食品殺菌の微生物工学的研究

土 戸 哲 明

関西大学化学生命工学部生命・生物工学科

Several Aspects of Microbial Technology for Food Pasteurization and Sterilization

Tetsuaki TSUCHIDO

*Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University
3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan*

The results obtained from our studies on several aspects of food pasteurization and sterilization by cross-talk between microbiology and technology were presented. First, we found that the thermal death of *Escherichia coli* was affected by rising temperature and pre-incubation processes and it was suggested that the phase transition and phase separation of membrane lipids were involved in these phenomena. Second, we analyzed the kinetics of bacterial death by a combined treatment of heating with antimicrobial compounds and we presented two distinct modes depending upon the type of chemicals. Third, new methods for process evaluation and prediction of pasteurization effects, including the growth-delay analysis, the cell motion analysis and the analysis with the fluorescence of green fluorescent protein variants expressed in bacterial cell were proposed. And finally, we constructed the database of thermal death of microorganisms based upon the data which have appeared in articles published in 30 major academic journals. Also, some predictive models on the thermal death of bacterial spores in a buffer and liquid foods were predicted as influenced by several factors such as pH, the sodium chloride concentration and heating temperature.

Keywords: pasteurization, sterilization, food, microbiology, technology.

1. は じ め に

殺菌には微生物学的な側面と工学的な側面があり、前者ではその直接の対象が微生物であるのに対し、後者では、食品などの物質や諸環境の空間という場ないし系である。その意味で、前者では微視的な見方ととらえられ、後者は巨視的な立場で考えられるといえよう [1]。したがって、現場における殺菌方法の選択や条件設定には、微生物の耐性という生物的情報と装置や殺菌手段に関する特性や処理時の負荷量という物理的・化学的情報の双方が必要になる。

今回の受賞対象と目される食品殺菌における微生物工学的研究は、上記の2つの分野間のクロストークによってより緻密な殺菌の条件設定・プロセス評価やそ

れらの方法論の開発を企図して行ったものである。この融合領域の成果はまだわずかであるが、ここではそれらを含む微生物工学的視点から検討を進めた主な研究の概要を紹介する。なお、別途進めてきた純微生物学的ないし生化学的な研究の成果 [1] については対象外とした。

2. 加熱殺菌における昇温過程の解析

加熱殺菌は必ず非定温過程を伴うが、この過程における微生物の耐性変動について検討された例は1970年代当時ほとんど見出せなかった。筆者ら [2-5] は、マイクロ波の急速加熱による殺菌効果の解析の検討から派生して、大腸菌について一定の加熱温度に至るまでの非定温過程における昇温速度および一定の非致死温度での予備保温温度の影響を検討し、以下の現象を見出した。

37℃で培養した大腸菌 K12 の野生株 OW6 を緩衝液

中で0℃および37℃で30分間予備保温し、その後に10倍希釈法（予め加熱保温した緩衝液18 mlに菌懸濁液2 mlを注入する方法）によって50℃や55℃に急速加熱すると、その一定温度での加熱過程における死滅速度が予備保温温度に依存し、37℃よりも0℃の方が大であった（Fig. 1）。これを予備保温効果とよび、その要因について、予備保温温度と培養温度を変えて解析した結果、細胞膜脂質の相転移・相分離が関与していることが判明した（Fig. 2）。すなわち、37℃培養の大腸菌では、ゲル相の出現が起こり始める温度は22℃あたりで、そ

Fig. 1 Preincubation effect on the thermal death of *E. coli* at 50°C. Cells grown at 37°C were harvested, washed, preincubated at 0°C (○) or 37°C (●) for 30 min and then heated to 50°C with 10-fold dilution method in 50 mM potassium phosphate buffer at pH 7.0.

Fig. 2 Thermal death at 50°C of *E. coli* cells grown at different temperatures after preincubaion at various temperatures. Cells were grown at 37°C (●) or 15°C (○), preincubated for 30 min and then heated to 50°C with 10-fold dilution method in 50 mM potassium phosphate buffer at pH 7.0. Solid and broken parts of line suggest the temperature ranges for the homogeneous liquid-crystalline phase and the phase separation state including the gel phase of membrane lipids, respectively.

