

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14552

研究課題名（和文）高圧処理による好熱性好酸性菌芽胞の耐熱性弱体化

研究課題名（英文）Decrease in heat resistance of Alicyclobacillus acidoterrestris spore by high hydrostatic pressure treatment

研究代表者

森松 和也（Morimatsu, Kazuya）

愛媛大学・農学研究科・講師

研究者番号：70746742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高圧処理により好熱性好酸性菌芽胞の耐熱性を弱体化できることを利用した新規殺菌技術について、芽胞懸濁液の成分が与える影響について調べた。100 MPaの中温高圧処理を行った場合、懸濁液のpHが低下すると殺菌効果が増加した。このとき、中温中高圧処理により殺菌効果に対して、懸濁液中に含まれる有機酸や無機酸の成分による影響はみられなかった。また、pH5.0の懸濁液中にカルシウムやマグネシウムが含まれている場合、ナトリウムやカリウムに比べ、殺菌効果が抑えられた。一方、金属成分による殺菌効果の抑制は、pHを4.0まで下げるか、処理圧力を600 MPaまで上昇させると小さくなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の技術では好熱性好酸性菌芽胞の殺菌を行うには100以上の高温での熱処理が必要となるため、飲料の熱劣化が避けられなかった。これに対し、芽胞へ高圧処理を行うと芽胞の発芽を誘導させることで芽胞の耐熱性を弱体化できるため、殺菌に要する熱処理の温度を下げることができる。しかしながら、高圧発芽誘導を利用した芽胞の殺菌に関する研究は少なく、共存成分が芽胞の高圧発芽誘導に与える影響についてほとんど知られていないのが現状である。本研究により、一部の金属成分が芽胞の高圧発芽誘導を抑制することを明らかとした。これにより、飲料中の成分により高圧発芽誘導を利用した芽胞の殺菌の効果が変動することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate pasteurization of Alicyclobacillus acidoterrestris spore by the combination of high hydrostatic pressure treatment (HHPT) and mild heat treatment, which could achieve pasteurization of the spore since HHPT can decrease heat resistance of the spore. At 100 MPa of HHPT, the pasteurization of the spore could be increased according to decrease in the pH value of the spore suspension. Meanwhile, no effect of the component of organic acid and mineral acid in the suspension on the pasteurization by HHPT was not observed. Additionally, calcium or magnesium component in the spore suspension could inhibit the pasteurization effect on the spore in comparison with sodium or potassium. On the other hands, inhibition on the pasteurization by the mineral component was not observed when the HHPT performed at 600 MPa.

研究分野：微生物制御学

キーワード：高圧処理 高圧発芽誘導 殺菌 好熱性好酸性菌 芽胞

## 1. 研究開始当初の背景

pH4.0 未満の酸性飲料に分類される果汁飲料において好熱性好酸性菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) による変敗事故が国内外で多発しており、果汁飲料の衛生管理において好熱性好酸性菌の制御が重要視されている。好熱性好酸性菌は、大半の菌が生育できないような酸性下 (pH2.0 以上) でも生育可能であるため、果汁飲料の常温流通を行うには好熱性好酸性菌の殺滅が必要となる。しかしながら、好熱性好酸性菌は耐熱性芽胞を形成するため、食品衛生法で定められた pH4.0 未満の酸性飲料の殺菌基準である 65 °C・10 分以上の熱処理を施しても好熱性好酸性菌芽胞の殺滅は難しいとされる。好熱性好酸性菌芽胞の殺滅には 90 °C 以上の熱処理が必要とされるが、過剰な熱による処理は果汁の成分変性を引き起こし、食味、香り、栄養素等の品質劣化は避けられない。そのため、熱による品質劣化を最小限にした上で、果汁飲料中の好熱性好酸性菌芽胞を殺滅できる殺菌技術の確立が求められているのが現状である。

芽胞を形成した細菌は発芽により耐熱性を示す芽胞形態から耐性の非常に弱い栄養細胞の形態になることが知られている。近年、高圧力によりこの発芽を人為的に誘導し、熱処理条件を緩和できることが明らかにされた。そのため、好熱性好酸性菌芽胞の新規殺菌技術として「高圧処理による芽胞の耐熱性弱体化」に着目した。一方、高圧処理を同一の菌に施しても、耐熱性弱体化の程度が果汁成分により変化すると報告されている。これらの結果から、高圧力による芽胞の発芽誘導では高圧処理に供試する芽胞懸濁液中の共存成分により発芽誘導効果が大きく異なることが示唆されている。しかしながら、果汁には有機酸、ミネラル (金属成分) 等の多くの物質が含まれているものの、果汁中の個々の物質が高圧力による芽胞の発芽誘導に対してどのような影響を与えているか明らかとなっていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

