 培土法で栽培されるホワイトアスパラガスは, 栽培初期から収穫に至るまで長期間に亘り土壌と接触しているため土壌由来の微生物に汚染される可能性が高い。したがって, 今回分離された *Paenibacillus* 属細菌は, 原材料のホワイトアスパラガスに付着して製品に持ち込まれたと推察された。

1-1-2. 分離菌株の増殖可能温度および増殖可能 pH

ホワイトアスパラガス水煮から分離した 20 菌株の増殖可能温度および増殖可能 pH を調べた結果, 増殖可能温度は, 4 °C 以下のものが 11 株, 6 °C が 5 株, 8 °C が 4 株であった。増殖可能 pH は, pH 4.6 のものが 18 株, pH 4.9 が 2 株であった (Table 1-1-1)。

変敗した要冷蔵食品から分離した *P. polymyxa* や *P. odorifer*, *Paenibacillus* sp. は, 3–4 °C でも増殖した (Hamasaki et al., 2006; 松田, 1985)。 *P. terrae* の増殖可能温度は 5 °C, 増殖可能 pH は 5.2 であり, 4 °C および pH 4.0 では発育しないことが報告されている (Yoon et al., 2003; Horn et al., 2005)。また, Lee ら (2008) は *P. taichungensis* の増殖可能温度および増殖可能 pH は, それぞれ 5 °C および pH 5 であることを報告している。他にも, *Paenibacillus* 属細菌は 6 °C で保持した低温殺菌乳中で増殖することや, サイレージの pH が 4.5 より高

くなると *Paenibacillus* 属細菌の発育が顕著になることが報告されている (Borreani et al., 2013; Masiello et al., 2014)。これらのことから、*Paenibacillus* 属細菌は低温、低 pH でも増殖する特性を有することが推察された。

1-1-3. 分離菌株芽胞の加熱処理後の生残性

調味液モデル (pH 5.0) に接種した芽胞を 95 °C で 15 分間の加熱した時の 20 菌株の生残性を調べた。加熱処理による生残芽胞数の低下は、約 -2 log が 2 菌株、約 -3 log が 15 菌株、-5 log 以上が 3 菌株であった (Table 1-1-1)。また、生残性が異なる 6 菌株 (高: *Paenibacillus* sp. No.1 および No.2, 中: *P. terrae* No.2, No.6 および No.7, 低: *P. polymyxa* No.1) を選んで同様に加熱した時の生残芽胞数の経時変化を測定したところ、 $D_{95^{\circ}\text{C}}$ は 1.0–8.6 分であった (Table 1-1-2)。

低温増殖性 *P. polymyxa* 芽胞の $D_{95^{\circ}\text{C}}$ は、1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7) 中では 0.7 分と報告されている (青山・遠田, 2010)。また、クエン酸、乳酸および酢酸の非解離型分子が 50–200 mM 溶存した水溶液 (pH 4) 中の *P. polymyxa* の芽胞の $D_{95^{\circ}\text{C}}$ は、0.4–1.5 分であった (Casadei et al., 2000)。一方、芽胞の $D_{95^{\circ}\text{C}}$ が 15.7–28.0 分の *P. polymyxa* の分離例も報告されており (Huo et al., 2012), 同種でも芽胞の耐熱性には大きな差があることが推察された。その他にも、*P. terrae* の芽胞を 90 °C で 60 分間加熱した時には生残芽胞数が 2 log 程度低下したこと (重田ら, 2013) や、芽胞の D 値が 10 分となる加熱温度が 89–108 °C の *P. polymyxa* や *P. macerance*, *Paenibacillus* sp. の分離例も報告されている (André et al., 2013)。芽胞の耐熱性は、培養温度と正の相関があると言われており、芽胞形成時の培地成分にも影響される (Cazemier et al., 2001; Palop et al., 1999a; Yamazaki et al., 1997)。芽胞の耐熱性の報告例では、供試菌株の芽胞形成温度や正確な培地成分が明示されていない報告もあるため、冷蔵温度帯で増殖する *Paenibacillus* 属細菌の耐熱性を理解するためには、芽胞形成菌の増殖特性と耐熱性について知見を深める必要がある。

1-1-4. *Paenibacillus* sp. No.1 の芽胞の耐熱性に対する加熱温度および加熱 pH の影響

前項で芽胞の耐熱性 ($D_{95^{\circ}\text{C}}$) を評価した 6 菌株のうち、形成芽胞の耐熱性が最も高かった *Paenibacillus* sp. No.1 について芽胞の耐熱性特性を詳細に調べた。調味液モデル (pH 5.0) における *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$, $D_{95^{\circ}\text{C}}$, $D_{100^{\circ}\text{C}}$ および $D_{105^{\circ}\text{C}}$ は、各々 29.5 分、

8.6分, 1.8分および0.4分となり, z値は8.1 °Cと算出された (Table 1-1-3)。また, pH 4.0, 4.5 および 5.5 の調味液モデルにおける *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の $D_{95\text{ °C}}$ は, 3.2分, 4.5分 および 13.6分で, z_{pH} 値は 2.3 であった (Table 1-1-4)。

細菌芽胞の z 値は, 一般的に 7–11 °C と言われている (高野・横山, 1998)。 *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の z 値もこの範囲内であったことから, 加熱温度の変化に対する感受性は一般的な細菌芽胞と同程度であることが明らかになった。また, 細菌芽胞の D 値は, 酸性下で低下するだけでなく, D 値の常用対数値は加熱時の pH に対して直線的に変化する (犬飼・松田, 1980; Cameron et al., 1980)。 pH 4.0–5.5 の調味液モデル中で加熱した時の *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の $D_{95\text{ °C}}$ についても同様の変化が観察され, z_{pH} 値は 2.3 であった。このことは, 加熱時の pH を 2.3 上昇させると *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の $D_{95\text{ °C}}$ が 10 倍に変化する。すなわち, pH 7.3 の調味液モデル中での $D_{95\text{ °C}}$ は 86 分となることを示唆しており, 本菌芽胞は中性域で非常に高い耐熱性を示すことが推察された。

1-1-5. *Paenibacillus* sp. No.1 の芽胞の D 値に対する生残芽胞培養条件の影響

芽胞を加熱するとその一部は損傷芽胞となるため, 耐熱性測定 of 培養条件によっては生残芽胞数の測定値が変化することが指摘されている (Cazemier et al., 2001; Coroller et al., 2001, López et al., 1997)。そこで, *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の加熱処理後の生残芽胞数に対する培養条件の影響を調べた。90 °C および 95 °C で加熱した *Paenibacillus* sp. No.1 の芽胞は, 酸性および低温で培養すると計数できる生残芽胞数が低下したため, D 値は小さく見積もられた (Table 1-1-5)。すなわち, pH 6.7, 30 °C で培養した時の $D_{90\text{ °C}}$ と $D_{95\text{ °C}}$ は, 各々 26.6 分と 7.2 分であった。一方, pH 5.0, 30 °C で培養した時の $D_{90\text{ °C}}$ と $D_{95\text{ °C}}$ は, 15.9 分と 4.0 分, pH 6.7, 12 °C で培養した時の $D_{90\text{ °C}}$ と $D_{95\text{ °C}}$ は, それぞれ 18.5 分, 5.0 分, pH 5.0, 12 °C で培養した時の $D_{90\text{ °C}}$ および $D_{95\text{ °C}}$ は, それぞれ 13.8 分, 3.6 分であった。pH 6.7, 30 °C で培養した時の D 値を 100 としたときの各培養条件における D 値の低下率は, pH 5.0, 30 °C 培養では約 40 %, pH 6.7, 12 °C 培養では約 30 %, pH 5, 12 °C 培養では約 50 %であった。これらのことから, 実験で測定する D 値は, 生残芽胞数を測定する時の培養温度よりも培養 pH の影響が大きいと推察された。本実験で観察された D 値の変化に対する生残芽胞の培養条件の影響は, 高温性の芽胞形成細菌の一種である *Geobacillus stearothermophilus* でも同様に観察されている (López et al., 1997)。すなわち, 加熱処理し

た *G. stearothermophilus* の芽胞を pH 5.0 の寒天培地で培養して得た D 値は、pH 7.0 の寒天培地で得た D 値と比較して 43–59%低下した。一方、加熱処理した芽胞を 40 °C で培養して得た D 値は、55 °C での培養で得た D 値と比較して 7–34%しか低下しなかった。

微生物の耐熱性の指標である D 値は、加熱処理後の生残細胞を培養して得た細胞数から算出するため、回復培地の pH や培地組成、培養温度などの培養条件によって変化する。そのため、一般的な D 値の評価では、細胞を様々な条件で加熱した後に生残細胞を至適条件で培養する。しかし、食品製造における加熱殺菌を考えた場合、食品そのものが生残細胞の回復培地となり、保存温度が培養温度となるため、必ずしも生残細胞の増殖に至適な条件とは限らない。そこで、製品環境に近い酸性、低温環境での D 値を算出するため、製品の環境に最も近い pH 5.0, 12 °C で *Paenibacillus* sp. No.1 の加熱後芽胞を培養すると、D 値は至適条件 (pH 6.7, 30 °C) で算出した D 値から約 50%低下し、約 1/2 の加熱時間で同等の殺菌効果を得られると示唆された。また、製造元から食卓に届くまでの温度変化を考慮した場合でも、pH 5.0, 30 °C 培養で算出した D 値をもとに加熱殺菌条件を設定しても、約 3/5 の加熱時間で同等の殺菌効果が得られると見積もられた。従って、過加熱とならない加熱殺菌条件を設定するためには、生残芽胞の培養条件まで考慮した D 値の評価が重要と考えられる。

Table 1-1-1. Growth characteristics and survivability of psychrotrophic spore-forming bacteria isolated from processed food stored at refrigeration temperature.

Source	Isolate	Minimum growth temperature (°C)	Minimum growth pH	Reduction ^a (log spore/ml)
Product	<i>Paenibacillus</i> sp. No.1	≤4	4.6	1.9
	<i>Paenibacillus</i> sp. No.2	≤4	4.6	2.1
	<i>P. taichungensis</i> No.1	≤4	4.9	>5.0
	<i>P. terrae</i> No.1	≤4	4.6	>5.0
Spoiled product	<i>P. terrae</i> No.2	≤4	4.6	2.7
	<i>P. terrae</i> No.3	≤4	4.6	2.9
	<i>P. terrae</i> No.4	≤4	4.6	2.8
	<i>P. terrae</i> No.5	6	4.6	2.9
	<i>P. terrae</i> No.6	8	4.6	3.0
	<i>P. terrae</i> No.7	6	4.6	3.0
	<i>P. terrae</i> No.8	≤4	4.6	3.4
	<i>P. terrae</i> No.9	≤4	4.6	2.9
	<i>P. terrae</i> No.10	8	4.6	3.1
	<i>P. terrae</i> No.11	6	4.9	2.6
	<i>P. terrae</i> No.12	8	4.6	3.3
	<i>P. terrae</i> No.13	≤4	4.6	3.2
	<i>P. terrae</i> No.14	6	4.6	2.7
	<i>P. terrae</i> No.15	8	4.6	2.6
	<i>P. terrae</i> No.16	6	4.6	3.3
	Enrichment culture	<i>P. polymyxa</i> No.1	≤4	4.6

^aDifference of log survived spore numbers before and after heating at 95 °C for 15 min in 5 mM citrate buffer of pH 5.0.

Table 1-1-2. Spore heat resistance of the isolates from refrigerated process food in 5 mM citrate buffer (pH 5.0).

Isolate	Source	D ₉₅ °C (min)
<i>Paenibacillus</i> sp. No.1	Product	8.6 ± 0.46 ^a
<i>Paenibacillus</i> sp. No.2	Product	6.7 ± 0.06
<i>P. terrae</i> No.2	Spoiled product	5.0 ± 1.05
<i>P. terrae</i> No. 6	Spoiled product	4.7 ± 0.39
<i>P. terrae</i> No. 7	Spoiled product	4.7 ± 0.60
<i>P. polymyxa</i> No.1	Enrichment culture	1.0 ± 0.10

^aMeans ± SD

Table 1-1-3. Heat resistance of *Paenibacillus* sp. No.1 spores at different heating temperture.

Heating temperature (°C)	D-value (min)
90	29.5 ± 0.46 ^a
95	8.6 ± 0.46 ^b
100	1.8 ± 0.11
105	0.4 ± 0.06
z-value	8.1 °C

^aMeans ± SD

^bReference from Table 1-2

Table 1-1-4. Heat resistance of *Paenibacillus* sp.
No.1 spores in different pH media.

pH of heating media	D-value (min)
4.0	3.2 ± 0.03 ^a
4.5	4.5 ± 0.18
5.0	8.6 ± 0.46 ^b
5.5	13.6 ± 0.46
z_{pH} -value	2.3

^aMeans ± SD

^bReference from Table 1-2

Table 1-1-5. Influence of enumeration conditions on D-values of *Paenibacillus* sp. No.1 spores.

Enumeration condition	D ₉₀ °C (min)	Reduction ^b (%)	D ₉₅ °C (min)	Reduction (%)
pH 6.7, 30 °C	26.6 ± 2.11 ^a	—	7.2 ± 0.03	—
pH 5.0, 30 °C	15.9 ± 0.78	40.5	4.0 ± 0.29	44.1
pH 6.7, 12 °C	18.5 ± 0.80	30.4	5.0 ± 0.12	30.1
pH 5.0, 12 °C	13.8 ± 1.40	48.1	3.6 ± 0.19	50.5

^aMeans ± SD

^bCalculated as 100 % D-values when heated spores were enumerated on Standard Method Agar plates.

第2節 *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性と 冷蔵温度帯での増殖能力

第1節では、賞味期限を超過して冷蔵保存した要冷蔵加工食品において *Paenibacillus* 属細菌が増殖した事例を示すとともに、当該製品から分離した *Paenibacillus* 属細菌の増殖温度や増殖 pH, 芽胞の耐熱性を明らかにした。分離した *Paenibacillus* 属細菌は、土壌に分布する芽胞が原材料であるホワイトアスパラガスを紹介して製品に混入したと考えられた。土壌には *Paenibacillus* 属細菌だけでなく様々な芽胞形成菌が分布している (Heyndrickx, 2011)。その一つに *Bacillus* 属細菌が挙げられる。

Bacillus 属の細菌でも、様々な菌種が冷蔵温度帯で増殖すると報告されている (Dufrenne et al., 1995; Meer et al., 1991; Guinebretiere et al., 2001)。一方、第1節では正常試料や腐敗試料から *Bacillus* 属細菌ではなく、*Paenibacillus* 属細菌を分離し、分離菌株が冷蔵温度帯で増殖することを示した。このことは、加熱殺菌条件や保存温度、製品 pH などが *Paenibacillus* 属細菌の生残性に影響し、その他の生残菌芽胞よりも増殖しやすい環境であったためではないかと考えられた。すなわち、*Paenibacillus* 属細菌は *Bacillus* 属細菌とは異なる増殖特性や耐熱特性を備えていると推察された。本節では、10 °C で増殖する *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌について、芽胞の耐熱性と冷蔵温度帯での増殖能力を調べ、比較した。

試料および方法

1-2-1. 供試菌株

予備実験で 10 °C において増殖することを確認した *Paenibacillus* 属細菌 45 菌株および *Bacillus* 属細菌 72 菌株を供試した (Table 1-2-1, 1-2-2 および 1-2-3)。供試菌株のうち、著者が分離した菌株については、試料および方法 1-1-3 と同様に、16S rDNA の 5'末端から約 500 bp の塩基配列を決定し、GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) に登録されている塩基配列と比較して簡易同定した。

1-2-2. 芽胞懸濁液の調製

全ての菌株は、6.0 g/L Yeast extract (Becton-Dickinson) を添加した Tryptic soy broth (TSB, Becton-Dickinson) に接種し、30 °C で 24–48 時間静置培養した。この培養液を集菌 (10,000 × g, 2 分間) して 10 倍濃縮した後、普通寒天平板培地 [普通ブイヨン培地 (栄研化学) + 1.5 % (w/v) 寒天 (細菌用, 富士フィルム和光純薬)] に塗抹し、30 °C で 14–21 日間培養して芽胞を形成させた。微分干渉顕微鏡 (BX-50) で芽胞形成を確認した後、コンラージ棒で擦り取って冷滅菌蒸留水に懸濁した。得られた懸濁液は、Yamazaki らの方法 (1997) に従って遠心洗浄 (1,500 × g, 10 分間, 5 回) し、30 mL の冷却滅菌蒸留水に再懸濁して芽胞懸濁液とし、4 °C で保管した。芽胞懸濁液は 75 °C で 15 分間加熱してから以下の各試験に用いた。

1-2-3. 芽胞の耐熱性の測定

1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 6 log spore/mL となるように各菌株の芽胞懸濁液を接種し、その 500 μL をガラス管 (内径 7 mm, 外径 9 mm, 全長 120 mm) 分注した後、酸素炎で開口部を溶封した。溶封したガラス管はアンプル保持用ケーン (全長 29 cm) の最下段に保持し、ポリエチレングリコール (KO10002000) を満たしたオイルバス (ヒーター: TR-4AR; 水槽: SB-24, 幅 459 mm × 奥行 255 mm × 深さ 162 mm) に浸漬して所定の温度 (85.0–97.5 °C) で加熱した。所定時間経過毎に試料の入ったガラス管を取り出して直ちに氷水冷した。アンプルカッターで無菌的に開封し、10 倍希釈液列を調製した後、標準寒天平板培地を用いた表面塗抹法 (30 °C, 1–3 日間培養) で生残芽胞数を測定した。なお、測定は各菌株 3 回行った。

1-2-4. 冷蔵温度帯での増殖能力の測定

冷蔵温度帯での増殖能力として、増殖温度と増殖日数を測定した。48 穴マイクロプレート (付着細胞培養用) の各ウェルに普通ブイヨン培地を 990 μL 分注し、5 log spores/mL となるように芽胞懸濁液を 10 μL 接種した。プレートは 4, 6, 8 および 10 °C で 4–28 日間培養し、培地の濁りの有無を目視観察した。なお、測定には各菌株 3 ウェルを使った。

結果および考察

1-2-1. *Paenibacillus* 属細菌と *Bacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性

Paenibacillus 属細菌, *B. cereus* group および *B. cereus* group 以外の *Bacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性 (D 値) を Table 1-2-1, 1-2-2 および 1-2-3 に示した。*B. cereus* の芽胞の耐熱性は、一般的に $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ で議論されることが多い (Choma et al., 2000; Daelman et al., 2013; Dufrenne et al., 1995; Luu-Thi et al., 2014; Meer et al., 1991; Samapundo et al., 2011)。そこで、*Paenibacillus* 属細菌 23 菌株および *Bacillus* 属細菌 34 菌株の芽胞の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ の分布を比較した (Fig. 1-2-1)。23 菌株の *Paenibacillus* 属細菌のうち, 17 菌株 (73.9 %) の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ は 15 分未満であった。一方, *P. terrae* JCM11466^T, *P. terrae* No. 9, *Paenibacillus* sp. JCM13343 および *Paenibacillus* sp. No. 1 の 4 菌株の芽胞の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ は 25 分以上であり, 特に, *Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞は極めて高い耐熱性 ($D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}} = 136.1$ 分) を示した。34 菌株の *Bacillus* 属細菌のうち, 23 菌株 (67.6 %) の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ は 15 分未満であった。*B. cereus* group の約半数もこの範囲内であったが, 8 菌株の *B. cereus* は $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ が 25 分以上の芽胞を形成した。特に, *B. cereus* MAFF118590 および *B. cereus* MAFF118598 の芽胞の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ は, それぞれ 82.9 分および 91.6 分であった。これらの結果から, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ で増殖する *Paenibacillus* 属細菌の芽胞の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ は, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ で増殖する *Bacillus* 属細菌の芽胞の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ と極めて類似した耐熱特性を示すことが明らかになった。

これまでの研究 (Choma et al., 2000; Dufrenne et al., 1995; Luu-Thi et al., 2014; Meer et al., 1991) では, 冷蔵温度帯で増殖する *B. cereus* group の芽胞の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ は概ね 15 分未満と報告されているが, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ が 90 分以上の耐熱性の高い芽胞を形成する菌株の存在も報告されている (Daelman et al., 2013; Dufrenne et al., 1995)。一方, 冷蔵温度帯で増殖する *Paenibacillus* 属細菌の芽胞については, *B. cereus* group ほどの耐熱性データの蓄積はなく, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ が 3.9–5.0 分であると報告されているのみである (Helmond et al., 2017; 稲津ら, 2017)。 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ で増殖する *Paenibacillus* 属細菌において, 耐熱性が極めて高い芽胞を形成する菌株の存在は, 本研究が初めて明らかにした。本研究では, 様々な分離源由来の *Paenibacillus* 属細菌 23 菌株の芽胞の耐熱性を調べ, *Paenibacillus* 属細菌芽胞の耐熱性分布が一般的な *Bacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性分布と同様の傾向にあることを示した。したがって, *Bacillus* 属細菌の芽胞が生残してしまうような加熱処理条件においては, *Paenibacillus* 属細菌の芽胞も同

様に生残する可能性が高いことが示唆され、加工食品の加熱殺菌の指標菌の一つとして考慮する必要があると考えられた。

1-2-2. *Paenibacillus* 属細菌と *Bacillus* 属細菌の芽胞の熱感受性

本研究で芽胞の耐熱性を調べた菌株の z 値は概ね 7–8 °C であり、10 °C を超える菌株はなかった (Table 1-2-1, 1-2-2 および 1-2-3)。すなわち、*Paenibacillus* 属細菌 22 菌株の芽胞の z 値は、6–7 °C が 3 菌株、7–8 °C が 13 菌株、8–9 °C が 5 菌株、9–10 °C が 1 菌株であった (Table 1-2-1)。一方、*B. cereus* group 22 菌株の芽胞の z 値は、5–6 °C が 1 菌株、6–7 °C が 3 菌株、7–8 °C が 15 菌株、8–9 °C が 3 菌株であった (Table 1-2-2)。その他の *Bacillus* 属の菌種では、*B. megaterium* 4 菌株、*B. pumilus* 3 菌株および *B. simplex* 3 菌株の芽胞の z 値は 7–8 °C であった (Table 1-2-3)。

冷蔵温度帯で増殖する *B. cereus* group, *B. pumilus*, *B. simplex* および *B. subtilis* の芽胞の z 値は 7–10 °C と報告されている (Baril et al., 2012; Condón-Abanto et al., 2016; Coton et al., 2011; Daelman et al., 2013; Meer et al., 1991; Samapundo et al., 2011; Trunet et al., 2015)。さらに、冷蔵保存したレディーミールから分離した 4 菌株の *Paenibacillus* 属細菌の D 値 (Helmond et al., 2017) から算出した z 値は 5.7–9.4 °C であった。本研究で明らかにした *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の芽胞の z 値もこれらの報告と類似しており、冷蔵温度帯で増殖する *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の芽胞の z 値は 7–10 °C に分布することが明らかとなった。

1-2-3. *Paenibacillus* 属細菌と *Bacillus* 属細菌の冷蔵温度帯での増殖能力

10 °C での培養では、*Paenibacillus* 属細菌は 45 菌株のうち 41 菌株が、*B. cereus* group は 48 菌株のうち 45 菌株が、*B. cereus* group 以外の *Bacillus* 属細菌は 24 菌株のうち 19 菌株が 7 日以内に増殖し、本条件においては属種間の増殖に大きさ差のないことが確認された (Table 1-2-4, 1-2-5 および 1-2-6)。一方、増殖可能温度を比較すると、*Paenibacillus* 属細菌は 45 菌株のうち 32 菌株が 4 °C で増殖したが、*Bacillus* 属細菌は 72 菌株のうち 10 菌株のみが 4 °C で増殖し、さらに *B. cereus* group に限ると 48 菌株のうち 3 菌株のみが 4 °C で増殖した (Fig. 1-2-2)。また、4 °C での増殖に要した日数に着目すると、*P. odorifer* と *B. simplex* (JCM12307^Tを除く) は 14 日以内に増殖が認められたが、*B. cereus* group の 3 菌株は 21 日

以上必要であった (Table 1-2-4, 1-2-5 および 1-2-6)。

P. odorifer は、低温での増殖能力が高いことと、*B. weihenstephanensis* と比較して低温での誘導期が短いことが報告されている (Buehler et al., 2018)。本試験においても、供試した 3 菌株の *P. odorifer* は 4 °C で 14 日以内に増殖した。*B. simplex* は自然界に広く分布しており、加工食品からの分離事例も多数ある (Coton et al., 2011; Fancello et al., 2018; Helmond et al., 2017; Schwartz et al., 2013; Sikorski and Nevo, 2005)。本研究では、*Paenibacillus* 属および *Bacillus* 属の冷蔵温度帯での増殖能力を初めて明らかにし、*P. odorifer* や *B. simplex* が低温での増殖に優れる菌種であることを示した。一方、*P. odorifer* や *B. simplex* の芽胞の $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ は 15 分未満であった。したがって、本研究で明らかにした *Paenibacillus* 属および *Bacillus* 属の芽胞の耐熱性から考察すると、*Paenibacillus* sp. JCM13343 や *B. cereus* MAFF118598 の耐熱性 ($D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}} = 136.1$ 分および 91.6 分) をもとに加熱殺菌条件を設定すれば、*P. odorifer* や *B. simplex* の芽胞は十分に殺滅されと考えられ、要冷蔵加工食品の腐敗原因となる可能性は低いと推察される。

野菜ピューレを 4 °C で保管すると *Bacillus* 属細菌よりも *Paenibacillus* 属細菌の増殖が優勢となるが、10 °C 以上で保管するとその傾向が逆転する (Guinebretiere et al, 2001)。また、7 °C 以下で保存したレディーミールや牛乳では *Paenibacillus* 属細菌が優占種として分離されると報告されている (Helmond et al., 2017; Ranieri et al., 2012)。これらの報告と本研究で明らかにした *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の増殖可能温度の分布を考えると、加工食品を 10 °C より低温 (4 °C や 6 °C) で保存した時には、*Bacillus* 属細菌よりも *Paenibacillus* 属細菌が腐敗に関与する可能性が高く、長期間の冷蔵保蔵を考える場合には *Paenibacillus* 属細菌を制御対象とする方が望ましいと考えられた。

1-2-4. *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性と増殖温度の関係

各菌株の芽胞の耐熱性 ($D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$, Table 1-2-1, 1-2-2 および 1-2-3) と増殖可能温度 (Table 1-2-4, 1-2-5 および 1-2-6) の関係を Fig. 1-2-3 にまとめた。 $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ が 25 分以上を示した *Paenibacillus* 属細菌 4 菌株 (*P. terrae* JCM11466^T, *P. terrae* No. 9, *Paenibacillus* sp. JCM13343 および *Paenibacillus* sp. No. 1) は 6 °C 以下でも増殖した。特に、最も耐熱性の高い芽胞を形成した *Paenibacillus* sp. JCM13343 は 4 °C でも増殖した (Fig. 1-2-3A)。一方、 $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ が 25 分以上を示した *B. cereus* の 8 菌株は、10 °C 未満では増殖しなかった。また、6 °C 以下で

増殖した *Bacillus* 属細菌 12 菌株の芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ は 15 分未満であった (Fig. 1-2-3B)。さらに、増殖可能温度が 6°C であった *Paenibacillus* 属細菌 4 菌株の芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ は、増殖可能温度が 6°C であった *Bacillus* 属細菌の芽胞の中で最も高い耐熱性を示した *B. cereus sensu lato* No.9 の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ (6.7 分) の 1.8–7.2 倍と高いものであった。すなわち、冷蔵温度帯で増殖する *Paenibacillus* 属細菌は 6°C 以下の極めて低い温度で増殖するだけでなく、形成芽胞の耐熱性も高いことが明らかになり、制御が困難な細菌群であることが判明した。

冷蔵温度帯で増殖する *B. cereus* のうち、芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 90 分以上の菌株は、スキムミルク (7°C 保存) や pH と水分活性を調整して食品環境を模した液体培地 (10°C 保存) では増殖しなかったと報告されている (Daelman et al., 2013; Dufrenne et al., 1995)。したがって、芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 90 分前後の *B. cereus* は冷蔵温度帯での増殖能力を備えていても、食品成分や pH, 水分活性などの影響を受けて、冷蔵保存する加工食品で発芽・増殖する可能性は小さいと推察した。本研究においても、芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 90 分前後を示した *B. cereus* MAFF118590 ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 82.9$ 分) や *B. cereus* MAFF118598 ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 91.6$ 分) も 10°C 未満では増殖しなかった。そのため、*Paenibacillus* sp. JCM13343 や *B. cereus* MAFF118598 の耐熱性 ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 136.1$ 分および 91.6 分) をもとに加熱殺菌条件を設定すれば、*B. cereus* の芽胞が生残したとしても冷蔵保存中に発芽・増殖する可能性は小さいと考えられた。一方、供試菌株の中で芽胞の耐熱性が高かった *P. terrae* No. 9 は、前節において賞味期限を超過して冷蔵保存したホワイトアスパラガス水煮から分離した菌株であり、*Paenibacillus* sp. JCM13343 も腐敗した加工食品から分離されたものである (Hamasaki et al., 2006)。すなわち、加熱処理後の加工食品に *Paenibacillus* 属細菌の芽胞が生残していると冷蔵保存中に発芽・増殖する可能性が高いと考えられる。以上の結果から、低温で増殖可能かつ耐熱性の高い芽胞を形成する *Paenibacillus* 属細菌は、要冷蔵加工食品の製造における制御対象菌の一つと考えるべきであると言える。

Table 1-2-1. Spore heat resistance of *Paenibacillus* strains in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0).

Tested strain	D value (min)						z value (°C)
	85.0 °C	87.5 °C	90.0 °C	92.5 °C	95.0 °C	97.5 °C	
<i>P. odorifer</i> JCM13339		9.3±0.2 ^a	4.1±0.4	2.3±0.1			8.1
<i>P. odorifer</i> JCM21743 ^T		9.2±0.1	4.4±0.2	2.2±0.1			8.1
<i>P. odorifer</i> No.3		7.7±0.8	3.8±0.4	2.0±0.1			8.7
<i>P. polymyxa</i> JCM2507 ^T		6.3±0.2	3.6±0.2	1.8±0.0			9.1
<i>P. polymyxa</i> JCM20106		6.7±0.4	3.4±0.2	1.6±0.1			7.9
<i>P. polymyxa</i> JCM20385		13.9±0.1	6.9±0.7	3.0±0.1			7.6
<i>P. polymyxa</i> No.1		12.5±0.7	6.0±0.4	2.9±0.2			7.9
<i>P. polymyxa</i> No.7		13.7±0.5	6.7±0.7	3.1±0.2			7.7
<i>P. polymyxa</i> No.11		25.1±2.3	12.2±0.6	6.3±0.5			8.4
<i>P. polymyxa</i> No.952		11.6±0.3	6.1±0.2	2.6±0.1			7.6
<i>P. polymyxa</i> No.1095		10.9±0.4	6.3±0.1	2.6±0.2			8.1
<i>P. terrae</i> JCM11466 ^T			27.5 ^b	11.7±0.3	5.6±0.3	2.3±0.2	7.0
<i>P. terrae</i> No.9			27.4	12.5±2.5	6.8±0.8	2.8±0.2	7.7
<i>P. humicus</i> No.58		48.9±9.2	20.3±2.7	9.8±0.9			7.2
<i>P. pabuli</i> No.411		21.7±1.5	9.9±0.6	4.1±0.4			6.9
<i>P. taichungensis</i> No.39		11.6±0.5	6.1±0.3	2.6±0.2			7.6
<i>P. taichungensis</i> No.303		19.9±0.7	9.0±0.7	4.4±0.6			7.6
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13338			3.1±0.4				
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13341		24.3±3.2	10.3±1.5	5.2±0.6			7.5
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13342		38.5±3.3	15.7±2.1	7.5±0.3			7.0
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13343			<i>136.1</i>	54.8±12.8	21.4±1.3	8.5±1.6	6.2
<i>Paenibacillus</i> sp. No.1			48.3	19.5±1.3	8.8±0.4	3.3±0.0	6.5
<i>Paenibacillus</i> sp. No.4	11.7±1.3						
<i>Paenibacillus</i> sp. No.7		9.3±0.5	4.5±0.0	2.0±0.1			7.5
<i>Paenibacillus</i> sp. No.111	5.5±0.4						
<i>Paenibacillus</i> sp. No.293	5.4±0.4						

^aMeans±SD^bD_{90 °C} written in italics were calculated from z-value.

The blank spaces of D value and z value were not measured or calculated.

Table 1-2-2. Spore heat resistance of *B. cereus* group strains in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0).

Tested strain	D value (min)					z value (°C)
	87.5 °C	90.0 °C	92.5 °C	95.0 °C	97.5 °C	
<i>B. cereus</i> NBRC3002	15.8±0.6 ^a	7.5±0.3	4.2±0.4			8.7
<i>B. cereus</i> NBRC3003	20.9±1.5	9.5±0.4	4.6±0.2			7.6
<i>B. cereus</i> NBRC13690		20.4 ^b	10.7±0.1	4.9±0.2	2.8±0.2	8.5
<i>B. cereus</i> NBRC15305 ^T		25.0±4.6	12.9±1.8	4.3±0.2		6.6
<i>B. cereus</i> MAFF118482		38.1	18.1±1.1	8.6±0.5	4.1±0.1	7.7
<i>B. cereus</i> MAFF118519	8.3±0.3	4.1±0.4	2.0±0.2			8.1
<i>B. cereus</i> MAFF118590		82.9	37.7±4.5	17.4±1.9	7.8±0.5	7.3
<i>B. cereus</i> MAFF118591		38.8	17.4±0.6	8.2±0.0	3.6±0.1	7.3
<i>B. cereus</i> MAFF118596		25.8±1.3	11.9±1.2	5.6±0.2		7.5
<i>B. cereus</i> MAFF118597		25.8±1.5	12.4±0.9	5.8±0.7		7.7
<i>B. cereus</i> MAFF118598		91.6	41.3±4.9	18.3±2.9	8.2±0.8	7.1
<i>B. cereus</i> MAFF118601		34.3	16.8±0.1	7.9±0.2	4.0±0.0	7.9
<i>B. thuringiensis</i> NBRC101235 ^T	15.2±0.6	6.3±0.3	3.0±0.1			7.1
<i>B. cereus sensu lato</i> No.5	10.6±0.5	4.8±0.2	2.3±0.2			7.6
<i>B. cereus sensu lato</i> No.6	11.1±0.0	4.9±0.3	2.3±0.3			7.3
<i>B. cereus sensu lato</i> No.9	17.4±1.2	6.7±0.9	3.4±0.3			7.0
<i>B. cereus sensu lato</i> No.271	14.0±1.7	7.8±1.3	3.2±0.3			7.8
<i>B. cereus sensu lato</i> No.275	44.0±8.5	20.9±6.3	5.8±1.1			5.7
<i>B. cereus sensu lato</i> No.501	10.7±2.3	4.9±1.5	2.1±0.2			7.1
<i>B. cereus sensu lato</i> No.503	20.1±3.8	7.9±1.7	3.3±0.8			6.3
<i>B. cereus sensu lato</i> No.591	19.3±2.2	8.3±1.5	3.3±0.2			6.6
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1071	16.8±1.2	6.2±0.4	3.7±0.4			7.6

^aMeans±SD^bD_{90 °C} written in italics were calculated from z-value.

The blank spaces of D value and z value were not measured or calculated.

Table 1-2-3. Spore heat resistance of *Bacillus* strain except for *B. cereus* group in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0).

Tested strain	D value (min)			z value (°C)
	87.5 °C	90.0 °C	92.5 °C	
<i>B. megaterium</i> NBRC15308 ^T	14.2±0.1 ^a	6.8±0.9	2.9±0.3	7.2
<i>B. megaterium</i> No.17	7.7±0.3	3.7±0.4	1.8±0.0	7.9
<i>B. megaterium</i> No.19	29.5±1.1	13.4±0.8	5.1±0.1	6.5
<i>B. megaterium</i> No.61	24.3±2.2	11.5±0.6	4.7±0.2	7.0
<i>B. pumilus</i> No.1	13.8±0.6	6.4±0.3	2.9±0.1	7.4
<i>B. pumilus</i> No.2	29.9±2.5	12.7±1.9	6.5±0.6	7.5
<i>B. pumilus</i> No.956	13.9±0.4	5.5±0.1	2.9±0.2	7.4
<i>B. simplex</i> No.10	12.9±0.5	5.5±0.5	2.5±0.1	7.0
<i>B. simplex</i> No.433	10.6±0.3	5.0±0.3	2.5±0.1	8.0
<i>B. simplex</i> No.1077	9.5±0.1	4.7±0.3	2.1±0.1	7.5
<i>Bacillus</i> sp. No.23	24.6±2.4	11.2±0.6	4.4±0.9	6.7
<i>Bacillus</i> sp. No.592	31.8±5.9	17.6±1.7	9.9±1.1	9.9

^aMeans±SD

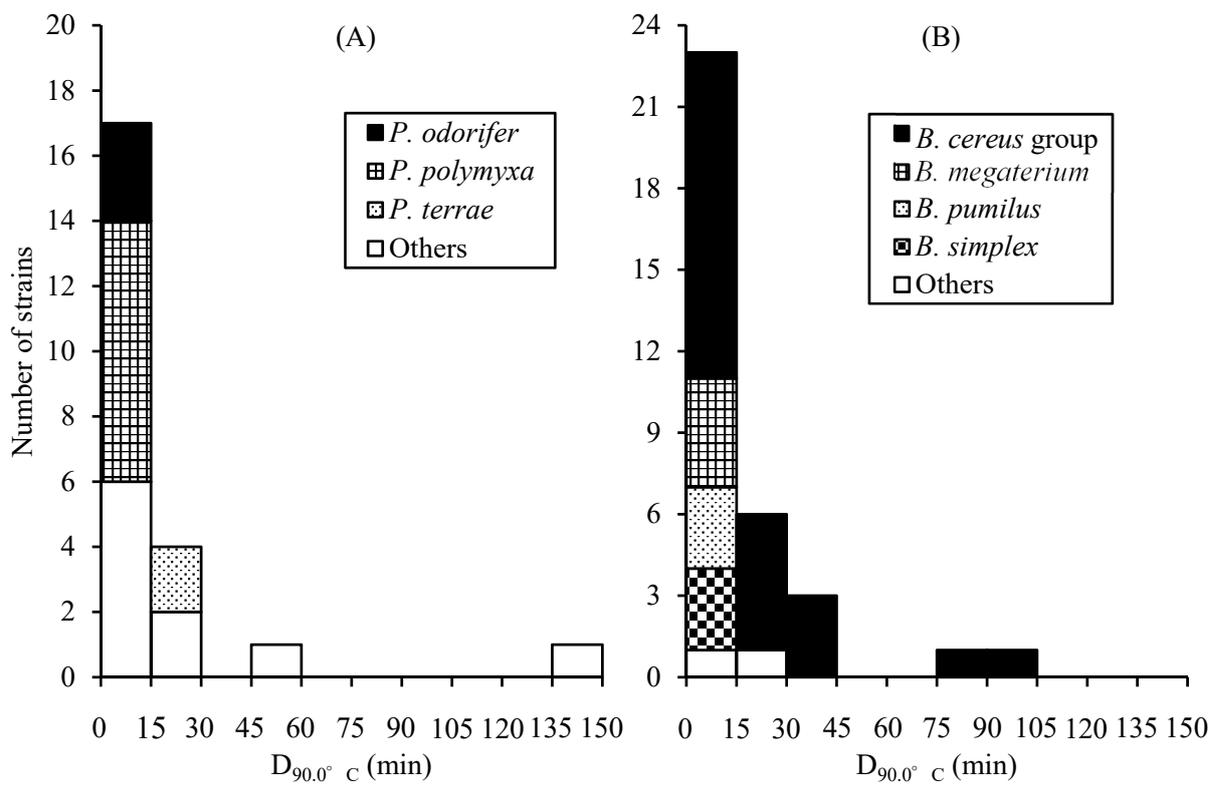


Fig. 1-2-1. Distribution of the spore D_{90.0°C} of 23 *Paenibacillus* (A) and 34 *Bacillus* strains (B) in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0).

Table 1-2-4. Growth ability of *Paenibacillus* strains at refrigeration temperatures.

Tested strain	Growth detected day ^a			
	4 °C	6 °C	8 °C	10 °C
<i>P. odorifer</i> JCM13339	7	4	4	4
<i>P. odorifer</i> JCM21743 ^T	7	4	4	4
<i>P. odorifer</i> No.3	11	4	4	4
<i>P. polomyxa</i> JCM2507 ^T	- ^b	-	-	11
<i>P. polomyxa</i> JCM20106	-	14	7	4
<i>P. polomyxa</i> JCM20385	-	21	11	7
<i>P. polymyxa</i> No.1	21	11	7	4
<i>P. polymyxa</i> No.7	-	11	7	7
<i>P. polymyxa</i> No.11	-	11	7	7
<i>P. polymyxa</i> No.952	21	7	4	4
<i>P. polymyxa</i> No.1095	28	10	7	4
<i>P. terrae</i> JCM11466 ^T	-	21	14	11
<i>P. terrae</i> No.2	-	21	11	7
<i>P. terrae</i> No.8	28	21	11	7
<i>P. terrae</i> No.9	-	21	11	7
<i>P. caespitis</i> No.112	14	7	4	4
<i>P. chibensis</i> JCM9905 ^T	-	-	-	14
<i>P. humicus</i> No.58	-	14	7	4
<i>P. humicus</i> No.65	-	21	7	4
<i>P. pabuli</i> NBRC13638 ^T	28	10	7	4
<i>P. pabuli</i> No.411	11	7	4	4
<i>P. taichungensis</i> No.5	14	7	7	4
<i>P. taichungensis</i> No.39	14	11	4	4
<i>P. taichungensis</i> No.295	21	11	7	4
<i>P. taichungensis</i> No.303	21	11	7	4
<i>P. xylanexedens</i> No.1	28	11	7	7
<i>P. xylanexedens</i> No.4	21	14	11	7
<i>P. xylanexedens</i> No.274	21	11	7	4
<i>P. xylanexedens</i> No.284	14	11	7	4
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13338	14	11	7	7
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13341	7	4	4	4
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13342	21	11	7	4
<i>Paenibacillus</i> sp. JCM13343	11	11	7	4
<i>Paenibacillus</i> sp. No.1	-	11	7	4
<i>Paenibacillus</i> sp. No.2	21	7	7	4
<i>Paenibacillus</i> sp. No.4	28	11	11	7
<i>Paenibacillus</i> sp. No.6	21	11	7	4
<i>Paenibacillus</i> sp. No.7	11	7	4	4
<i>Paenibacillus</i> sp. No.9	21	14	11	7
<i>Paenibacillus</i> sp. No.111	21	7	7	7
<i>Paenibacillus</i> sp. No.122	21	11	4	4
<i>Paenibacillus</i> sp. No.173	11	7	4	4
<i>Paenibacillus</i> sp. No.174	-	-	28	28
<i>Paenibacillus</i> sp. No.281	21	11	11	7
<i>Paenibacillus</i> sp. No.293	28	11	11	7

^aThe number represents days observed turbidity with microbial growth.

^bNo turbidity was observed in 28 days incubation.

Table 1-2-5. Growth ability of *B. cereus* group strains at refrigeration temperatures.

Tested strain	Growth detected day ^a			
	4 °C	6 °C	8 °C	10 °C
<i>B. cereus</i> NBRC3001	- ^b	-	-	4
<i>B. cereus</i> NBRC3002	28	7	4	4
<i>B. cereus</i> NBRC3003	28	10	4	4
<i>B. cereus</i> NBRC3457	-	-	-	7
<i>B. cereus</i> NBRC3563	-	-	-	10
<i>B. cereus</i> NBRC13597	-	-	-	10
<i>B. cereus</i> NBRC13690	-	-	10	4
<i>B. cereus</i> NBRC15305 ^T	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118482	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118502	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118512	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118515	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118519	-	7	4	4
<i>B. cereus</i> MAFF118521	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118523	-	-	-	7
<i>B. cereus</i> MAFF118524	-	-	11	4
<i>B. cereus</i> MAFF118525	-	11	4	4
<i>B. cereus</i> MAFF118526	-	-	-	7
<i>B. cereus</i> MAFF118532	-	-	-	7
<i>B. cereus</i> MAFF118590	-	-	-	7
<i>B. cereus</i> MAFF118591	-	-	-	11
<i>B. cereus</i> MAFF118593	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118594	-	-	14	7
<i>B. cereus</i> MAFF118596	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118597	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118598	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118601	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF118607	-	-	11	4
<i>B. cereus</i> MAFF301697	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF301699	-	-	-	4
<i>B. cereus</i> MAFF520024	-	-	-	4
<i>B. thuringiensis</i> NBRC101235 ^T	-	-	10	4
<i>B. weihenstephanensis</i> NBRC101238 ^T	-	7	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.5	-	11	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.6	-	11	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.9	-	11	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.271	21	4	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.275	-	-	7	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.501	-	7	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.503	-	-	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.591	-	-	11	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1071	-	-	7	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1072	-	7	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.10711	-	7	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.10810	-	7	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1093	-	4	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1099	-	7	4	4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.2611	-	14	7	4

^aThe number represents days observed turbidity with microbial growth.

^bNo turbidity was observed in 28 days incubation.

Table 1-2-6. Growth ability of *Bacillus* strains except for *B. cereus* group at refrigeration temperatures.