れから0℃までの温度範囲では低温になるほど細胞表面上のゲル相の面積が増加するが、細胞の加熱後の生存性（耐熱性）はほぼこの挙動に呼応して変化した。22℃以上では膜脂質はすべて液晶相にあり、耐熱性もこれに対応して一定であった。一方、膜脂質の不飽和脂肪酸が増えて細胞膜の流動性が上昇することが知られている15℃培養の細胞の膜脂質は、0~37℃の範囲ではすべて液晶相であり、耐熱性も低いままで変動しなかった。37℃培養細胞について10倍希釈法による加熱によって観察されたFig. 2の曲線的な耐熱性の予備保温温度依存性は、加熱時の希釈倍率に影響を受け、100倍希釈（予熱した緩衝液19.8 mlに0.2 mlの菌懸濁液を注入）による一層急速な加熱では22℃付近で急激に生存率が低下し、それ以下の低温側でほぼ一定となる不連続性が認められた。

このような現象は、野生株の培養温度変化の代わりに不飽和脂肪酸合成欠損株を用い、同じ培養温度の30℃で添加不飽和脂肪酸種を変化（オレイン酸とリノレン酸）させた場合にも認められ、オレイン酸培養では膜脂質相分離開始（ゲル相が出現し始める）温度の15℃付近から低温になるにつれて10倍希釈法による加熱後の生存性が次第に低下したが、相分離開始が4℃付近であるリノレン酸培養細胞ではほとんど影響を受けなかった。なお、最近、筆者らは、この予備保温効果には、熱作用の二次的な細胞膜損傷に起因するとみられる活性酸素の発生が関与することを示唆している。

この定温での予備保温の代わりに、非定温加熱における昇温速度を変えて検討したところ、0℃からの緩慢昇温はその速度が遅いほどその後の定温加熱による死滅の速度が低下した。この現象を昇温効果とよび、速度をさまざまに変化させて検討した結果、上記の予備保温後の希釈による比較的急速な昇温加熱領域（約30℃/min以上）とそれより緩慢な昇温領域（約30℃/min以下）とでそれぞれ耐熱性変動の要因が異なることを示唆した。急速加熱域では上記の細胞膜脂質の相転移・相分離が関与するが、その効果には相分離が生ずる温度範囲が存在し、昇温速度の効果は相分離の程度によって決定されるとみられ、たとえば37℃培養の大腸菌の耐熱性は22℃以下の温度範囲をどれだけの速度で通過するかによって影響を受ける。しかし、15℃培養の場合は0~37℃の範囲で相分離は発生しないため、これに影響されないと推察された。一方、緩慢加熱域では37℃以上から加熱温度近くに至るまでの高温暴露による細胞の熱ショック応答に起因する熱適応（熱トレランス）が耐熱性化の要因と考えられた。同様な現象は予備保温の代わりに加熱後の冷却温度についても得られた。

ここで得られた予備保温効果と昇温効果は、種々の細菌・酵母の栄養細胞、卵白やトマトジュースなど種々

の食品系でも観察され、低温加熱殺菌（パストゥリゼーション）プロセスにおいて、効果の評価や予測に留意すべき問題であることを指摘した。

3. 加熱殺菌における薬剤併用効果の動力学的解析

加熱殺菌では適当な薬剤を共存させると殺菌効果が增大することが広く知られ、この併用処理は実際の食品殺菌においてしばしば利用されている。筆者ら [6-9] は、大腸菌をモデルに、食品防腐剤のソルビン酸と両性界面活性剤（アルキルアミノエチルグリシン系のテゴ-15DL）の加熱併用殺菌効果について、加熱温度と薬剤濃度を変動させて調べているうち、その特性が両薬剤間で大きく異なることを見出した（Fig. 3）。

一般に、微生物の熱死滅は次の一次反応に従うことが多い。

$$dN/dt = -kN$$

ここで、 N は生存数 (mL^{-1})、 t は加熱時間、 k は死滅速度定数 (min^{-1}) である。

ソルビン酸あるいは両性界面活性剤が共存する場合、熱死滅速度はそれらの添加濃度の上昇とともに増大したが、その温度依存性に明らかな相違が認められた。

熱死滅速度の温度依存性は、一般の化学反応と同様に次のアレニウス式

$$k = A \cdot \exp(-E_a/RT)$$

に従うことが知られ、ここで、 E_a は反応の活性化エネルギー (kJ/mole)、 T は絶対温度 (K)、 R は気体定数、 A は頻度因子 (定数) である。

この死滅反応の活性化エネルギーの値が、ソルビン酸の場合には調べた 0.5~3% の範囲の各濃度について

あまり差がなかったが、両性界面活性剤では、1~10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で濃度の上昇とともに顕著に低下した。Fig. 3 (図はほぼ同様な傾向を示す下記のアイリングの式に基づくプロット) にみられるように、両性界面活性剤では各直線を高温側に外挿するとおおざっぱにみて実験域に近い温度で交差する傾向にあって、その温度を平均値として求めることができるが、後者では平行関係にあるため、測定不可能であった。

死滅反応の温度依存性は絶対反応速度論におけるアイリングの式

$$k = (k_B T/h) \cdot \exp(-\Delta H^*/RT) \cdot \exp(\Delta S^*/R)$$

によっても表される。ここで、 ΔH^* 、 ΔS^* はそれぞれ反応の活性化エンタルピーと活性化エントロピー、 k_B はボルツマン定数、 h はプランク定数である。