好熱性好酸性菌芽胞は非常に高い耐熱性を有するため、殺菌を達成するには高温の熱処理が必要となる。これに対し、本研究では高圧処理による芽胞の耐熱性弱体化に着目した。芽胞へ高圧処理を施すと芽胞の発芽を誘導することができ、これにより耐熱性の低い栄養細胞の形態となるため、酸性飲料の殺菌基準である 65 °C でも芽胞の殺滅を可能にできる。一方、高圧処理を同一の菌に施しても、耐熱性弱体化の程度が果汁成分により変化すると報告されている。これらの結果から、高圧力による芽胞の発芽誘導では高圧処理に供試する芽胞懸濁液中の共存成分により発芽誘導効果が大きく異なることが示唆されている。しかしながら、果汁には有機酸、ミネラル (金属成分) 等の多くの物質が含まれているものの、果汁中の個々の物質が高圧力による芽胞の発芽誘導に対してどのような影響を与えているか明らかとなっていないのが現状である。そこで、本研究では、高圧処理による果汁飲料の新規殺菌技術の確立を最終目標とし、果汁成分に関連する種々の有機酸やミネラル成分が好酸性菌芽胞の高圧発芽誘導に与える影響について調べてきた。

## 3. 研究の方法

### (1) 溶存物質濃度が好酸性菌芽胞の高圧発芽誘導に与える影響

供試菌として *Alicyclobacillus acidoterrestris* NBRC108913 (以下、好酸性菌) を用いた。pH 3.7 の YSG 寒天培地上へ好酸性菌を 45 °C で 1 週間培養し、芽胞を形成させた。得られた芽胞液を pH 5.0/pH 3.5 のクエン酸ナトリウム溶液および塩化ナトリウム溶液にそれぞれ懸濁し、高圧処理試験 (65 °C・100 MPa・10 分間) に供試する試料を作製した。未処理および高圧処理後の懸濁液をそれぞれ適宜希釈し、0.1 ml を YSG 寒天培地上に塗布し、45 °C で 2 日間培養した。その後、出現したコロニー数から生菌数の算出を行った。なお、中高圧処理後の生菌数を未処理の生菌数で除したものを菌数減少量として算出した。

### (2) 有機酸・無機酸が好酸性菌芽胞の高圧発芽誘導に与える影響

好酸性菌芽胞を pH 3.5-5.0 のクエン酸ナトリウム、DL-リンゴ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、塩化ナトリウムの各溶液へ懸濁し、高圧処理試験 (65 °C・100 MPa・10 分間) に供試する試料を作製した。生菌数の測定については (1) と同様の方法で行った。なお、各溶液の濃度はナトリウム濃度が生理食塩水 (154 mM) と同濃度のものを用いた。生菌数の測定については (1) と同様の方法で行った。

### (3) ミネラルが好酸性菌芽胞の高圧発芽誘導に与える影響

好酸性菌芽胞を pH 4.0/5.0 の塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムの各溶液へ懸濁し、高圧処理試験 (60 °C・100-600 MPa・10 分間) に供試する試料を作製した。生菌数の測定については (1) と同様の方法で行った。

## 4. 研究成果

### (1) 溶存物質濃度が好酸性菌芽胞の高圧発芽誘導に与える影響

好酸性菌芽胞への高圧処理による殺菌に対する溶液濃度(0.015-308 mM)の影響を調べるため、塩化ナトリウム溶液およびクエン酸ナトリウム溶液に懸濁した好酸性菌芽胞への高圧処理(65・100 MPa・10分間)を調べた。溶液の種類に関わらず、溶液 pH が 5.0 の場合、0 mM から 15 mM 濃度が上昇することで高圧処理による殺菌効果が 0.4 log 程度増加することが明らかとなった。一方、クエン酸ナトリウム溶液ではそれ以上の濃度の増加が示されても、殺菌効果に影響は見られなかった。これに対し、塩化ナトリウム溶液では濃度の増加と共に、殺菌効果が抑制され、308 mM では 3.3 log となり、0 mM の際と同程度の殺菌効果となった。溶液 pH が 3.5 の場合、0 mM から 77 mM まで濃度が上昇することで高圧処理による殺菌効果が 1.0 log 程度増加することが明らかとなった。また、両溶液共に、濃度の増加により殺菌効果が抑制されたが、77 mM から 308 mM まで濃度が上昇しても、殺菌効果の減少は 0.2 log 程度であり、僅かであった。また、pH の違いによる高圧処理による殺菌効果を比較した場合、溶液に関わらず、pH 3.5 の溶液の殺菌効果が高くなった。