Tested strain	Growth detected day ^a			
	4 °C	6 °C	8 °C	10 °C
<i>B. megaterium</i> NBRC15308 ^T	- ^b	-	14	10
<i>B. megaterium</i> No.3	-	-	14	7
<i>B. megaterium</i> No.5	-	-	11	4
<i>B. megaterium</i> No.17	-	-	21	4
<i>B. megaterium</i> No.19	-	-	14	4
<i>B. megaterium</i> No.61	-	-	11	4
<i>B. megaterium</i> No.1073	-	10	4	4
<i>B. megaterium</i> No.10710	-	21	7	4
<i>B. megaterium</i> No.1081	-	-	10	7
<i>B. pumilus</i> NBRC12092 ^T	-	28	10	7
<i>B. pumilus</i> No.1	-	-	-	11
<i>B. pumilus</i> No.2	-	-	14	11
<i>B. pumilus</i> No.8	-	-	28	7
<i>B. pumilus</i> No.956	-	21	14	7
<i>B. simplex</i> JCM12307 ^T	21	11	7	4
<i>B. simplex</i> No.10	14	7	4	4
<i>B. simplex</i> No.433	14	11	7	4
<i>B. simplex</i> No.1077	7	7	4	4
<i>B. simplex</i> No.10714	7	4	4	4
<i>B. simplex</i> No.2923	14	10	7	7
<i>B. subtilis</i> No.2922	-	-	-	14
<i>Bacillus sp.</i> No.23	-	-	14	4
<i>Bacillus sp.</i> No.592	-	-	28	11
<i>Bacillus sp.</i> No.2916	10	4	4	4

^aThe number represents days observed turbidity with microbial growth.

^bNo turbidity was observed in 28 days incubation.

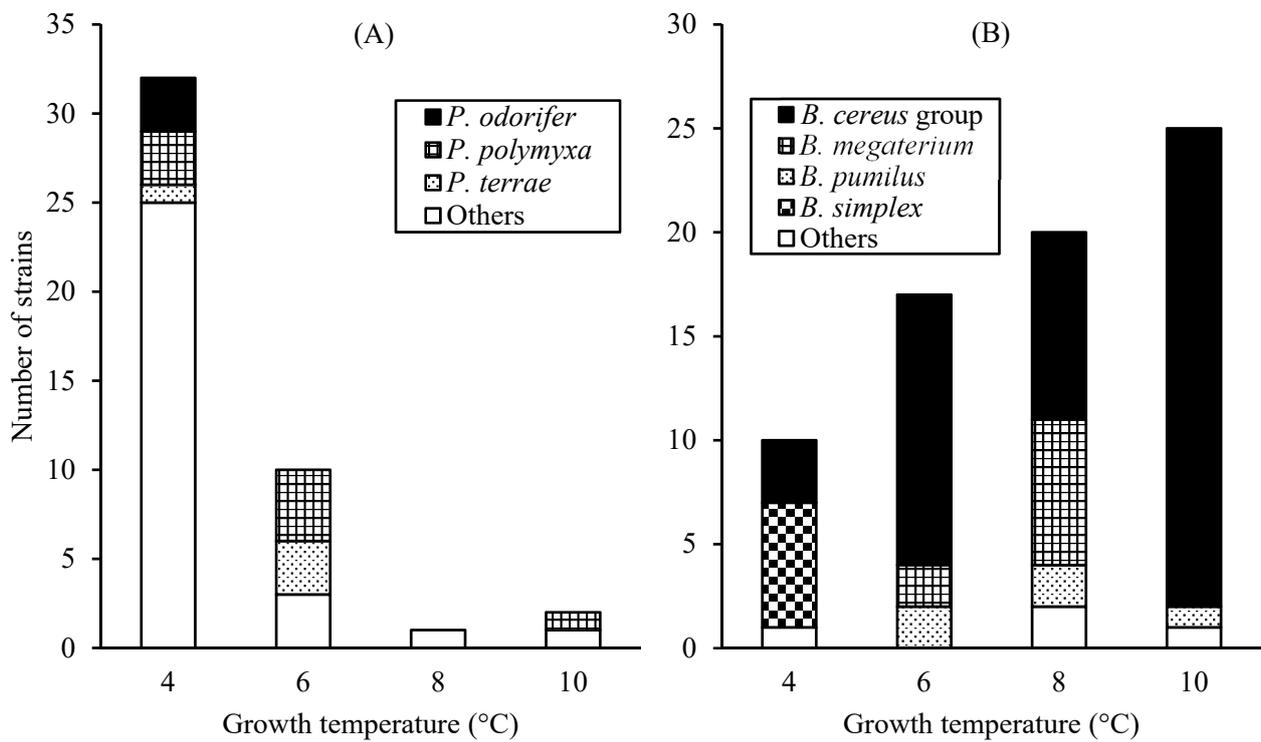


Fig. 1-2-2. Distribution of the lowest temperature at which 45 *Paenibacillus* (A) and 72 *Bacillus* strains (B) could grow, among the tested temperatures in this study. The growth at each temperature was determined for 28 days.

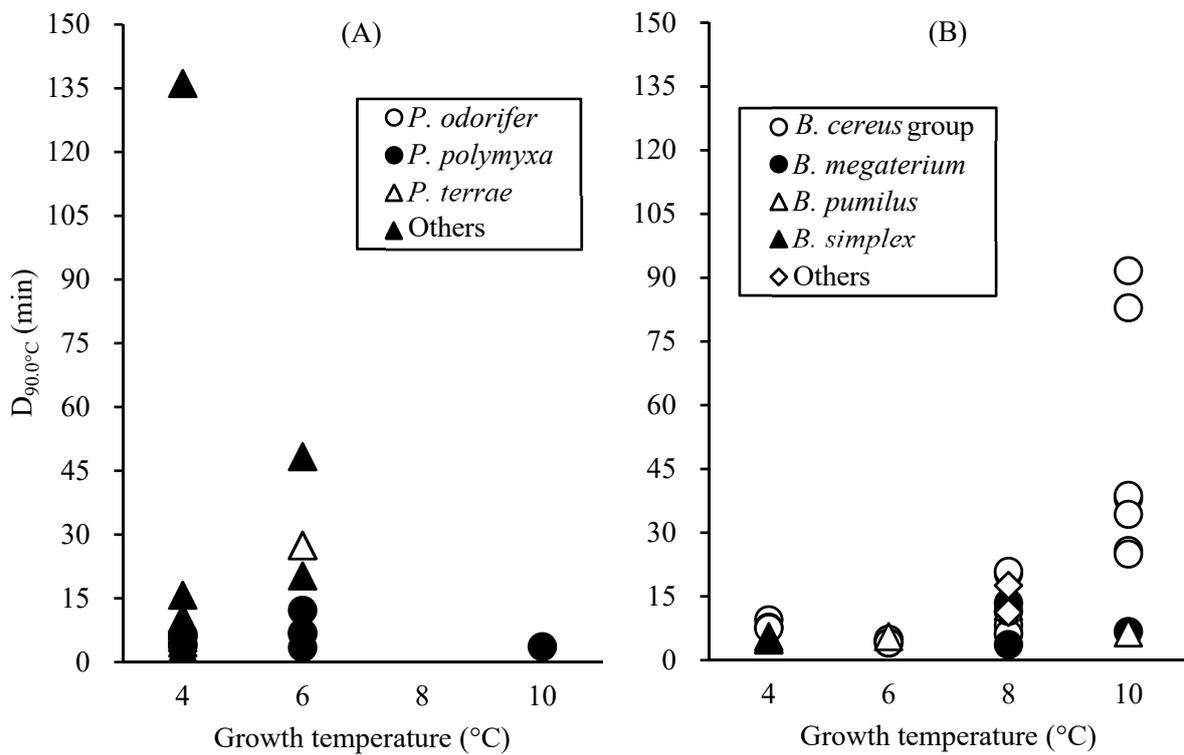


Fig. 1-2-3. Relationship between the spore $D_{90.0^{\circ}\text{C}}$ and the lowest temperature at which 23 *Paenibacillus* (A) and 34 *Bacillus* strains (B) could grow, among the tested temperatures. The growth at each temperature was evaluated after 28 days incubation.

第3節 *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の硬質表面への付着

第1節では、原材料のホワイトアスパラガスに付着して製品に混入したと推察される *Paenibacillus* 属細菌が冷蔵保存中に増殖する事例を示した。第2節では、低温増殖性の *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の増殖温度ならびに芽胞の耐熱性を明らかにし、加熱処理後に生残する *Paenibacillus* 属細菌は冷蔵保存中に増殖する可能性が高いことを示した。細菌芽胞は主に土壌等の自然環境に分布するため、原材料に付着した状態で製造工程に持ち込まれる。食品加工において、原材料の洗浄殺菌や微生物数の少ない原材料の選定が重要になる理由はこのためである。一方、食品と直接接触する加工機器や包装資材から食品への微生物汚染も看過できない (Heyndrickx, 2011)。食品加工機器やコンベアベルト、調理器具類等の表面に付着した微生物が、製造ライン稼働前後の洗浄殺菌作業で除去されずに製品に混入した場合には、思いもよらない食品事故につながる。すなわち、固液界面における微生物の付着動態の理解は、製造環境の清浄度を高めて衛生的な加工食品の製造するために重要である。

微生物の付着動態に関する研究では、平板や円板形状のステンレス鋼やプラスチック等が一般的な付着対象である (Nanasaki et al., 2010; Takahashi et al., 2016a; Tsuji and Yokoigawa, 2012)。一方、微生物や様々な食品成分の付着動態や洗浄除去について、直径数十 μm の微粒子形状の上記硬質材料を付着対象とした水相微粒子分散系での研究も報告されている (Fukuzaki et al., 1995; Fukuzaki et al., 2006; Fukuzaki et al., 2007; Sugiyama et al., 2012; Takahashi et al., 2016b; Takehara and Fukuzaki, 2002; Urano et al., 2002; 浦野・福崎, 2008)。微粒子分散系における吸・脱着研究は、平板や円板形状の硬質と比較して付着表面積が大きいいため、定量的評価が容易であり、精度の高い評価系であると言われている (Sugiyama et al., 2012)。本節では、包装資材や食品加工機器の材料となる、疎水性のポリエチレンテレフタレートおよび親水性のステンレス鋼の微粒子表面における *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の芽胞の付着動態を検討した。

試料および方法

1-3-1. 供試菌株

Bacillus 属細菌 26 菌株および *Paenibacillus* 属細菌 11 菌株を用いた (Table 1-3-1)。*Bacillus* 属細菌 6 菌株および *Paenibacillus* 属細菌 4 菌株は、製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) および理化学研究所微生物材料開発室 (JCM) から入手した。その他の 27 菌株は、食品製造環境や要冷蔵加工食品から分離した。

1-3-2. 芽胞懸濁液の調製

芽胞懸濁液は、試料および方法 1-2-2 と同様の方法で調製し、以後の実験に供した。

1-3-3. 付着材料

付着材料には、微粒子形状のポリエチレンテレフタレート (PET, 粒径: 約 43 μm , 比表面積: 約 0.73 m^2/g , ホソカワ粉体技術研究所) およびステンレス鋼 (SS, SUS316L, 粒径: 約 20 μm , 比表面積: 約 0.266 m^2/g , ニラコ) を用いた。PET 微粒子はエタノールで洗浄した後に、SS 微粒子はアセトンとエタノールで洗浄した後にそれぞれ定温恒温乾燥器 (NDO-520, 東京理化器械) で 40 $^{\circ}\text{C}$ および 150 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥してから試験に用いた (Takehara and Fukuzaki, 2002; Fukuzaki et al., 2006)。

1-3-4. 芽胞の表面疎水性の測定

芽胞の表面疎水性は、ヘキサデカンへの分配率を指標とした Rosenberg の方法 (1984) に従って評価した。簡易濁度計 (miniphoto518R, タイテック) で 660 nm の濁度が約 0.6 (約 10^{7-8} spores/mL, pH 6.3–6.8) となるように蒸留水で希釈した各菌株の芽胞懸濁液 4 mL をねじロガラス試験管 (NW-18H, マルエム) に採り、n-ヘキサデカン (特級, 富士フイルム和光純薬) を 1 mL 添加してボルテックスミキサーで 10 秒間激しく攪拌した。30 分間静置した後に再び 5 秒間攪拌し、15 分間静置した後に 660 nm の濁度を測定した。芽胞の表面疎水性は、Eq. 1 から算出した。

$$\text{芽胞の表面疎水性 (\%)} = \frac{A_{\text{initial}} - A_{\text{after}}}{A_{\text{initial}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 1}$$

A_{initial} : ヘキサデカン添加前の濁度

A_{after} : ヘキサデカン添加後の水層の濁度

1-3-5. 芽胞の微粒子付着性の測定

微生物の表面疎水性は、水層から油層に分配される微生物数の多寡を水層の濁度低下率を指標にして評価した。そのため、芽胞が微粒子表面に付着すると懸濁液の濁度が低下すると考え、表面疎水性の測定方法と同様に、微粒子添加前後の濁度を測定して PET 微粒子および SS 微粒子に対する芽胞の付着性を評価した。

660 nm の濁度が約 0.6 となるように蒸留水で希釈した芽胞懸濁液 4 mL に PET 微粒子 0.1822 g (0.133 m²) もしくは SS 微粒子 0.5000 g (0.133 m²) を添加してボルテックスミキサーで 10 秒間激しく攪拌した。30 分間静置した後に再び 5 秒間攪拌し、15–30 分間静置した後に 660 nm の濁度を測定した。微粒子表面に対する芽胞の付着は、Eq. 2 から算出した。

$$\text{芽胞の表面付着性 (\%)} = \frac{B_{\text{initial}} - B_{\text{after}}}{B_{\text{initial}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 2}$$

B_{initial}: 微粒子添加前の濁度

B_{after}: 微粒子添加後の濁度

1-3-6. 付着芽胞数の測定

25 mL 容ゴムキャップ付ガラスバイアル中で芽胞懸濁液と微粒子を接触させて微粒子表面に芽胞を付着させた。すなわち、蒸留水で 0.1–0.9 倍に希釈した各菌株の芽胞懸濁液 2.9 mL に PET 微粒子 0.1822 g (0.133 m²) もしくは SS 微粒子 0.5000 g (0.133 m²) を添加してボルテックスミキサーで 15 秒間激しく攪拌し、15 分間静置した。この操作を 3 回繰り返した後に蒸留水で遠心洗浄し、定温恒温乾燥器にて 40 °C で 1–2 晩乾燥させて芽胞付着微粒子を調製した。

微粒子に付着した芽胞数は、ジピコリン酸 (DPA) 濃度から推定した。芽胞付着微粒子 (PET: 0.0365 g, SS: 0.1000 g, いずれも 0.0266 m²) を蒸留水 0.5 mL に懸濁した後、20 分間煮沸して芽胞中の DPA を抽出した。抽出液中の DPA は、塩化テルビウム (TbCl₃) を用いた高感度検出法 (Rosen, 1997) で定量した。遠心分離で得た上清 0.3 mL を 1 mM TbCl₃ 0.3 mL, 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 2.4 mL と混合し、蛍光分光光度計 (F-4010, 日立製作所) で直ちに蛍光強度 (励起波長: 282 nm, 測定波長: 544 nm) を測定した。蛍光強度から DPA 濃度を推定し、DPA 濃度から微粒子に付着した芽胞数を推定した。

DPA 試薬 (P63808, Sigma-Aldrich) を用いて同様に蛍光強度を測定し, 蛍光強度から DPA 濃度を推定するための検量線を作成した。さらに, 蒸留水で 0.03–0.9 倍に希釈した各菌株の芽胞懸濁液について, 同様に DPA 濃度を求めるとともに, 標準寒天平板培地 (島津ダイアグノスティクス) を用いた表面塗抹培養法 (30 °C, 1–2 日間) で芽胞数を求め, DPA 濃度から芽胞数を推定するための検量線を菌株毎に作成した。

1-3-7. 走査型電子顕微鏡観察

観察用試料台 (S-KM, φ 15 mm, 日新 EM) に両面テープを貼り, 芽胞が付着した PET 微粒子を接着させた。余分な微粒子をエアブローアで除いた後, イオンスパッタ装置 (E102, 日立製作所) で白金パラジウムを 1 分間蒸着させ, 走査型電子顕微鏡 (S-2400, 日立製作所) で観察した。

結果および考察

1-3-1. 芽胞の表面疎水性

Paenibacillus 属細菌 11 菌株および *Bacillus* 属細菌 26 菌株の芽胞の表面疎水性の測定結果は Table 1-3-1 に示した。*P. odorifer* の表面疎水性は 90 %前後、*P. polymyxa* は約 70–80 % と評価された。一方、*P. pabuli* の表面疎水性は、*P. odorifer* や *P. polymyxa* よりも低かった。*B. cereus* group 15 菌株のうち、10 菌株は 80 %以上の表面疎水性を示し、最も低い菌株でも約 60 %であった。*B. megaterium* NBRC15308^T の表面疎水性は約 30 %と低かったが、*B. megaterium* の分離菌株における表面疎水性は約 60–90 %であった。*B. licheniformis* NBRC12200^T の表面疎水性は約 40 %、*B. pumilus* NBRC12092^T および *B. subtilis* NBRC13719^T の表面疎水性は 10 %以下であった。

芽胞の表面疎水性は、スポアコートの外側に形成されるエキソスポリウムの有無と関連があると考えられている。本研究では、エキソスポリウムを持つ *B. cereus* group の芽胞は表面疎水性が高く、エキソスポリウムを持たない *B. licheniformis* や *B. pumilus*、*B. subtilis* の芽胞の表面疎水性は低い傾向にあった (Table 1-3-1)。これらの結果は、*Bacillus* 属細菌の芽胞の表面疎水性を評価した過去の報告 (Ankolekar and Labbe, 2010; Koshikawa et al., 1989; Wiencek et al., 1990) とよく一致していた。また、*B. megaterium* の芽胞は、エキソスポリウムの有無で表面疎水性がそれぞれ約 80 %、約 10–20 %であると報告されている (Koshikawa et al., 1989)。本研究では、標準菌株 (*B. megaterium* NBRC15308^T) 芽胞の表面疎水性は約 30 %、分離菌株芽胞の表面疎水性は約 60–90 %であったことから、標準菌株の芽胞はエキソスポリウムを持たない菌株で、分離菌株の芽胞はエキソスポリウムを持つ菌株であることが推察された。*P. polymyxa* の芽胞の電子顕微鏡による構造観察 (Hachisuka et al., 1984; Huo et al., 2012; Murphy et al., 1969) ではエキソスポリウムは観察されておらず、本研究で供試した *P. polymyxa* の芽胞も同様の構造であると推察された。そのため、エキソスポリウムを持たないと推察される *P. polymyxa* の芽胞が高い表面疎水性を示したことは、最外層であるスポアコートが疎水性の高いタンパク質で構成されている可能性が考えられた。また、*P. polymyxa* の芽胞はグラム陰性菌の線毛に似たアペンデジと呼ばれる構造物を表層に形成することも報告されている (Hachisuka et al., 1984)。アペンデジの主要成分はタンパク質であることから (Kozuka and Tochikubo, 1985)、スポアコートと同様に

疎水性の高いタンパク質で構成されるために芽胞の表面疎水性が高まると推測された。

P. odorifer の芽胞構造は未だ不明であるが、その高い表面疎水性から考えると、疎水性の高いスポアコートやアペンデジあるいはエキソスポリウムの存在が推測された。

1-3-2. PET 微粒子および SS 微粒子表面への芽胞の付着性

PET 微粒子および SS 微粒子への芽胞の付着性の測定結果は、それぞれ Fig. 1-3-1 および Fig. 1-3-2 に示した。*P. odorifer* および *P. polymyxa* の PET 微粒子表面への付着性は、それぞれ 85–90% および 63–91%, SS 微粒子表面への付着性は、それぞれ 76–88% および 53–92% であった。*B. cereus* group の PET および SS 微粒子表面への付着性は、それぞれ 66–99% および 48–87% であった。*B. megaterium* の付着性は、いずれの微粒子においても標準菌株 (NBRC15308^T) よりも分離菌株の方が高い傾向にあった。*B. pumilus* NBRC12092^T および *B. subtilis* NBRC13719^T の微粒子表面への付着性は極めて低かった。

平板形状のポリエチレンやステンレス鋼を用いて *Bacillus* 属細菌芽胞の付着性を評価した研究では、*B. cereus* の芽胞は *B. licheniformis* や *B. pumilus*, *B. subtilis* の芽胞と比較して硬質表面に付着しやすい傾向にあること、硬質表面への付着性は芽胞の表面疎水性に影響されることが報告されている (Faille et al., 2002; 2010; Rönner et al., 1990)。そこで、各菌株芽胞の表面疎水性と PET 微粒子および SS 微粒子表面への芽胞の付着性の関係を回帰分析したところ、その分布は有意な正の相関 (PET 微粒子: $r = 0.884$, $p < 0.001$; SS 微粒子: $r = 0.913$, $p < 0.001$) を示した (Fig. 1-3-1 および 1-3-2)。さらに、属毎に分けて回帰分析してもその関係には有意な正の相関があった (PET 微粒子: *Paenibacillus* 属: $r = 0.907$, $p < 0.001$; *Bacillus* 属: $r = 0.881$, $p < 0.001$; SS 微粒子: *Paenibacillus* 属: $r = 0.767$, $p < 0.05$; *Bacillus* 属: $r = 0.937$, $p < 0.001$)。これらのことから、硬質表面への芽胞の付着は、付着対象の疎水性度に関わらず芽胞の表面疎水性が重要な因子であることが示唆された。また、芽胞の表面疎水性を評価すれば硬質表面への芽胞の付着性の定性評価が可能になると期待される。

1-3-3. PET 微粒子および SS 微粒子表面に対する芽胞の付着量

芽胞の表面疎水性が高い *P. odorifer* JCM13339 (表面疎水性: 91.6%), *P. odorifer* JCM21743^T (同: 86.1%) および *B. thuringiensis* NBRC101235^T (同: 67.3%) と、表面疎水性が低い *B. licheniformis* NBRC12200^T (同: 40.3%), *B. pumilus* NBRC12092^T (同: 8.6%) および *B.*

subtilis NBRC13719^T (同: 5.5%) について、水溶液中の芽胞数と微粒子表面への付着芽胞数の関係を調べた。PET 微粒子での結果は Fig. 1-3-3 に、SS 微粒子での結果は Fig. 1-3-4 に示した。

PET 微粒子表面への付着において、芽胞の表面疎水性が高い *P. odorifer* JCM13339, *P. odorifer* JCM21743^T および *B. thuringiensis* NBRC101235^T では、懸濁液の芽胞濃度の増加に伴い付着芽胞数も増加した。特に、*P. odorifer* JCM13339 および JCM21743^T は変化量が最も大きく、約 2.0×10^8 spores/mL の懸濁液において付着芽胞数は約 3.0×10^9 spores/m² に達した。一方、芽胞の表面疎水性が低い *B. licheniformis* NBRC12200^T, *B. pumilus* NBRC12092^T および *B. subtilis* NBRC13719^T では、 2.0×10^8 – 3.4×10^8 spores/mL の懸濁液においても付着芽胞数は 0.1×10^9 – 0.2×10^9 spores/m² であった (Fig. 1-3-3)。SS 微粒子表面への付着において、懸濁液中の芽胞濃度に依存した付着芽胞数の増加は表面疎水性の高い *P. odorifer* の芽胞で顕著であった。しかし、芽胞の表面疎水性が低い *B. licheniformis* NBRC12200^T, *B. pumilus* NBRC12092^T および *B. subtilis* NBRC13719^T の変化量は小さく、特に *B. licheniformis* NBRC12200^T は、芽胞濃度を 3.5×10^8 spores/mL まで増加させても付着芽胞数は 0.4×10^8 spores/m² であった (Fig. 1-3-4)。これらの結果は、芽胞懸濁液の濁度低下率で評価した微粒子表面への各菌株芽胞の付着性とよく一致していた。

1-3-4. 微粒子付着芽胞の走査型電子顕微鏡観察

B. thuringiensis NBRC101235^T, *P. odorifer* JCM21743^T, *B. pumilus* NBRC12092^T および *B. subtilis* NBRC13719^T の芽胞懸濁液に接触後の PET 微粒子を走査型電子顕微鏡で観察した。観察画像は、Fig. 1-3-5 および 1-3-6 に示した。 0.2×10^8 – 0.3×10^8 spore/mL の芽胞懸濁液に PET 微粒子を接触させた場合、いずれの菌株についても微粒子表面に付着した芽胞は極めて少なかった (Fig. 1-3-5A, C, E および G)。一方、 1.9×10^8 – 2.8×10^8 spore/mL の芽胞懸濁液に PET 微粒子を接触させた場合、*B. thuringiensis* NBRC101235^T および *P. odorifer* JCM21743^T の芽胞は、微粒子表面に凝集することなく多数付着していた (Fig. 1-3-5B, D および Fig. 1-3-6) が、*B. pumilus* NBRC12092^T および *B. subtilis* NBRC13719^T の芽胞では、微粒子表面に付着した芽胞は極めて少なかった (Fig. 1-3-5F および H)。これらの結果は、DPA 濃度から推定した各菌株芽胞の PET 微粒子に対する付着挙動とよく一致していた。

Table 1-3-1. Surface hydrophobicity of *Paenibacillus* and *Bacillus* spores.

Tested strain	Surface hydrophobicity (%)
<i>P. odorifer</i>	
<i>P. odorifer</i> JCM13339	91.6 ± 0.6 ^a
<i>P. odorifer</i> JCM21743 ^T	86.1 ± 0.4
<i>P. odorifer</i> No.3	89.0 ± 0.4
<i>P. pabuli</i>	
<i>P. pabuli</i> NBRC13638 ^T	54.5 ± 1.0
<i>P. pabuli</i> No.411	37.1 ± 1.2
<i>P. polymyxa</i>	
<i>P. polymyxa</i> JCM2507 ^T	68.1 ± 0.3
<i>P. polymyxa</i> No.1	70.5 ± 2.1
<i>P. polymyxa</i> No.7	75.6 ± 1.3
<i>P. polymyxa</i> No.11	81.8 ± 0.5
<i>P. polymyxa</i> No.952	72.8 ± 0.7
<i>P. polymyxa</i> No.1095	66.5 ± 0.4
<i>B. cereus</i> group	
<i>B. thuringiensis</i> NBRC101235 ^T	67.3 ± 0.2
<i>B. weihenstephanensis</i> NBCR101238 ^T	88.1 ± 0.3
<i>B. cereus sensu lato</i> No.5	82.1 ± 0.9
<i>B. cereus sensu lato</i> No.6	75.7 ± 0.1
<i>B. cereus sensu lato</i> No.9	93.2 ± 0.5
<i>B. cereus sensu lato</i> No.271	84.9 ± 0.4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.275	78.0 ± 0.7
<i>B. cereus sensu lato</i> No.501	80.0 ± 0.9
<i>B. cereus sensu lato</i> No.503	58.5 ± 0.5
<i>B. cereus sensu lato</i> No.591	81.5 ± 0.1
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1071	71.7 ± 0.5
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1072	87.2 ± 0.1
<i>B. cereus sensu lato</i> No.10810	81.1 ± 0.4
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1093	82.8 ± 1.2
<i>B. cereus sensu lato</i> No.1099	82.2 ± 0.8
<i>B. licheniformis</i>	
<i>B. licheniformis</i> NBRC12200 ^T	40.3 ± 1.4
<i>B. megaterium</i>	
<i>B. megaterium</i> NBRC15308 ^T	29.5 ± 0.3
<i>B. megaterium</i> No.5	70.2 ± 0.7
<i>B. megaterium</i> No.17	89.7 ± 0.9
<i>B. megaterium</i> No.19	88.9 ± 0.6
<i>B. megaterium</i> No.61	87.5 ± 0.6
<i>B. megaterium</i> No.1073	75.5 ± 1.4
<i>B. megaterium</i> No.10710	55.8 ± 0.7
<i>B. megaterium</i> No.1081	64.3 ± 1.5
<i>B. pumilus</i>	
<i>B. pumilus</i> NBRC12092 ^T	8.6 ± 0.7
<i>B. subtilis</i>	
<i>B. subtilis</i> NBRC13719 ^T	5.5 ± 0.1

^aMeans ± standard error of samples determined 3 times.

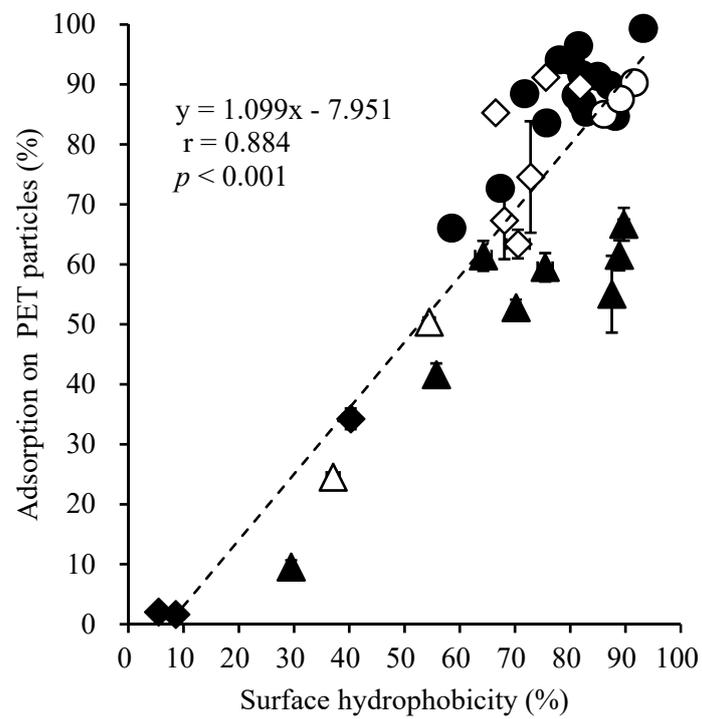


Fig. 1-3-1. Relationship between the spore surface hydrophobicity and the spore adsorption on particles of polyethylene terephthalate. Symbols: *B. cereus* group (●), *B. megaterium* (▲), other *Bacillus* spp. (◆), *P. odorifer* (○), *P. pabuli* (△), and *P. polymyxa* (◇). Bars represent standard error.

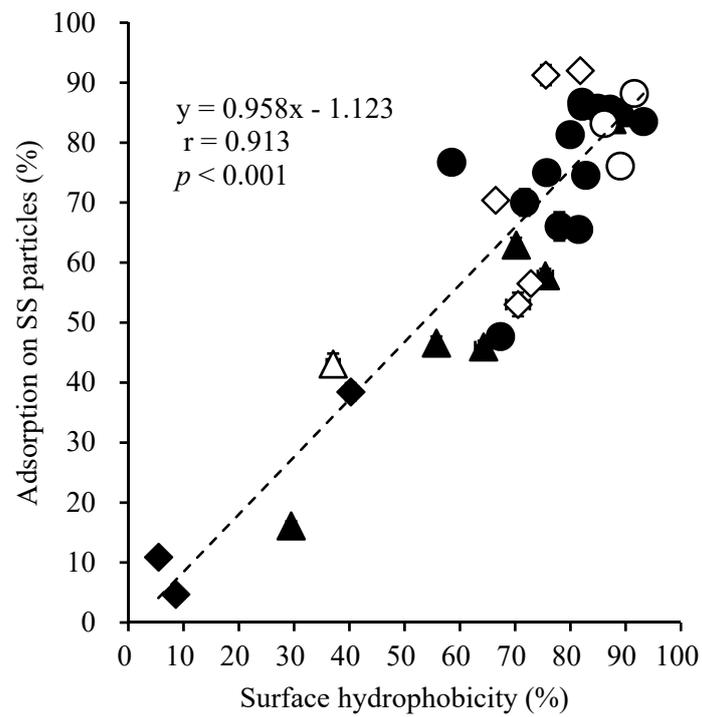


Fig. 1-3-2. Relationship between the spore surface hydrophobicity and the spore adsorption on particles of stainless steel. Symbols: *B. cereus* group (●), *B. megaterium* (▲), other *Bacillus* spp. (◆), *P. odorifer* (○), *P. pabuli* (△), and *P. polymyxa* (◇). Bars represent standard error.

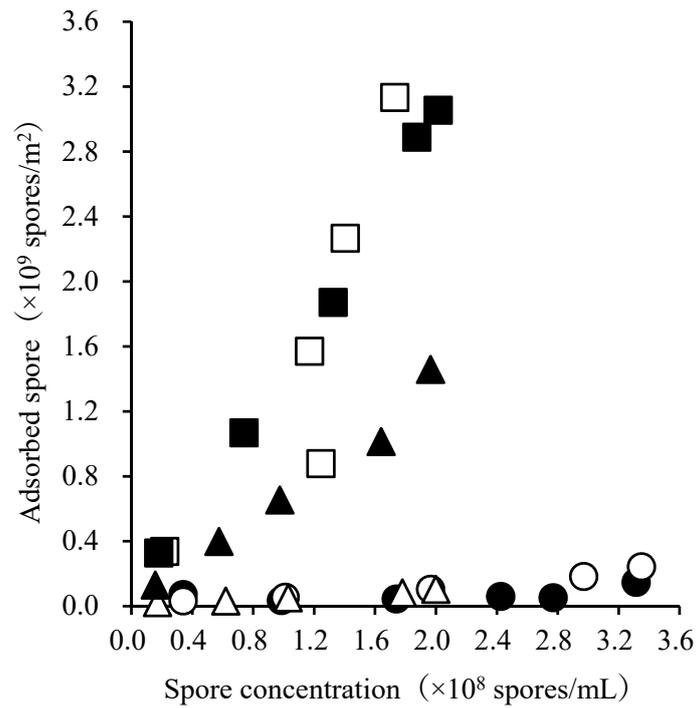


Fig. 1-3-3. Adsorption behavior of spores having different surface hydrophobicity on particles of polyethylene terephthalate in an aqueous solution. Symbols: *B. licheniformis* NBRC12200^T, surface hydrophobicity was 40.3 % (\circ); *B. pumilus* NBRC12092^T, surface hydrophobicity was 8.6 % (\bullet); *B. subtilis* NBRC13719^T, surface hydrophobicity was 5.5 % (Δ); *B. thuringiensis* NBRC101235^T, surface hydrophobicity was 67.3 % (\blacktriangle); *P. odorifer* JCM13339, surface hydrophobicity was 91.6 % (\square); *P. odorifer* JCM21743^T, surface hydrophobicity was 86.1 % (\blacksquare).

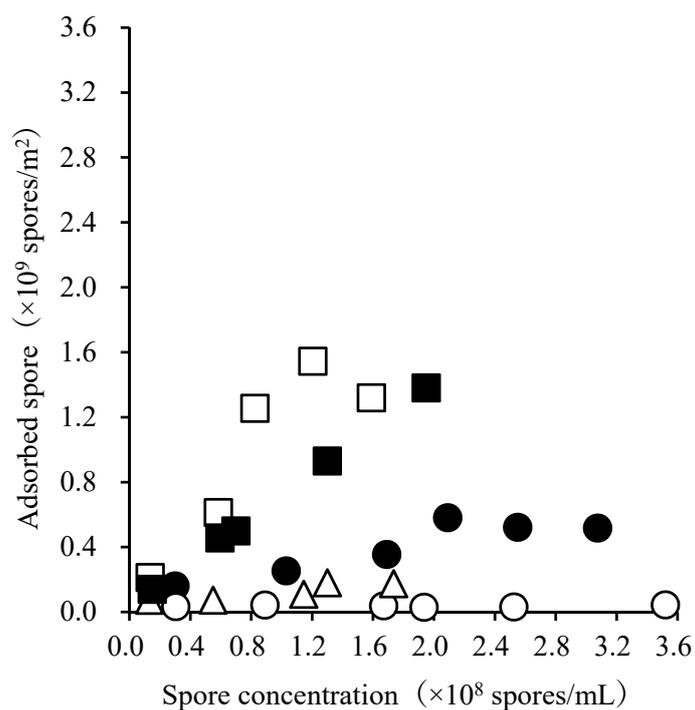


Fig. 1-3-4. Adsorption behavior of spores having different surface hydrophobicity on particles of stainless steel (B) in an aqueous solution. Symbols: *B. licheniformis* NBRC12200^T, surface hydrophobicity was 40.3 % (\circ); *B. pumilus* NBRC12092^T, surface hydrophobicity was 8.6 % (\bullet); *B. subtilis* NBRC13719^T, surface hydrophobicity was 5.5 % (Δ); *P. odorifer* JCM13339, surface hydrophobicity was 91.6 % (\square); *P. odorifer* JCM21743^T, surface hydrophobicity was 86.1 % (\blacksquare).

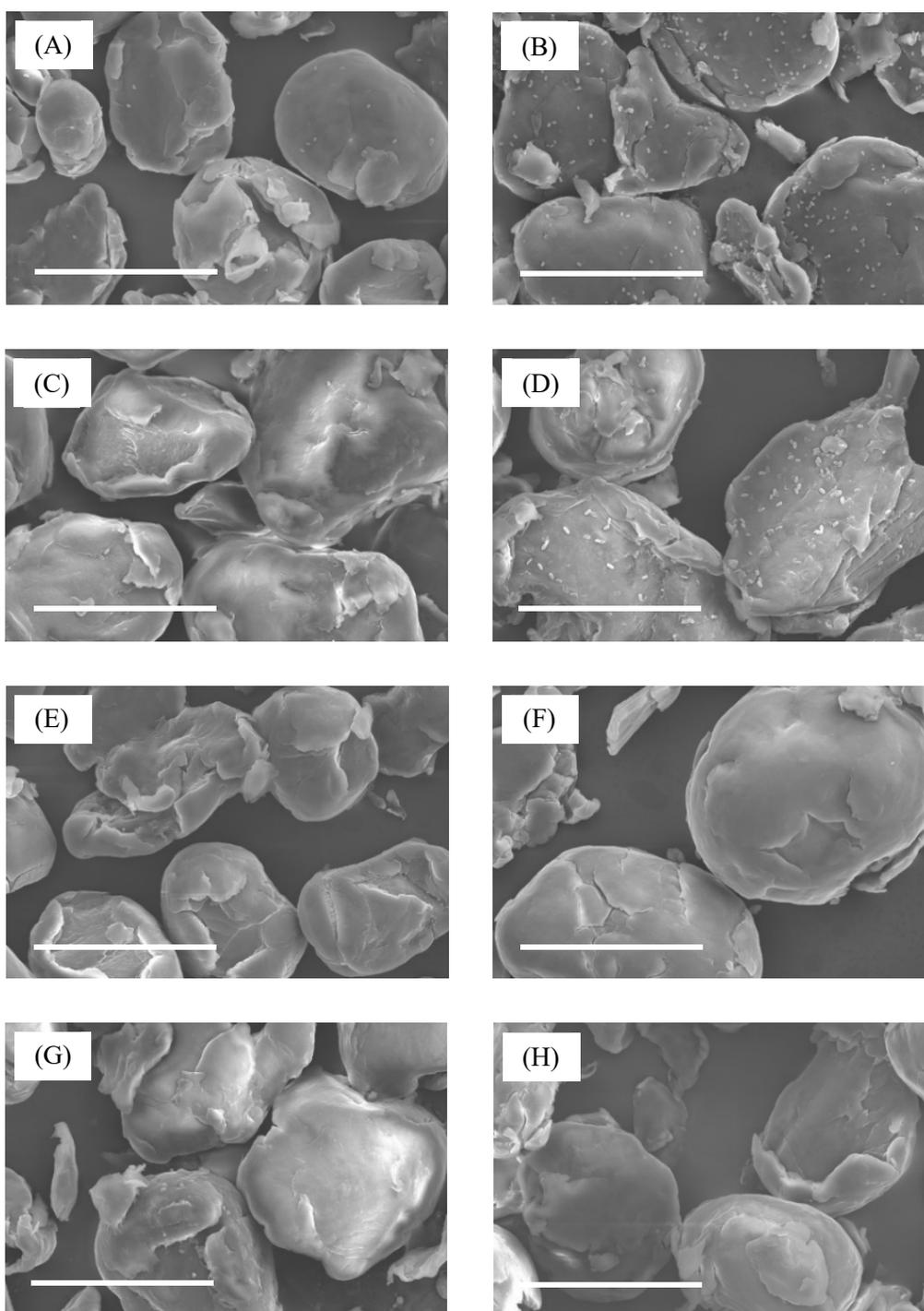
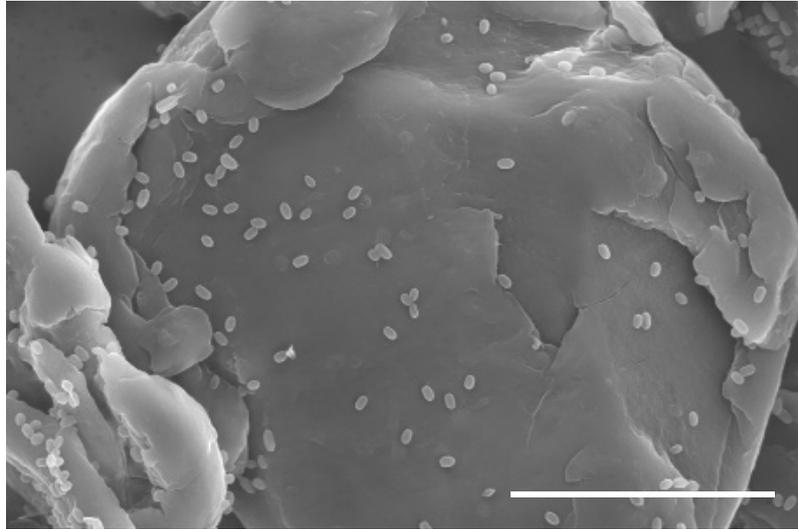


Fig. 1-3-5. SEM images of the spores of *B. thuringiensis* NBRC101235^T (A, B), *P. odorifer* JCM21743^T (C, D), *B. pumilus* NBRC12092^T (E, F), and *B. subtilis* NBRC13719^T (G, H) adsorbed on polyethylene terephthalate particles. Micrographs (A, C, E, and G) represent particles that were brought into contact with spores in dilute suspensions, 0.2×10^8 – 0.3×10^8 spores/mL. Micrographs (B, D, and H) represent particles that were brought into contact with spores in concentrated suspensions, 1.9×10^8 – 2.8×10^8 spores/mL. Bars represent 50 μ m.

B. thuringiensis NBRC101235^T



P. odorifer JCM21743^T

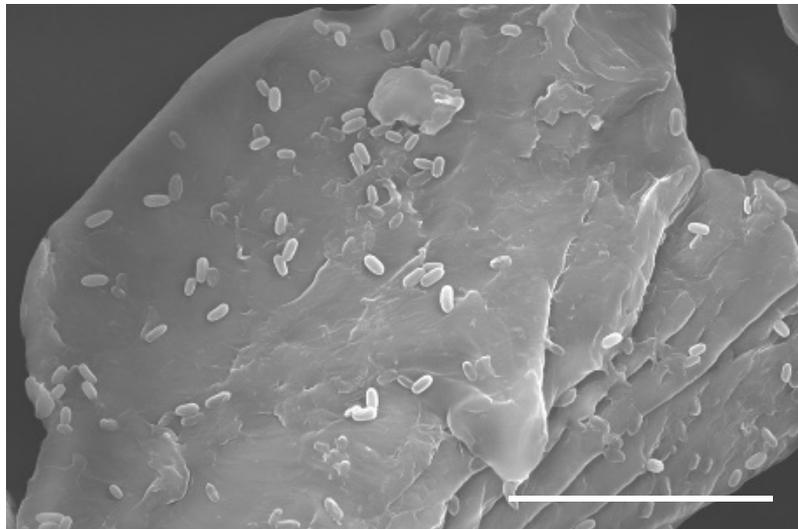


Fig. 1-3-6. SEM images of the spores of *B. thuringiensis* NBRC101235^T and *P. odorifer* JCM21743^T adsorbed on polyethylene terephthalate particles. Enlargements of the micrographs in Figure 1-3-5-(B), and -(D). Bars represent 20 μ m.

第4節 *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌のガス置換雰囲気における増殖

容器包装に密封する惣菜において、樹脂製パウチに惣菜を詰める袋物惣菜だけでなく、樹脂製トレイやカップに惣菜を詰める成型容器詰惣菜も消費者の需要が高まっている(日本惣菜協会, 2023)。当該製品は、樹脂製のトレイやカップに内容物を充填し、上部をトップシール機で密封するため、袋物惣菜のように包材と内容物が密着はしておらず、容器内にヘッドスペース(気相)が存在する。ヘッドスペースに残存した空気(酸素)は、保存中に内容物と反応して酸化劣化による品質低下を引き起こす可能性がある。そのため、密封時にヘッドスペースから酸素を除去し、その代わりに窒素や二酸化炭素を充填することもある。このような技術は、ガス置換包装(Modified Atmosphere Packaging: MAP)と呼ばれている。

MAPのうち、ヘッドスペースの酸素除去や二酸化炭素置換は、好気性細菌の増殖抑制や食中毒菌の増殖遅延、細菌芽胞の発芽や発芽後生育の抑制に有効とされている(Enfors, 1978; Daniels et al., 1985; 木村・藤井, 1996)。一方、酸素濃度が低下すると偏性嫌気性菌が増殖する可能性が高まるため、イギリスでは、MAP製品に10日以上保存性を付与するためには、冷蔵温度帯で増殖するE型ボツリヌス菌の芽胞の殺滅を目的に90℃で10分以上の加熱殺菌が求められる。また、殺菌後の二次汚染が生じないように包装後の加熱殺菌が推奨されている(Food Standards Agency, 2020)。

第2節で得た結果から、低温増殖性の*Paenibacillus*属細菌や*Bacillus*属細菌の芽胞は、90℃で10分間の加熱殺菌では殺菌前の芽胞数が多い場合には食品中に生残することが示唆された。すなわち、MAP製品の微生物制御を検討する上では、ガス置換雰囲気における*Paenibacillus*属細菌や*Bacillus*属細菌の増殖も理解する必要がある。そこで本節では、窒素、二酸化炭素およびその混合ガスを用いたガス置換雰囲気における*Paenibacillus*属細菌および*Bacillus*属細菌の増殖について検討した。

試料および方法

1-4-1. 供試菌株

予備実験で10℃において増殖することを確認した*Paenibacillus*属細菌3種11菌株お

よび *Bacillus* 属細菌 4 種 36 菌株およびを用いた (Table 1-4-2)。以降の試験には、各供試菌株を TSB に接種し、30 °C で 24 時間培養した菌液を用いた。

1-4-2. 供試ガス

窒素 (N₂/CO₂ 混合比率: 100/0, 純度: > 99.99995 %, 大陽日酸), 二酸化炭素 (N₂/CO₂: 0/100, 純度: > 99.995 %, 大陽日酸) および窒素と二酸化炭素の混合ガス 3 種類 (N₂/CO₂: 75/25, 50/50, 25/75, いずれも大陽日酸) を用いた。

1-4-3. 芽胞形成菌のコロニー形成における雰囲気ガス組成の影響

滅菌シャーレ (φ 90 mm, 栄研化学) に標準寒天培地 (pH 7.0) 20 mL を注いで固化させた平板に菌液 10 μL を 1 株あたり 3 もしくは 6 箇所滴下した。滴下した菌液が培地に吸収されるまで室温で数分間放置した後、平板 6 枚 (うち 1 枚は後述する pH 測定用のブラック) を嫌気培養用パウチ袋 (A-94, 300 mm × 300 mm, 三菱ガス化学) に並べ入れ、卓上型自動真空包装機 (V-490G, チャンバー容積: 約 40 L, TOSEI) で各々のガスを封入した。すなわち、チャンバー内を真空度 99.0 % まで真空引きした後、注入圧 0.04 MPa で真空度 10.0 % までガスを注入して密封した。ガス置換包装した平板は、10 °C で 4 週間および 30 °C で 1 週間培養した。コロニー形成の有無は目視で判定し、1 箇所でもコロニー形成が認められた場合には陽性とみなした。なお、二酸化炭素を含むガスを封入した場合には、気相の二酸化炭素が培地に溶解することによる培地 pH の低下が想定された。そのため、pH 測定用の寒天平板に pH 試験紙 (MColorpHast, pH 4.0–7.0, メルク) の呈色面が培地と接触するように置き、菌液を接種した平板 5 枚と共にガス置換包装した。試験紙の呈色は、ガス置換包装直後と翌日に観察した。

また、種々の pH に調整した標準寒天平板の大気雰囲気での培養を対照とした。すなわち、5 N 塩酸で pH 調整した標準寒天培地 (pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 および 7.0) 20 mL で調製した平板にも同様に菌液を滴下し、大気雰囲気にて 10 °C で 4 週間および 30 °C で 1 週間培養してコロニー形成の有無を目視で判定した。ガス置換包装した寒天平板と同様に pH 試験紙で培地 pH を確認したところ、pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 および 7.0 に調整した寒天平板は、それぞれ pH 4.4–4.7, 5.0–5.3, 5.5–5.8, 5.8–6.1 および 7.0 を指示する呈色を示した。

1-4-4. ガス組成分析

寒天平板をガス置換包装した直後のヘッドスペースのガス組成をガスクロマトグラフ (GC-15A, 島津製作所) で分析した。ガス採取時にガス漏れ, 空気の混入がないようにパウチ袋表面に粘着ゴム (RG-1, 飯島電子工業) を貼り付け, ガスタイトシリンジ (IMR-VLL-GT, Trajan) で 0.5 mL を採取した。ガスクロマトグラフでの分析条件は以下の通りとした。カラム: パックドカラム (WG-100, ジーエルサイエンス); キャリアガス: ヘリウム, 流速: 20 mL/min; 検出器: TCD 120 mA, カラム温度: 50 °C; 試料容量: 0.5 mL。各ガスの濃度は, 標準ガスを分析したときの各クロマトグラムのピーク面積比より算出した。

結果および考察

1-4-1. ガス置換包装したときの雰囲気ガス組成と培地 pH

5種類的气体 (N_2/CO_2 : 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 および 0/100) でガス置換包装したパウチ内のヘッドスペースガス組成および培地 pH は Table 1-4-1 に示した。いずれのガスで注入したときも O_2 は 1-2 % 残存したが概ね注入ガスの組成と一致した。pH 試験紙で判定した培地 pH は、10 °C 培養では pH 6.5-7.0 (N_2/CO_2 : 100/0), 5.5 (75/25), 5.3-5.5 (50/50), 5.0-5.3 (25/75) および 4.7-5.0 (0/100) であり、30 °C 培養では pH 6.5-7.0 (100/0), 5.5-5.8 (75/25), 5.5 (50/50), 5.3-5.5 (25/75) および 5.0-5.3 (0/100) であった (Table 1-4-1)。

1-4-2. *Bacillus* 属細菌のコロニー形成

供試菌株を接種した標準寒天平板培地を N_2/CO_2 混合比率が 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 および 0/100 のガスでガス置換包装し、10 °C で 4 週間および 30 °C で 1 週間培養した時の *Bacillus* 属細菌 36 菌株のコロニー形成を Table 1-4-2 に示した。10 °C で 4 週間培養した時には、 N_2/CO_2 混合比率が 100/0, 75/25 および 50/50 のガスで置換した場合には、それぞれ 30 菌株、16 菌株および 2 菌株がコロニーを形成した。一方、 N_2/CO_2 混合比率が 25/75 および 0/100 の場合には、いずれの菌株でもコロニーを形成しなかった。また、30 °C で 1 週間培養した時には、 N_2/CO_2 混合比率が 100/0 のガスで置換した場合には 36 菌株がコロニーを形成し、混合比率を 75/25, 50/50, 25/75 および 0/100 にしても *B. simplex* を除くほぼ全ての菌株がコロニーを形成した。しかし *B. simplex* は、混合比率が 75/25 のガスで置換した場合には 2 菌株しかコロニーを形成せず、混合比率が 50/50, 25/75 および 0/100 のガスで置換した場合にはコロニーを形成した菌株はなく、10 °C 培養のときと同様の結果であった (Table 1-4-2)。

pH 調整した標準寒天平板培地に供試菌株を接種し、大気雰囲気、10 °C、4 週間および 30 °C、1 週間培養した時の *Bacillus* 属細菌のコロニー形成を Table 1-4-3 に示した。10 °C で 4 週間培養した時には、pH 5.5 の平板培地では 32 菌株がコロニーを形成したが、pH 5.0 および 4.5 の平板培地ではそれぞれ 12 菌株および 2 菌株しかコロニーを形成しなかった。一方、30 °C で 1 週間培養した時には、pH 4.5 の平板培地でも 33 菌株がコロニーを形成した (Table 1-4-3)。

気相を CO₂ と O₂ でガス置換して 30 °C で培養した時の *Bacillus* 属細菌のコロニー形成について、CO₂濃度の増加に伴いコロニー直径は小さくなるが、コロニー数は変化しないことが報告されている(荻原ら, 1993)。また、CO₂比率が 60 %以上のガスで気相を置換すると、*B. subtilis* や *B. weihenstephanensis* の冷蔵温度帯での増殖が抑制されることが報告されている(藤井ら, 1993; Thorsen et al., 2009)。本研究においても、ガス置換包装した平板培地を 30 °C で培養した時には、気相を CO₂ ガスで置換した場合でも *B. simplex* を除くほぼ全ての菌株がコロニーを形成した。また、10 °C で培養した時には N₂ ガスで置換した場合では 36 菌株のうち 30 菌株がコロニーを形成した一方で、置換するガスの CO₂ 比率が 50 %以上になるとほとんどの菌株がコロニーを形成しなかった。これらの結果は、従来の報告と類似した傾向であった。したがって、*Bacillus* 属細菌の増殖抑制を目的とした N₂ や CO₂ を使った MAP は、30 °C ではほとんど効果を得られないが、10 °C では CO₂ 比率が 50 %以上のガスを封入することによって増殖抑制効果が得られる可能性が示唆された。

1-4-3. *Paenibacillus* 属細菌のコロニー形成

供試菌株を接種した標準寒天平板培地を N₂/CO₂ 混合比率が 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 および 0/100 のガスでガス置換包装し、10 °C で 4 週間および 30 °C で 1 週間培養した時の *Paenibacillus* 属細菌 11 菌株のコロニー形成を Table 1-4-4 に示した。10 °C で 4 週間培養した時には、N₂/CO₂ 混合比率が 100/0 のガスで置換した場合では 11 菌株がコロニーを形成し、混合比率が 75/25, 50/50 および 25/75 のガスで置換した場合でも *P. polymyxa* JCM2507^T を除く 10 菌株がコロニーを形成した。混合比率が 0/100 のガスで置換した場合には、*P. polymyxa* JCM2507^T に加えて *P. odorifer* もコロニーを形成しなかった。また、30 °C で 1 週間培養した時には、*P. polymyxa* JCM2507^T は全てのガス置換包装条件でコロニーを形成し、*P. odorifer* は混合比率が 0/100 のガスで置換した場合以外の条件ではコロニーを形成した (Table 1-4-4)。

pH 調整した標準寒天平板培地に供試菌株を接種し、大気雰囲気、10 °C、4 週間および 30 °C、1 週間培養した時の *Paenibacillus* 属細菌のコロニー形成を Table 1-4-5 に示した。10 °C で 4 週間培養した時には、pH 5.5 の平板培地では全ての菌株がコロニーを形成したが、pH 5.0 および 4.5 の平板培地では、それぞれ *P. odorifer* 2 菌株および *P. odorifer* 3 菌株と *P. polymyxa* JCM2507^T がコロニーを形成しなかった。一方、30 °C で 1 週間培養した時

には、pH 4.5 の平板培地でも全ての菌株がコロニーを形成した (Table 1-4-5)。

ガス置換雰囲気における *Paenibacillus* 属細菌の増殖はこれまでに報告されていない。前項において、10 °C での培養では CO₂ 比率が 50 %以上のガス置換雰囲気ではコロニーを形成する *Bacillus* 属細菌が著しく減少することを明らかにしたが、*Paenibacillus* 属細菌は同条件下でもコロニーを形成し、*Bacillus* 属細菌よりも高濃度の CO₂ ガス雰囲気に対する高い抵抗性が明らかになった。*Paenibacillus* 属細菌が 10 °C での CO₂ ガス雰囲気に対して抵抗性が高いことは、*Paenibacillus* 属細菌が低温ストレスに強いことに関連していると推察された。すなわち、細菌の増殖抑制に対する CO₂ の作用は、気相から溶媒への CO₂ 溶解による pH 低下や、細胞内に侵入した CO₂ が H₂CO₃ となり H⁺を放出してプロトンポンプを駆動させることによる ATP の枯渇であると提唱されており、培養温度の影響も大きいと言われている (木村・藤井, 1996)。一般的な細菌のストレス応答として、低温に曝されると細胞膜中の不飽和脂肪酸比率を上げて細胞膜の流動性を高め、弱酸や低 pH に曝されると細胞膜中の不飽和脂肪酸比率を下げて細胞膜の流動性を低下させる (Beales, 2004)。すなわち、低温ストレスと弱酸および低 pH ストレスに対する細菌のストレス応答は対極にある。細菌の増殖抑制に対する CO₂ の作用機作から、高濃度の CO₂ ガスに曝されることが、弱酸や低 pH に曝されることと同義であると考え、低温ストレスがその効果を高めることは妥当である。大気雰囲気での培養でコロニー形成が認められた培地 pH を培養温度で比較すると、*Bacillus* 属細菌のほとんどの菌株は、30 °C よりも 10 °C で培養した時にその下限 pH は高くなった (Table 1-4-3)。一方、*Paenibacillus* 属細菌の多くの菌株は、10 °C で培養してもコロニー形成が認められた培地 pH に変化はなかった (Table 1-4-5)。ガス置換雰囲気で培養した時も、*Bacillus* 属細菌では 10 °C で培養した時にはコロニー形成阻害が認められたが、*Paenibacillus* 属細菌では *P. polymyxa* JCM2507^T 以外には培養温度の影響は観察されなかった (Table 1-4-2 および 1-4-4)。すなわち、*Bacillus* 属細菌よりも *Paenibacillus* 属細菌の方が低温ストレスに対して強いこと明らかになった。

また、大気雰囲気とガス置換雰囲気における 10 °C でのコロニー形成を培地 pH に着目して比較すると、*Bacillus* 属細菌は、塩酸で pH 5.5 および 5.0 に調整した平板培地ではそれぞれ 32 菌株および 12 菌株でコロニー形成が認められたが、N₂/CO₂ 混合比率が 75/25 および 50/50 のガスで置換した平板培地では、それぞれ 16 菌株および 2 菌株しかコロニー形成が認められなかった (Table 1-4-2 および 1-4-3)。当該条件における平板培地の pH は、そ

れぞれ pH 5.5 および pH 5.3–5.5 であったことから、ガス置換雰囲気下での培養では、大気雰囲気下での培養よりもコロニーを形成する培地 pH の下限が高くなった。一方、*Paenibacillus* 属細菌の中でこのような傾向が観察されたのは *P. polymyxa* JCM2507^T だけであった (Table 1-4-4 および 1-4-5)。このことは、低温ストレスに強い *Paenibacillus* 属細菌は、*Bacillus* 属細菌と比較して低温下でも pH ストレスや弱酸ストレス、気相の低酸素ストレスにも強いことを示唆している。すなわち、*Paenibacillus* 属細菌は有機酸で pH 調整した製品や真空包装した製品などで *Bacillus* 属細菌よりも増殖する可能性が高いと推察された。これらのことから、N₂、CO₂ およびその混合ガスによるガス置換包装では *Paenibacillus* 属細菌が増殖する可能性が高く、*P. polymyxa* や *P. terrae* が加熱殺菌条件や静菌剤の処方などの制御方法を検討するための指標になると考えられる。

Table 1-4-1. Headspace gas analyses and medium pH of agar plates packed with N₂, CO₂, or mixed gases.

Injected gas ^a (N ₂ /CO ₂)	Headspace gas composition (%) ^a			medium pH ^d	
	N ₂	CO ₂	O ₂	10 °C	30 °C
100/ 0	96.2 ± 2.3 ^b	ND ^c	1.4 ± 0.2	6.5–7.0	6.5–7.0
75/ 25	76.6 ± 0.8	23.0 ± 0.8	1.7 ± 0.3	5.5	5.5–5.8
50/ 50	53.1 ± 2.8	47.3 ± 2.9	1.4 ± 0.5	5.3–5.5	5.5–5.8
25/ 75	29.8 ± 0.3	73.1 ± 2.1	1.9 ± 0.3	5.0–5.3	5.5
0/100	4.5 ± 0.9	92.3 ± 1.8	1.7 ± 0.9	4.7–5.0	5.0–5.3

^aCalculated from peak area of standard gases.

^bMeans ± standard error.

^cNot detected.

^dDetermined with pH test strips.

Table 1-4-2. Colony forming ability of *Bacillus* spp. in modified atmosphere with N₂ and CO₂ gases.

Tested strain	Incubated at 10 °C for 4 weeks					Incubated at 30 °C for 1 week				
	Injected gas (N ₂ /CO ₂)					Injected gas (N ₂ /CO ₂)				
	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
<i>B. cereus</i> group										
NBRC3003 (<i>B. cereus</i>)	+ ^a	+	-- ^b	—	—	+	+	+	+	+
NBRC15305 ^T (<i>B. cereus</i>)	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
NBRC13690 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118482 (<i>B. cereus</i>)	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118519 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118524 (<i>B. cereus</i>)	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118525 (<i>B. cereus</i>)	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118590 (<i>B. cereus</i>)	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118591 (<i>B. cereus</i>)	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118598 (<i>B. cereus</i>)	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118601 (<i>B. cereus</i>)	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118607 (<i>B. cereus</i>)	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
NBRC101235 ^T (<i>B. thuringiensis</i>)	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
NBRC101238 ^T (<i>B. weihenstephanensis</i>)	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.1071	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
No.1072	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.10711	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.10810	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.1093	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.1099	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.2611	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
No.2625	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>B. megaterium</i>										
NBRC15308 ^T	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
No.17	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
No.19	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
No.1081	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i>										
NBRC12092 ^T	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.2	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.956	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.1082	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
No.2927	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>B. simplex</i>										
JCM12307 ^T	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
No.10	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
No.433	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—
No.1077	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—
No.2923	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—

^aColony formation was observed in one at least among three or six points where the culture of tested strain was dropped.

^bNo colony formation was observed in all three or six points where the culture of tested strain was dropped.

Table 1-4-3. Colony forming ability of *Bacillus* spp. on agar plates incubated in the atmosphere.

Tested strain	Incubated at 10 °C for 4 weeks					Incubated at 30 °C for 1 week			
	Medium pH					Medium pH			
	7.0	6.0	5.5	5.0	4.5	6.0	5.5	5.0	4.5
<i>B. cereus</i> group									
NBRC3003 (<i>B. cereus</i>)	+ ^a	+	+	+	— ^b	+	+	+	+
NBRC15305 ^T (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	+	—	+	+	+	+
NBRC13690 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	+	—	+	+	+	+
MAFF118482 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
MAFF118519 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
MAFF118524 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
MAFF118525 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
MAFF118590 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
MAFF118591 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
MAFF118598 (<i>B. cereus</i>)	+	+	—	—	—	+	+	+	+
MAFF118601 (<i>B. cereus</i>)	+	+	—	—	—	+	+	+	+
MAFF118607 (<i>B. cereus</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
NBRC101235 ^T (<i>B. thuringiensis</i>)	+	+	+	+	—	+	+	+	+
NBRC101238 ^T (<i>B. weihenstephanensis</i>)	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.1071	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1072	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.10711	+	+	+	—	—	+	+	+	—
No.10810	+	+	+	+	—	+	+	+	+
No.1093	+	+	+	+	—	+	+	+	+
No.1099	+	+	+	+	—	+	+	+	+
No.2611	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.2625	+	—	+	—	—	+	+	+	+
<i>B. megaterium</i>									
NBRC15308 ^T	+	—	—	—	—	+	+	+	—
No.17	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.19	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.1081	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i>									
NBRC12092 ^T	+	+	—	—	—	+	+	+	+
No.2	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.956	+	+	+	+	—	+	+	+	+
No.1082	+	—	+	+	—	—	+	+	+
No.2927	+	+	+	—	—	+	+	+	+
<i>B. simplex</i>									
JCM12307 ^T	+	+	+	—	—	+	+	—	—
No.10	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.433	+	+	+	—	—	+	+	—	+
No.1077	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.2923	+	+	+	—	—	+	+	+	+

^aColony formation was observed in one at least among three or six points where the culture of tested strain was dropped.

^bNo colony formation was observed in all three or six points where the culture of tested strain was dropped.

Table 1-4-4. Colony forming ability of *Paenibacillus* spp. in modified atmosphere with N₂ and CO₂ gases.

Tested strain	Incubated at 10 °C for 4 weeks					Incubated at 30 °C for 1 week				
	Injected gas (N ₂ /CO ₂)					Injected gas (N ₂ /CO ₂)				
	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
<i>P. odorifer</i>										
JCM13339	+ ^a	+	+	+	- ^b	+	+	+	+	-
JCM21743 ^T	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
No.3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>P. polymyxa</i>										
JCM2507 ^T	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
JCM20106	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM20385	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1095	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. terrae</i>										
JCM11466 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^aColony formation was observed in one at least among three or six points where the culture of tested strain was dropped.

^bNo colony formation was observed in all three or six points where the culture of tested strain was dropped.

Table 1-4-5. Colony forming ability of *Paenibacillus* spp. on agar plates incubated in the atmosphere.

Tested strain	Incubated at 10 °C for 4 weeks					Incubated at 30 °C for 1 week			
	Medium pH					Medium pH			
	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0	4.5	5.0	5.5	6.0
<i>P. odorifer</i>									
JCM13339	+ ^a	+	+	— ^b	—	+	+	+	+
JCM21743 ^T	+	+	+	—	—	+	+	+	+
No.3	+	+	+	+	—	+	+	+	+
<i>P. polymyxa</i>									
JCM2507 ^T	+	+	+	+	—	+	+	+	+
JCM20106	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM20385	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1095	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. terrae</i>									
JCM11466 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^aColony formation was observed in one at least among three or six points where the culture of tested strain was dropped.

^bNo colony formation was observed in all three or six points where the culture of tested strain was dropped.

第2章 低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌の制御方法の検討

第1章では、冷蔵保存したホワイトアスパラガス水煮で *Paenibacillus* 属細菌が増殖した事例を始まりに、低温増殖性の *Paenibacillus* 属細菌および *Bacillus* 属細菌の冷蔵温度帯での増殖能力や芽胞の耐熱性、硬質表面への芽胞の付着性、ガス置換雰囲気での増殖を明らかにした。明らかにした諸特性からは、*Paenibacillus* 属細菌は原材料だけでなく、加工機器や調理器具等に付着しやすく、製造環境からも製品に混入する可能性があることや、加熱殺菌後も製品に生残した場合には、冷蔵保存中に増殖する可能性の高いことが推察された。すなわち、要冷蔵加工食品の保存性向上には *Paenibacillus* 属細菌の制御が重要である。

低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌には、pH 5 以下や 6°C 以下でも増殖するものが多く、さらに低温で増殖可能なものの中には耐熱性の高い芽胞を形成する菌株が存在することが第1章で明らかになった。そのため、*Paenibacillus* 属細菌の制御を目的として、pH 調整や低温管理、加熱殺菌などの微生物制御を単独で施すと、制御には高い強度が必要となる。pH 調整や加熱殺菌の強度が高くと、加工食品の風味や食感、色調などの品質低下が懸念される。したがって、良好な品質を特徴とする要冷蔵加工食品における *Paenibacillus* 属細菌の制御に必要な条件は可能な限り穏和にしなければならない。

第2章では、製品ならびに原材料や製造機器等の洗浄・殺菌工程中での *Paenibacillus* 属細菌の制御を想定し、有機酸と加熱処理の併用ならびに次亜塩素酸ナトリウム溶液処理による制御を検討した。第1節では、冷蔵保存するポテトペーストにおける *Paenibacillus* 属細菌の増殖抑制について、有機酸による pH 調整と加熱処理の併用効果を検討した。第2節では、*Paenibacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液処理の影響を検討した。

第1節 有機酸による pH 調整と加熱処理の併用による *Paenibacillus* 属細菌の増殖抑制

pH や水分活性の調整, 低温管理, 加熱殺菌, 日持ち向上剤に代表される抗菌性物質の添加などの様々な微生物制御因子は, 適切に併用すると各々の単独処理時よりも各強度を低くしても目的微生物を制御できる。この技術は, 各微生物制御因子をハードルに見立てハードルテクノロジーと呼ばれている (Leistner, 2000)。この場合, 各微生物制御因子の強度は単独処理時よりも低強度であるため, 品質への影響を少なくすることができる。例えば, フラットサワー変敗菌と呼ばれる高温性の芽胞形成菌は芽胞の耐熱性が極めて高いため, 加熱殺菌だけで制御しようとするると極めて過酷な条件が必要となり, 製品の品質が大きく毀損される。そのため, 抗菌効果を持つ食品用乳化剤を併用し, より穏和な条件で制御されている (諏訪ら, 1988)。

低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌の制御について, 第1章で明らかにした諸特性から, pH 調整や加熱殺菌の単独処理では有効な制御を行うためには高い強度が必要であり, 要冷蔵加工食品の品質低下が懸念される。一方, 低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌については, これまでに増殖特性や芽胞の耐熱特性は明らかにされている (Helmond et al., 2017; Hamasaki et al., 2006; 稲津ら, 2017) が, 具体的な制御方法の検討はなされていない。

そこで本節では, 加工食品の pH 調整に用いる有機酸に着目し, *Paenibacillus* 属細菌の増殖抑制における有機酸と加熱処理の効果を検討した。

試料および方法

2-1-1. 供試菌株

Paenibacillus sp. No.1 (第1章1節ホワイトアスパラガス水煮正常品由来), *P. terrae* No.9 (第1章1節ホワイトアスパラガス水煮変敗品由来) および *P. terrae* JCM11466^T を用いた。

2-1-2. 芽胞懸濁液の調製

芽胞懸濁液は, 試料および方法 1-2-2 と同様の方法で調製し, 以後の実験に供した。

2-1-3. pH 調整用酸溶液の調製

クエン酸, 乳酸, 酢酸および塩酸 (いずれも特級, 富士フィルム和光純薬) を用いた。有機酸は 2 M, 塩酸は 5 M に調製した後にフィルター (SLGV033RS, Merck Millipore) で濾過滅菌した。

2-1-4. 有機酸の増殖抑制効果

有機酸の増殖抑制効果は, 種々の有機酸で pH 調整した培地において細菌の増殖が抑制される pH を比較した山本らの報告 (1984) に従い, pH 調整用酸溶液で pH 調整した培地における各菌株の増殖が抑制される pH を調べた。48 穴マイクロプレートの各ウェルに pH 4.4, 4.7, 5.0, 5.3, 5.6, 5.9 および 6.2 に調整した普通ブイヨン培地を 990 μ L 分注し, 5 log spores/mL となるように芽胞懸濁液を 10 μ L 接種した。プレートは 10 $^{\circ}$ C で 56 日間ならびに 30 $^{\circ}$ C で 28 日間培養し, 培地の濁りの有無を経日的に目視観察した。各条件 3 ウェルに芽胞懸濁液を接種し, 全てのウェルで濁りが生じなかった最も高い pH を評価した。

2-1-5. ジャガイモペーストにおける有機酸の増殖抑制効果

試料には, pH 調整用酸溶液で pH 4.8, 5.1 および 5.4 に調整したジャガイモペースト (ベジペースト, pH 5.7, 日本製粉) を用いた。樹脂製透明パウチ [180 mm \times 250 mm, 酸素透過性: 15 mL/m²·day·MPa (未処理時の理論値), 大日本印刷] に試料を 50 g 充填した後, 芽胞懸濁液を 3 log spores/g となるように 50 μ L 接種して真空包装機 (V-490G) で密封 (真空度: 99.0 %) した。芽胞接種試料はよく混和した後, 10 $^{\circ}$ C で 14 日間および 28 日間保存し, 生菌数を測定した。生菌数測定を行う時は, 試料内の菌数分布を均一にするためによく混和した後, 開封して 25 g を無菌的にフィルター付ストマックバッグ (PX0020P, エルメックス) に採取した。9 倍重量の滅菌生理食塩水を加えてストマッカー (BagMixer 400) でストマッキング (480 rpm 60 秒間) して 10 倍希釈乳剤を調製した。同希釈液で 10 倍希釈乳剤を適宜 10 倍希釈した後, 標準寒天平板培地に塗抹し, 30 $^{\circ}$ C で 2 日間培養して生菌数を求めた。

2-1-6. pH 調整したジャガイモペーストの酸味評価

pH 未調整のジャガイモペーストの酸味を基準 (全く感じない) として, 2 M クエン酸, 乳酸および酢酸で pH 4.8, 5.1 および 5.4 に調整したジャガイモペーストの酸味を 4 段階

(1: 全く感じない, 2: 少し感じる, 3: かなり感じる, 4: 非常に感じる) で評価した。また, 酸味の許容範囲を測るため, 各ペーストの酸味について, 「許容できる」, 「許容できない」を回答した。パネルは (地独) 北海道立総合研究機構食品加工研究センターの研究職員とした。

2-1-7. ジャガイモペーストにおける芽胞の耐熱性測定

2 M クエン酸で pH 5.4 および 5.1, 2 M 乳酸で pH 5.4 に調整したジャガイモペースト 50 g を樹脂製透明パウチに充填し, 芽胞懸濁液を 6 log spores/g となるように 50 μ L 接種して前述の 4 項と同様に密封してよく混和した。包装したジャガイモペーストは, ポリエチレングリコール (KO10002000) を満たしたオイルバス (設定温度: 92.5 $^{\circ}$ C; ヒーター: TR-4AR; 水槽: SB-24) に浸漬して 10–45 分間加熱した。加熱後は直ちに氷冷して標準寒天培地を用いた混釈平板培養法 (30 $^{\circ}$ C, 2–3 日間) で生残芽胞数を測定した。芽胞数測定用の試料は前述の 4 項と同様に調製した。

2-1-8. ジャガイモペーストにおける有機酸の増殖抑制効果に対する加熱処理の影響

2 M クエン酸で pH 5.4 および 5.1, 2 M 乳酸で pH 5.4 に調整したジャガイモペースト 50 g を樹脂製透明パウチに充填し, 芽胞懸濁液を 3 log spores/g となるように 50 μ L 接種して前述の 4 項と同様に密封した。包装したジャガイモペーストは, 前項と同様にオイルバスに浸漬して 92.5 $^{\circ}$ C で 10–45 分間加熱した。加熱後は直ちに氷水冷して 10 $^{\circ}$ C で保存した。7, 14, 21 および 28 日間保存後に試料を抜き取り, 標準寒天平板培地を用いた表面塗抹培養法 (30 $^{\circ}$ C, 2–3 日間) で生菌数を測定した。生菌数測定用の試料は前述の 4 項と同様に調製した。

結果および考察

2-1-1. 有機酸で pH 調整したときの *Paenibacillus* 属細菌の増殖抑制 pH

有機酸で pH 調整した液体培地において, *Paenibacillus* 属細菌 3 菌株の増殖が抑制された pH を Table 2-1-1 に示した。30 °C で 28 日間および 10 °C で 56 日間の培養で増殖が抑制された pH を有機酸毎に比較すると, クエン酸調整ではそれぞれ pH 4.4–4.7 および 4.7–5.0, 乳酸調整では pH 4.4–4.7 および 4.7–5.3, 酢酸調整では pH 4.7–5.0 および 5.3–5.6, 塩酸調整では pH 4.4 未満–4.4 および 4.4–5.0 であり, 30 °C で培養した場合よりも 10 °C で培養した場合に増殖が抑制される pH は 0.3–0.6 高かった。また, 10 °C で 56 日間の培養で増殖が抑制された pH を菌株毎に比較すると, *P. terrae* No.9 は *P. terrae* JCM11466^T と比べていずれの酸で調整した場合でも 0.3–0.6 低く, *Paenibacillus* sp. No.1 と比べても乳酸調整で 0.3, 塩酸調整で 0.6 低く, 3 菌株の中で最も高い耐酸性を示した (Table 2-1-1)。

高い pH でも微生物の増殖を抑制する酸は抗菌力が強く, その強さは酢酸 > 乳酸 > クエン酸の順であると言われる (山本ら, 1984)。有機酸の抗菌力は, 非解離型分子として菌体内に侵入して菌体内の pH 低下やプロトンポンプの駆動によるエネルギー枯渇を惹起することで発揮されると考えられている (小磯, 2014)。そのため, 酸解離定数が大きい有機酸ほど高い pH でも非解離型分子の割合が大きく, 抗菌力を発揮する。抗菌力が酢酸 > 乳酸 > クエン酸の順と考えられるのは, 酢酸, 乳酸およびクエン酸の酸解離定数 (pKa) がそれぞれ 4.76, 3.86 および 3.09 であり, 同モル濃度であれば非解離型分子の割合が酢酸 > 乳酸 > クエン酸の順となるためである。本研究においても, 30 °C で培養した *P. terrae* No.9 の結果を除き, 増殖が抑制される pH は酢酸の場合が最も高かった。また, 増殖が抑制される pH は, 乳酸調整がクエン酸調整よりも高い傾向にあり, 塩酸調整の場合で最も低い傾向にあった。これまでの研究では, 酢酸で pH 調整した培地で *B. megaterium* や *B. cereus* を 30 °C で 5 日間培養すると pH 5.0–5.1 で増殖が抑制されたこと, 塩酸で pH 調整した培地で *P. odorifer* や *P. macquariensis*, *P. pabuli* を 7 °C で培養すると, pH 6.0 では増殖したが, pH 5.0 では増殖しなかったこと, *P. terrae* や *P. polymyxa* は 7–10 °C で培養する場合, pH 5.0 でも増殖したことが報告されている (青山・遠田, 2010; Helmond et al., 2017; 山本ら, 1984)。本研究で供試した *Paenibacillus* 属細菌も, 酢酸で pH を調整した培地で 30 °C で 7 日間培養すると pH 5.0–5.3 で増殖が抑制されており, 中温培養での有機酸による *Paenibacillus* 属

細菌の増殖抑制 pH は、*B. megaterium* や *B. cereus* と同程度であると推察された。また、10 °C で培養した *P. terrae* No.9 は、塩酸で pH 調整した培地では pH 4.7 でも増殖したため、他の低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌 (*P. odorifer* や *P. macquariensis*, *P. pabuli*) よりも耐酸性が高い菌株であることが明らかになった。

2-1-2. 有機酸で pH 調整したジャガイモペーストにおける *Paenibacillus* 属細菌の増殖

前項の試験で供試菌株の中で最も耐酸性が高いことが判明した *P. terrae* No.9 の芽胞を有機酸で pH 調整したジャガイモペーストに接種し、10 °C で 14 日間および 28 日間保存した場合の増殖挙動を Fig. 2-1-1 に示した。初発芽胞数は 3.1 log spores/g であった。pH 未調整のペースト (pH 5.7) を 14 日間保存した後の生菌数は 7.5 log CFU/g であった。また、クエン酸で pH 5.4 に調整したペーストも 14 日間保存後の生菌数は 7.1 log CFU/g であった。一方、クエン酸で pH 5.1 および 4.8 に調整したペーストを 14 日間保存した後の生菌数は、それぞれ 6.2 および 4.2 log CFU/g であり、pH 5.4 に調整したペーストよりも生菌数は少なかった。特に、pH 4.8 に調整したペーストの生菌数は、pH 5.4 および 5.1 に調整したペーストの生菌数と比較して有意に低かった (5 %水準, Tukey-Kramer 法)。さらに、pH 4.8 に調整したペーストでは 28 日間保存した後の生菌数も 5.5 log CFU/g と少なく、長期間保存後の生菌数にも増殖遅延が認められた。乳酸で pH 5.4 に調整したペーストでは、14 日間保存した後の生菌数は 7.1 log CFU/g であった。pH 5.1 に調整したペーストを 14 日間保存した後の生菌数は、pH 5.4 に調整したペーストと比較して有意に低い 4.9 log CFU/g であった (5 %水準, Tukey-Kramer 法) が、28 日間保存したときの生菌数は 6.4 log CFU/g に増加した。一方、乳酸で pH 4.8 に調整したペーストを 14 日間および 28 日間保存した後の生菌数は、いずれも 2.1 log CFU/g であり、*P. terrae* No.9 の増殖が抑制された。酢酸で pH 5.4, 5.1 および 4.8 に調整したペーストを 14 日間および 28 日間保存した後の生菌数は、それぞれ 3.4 および 3.0, 2.6 および 2.6, 2.1 および 2.3 log CFU/g であった。14 日間保存した pH 5.4 のペーストの生菌数 (3.4 log CFU/g) も初発芽胞数と有意な差はなく (5 %水準, Tukey-Kramer 法)、いずれのペーストでも *P. terrae* No.9 の増殖が抑制された。

クエン酸、乳酸ならびに酢酸で pH 調整した普通ブイヨン培地において、*P. terrae* No.9 の増殖が 10 °C で 28 日間抑制される pH は、それぞれ 4.7, 4.7 および 5.3 であった (Table 2-1-1)。10 °C で 28 日間保存したジャガイモペーストでは、*P. terrae* No.9 の増殖は乳酸調整

では pH 4.8, 酢酸調整では pH 5.4 で抑制され, 培地での結果と概ね一致した。また, クエン酸調整でも pH 4.8 では 14 日間は増殖が抑制されたことから, pH 4.7 を下回るように調整すれば 28 日間に亘る増殖抑制効果が得られると推察される。

2-1-3. ジャガイモペーストの酸味

pH 未調整のジャガイモペースト (pH 5.7) の酸味を基準 (全く感じない) として, クエン酸, 乳酸および酢酸で pH 4.8, 5.1 および 5.4 に調整したジャガイモペーストの酸味を評価したところ, いずれにおいても pH 低下に伴い酸味を強く感じる傾向が観察された。また, それぞれのペーストの酸味を許容できると判定したパネルは, いずれの有機酸でも pH 5.4 に調整したペーストが最も多く, pH 5.1 や 4.8 に調整したペーストでは半数以上のパネルが許容できる酸味ではないと判定した (Table 2-1-2)。

クエン酸は爽快な酸味, 乳酸はやや渋みを感じるが穏やかな酸味, 酢酸は刺激的な臭気があり, やや刺すような酸味が特徴である (食品化学新聞社, 2004)。前項の実験において, pH 調整のみで *P. terrae* No.9 の増殖を抑制でき, 風味への影響が小さいと考えられるのは, 酢酸で pH 5.4 に調整した場合のみであり, クエン酸や乳酸による pH 調整のみで *P. terrae* No.9 の増殖を抑制しようとするとう風味への影響は避けられない。すなわち, 風味への影響が小さいと考えられるクエン酸や乳酸で pH 5.4 に調整したペーストで *P. terrae* No.9 の増殖を抑制するためには, 別の微生物制御の併用が必要である。

2-1-4. ジャガイモペーストを加熱したときの *Paenibacillus* 属細菌芽胞の生残性

P. terrae No.9 を 6 log spores/g となるように接種したジャガイモペーストを 92.5 °C で 30 分間加熱したとき, pH 未調整 (pH 5.7) およびクエン酸もしくは乳酸で pH 5.4 に調整したペーストの生残芽胞数は, それぞれ 3.2, 2.2 および 2.0 log spores/g であり, pH 未調整のペースト (pH 5.7) と比較して pH 5.4 のペーストにおける生残芽胞数はいずれも有意に低下した (5 %水準, Dunnett 法)。各ペーストの生残芽胞数の推移を最小二乗法で線形回帰し, 回帰直線の傾きから算出した *P. terrae* No.9 芽胞の $D_{92.5^{\circ}\text{C}}$ は, pH 未調整のペースト (pH 5.7) では 10.6 分, クエン酸および乳酸で pH 5.4 に調整したペーストでは, それぞれ 8.4 分および 7.2 分であった (Fig. 2-1-2)。すなわち, クエン酸もしくは乳酸でジャガイモペーストの pH を 0.3 ユニット低下させることによって, 一定芽胞数まで低減するために必要な

加熱処理時間を 20-30 %短縮できることが示唆された。このことから、風味への影響が小さいと考えられるクエン酸や乳酸で pH 5.4 に調整したペーストで *P. terrae* No.9 の増殖を抑制するためには、短時間の加熱処理の併用が効果的な手段の一つとして期待された。

pH を酸性にすることによる加熱時の芽胞の死滅促進は、*C. sporogenes* や *G. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *P. polymyxa* といった様々な芽胞形成菌で観察されている (Cameron et al., 1980; Casadei et al., 2000; López et al., 1996; Palop et al., 1999b)。本研究においても、*P. terrae* No.9 の芽胞だけでなく、第 1 章 1 節では *Paenibacillus* sp. No.1 の芽胞について同様の挙動を観察した。酸性環境下での加熱によって芽胞の死滅が促進される機作は明らかにされていない。Casadei ら (2000) は、コルテックス層のカルボキシ基のプロトン化が進み、芽胞内部に水が侵入することや芽胞中の二価イオンがプロトンと置換されることが耐熱性低下の要因と考えている。特に、二価イオンの中でもカルシウムイオンは芽胞の堅牢性に関与するため、カルシウムイオンが置換されることで芽胞の構造が脆弱になり耐熱性が低下すると考察している。山本ら (1990) は低 pH 環境での耐熱性には耐酸性が影響すると推察している。酸性環境が増殖至適である好熱性好酸性菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) の芽胞は、pH 3.0-8.0 や pH 2.3-5.3 の環境下で加熱しても生残芽胞数に差が生じない (小林・青山, 2014; Murakami et al., 1998) ことから、山本らの推察は支持できる。本実験において生残性を評価しなかった 2 菌株のうち、*P. terrae* JCM11466^T は各種酸で pH 調整した培地における増殖抑制 pH が *P. terrae* No.9 と比較して 0.3-0.6 高く、相対的に耐酸性が低いと推察された。すなわち、同様の条件で *P. terrae* JCM11466^T の生残性を調べると、*P. terrae* No.9 よりも速やかに生残芽胞数が低減すると推測される。初発芽胞数が低減すると一定菌数に到達するまでの培養期間は長くなる。加工食品においては保存期間の延長につながることから、短時間で芽胞数が低減する有機酸による pH 調整と加熱処理の併用は、要冷蔵加工食品の保存期間延長のための有効な手段と推察された。

2-1-5. ジャガイモペーストにおける *Paenibacillus* 属細菌の増殖に対する有機酸による pH 調整と加熱処理の併用効果

P. terrae No.9 の芽胞を接種したジャガイモペーストを加熱処理後に 10 °C で保存した時の生菌数変化を Table 2-1-3 に示した。低温殺菌した加工食品は、生菌数が 10⁶ CFU/g 以

上で腐敗とみなされる (Helmond et al., 2017)。そこで、ジャガイモペーストの保存性 (可食期間) を生菌数が $6 \log \text{CFU/g}$ 以上となった時を指標に比較した。pH 未調整のペースト (pH 5.7) では、非加熱の場合には可食期間は 7 日間未満であったのに対して、 92.5°C で 15 分間および 30 分間加熱した場合の可食期間は、それぞれ 14 日間未満および 21 日間未満であった。また、45 分間加熱した場合は、28 日間保存しても生菌数は検出限界 ($2.0 \log \text{CFU/g}$) 未満であったことから可食期間は 28 日間以上と評価された。クエン酸で pH 5.4 に調整したペーストの可食期間は、非加熱の場合は 7 日間未満であったのに対して、 92.5°C で 10 分間および 20 分間加熱した場合は、それぞれ 14 日間未満および 28 日間未満であった。30 分間加熱した場合は、28 日間保存しても生菌数は検出限界未満となり、可食期間は 28 日間以上であった。また、pH 5.1 に調整したペーストでは、非加熱の場合の可食期間は 14 日間未満であったのに対して、 92.5°C で 10 分間加熱した場合は 21 日間未満と評価され、20 分間加熱した場合は 28 日間保存しても生菌数は検出限界未満となり可食期間は 28 日間以上であった。乳酸で pH 5.4 に調整したペーストの可食期間は、非加熱の場合は 7 日間未満であったのに対して、 92.5°C で 10 分間加熱した場合は 14 日間未満、20 分間加熱した場合は 28 日間保存後の生菌数は検出限界未満となり、可食期間は 28 日間以上であった。すなわち、いずれのペーストにおいても 92.5°C での加熱時間を 10–15 分間延長すれば、*P. terrae* No.9 の初発生残芽胞数の減少に伴い、可食期間が 1–2 週間延長されることが明らかになった。また、28 日間以上の可食期間を維持するためには、pH 未調整のペースト (pH 5.7) では 92.5°C で 45 分間の加熱が必要であったが、クエン酸や乳酸で pH をわずかに 0.3 ユニットの低下に調整すれば、それぞれ 92.5°C で 30 分間および 20 分間の加熱で 28 日間以上の可食期間を維持できることが明らかとなった。

クエン酸もしくは乳酸で pH 5.1 および 5.4 に調整したペーストにおいて、pH 未調整のペースト (pH 5.7) よりも短時間の加熱処理で 28 日間にも亘って生菌数増加が抑制されたことは、加熱処理による芽胞の死滅が pH の影響を受けて促進されたことに起因すると推察される。そこで、生菌数増加が 28 日間抑制された条件について、前項で明らかにした *P. terrae* No.9 芽胞の D 値からパウチ 1 袋あたりの生残芽胞数を算出したところ、各実験条件の生残芽胞数に 1 桁以上の差があると推定された。すなわち、pH 未調整のペースト (92.5°C , 45 分間加熱) では $0.5 \log \text{spores/パウチ}$ 、クエン酸で pH 5.4 に調整したペースト (92.5°C , 30 分間加熱) では $1.1 \log \text{spores/パウチ}$ 、乳酸で pH 5.4 に調整したペースト

(92.5 °C, 20 分間加熱) では 1.9 log spores/パウチであった。また, 乳酸で pH 5.4 に調整したペーストを 20 分間加熱したときの生残芽胞数は, pH 未調整のペーストを 30 分間加熱したときの生残芽胞数 (1.9 log spores/パウチ) と同水準であった。しかし, 前者の生菌数は 28 日間保存しても検出限界未満であったが, 後者の生菌数は 14 日間保存したときには 5.1 log CFU/g まで増加し, 加熱直後の生残芽胞数が同水準であっても保存中における *P. terrae* No.9 の生菌数の推移は異なるものであった。一定強度の加熱処理を受けた細菌芽胞は, 低 pH や低水分活性などストレスに対する感受性が高まり, 至適環境で培養した時と比較して生菌数が低くなることがある (Cazemier et al., 2001; Coroller et al., 2001; Mtimet et al., 2016)。本研究においても, *Paenibacillus* sp. No.1 の加熱後芽胞について, 至適条件で培養した場合と比較して低 pH や低温環境で培養した場合に生菌数の低下を観察した (第 1 章 1 節 5 項)。すなわち, 有機酸で pH を調整した場合に pH 未調整の場合よりも短時間の加熱処理で *P. terrae* No.9 の増殖が抑制されたことは, 酸性下での加熱で芽胞の死滅が促進されるだけでなく, 生残した芽胞の発芽や発芽後増殖の時の栄養要求性の変化や, pH や有機酸などに対する感受性の変化によって発芽ならびに発芽後増殖が遅延または抑制されたためと推察された。

Table 2-1-1. Growth inhibitory pH of *Paenibacillus* spp. in nutrient broth adjusted with various acids.

Tested strain	Acid	Growth inhibitory pH ^a					
		Incubation days at 30 °C			Incubation days at 10 °C		
		7	14	28	14	28	56
<i>Paenibacillus</i> sp. No.1	Citric acid	4.7	4.7	4.4	4.7	4.7	4.7
	Lactic acid	4.7	4.7	4.4	5.0	5.0	5.0
	Acetic acid	5.0	5.0	5.0	5.3	5.3	5.3
	Hydrochloric acid	4.4	4.4	<4.4 ^b	5.0	5.0	5.0
<i>P. terrae</i> No.9	Citric acid	4.7	4.7	4.4	4.7	4.7	4.7
	Lactic acid	4.7	4.7	4.7	5.0	4.7	4.7
	Acetic acid	5.0	5.0	4.7	5.6	5.3	5.3
	Hydrochloric acid	4.4	4.4	4.4	5.0	4.4	4.4
<i>P. terrae</i> JCM11466 ^T	Citric acid	5.0	5.0	4.7	5.3	5.0	5.0
	Lactic acid	5.0	5.0	4.7	5.3	5.3	5.3
	Acetic acid	5.3	5.0	5.0	5.6	5.6	5.6
	Hydrochloric acid	4.7	4.7	4.4	5.0	5.0	5.0

^aDetermined as the highest pH of all 3 wells which did not observe turbidity with microbial growth.