以上のことから、好酸性菌芽胞への高圧殺菌には溶液 pH が影響を及ぼす可能性が示された。また、pH 3.5 近傍の果汁であれば、溶存物質濃度が高くなるような濃縮果汁であっても、高圧処理により十分に殺菌できる可能性が示された。一方、pH が高いような低酸性飲料については好酸性菌芽胞への高圧殺菌効果が低くなる可能性が示唆された。

### (2) 有機酸・無機酸が好酸性菌芽胞の高圧発芽誘導に与える影響

好酸性菌芽胞への高圧処理(65・100 MPa・10分間)による殺菌に対する有機酸・無機酸による影響を調べるため、pH 3.5-5.0 の 154 mM のクエン酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、燐酸ナトリウム、塩化ナトリウムの各溶液における高圧処理による殺菌効果を調べた。まず、高圧処理による殺菌効果への各溶液における pH の影響を調べた。溶液の種類に関わらず、pH が低下することで殺菌効果が増加することが明らかとなった。このとき、pH 5.0 における各溶液での殺菌効果について比較すると、いずれの溶液においても 2.7 log 程度の菌数減少が示された。また、pH 3.5 では、溶液の種類により 4.2-4.6 log 程度のばらつきが見られたが、統計的な検定を行っても有意な差は見られなかった。

以上のことから、154 mM 程度の濃度であれば、果汁中に含まれる有機酸・無機酸の成分による好酸性菌芽胞への高圧殺菌への影響は小さいものと考えられる。

### (3) ミネラルが好酸性菌芽胞の高圧発芽誘導に与える影響

好酸性菌芽胞への高圧処理(60・100-600 MPa・10分間)による殺菌に対するミネラルによる影響を調べるため、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムの各溶液における高圧処理による殺菌効果を調べた。このとき、圧力の違いによりミネラルの影響が異なるかを検証するため、100, 200, 400, 600 MPa で高圧処理を行った。100 MPa で高圧処理を行った場合、pH 5.0 の溶液では、塩化ナトリウム/カリウム溶液における菌数減少量は 2.8 log 程度であったのに対し、塩化カルシウム/マグネシウム溶液における菌数減少量は 1.0 log 程度となった。そのため、100 MPa の高圧処理では、カルシウムやマグネシウムの働きで高圧処理による好酸性菌芽胞の発芽誘導が抑制されたものと考えられる。一方、200 MPa で高圧処理を行うと溶液間の菌数減少量の差は 1.0 log 程度となり、100 MPa の際と比べ、溶液間の差は小さくなった。さらに、圧力を上昇させると溶液間の差は小さくなり、600 MPa では溶液間の差は 0.1 log にも満たない程度となった。したがって、pH 5.0 では、低い圧力による高圧発芽誘導を抑制する働きをカルシウムやマグネシウムが有するものと考えられる。一方、圧力を上昇させることでカルシウムやマグネシウムの高圧発芽誘導への抑制を小さくすることができるものと考えられる。pH 4.0 の溶液では、菌数減少量における溶液間の差は、100 MPa では 0.4 log 程度、200 MPa では 0.3 log 程度となった。そのため、pH の低下によって溶液中のカルシウムおよびマグネシウムによる高圧発芽誘導の抑制が小さくなったと考えられる。

以上のことから、果汁中のミネラル成分にカルシウムやマグネシウムが含まれている場合、100-200 MPa 程度の圧力では殺菌効果が抑制される可能性が示唆された。このとき、処理圧力を上昇させる、または果汁の pH を下げることでミネラル成分による高圧殺菌の抑制を防ぐことができるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森松和也、高橋憲子、中浦嘉子、稲岡隆史、山本和貴                |
| 2. 発表標題<br>中温中高压処理による好熱性好酸性菌芽胞の殺菌におけるpHの影響         |
| 3. 学会等名<br>2019年 農業食料工学会・農業施設学会・国際農業工学会第6部会 合同国際大会 |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|