^bNot inhibited growth in tested pH range.

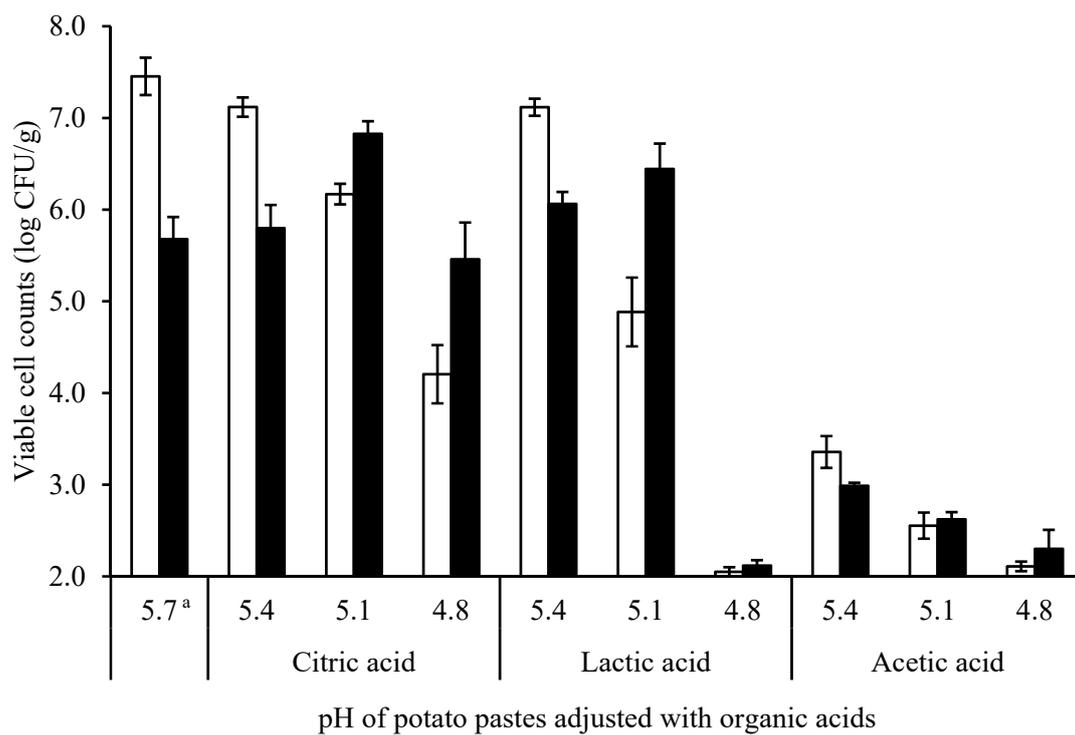


Fig. 2-1-1. Effect of organic acids and pH on the growth of *P. terrae* No.9 spores in potato pastes at 10 °C.

Initial spore concentration was 3.1 ± 0.1 log spores/g.

Columns were expressed as for 14 days (□) and 28 days (■), respectively.

^aWithout adjusting pH.

Results were expressed as means±standard error.

Table 2-1-2. Sensory evaluation for sour taste of potato pastes adjusted pH with organic acids.

Panels	Acidulant	pH	Sour score*	Acceptable panels
10	Non	5.7	1.0 ^a	-
	Citric acid	5.4	1.8 ± 0.4 ^{ab}	8
		5.1	2.6 ± 1.0 ^{bc}	6
		4.8	3.2 ± 0.8 ^c	6
9	Non	5.7	1.0 ^a	-
	Lactic acid	5.4	1.9 ± 0.3 ^b	8
		5.1	2.8 ± 0.8 ^c	5
		4.8	3.1 ± 0.6 ^c	3
9	Non	5.7	1.0 ^a	-
	Acetic acid	5.4	1.8 ± 0.4 ^b	9
		5.1	3.0 ± 0.7 ^c	3
		4.8	3.6 ± 0.7 ^c	2

Sour score: Not at all (1 pt), Slightly (2 pt), Considerably (3 pt), and Very (4 pt).

The sour taste of the pastes adjusted pH with organic acids was evaluated using sour score of the pastes not adjusted pH as 1 pt.

Significant difference in sour score between different alphabets ($p < 0.05$, Tukey).

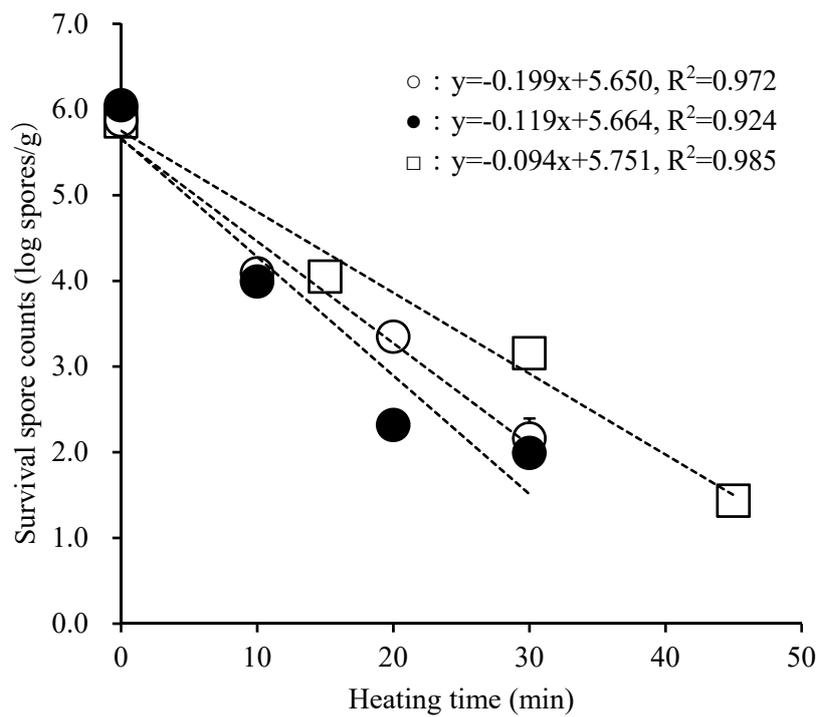


Fig. 2-1-2. Survival behaviors of *P. terrae* No.9 spores in potato pastes heated at 92.5 °C. The pH of potato pastes was adjusted at pH 5.4 with citric acid (○), pH 5.4 with lactic acid (●) and pH 5.7 without adjusting (□). Symbols and bars were expressed as means ± standard error, respectively. Regression equations responsible for dashed lines were obtained by linear regression of each plot by the least square method.

Table 2-1-3. Influence of organic acids, pH, and heating time on the growth of *P. terrae* No.9 spores in potato pastes during the storage at 10 °C.

Acidulant	pH	Heating time at 92.5 °C (min)	Viable cells in potato pastes (log CFU/g)							
			7 days		14 days		21 days		28 days	
Non	5.7	Not heating	6.8±0.1 ^a (3/3) ^c		7.5±0.2 (3/3)		6.8±0.3 (3/3)		5.7±0.2 (3/3)	
		15	4.5±0.2 (3/3)		6.6±0.1 (3/3)		7.0±0.1 (3/3)		5.5±0.1 (3/3)	
		30	<2.0 ^b (0/3)		5.1±0.4 (3/3)		7.4±0.1 (3/3)		7.6±0.0 (3/3)	
		45	<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)	
Citric acid	5.4	Not heating	6.0±0.1 (3/3)		7.1±0.1 (6/6)		6.9±0.1 (4/4)		5.8±0.3 (5/5)	
		10	2.8±0.5 (4/5)		6.5±0.2 (3/3)		7.0±0.2 (4/4)		6.5±0.1 (3/3)	
		20	<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		3.6 (1/3)		7.1±0.3 (3/3)	
		30	<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)	
Citric acid	5.1	Not heating	5.0±0.2 (4/4)		6.2±0.1 (6/6)		6.8±0.2 (3/3)		6.8±0.1 (5/5)	
		10	2.1 (2/3)		2.3 (2/3)		6.6±0.2 (3/3)		6.5±0.8 (3/3)	
		20	<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)	
Lactic acid	5.4	Not heating	6.1±0.1 (4/4)		7.1±0.1 (6/6)		6.8±0.1 (3/3)		6.1±0.1 (5/5)	
		10	2.2 (1/3)		6.2±0.1 (3/3)		7.1±0.2 (3/3)		7.1±0.0 (3/3)	
		20	<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)		<2.0 (0/3)	

Initial spore concentration was 3.0±0.1 log spores/g.

^aMeans±standard error of samples.

^bBelow the detection limit in all measured samples.

^cNumbers of sample with viable cells detected/numbers of samples measured.

第2節 *Paenibacillus* 属細菌芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液処理の影響

次亜塩素酸ナトリウムは、原材料や器具類、製造ラインなど食品製造現場の洗浄殺菌に広く使用される殺菌料である。その殺菌スペクトルは広く、細菌やウイルス、真菌類だけでなく、細菌芽胞に対しても効果を発揮する (藤上, 2005)。一方、硬質表面に付着した微生物に対する殺菌効果は、浮遊微生物に対する殺菌効果よりも低いため、付着微生物に対する次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果を高める様々な方法が提唱されている (福崎, 2014)。また、加熱殺菌や製品中での増殖抑制を検討する上で、洗浄殺菌後に生残した微生物の性状に着目することも重要と言われている (福崎, 2014)。

亜致死濃度の次亜塩素酸ナトリウムで処理した大腸菌は、菌体機能に何らかの損傷が生じることが報告されている (Tandon et al., 2007)。また、酸性に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した *A. acidoterrestris* の芽胞は耐熱性が低下する (小林・青山, 2014)。前節では、ジャガイモペーストに接種した *Paenibacillus* 属細菌の芽胞の発芽・増殖を 10 °C で 4 週間抑制するためには、92.5 °C で 45 分間の加熱が必要であった。有機酸での pH 調整と加熱処理の併用によって加熱時間の短縮が可能であったが、有機酸添加による味への影響は避けられないことも明らかになった。*Paenibacillus* 属細菌についても、*A. acidoterrestris* のように次亜塩素酸ナトリウム溶液処理によって芽胞の耐熱性が低下すれば、pH 調整を併用せずに短時間の加熱処理のみでも制御できる可能性があり、品質維持が期待できる。本節では、*Paenibacillus* 属細菌芽胞の耐熱性に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液処理の影響を明らかにした。

試料および方法

2-1-1. 供試菌株と芽胞懸濁液の調製

Paenibacillus sp. No.1 (第1章1節ホワイトアスパラガス水煮正常品由来) を用いた。普通ブイヨンに接種して 30 °C で 24 時間培養した新鮮培養菌液を普通寒天平板培地 [普通ブイヨン培地 + 1.5 % (w/v) 寒天] に塗抹し、30 °C で 10 日間培養して芽胞を形成させた。芽胞形成は微分干渉顕微鏡で観察した。芽胞はコンラージ棒で擦り取り、冷却滅菌蒸留水に懸濁した後に遠心洗浄 (2,000 × g, 10 分間, 5 回) によって夾雑物を除いて芽胞懸濁液

とした。芽胞懸濁液は 75 °C で 15 分間加熱してから各試験に用いた。

2-1-2. 次亜塩素酸ナトリウム溶液の調製

次亜塩素酸ナトリウム溶液 (化学用, 富士フイルム和光純薬) を有効塩素濃度 15–270 mg/L となるように蒸留水で希釈した後, 5 M 塩酸もしくは 5 M 水酸化ナトリウムで pH 6.0, 8.0 および 10.0 に調整した。遊離有効塩素濃度はハンディ水質計 (AQ-202, 柴田化学) で測定した。

2-1-3. 芽胞の次亜塩素酸ナトリウム溶液処理

芽胞懸濁液 150 μ L を集菌 (10,000 \times g, 5 °C, 2 分間) して上清を除いた後に, 調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液 500 μ L で再懸濁した。恒温水槽にて 15 °C, 10 分間処理した後, 有効塩素を失活させるため, 直ちに 1 %チオ硫酸ナトリウム溶液 500 μ L を加えた。

2-1-4. 芽胞の耐熱性測定

次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した芽胞は, 直ちに集菌洗浄 (10,000 \times g, 5 °C, 2 分間, 2 回) した後, ホワイトアスパラガス水煮調味液モデル (80 mM ショ糖, 850 mM 塩化ナトリウム/5 mM クエン酸緩衝液, pH 5.0) 3.0 mL で再懸濁した。懸濁液 500 μ L をガラス管 (内径: 7 mm, 外径: 9 mm, 全長: 120 mm) にとり, 酸素炎で開口部を溶封した。溶封したガラス管はアンプル保持用ケーシング (全長 29 cm) の最下段に保持し, ポリエチレングリコール (KO10002000) を満たしたオイルバス (ヒーター: TR-4AR, 水槽: SB-24) に浸漬して 95 °C で 15 分間加熱した。加熱後は直ちに氷水冷し, アンプルカッターで無菌的に開封し, 10 倍希釈液列を調製した後, 標準寒天平板培地に塗抹して 30 °C で 3 日間培養して芽胞数を測定した。

結果および考察

2-2-1. 次亜塩素酸ナトリウム溶液処理による芽胞の生残性

ホワイトアスパラガス水煮調味液モデルで再懸濁した加熱処理前の芽胞数を次亜塩素酸ナトリウム溶液処理後の芽胞数として、各処理区を比較した。遊離有効塩素が 15, 30, 45 および 60 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) で処理した時の芽胞数は、それぞれ 6.7, 6.7, 6.3 および 6.1 log spore/mL, 45, 60, 90 および 120 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH 8.0) で処理した時の芽胞数は、それぞれ 6.5, 6.5, 6.5 および 6.2 log spore/mL, 45, 90, 180 および 270 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH 10.0) で処理した時の芽胞数は、それぞれ 6.5, 6.5, 6.5 および 6.7 log spore/mL であった。対照 (滅菌蒸留水) の芽胞数は 6.7 log spore/mL であった (Fig. 2-2-1)。

A. acidoterrestris の芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液処理では、0.5 log 程度の減少が得られた条件で耐熱性低下作用が観察されている (小林・青山, 2014)。本研究においては、遊離有効塩素が 45 mg/L, 60 mg/L (いずれも pH 6.0) および 120 mg/L (pH 8.0) の次亜塩素酸ナトリウム溶液処理では対照と比較して芽胞数が 0.4–0.6 log 減少しており、*A. acidoterrestris* の芽胞と同様に耐熱性が低下している可能性が推察された。

2-2-2. 加熱処理による次亜塩素酸ナトリウム溶液処理芽胞の生残性

滅菌蒸留水処理 (対照) した芽胞は、その後の加熱処理 (95 °C, 15 分間) で芽胞数が 2.6 log 減少した。遊離有効塩素が 15, 30, 45 および 60 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) で処理した芽胞は、その後の加熱処理で芽胞数がそれぞれ 2.8, 3.2, 4.0 および 4.2 log 減少した。45, 60, 90 および 120 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH 8.0) で処理した芽胞は、その後の加熱処理で芽胞数がそれぞれ 2.5, 2.5, 3.1 および 4.1 log 減少した。45, 90, 180 および 270 mg/L の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH 10.0) で処理した芽胞は、その後の加熱処理での芽胞数の減少は 2.3–2.5 log であった (Fig. 2-2-2)。なお、前処理を行わなかった芽胞を 95 °C で 15 分間加熱した場合には芽胞数は 2.5 log 減少した。

対照や pH 10.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液で前処理した *Paenibacillus* sp. No.1 の芽胞を加熱したときの減少は、前処理を行わなかったときと同水準であったことから、蒸留水処理や pH 10.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液処理は、*Paenibacillus* sp. No.1 の芽胞の耐熱

性には影響しないことが判明した。一方, pH 6.0 および 8.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液で芽胞を処理した場合には, 遊離有効塩素濃度の増加に伴い, 加熱処理後の生残芽胞数の減少が増大したことから, pH を低下させた次亜塩素酸ナトリウム溶液での前処理は, *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の耐熱性を低下させる可能性が示唆された。また, pH 6.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液での前処理は, pH 8.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液での前処理と比較して, 低濃度の遊離有効塩素でも加熱処理後の芽胞数の減少は同等であったことから, 芽胞の耐熱性低下に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液の作用は, 酸性側で強くなると推察された。

次亜塩素酸ナトリウムは, 水溶液中では次亜塩素酸イオンとナトリウムイオンに解離する。さらに, 次亜塩素酸イオンは次亜塩素酸と平衡状態にある。次亜塩素酸の酸解離定数 (pK_a) は 7.6 (15 °C) である (Morris, 1966)。そのため, pH 6.0, 8.0 および 10.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液における次亜塩素酸の存在比率 (理論値) は, それぞれ 97.5, 28.5 および 0.4 % である。芽胞の耐熱性低下に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液の作用が酸性側で強くなったことから, 酸性側で存在比率が高まる次亜塩素酸の関与が推察される。そこで, 各 pH における次亜塩素酸の存在比率から遊離有効塩素中の次亜塩素酸濃度を算出し, 加熱処理による *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の減少との関係を解析した (Fig. 2-2-3)。耐熱性低下作用が全く見られなかった pH 10.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液の遊離有効塩素は, ほとんどが解離型の次亜塩素酸イオンであり, 非解離型の次亜塩素酸は最大でも約 1 mg/L であった。一方, pH 6.0 および 8.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液には, 次亜塩素酸が約 10–40 mg/L 存在しており, この間で濃度依存的に芽胞数が減少したことが明らかになった。これらのことから, 次亜塩素酸ナトリウム溶液による前処理で生じる *Paenibacillus* sp. No.1 芽胞の耐熱性低下は, 次亜塩素酸の作用が主因であることが示唆された。

次亜塩素酸イオンおよび次亜塩素酸の細菌への作用について, 次亜塩素酸イオンは疎水性の細胞膜を通過できず, 細胞表層への作用に留まるが, 次亜塩素酸は細胞膜を通過して菌体内部にも作用する (福崎, 2009)。Zhang ら (2022) は, 次亜塩素酸を主成分とする弱酸性電解水で *B. cereus* の芽胞を処理するとコート層や内膜が損傷することやジピコリン酸を放出しやすくなること明らかにした。また, 次亜塩素酸ナトリウム溶液処理によって熱感受性が高まった *B. subtilis* の芽胞では内膜損傷が観察されている (Cortezzo et al.,

2004)。ジピコリン酸は、カルシウムイオンと結合したジピコリン酸カルシウムとして芽胞最内部のコアに蓄積され、コア内部の水分含量の低下を招いて耐熱性に寄与すると考えられている (三宅ら, 2018)。すなわち、次亜塩素酸による芽胞の耐熱性低下は、芽胞内膜の損傷によってコア内部に蓄積されたジピコリン酸が放出され、その代わりに芽胞内部に水が侵入することで引き起こされたと推察される。したがって、次亜塩素酸ナトリウム溶液処理で耐熱性が低下した *Paenibacillus* sp. No.1 の芽胞では、非解離型の次亜塩素酸が芽胞内に侵入し、内部構造の損傷やそれに伴うジピコリン酸の放出が生じていると推察された。

次亜塩素酸は、pH を酸性に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液だけでなく、弱酸性電解水や微酸性電解水にも高い比率で存在する。このような殺菌料を原材料の洗浄殺菌に用いれば、細菌芽胞を完全に殺菌することは難しくても生残した細菌芽胞は損傷を受けて耐熱性が低下している可能性がある。特に、冷蔵温度帯でも増殖する *Paenibacillus* sp. No.1 に対して効果が得られたことから、要冷蔵加工食品の製造に応用することで温和な加熱殺菌での保存性向上や高品質化が期待される。

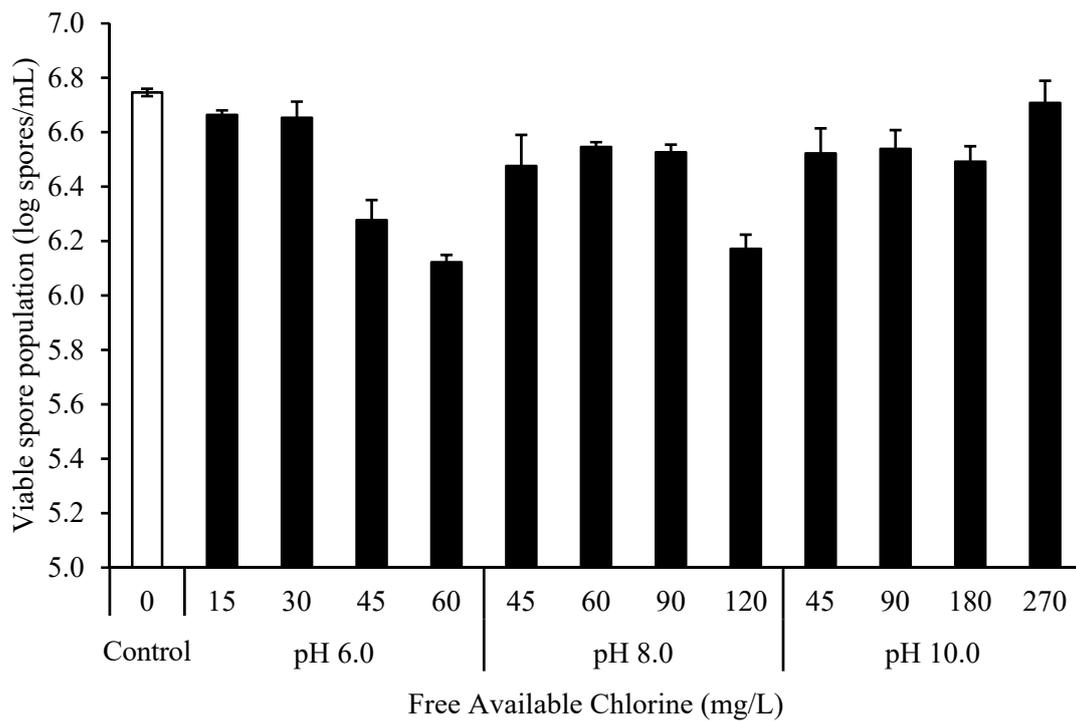


Fig. 2-2-1. Effect of pH and free available chlorine in sodium hypochlorite solution on *Paenibacillus* sp. No.1 spore surviving.

Spores were treated with the sodium hypochlorite solution for 10 min at 15 °C, and then resuspended in citrate buffer to determine the spore heat resistance. Viable spore population represents the numbers in citrate buffer before heating. Columns and bars represent means and standard error, respectively.

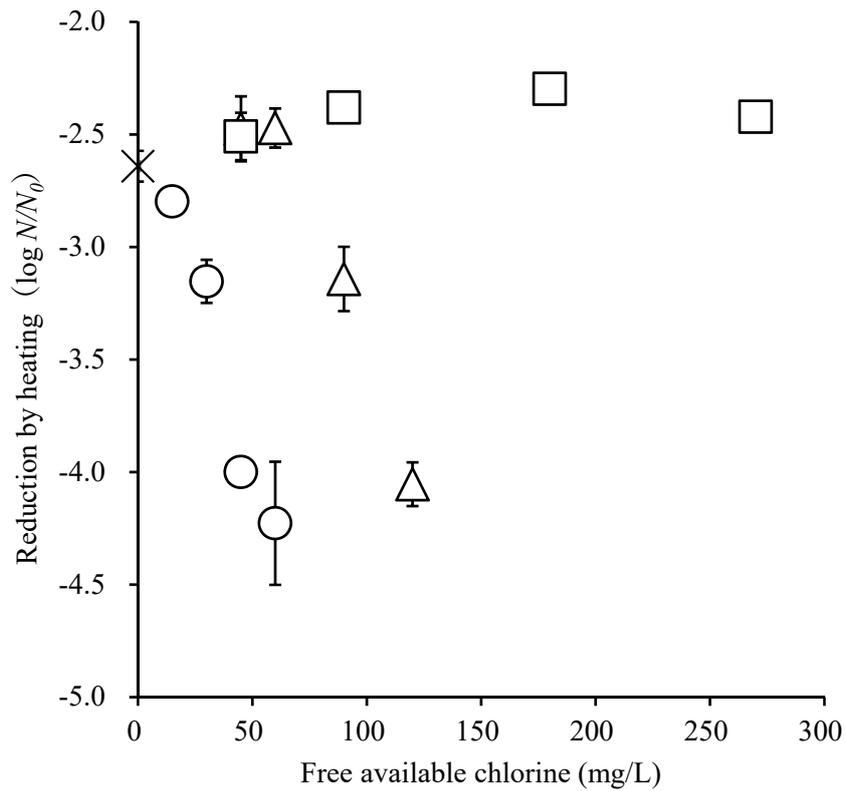


Fig. 2-2-2. Spore heat resistance of *Paenibacillus* sp. No.1 pretreated with sodium hypochlorite solutions.

Symbols represent pretreatment with sodium hypochlorite solution of pH 6.0 (○), pH 8.0 (△), pH 10.0, (□), and sterilized distilled water (×), respectively. N_0 and N represent viable spore population before and after heating at 95 °C for 15min, respectively. Bars represent standard error.

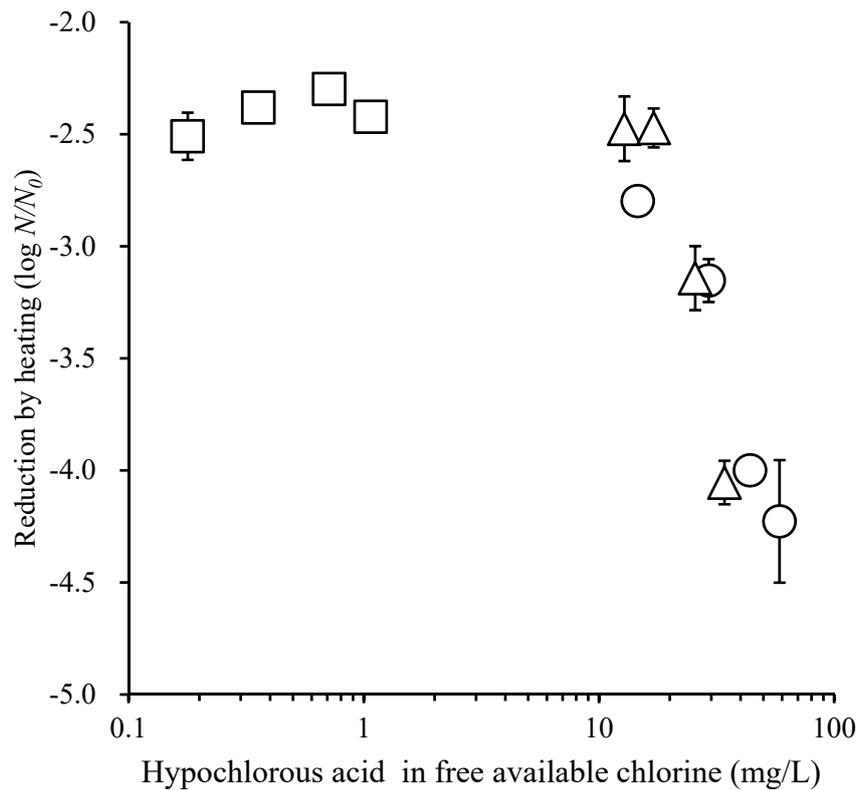


Fig. 2-2-3. Effect of hypochlorous acid on spore heat resistance of *Paenibacillus* sp. No.1 pretreated with sodium hypochlorite solutions. Symbols represent pretreatment by sodium hypochlorite solution of pH 6.0 (\circ), pH 8.0 (\triangle), and pH 10.0 (\square), respectively. N and N_0 represent viable spore population before and after heating at 95 °C for 15min, respectively. Bars represent standard error.

第3章 予測微生物学を活用した要冷蔵加工食品の加熱殺菌条件の設定

予測微生物学とは、微生物の増殖挙動や死滅挙動について、温度や pH、水分活性などの周辺環境情報をパラメータとする数理モデルとして記述し、周辺環境が変化したときの当該微生物の増殖挙動や死滅挙動の定量評価を目的とした食品微生物学の研究分野の一つである。当初は殺菌や保管における経時的な菌数変化の予測に関する研究が主であったが、近年ではその菌数を生起する確率を予測する研究が着目されている (Koseki et al., 2021)。また、対象微生物の増殖の有無を確率で予測する増殖／非増殖境界 (Growth/no growth boundary, GNG) モデルは、複数の微生物制御因子を併用したとき影響を定量評価できる (McMeekin et al., 2000) ため、製品開発における微生物制御条件の検討にも活用されている (淵澤, 2018; 石田, 2018)。

高い保存性をもつ要冷蔵加工食品を製造するためには、冷蔵保管中に増殖する可能性のある低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌のような微生物の菌数を可能な限り低減する必要がある。一方、微生物数を実験レベルで 1 log CFU/mL 程度まで低減させようとすると、0 log CFU/mL や 1.5 log CFU/mL などといった生残微生物数の試料が発生する。このような現象は個々の細胞の耐熱性の多様性に起因すると考えられている (Aspridou and Koutsoumanis, 2015)。実際の食品製造では、加熱殺菌装置を使って一度に数千個の包装食品を加熱処理するため、個々の細胞の耐熱性の多様性によっても生残菌量にばらつきが発生する可能性は否定できない。また、生残微生物数のばらつきを恐れて加熱殺菌条件を必要以上に厳しくすると要冷蔵加工食品の特長である食感や色調、風味などの品質が損なわれてしまう。そのため、加熱殺菌後の生残微生物数とそれを生起する確率を予測できれば、高い保存性をもつ高品質な要冷蔵加工食品を製造するための必要最小限の加熱殺菌条件が設定できる。しかし、これまでにレトルト殺菌機やボイル殺菌槽を使って生残微生物数のばらつきを観察した研究は報告されていない。加熱処理後の生残微生物数のばらつき評価では、サーマルサイクラーや水浴が加熱機器として主に用いられてきた (Abe et al., 2019; Aguirre et al., 2009)。GNG モデルの作成についても同様であり、加熱処理とその後の保存を組み合わせる増殖確率を評価していても加熱処理が水浴やマイクロプレート用ヒートブロックであり (Belletti et al., 2010; Daelman et al., 2013)、実際の製造スケールに近い条件での検討はない。

第3章では、微生物数低減のための加熱処理方法としてレトルト殺菌機を使い、カレーやシチューなどの包装済惣菜類の重量に近い100g以上の試験系における微生物数の挙動の解析に対して予測微生物学を応用した。第1節では、*Paenibacillus* sp. JCM13343の芽胞を接種した緩衝液を詰めたパウチをレトルト殺菌機で加熱し、処理した全数について全容量中の生残芽胞数の測定結果から生残芽胞数のばらつき(変動性, Variability)の確率分布を明らかにした。第2節では、*Paenibacillus* sp. JCM13343の芽胞を指標菌とした加熱殺菌条件の設定において、接種試験に確率論的手法を組み合わせた。すなわち、10℃で12週間保存したときの腐敗率とレトルト殺菌機での加熱処理後の生残芽胞数のばらつきの累積確率を比較し、腐敗に至る生残芽胞数の推定と適切な加熱殺菌条件について考察した。第3節では、第2節で明らかにした加熱殺菌条件をもとに、未殺菌製品をレトルト殺菌機で処理し、10℃での保存性を検証した。さらに、要冷蔵加工食品の保管温度逸脱を考慮した加熱殺菌条件を検討するため、30℃、5日間保存での腐敗確率を予測するGNGモデルを作成・検証した。

第1節 レトルト殺菌機での加熱処理後の生残芽胞数の変動性

加工食品の加熱殺菌条件は、指標となる微生物の耐熱性 (D 値) をもとに 5–6 桁の菌数低減を目標として設定する (佐藤, 2005)。一方, D 値をもとにした加熱殺菌条件の設計方法は, 生残菌数のばらつきを考慮しておらず加熱殺菌の効果を過小もしくは過大に評価する可能性も指摘されている (Peleg, 2006)。

細菌を加熱すると, その属種や加熱媒体に関わらず生菌数が減少するに伴い観測される生菌数のばらつきが大きくなる (Aguirre et al., 2009)。観測データのばらつきは, 変動性と不確実性の二つに分けられる。変動性は微生物固有の性質であり, 実験を繰り返してもばらつきが小さくなることはない (小関, 2016)。また, 細菌の減少における変動性は, 生菌数が 100 個未満で顕著になることが示されている (Aspidou and Koutsoumanis, 2015)。生菌数が少なくなるほど変動性が大きくなる原因は, 個々の細胞の死滅挙動が一様ではないためと考えられている (Aspidou and Koutsoumanis, 2015)。

内容量 100 g の包装済惣菜類を例に上述の加熱殺菌条件の設定を考える。加熱殺菌前の芽胞数が 10^{3-4} spores/g の惣菜類について, 5–6 桁の低減を目標とすると生残芽胞数は 100 g あたり 10^{-1} spores/100 g となる。変動性が顕著に現れる菌量であることを考慮すると, 1 回に 1000 個以上を処理するレトルト殺菌機を使った大量生産では, 10^2 spores/100 g や 10^2 spores/100 g の個体が出現する確率を把握する必要があることを意味している。 10^2 spores/100 g の個体を出現させないために, 菌数低減の桁数を大きくすることによって確率論的な改善が可能であるが, このような考え方では過加熱となる個体が増大し, 製品全体の品質低下を招く。そのため, 過不足のない適切な加熱殺菌条件を設定するためには, 細菌の変動性の理解が重要である。

生残菌数の変動性は, ポアソン分布に従うことがこれまでの研究で示されている (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; 2019)。これらの研究では, 試験管や 96 穴マイクロプレートなどの比較的小さな試験系 (0.1–10 mL) で数十反復の生残菌数を測定し, 変動性を評価している。一方, 食品加工への展開を考えると, 実際の製品に近い大きな試験系 (100 mL) で検証すべきである。本節では, *Paenibacillus* 属細菌の芽胞を接種したパウチ詰緩衝液をレトルト殺菌機で処理し, 全量の生残芽胞数を測定してばらつきを評価し, 大きな試験系においても生残芽胞数の変動性がポアソン分布に従う可能性を示した。

試料および方法

3-1-1. 供試菌株と芽胞懸濁液の調製

Paenibacillus sp. JCM13343 を用い, 試料および方法 1-2-2 と同様の方法で芽胞懸濁液を調製し, 以後の実験に供した。

3-1-2. レトルト殺菌機

貯湯式レトルト殺菌機 [RCS-40RTGN, 庫内容量: 0.097 m³ (φ400 mm × 奥行 800 mm), 180 mm × 250 mm のパウチで最大 40 袋収容; 4 袋 × 10 段, 日阪製作所] を用いた。運転サイクルは, 100 °C までの昇温工程 5 分, 100 °C での定温加熱工程, 冷却工程 10 分とした。

3-1-3. 生残芽胞数予測モデルの作成

30 °C でプレインキュベートした 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 850 mL に 5.0 log spores/100 mL となるように *Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞懸濁液を接種し, 1-4 の番号を記した樹脂製パウチ (180 mm × 250 mm) にボトルトップディスペンサー (Calibrex solutae 530.100FC, SOCOREX) で 100 mL ずつ分注してヒートシーラー (FI-K300-10, 富士インパルス) で密封した。密封したパウチは, 温度低下を防ぐために 30 °C の水浴でインキュベートした。4 袋のパウチは, レトルト殺菌機内の 4 箇所 (Fig. 3-1-1A) に番号順に配置し, 100 °C で 4, 8, 12 および 16 分間加熱した。加熱処理後は直ちに氷水冷した後, 生残芽胞数を測定した。試験は各加熱条件につき 3 回行った。

芽胞の減少挙動は Weibull モデル (Eq.1, Koseki et al., 2021) で回帰分析し, パラメータ b および n を推定した。

$$\log_{10} N_t = -bt^n + \log_{10} N_0 \dots\dots\dots \text{Eq. 1}$$

t : 加熱時間; N_0 : 初発芽胞数; N_t : t 分加熱したときの芽胞数

Weibull モデルは, 微生物の減少や不活化の挙動を説明するために活用されている (Gómez et al., 2005; Koseki et al., 2015; Mafart et al., 2002; Peleg and Normand, 2004)。Bigelow モデルで説明する従来の解析では生残菌数を過大もしくは過小評価する可能性があるこ

と、また、Weibull モデルは Bigelow モデルよりも微生物の減少や不活化の挙動を正確に説明できることが示されている (Peleg, 2006; Koyama et al., 2019)。

3-1-4. 加熱処理後に生残する芽胞数の定量

30 °C でプレインキュベートした 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 4000 mL に、3.5 log spores/100 mL となるように *Paenibacillus* sp. JCM1334 の芽胞懸濁液を接種し、1-36 の番号を記した樹脂製パウチにボトルトップディスペンサーで 100 mL ずつ分注してヒートシーラーで密封した。密封したパウチは、温度低下を防ぐために 30 °C の水浴でインキュベートした。36 袋のパウチは、レトルト殺菌機内の 36 箇所 (Fig. 3-1-1B) に番号順に配置し、100 °C で 7.5, 12 および 14 分間加熱した。加熱処理後は直ちに氷水冷した後、生残芽胞数を測定した。試験は各加熱条件につき 5 回行った。

3-1-5. 生残芽胞数の測定

生残芽胞数はメンブレンフィルター法で測定した。試料液全量、もしくは 90 mL の滅菌希釈水で調製した 10 倍希釈液列の全量をビバレッジモニター (マイクロチェック II, φ 6.1 cm, 孔径 0.45 μm, 修飾ポリエーテルスルホン, PALL) に注ぎ、3 連マニホールド (ラボラトリーマニホールド, PALL) で全量を吸引濾過してフィルター上に芽胞を捕集した。さらに、100 mL の滅菌希釈水でビバレッジモニターの壁面を洗い流し、全量を吸引濾過した。フィルターは無菌的に標準寒天平板上に置き、30 °C で 7 日間培養して出現したコロニー数を計数し、生残芽胞数とした。

3-1-6. パウチ内部の温度履歴の測定

30 °C でプレインキュベートした 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) をボトルトップディスペンサーで 100 mL ずつ樹脂製パウチに分注し、無線式温度データロガー (Micropack III, Mesa Laboratories) を入れて密封した。測温部分 (データロガー先端) がパウチの中心となるように調整して上述した 3-1-2 および 3-1-3 のパウチ配置 (Fig. 3-1-1) と同位置に配置し、2 秒間隔で温度を記録した。庫内 4 箇所 (Fig. 3-1-1A) の測定では、100 °C で 4, 12 および 20 分間加熱したときの温度履歴を各箇所 3 回、庫内 36 箇所 (Fig. 3-1-1B) の測定では、100 °C で 7.5, 14 および 16 分間加熱したときの温度履歴を各箇所 3 回取得した。記録し

た温度は PC interface system (Data Trace Version5.lnk, LINK SYSTEMS) で読み出した後、100 °C での Pasteurization value ($P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}}$, Eq.2, Daelman et al., 2013) を算出した。

$$P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}} = \int_0^t 10^{\left(\frac{T(t)-T(\text{ref})}{z}\right)} dt \dots\dots\dots \text{Eq. 2}$$

t : 経過時間; $T(t)$: 経過時間における温度; $T(\text{ref})$: 100 °C; z : 10 °C

3-1-7. 確率分布に従ったばらつきの算出

生残菌数の変動性は、ポアソン分布に従うことがこれまでの研究 (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; 2019) で示されていることから、レトルト殺菌機での加熱処理後の生残芽胞数のばらつきが、ポアソン分布に従うと仮定してばらつきを算出した。すなわち、推定されたパラメータ b および n , 実測した初発芽胞数の平均値, 100 °C で 7.5, 12 および 14 分間加熱したとき $P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}}$ を Eq. 1 に代入して、それぞれの加熱処理条件について 36 箇所が生残芽胞数 (理論値) を算出した。生残芽胞数の変動がポアソン分布に従うと仮定して理論値から各芽胞数にばらつく確率を求めた。この確率に試験回数 (5 回) を乗じて各箇所において各生残芽胞数となる頻度とし、その総和を全体のばらつきとした。

3-1-8. 解析

実測した生残芽胞数の頻度と、ポアソン分布に従うと仮定して算出した生残芽胞数の頻度を比較した。すなわち、ヒストグラムの類似度を評価する指標である Histogram Intersection (Eq. 3, Koyama and Lyu, 2022) を算出した。

$$\text{Histogram Intersection (HI)} = \frac{\sum_i \min(\text{Freq}_{\text{pred}}(i), \text{Freq}_{\text{obs}}(i))}{\sum_i \text{Freq}_{\text{obs}}(i)} \dots\dots\dots \text{Eq. 3}$$

i : 生残芽胞数

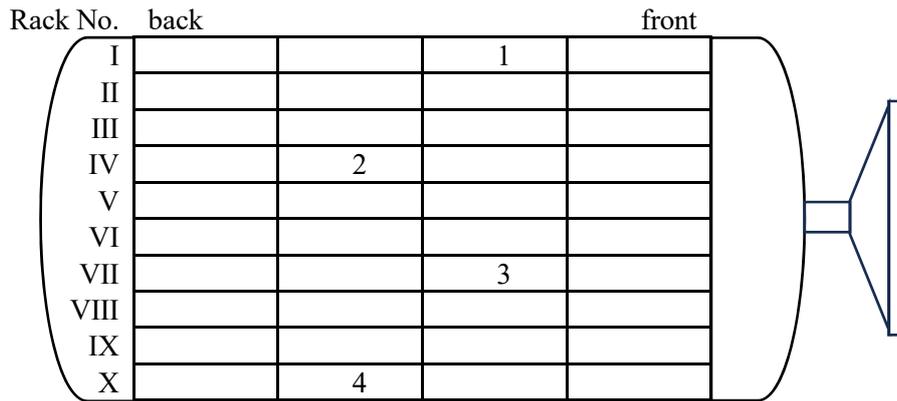
$\text{Freq}_{\text{pred}}(i)$: i 個の生残芽胞数が観察される頻度 (理論値)

$\text{Freq}_{\text{obs}}(i)$: i 個の生残芽胞数が観察された頻度 (実測値)

$\sum_i \min(\text{Freq}_{\text{pred}}(i), \text{Freq}_{\text{obs}}(i))$: 生残芽胞数 i 個について、理論値と実測値の小さい方の総和

$\sum_i \text{Freq}_{\text{obs}}(i)$: i 個の生残芽胞数が観察された頻度の総和 (36 データ × 5 回 = 180)

(A) Determination for heat inactivation kinetics



(B) Quantification for surviving spore numbers

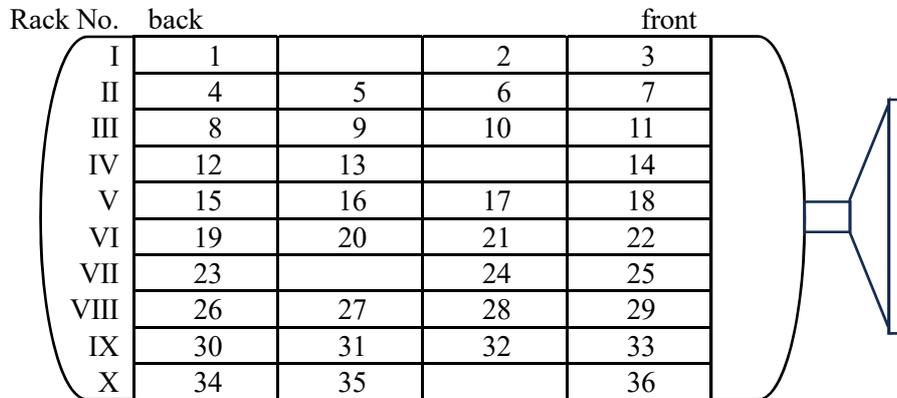


Fig. 3-1-1. Installation places of samples inoculated *Paenibacillus* sp. JCM13343 spores in the experiment of determination for heat inactivation kinetics (A) and the experiment of quantification for surviving spore numbers (B).

結果および考察

3-1-1. 温度履歴から算出した 100 °C での Pasteurization value

100 °C で 4, 12 および 20 分間加熱したときの庫内 4 箇所の 100 °C での Pasteurization value ($P_{100\text{ °C}}$) ならび 100 °C で 7.5, 14 および 16 分間加熱したときの庫内 36 箇所の $P_{100\text{ °C}}$ について加熱時間との関係を最小二乗法で線形回帰し, 得られた回帰直線から求めた $P_{100\text{ °C}}$ を Table 3-1-1 および Table 3-1-2 に示した。

3-1-2. 生残芽胞数予測モデル

Paenibacillus sp. JCM13343 の芽胞を接種した 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) をレトルト殺菌機にて 100 °C で 4, 8, 12 および 16 分間加熱した時の生残芽胞数の減少挙動を Fig 3-1-2 に示した。芽胞数の減少における昇温および冷却工程の影響も加味するため, 横軸は $P_{100\text{ °C}}$ で示し, Table 3-1-1 の値を引用した。この減少挙動を Weibull モデル (Eq. 1) で回帰すると, パラメータ n, b および予測値と実測値の誤差の指標である RMSE は, それぞれ 0.86, 0.33 および 0.177 であった。すなわち, 生残芽胞数予測モデル (Eq. 4) を得た。

$$\log_{10} Nt = -0.33t^{0.86} + \log_{10} N_0 \dots\dots\dots \text{Eq. 4}$$

t : 100 °C での Pasteurization value ($P_{100\text{ °C}}$)

3-1-3. 生残芽胞数のばらつきの確率分布

Paenibacillus sp. JCM13343 が 3.6 log spores/100 mL であったパウチをレトルト殺菌機にて 100 °C で 7.5, 12 および 14 分間加熱したときの生残芽胞数の実測値および初発芽胞数とそれぞれの $P_{100\text{ °C}}$ (Table 3-1-2) を Eq. 4 に代入して算出した理論値を Table 3-1-3 に示した。さらに, 実測値および理論値のばらつきをヒストグラムとして Fig. 3-1-3 に示した。ヒストグラムの各データを Eq. 3 に代入して算出した 100 °C で 7.5, 12 および 14 分間加熱したとき生残芽胞数の実測値と理論値の Histogram Intersection (HI) は, それぞれ 0.819, 0.814 および 0.743 であった。HI には良否の基準がなく, 数値が大きいほどヒストグラムの類似度が高いとされる。すなわち, 実測値と理論値と比較した場合には, HI が大きいほど実測値と理論値が類似していると言える。本研究では, 実測値の 80 %前後が理論値

と一致したことから、生残芽胞数のばらつきは、ポアソン分布に従う可能性が高いと推察された。また、いずれの加熱処理条件においても低芽胞数の頻度は、理論値よりも実測値が上回る傾向にあった。生残芽胞数予測モデルの作成と生残芽胞数のばらつきの定量の二つの試験において、それぞれの加熱処理条件および初発芽胞数を比較すると、予測モデル作成の加熱処理条件および初発芽胞数は、100 °C で 4–16 分間および 5.1 log spores/100 mL、ばらつきの定量では 100 °C で 7.5–14 分間および 3.6 log spores/mL であった。すなわち、生残芽胞数の定量試験の方が少量の芽胞を長時間加熱しており、芽胞がより過酷な加熱を受けたと考えられる。したがって、低芽胞数の頻度が理論値よりも実測値において上回ったことは、実測では一部の芽胞が加熱損傷し、標準寒天培地での発芽・増殖能力を失ったために生残芽胞数測定でコロニーを形成せず、計数されなかったためと推察された。*Bacillus* 属細菌の芽胞では、加熱損傷芽胞をリゾチームやジピコリン酸カルシウム、硫酸マグネシウムを添加した培地で培養すると損傷状態から回復してコロニーを形成することが報告されている (Cazemier et al., 2001; Faille et al., 1997)。そのため、加熱後芽胞の培養条件を検討することによって実測値の下振れは解消され、より理論値に近づくと推察される。

生残菌数のばらつきがポアソン分布に従うと推察されたことから、加熱殺菌後の生残菌数の理論値が分かれば、任意の生残菌数となる確率を明示できることが明らかになった。容器包装食品の加熱殺菌においては、処理庫内や槽内で最も加熱されにくい場所(最冷点)で条件を管理する。D 値を使った従来の加熱殺菌条件の設定では、加熱殺菌後の目標菌数をピンポイントでしか設定できなかったが、目標菌数となる確率も考えることによって従来よりも的確な加熱殺菌条件が設定できると考えられる。

Table 3-1-1. Pasteurization values at 100 °C of samples installed to determined places in the retort sterilizer.

Installation place ^a	Regression equation ^b	Coefficient of determination	P _{100 °C} (min)			
			100 °C, 4 min	100 °C, 8 min	100 °C, 12 min	100 °C, 16 min
1	$P_{100\text{ °C}}=1.135\times\text{Heating time}+2.397$	1.000	6.9	11.5	16.0	20.6
2	$P_{100\text{ °C}}=1.104\times\text{Heating time}+2.086$	1.000	6.5	10.9	15.3	19.7
3	$P_{100\text{ °C}}=1.127\times\text{Heating time}+1.326$	1.000	5.8	10.3	14.9	19.4
4	$P_{100\text{ °C}}=1.127\times\text{Heating time}+0.989$	1.000	5.5	10.0	14.5	19.0

^aEach number represents the installation place of samples in Figure 3-1-1A.

^bEquations were obtained by linear regression with the least squares method of the relationship between the heating time at 100 °C and the P_{100 °C} calculated from temperature history.

Table 3-1-2. Pasteurization values at 100 °C of samples installed to determined places in the retort sterilizer

Installation place ^a	Regression equation ^b	Coefficient of detrmination	P _{100 °C} (min)		
			100 °C, 7.5 min	100 °C, 12 min	100 °C, 14 min
1	P _{100 °C} =1.094×Heating time+2.758	0.995	11.0	15.9	18.1
2	P _{100 °C} =1.123×Heating time+2.545	1.000	11.0	16.0	18.3
3	P _{100 °C} =1.096×Heating time+2.576	1.000	10.8	15.7	17.9
4	P _{100 °C} =1.179×Heating time+1.740	1.000	10.6	15.9	18.2
5	P _{100 °C} =1.192×Heating time+1.514	1.000	10.5	15.8	18.2
6	P _{100 °C} =1.153×Heating time+2.231	0.999	10.9	16.1	18.4
7	P _{100 °C} =1.175×Heating time+1.857	0.999	10.7	16.0	18.3
8	P _{100 °C} =1.128×Heating time+1.741	0.999	10.2	15.3	17.5
9	P _{100 °C} =1.135×Heating time+1.850	0.999	10.4	15.5	17.7
10	P _{100 °C} =1.150×Heating time+1.842	0.998	10.5	15.6	17.9
11	P _{100 °C} =1.103×Heating time+2.153	0.999	10.4	15.4	17.6
12	P _{100 °C} =1.094×Heating time+1.905	1.000	10.1	15.0	17.2
13	P _{100 °C} =1.135×Heating time+1.582	1.000	10.1	15.2	17.5
14	P _{100 °C} =1.114×Heating time+1.897	0.999	10.2	15.2	17.5
15	P _{100 °C} =1.122×Heating time+1.414	0.999	9.8	14.9	17.1
16	P _{100 °C} =1.170×Heating time+0.948	0.999	9.7	15.0	17.3
17	P _{100 °C} =1.136×Heating time+1.353	0.999	9.9	15.0	17.3
18	P _{100 °C} =1.133×Heating time+1.349	1.000	9.8	14.9	17.2
19	P _{100 °C} =1.124×Heating time+1.271	1.000	9.7	14.8	17.0
20	P _{100 °C} =1.120×Heating time+1.375	0.999	9.8	14.8	17.1
21	P _{100 °C} =1.117×Heating time+1.440	0.999	9.8	14.8	17.1
22	P _{100 °C} =1.155×Heating time+0.913	1.000	9.6	14.8	17.1
23	P _{100 °C} =1.131×Heating time+1.051	1.000	9.5	14.6	16.9
24	P _{100 °C} =1.083×Heating time+1.767	1.000	9.9	14.8	16.9
25	P _{100 °C} =1.156×Heating time+0.799	1.000	9.5	14.7	17.0
26	P _{100 °C} =1.098×Heating time+1.443	1.000	9.7	14.6	16.8
27	P _{100 °C} =1.113×Heating time+1.108	1.000	9.5	14.5	16.7
28	P _{100 °C} =1.100×Heating time+1.265	1.000	9.5	14.5	16.7
29	P _{100 °C} =1.145×Heating time+0.763	0.996	9.4	14.5	16.8
30	P _{100 °C} =1.127×Heating time+0.917	1.000	9.4	14.4	16.7
31	P _{100 °C} =1.096×Heating time+1.020	1.000	9.2	14.2	16.4
32	P _{100 °C} =1.135×Heating time+0.415	0.999	8.9	14.0	16.3
33	P _{100 °C} =1.147×Heating time+0.257	1.000	9.2	14.3	16.6
34	P _{100 °C} =1.099×Heating time+1.061	0.999	9.3	14.2	16.4
35	P _{100 °C} =1.106×Heating time+1.056	1.000	9.4	14.3	16.5
36	P _{100 °C} =1.130×Heating time+0.326	0.995	8.8	13.9	16.1

^aEach number represents the installation place of samples in Figure 3-1-1B.

^bEquations were obtained by linear regression with the least squares method of the relationship between the heating time at 100 °C and the P_{100 °C} calculated from temperature history.

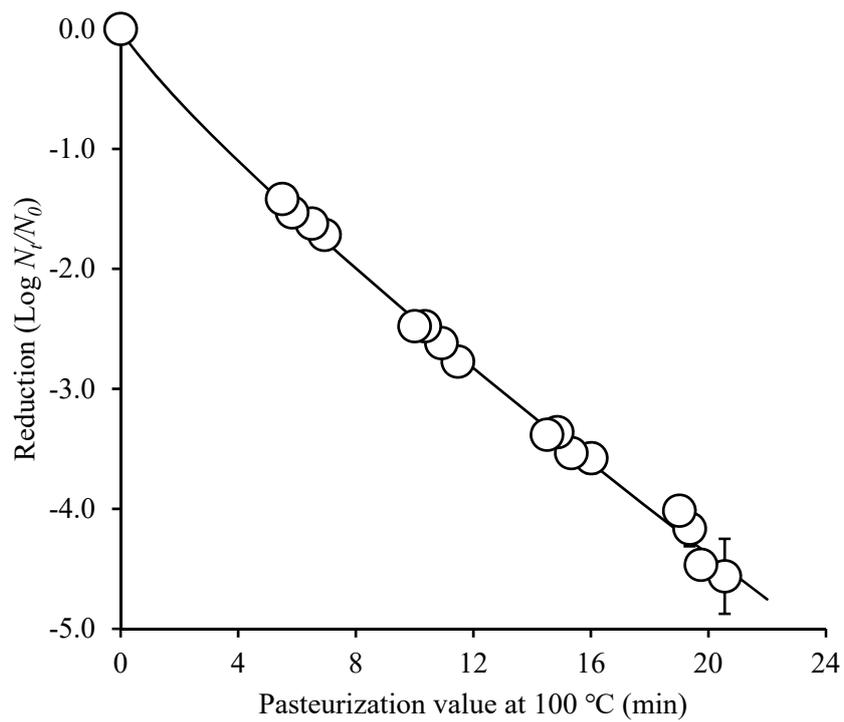


Fig. 3-1-2. Heat inactivation model to predict surviving spore numbers developed with the Weibull fitting.

N_0 or N_t represent viable spore numbers in 100 mL of 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) before or after^t heating at 100 °C, respectively. “t” represents the pasteurizing value at 100 °C calculated from the temperature history in samples heated for 4–16 min as z-value =10 °C.

Bars represent standard error.

Table 3-1-3. Quantification of surviving spores in 100 mL of phosphate buffer after heating with a retort sterilizer.

Installation place ^a	100 °C, 7.5 min			100 °C, 12 min			100 °C, 14 min		
	Observed data	Means ±SD	Predicted value ^b	Observed data	Means ±SD	Predicted value	Observed data	Means ±SD	Predicted value
1	11, 12, 13, 12, 10	11.6± 1.1	10.1	3, 1, 0, 0, 0	0.8±1.3	1.1	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.4
2	3, 9, 13, 12, 12	9.8± 4.1	10.1	2, 0, 0, 1, 1	0.8±0.8	1.0	0, 0, 1, 0, 0	0.2±0.4	0.4
3	3, 18, 10, 6, 7	8.8± 5.7	10.9	0, 0, 0, 2, 1	0.6±0.9	1.1	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.4
4	4, 11, 18, 16, 11	12.0± 5.4	12.1	0, 0, 3, 0, 1	0.8±1.3	1.1	1, 0, 0, 1, 0	0.4±0.5	0.4
5	12, 14, 9, 10, 12	11.4± 1.9	12.9	1, 2, 1, 0, 1	1.0±0.7	1.1	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.4	0.4
6	8, 21, 12, 16, 9	13.2± 5.4	10.5	0, 3, 0, 1, 2	1.2±1.3	1.0	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.4
7	9, 14, 20, 11, 7	12.2± 5.1	11.6	2, 0, 2, 0, 0	0.8±1.1	1.0	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.4
8	12, 16, 18, 18, 9	14.6± 4.0	14.5	2, 0, 1, 0, 0	0.6±0.9	1.4	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.5
9	4, 20, 12, 18, 9	12.6± 6.5	13.4	1, 1, 1, 1, 1	1.0±0.0	1.3	0, 0, 0, 1, 0	0.2±0.4	0.5
10	5, 14, 18, 15, 9	12.2± 5.2	12.8	0, 1, 1, 1, 0	0.6±0.5	1.2	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.4
11	14, 14, 20, 14, 14	15.2± 2.7	13.0	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.4	1.3	1, 0, 1, 0, 0	0.4±0.5	0.5
12	9, 16, 19, 8, 8	12.0± 5.1	15.1	0, 1, 1, 1, 0	0.6±0.5	1.6	1, 0, 0, 1, 0	0.4±0.5	0.6
13	9, 19, 20, 14, 13	15.0± 4.5	15.3	1, 0, 2, 0, 2	1.0±1.0	1.4	0, 0, 0, 2, 0	0.4±0.9	0.5
14	11, 13, 14, 14, 5	11.4± 3.8	14.4	0, 0, 1, 0, 1	0.4±0.5	1.4	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.5
15	2, 18, 10, 13, 7	10.0± 6.0	17.3	0, 0, 0, 0, 3	0.6±1.3	1.7	0, 0, 0, 0, 1	0.2±0.4	0.6
16	9, 15, 22, 10, 15	14.2± 5.2	18.2	3, 0, 0, 0, 2	1.0±1.4	1.6	0, 0, 1, 2, 0	0.6±0.9	0.6
17	15, 19, 23, 20, 6	16.6± 6.6	17.0	0, 0, 0, 1, 0	0.2±0.4	1.6	1, 0, 0, 1, 0	0.4±0.5	0.6
18	3, 30, 16, 24, 12	17.0±10.5	17.2	1, 2, 0, 1, 1	1.0±0.7	1.6	0, 1, 0, 0, 0	0.2±0.4	0.6
19	15, 22, 11, 8, 22	17.6± 4.7	18.4	2, 0, 1, 0, 0	0.6±0.9	1.8	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.4	0.6
20	15, 15, 15, 21, 9	15.0± 4.2	17.8	2, 0, 1, 0, 0	0.6±0.6	1.7	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.6
21	16, 24, 15, 11, 23	17.8± 5.5	17.4	2, 0, 4, 3, 0	1.8±1.8	1.7	0, 1, 2, 0, 0	0.6±0.9	0.6
22	11, 23, 13, 27, 9	16.6± 7.9	19.6	2, 1, 2, 4, 1	2.0±1.2	1.7	0, 0, 0, 3, 0	0.6±1.3	0.6
23	24, 19, 15, 21, 25	20.8± 4.0	20.0	1, 1, 1, 1, 2	1.2±0.4	1.9	2, 0, 0, 0, 0	0.4±0.9	0.7
24	12, 7, 22, 19, 17	15.4± 5.9	16.8	2, 0, 1, 2, 2	1.4±0.9	1.8	0, 0, 0, 0, 2	0.4±0.9	0.7
25	15, 24, 33, 13, 19	20.8± 8.0	20.6	1, 4, 4, 0, 1	2.0±1.9	1.8	2, 0, 0, 0, 0	0.4±0.9	0.6
26	9, 25, 21, 19, 17	18.2± 5.9	18.6	3, 2, 1, 1, 3	2.0±1.0	1.9	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.4	0.7
27	18, 20, 25, 14, 18	19.0± 4.0	20.7	2, 1, 1, 3, 0	1.4±1.1	2.0	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.7
28	17, 24, 21, 26, 22	22.0± 3.4	20.1	3, 0, 0, 2, 1	1.2±1.3	2.0	1, 0, 0, 0, 1	0.4±0.5	0.7
29	6, 7, 30, 28, 31	20.4±12.7	21.8	1, 0, 1, 1, 1	0.8±0.4	2.0	0, 0, 1, 1, 0	0.4±0.5	0.7
30	15, 22, 16, 25, 20	19.6± 4.2	21.6	1, 0, 0, 1, 0	0.4±0.5	2.0	0, 1, 0, 0, 0	0.2±0.4	0.7
31	12, 26, 19, 29, 20	21.2± 6.6	23.0	2, 0, 2, 1, 0	1.0±1.0	2.3	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.9
32	15, 29, 20, 28, 17	21.8± 6.4	26.7	3, 1, 0, 3, 1	1.6±1.3	2.4	0, 0, 0, 0, 0	0.0±0.0	0.9
33	14, 29, 22, 29, 15	21.8± 7.3	23.7	2, 4, 1, 6, 0	2.6±2.4	2.1	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.4	0.8
34	12, 25, 21, 23, 24	21.0± 5.2	22.3	3, 1, 2, 2, 2	2.0±0.7	2.2	0, 0, 0, 0, 1	0.2±0.4	0.8
35	23, 24, 20, 21, 25	22.6± 2.1	21.8	1, 5, 2, 1, 0	1.8±1.9	2.1	0, 0, 0, 0, 1	0.2±0.4	0.8
36	25, 14, 30, 27, 28	24.8± 6.3	28.4	2, 3, 1, 2, 0	1.6±1.1	2.6	0, 0, 0, 0, 0	0.4±0.5	0.9

^aEach number represents the installation place of samples in Figure 3-1-1B.^bTheoretical surviving spore numbers were calculated by substituting the P_{100 °C} of each sample represented in Table 3-1-2 and the initial spore concentration (3.6 log spores/100 mL) in Eq. 4.

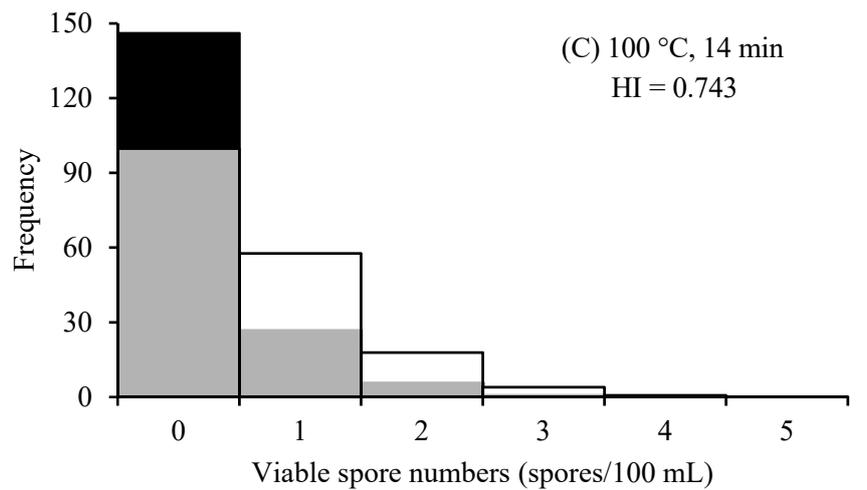
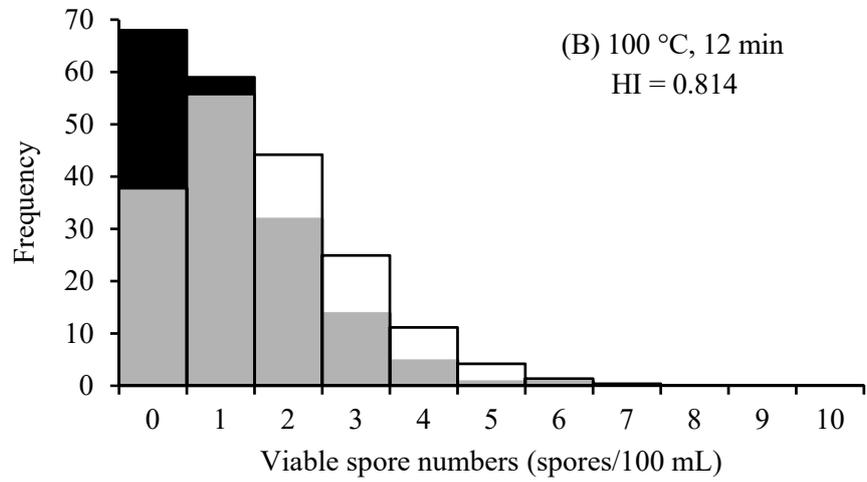
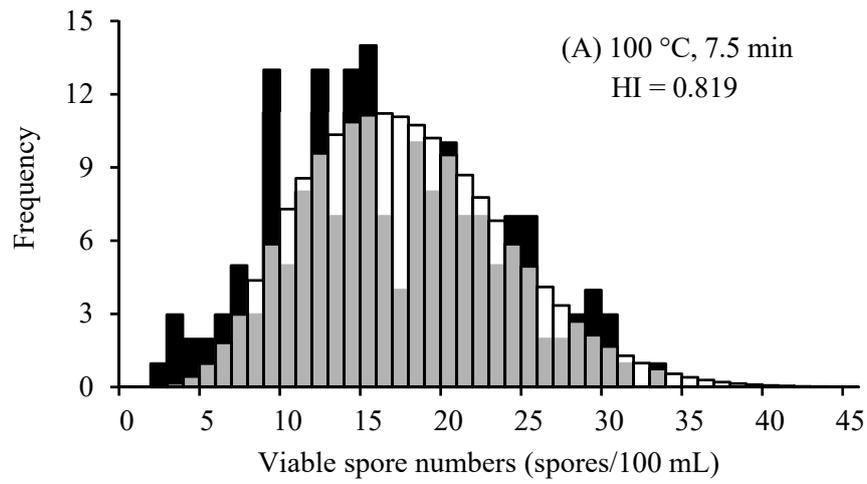


Fig. 3-1-3. Distributions of viable spore numbers in samples heated with the retort sterilizer at 100 °C for 7.5, 12, or 14 min. Columns represent observed data (■) and predicted data (□), respectively.

第2節 接種試験と生残芽胞数の変動性解析を組み合わせた加熱殺菌条件の設定

保存性の高い要冷蔵加工食品の製造者は、品質や生産性を向上させるために加熱殺菌条件をより穏和にできる方法を探求している (Daelman et al., 2013)。加熱処理後の目標芽胞数の設定を詳細に考えると加熱殺菌条件をより穏和にできる可能性がある。加工食品の加熱殺菌で求められる一般的な菌数低減の目標値は 5–6 桁である (佐藤, 2005)。殺菌前芽胞数および製品重量をそれぞれ 3 log spores/g および 100 g として 5–6 桁低減させたときの生残芽胞数は、製品あたり 1 個前後である。一方で、第2章1節では低温増殖性の *P. terrae* の芽胞が 10–100 個生残していても 10 °C で 4 週間保蔵できることを示した。すなわち、保存性の高い要冷蔵加工食品の加熱殺菌には必ずしも 1 個前後までの芽胞数低減が要求されるものではなく、一定期間増殖しない芽胞数水準を明らかにすることで加熱殺菌条件をより穏和にできると推察される。

微生物を接種した液体培地や加工食品を加熱し、一定期間保存した後に接種微生物の増殖を観察する実験を複数反復行くと、同じ実験条件でも増殖と非増殖の両方が観察されることがある (Tsuruma et al., 2021; Daelman et al., 2013)。微生物の死滅が一様であれば全ての反復で生残菌数は同じとなるはずであり、このような現象が観察されることはないと考えられる。すなわち、各反復の生残芽胞数は一様ではなかったと推察される。

加熱処理後の生残微生物数の分布を調査した研究では、加熱処理が強いほど生残微生物数の標準偏差が大きくなることが観察されている (Aguirre et al., 2009)。さらに、加熱殺菌を含めた微生物の不活化において、生残微生物数のばらつきは、生残 (不活化) 曲線から求めた理論値のポアソン分布で記述できることが示されている (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; 2019)。そのため、生残曲線を使った菌数予測にポアソン分布を組み合わせれば、一定時間加熱したあとの生残微生物数のばらつきを予測できる。このような手法を活用すると、同じ環境条件で増殖と非増殖の両方が観察された上述の研究事例 (Tsuruma et al., 2021; Daelman et al., 2013) において、加熱処理後の生残菌数のばらつきを予測できる上、ばらつきの累積確率と増殖／非増殖の比率と比較することによってその境界となる生残菌数が分かるかもしれない。また、Membréら (2006) は過去に報告された *B. cereus* 芽胞の耐熱性データとばらつきの確率分布を活用してレトルト殺菌機を使った穏和な加熱殺菌後の *B. cereus* の生残芽胞数を予測している。一方、芽胞を接種した加工食

品について、レトルト殺菌機での加熱処理後の生残芽胞数予測や、接種試験の結果を確率分布で解析することによる増殖／非増殖の境界の推定を行った実践例は見当たらない。

本節では、レトルト殺菌機を使った接種試験に確率論的解析を組み合わせた加熱殺菌条件の新たな設定方法を検討した。すなわち、加熱処理における死滅の変動性に起因する生残芽胞数のばらつきをポアソン分布から予測し、各芽胞数となる確率の累積値と接種試験の腐敗率を照合し、10 °C で 12 週間保存したときに接種菌株が腐敗水準まで増殖する生残芽胞数を推定した。

試料および方法

3-2-1. 供試菌株と芽胞懸濁液の調製

Paenibacillus sp. JCM13343 を用い、試料および方法 1-2-2 と同様の方法で芽胞懸濁液を調製し、以後の実験に供した。

3-2-2. 芽胞接種用カレーの調製

カレーフレーク (S&B 食品) 2000 g とグルコース (特級, 富士フィルム和光純薬) 120 g に水道水 9880 g を加え、70–80 °C で加温溶解した。この 800 g を樹脂製パウチに充填し、ヒートシーラー (FI-K300-10) で密封した。密封したカレーは、冷蔵温度帯での保存試験の妨げとなる微生物を殺滅するため、120 °C で 30 分間加熱し、試験に使用するまで 4 °C で保管した。なお、加熱後のカレーの pH, 水分活性および食塩濃度は、それぞれ、5.9, 0.98 および 0.9 g/100 mL であった。

3-2-3. 生残芽胞数予測モデルの作成

樹脂製パウチ (180 mm × 250 mm) に芽胞接種用カレー 100 g を充填し、初発芽胞数が 5.0 log spores/g となるように芽胞懸濁液を 100 μL 接種した。真空包装した後、レトルト殺菌機 (RCS-40RTGN, 当該パウチは最大 40 袋収容; 4 袋 × 10 段) で加熱した。レトルト殺菌機は次のプロセスの通り運転した。昇温 (15 °C から 98.0 °C まで約 6 分), 定温加熱 (98.0 °C, 10, 15, 20 および 25 分間), 冷却 (98.0 °C から 47 °C まで 15 分間)。検体は下から 1, 5, 6 および 10 段目に配置した。加熱処理後は直ちに氷水冷した後、生残芽胞数を測定した。す

なわち, 試料 25 g を無菌的にフィルター付ストマックバッグ (PX0020P) に採取し, 225 mL の滅菌希釈水を加えて 480 rpm で 1 分間ストマッキングした。調製した 10 倍希釈乳剤と 9.0 mL の滅菌希釈水で調製した 10 倍希釈液列について, 標準寒天培地を用いた混釈平板培養法 (30 °C, 3 日間) で生残芽胞数を測定した。試験は各加熱条件につき 3 回行った。芽胞の減少挙動は Weibull モデル (Eq.1, Koseki et al., 2021) で回帰分析し, パラメータ b および n を推定した。

$$\log_{10} Nt = -bt^n + \log_{10} N_0 \dots\dots\dots \text{Eq. 1}$$

t : 加熱時間

N_0 : 初発芽胞数

Nt : t 分加熱したときの芽胞数

3-2-4. 腐敗水準の生残芽胞数推定用の接種試験

樹脂製パウチ (180 mm × 250 mm) に芽胞接種用カレー 100 g を充填し, 初発芽胞数が 3.0 log spores/g となるように芽胞懸濁液を 1.0 mL 接種した。真空包装した後, レトルト殺菌機 (RCS-40RTGN) にて 98.0 °C で 10, 15, 20, 25, 31 および 37 分間加熱した。加熱時間が 25, 31 および 37 分間の接種試験は 3 回行った。運転プロセスは前項に準じた。加熱処理後の試料は直ちに氷水冷した後, 10 °C で最長 12 週間保存して生菌数を測定した。すなわち, 前項と同様に調製した 10 倍希釈乳剤とその 10 倍希釈液列について, 標準寒天平板培地を用いた表面塗抹培養法 (30 °C, 3 日間) で生菌数を測定した。

3-2-5. 腐敗水準の生残芽胞数検証用の接種試験

樹脂製パウチ (180 mm × 250 mm) に芽胞接種用カレー 100 g を充填し, 初発芽胞数が 2.5 log spores/g となるように芽胞懸濁液を 1.0 mL 接種した。真空包装した後, レトルト殺菌機 [RCS-80/10RSPXTGH, 日阪製作所, 庫内容量: 0.69 m³ (φ 800 mm × 奥行 1280 mm), 当該パウチは最大 168 袋収容; 7 袋 × 2 列 × 12 段] では 98.0 °C で 11.5, 24, 31 および 38 分間加熱した。24 および 31 分は 2 回行った。運転プロセスは 30 °C からの昇温 7.5 分, 98.0 °C での定温加熱, 34 °C までの冷却 27 分とした。加熱処理後の試料は直ちに氷水冷した後, 10 °C で最長 12 週間保存して生菌数を測定した。生菌数の測定は前項に準じた。

3-2-6. 加熱処理中の温度の測定

芽胞接種用カレー100 gを充填したパウチに無線式温度データロガー(Micropack III)を入れて密封し、レトルト殺菌機で加熱した時の内容物の温度を10秒間隔で記録した。PC interface system (Data Trace Version5.lnk) で温度記録を読み出した後、98.0 °C での Pasteurization value ($P_{98.0\text{ }^{\circ}\text{C}}$, Eq.2, Daelman et al., 2013) を算出した。

$$P_{98.0\text{ }^{\circ}\text{C}} = \int_0^t 10^{\left(\frac{T(t)-T(\text{ref})}{z}\right)} dt \dots\dots\dots \text{Eq. 2}$$

t : 経過時間

$T(t)$: 経過時間における温度

$T(\text{ref})$: 98.0 °C

z : 10°C

3-2-7. 生残芽胞数のばらつき推定

加熱処理後や乾燥環境, 酸性環境で生残菌数がばらつく確率はポアソン分布に従うことが示されている (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; 2019)。本研究でも前節において、レトルト殺菌機で加熱処理した後の生残芽胞数がばらつく確率がポアソン分布に従う可能性のあることを示した。そこで、生残芽胞数のばらつく確率がポアソン分布に従うと仮定して接種試験における加熱処理後の生残芽胞数のばらつきを推定した。すなわち、実測した初発芽胞数の平均値および98.0 °C相当での加熱時間 ($P_{98.0\text{ }^{\circ}\text{C}}$) の平均値を Eq. 1 に代入して、98.0 °C で所定時間加熱したときの生残芽胞数 (理論値, λ) を算出した。生残芽胞数のばらつきがポアソン分布に従うと仮定して理論値から各芽胞数にばらつく確率 $P(X = k)$ を求めた。

$$P(X = k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!} \dots\dots\dots \text{Eq. 3}$$

λ : Eq. 1 から算出した生残芽胞数

k : 芽胞数

e : ネイピア数

結果および考察

3-2-1. 生残芽胞数予測モデル

Paenibacillus sp. JCM13343 の芽胞を接種したカレーをレトルト殺菌機にて 98.0 °C で加熱した時の生残芽胞数の減少挙動を Fig 3-2-1 に示した。芽胞数の減少における昇温および冷却工程の影響も加味するため、横軸は温度履歴から算出した 98.0 °C での Pasteurization value ($P_{98.0^{\circ}\text{C}}$) とした。レトルト殺菌機にて 98.0 °C で 10, 15, 20 および 25 分間加熱すると、カレーに接種した *Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞は、それぞれ 0.8 log, 1.9 log, 2.7 log および 3.6 log 減少した。この減少挙動を Weibull モデル (Eq. 1) で回帰して得たパラメータ n , および b は、それぞれ 1.37 および 0.04 であり、生残芽胞数予測モデル (Eq. 4) を得た。Eq. 4 から算出した理論値と各実測値との誤差の指標である RMSE は 0.30 であった。

$$\log_{10} Nt = -0.04t^{1.37} + \log_{10} N_0 \dots\dots\dots \text{Eq. 4}$$

t : 98.0 °C での Pasteurization value ($P_{98.0^{\circ}\text{C}}$)

3-2-2. 接種試験における加熱処理後の生残芽胞数

Paenibacillus sp. JCM13343 の芽胞を接種したカレーの初発芽胞数は 3.2 log spores/g であった。レトルト殺菌機にて 98.0 °C で 10 分間加熱したカレー ($P_{98.0^{\circ}\text{C}} = 9.6$ 分) の生残芽胞数は 2.0–2.4 log spores/g であった。15 分間加熱したカレー ($P_{98.0^{\circ}\text{C}} = 15.5$ 分) では 4 検体のうち 3 検体の生残芽胞数は 1.2–1.4 log spores/g, 1 検体は検出限界未満 (<0.7 log spores/g) であった。20 分間加熱したカレー ($P_{98.0^{\circ}\text{C}} = 21.0$ 分) では 4 検体のうち 3 検体が検出限界未満であり, 25 分間加熱したカレー ($P_{98.0^{\circ}\text{C}} = 26.5$ 分) では 12 検体 (4 検体×3 バッチ) 全てが検出限界未満であった。Eq. 4 の $\log_{10} N_0$ に初発芽胞数 (3.2 log spores/g) を代入して $P_{98.0^{\circ}\text{C}}$ を変化させたときの生残曲線を記述したところ、各条件のプロットは生残曲線と概ね一致した (Fig. 3-2-2)。

3-2-3. 接種試験における *Paenibacillus* sp. JCM13343 の増殖

接種した *Paenibacillus* sp. JCM13343 の初発芽胞数が 3.2 log spores/g であったカレーを

加熱せずに 10 °C で保存したところ、2 週間後には生菌数が 5.0 log CFU/g に達し、12 週間後においても 5.0 log CFU/g 以上であった。98.0 °C で 10, 15 および 20 分間加熱したカレーにおいても、4 週間後ないしは 5 週間後には生菌数が 5.0 log CFU/g 以上の検体が観察され、12 週間は保蔵できなかつた。98.0 °C で 25 分間加熱したカレーの生菌数は、8 週間後では検出限界未満 (< 1.7 log CFU/g) であったが、12 週間後では 67 検体のうち 3 検体の生菌数が 5.0 log CFU/g 以上であった。残りの 64 検体の生菌数は検出限界未満であった。31 分間以上加熱したカレーの生菌数は、12 週間後も全ての検体で検出限界未満であった (Table 3-2-1)。

個々の細胞の性質は均一ではないため、微生物の不活化挙動は一様にはならない。特に、不活化が進んで菌量が少なくなると個々の細胞の性質が反映されやすくなり、観測データにはばらつきとして現れる (Aspridou and Koutsoumains, 2015)。例えば、加熱処理後の細菌数を測定すると、菌種や加熱媒体に関わらず加熱強度が高いほど、標準偏差が大きくなる (Aguirre et al., 2009)。*B. simplex* や *Escherichia coli* O157: H7 の死滅挙動の観察では、各々の生残曲線からの予測値がそれぞれ 1 log spores/100 μL および 1 log CFU/50 μL のとき、それぞれの実測値は 0 log/100 μL から 1 log spores/100 μL および 0 log/50 μL から 2 log CFU/50 μL に分布したことが報告されている (Abe et al., 2020; Hiura et al., 2020)。一方、不活化がさらに進行するとばらつきは解消されてゼロに収束する (Abe et al., 2019; 2020; Aspridou and Koutsoumains, 2015)。このようなことから、レトルト殺菌機での加熱処理後のカレーに生残する *Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞数のばらつきを考えると、加熱処理時間が 20 分間以下のカレーでは、芽胞数にばらつきはあるもののどの検体においても栄養増殖に影響がない芽胞が残っている状態、加熱処理時間が 25 分間のカレーでは、芽胞数のばらつきが収束に向かいつつあるものの一部の検体には栄養増殖に影響がない芽胞が残っている状態、加熱処理時間が 31 分間以上のカレーではばらつきが解消されてほとんど全ての検体で栄養増殖できる芽胞がゼロに収束した状態であると推察された。

3-2-4. 加熱処理後の生残芽胞数のばらつき予測と腐敗に至る生残芽胞数の推定

初発芽胞数が 3.2 log spores/g のカレー 100 g をレトルト殺菌機にて 98.0 °C で 20, 25, 31 および 37 分間加熱した時、Eq. 4 から算出した生残芽胞数 (λ) は、それぞれ 322.6, 32.4, 0.8 および 0.1 spores/100 g であった。個々の細胞の性質の不均一さに由来する生残菌数のば

らつきは、ポアソン分布 (Eq. 3) で記述できることがこれまでの研究で示されている (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; 2019)。レトルト殺菌機での加熱処理後の生残芽胞数のばらつきもポアソン分布に従うと仮定し、Eq. 3 から算出した生残芽胞数の確率分布を示した (Fig. 3-2-3)。98.0 °C で 25 分間処理したカレーの生残芽胞数は、15–55 spores/100 g と予測された (Fig. 3-2-3A)。一方、98.0 °C で 31 分間以上処理したカレーの生残芽胞数は 10 spores/100 g 未満と予測された (Fig. 3-2-3B および C)。なお、98.0 °C で 20 分間処理したカレーの生残芽胞数が 250 spores/100 g 以下である確率は 0.001 % 以下であった。

不活化処理後の生残芽胞数や生残菌数のばらつきは、96 穴マイクロプレートや試験管を使った独立した各試行の菌数とその頻度を測定して評価されることが多い (Abe et al., 2019, 2020; Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; Rodríguez et al., 2016)。また、レトルト殺菌機を使った加熱処理においても、各検体の死滅は、96 穴マイクロプレートの各ウェルや試験管毎の死滅と同様に独立した試行と言える。すなわち、100 検体について、25 spores/100 g である確率が 0.04、累積確率が 0.90 の場合、4 検体は生残芽胞数が 25 spores/100 g であり、86 検体は生残芽胞数が 24 spores/100 g 以下、10 検体は 26 spores/100 g 以上であると考えられる。*B. cereus* の GNG モデルを作成した Daelman ら (2013) も増殖確率 1 % は 100 検体のうち 1 検体で *B. cereus* が増殖する可能性があることを示唆すると考えている。この考えをもとに、10 °C で 12 週間保存したときに *Paenibacillus* sp. JCM13343 が検出水準 (1.7 log CFU/g) まで増殖しなかった検体の割合と生残芽胞数のばらつきの累積確率を比較して 12 週間保存において *Paenibacillus* sp. JCM13343 が増殖した試料の生残芽胞数を推定した。一部の検体でのみ *Paenibacillus* sp. JCM13343 が増殖した 98.0 °C で 25 分間加熱したカレーでは、*Paenibacillus* sp. JCM13343 が検出水準まで増殖しなかった検体の割合は、0.955 (64/67 検体) であった (Table 3-2-1)。これに対して、生残芽胞数のばらつきの累積確率は 41 spores/100 g で 0.941、42 spores/100 g で 0.957 であった (Fig. 3-2-3A)。このことから、12 週間の保存期間中に *Paenibacillus* sp. JCM13343 が増殖して腐敗に至る加熱処理後の生残芽胞数は 42 spores/100 g 以上と推定された。

3-2-5. 腐敗に至る生残芽胞数の検証

接種した *Paenibacillus* sp. JCM13343 の初発芽胞数が 2.9 log spores/g であったカレーを

加熱せずに 10 °C で保存すると 2 週間後には生菌数が 5.0 log CFU/g に達した。98.0 °C で 11.5 分間加熱したカレーにおいても、10 °C で 5 週間保存後には生菌数が 5.0 log CFU/g 以上の検体が観察され、12 週間保蔵は達成できなかった。98.0 °C で 24 分間加熱したカレーの生菌数は、8 週間後では検出限界未満 (< 1.7 log CFU/g) であったが、12 週間後には 239 検体のうち 14 検体の生菌数が 5.0 log CFU/g 以上になった。しかし、残りの 225 検体の生菌数は検出限界未満であった。98.0 °C で 31 分間以上加熱したカレーの生菌数は、12 週間後も全ての検体で検出限界未満であった (Table 3-2-2)。

初発芽胞数が 2.9 log spores/g のカレーを 98.0 °C で加熱した場合、24、31 および 38 分間加熱したときの $P_{98.0^{\circ}\text{C}}$ を Eq. 4 に代入して算出した生残芽胞数 (λ) は、それぞれ 43.4、1.5 および 0.0 spores/100 g であった。得られた λ を Eq. 3 に代入して得られた確率分布から 98.0 °C で 24 分間処理したカレーの生残芽胞数は 25–65 spores/100 g、31 分間以上処理したカレーの生残芽胞数は 10 spores/100 g 未満と推定された (Fig. 3-2-4)。一部の検体で *Paenibacillus* sp. JCM13343 が増殖した 98.0 °C で 24 分間加熱したカレーでは、*Paenibacillus* sp. JCM13343 が増殖しなかった検体の割合は、0.941 (225/239 検体) であった (Table 3-2-2)。これに対して生残芽胞数のばらつきの累積確率は 53 spores/100 g で 0.934、54 spores/100 g で 0.951 であった (Fig. 3-2-4A)。このことから、12 週間の保存期間中に *Paenibacillus* sp. JCM13343 が増殖して腐敗に至る加熱処理後の生残芽胞数は 54 spores/100 g 以上と推定された。

腐敗に至る生残芽胞数を推定するための接種試験では、*Paenibacillus* sp. JCM13343 の生残芽胞数が 42 spores/100 g 以上であると 12 週間の保存期間中に増殖して腐敗に至ると推定されたことから、生残芽胞数の推定値は概ね一致したと考えられる。このことから、接種微生物の増殖／非増殖両方の検体が観察された加熱処理条件において、非増殖検体の比率と生残芽胞数のばらつきの確率分布の累積値を比較すれば、腐敗に至る生残芽胞数の水準を推定できることが示唆された。

3-2-6. 確率分布に基づいた加熱殺菌条件の設定

第 5 項および第 6 項で腐敗に至る生残芽胞数の推定値が異なったように、推定値は接種試験の処理数量や生菌数測定検体数に応じてばらつくことが推察される。このばらつきを推定する手法は今後検討すべき課題である。今回は賞味期限設定の安全係数として

採用される 0.7 (厚生労働省・農林水産省, 2005) を明らかにした推定値 (41 spores/100 g) に乗じ, *Paenibacillus* sp. JCM13343 の生残芽胞数が 29 spores/100 g 以下であれば 10 °C で保存するカレーの 12 週間保蔵が達成できると設定した。初発芽胞数が 3.2 log spores/g であるカレー 100 g について, $P_{98.0^{\circ}\text{C}}$ と生残芽胞数が 29 spores/100 g 以下となる確率の関係を Fig. 3-2-5A に描画したところ, その確率は $P_{98.0^{\circ}\text{C}}$ が 26 分から 28 分の間で大きく変化し, それ以降で漸近的に 1.0 になった。また, $P_{98.0^{\circ}\text{C}}$ が 28.0 分および 29.0 分のカレーについて, 生残芽胞数が 29 spores/100 g 以下となる確率はそれぞれ, 99.27 % および 99.99 % 以上であった (Fig. 3-2-5B)。すなわち, 28.0 分では 10000 検体のうち 73 検体は目標値を達成できない可能性がある一方, 29.0 分では全ての検体で目標値を達成できる可能性が極めて高いことが示唆された。

Membré ら (2006) は *B. cereus* 芽胞の耐熱性データや温度履歴から算出した Pasteurization value を駆使してレトルト殺菌機で加熱殺菌したときの要冷蔵加工食品に生残する *B. cereus* の芽胞数を予測した。本節では, ばらつきを含めた生残芽胞数の予測手法に接種試験の結果を組み合わせ, 10 °C で 12 週間の保存期間内で腐敗に至る検体の生残芽胞数を推定し, 適切な加熱殺菌条件の設定を試みて良好な結果が得られた。接種試験のみで加熱殺菌条件を検討すると, 生菌数を測定した全ての検体で微生物の増殖が観察されなかった条件が基準となり, 定量的な根拠を持って加熱殺菌条件を設定することは困難である。一方, 接種微生物の耐熱性データ取得した上で, 接種試験で増殖/非増殖がともに観察された加熱殺菌条件について生残菌数のばらつきを予測し, 保存期間内で腐敗に至る生残菌数を推定すると確率分布の累積値を指標として加熱殺菌条件の良否を定量評価できるため, 根拠を以って加熱殺菌条件を設定できる。さらに, Fig. 3-2-5B に示したように, その累積値は 1 分単位で大きく変化するため, 品質変化との兼ね合いで厳格な加熱殺菌時間管理が求められる製品において効果を発揮すると推察される。

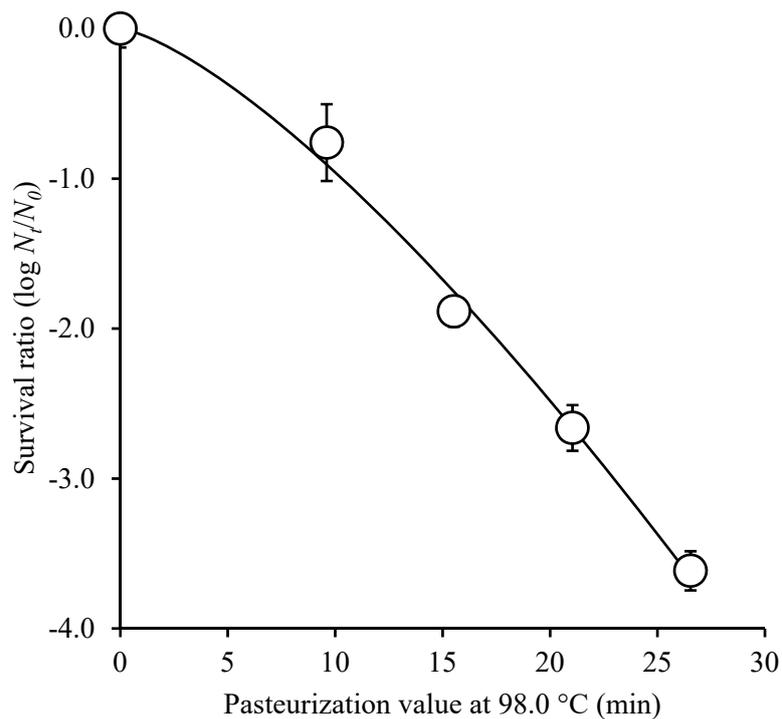


Fig. 3-2-1. Survival kinetics of *Paenibacillus* sp. JCM13343 spores in curry samples heated at 98.0 °C with the small retort sterilizer.

Circles and bars represent mean and standard error of four samples, respectively. The solid line shows the survival curve fitted with the Weibull model of changes in the surviving spore populations. The explanatory variable was the pasteurization value at 98.0 °C ($P_{98.0\text{ }^\circ\text{C}}$) and not the heating time at 98.0 °C to evaluate the heat inactivation effect of the whole process including the process of come-up and cooling down to/from 98.0 °C.

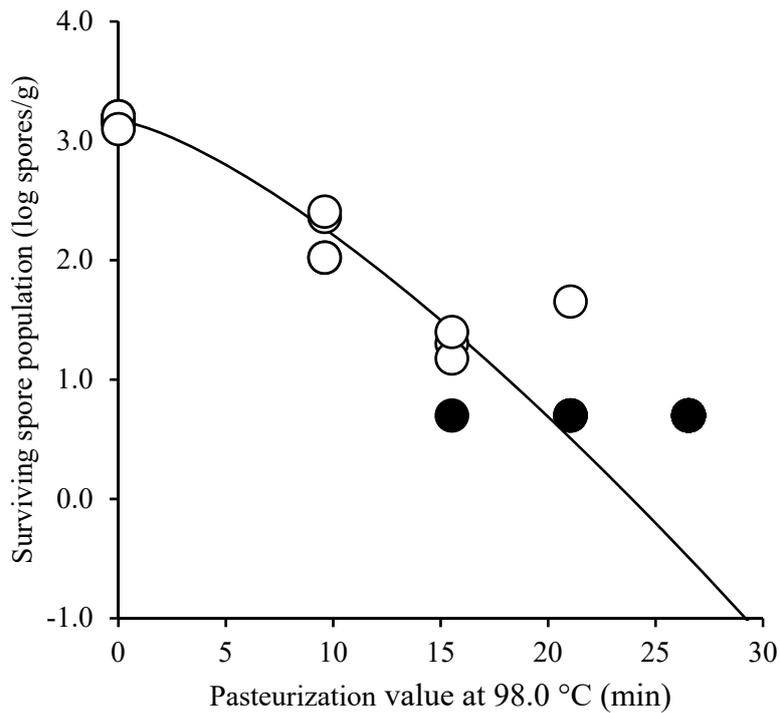


Fig. 3-2-2. Surviving spore populations of *Paenibacillus* sp. JCM13343 in curry samples used in the challenge tests.

The circles represent the observed data for each sample heated with a retort sterilizer. Shaded symbols indicate that viable spores were not detected by the pour culture method. A solid line represents the survival curve of the challenge test with a retort sterilizers. The explanatory variable was the pasteurization value at 98.0 °C ($P_{98.0\text{ }^\circ\text{C}}$) and not the heating time at 98.0 °C to evaluate the heat inactivation effect of the whole process including the process of come-up and cooling down to/from 98.0 °C.

Table 3-2-1. Challenge tests to determine the pasteurizing condition with a retort sterilizer to preserve curry samples inoculated *Paenibacillus* sp. JCM13343 spores for 12 weeks at 10 °C.

Heating time at 98.0 °C (min)	P _{98.0 °C} (min) ^a	Surviving population (log spores/g) ^b	Samples preserved for 12 weeks	
			Yes	No
25	26.5	-0.5	64	3
31	34.5	-2.1	108	0
37	39.9	-3.2	108	0

^aThe pasteurization value at 98.0 °C (P_{98.0 °C}) was calculated from Eq. 2 based on temperature history recorded with a wireless temperature data logger placed into the curry sample.

^bSurviving spore populations in heated samples were predicted by substituting the spore population in samples without heating and the P_{98.0 °C} in each heating condition with Eq. 4.

^cND indicates no colonies were detected from two spread plates with 100 µL of homogenates.

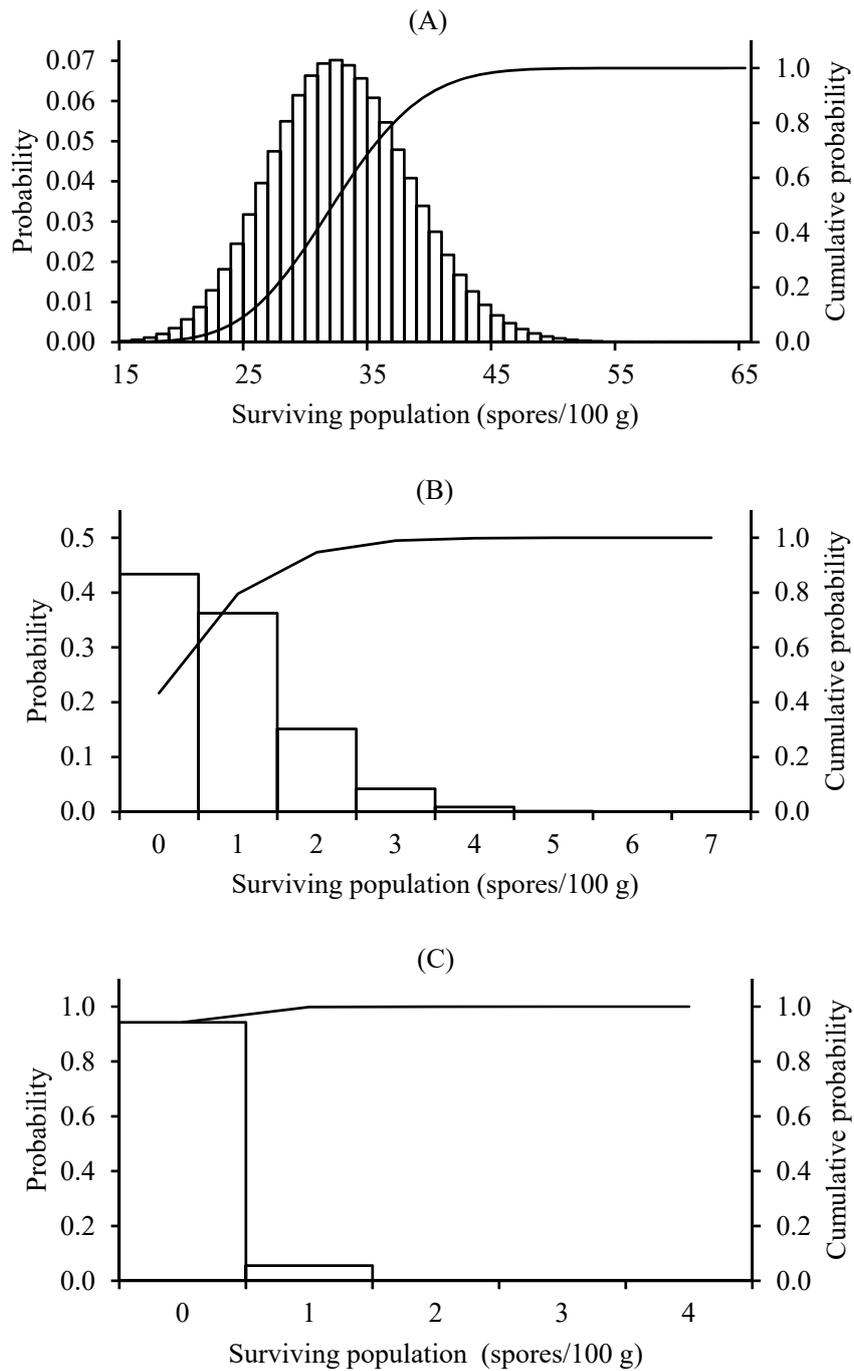


Fig. 3-2-3. Probabilistic distributions of surviving spore populations of *Paenibacillus* sp. JCM13343 in samples heated with a retort sterilizer.

The probabilities of surviving spore population were calculated with the assumption that the variation in the surviving spore populations shown in Table 3-2-1 followed the Poisson distribution. Probabilistic distributions of surviving spore population in samples heated at 98.0 °C for 25, 31, and 37 min are represented in (A), (B), and (C), respectively. The solid curve in each figure describes the cumulative value of the probabilities of each surviving spore population that occurred.

Table 3-2-2. Challenge tests to validate the pasteurizing condition with a retort sterilizer to preserve curry samples inoculated *Paenibacillus* sp. JCM13343 spores for 12 weeks at 10 °C.

Heating time at 98.0 °C (min)	P _{98.0 °C} (min) ^a	Surviving population (log spores/g) ^b	Samples preserved for 12 weeks	
			Yes	No
24	24.3	-0.4	225	14
31	31.8	-1.8	320	0
38	40.2	-3.6	123	0

^aThe pasteurization value at 98.0 °C (P_{98.0 °C}) was calculated from Eq. 2 based on temperature history recorded with a wireless temperature data logger placed into the curry sample.

^bSurviving spore populations in heated samples were predicted by substituting the spore population in samples without heating and the P_{98.0 °C} in each heating condition with Eq. 4.

^cND indicates no colonies were detected from two spread plates with 100 µL of homogenates.

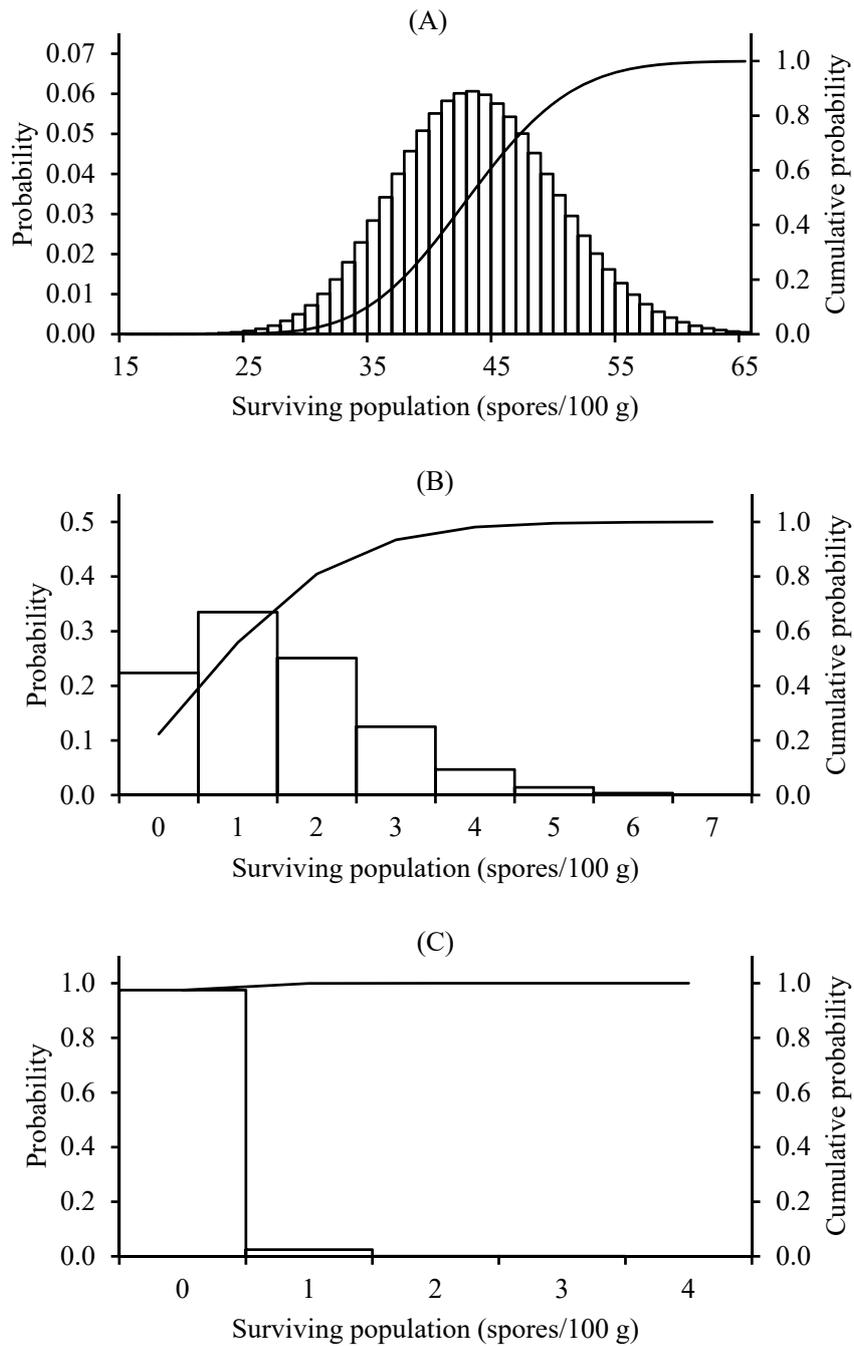


Fig. 3-2-4. Probabilistic distributions of surviving spore populations of *Paenibacillus* sp. JCM13343 in samples heated with a retort sterilizer.

The probability of each surviving spore population was calculated with the assumption that the variation in the surviving spore populations shown in Table 3-2-2 followed the Poisson distribution. Probabilistic distributions of surviving spore population in samples heated at 98.0 °C for 24, 31, and 38 min are represented in (A), (B), and (C), respectively. The solid curve in each figure describes the cumulative value of the probabilities of each surviving spore population that occurred.

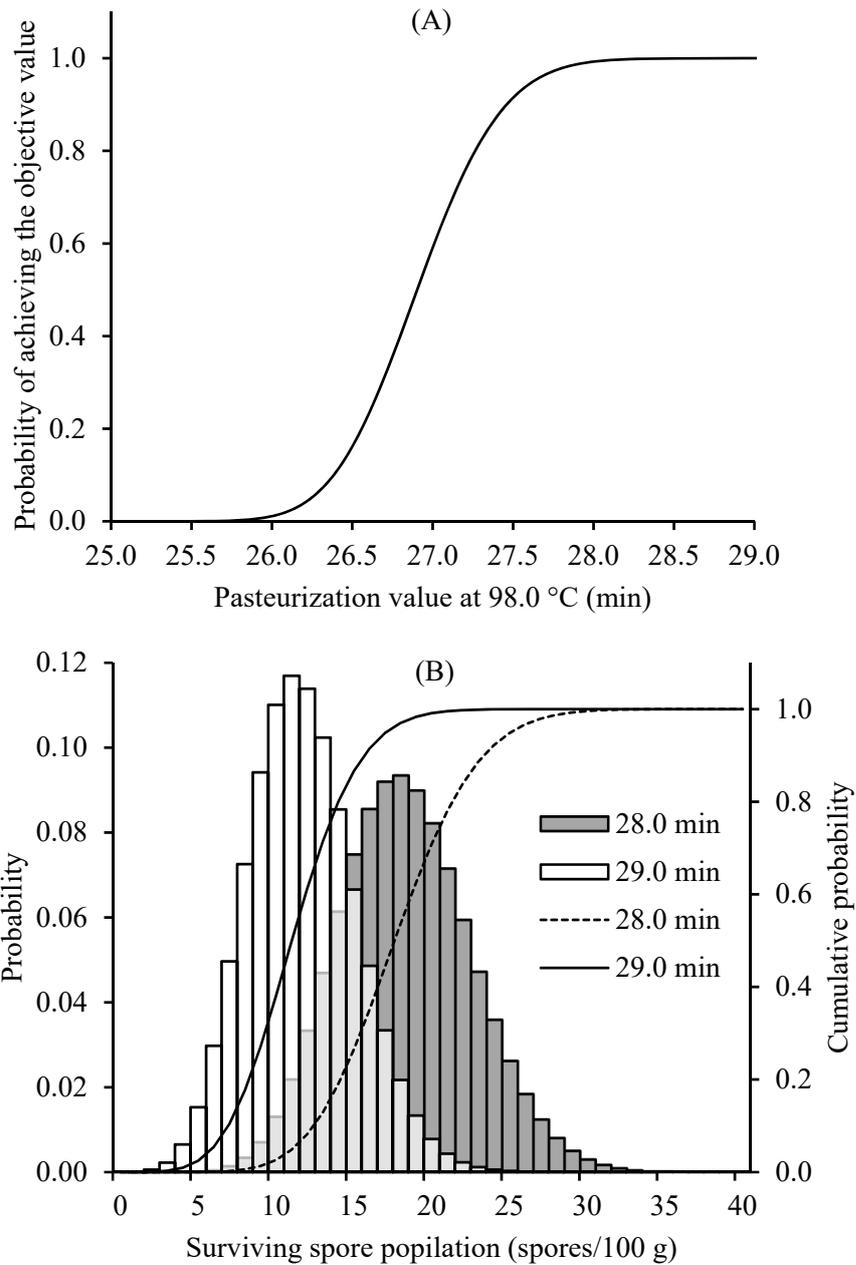


Fig. 3-2-5. The relationship between the pasteurizing condition and the probability of achieving the objective value of surviving populations of *Paenibacillus* sp. JCM13343 spores (A) and probabilistic distribution of surviving populations of *Paenibacillus* sp. JCM13343 spores in 100 g of curry samples heated for 28.0 and 29.0 min of the $P_{98.0\text{ }^\circ\text{C}}$ (B).

Inoculum volumes of the spore before heating and the objective value after pasteurization were set at 3.2 log spores/g and at most 29 spores/100 g, respectively. The probability of achieving the objective value represents the cumulative value of the probabilities of at most 29 surviving spores in the samples heated at 98.0 °C with the retort sterilizer. It was assumed that *Paenibacillus* sp. JCM13343 will be undetectable in curry samples stored for 12 weeks at 10 °C in curry if the surviving spore population is at most 29 spores per 100 g of samples.

第3節 腐敗境界予測による要冷蔵加工食品の加熱殺菌条件の設定

GNGモデルは、加熱処理条件やpH、水分活性などの複数の因子を様々な強度で組み合わせたときの微生物に対する影響を増殖確率として提示する (McMeekin et al., 2000)。複数の因子を様々な強度で組み合わせると試験条件は膨大になるため、GNGモデル作成のための増殖評価には、マイクロプレートを使うことが多い (Daelman et al., 2013; Tsuruma et al., 2021; Boix et al., 2021)。特に、加熱処理を検討する場合にはサーマルサイクラーで均一に多検体を加熱できる利点がある (Daelman et al., 2013; Tsuruma et al., 2021)。一方、マイクロプレートでの増殖評価は試験容量に制限があるため、このような試験系を基にしたGNGモデルの食品開発・製造への活用には注意が必要である。レトルトカレーに代表されるパウチ詰カレー等の重量は200g前後であるため、同じ加熱処理条件であってもマイクロプレートでの試験系とは生残菌数の絶対量が大きく異なる。すなわち、微生物が増殖する確率が著しく小さいと予測される環境条件で試作・製品化しても、期待した結果が得られない可能性が高い。

市販される95点(要冷蔵: 30点; 常温: 65点)のカレーやスープ、シチューのpHと水分活性(A_w)を調査したところ、pHは4.5–6.1、 A_w は0.960–0.985に分布した(小林, 2022)。芽胞の死滅挙動や発芽・増殖挙動は、pHや A_w の影響を受けて変化する(Casadei et al., 2000; Helmond et al., 2017; 駒木ら, 2017; López et al., 1996; Samapundo et al., 2011)。前節では、*Paenibacillus*属細菌を保存性検証のための指標菌として、パウチ詰カレー等の重量に近い100gの試験系にて、加熱処理にレトルト殺菌機を用いて予測微生物学の食品加工への応用を考えた。本来はこのような接種試験を網羅的に行うべきだが、マイクロプレートのように容易には実施できない。

加工食品を冷蔵保管すると、低温増殖性の*Paenibacillus*属細菌や*Bacillus*属細菌が増殖してくる(Carlin et al., 2000; Choma et al., 2000; Guinebretiere et al., 2001; Hamasaki et al., 2006; Helmond et al., 2017)。すなわち、低温増殖性芽胞形成菌を広く制御することができれば加工食品の冷蔵温度帯での長期間保蔵が達成される。その制御条件を設定するためには、多種多様な芽胞形成菌が分布すると考えられる加熱殺菌前の加工食品を対象としたGNGモデルの作成が必要と考えた。そこで本節では、様々な加熱殺菌条件で処理したカレーやスープの保存試験結果から腐敗境界を予測し、加熱殺菌条件の設定を試みた。

試料および方法

3-3-1. 供試試料

北海道内のレトルト食品企業が製造するレトルトカレーおよびスープの密封済未殺菌品 11 点について、9 点を腐敗境界予測モデル作成用試料、2 点を予測モデル検証用試料として供試した (Table 3-3-1)。各企業での製造後は試験まで 4 °C 以下で保管し、3 日以内にレトルト殺菌機で処理した。

3-3-2. 供試試料の理化学分析

pH, 水分活性および塩分濃度を測定した。pH はコンパクト pH メーター (LAQUAtwin-pH-22B, 堀場製作所) の電極部分に試料を満載して測定した。水分活性は測定用カップの基準線まで試料を入れて水分活性測定装置 (LabMaster-AW, Novasina) で測定した。測定温度は 25 °C, 温度および水分活性の安定時間はともに 5 分間とした。塩分濃度は試料を蒸留水で 10 倍重量に希釈し、塩分計 (PAL-SALT, アタゴ) で測定した。

3-3-3. 供試試料の耐熱性細菌分析

測定前にパウチ内の細菌分布が均一になるようにパウチをよく揉んで内容物を混和した。試料 25 g を無菌的にフィルター付ストマックバッグ (PX0020P) に採取し、225 mL の滅菌希釈水を加えて 480 rpm で 1 分間ストマッキングし、10 倍希釈乳剤を調製した。調製した 10 倍希釈乳剤 30 mL を 50 mL 容遠沈管に採り、80 °C で 20 分間加熱して大腸菌群等の易熱性細菌を殺滅した後、9.0 mL の滅菌希釈水で 10 倍希釈液列を調製した。加熱済みの 10 倍希釈乳剤ならびにその 10 倍希釈液列について、好気性および通性嫌気性菌の芽胞は混積平板培養法 (標準寒天培地, 30 °C, 3 日間) で、クロストリジウムは試料液 10 mL に培地 15 mL を加えるパウチ培養法 [クロストリジウム測定用培地 (島津ダイアグノスティクス), 35 °C, 1 日間] で測定した。

3-3-4. レトルト殺菌機での加熱処理と保存試験

冷蔵保管した試料は、恒温化するために 20 °C で 30 分間保持した後、レトルト殺菌機 (RCS-40RTGN) で 90–112 °C で一定時間処理した。運転プロセスは、設定温度までの昇温

工程: 5 分, 設定温度での定温加熱工程, 冷却工程: 10 分とし, 運転終了後は直ちに氷水冷した。加熱処理した試料は, それぞれ 10 °C で 12 週間および 30 °C で 5 日間保存した後に開封して一般生菌数, 嫌気性菌数および pH を測定した。検体からの内容物の採取と 10 倍希釈乳剤ならびに 10 倍希釈液列の調製は第 3 項と同様に行い, 標準寒天平板培地に塗抹した。一般生菌数は 30 °C で 3 日間, 嫌気性菌数は, 平板を酸素吸収・炭酸ガス発生剤(アネロパック・ケンキ, ジャー用, 三菱ガス化学)とともにパウチ袋(A-93, 三菱ガス化学)に入れて専用クリップ(A-75, 三菱ガス化学)で口部を密閉した後に 30 °C で 7 日間嫌気培養して計数した。pH は第 2 項と同様に測定した。

3-3-5. レトルト殺菌機での加熱処理の温度履歴と Pasteurization value の算出

加熱処理の温度履歴は, 無線式温度データロガー(Micropack III)で測定した。すなわち, データロガーを入れて密封した検体を最上段(1 段目)および最下段(10 段目)に設置し, レトルト殺菌機で加熱した時の内容物の温度を 10 秒間隔で記録した。記録した温度履歴は PC interface system (Data Trace Version5.lnk) で読み出した後, 100 °C での Pasteurization value ($P_{100^{\circ}\text{C}}$, Eq.1, Daelman et al., 2013) を算出した。

$$P_{100^{\circ}\text{C}} = \int_0^t 10^{\left(\frac{T(t)-T(\text{ref})}{z}\right)} dt \dots\dots\dots \text{Eq. 1}$$

t: 経過時間

$T(t)$: 経過時間における温度

$T(\text{ref})$: 100 °C

z: 10 °C

3-3-6. 腐敗境界予測モデルの作成

保存試験の結果をもとに, 菌数増加もしくは pH 低下が認められた検体を腐敗(1), それ以外を正常(0)と判定し, 腐敗境界予測モデルを作成した。すなわち, 加熱前試料の pH, 塩分濃度, 耐熱性芽胞数および 100 °C での Pasteurization value ($P_{100^{\circ}\text{C}}$) を説明変数として, 保存試験の結果について以下のモデル式 (Eq. 2) を用いてロジスティック回帰分析し, 各説明変数の偏回帰係数を推定した。

$$\text{Logit}(P) = \ln\left(\frac{P}{1-P}\right) = b_0 + b_1 pH + b_2 NaCl + b_3 \log_{10} Spore + b_4 \log_{10} P_{100^\circ C} \dots\dots\dots \text{Eq. 2}$$

P : 腐敗確率

pH : 加熱処理前の pH

$NaCl$: 加熱処理前の塩分濃度

$\log_{10} Spore$: 加熱処理前の耐熱性芽胞数

$\log_{10} P_{100^\circ C}$: $100^\circ C$ での Pasteurization value

b_i ($i = 0, \dots, 4$): 推定される偏回帰係数

3-3-7. 腐敗境界予測モデルの適合度評価および精度評価

適合度評価では, Daelman らの報告 (2013) を参考に, 逸脱度 (Deviance), 赤池情報量規準 (AIC) およびベイズ情報量規準 (BIC) を算出した。精度評価では, Tsuruma らの報告 (2021) を参考に, 混合行列 (Confusion matrix), 誤答率 (% of fail-safe, % of fail-dangerous) および ROC 曲線 (Receiver operating characteristic curve) の下側面積を算出した。腐敗検体数および正常検体数の予測値は, Eq. 2 の各説明変数に供試試料の各測定値を代入して腐敗確率を求め, 測定検体数を乗じて得た。なお, 小数点以下は四捨五入した。

(1) Confusion matrix

予測値と実測値を比較して次の 4 つに分類した; 真陰性 (true negative, TN: 予測では正常であり, 実測でも正常であった検体), 偽陽性 (false positive, FP: 予測では腐敗であったが, 実測では正常であった検体), 偽陰性 (false negative, FN: 予測では正常であったが, 実測では腐敗であった検体) および真陽性 (true positive, TP: 予測では腐敗であり, 実測でも腐敗であった検体)。4 つの分類から正答率 (fraction correct: FC, Eq. 3, Hajmeer and Basheer, 2003) を算出した。

$$FC = \frac{N_{TN} + N_{TP}}{N_{TN} + N_{FP} + N_{FN} + N_{TP}} \dots\dots\dots \text{Eq. 3}$$

N_{TN} : TN に分類された検体総数

N_{FP} : FP に分類された検体総数

N_{FN} : FN に分類された検体総数

N_{TP} : TP に分類された検体総数

(2) Fail-safe および Fail-dangerous

不正確な予測は, fail-dangerous (予測では正常であった, 実測では腐敗であった検体) および fail-safe (予測では腐敗であったが, 実測では正常であった検体) に分類し, それぞれ正常および腐敗と予測した検体数に対する割合を求めた (Mejlholm et al., 2010)。

(3) ROC 曲線の下側面積 (Area under the ROC curve, AUC)

ROC 曲線の下側面積 (AUC) は, 統計解析ソフト R (ver. 4.1.3) の ROCR パッケージを使って解析した。AUC は 1 に近いほど良く, > 0.7 で Acceptable, > 0.8 で Excellent と考えられている (Hosmer and Lemeshow, 2000)。

結果および考察

3-3-1. カレーおよびスープの理化学分析値および耐熱性細菌数

供試試料の理化学分析値 (pH, Aw および塩分濃度) および耐熱性細菌数 (耐熱性芽胞およびクロストリジア) を Table 3-3-1 に示した。好気性および通性嫌気性細菌の芽胞数は 1.5-4.1 log spores/g と試料間で最大約 1,000 倍異なった一方で, クロストリジアは 8 試料では検出されず, 残り 3 試料も極微量であった。

3-3-2. 腐敗境界予測モデル作成用試料の保存性

腐敗境界予測モデル作成用試料 9 点の保存試験結果を Table 3-3-2 に示した。10 °C で 12 週間の保存性を評価した 7 試料 25 条件のうち, 2 試料 3 条件 (試料 D: $P_{100^{\circ}\text{C}}=10.4$ 分; 試料 E: $P_{100^{\circ}\text{C}}=2.1$ 分および 9.9 分) で検体の腐敗が観察された。一方, 10 °C で 12 週間保蔵できた 22 条件のうち, 30 °C で 5 日間保存しても検体の腐敗が観察されなかった条件は 10 条件のみ (試料 A: $P_{100^{\circ}\text{C}}=41.1$ 分; 試料 C: $P_{100^{\circ}\text{C}}=39.0$ 分; 試料 E: $P_{100^{\circ}\text{C}}=94.3$ 分, 128.1 分および 294.1 分; 試料 H: $P_{100^{\circ}\text{C}}=52.0$ 分および 159.5 分; 試料 I: $P_{100^{\circ}\text{C}}=48.6$ 分, 151.0 分および 482.7 分) であった。また, 30 °C で 5 日間の保存で腐敗した検体が観察されなかった条件のうち, 10 °C で 12 週間の保存で腐敗した検体が観察された条件はなかった。すなわち, 30 °C で 5 日間保蔵を達成する加熱殺菌条件は, 10 °C で 12 週間保蔵を達成するための十分条件であると示唆された。なお, 腐敗した検体について, 嫌気培養のみで生菌が検出された条件はなく, 好気培養と嫌気培養で同程度の生菌の検出, もしくは好気培養のみで生菌の検出であったことから, 偏性嫌気性菌が増殖したと推察される条件はなかった。

要冷蔵加工食品は, 流通や販売, 購入後の消費者の持ち帰りにおいて保管温度が逸脱する場合が想定される (Jevšnik et al., 2008; Nauta et al., 2003; Ovca and Jevšnik, 2009)。保管温度の逸脱は, 製品中に生残する微生物が増殖する機会となるため, 温度逸脱があったときの微生物制御効果や微生物の増殖挙動が検証されている (Ingham et al., 2010; Roccatto et al., 2015; Thorsen et al., 2009)。我が国においても, 1999 年に要冷蔵保管のハヤシライスソースを室温で 8 日間放置した後に喫食したことを原因とするボツリヌス菌食中毒が発生しており, 設定した保管条件からの温度逸脱によるトラブルが発生している (内村・小岩井,

2000)。レトルトパウチや樹脂製パウチに密封された要冷蔵加工食品は、その外観から常温で保存可能なレトルト食品と誤認され易く、常温環境に放置される可能性がある。上述のハヤシライスソースでの食中毒が発生して以降、このような製品では「要冷蔵」を強調して表示する旨の通知があったが、いまだに誤って常温で販売した製品の自主回収が散見されるため、消費者庁ならびに厚生労働省から改めて保管温度について注意喚起されている(厚生労働省, 1999; 消費者庁・厚生労働省, 2023)。すなわち、レトルトパウチや樹脂製パウチに密封された要冷蔵加工食品は、現在においても出荷後に設定した保管温度から逸脱するリスクのある製品であるといえる。そのため、要冷蔵加工食品の製造にあたっては、室温で数日間程度放置しても微生物が増殖しない製品設計を検討すべきと考えられている。

3-3-3. 腐敗境界予測モデル

供試試料の加熱処理前検体からクロストリジアがほとんど検出されなかったこと、ならびに偏性嫌気性菌による腐敗は発生しなかったと推察されたことから Eq. 2 の説明変数: $\log_{10} Spore$ を通性嫌気性および好気性の中温性細菌の芽胞数として 30 °C, 5 日間の保存試験結果をロジスティック回帰分析した。各説明変数の偏回帰係数と得られたモデル式の適合度は Table 3-3-3 に示した。説明変数の偏回帰係数を比較すると、内容物への加熱殺菌効果および加熱処理前試料の食塩濃度は負値, 加熱処理前試料の pH および芽胞数は正值であった。その中でも、内容物への加熱殺菌効果と加熱処理前試料の芽胞数は腐敗確率に有意に影響した。また、モデル作成用試料の腐敗確率を算出し、測定試料数を乗じて腐敗試料数を予測した。予測精度の指標である FC, Fail-dangerous, Fail-safe, および AUC は、それぞれ、0.893, 8.2 %, 15.6 % および 0.879 であった (Table 3-3-4)。

本モデル式 (Eq. 2) では、偏回帰係数が負値の説明変数は、変数が大きくなると腐敗確率が低まる。反対に、正值の説明変数は、変数が大きくなると腐敗確率が高まる。一般的に、加熱殺菌条件を強めると生残菌数はより少なくなるため、腐敗が発生する可能性は小さくなる。また、加熱殺菌前試料の芽胞数が多いと、加熱殺菌条件を強めない限り芽胞を十分に低減できず、腐敗する可能性は大きくなる。保存試験の結果を検体が「腐敗した」、または「腐敗しなかった」の二つに分類してロジスティック回帰分析するによって、加熱殺菌条件と加熱処理前の芽胞数、腐敗の三者の関係を定量的に表現できた。また、製品

の pH を下げることは、加熱殺菌において微生物の死滅が促進されるため、ならびに保存中の増殖に負の効果を発揮するため、効果的な微生物制御方法であることはよく知られているが、本モデル式では pH が腐敗確率に影響したとは言い切れなかった。本モデル式は、原材料構成の異なる様々な試料を用いて作成したため、試料毎に分布する芽胞の種類は異なると推察された。芽胞の耐熱性や発芽・増殖に対する pH 感受性は一様ではない (Daelman et al., 2013; Helmond et al., 2017; 山本ら, 1990)。すなわち、多様な芽胞を対象にしてモデル式を作成したために有意な効果として現れなかったと推察された。

3-3-4. GNG モデル検証用試料の保存性と GNG モデルの検証

GNG モデル検証用試料の保存試験結果と予測精度を Table 3-3-5 に示した。2 試料 11 条件全てにおいて、10 °C、12 週間の保存で腐敗した検体は観察されなかった。一方、30 °C で 5 日間保存しても腐敗した検体が観察されなかった条件は 5 条件のみ (試料 J: $P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}} = 28.4$ 分, 48.3 分および 226.6 分; 試料 K: $P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}} = 144.9$ 分および 468.4 分) であった。30 °C、5 日間保存での腐敗試料数の予測値を基に算出した FC, Fail-dangerous, Fail-safe, および AUC は、それぞれ、0.961, 2.1 %, 8.5 % および 0.956 であった (Table 3-3-5)。

FC は 0.65–0.8 で Acceptable, 0.85 や 0.90 で High accuracy と言われている (Daelman et al., 2013; Kuroda et al., 2019; Tsuruma et al., 2021)。本モデル式の FC および AUC は、それぞれ 0.961 および 0.956 であったため、十分な予測精度であることが推察された。特に、腐敗した検体と正常な検体の両方の観察が予測される境界条件付近でもその比率は実測値と概ね一致した。

GNG モデルの作成と検証では何らかの指標菌が対象とすることが一般的である。その中には単一菌株では増殖範囲が限られるため、複数菌株を混合して検討する例もある (Evans et al., 2004; Ingham et al., 2010; Koutsoumanis et al., 2004)。本研究では、さらに実用的な予測モデルとなるように、加熱殺菌前の加工食品に分布する芽胞に着目して腐敗境界を予測した。供試試料は複数の製造企業から調達し、原材料も様々である。そのため、加熱殺菌前の供試試料に分布する芽胞は多種多様であることが推察された。このような条件でも本モデルは腐敗境界を高精度に予測できたことから、カレーを中心とした保存期間の長い要冷蔵加工食品の製品設計への活用が期待できる。

Table 3-3-1. Physicochemical and microbiological characteristics of curry and soup samples before pasteurization with retort sterilizer.

Sample	Physicochemical quality			Microbiological characteristics	
	pH	Aw	Salt (g/100 mL)	Facultative anaerobic and aerobic mesophilic bacteria (log spores/g)	Clostridia ^a (log spores/g)
Model developing					
A	5.5	0.976	0.9	2.9	-0.4
B	5.9	0.978	0.5	1.9	-0.1
C	5.2	0.965	1.2	2.1	Not detected ^b
D	5.6	0.976	1.0	4.1	-0.8
E	5.9	0.974	1.0	2.6	Not detected
F	5.3	0.971	0.9	3.2	Not detected
G	5.3	0.972	1.0	2.6	Not detected
H	5.0	0.972	1.1	2.6	Not detected
I	5.2	0.974	1.2	1.5	Not detected
Model validation					
J	5.3	0.972	1.1	1.8	Not detected
K	5.5	0.975	0.9	3.6	Not detected

^aMore than 5.0 g samples were determined.

^bThe typical black colony was not detected in all pouches.

Table 3-3-2. Pasteurizing condition to preserve samples for developing the GNG model at refrigerated and ambient temperature.

Sample	Pasteurizing Condition				10 °C for 12 weeks		30 °C for 5 days	
	No.	Temp. (°C)	Time (min)	P _{100 °C} (min) ^a	Yes ^b	No ^c	Yes	No
A	1	100	18	8.2	60	0	3	5
	2	100	30	20.9	59	0	7	1
	3	100	48	41.1	50	0	4	0
B	4	100	18	8.5	30	0	0	8
	5	100	30	21.2	30	0	2	6
	6	100	48	39.9	25	0	2	2
C	7	100	18	7.8	28	0	2	5
	8	100	30	19.5	28	0	5	2
	9	100	48	39.0	28	0	7	0
	10	105	48	136.8	Not determined		4	0
D	11	110	48	391.0	Not determined		4	0
	12	100	18	10.4	68	16	0	9
	13	100	30	23.7	42	0	2	7
	14	100	48	44.3	27	0	3	6
	15	105	48	140.7	Not determined		8	0
	16	110	48	447.7	Not determined		8	0
	E	17	100	18	2.1	0	12	0
18		100	30	9.9	9	3	1	9
19		100	48	26.4	12	0	9	1
20		102	35	21.9	12	0	9	1
21		102	45	40.1	12	0	9	1
22		105	48	94.3	12	0	10	0
23		107	45	128.1	12	0	10	0
24		110	48	294.1	12	0	10	0
F	25	100	48	41.5	Not determined		4	0
	26	105	16	20.7	Not determined		5	3
	27	105	48	131.7	Not determined		4	0
G	28	100	48	41.5	Not determined		2	2
	29	105	16	20.7	Not determined		3	5
	30	105	48	131.7	Not determined		4	0
H	31	102	30	52.0	7	0	10	0
	32	107	30	159.5	7	0	10	0
I	33	90	30	2.8	Not determined		0	8
	34	100	48	48.6	12	0	6	0
	35	105	48	151.0	12	0	8	0
	36	110	48	482.7	12	0	6	0

^aCalculated from the temperature history recorded with a data logger put into a pouch.

^bNot observed microbial growth and pH changes.

^cObserved microbial growth or pH changes.

Table. 3-3-3. Statics parameters obtained for logistic regression model for spoilage boundary of pasteurized refrigerated curry and soup.

Variable/Performance statics	Coefficient	Standard error	<i>p</i> -value
Intercept	4.0875306	6.2987	0.516373
pH	0.3516857	0.9466	0.710252
NaCl	-2.0361651	1.6608	0.220206
log ₁₀ spore	1.1282325	0.7592	1.05e-13
log ₁₀ P _{100 °C}	-5.6442815	0.3314	0.000663
Number of observations			272
Deviance ^a			170.76
AIC ^b			180.76
BIC ^c			198.79

^aDeviance = $-2 \cdot \ln(L)$, the L is the likelihood in its optimum.

^bAkaike's Information Criterion = $-2 \cdot \ln(L) + 2 \cdot k$, the k is the number of parameters in the model.

^cBayesian Information Criterion = $-2 \cdot \ln(L) + k \cdot \ln(n)$, the n is the number of observations.

Table 3-3-4. Predictive performance of the developed GNG model on observed data in samples for GNG model developing.

Sample	Condition No. ^a	30 °C for 5 days ^b		Confusion matrix			
		Yes	No	TP ^c	FN ^d	FP ^e	TN ^f
A	1	1	7	5	0	2	1
	2	4	4	1	0	3	4
	3	3	1	0	0	1	3
B	4	1	7	7	1	0	0
	5	5	3	3	3	0	2
	6	3	1	1	1	0	2
C	7	2	5	5	0	0	2
	8	6	1	1	1	0	5
	9	7	0	0	0	0	7
	10	4	0	0	0	0	4
	11	4	0	0	0	0	4
D	12	0	9	9	0	0	0
	13	3	6	6	1	0	2
	14	6	3	3	3	0	3
	15	8	0	0	0	0	8
	16	8	0	0	0	0	8
E	17	0	10	10	0	0	0
	18	2	8	8	1	0	1
	19	7	3	1	0	2	7
	20	6	4	1	0	3	6
	21	9	1	1	0	0	9
	22	10	0	0	0	0	10
	23	10	0	0	0	0	10
F	24	10	0	0	0	0	10
	25	3	1	0	0	1	3
	26	3	5	3	0	2	3
G	27	4	0	0	0	0	4
	28	4	0	0	2	0	2
	29	5	3	3	2	0	3
H	30	4	0	0	0	0	4
	31	10	0	0	0	0	10
I	32	10	0	0	0	0	10
	33	0	8	8	0	0	0
	34	6	0	0	0	0	6
	35	8	0	0	0	0	8
	36	6	0	0	0	0	6
Total ^g				76	15	14	167
FC ^h							0.893
Fail-dangerous (%) ⁱ							8.2
Fail-safe (%) ^j							15.6
AUC ^k							0.879

^aRefer to the pasteurizing condition number in Table 3-3-2.

^bPredictive numbers of pouch spoiled or not.

^{c, d, e, and f}Numbers of true positive, false negative, false positive, and true negative, respectively.

^gSum of numbers from Condition No. 1 to 36.

^hFraction correct calculated from total numbers of TP, FN, FP, and TN.

ⁱratio of spoiled pouch but predicted as not spoil.

^jratio of not spoiled pouch but predicted as spoil.

^kArea under the ROC curve.

Table 3-3-5. Validation of pasteurizing conditions to preserve samples at refrigerated and ambient temperature and of the predictive performance of the developed GNG model.

Sample	Pasteurizing Condition			10 °C for 12 weeks ^a		30 °C for 5 days ^a		30 °C for 5 days ^b		Confusion matrix			
	Temp (°C)	Time (min)	P _{100°C} (min)	Yes	No	Yes	No	Yes	No	FP ^c	FN ^d	FP ^e	TN ^f
J	102	15	3.3	20	0	0	20	1	19	19	1	0	0
	102	35	28.4	20	0	20	0	19	1	0	0	1	19
	104	15	6.0	20	0	3	17	4	16	16	1	0	3
	107	15	12.1	20	0	12	8	12	8	8	0	0	12
	107	25	48.3	20	0	20	0	20	0	0	0	0	20
	107	35	93.2	20	0	19	1	20	0	0	1	0	19
	112	30	226.6	20	0	20	0	20	0	0	0	0	20
K	90	48	4.3	12	0	0	10	0	10	10	0	0	0
	100	48	43.9	18	0	17	1	13	5	1	0	4	13
	105	48	144.9	18	0	18	0	18	0	0	0	0	18
	110	48	468.4	18	0	18	0	18	0	0	0	0	18
Total ^g										54	3	5	142
FC ^h										0.961			
Fail-dangerous (%) ⁱ										2.1			
Fail-safe (%) ^j										8.5			
AUC ^k										0.956			

^aObserved numbers of pouch spoiled or not.

^bPredictive numbers of pouch spoiled or not.

^{c, d, e, and f}Numbers of true positive, false negative, false positive, and true negative, respectively.

^gSum numbers of all validated conditions.

^hFraction correct calculated from total numbers of TP, FN, FP, and TN.

ⁱRatio of spoiled pouch but predicted as not spoil.

^jRatio of not spoiled pouch but predicted as spoil.

^kArea under the ROC curve.

第4章 要冷蔵水産加工食品への加熱殺菌条件の応用

水産物を主な原材料とする加工食品(惣菜)は、刺身や煮魚、焼魚、かまぼこや竹輪などの練り物と多岐に渡る。このうち、非加熱食品である刺身以外は、袋物惣菜としても販売され、その需要は拡大傾向にある。すなわち、要冷蔵水産加工食品の密封後の加熱処理条件と保存性ならびに品質変化の関係を明らかにすることは、当該食品の製造や製品開発において重要な知見となる。

これまでに、魚肉すり身やカニ肉には *Paenibacillus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌が芽胞として分布することが報告されている (Condón-Abanto et al., 2016; Cotton et al., 2011; Tsuda et al., 2015)。また、貝類からは主に *Clostridium* 属細菌の分離が報告されている (Agnolletti et al., 2019; 小林・上野, 1984)。その他にも、天日塩からも芽胞形成菌を分離できることが報告されている (Kang et al., 2020)。これらのことから、芽胞形成菌は水産物にも芽胞として広く分布することが推察される。

魚肉練り製品の製造では、製品の形態に応じて中心部分を 80 °C で一定時間以上加熱することが食品衛生法の製造基準で定められている。水産物や海洋環境由来の芽胞形成菌の諸性状と、農産物や土壌環境由来の芽胞形成菌の諸性状に大きな相違はないとすると、低温増殖性芽胞形成菌の性状を明らかにした第1章2節や、加熱殺菌条件と保存性の関係を明らかにした第3章2節および3節の結果を見ると、食品衛生法の製造基準で定められている加熱殺菌条件は、低温増殖性の *Paenibacillus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌の芽胞の制御に対しては不十分である。堀川らの調査 (2005) では、気密性容器に密封された揚げかまぼこから *Paenibacillus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌が分離されている。また、これまでの研究では常温での保管を目標として、中心部分を 120 °C で4分間以上加熱したときの魚肉練り製品やエビ肉の品質変化が報告されている (竹内・高橋, 2011; 2013; Tanaka and Kimura, 1988; 山澤, 1990; 山澤ら, 1979)。低温増殖性の *Paenibacillus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌の芽胞を制御しつつ、加熱による品質低下を最小限に留めるためには、90–120 °C で加熱したときの品質変化からも加熱殺菌条件を検討すべきである。

本章では、第3章で検討した加熱処理条件をもとに、パウチに密封した魚肉練り製品をレトルト殺菌機で加熱したときの 10 °C および 30 °C での保存性ならびに色調および破断特性の変化を明らかにした。

試料および方法

4-1. 供試試料

北海道内の水産加工食品企業が製造する魚肉練り製品 2 点（冷蔵品: 1 点; 冷凍品: 1 点）を供試した。冷蔵品は、製造後は 4 °C 以下で保持して翌日にはレトルト殺菌機で処理した。冷凍品は 4 °C で一晩保持して解凍した後、レトルト殺菌機で処理した。なお、それぞれの形状、重量および原材料構成は以下の通りであった; 試料 A (冷蔵品): 円板 (φ 80 mm × 18 mm), 70 g, 魚肉 (スケトウダラ, 北海道産), 人参, ごぼう, 玉ねぎ, 卵白, 澱粉, 植物油, ぶどう糖, 発酵調味液, 食塩, 砂糖 / 調味料 (アミノ酸等), pH 調整剤; 試料 B (冷凍品): 直方体 (120 mm × 80 mm × 12 mm), 100 g, 魚肉 (スケトウダラ, 北海道産), 澱粉, 植物油, 食塩, 味醂, 砂糖, ぶどう糖。

4-2. 供試試料の理化学分析

pH, 塩分濃度および水分活性を測定した。検体をフィルター付ストマックバッグ (PX0020P) にとり、粉碎して均一試料とした。25 g をミルサーカップに採取し、9 倍重量の蒸留水を加えてミルサー (IFM-800, 岩谷産業) で 30 秒間処理して試料液を得た。pH および塩分濃度は、試料液について、それぞれをコンパクト pH メーター (LAQUAtwin-pH-22B) および塩分計 (PAL-SALT, アタゴ) で測定した。水分活性の測定は、試料および方法 3-3-2 に準じた。

4-3. 供試試料の耐熱性細菌分析

検体をフィルター付ストマックバッグにとり、粉碎して均一試料とした。25 g を無菌的に別のフィルター付ストマックバッグに採取し、試料および方法 3-3-3 と同様の方法で好気性および通性嫌気性菌の芽胞 (標準寒天培地, 30°C, 3 日間) およびクロストリジア (クロストリジア測定用培地, 35 °C, 1 日間) を測定した。

4-4. レトルト殺菌機での加熱処理と保存試験

検体 1 枚を樹脂製パウチ (180 mm × 250 mm) に入れ、真空包装机 (V-955-500, TOSEI) で密封 (真空度: 99.0 %) した。恒温化するために 20 °C で 30 分間保持した後、レトルト殺菌

機 (RCS-40RTGN) で 90–117 °C で一定時間処理した。運転プロセスは、設定温度までの昇温工程: 5 分, 設定温度での定温加熱工程, 冷却工程: 10 分とし, 運転終了後は直ちに氷水冷した。加熱処理した試料は, それぞれ 10 °C で 12 週間および 30 °C で 5 日間保存した後に開封して一般生菌数, 嫌気性菌数および pH を測定した。検体からの内容物の採取と 10 倍希釈乳剤ならびに 10 倍希釈液列の調製は試料および方法 3-3-3 と同様に行い, 試料および方法 3-3-4 と同様に一般生菌数 (30 °C で 3 日間) および嫌気性菌数 (30 °C で 7 日間) を測定した。pH は調製した 10 倍希釈乳剤を用いて測定した。

4-5. レトルト殺菌機での加熱処理の温度履歴と Pasteurization value の算出

無線式温度データロガー (Micropack III) を入れて密封した検体を最上段 (1 段目) および最下段 (10 段目) に設置し, 試料および方法 3-3-6 と同様に温度履歴を測定し, 100 °C での Pasteurization value ($P_{100^{\circ}\text{C}}$, Daelman et al., 2013) を算出した。

4-6. 色調評価

色彩色差計 (CR-300, コニカミノルタ) で検体表面の色調 (L^* , a^* および b^*) を測定し, 未加熱検体を対照とした色差 (ΔE^*ab) を求めた。試料 A は 12 箇所 (中心 1 箇所, 中心と外周との中間点 5 箇所の計 6 箇所 \times 2 面), 試料 B は 10 箇所 (中心 1 箇所, 短辺側の両端まで 1/3 点, 2/3 点の 4 箇所の計 5 箇所 \times 2 面) の色調を測定し, 平均値を各検体の色調とした。

4-7. 破断特性評価

クリープメータ (RE2-33005C(XZ), 山電) で検体を圧縮したときの応力変化を測定した。測定条件は以下の通りとした; プランジャー: 円柱型 (P-5, ϕ 5 mm), 圧縮速度: 1.0 mm/sec, 最大圧縮: 歪率 99.0 %, ロードセル: 20 N, データ収集: 1 ポイント/0.05 sec。得られた応力–歪曲線をソフトウェア (破断強度解析 for windows, model BAS-3305 ver.2.5001, 山電) で解析し, 破断応力および破断歪率を求めた。試料 A は 5 箇所 (中心 1 箇所, 直交する 2 本の直径のそれぞれ 1/4 点, 3/4 点の 4 箇所), 試料 B は 6 箇所 (中心を通過して短辺と直交する線分の 7 等分点) を測定し, 平均値を各検体の物性値とした。

結果および考察

4-1. 魚肉練り製品の理化学分析値および耐熱性細菌数

供試試料の理化学分析値 (pH, Aw および塩分濃度) および耐熱性細菌数 (耐熱性芽胞およびクロストリジア) を Table 4-1 に示した。いずれの試料においても, 耐熱性芽胞およびクロストリジアは検出されなかった。なお, 試料 A および試料 B の一般生菌数 (30 °C, 3 日間培養) は, それぞれ 2.4 log CFU/g および 1.3 log CFU/g であった。

低温増殖性の *Paenibacillus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌の芽胞は, 魚肉練り製品の主原料である魚肉すり身からも分離される (Coton et al., 2011; Tsuda et al., 2015)。一方, これらの 2 報における芽胞量は, 寒天平板培養法の検出限界水準付近のごくわずかであった。そのため, 本研究で用いた魚肉すり身 (スケトウダラ) についても, 低温増殖性芽胞形成菌が含まれる可能性はあるが, その量はごくわずかであることが推察された。原材料構成を参照すると, すり身の他に芽胞の混入源となる可能性がある原材料として, ごぼうや人参, 玉ねぎ, 澱粉, 砂糖が推察された。魚肉練り製品の製造に用いる澱粉および砂糖には, 食品衛生法の製造基準において芽胞数の定めがある (1000 個以下/g) が, 野菜類にはこのような定めはない。農産物を主原料とした加工食品には様々な低温増殖性芽胞形成菌が芽胞として分布することはよく知られている (Choma et al., 2000; Del Torre et al., 2001; 2004; Guinebretiere et al., 2001)。したがって, 魚肉練り製品に野菜を配合した場合には農産物由来の芽胞も加わるため, 潜在的な腐敗の可能性が高まる。このようなことから, いずれの供試試料からも寒天平板培養法で芽胞は検出されなかったが, 温和な加熱殺菌条件で試作した場合には, 冷蔵保管中に芽胞が発芽・増殖して腐敗に至る可能性が推察された。

4-2. 10 °C および 30 °C での保存性

レトルト殺菌機で加熱処理した試料 A および試料 B を 10 °C で 12 週間ならびに 30 °C で 5 日間保存したときの保存性を Table 4-2 に示した。最も穏和な加熱処理条件である 90 °C で 45 分間の加熱処理でも, 10 °C で 12 週間ならびに 30 °C で 5 日間保存した試料 A および試料 B で腐敗した検体は観察されなかった。なお, 真空包装のみでは試料 A, 試料 B の一般生菌数 (30 °C, 3 日間培養) は, 10 °C で 7 日間保存後には 4-7 log CFU/g に達した。

第 3 章 3 節で明らかにしたカレー, スープの保存試験結果 (Table 3-3-2 および 3-3-5) を

参照すると、 $P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}} = 5$ 分以下でもいくつかの試料では $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 12 週間保蔵を達成できたが、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 5 日間保蔵を達成できた試料はなかった。カレー、スープでは加熱処理前の試料の中温性の芽胞数は $1.5\text{--}4.1\text{ log spores/g}$ であったが、試料 A および試料 B では検出されなかった。すなわち、いずれの試料も中温性細菌の芽胞が極めて少なかったために $P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}} = 5$ 分以下の加熱処理条件でも $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 5 日間保蔵を達成できたと推察された。

4-3. 加熱殺菌による品質変化

レトルト殺菌機で加熱処理した試料 A および試料 B の外観および色調変化は、Fig. 4-1 および 4-2 に示した。試料 A は、加熱殺菌強度が高まるに伴って褐色化が進行した。すなわち、加熱殺菌強度に応じて L^* 値の低下、 a^* 値の増加および b^* 値の低下が観察され、色差が大きくなった。一方で、試料 B は、 a^* 値が増加する傾向が観察されたが、 L^* 値や b^* 値の変化には一定の傾向は観察されず、色差も 10 以下で分散した。試料 A で褐変の進行が顕著であったのは、原材料構成にあると推察された。すなわち、調味料(アミノ酸等)としてグリシンが添加されている可能性が考えられた。グリシンは褐変を促進する原因物質として知られている(小磯, 2014)。

レトルト殺菌機で加熱処理した試料 A および試料 B の破断特性は、Table 4-3 に示した。いずれの試料においても加熱殺菌強度が高まるに伴って破断応力と破断歪率の低下が観察された。すなわち、加熱処理により食感は軟らかく、もろくなることが示唆された。

さらに、色調変化および破断特性変化について加熱殺菌強度との関係を最小二乗法で回帰分析した(Fig. 4-3)。加熱殺菌強度の常用対数値 ($\log_{10} P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}}$) と試料 A および試料 B の色差、破断強度および破断歪率の回帰直線の決定係数 (R^2) は、それぞれ 0.968 および 0.121, 0.877 および 0.873, 0.925 および 0.881 であった。すなわち、試料 B の色差変化以外は線形回帰直線への当てはまりが良好であり、 $\log_{10} P_{100\text{ }^{\circ}\text{C}}$ から加熱処理による品質変化を推測できることが示唆された。

かまぼこの再加熱においては、 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で加熱したときの品質変化が報告されている(赤羽, 1985; 白川, 1985)。特に、揚げかまぼこは $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 60 分間加熱すると、硬さの指標であるゼリー強度が低下し、官能評価においても色調や香りにも差を認めるパネルが現れた(白川, 1985)。本研究においても、 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 45 分間の加熱で色調変化や破断応力ならびに破断歪率の低下が観察された。官能評価は行わなかったが、当該検体と非加熱品検体の

品質を比較する官能評価では、その差を検知するパネルが現れることが推察された。本研究では、これらの研究では不明であった 95 °C 以上での品質変化も明らかにした。10 °C での保存試験では、90 °C で 45 分間の加熱処理 ($P_{100^{\circ}\text{C}} = 5$ 分未満) でも 2 種類の魚肉練り製品の 12 週間保蔵を達成できたが、第 3 章 3 節の結果 (Table 3-3-1) を参照すると、 $P_{100^{\circ}\text{C}}$ が 10 分以下の場合には、10 °C では長期間保蔵できない可能性もある。そのため、95 °C 以上で加熱したときの品質変化は、冷蔵で長期間保蔵できる魚肉練り製品を製造するための重要な知見になると考えられる。90 °C より高温でかまぼこを再加熱したときの品質変化はこれまでに報告されておらず、本研究において初めて明らかにした。一方、ケーシング詰めした塩摺り魚肉すり身では 100 °C 以上の加熱における品質変化が報告されている (Tanaka and Kimura, 1988; 山澤, 1990; 山澤ら, 1979)。すなわち、加熱殺菌効果 (F_0 値) が同等である場合には高温短時間加熱の方が良好な品質であることや、98 °C、30 分間の加熱処理と比べて 110 °C、30 分間の加熱処理ではゼリー強度が著しく低下すること、ゼリー強度の低下は 105–110 °C で始まるミオシン重鎖の加熱分解に起因するところが示されている。本研究では、100 °C、45 分間や 60 分間といった加熱処理条件で破断応力ならびに破断歪率の低下が観察された。このことは、上述の研究と比較すると穏和な加熱処理条件で物性低下が生じたと考えられた。

Table 4-1. Physicochemical and microbiological characteristics of fish paste products before pasteurization with retort sterilizer.

Sample	Physicochemical quality			Microbiological characteristics	
	pH	Aw	Salt (g/100 mL)	Facultative anaerobic and aerobic mesophilic bacteria (log spores/g)	Clostridia (log spores/g)
A	6.9	0.963	1.0	ND (<1.0)	ND ^a
B	6.9	0.964	1.4	ND	ND

^aThe typical black colony was not detected in all pouches.

Table 4-2. Pasteurizing conditions to preserve samples at refrigerated and ambient temperature.

Sample	Pasteurizing Condition				10 °C for 12 weeks ^a		30 °C for 5 days ^a	
	No.	Temp (°C)	Time (min)	P _{100°C} (min) ^a	Yes ^b	No ^c	Yes	No
A	1	90	45	4.2	11	0	10	0
	2	95	45	13.5	11	0	10	0
	3	100	30	26.9	11	0	10	0
	4	100	45	44.0	11	0	10	0
	5	100	60	61.6	11	0	10	0
	6	105	45	137.2	11	0	10	0
	7	110	45	445.5	11	0	10	0
B	1	90	45	4.8	11	0	10	0
	2	95	45	14.6	11	0	10	0
	3	100	30	31.5	11	0	10	0
	4	100	45	48.2	11	0	10	0
	5	100	60	64.9	11	0	10	0
	6	105	45	154.3	11	0	10	0
	7	110	45	517.5	11	0	10	0

^aCalculated from the temperature history recorded with a data logger put into a pouch.

^bNot observed microbial growth and pH changes.

^cObserved microbial growth or pH changes.

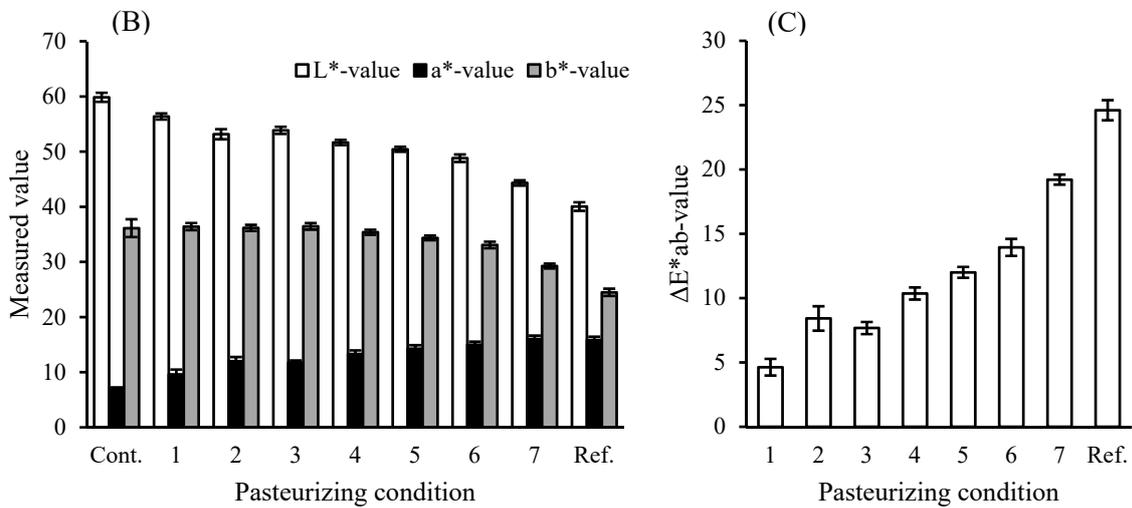
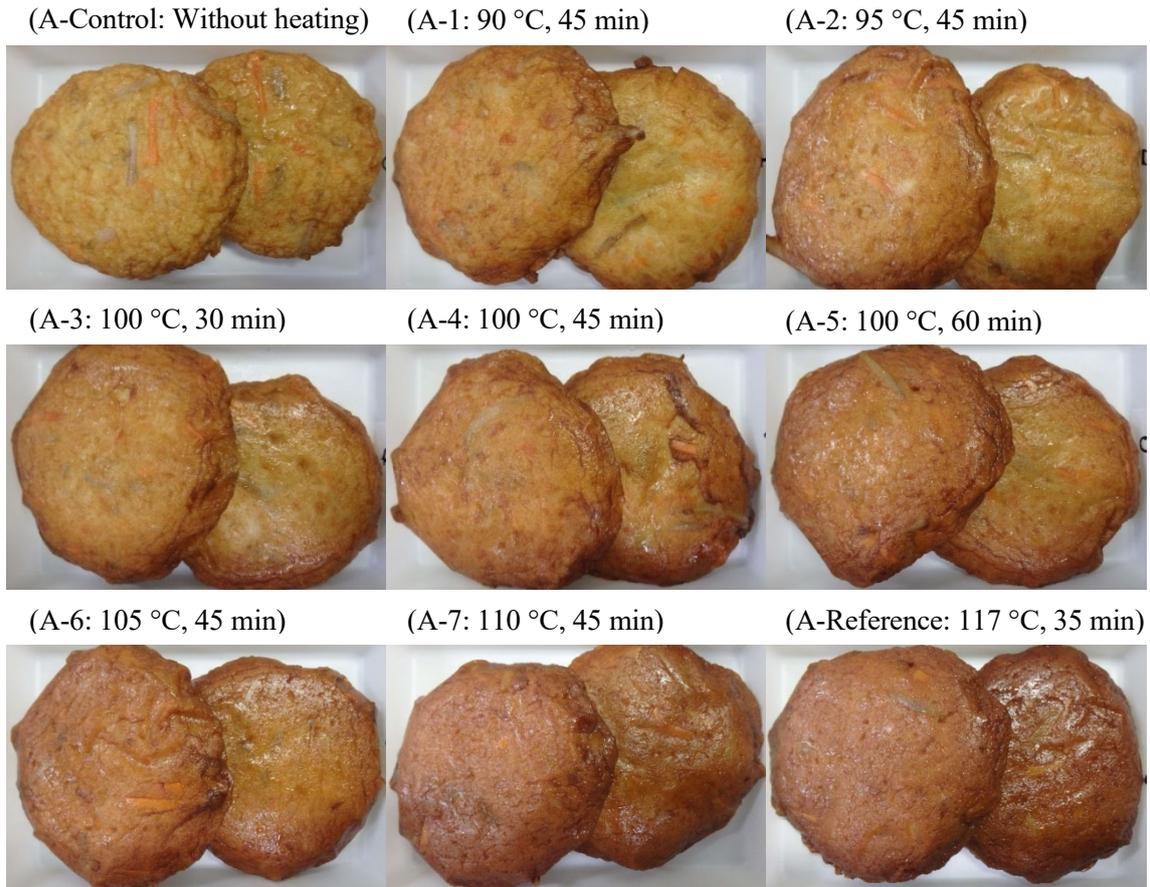


Fig. 4-1. Digital photographs (A), color evaluation (B), and color difference (C) of the fish paste product “A” pasteurized with the retort sterilizer. Color difference (ΔE^*_{ab}) represented the distance between the pasteurized samples and the samples without heating. Columns and bars represented mean-value and standard error, respectively. Pasteurizing condition number 1–7 is same as Pasteurizing condition number 1–7 in Table 4-2.

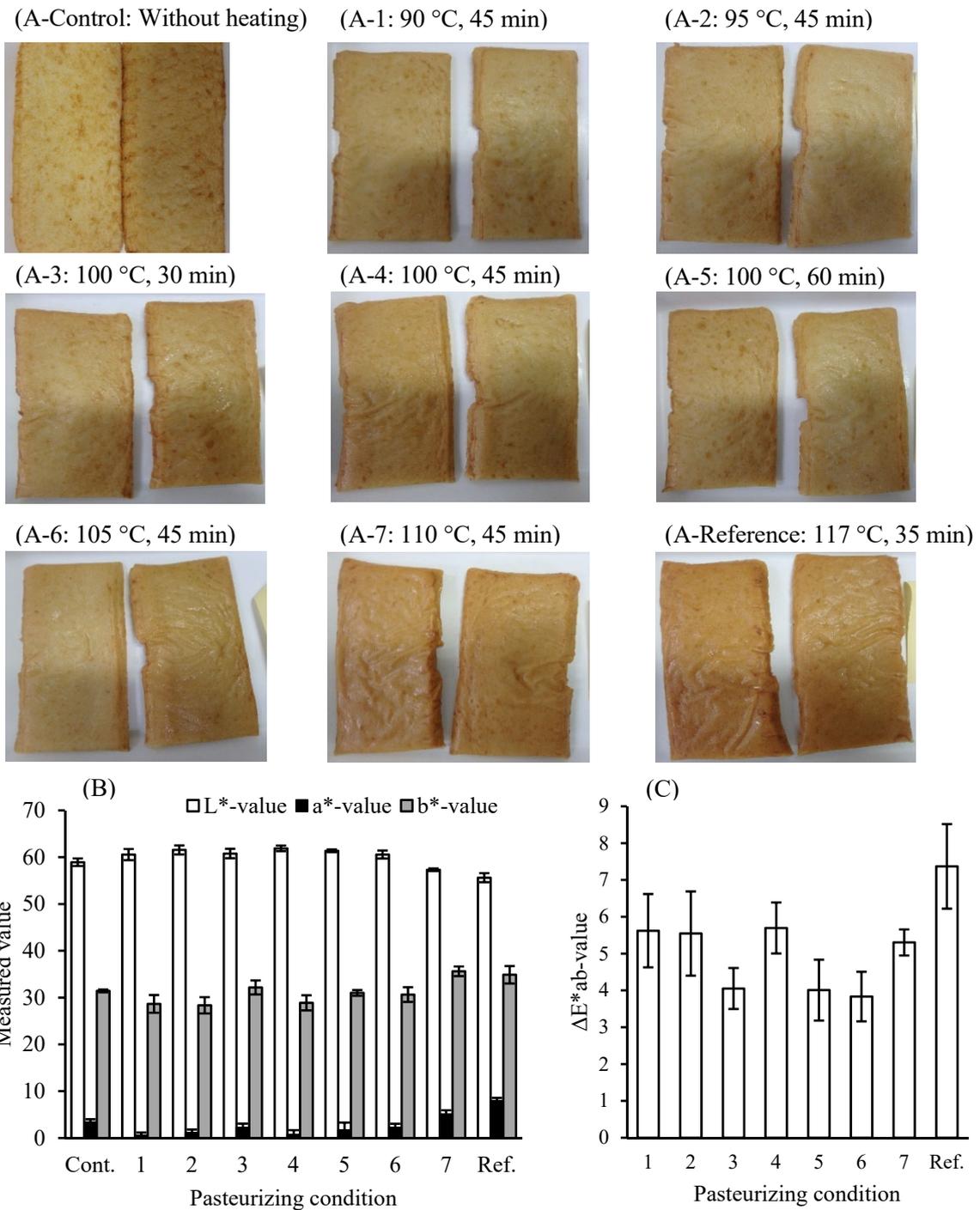


Fig. 4-2. Digital photographs (A) and color evaluation (B), and color difference (C) of the fish paste product “B” pasteurized with the retort sterilizer. Color difference (ΔE^*ab) represented the distance between the pasteurized samples and the samples without heating. Columns and bars represented mean-value and standard error, respectively. Pasteurizing condition number 1–7 is same as Pasteurizing condition number 1–7 in Table 4-2.

Table 4-3. Effect of pasteurization with retort sterilizer on breaking characteristics for fish paste products.

Sample	Pasteurizing Condition No. ^a	Height (mm)	Breaking stress ($\times 10^4$ Pa)	Breaking strain (%)
A	Control ^b	18.2 \pm 0.1	20.2 \pm 0.5	55.5 \pm 1.0
	1	16.0 \pm 0.1	20.9 \pm 1.0	46.9 \pm 1.1
	2	15.9 \pm 0.1	21.5 \pm 1.0	47.0 \pm 0.8
	3	15.9 \pm 0.1	20.8 \pm 0.8	46.7 \pm 0.9
	4	16.1 \pm 0.1	19.3 \pm 0.9	43.2 \pm 0.9
	5	15.9 \pm 0.2	17.7 \pm 0.9	40.6 \pm 0.6
	6	16.6 \pm 0.1	17.9 \pm 0.9	39.6 \pm 0.4
	7	16.5 \pm 0.1	16.1 \pm 0.7	35.2 \pm 0.7
	Reference ^c	16.3 \pm 0.1	15.4 \pm 0.7	32.6 \pm 0.7
B	Control	12.1 \pm 0.2	41.3 \pm 1.2	83.6 \pm 0.8
	1	10.8 \pm 0.2	33.5 \pm 1.1	73.8 \pm 0.8
	2	11.2 \pm 0.1	32.3 \pm 0.9	73.8 \pm 0.7
	3	10.9 \pm 0.1	30.2 \pm 0.7	68.6 \pm 0.5
	4	11.2 \pm 0.2	30.8 \pm 0.8	66.1 \pm 0.8
	5	11.3 \pm 0.2	28.2 \pm 0.9	60.2 \pm 0.8
	6	11.5 \pm 0.2	30.2 \pm 0.9	63.0 \pm 0.7
	7	11.4 \pm 0.1	25.9 \pm 0.7	58.9 \pm 1.0
	Reference	11.5 \pm 0.1	25.5 \pm 0.5	54.5 \pm 0.6

All data in each pasteurizing condition were summarized mean value \pm standard error.

^aNo 1–7 is same as pasteurizing condition number 1–7 in Table 4-2.

^bthe sample without heating.

^cthe sample sterilized at 117 °C for 35 min.

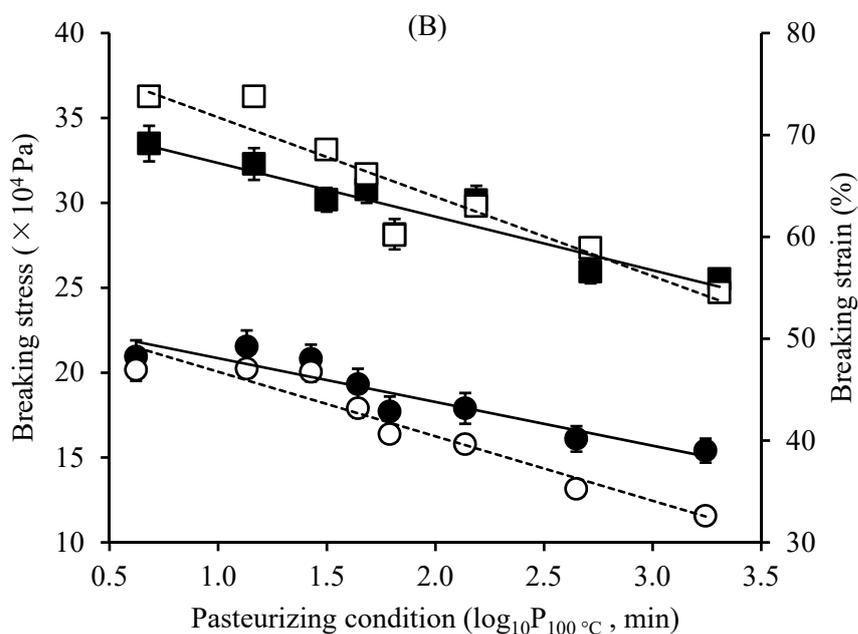
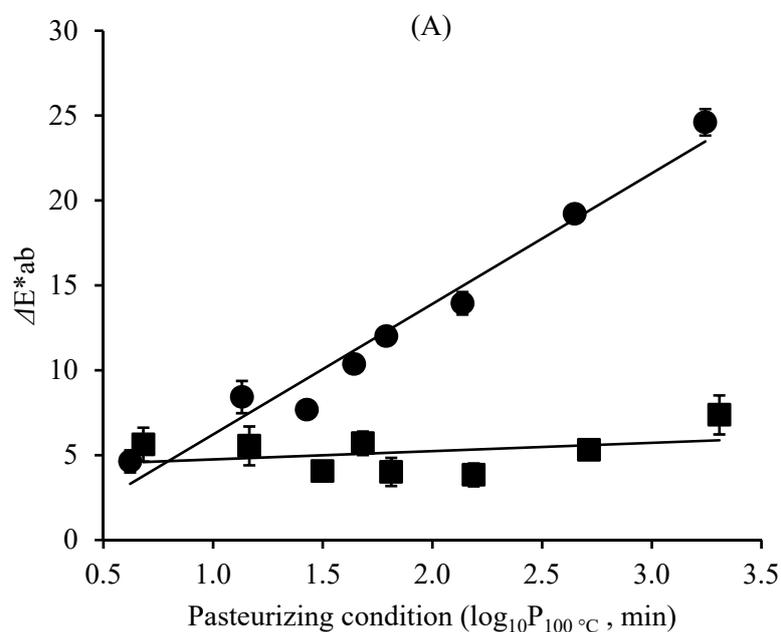


Fig. 4-3. Regression analysis of the color difference (A) and breaking properties (B) of pasteurized fish paste products.

Circle and square symbols represented sample “A” and “B”, respectively. Black and white symbols in figure (B) represented breaking stress and breaking strain, respectively. Solid and dashed lines were drawn by linear regression using least-squares method.

第5章 総合考察

高齢化の進展や共働き世帯の増加, 世帯人数の減少などを背景に, 調理食品や惣菜を利用する機会が増加し, 惣菜市場は 8 兆 7,132 億円 (2012) から 10 兆 1,149 億円 (2022) に拡大した (日本惣菜協会, 2014; 2022)。その中でも袋物惣菜 (樹脂製容器への密封と加熱殺菌を組み合わせて 10 °C 以下で 1 ヶ月前後の保存性を付与した惣菜類) は, 惣菜市場でのシェアを 2.3 % (2012) から 8.7 % (2022) に拡大している (日本惣菜協会, 2014; 2022)。

加工食品の製造には HACCP に沿った衛生管理が求められるが, 袋物惣菜においては, 食品衛生法の規格基準で定められた製造基準や成分規格はなく, ガイドラインや製造業界全体の自主規格等もないため, 事業者自らが危害を分析し, 科学的根拠を以て重要管理点ならびにその管理基準を設定しなければならない。加熱殺菌工程は, 袋物惣菜の製造における重要管理点の一つであり, 国内外の関連法令を整理すると, イギリスのガイドライン (Food Standards Agency, 2020) に倣い, タンパク質非分解性のボツリヌス菌の芽胞を殺滅するために, 中心部分を 90 °C で 10 分間以上加熱する必要がある。

食中毒細菌の一種であるセレウス菌の一部は冷蔵温度帯で増殖能力を有し (Luu-Thi et al., 2014), 90 °C で 10 分間以上加熱に耐える耐熱性芽胞を形成する (Dufrenne et al., 1995; Luu-Thi et al., 2014; Membré et al., 2008; Samapundo et al., 2011) ため, 欧米では, 袋物惣菜に類似した保存期間の長い要冷蔵加工食品の危害細菌と考えられている (Daelman et al., 2013; Reddy et al., 2021)。しかしながら, 冷蔵温度帯で増殖するセレウス菌芽胞の耐熱性には幅があり (Membré et al., 2008; Luu-Thi et al., 2014), $D_{90\text{°C}}$ が 90 分以上の芽胞を形成する菌株も発見されている (Dufrenne et al., 1995; Samapundo et al., 2011) ため, 殺滅に必要な加熱殺菌条件は示されていない。また, 加熱済みの加工食品を冷蔵保存すると, セレウス菌以外の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌が増殖し, 様々な腐敗現象が観察される (Carlin et al., 2000; Guinebretiere et al., 2001; Hamasaki et al., 2006)。製品腐敗は喫食による健康被害に直結しないが経済的損失は大きいとため, これらの細菌群も要冷蔵加工食品の微生物制御において重要な属種であるが, 増殖温度や増殖 pH, 芽胞の耐熱性といった制御条件の設計に必要な性状に関する報告は限られている。さらに, セレウス菌では増殖温度と形成する芽胞の耐熱性には正の相関関係が観察されている (Choma et al., 2000; Luu-Thi et al., 2014) ため, 欧米と我が国の冷蔵温度の違いを考慮すると, Dufrenne ら (1995)

や Samapundo ら (2011) が発見した $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 90 分以上のよりも耐熱性の高い芽胞を形成する菌株が問題となる可能性もある。

これらのことから、これまでに蓄積された知見だけでは、要冷蔵加工食品の微生物制御の構築は難しいと考えられる。特に、制御に関する知見が乏しいセレウス菌以外の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌は、増殖温度や形成芽胞の耐熱性といった基礎的性状から明らかにする必要がある。そこで本研究では、要冷蔵加工食品の微生物制御に資する知見の蓄積を目標として一連の研究に取り組み、 10°C 以下で増殖する低温増殖性芽胞形成菌の性状や制御条件、加工食品の加熱殺菌条件と保存性ならびに品質変化の関係を明らかにした。

第 1 章では、加熱殺菌後の農産加工食品について、生残微生物や冷蔵保存中に増殖する微生物が *Paenibacillus* 属細菌であることや、 10°C で増殖する *Bacillus* 属細菌および *Paenibacillus* 属細菌の諸特性の差異から、要冷蔵加工食品の微生物学的な保存性の向上においては、*Paenibacillus* 属細菌の制御が重要であることを見出した。

すなわち、第 1 節では、ホワイトアスパラガス水煮製品 (10°C で 31 日間保存) やその腐敗品 (10°C で 64 日間保存) から微生物を分離し、増殖可能温度や増殖可能 pH、芽胞の加熱生残性を調べ、 4°C 以下や pH 4.6 で増殖する *Paenibacillus* 属細菌が生残して腐敗に関与することを明らかにした (Table 1-1-1)。さらに、分離菌株の中で芽胞の耐熱性が最も高い菌株 (*Paenibacillus* sp. No.1, 製品由来) の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ は 29.5 分、z 値は 8.1°C であり、加熱処理後の生残芽胞のコロニー形成への影響は、培養温度よりも培養 pH の方が大きいことを明らかにした (Table 1-1-3, -4 および -5)。Hamasaki ら (2006) は、本研究に先んじて腐敗した要冷蔵加工食品から *Paenibacillus* 属細菌の分離を報告したが、加熱殺菌条件の設定で必要な知見である芽胞の耐熱性については明らかにしておらず、冷蔵温度帯で増殖する *Paenibacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性は本研究が初めて明らかにした。その後、Helmond ら (2017) や稲津ら (2017) も腐敗した要冷蔵加工食品から *Paenibacillus* 属細菌を分離し、その芽胞の耐熱性を報告したが、分離菌株芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ は 5 分以下であり、本研究と比較すると著しく低いものであった。したがって、冷蔵温度帯で増殖する *Paenibacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性は多様であると推察され、加熱殺菌条件の設定に向けて *Paenibacillus* 属細菌芽胞の耐熱性を理解するためには、多様な菌株を用いた芽胞の耐熱性評価の必要性が考えられた。

そこで第2節では、10℃で増殖する *Bacillus* 属細菌および *Paenibacillus* 属細菌の芽胞の耐熱性と増殖温度の関係を明らかにした。芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 25 分以上であった *Paenibacillus* 属細菌 4 菌株は 6℃以下、特に、最も耐熱性の高い芽胞 ($D_{90^{\circ}\text{C}} = 136.1$ 分) を形成した *Paenibacillus* sp. JCM13343 は 4℃でも増殖した (Fig. 1-2-3A)。一方、 $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 25 分以上を示した *B. cereus* の 8 菌株は、10℃未満では増殖しなかった (Fig. 1-2-3B)。すなわち、低温増殖性の *Paenibacillus* 属細菌は 6℃以下で増殖するだけでなく、形成芽胞の耐熱性も高いことが明らかになった。低温増殖性 *B. cereus* のうち、芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 90 分以上の菌株は、スキムミルク (7℃保存) や pH と水分活性を調整して食品環境を模した液体培地 (10℃保存) では増殖しなかったと報告されている (Daelman et al., 2013; Dufrenne et al., 1995)。そのため、芽胞の $D_{90^{\circ}\text{C}}$ が 90 分前後の低温増殖性 *B. cereus* は冷蔵温度帯での増殖能力を備えていても要冷蔵加工食品で発芽・増殖する可能性は小さいと推察した。一方、供試菌株の中で芽胞の耐熱性が高かった *Paenibacillus* 属細菌のうち、*P. terrae* No. 9 (第1章1節) や *Paenibacillus* sp. JCM13343 (Hamasaki et al., 2006) は腐敗した要冷蔵加工食品から分離されたものである。すなわち、加熱処理後の加工食品に低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌の芽胞が生残していると冷蔵保存中に発芽・増殖する可能性が高いため腐敗の要因になると考えられる。したがって、低温で増殖可能かつ耐熱性の高い芽胞を形成する *Paenibacillus* 属細菌は、要冷蔵加工食品の製造における制御対象菌の一つと考えるべきであると結論した。

第3節では、ポリエチレンテレフタレート(疎水性素材)およびステンレス鋼(親水性素材)に対する *Bacillus* 属細菌芽胞および *Paenibacillus* 属細菌芽胞の付着動態を明らかにした。第1節では、原材料のホワイトアスパラガスに付着して製品に混入したと推察される *Paenibacillus* 属細菌が腐敗原因となったように、細菌芽胞は主に土壌等の自然環境に分布するため、原材料に付着した状態で製造工程に持ち込まれる。一方、食品と直接接触する加工機器や包装資材から食品への微生物汚染も看過できない (Heyndrickx, 2011)。食品加工機器等の表面に付着した微生物が洗浄殺菌作業では除去されずに製品に混入した場合には思いもよらない食品事故につながる。したがって、固液界面における微生物の付着動態の理解は、製造環境の清浄度を高めて衛生的な加工食品の製造するために重要である。これまでに、*B. cereus* の芽胞は *B. licheniformis* や *B. pumilus*, *B. subtilis* の芽胞よりも硬質表面に付着しやすいことや、*Bacillus* 属細菌芽胞の硬質表面への付着性は、芽胞の

表面疎水性に影響されることが報告されている (Faille et al., 2002; 2010; Röner et al., 1990)。本節では, *Paenibacillus* 属細菌の中では *P. odorifer* の芽胞が硬質表面に付着しやすいことや, *Paenibacillus* 属細菌芽胞の硬質表面への付着においても, *Bacillus* 属細菌と同様に芽胞の表面疎水性が重要な因子であることを初めて明らかにした (Fig. 1-3-1 および-2)。この結果からは, *Paenibacillus* 属細菌芽胞は原材料だけでなく, 製造環境からも製品に混入する可能性があることに留意する必要があると考えられた。

近年の惣菜市場においては, 惣菜を樹脂製のトレイやカップに詰めて密封した成型容器詰惣菜も消費者需要が高まっている (日本惣菜協会, 2023)。このような製品はガス置換包装されるため, 容器内の気相分圧が窒素や二酸化炭素でコントロールされている。そのため, *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌の芽胞が成型容器詰惣菜中に生残した場合には, 大気圧環境での増殖とは異なる挙動を示す可能性がある。第4節では, ガス置換雰囲気における *Bacillus* 属細菌ならびに *Paenibacillus* 属細菌の増殖の可否を明らかにするため, 窒素, 二酸化炭素およびその混合ガスでガス置換包装した寒天平板上での *Bacillus* 属細菌および *Paenibacillus* 属細菌のコロニー形成を 10 °C で 4 週間培養して評価した。*Bacillus* 属細菌では, 二酸化炭素の混合比率が高まると, コロニーを形成する菌株数は減少し, N₂/CO₂ 混合比率が 25/75 および 0/100 のガスで置換した場合にはコロニーを形成した菌株はなかった (Table 1-4-2)。一方, *Paenibacillus* 属細菌では, *P. polymyxa* や *P. terrae* は二酸化炭素の混合比率が高まってもコロニー形成への影響は小さく, N₂/CO₂ 混合比率が 0/100 のガスで置換した場合でもコロニーを形成することが明らかとなった (Table 1-4-4)。細菌の増殖抑制に対する CO₂ の作用機作の一つは, 溶媒への溶解に伴う周辺環境の pH 低下と考えられている (木村・藤井, 1996)。塩酸で pH 調整した寒天平板における大気雰囲気でのコロニー形成を 10 °C および 30 °C で観察した対照実験 (Table 1-4-3 および-5) において, *Paenibacillus* 属細菌の多くの菌株が 10 °C でも高い耐酸性を示したように, *Paenibacillus* 属細菌の 10 °C での CO₂ ガス雰囲気に対する抵抗性は, *Paenibacillus* 属細菌の低温での耐酸性と関連すると推察された。これらのことから, N₂, CO₂ およびその混合ガスでガス置換包装した要冷蔵加工食品では, *Paenibacillus* 属細菌が増殖する可能性が高いと示唆された。

第2章では, 製品ならびに原材料や製造機器等の洗浄・殺菌工程中での *Paenibacillus* 属細菌の制御を想定し, 有機酸と加熱処理の併用ならびに次亜塩素酸ナトリウム溶液処理

による制御を検討した。第 1 章で得られた結果から、要冷蔵加工食品の微生物制御において制御対象となる *Paenibacillus* 属細菌は、高い耐熱性や耐冷性、耐酸性を具備することが明らかになった。したがって、加熱殺菌や低温管理、pH 調整などの微生物制御を単独で施すと、*Paenibacillus* 属細菌の制御には高い強度が必要になると推察される。pH 調整や加熱殺菌の強度が高いと、加工食品の風味や食感、色調などの品質低下が懸念される。そのため、良好な品質を特長とする要冷蔵加工食品の微生物制御に必要な条件は可能な限り穏和にしなければならない。

第 1 節では、*Paenibacillus* 属細菌の増殖抑制における有機酸と加熱処理の併用を検討した。まず初めに、クエン酸、乳酸、酢酸および塩酸で pH 調整した液体培地において増殖が抑制される pH を測定したところ、供試菌株の中で *P. terrae* No.9 が最も高い耐酸性を示した (Table 2-1-1)。塩酸で pH 調整した培地にて *Paenibacillus* 属細菌の 7-10 °C での増殖を観察した青山・遠田 (2010) や Helmond ら (2017) の研究と比較すると、*P. terrae* No.9 はより低い pH 4.7 でも増殖しており、他の低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌 (*P. odorifer* や *P. macquariensis*, *P. pabuli*) よりも耐酸性の高い菌株であることが明らかになった。ポテトペースト (pH 5.7) に接種した *P. terrae* No.9 (初発芽胞数: 3.1 log spores/g) は、発芽して 10 °C で 14 日間保存後には 7.5 log CFU/g まで増殖したが、酢酸添加では酸味を僅かに感じる程度の pH 5.4 でその増殖が 28 日間抑制された。一方、乳酸添加では pH 4.8 で *P. terrae* No.9 の増殖が 28 日間抑制されたが、多くのパネルが許容できないほどの酸味を呈していた (Fig. 2-1-1 および Table 2-1-2)。そこで、乳酸ならびにクエン酸で pH 5.4 に調整したポテトペーストでの *P. terrae* No. 9 の増殖抑制 (10 °C, 28 日間) を目標として 92.5 °C での加熱処理を併用したところ、乳酸添加では 20 分間、クエン酸添加では 30 分間の加熱処理を併用すると目標が達成された (Table 2-1-3)。有機酸未添加のポテトペーストでの *P. terrae* No. 9 の増殖抑制 (10 °C, 28 日間) には 92.5 °C で 45 分間の加熱処理が必要であったことから、乳酸やクエン酸の添加によって pH を僅かに 0.3 ユニットの低下に調整することは、増殖抑制に必要な加熱時間を 1/2 前後に短縮でき、より穏和な条件での *Paenibacillus* 属細菌の制御に有効な方法であることが明らかとなった。有機酸で pH を調整した場合に pH 未調整の場合よりも短時間の加熱処理で *P. terrae* No.9 の増殖が抑制されたことは、酸性下での加熱で芽胞の死滅が促進されるだけでなく、生残した芽胞の発芽や発芽後増殖の時の栄養要求性の変化や、pH や有機酸などに対する感受性の変化によって発芽ならびに発

芽後増殖が遅延または抑制されたためと推察された。

有機酸による pH 調整と加熱処理の併用は、より温和な条件での *Paenibacillus* 属細菌の増殖抑制に効果的であったが、有機酸添加による味への影響は避けられないことも明らかになった (Table 2-1-2)。芽胞制御の困難さは、物理的・化学的処理に対する芽胞の高い耐久性に起因する。そのため、物理的・化学的処理に対する芽胞の耐久性を消失させることができればその制御は容易になり、品質への影響の緩和も期待できる。そこで第 2 節では、*A. acidoterrestris* の芽胞で効果が報告されている次亜塩素酸ナトリウム溶液処理による芽胞の耐熱性低下 (小林・青山, 2014) について、*Paenibacillus* 属細菌芽胞への応用を検討した。*Paenibacillus* sp. No.1 芽胞を有効塩素濃度を調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH 6.0, 8.0 および 10.0) に接種し、15 °C で 10 分間処理した後、95 °C で 15 分間加熱したところ、pH 6.0 や 8.0 の次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した芽胞は、蒸留水で処理した芽胞 (対照) と比較して生残芽胞数が最大 1.6 log 低下した (Fig. 2-2-2)。次亜塩素酸ナトリウム溶液処理後の加熱による生残芽胞数の低下は、より酸性の次亜塩素酸ナトリウム溶液処理で大きくなったため、溶液 pH によって存在比率が変化し、酸性側でその比率が高まる非解離型の次亜塩素酸 (HClO) の関与が推察された。そこで次亜塩素酸の酸解離定数 ($pK_a = 7.6, 15\text{ }^\circ\text{C}$; Morris, 1966) から各前処理溶液の次亜塩素酸の存在比率を算出し、加熱処理による生残芽胞数の減少との関係を解析したところ、10 mg/L 以上の次亜塩素酸で芽胞を処理すると耐熱性低下作用が得られることが明らかになった (Fig. 2-2-3)。次亜塩素酸は、弱酸性電解水や微酸性電解水にも高い比率で存在する。このような殺菌料を原材料の洗浄殺菌に用いれば、細菌芽胞は損傷し、耐熱性が低下する可能性がある。特に、冷蔵温度帯でも増殖する *Paenibacillus* sp. No.1 に対して効果が得られたことから、要冷蔵加工食品の製造に応用することで温和な加熱殺菌での保存性向上や高品質化が期待される。

要冷蔵加工食品の加熱殺菌条件は、内容物の品質 (色調, 風味, 具材の食感等) を維持するために可能な限り穏和であるべきである。第 3 章では、加熱殺菌条件の新たな設定方法として予測微生物学の応用に着目した。微生物数の増減を観察する実験では必ずデータにばらつきが観測される。この要因の一つは微生物固有の性質に由来するばらつきであり、実験を繰り返してもばらつきが小さくなることはない (小関, 2016)。さらに、微生物固有の性質に由来するばらつきは菌数が少なくなるほど大きくなる (Aspridou and

Koutsoumanis, 2015)。予測微生物学においては、微生物の死滅における微生物固有の性質に由来するばらつきは、ポアソン分布に従うことが示されている (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; 2019)。したがって、生残菌数の目標値を設定して加熱殺菌した時に、生残菌数が目標値より大きくなる検体が発生することは避けられないが、その発生確率は推定できるため、発生確率が許容水準以下まで小さくなるように加熱殺菌条件を設定すれば良い。

微生物固有の性質に由来するばらつきについて、これまでの研究では比較的小さな試験容量 (0.1–10 mL) で数十反復の生残菌数を測定する評価系であった (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017)。そのため、実際の製品に近い試験容量 (100 mL) でこのことを検証することにより、実際の食品加工における生残微生物数のばらつき予測の信頼性は高まると考えられる。第 1 節では、*Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞を接種した緩衝液を詰めたパウチを 100 °C で 7.5, 12 および 14 分間加熱し、処理した全数について全容量中の生残芽胞数をフィルター培養法で測定することにより各々の加熱処理条件における生残芽胞数のばらつきを明らかにした (Fig. 3-1-3-black columns)。さらに、*Paenibacillus* sp. JCM13343 の加熱生残曲線 (Fig. 3-1-2) から当該加熱処理条件における生残芽胞数を予測し、予測値からの変動性がポアソン分布に従う仮定して理論的なばらつきを得た (Fig. 3-1-3-white columns)。実測値のばらつきと理論的なばらつき的一致率が高いほど生残芽胞数のばらつきがポアソン分布に従う可能性が高いと考えられたため、Histogram Intersection (HI) を指標に二つのヒストグラムの類似度を評価した。100 °C で 7.5, 12 および 14 分間加熱した場合の HI はそれぞれ 0.819, 0.814 および 0.743 であり、実測値の 80 %前後が理論値と一致したことから、生残芽胞数のばらつきはポアソン分布に従う可能性が高いと推察された。一方、いずれの加熱処理条件においても低芽胞数の頻度は、理論値よりも実測値が上回る傾向にあった。このことは、実測では一部の芽胞が加熱損傷し、標準寒天培地での発芽・増殖能力を失ったために生残芽胞数測定でコロニーを形成せず、計数されなかったためと推察された。すなわち、生残芽胞数のばらつき予測にポアソン分布を用いるだけでなく、加熱損傷してコロニー形成できなくなる芽胞が発生する確率も加味できると、その予測精度は一層向上すると考えられる。

第 2 節では、加熱殺菌条件を設定するための接種試験に生残芽胞数のばらつき予測を組み合わせて、10 °C で 12 週間の保存で腐敗する検体の加熱処理後の生残芽胞数を推定し

た。*Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞を接種したカレー (初発芽胞数: 3.2 log spores/g; 内容量: 100 g/検体) について、98.0 °C で 25 分間加熱した試料 ($P_{100^{\circ}\text{C}} = 26.5$ 分) は、10 °C で 12 週間保存後に 67 検体のうち 3 検体が腐敗した (Table 3-2-1)。加熱生残曲線 (Fig. 3-2-1) から算出した当該試料の生残芽胞数は 32.4 spores/100 g であった。微生物の死滅は一様ではなく、ポアソン分布に従ったばらつきを示すことがこれまでに報告されている (Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; 2019)。そのため、加熱生残曲線から求めた生残芽胞数 (32.4 spores/100 g) からのばらつきがポアソン分布に従うと仮定してその確率分布を求めた (Fig. 3-2-3A)。不活化処理後の生残微生物数のばらつきは、96 穴マイクロプレートや試験管を使った独立した各試行の菌数とその頻度を測定して評価されることが多い (Abe et al., 2019; 2020; Aguirre et al., 2009; Koyama et al., 2017; Rodríguez et al., 2016)。レトルト殺菌機で処理した各検体の死滅も、96 穴マイクロプレートの各ウェルや試験管毎の死滅と同様に独立した試行である。したがって、生残芽胞数のばらつきの確率分布は、各生残芽胞数の検体が発生する確率を表現したものと言える。そのため、生残芽胞数が多い試料から腐敗すると仮定すると、腐敗しなかった検体の割合と生残芽胞数のばらつきの確率分布の累積値を比較することにより、10 °C で 12 週間の保存で腐敗に至る生残芽胞数を推定できる。腐敗しなかった検体の割合は 0.955 (64/67 検体) であり、生残芽胞数がばらつく確率の累積値は 41 spores/100 g で 0.941, 42 spores/100 g で 0.957 となった。このことから、12 週間の保存期間中に *Paenibacillus* sp. JCM13343 が増殖して腐敗に至る加熱処理後の生残芽胞数は 42 spores/100 g 以上と推定された。このことを検証するため、*Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞を接種したカレー (初発芽胞数: 2.9 log spores/g; 内容量: 100 g/検体) を異なるレトルト殺菌機にて 98.0 °C で加熱し、10 °C で 12 週間保存したところ、24 分間加熱した試料 ($P_{100^{\circ}\text{C}} = 24.3$ 分) は、10 °C で 12 週間保存後に 239 検体のうち 14 検体が腐敗した (Table 3-2-2)。本条件について、腐敗しなかった検体の割合 (0.941, 225/239 検体) と生残芽胞数の確率分布の累積値を比較すると、腐敗に至る生残芽胞数は 54 spores/100 g 以上と推定された。前述の接種試験では、生残芽胞数が 42 spores/100 g 以上で設定期間内に腐敗に至ると推定されたことから、生残芽胞数の推定値は概ね一致したと考えられる。接種試験のみで加熱殺菌条件を検討すると、生菌数を測定した全ての検体で微生物の増殖が観察されなかった条件が基準となり、定量的な根拠を持って加熱殺菌条件を緩和することは困難である。一方、接種微生物の耐熱性データ取得した上で、

接種試験で増殖／非増殖がともに観察された加熱殺菌条件について生残菌数のばらつきを予測し、保存期間内で腐敗に至る生残菌数を推定すると加熱殺菌条件の良否を定量評価でき、根拠を持って加熱殺菌条件を決定できる。

第 2 節では、カレー (pH 5.8, Aw 0.98) の長期間保蔵を達成するための指標として *Paenibacillus* sp. JCM13343 の芽胞を接種し、加熱殺菌条件を検討したが、市販カレー等の pH と Aw の組み合わせは多様である (小林, 2022) ため、第 2 節のような接種試験を網羅的に行うことは難しい。そこで第 3 節では、様々な pH, 食塩濃度および耐熱性芽胞数の未殺菌カレー等を使って要冷蔵カレー等を試作し、その試作品の保存試験結果から腐敗境界を予測した。レトルト食品製造企業から調達したレトルトカレーおよびスープの密封済未殺菌品 9 点を 90–112 °C で一定時間加熱し、10 °C で 12 週間および 30 °C で 5 日間保存した。10 °C で 12 週間保蔵を達成した 22 条件のうち、30 °C で 5 日間保蔵も達成したのは 10 条件のみであった一方、30 °C で 5 日間保蔵を達成した条件のうち、10 °C で 12 週間保蔵を達成できなかった条件はなかった (Table 3-3-2)。これらの結果から、30 °C で 5 日間保蔵を達成する加熱殺菌条件は、10 °C で 12 週間保蔵を達成するための十分条件であると示唆された。レトルトパウチや樹脂製パウチに密封された要冷蔵加工食品は、その外観から常温で保存可能なレトルト食品と誤認され易く、常温環境に放置される可能性がある。要冷蔵加工食品にとって冷蔵温度帯で発芽・増殖しない芽胞は制御対象外であるため、保管温度の逸脱は製品中に生残する微生物が増殖する絶好の機会となる。我が国においては、1999 年に要冷蔵保管のハヤシライスソースを常温で保存可能なレトルト食品と誤認して室温で 8 日間放置したことを原因とするボツリヌス菌食中毒が発生している (内村・小岩井, 2000)。この食中毒事例から 20 年以上経過した現在においても、要冷蔵加工食品を誤って常温で販売する事例が散見される (消費者庁・厚生労働省, 2023)。すなわち、レトルトパウチや樹脂製パウチに密封された要冷蔵加工食品は、出荷以降の段階では設定した保管温度の逸脱リスクのある製品と考えた方がよく、要冷蔵加工食品の製造にあたっては、室温で数日間程度放置しても微生物が増殖しない製品設計を検討すべきである。そこで、pH, 食塩濃度, 芽胞数および $P_{100^\circ\text{C}}$ を説明変数として 30 °C で 5 日間の保存試験結果をロジスティック回帰分析し、腐敗確率を予測するモデル式を得た。得られたモデル式は、検証用試料 2 点 11 条件の 30 °C で 5 日間の保存試験結果 (Table 3-3-5) を概ね予測できており、予測精度の指標である FC, Fail-dangerous, Fail-safe, および AUC の

成績 (Table 3-3-5) から十分な予測精度であることが推察された。微生物の増殖確率予測では、何らかの指標菌が対象として予測モデル式を作成・検証することが一般的であり、単一菌株では増殖範囲に限られるため、複数菌株を混合して検討する例もある (Evans et al., 2004; Ingham et al., 2010; Koutsoumanis et al., 2004)。本研究では加熱殺菌前の加工食品に分布する芽胞に着目し、より実用的な腐敗境界予測モデルを目指した。食品製造企業の原材料調達先は、国内に留まらず世界各国に及ぶ。複数の製造企業から供試試料を調達し、原材料も様々である条件で作成した本予測モデルは、カレーを中心とした保存期間の長い要冷蔵加工食品の製造を検討する多くの食品製造企業での活用が期待される。

第 4 章では、第 3 章までで得られた知見を魚肉練り製品の加熱殺菌に応用した。*Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌、*Clostridium* 属細菌は、水産物にも芽胞として分布する (Agnoletti et al., 2019; Condón-Abanto et al., 2016; Coton et al., 2011; 小林・上野, 1984; Tsuda et al., 2015)。低温増殖性の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌の性状を明らかにした第 1 章 2 節や、加熱殺菌条件と保存性の関係を明らかにした第 3 章 2 節および 3 節の結果を参照すると、食品衛生法の製造基準で定められた加熱殺菌条件 (80 °C で 20 分間や 45 分間) で魚肉練り製品を製造しても、低温増殖性の *Paenibacillus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌の芽胞の制御に対しては不十分であると推察され、長期間の保存性は期待できない可能性が高い。また、これまでの研究は魚肉練り製品の常温保管を目標としており、主に中心部分を 120 °C で 4 分間以上加熱したときの品質変化が報告されている (Tanaka and Kimura, 1988; 山澤, 1990; 山澤ら, 1979)。低温増殖性の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌の芽胞を制御して長期間保蔵を達成するためには、90–120 °C で加熱したときの保存性や品質変化を明らかにする必要がある。そこで水産加工企業が製造した 2 種類の魚肉練り製品を樹脂製パウチに密封してレトルト殺菌機で 90–117 °C で所定時間処理した後、10 °C で 12 週間および 30 °C で 5 日間保存して微生物数を測定するとともに、加熱処理した魚肉練り製品の色調および破断特性を測定した。10 °C で 12 週間ならびに 30 °C で 5 日間の保存試験では、2 種類の試料ともに最も穏和な加熱処理条件である 90 °C で 45 分間の加熱処理 ($P_{100\text{°C}} = 5$ 分以下) でも腐敗した検体は観察されなかった (Table 4-2)。カレーおよびスープの保存試験結果 (Table 3-3-2 および 5) を参照すると、 $P_{100\text{°C}} = 5$ 分以下でもいくつかの試料では 10 °C で 12 週間保蔵を達成できたが、30 °C で 5 日間保蔵を達成できた試料はなかった。カレー、スープでは加熱処理前の中温性細菌の芽胞は 1.5–4.1 log

spores/gであったが、供試した魚肉練り製品では検出されなかった (Table 4-1)。すなわち、いずれの試料も中温性細菌の芽胞が極めて少なかったために $P_{100^{\circ}\text{C}}=5$ 分以下の加熱処理条件でも 30°C で5日間保蔵を達成できたと推察され、魚肉練り製品の製造において加熱殺菌前の中温性細菌の芽胞数は重要な管理項目であることが示唆された。色調および破断特性は、最も穏和な加熱処理条件 (90°C , 45分間, $P_{100^{\circ}\text{C}}=5$ 分以下) でも加熱前試料のそれらを維持できず、加熱処理強度が増すに伴い差が顕著になった。すなわち、色調では褐変が進行し、破断特性では軟らかくなり弾力が低下した (Fig. 4-1, -2および-3)。これらのことから、魚肉練り製品の加熱殺菌条件は可能な限り穏和である必要性が示唆された。このような制限の中で長期保蔵を達成するためには、微生物汚染の少ない魚肉すり身や副原料(砂糖, でんぷん等)を使うこと、ゴボウやニンジン等の野菜は次亜塩素酸ナトリウムなどで洗浄殺菌して付着微生物数を低減すること、抗菌性をもつ添加物を添加することなどが考えられる。

加熱殺菌はその条件に応じて様々な微生物を殺滅できる一方、加工食品の色調や食感、風味等の品質にも様々な影響を及ぼす。そのため、実際の食品製造においては保存性の観察だけではなく、品質変化の観察も重要である。第4章で対象とした魚肉練り製品は、最も穏和な加熱処理条件 (90°C , 45分間, $P_{100^{\circ}\text{C}}=5$ 分以下) でも加熱前試料の色調および破断特性を維持できず、加熱処理強度が増すに伴い差が顕著になった。このような場合には、一定期間以上の保蔵を達成するために加熱殺菌条件を強めることは難しく、原材料の微生物管理の厳格化により加熱殺菌前の微生物数を低水準に保つことや抗菌性を示す食品添加物を添加して生残微生物の増殖抑制が必要となる。第3章で対象としたカレーやスープの品質変化は、具材とソース両方を観察する必要があるため、魚肉練り製品よりも複雑であると推察される。具材の品質は、加熱強度が高まると共に低下が予想されるが、ソースに良好な風味を付与するためには一定強度以上の加熱処理が必要であると報告されている (加藤, 1992) ことから、ソースにとっては必ずしも低強度での加熱処理が望ましいわけではないと考えられる。特に、 $100\text{--}120^{\circ}\text{C}$ で加熱した具材およびソースの品質変化に関する報告はないため、品質面からの加熱殺菌条件の検討には本温度帯での品質変化の観察が今後の課題である。

本研究では、冷蔵温度帯で長期間保存する加工食品の微生物制御に関する知見を得るため、 10°C 以下で増殖する低温増殖性芽胞形成菌の性状や制御条件、加工食品の加熱殺

菌条件と保存性ならびに品質変化の関係を明らかにした。低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌は 4℃や 6℃でも増殖し、その中には耐熱性の高い芽胞を形成する菌株も存在した。したがって、加工食品の冷蔵温度帯での長期保蔵を達成するためには、低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌の芽胞を制御すべきである。低温増殖性 *Paenibacillus* 属細菌を単独の制御因子のみで制御しようとする、必要な強度が過剰になり品質低下を招いてしまうため、有機酸と加熱処理の併用や次亜塩素酸ナトリウム溶液の耐熱性低下作用を利用した穏和な条件での制御方法を示した。さらに、加熱殺菌後に様々な生残芽胞数の検体が発生する確率を算出し、腐敗に至る生残芽胞数を推定して過不足ない加熱殺菌条件を検討した。また、生残芽胞が増殖して腐敗に至る確率を算出した。魚肉練り製品では破断特性の変化を観察したが、カレー・スープのソースや具材の品質変化は観察していないため、加熱殺菌条件を設定するためにはこれらの品質変化も今後の研究で明らかにする必要がある。

以上、本研究では冷蔵温度帯で長期間保存する加工食品の微生物制御に資する知見を深めた。冷蔵温度帯で長期間保存する加工食品の消費者需要は高く、製造数量や製造品目数、製造企業数は今後も増加すると推察される。本研究で得られた結果は、当該食品の HACCP に沿った製造における重要管理点や管理点の管理基準設定の科学的根拠となる。

謝 辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、懇篤なご指導とご鞭撻を賜り、精細なご校閲を頂いた北海道大学大学院水産科学研究院 栗原秀幸 教授, 山崎浩司 教授ならびに山木将悟 助教に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、北海道立総合研究機構食品加工研究センター 柿本雅史 前所長, 川上 誠 前副所長, 八十川大輔 前主査ならびに研究職員の皆様からは、多大なご理解とご配慮を賜りました。厚く御礼申し上げます。

文 献

- Abe, H., Koyama, K., Kawamura, S., and Koseki, S. (2019). Stochastic modeling of variability in survival behavior of *Bacillus simplex* spore population during isothermal inactivation at the single cell level using a Monte Carlo simulation. *Food Microbiol.*, **82**, 436–444.
- Abe, H., Koyama, K., Takeoka, K., Doto, S., and Koseki, S. (2020). Describing the individual spore variability and the parameter uncertainty in bacterial survival kinetics model by using second-order Monte Carlo Simulation. *Front. Microbiol.*, **11**, Article ID 985.
- Agnoletti, F., Arcangeli, G., Barbanti, F., Barco, L., Brunetta, R., Cocchi, M., Conedera, G., D'Este, L., Drigo, I., Spigaglia, P., and Mazzolini, E. (2019). Survey, characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* from marine bivalve shellfish of North Adriatic Sea. *Int. J. Food Microbiol.*, **298**, 74–80.
- Aguirre, J.S., Pin, C., Rodríguez, M.R., and García de Fernando, G.D. (2009). Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 6992–6997.
- 赤羽義章 (1985). 真空包装かまぼこ保存中の物性変化に及ぼす製造条件の影響. *日水産会誌*, **51**, 1685–1691.
- André, S., Zuber, F., and Remize, F. (2010) Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *Int. J. Food Microbiol.*, **165**, 134–143.
- Ankolekar, C. and Labbe, R. G. (2010). Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 982–984.
- 青山好男, 遠田智江 (2010). 低温芽胞菌の耐熱性と低温での増殖性. *東洋食品研究所研究報告書*, **28**, 47–53.
- Aspidou, Z. and Koutsoumanis, K.P. (2015). Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation. *Food Microbiol.*, **45**, 216–221.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., and Mafart, P. (2012). Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiol.*, **30**, 29–36.

- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **3**, 1–20.
- Belletti, N., Kamdem, S.S., Tabanelli, G., Lanciotti, R., and Gardini, F. (2010). Modeling of combined effects of citral, linalool and beta-pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.*, **136**, 283–289.
- Boix, E., Couvert, O., André, S., and Coroller, Louis. (2021). The synergic interaction between environmental factors (pH and NaCl) and the physiological state (vegetative cells and spores) provides new possibilities for optimizing processes to manage risk of *C. sporogenes* spoilage. *Food Microbiol.*, **100**, Article ID 103832.
- Borreani, G., Dolci, P., Tabacco, E., and Cocolin, L. (2013). Aerobic deterioration stimulates outgrowth of spore-forming *Paenibacillus* in corn silage stored under oxygen-barrier or polyethylene films. *J. Dairy Sci.*, **96**, 5206–5216.
- Buehler, A.J., Martin, N.H., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (2018). Psychrotolerant spore-former growth characterization for the development of a dairy spoilage predictive model. *J. Dairy Sci.*, **101**, 1–18.
- Cameron, M.S., Leonard, S.J., and Barrett, E.L. (1980). Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphate buffer and in buffered pea puree. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 943–949.
- Carlin, F., Guinebretière, M.H., Choma, C., Pasqualini, R., Braconnier, A., and Nguyen-the, C. (2000). Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purées. *Food Microbiol.*, **17**, 153–165.
- Casadei, M.A., Ingram, R., Skinner, R.J., and Gaze, J.E. (2000). Heat resistance of *Paenibacillus polymyxa* in relation to pH and acidulants. *J. Appl. Microbiol.*, **89**, 801–806.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F.M., and ter Steeg, P.F. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 761–770.
- Choma, C., Guinebretière, M.H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P.E., and Nguyen-The, C. (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 617–625.

- Condón-Abanto, S., Arroyo, C., Álvarez, I., Condón, S., and Lyng, J.G. (2016). Application of ultrasound in combination with heat and pressure for the inactivation of spore forming bacteria isolated from edible crab (*Cancer pagurus*). *Int. J. Food Microbiol.*, **223**, 9–16.
- Coroller, L., Leguerinel, I., and Mafart, P. (2001). Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spore. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 317–322.
- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B., and Setlow P. (2004). Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 838–852.
- Coton, M., Denis, C., Cadot, P., and Coton, E. (2011). Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products. *Food Microbiol.*, **28**, 252–260.
- Daelman, J., Vermeulen, A., Willemyns, T., Ongenaert, R., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., and Devlieghere, F. (2013). Growth/no growth models for heat-treated psychrotrophic *Bacillus cereus* spores under cold storage. *Int. J. Food Microbiol.*, **161**, 7–15.
- Daniels, J.A., Krishnamurthi, R., and Rizvi, S.S.H. (1985). A review of effect of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *J. Food Prot.*, **48**, 532–537.
- Del Torre, M., Della Corte, M., and Stecchini, M.L. (2001). Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.*, **63**, 199–207.
- Del Torre, M., Stecchini, M.L., Braconnier, A., and Peck, M.W. (2004). Prevalence of *Clostridium* species and behaviour of *Clostridium botulinum* in gnocchi, a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.*, **96**, 115–131.
- Dufrenne, J., Bijwaard, M., te Giffel, M., Beumer, R., and Notermans, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, **27**, 175–183.
- Enfors, S.O. (1978). Mechanism of the inhibition of spore germination by inert gases and carbon dioxide, Spores VII. Chambliss, G. and Vary, J.C. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp.80–84.
- Evans, D.G., Everis, L.K., and Betts, G.D. (2004). Use of survival analysis and classification and regression trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, pH, sucrose, sorbate and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, **92**, 55–67.

- Faille, C., Lebret, V., Gavini, F., and Maingonnat, J.F. (1997). Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores suspended in buffer and in poultry meat. *J. Food Prot.*, **60**, 544–547.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, E., and Benezech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.*, **48**, 728–738.
- Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., and Guerardel, Y. (2010). Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: consequences on their ability to adhere to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.*, **143**, 125–135.
- Fancello, F., Petretto, G., Sanna, M.L., Pintore, G., Lage, M., and Zara, S. (2018). Isolation and characterization of microorganisms and volatiles associated with Moroccan saffron during different processing treatments. *Int. J. Food Microbiol.*, **273**, 43–49.
- 藤井建夫, 杉本和弘, 奥積昌世 (1993). ガス置換包装における食品関連細菌の挙動. *日本包装学会誌*, **2**, 167–172.
- 藤上朝生 (2005). 第3章－第1節－I 食材および工場環境殺菌剤次亜塩素酸ナトリウム, 現場必携・微生物殺菌実用データ集. 山本茂貴編, サイエンスフォーラム, 東京, pp.113–121.
- Food Standards Agency (2020). “The safety and shelf-life of vacuum and modified atmosphere packed chilled foods with respect to non-proteolytic *Clostridium botulinum*.”: (https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/the-safety-and-shelf-life-of-vacuum-and-modified-atmosphere-packed-chilled-foods-with-respect-to-non-proteolytic-clostridium-botulinum_1.pdf) (2023.11.10)
- 淵澤育史 (2018). 液体調味料の微生物制御における予測微生物学の活用. *食品と開発*, **53**, 7–9.
- 福崎智司 (2009). 次亜塩素酸による洗浄・殺菌機構と細菌の損傷. *日食微生物会誌*, **26**, 76–80.
- 福崎智司 (2014). 野菜の洗浄・殺菌の最新技術と見落としがちな盲点. *日食微生物会誌*, **31**, 76–81.
- Fukuzaki, S., Urano, H., and Nagata, K. (1995). Adsorption of protein onto stainless-steel surfaces.

- J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 6–11.
- Fukuzaki, S., Urano, H., and Yamada, S. (2007). Effect of pH on the efficacy of sodium hypochlorite solution as cleaning and bactericidal agents. *表面技術*, **58**, 465–469.
- Fukuzaki, S., Takehara, A., and Takahashi, K. (2006). Role of a surfactant in caustic alkali cleaning of polyethylene terephthalate surfaces fouled with organic substances. *Biocontrol Sci.*, **11**, 167–174.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Raso, J., and Condón, S. (2005). A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *J. Food Eng.*, **70**, 7–14.
- Guinebretière, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., and De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ Microbiol.*, **10**, 851–865.
- Guinebretiere, M.H., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F., and Nguyen-The, C. (2001). Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Appl Environ Microbiol.*, **67**, 4520–4530.
- Hachisuka, Y., Kozuka, S., and Tsujikawa, M. (1984). Exosporia and appendages of spores of *Bacillus* species. *Microbiol. Immunol.*, **28**, 619–624.
- Hajmeer, M.N. and Basheer, I.A. (2003). A hybrid Bayesian–neural network approach for probabilistic modeling of bacterial growth/no-growth interface. *Int. J. Food Microbiol.*, **82**, 233–243.
- Hamasaki, Y., Kotoura, S., Nakane, M., and Sugiyama, M. (2006). Spoilage ability of psychrotrophic *Paenibacillus* spp. isolated from cooked food products. *Biocontrol Sci.*, **11**, 43–47.
- Helmond, M., Nierop Groot, M.N., and van Bokhorst-van de Veen, H. (2017). Characterization of four *Paenibacillus* species isolated from pasteurized, chilled ready-to-eat meals. *Int. J. Food Microbiol.*, **252**, 35–41.
- Heyndrickx, M. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Appl. Environ. Soil Sci.*, **2011**, Article ID 561975.

- 堀川和美, 濱崎光宏, 村上光一, 石黒靖尚, 腎 博美, 長野英俊, 小熊恵二 (2005). 気密性のある容器包装に詰められた食品の細菌汚染実態. *日食微生物会誌*, **22**, 95–102.
- Hiura, S., Abe, H., Koyama, K., and Koseki, S. (2020). Transforming kinetic model into a stochastic inactivation model: Statistical evaluation of stochastic inactivation of individual cells in a bacterial population. *Food Microbiol.*, **91**, Article ID 103508.
- Horn, M. A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G., and Drake, H. L. (2005). *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaeericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1255–1265.
- Hosmer, D.W. and Lemeshow, S. (2000). Assessing the Fit of the Model (Chapter 5), Applied Logistic Regression (2nd ed.). John Wiley & Sons, Hoboken, pp.143–202.
- Huo, Z., Zhang, N., Raza, W., Huang, X., Yong, X., Liu, Y., Wang, D., Li, S., Shen, Q., and Zhang, R. (2012). Comparison of the spores of *Paenibacillus polymyxa* prepared at different temperatures. *Biotechnol. Lett.*, **34**, 925–933.
- 稲津早紀子, 竹谷早稀, 松永藤彦 (2017). 変敗コーンペーストから分離された *Paenibacillus* 属の生育性状解明. *日食微生物会誌*, **34**, 126–130.
- Ingham, S.C., Borneman, D.L., Ané, C., and Ingham, B.H. (2010). Predicting growth-no growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged ready-to-eat meats. *J. Food Prot.*, **73**, 708–714.
- 犬飼 進, 松田典彦 (1980). 細菌胞子の耐熱性におよぼす各種要因に関する研究. *缶詰時報*, **59**, 219–224.
- 石田 亘 (2018). 試験データの管理と予測微生物学の活用. *食品と開発*, **53**, 18–20.
- Jevšnik, M., Hlebec, V., and Raspor, P. (2008). Consumers' awareness of food safety from shopping to eating. *Food Control*, **19**, 737–745.
- 地子 立, 田中静幸 (2009). 半促成春取り栽培における遮光フィルム被覆によるホワイトアスパラガスの生産. *園学研*, **8**, 67–72.
- Kang, H., Kang, J., Cha, I., Kim, H., Joung, Y., Jang, T.Y., and Joh, K. (2020). *Bacillus salinus* sp. nov., isolated from commercial solar salt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**, 2696–2702.
- 加藤征江 (1992). ルーの香気に及ぼす加熱温度の影響 (第 1 報). *日家政会誌*, **43**, 871–877.

- 木村 凡, 藤井建夫 (1996). CO₂ ガスと微生物の増殖. *日食微生物会誌*, **13**, 1–8.
- 小林哲也 (2022). 容器包装詰調理食品の pH および水分活性の分布と芽胞形成菌の増殖範囲. *食品加工研究センター 成果事例集 III 2020~2021*, pp.20.
- 小林哲也, 青山好男 (2014). 次亜塩素酸ナトリウムで前処理を受けた好熱性好酸性菌芽胞の耐熱性. *日防菌防黴会誌*, **42**, 117–120.
- 小林とよ子, 上野 一恵 (1984). 貝類における *Clostridium* 属の分布に関する研究. *食品と微生物*, **1**, 119–125.
- 小磯博昭 (2014). 主要な保存料・日持向上剤の抗菌メカニズム—どこまで解明されているか?. *日食微生物会誌*, **31**, 70–75.
- 駒木 勝, 大久保良子, 荻野目 望, 出雲耕二, 松田 典彦 (2017). “つゆ” の pH および水分活性がボツリヌス菌の発育と毒素産生に及ぼす影響. *日食微生物会誌*, **34**, 118–125.
- 小関成樹 (2016). 農産物・食品における微生物挙動を予測する技術：予測微生物学の適用可能性. *農業食料工学会誌*, **78**, 504–512.
- Koseki, S., Nakamura, N., and Shiina, T. (2015). Comparison of desiccation tolerance among *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *J. Food Prot.*, **78**, 104–110.
- Koseki, S., Koyama, K., and Abe, H. (2021). Recent advances in predictive microbiology: theory and application of conversion from population dynamics to individual cell heterogeneity during inactivation process. *Curr. Opin. Food Sci.*, **39**, 60–67.
- Koshikawa, T., Yamazaki, M., Yoshimi, M., Ogawa, S., Yamada, A., Watabe, K., and Torii, M. (1989). Surface hydrophobicity of spores of *Bacillus* spp. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2717–2722.
- 厚生労働省 (1999). 気密性のある容器包装詰め^の要冷蔵食品に係る取り扱いについて. 平成 11 年 8 月 30 日通達, 衛食第 120 号.
- 厚生労働省, 農林水産省 (2005). “食品期限表示の設定のためのガイドライン”: (https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_sanitation/expiration_date/pdf/syokuhin23.pdf) (2023.11.01)
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., and Sofos, J.N. (2004). Modeling the boundaries of growth of *Salmonella* Typhimurium in broth as a function of temperature, water activity, and pH. *J. Food Prot.*, **67**, 53–59.

- Koyama, K., Hokunan, H., Hasegawa, M., Kawamura, S., and Koseki, S. (2017). Modeling stochastic variability in the numbers of surviving *Salmonella enterica*, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* cells at the single-cell level in a desiccated environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, Article ID e02974-16.
- Koyama, K., Abe, H., Kawamura, S., and Koseki, S. (2019). Calculating stochastic inactivation of individual cells in a bacterial population using variability in individual cell inactivation time and initial cell number. *J. Theor. Biol.*, **469**, 172–179.
- Koyama, K. and Lyu, S. (2022). Soft-labeling approach along with an ensemble of models for predicting subjective freshness of spinach leaves. *Comput. Electron. Agric.*, **93**, Article ID 106633.
- Kozuka, S. and Tochikubo, K. (1985). Properties and origin of filamentous appendages on spores of *Bacillus cereus*. *Microbiol. Immunol.*, **29**, 21–37.
- 熊谷浩一, 渡辺麻衣子, 高橋治男, 梶川揚申, 佐藤英一, 田中尚人, 岡田早苗 (2015). 「せんだんご」製造工程中の菌叢解析. *日本微生物資源学会誌*, **31**, 1–9.
- Kuroda, S., Okuda, H., Ishida, W., and Koseki, S. (2019). Modeling growth limits of *Bacillus* spp. spores by using deep-learning algorithm. *Food Microbiol.*, **78**, 38–45.
- Lee, F.L., Tien, C.J., Tai, C.J., Wang, L.T., Liu, Y.C., and Chern, L.L. (2008). *Paenibacillus taichungensis* sp. nov., from soil in Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 2640–2645.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 181–186.
- López, M., González, I., Condón, S., and Bernardo, A. (1996) Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 405–410.
- López, M., González, I., Mazas, M., González, J., Martin, R., and Bernardo, A. (1997). Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **32**, 305–311.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., and Michiels C.W. (2014). Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, **189**, 183–188.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., and Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food*

- Microbiol.*, **72**, 107–113.
- Masiello, S.N., Martin, N.H., Watters, R.D., Galton, D.M., Schukken, Y.H., Wiedmann, M., and Boor, K.J. (2014). Identification of dairy farm management practices associated with the presence of psychrotolerant sporeformers in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.*, **97**, 4083–4096.
- 松田典彦 (1985). チルド食品と低温殺菌. *食品と低温*, **11**, 31–37.
- McMeekin, T.A., Presser, K., Ratkowsky, D., Ross, T., Salter, M., and Tienungoon, S. (2000). Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 93–98.
- Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W. and Griffiths, M.W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *J. Food Prot.*, **54**, 969–979.
- Mejlholm, O. Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., and Dalgaard, P. (2010). Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* — An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *Int. J. Food Microbiol.*, **41**, 137–150.
- Membré, J.M., Amézquita, A., Bassett, J., Giavedoni, P., Blackburn, C.de W., and Gorris, L.G.M. (2006). A Probabilistic modeling approach in thermal inactivation: estimation of postprocess *Bacillus cereus* spore prevalence and concentration. *J. Food Prot.*, **69**, 118–129.
- Membré, J.M., Kan-King-Yu, D., and Blackburn, C.de W. (2008). Use of sensitivity analysis to aid interpretation of a probabilistic *Bacillus cereus* spore lag time model applied to heat-treated chilled foods (REFPEDs). *Int. J. Food Microbiol.*, **128**, 28–33.
- 三宅眞実, 幸田知子, 安木真世, 坂野上英世, 平田祥太郎 (2018). 嫌気性細菌芽胞の生物学的特性と損傷回復について. *日食科工会誌*, **65**, 142–147.
- 森 光國 (1987). チルド食品の現状と技術的諸問題. *日本食品低温保蔵学会誌*, **13**, 23–31.
- Morris, J.C. (1966). The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *J. Phys. Chem.*, **70**, 3798–3805.
- Mossel, D.A.A. and Struijk, C.B. (1991). Public health implication of refrigerated pasteurized ('sous-vide') foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**, 187–206.
- Mtimet, N., Guegan, S., Durand, L., Mathot, A.G., Venaille, L., Leguerinel, I., Coroller, L., and Couvert, O. (2016). Effect of pH on *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM571

- growth, spore heat resistance and recovery. *Food Microbiol.*, **55**, 64–72.
- Murakami, M., Tedzuka, H., and Yamazaki, K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiol.*, **15**, 577–582.
- Murphy, J.A. and Campbell, L.L. (1969). Surface features of *Bacillus polymyxa* spores as revealed by scanning electron microscopy. *J. Bacteriol.*, **98**, 737–743.
- 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸 (1998). 塩基配列に基づく細菌同定法の食品ミクロフローラ解析への応用. *日食科工会誌*, **45**, 58–65.
- 中條均紀, 森山裕子 (1991). *Bacillus coagulans* 孢子の耐熱性値の分布. *日食科工会誌*, **38**, 211–213.
- Nanasaki, Y., Hagiwara, T., Watanabe, H., and Sakiyama, T. (2010). Removability of bacterial spores made adherent to solid surfaces from suspension with and without drying. *Food Control*, **21**, 1472–1477.
- Nauta, M.J., Litman, S., Barker, G.C., and Carlin, F. (2003). A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, **83**, 205–218.
- 日本惣菜協会編 (2014). 2014 年版惣菜白書. 日本惣菜協会, 東京, pp.52.
- 日本惣菜協会編 (2019). 2019 年版惣菜白書. 日本惣菜協会, 東京, pp.12.
- 日本惣菜協会編 (2022). 2022 年版惣菜白書. 日本惣菜協会, 東京, pp.15.
- 日本惣菜協会編 (2023). 2023 年版惣菜白書. 日本惣菜協会, 東京, pp.4.
- 農林水産省農林水産政策研究所 (2019). “我が国の食料消費の将来推計 (2019 年版)”:
(https://www.maff.go.jp/primaff/seika/attach/pdf/190830_1.pdf) (2023.3.15)
- 長田 隆, 中野千紗, 大坪研一 (2015). トマトジュースの商業的無菌性を確保する加熱殺菌条件の検討. *日本食品工学会誌*, **16**, 145–152.
- 荻原博和, 蟹江 誠, 矢野信禮, 春田三左夫 (1993). ガス置換包装における二酸化炭素, 酸素, 及びその混合ガスが食品媒介病原細菌・腐敗細菌の発育に及ぼす影響. *食衛誌*, **34**, 283–288.
- Ovca, A. and Jevšnik, M. (2009). Maintaining a cold chain from purchase to the home and at home: Consumer opinions. *Food Control*, **20**, 167–172.
- Palop, A., Mañas, P., and Condón, S. (1999a). Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: A review. *J. Food Saf.*, **19**, 57–72.

- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., and Sala, F.J. (1999b). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **46**, 243–249.
- Peleg, M. (2006). Isothermal Microbial Heat Inactivation (Chapter 1), *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems*. CRC Press, Boca Ratone, pp.1–48.
- Peleg, M. and Normand, M.D. (2004). Calculating microbial survival parameters and predicting survival curves from non-isothermal inactivation data. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **44**, 409–418.
- Ranieri, M.L., Ivy, R.A., Mitchell, W.R., Call, E., Masiello, S.N., Wiedmann, M., and Boor, K.J. (2012). Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 5855–5863.
- Reddy, N.R., Morrissey, T.R., Aguilar, V.L., Schill, K.M., and Skinner, G.E. (2021). Evidence for *Bacillus cereus* spores as the target pathogen in thermally processed extended shelf life refrigerated foods. *J. Food Prot.*, **84**, 442–448.
- Roccatò, A., Uyttendaele, M., Cibin, V., Barrucci, F., Cappa, V., Zavagnin, P., Longo, A., Catellani, P., and Ricci, A. (2015). Effects of domestic storage and thawing practices on *Salmonella* in poultry-based meat preparations. *J. Food Prot.*, **78**, 2117–2125.
- Rodríguez, M.R., Aguirre, J.S., Lianou, A., Parra-Flores, J., and García de Fernando, G.D. (2016). Analysis of the variability in microbial inactivation by acid treatments. *LWT*, **66**, 369–377.
- Rönner, U., Husmark, U., and Henriksson, A. (1990). Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. *J Appl Bacteriol.*, **69**, 550–556.
- Rosen, D.L. (1997). Bacterial spore detection and determination by use of terbium dipicolinate photoluminescence. *Anal. Chem.*, **69**, 1082–1085.
- Rosenberg, M. (1984). Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **22**, 289–295.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., and Devlieghere, F. (2011). Validated empirical models describing the combined effect of water activity and pH on the heat resistance of spores of a psychrotolerant *Bacillus cereus* strain in broth and béchamel sauce. *J. Food Prot.*, **74**, 1662–1669.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., Xhaferi, R., and Heyndrickx, M. (2014). Incidence, diversity and

- characteristics of spores of psychrotolerant spore formers in various REPFEDS produced in Belgium. *Food Microbiol.*, **44**, 288–295.
- 佐藤 順 (2005). 第 1 章—第 2 節 加熱殺菌理論の基礎知識, 現場必携・微生物殺菌実用データ集. 山本茂貴編, サイエンスフォーラム, 東京, pp.31–42.
- Schwartz, A.R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C.W., Fujishige, N.A., Vijanderan, J.A., Vilella, W., Hanamoto, K., Diener, A., Sanders, E., Demason, D.A., and Hirsch, A.M. (2013). *Bacillus simplex* -a little known PGPB with anti-fungal activity- alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*, **3**, 595–620.
- 重田有仁, 渡邊弥生, 青山康司, 岡崎 尚 (2013). *Paenibacillus terrae* 芽胞の圧力および加熱連続処理による死滅挙動. 広島県立総合技術研究所食品工業技術センター研究報告, **27**, 29–33.
- Sikorski, J. and Nevo, E. (2005). Adaptation and incipient sympatric speciation of *Bacillus simplex* under microclimatic contrast at “Evolution Canyons” I and II, Israel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15924–15929.
- 白川武志 (1985). 蒲鉾の再加熱による影響. 香川県発酵食品試験場報告, **77**, 38–62.
- 総務省統計局 (2014). “家計調査/家計収支編 総世帯 年報”: (https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?stat_infid=000025408539) (2023.4.14)
- 総務省統計局 (2022). “家計調査/家計収支編 総世帯 年報”: (https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?stat_infid=000032221006) (2023.4.14)
- Sugiyama, H., Hagiwara, T., Watanabe, H., and Sakiyama, T. (2012). Effect of ionic substances on the adsorption of egg white proteins to a stainless steel surface. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 467–472.
- 諏訪信行, 代田徳子, 町田 肇 (1988). コーヒー缶詰の高温性芽胞細菌による変敗に対する乳化剤の添加効果. *日食工会誌*, **35**, 706–708.
- 食品化学新聞社編 (2004). 食品添加物総覧 2004 年版, 食品化学新聞社, 東京, pp81–89.
- 消費者庁, 厚生労働省 (2023). 容器包装詰低酸性食品に関するボツリヌス食中毒対策について. 令和 5 年 1 月 30 日通達, 消食表第 32 号, 薬生食監発 01310 第 2 号.
- Takahashi, K., Tanaka, R., and Fukuzaki, S. (2016a). Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus*

- unattached and attached to a solid surface in pH-controlled sodium hypochlorite solution. *Biocontrol Sci.*, **21**, 265–268.
- Takahashi, K., Tanaka, R., and Fukuzaki, S. (2016b). Adhesion of *Vibrio parahaemolyticus* to stainless steel surfaces and its removal by caustic alkali cleaning. *J. Environ. Control Technique*, **34**, 240–247.
- 高野光男, 横山理雄 (1998). 第3章—第3節 食品の熱殺菌, 食品の殺菌—その科学と技術—. 幸書房, 東京, pp.37–49.
- Takehara, A. and Fukuzaki, S. (2002). Effect of the surface charge of stainless steel on adsorption behavior of pectin. *Biocontrol Sci.*, **7**, 9–15.
- 竹内友里, 高橋英史 (2011). レトルト殺菌によるウシエビ組織の脆弱化原因の研究. *日水産会誌*, **77**, 887–895.
- 竹内友里, 高橋英史 (2013). 食塩水処理とヘッドスペースの調節によるレトルト殺菌にもなうウシエビ組織の脆弱化の抑制. *日水産会誌*, **79**, 38–47.
- Tanaka, M. and Kimura, S. (1988). Effect of heating condition on protein quality of retort pouched fish meat. *日水産会誌*, **54**, 265–270.
- Tandon, P., Chhibber, S., and Reed, R.H. (2007). The enumeration of chlorine-injured *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* is enhanced under conditions where reactive oxygen species are neutralized. *Lett. Appl. Microbiol.*, **44**, 73–78.
- Thorsen, L., Budde, B.B., Koch, A.G., and Klingberg, T.D. (2009). Effect of modified atmosphere and temperature abuse on the growth from spores and cereulide production of *Bacillus weihenstephanensis* in a cooked chilled meat sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, **130**, 172–178.
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A.G., Postollec, F., Leguerinel, I., Sohier, D., Couvert, O., Carlin, F., and Coroller, L. (2015). Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 562–568.
- Tsuda, K., Nagano, H., Ando, A. Shima, J., and Ogawa, J. (2015). Isolation and characterization of psychrotolerant endospore-forming *Sporosarcina* species associated with minced fish meat (surimi). *Int. J. Food Microbiol.*, **199**, 15–22.
- Tsuji, M. and Yokoigawa, K. (2012). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to abiotic surfaces

- of cooking utensils. *J. Food Sci.*, **77**, 194–199.
- Tsuruma, N., Doto, S., Ishida, W., Koyama, K., and Koseki, S. (2021). How many repetitions per condition are required for developing a stable growth/no growth boundary model for *Bacillus simplex* spores?, *Food Control*, **122**, Article ID 107756.
- 内村眞佐子, 小岩井健司 (2000). 千葉県で発生したハヤシライスの具によるボツリヌス食中毒事例について. *千葉県衛生研究所研究報告*, **24**, 35–37.
- 浦野博水, 福崎智司 (2008). 硬質表面からのトリオレインの除去における無機塩の界面での役割. *防菌防黴*, **36**, 513–521.
- Urano, H., Nagata, K., and Fukuzaki, S. (2002). Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to alumina surfaces and its removal by caustic alkali cleaning. *Biocontrol Sci.*, **7**, 131–137.
- Wiencek, K.M., Klapes, N.A., and Foegeding, P.M. (1990). Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2600–2605.
- 山本 泰, 東 和男, 好井久雄 (1984). 有機酸類の抗菌性. *日食工会誌*, **31**, 525–530.
- 山本 泰, 今泉 渉, 東 和男, 好井久雄 (1990). *Clostridium* 属芽胞の耐熱性に及ぼす有機酸の影響. *日食工会誌*, **37**, 199–202.
- Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N., and Shinano, H. (1997). Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Lett. Appl. Microbiol.*, **25**, 153–156.
- 山澤正勝 (1990). 高温加熱によるかまぼこの物性変化. *日水産会誌*, **56**, 497–503.
- 山澤正勝, 村瀬 誠, 志賀一三 (1979). レトルトかまぼこの品質改良に関する研究-I. *日水産会誌*, **45**, 187–192.
- Yoon, J.H., Oh, H.M., Yoon, B.D., Kang, K.H., and Park, Y.H. (2003). *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov., biofloculants for efficient harvesting of algal cells. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 295–301.
- Zhang, C., Yang, G., Shen, P., Shi, Y., Yang, Y., Liu, Y., Xia, X., and Wang, S. (2022). Inactivation mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiol.*, **103**, Article ID 103951.