さらに、両性界面活性剤による熱死滅促進において、死滅反応の ΔH^* に対して ΔS^* を各薬剤濃度についてプロットすると直線が得られたことから、 $\Delta H^* - \Delta S^*$ 補償効果

$$\Delta S^* = (1/T_c) \Delta H^* + b$$

を確認した。ここで、 T_c は補償温度とよばれ、 b は定数である。得られた直線の傾きから補償温度を求めた結果、上述のアレニウスプロットにおける交差点の温度に近い 61°C となった。理論上は、この温度で併用効果は消失することになる。ソルビン酸の場合はそれらの熱力学的変数があまり変化しないため、補償温度は求められなかった。

一方、薬剤の熱死滅促進効果を、古くから知られている薬剤殺菌における経験式

$$k = B \cdot C^n$$

Fig. 3 Arrhenius plots for the thermal death of *E. coli* in the presence of an amphoteric surfactant Tego 15DL (A) or sorbic acid (B). Concentrations used are indicated in the figure.

に基づいて解析した。ここで、 C は薬剤濃度、 n は殺菌濃度指数、 B は定数である。この式に基づいて薬剤濃度と死滅速度定数の両対数プロットをとると直線が得られ、その傾きから殺菌濃度指数が求まる。この値は、ソルビン酸では加熱温度によらずほぼ一定であったが、両性界面活性剤では加熱温度の上昇とともに低下したことから、ソルビン酸の熱死滅促進効果は加熱温度にほとんど依存しないが、両性界面活性剤の場合は高温側よりも低温側で顕著であることがわかった (Fig. 3)。

薬剤と加熱の併用殺菌効果について、加熱温度と薬剤濃度の両方の影響を系統的に検討した例は予想外に少ない。そこで筆者らは、それらを上記の動力学的特性に基づいて評価し、加熱併用殺菌効果を示す薬剤は、一般にソルビン酸のような挙動をとる酸 (A) 型と両性界面活性剤に類似した挙動を示す界面活性剤 (S) 型の2つに類型化できることを提唱した。

また、この種類の違いの要因を解析するため、大腸菌の熱死滅における炭素鎖長の異なる脂肪酸の促進効果を系統的に調査した結果、カプロン酸 (C6) はA型であるが、カプリル酸 (C8)、カプリン酸 (C10)、ラウリン酸 (C12) はS型に属することがわかった。このことは、薬剤分子の疎水性が細胞の熱死滅促進作用に関係することを示唆しており、おそらく細胞膜への作用の有無に関わるものと推察された。乳化剤のモノラウリンについても特性を検討し、S型に属することを認めた。

4. 新規な殺菌・細胞損傷効果の評価法の開発

殺菌効果の評価には、培養法と非培養法があり、培養法では一般的に平板法が古くから用いられているが、煩雑な希釈操作を必要とするため、近年ではATP定量、細胞内特定酵素の活性測定や色素の透過性など、非培養法に該当する新規な迅速法・簡便法が多く開発され

Fig. 4 A model of the injury distribution in a stressed cell population exposed to a lethal treatment. Each cell in a fraction of the population, n_i , has a lag time, $l + \lambda_i$ ($i=1, 2, \dots, k$).

ている。これらの方法における細胞の生死判定は、それぞれの測定原理に依存するため、当然得られる結果は異なる。筆者らは、培養法であるが操作が簡便な発育遅延時間解析法と非培養法で顕微鏡像の画像処理に基づく細胞運動速度解析法および細胞内に予め合成させた緑色蛍光タンパク質 (GFP) を利用する蛍光法についてそれらの有効性を検討した。

4.1 発育遅延解析による評価法 [10–12]

この方法は、未処理細胞集団に対する処理集団の発育遅延時間差から殺菌率を求めるもので、微生物の損傷による発育遅延分布の概念をもとに、その基盤となる理論を以下のとおり構築した。

微生物集団は殺菌処理前でも細胞周期によって個々の細胞の処理耐性は異なっていると考えられるが、モデルを単純にするためそれぞれの発育のための誘導期は同じ時間 l (h) であると仮定する (Fig. 4)。この集団を殺菌処理にさらすと、一部の亜集団 (n_k) は不可逆的に死に至るとみられるが、その他の集団は処理の程度に応じて軽傷のもの (n_1) から重傷のもの (n_{k-1}) までいくつかの亜集団に分かれ、これらの亜集団は処理後適当な条件に置かれることによって回復できるものと仮定する。処理集団においては、損傷回復に必要な誘導期とその延長時間 ($l + \lambda_i$) は、Fig. 4 に示すように分布することを想定する。

この処理集団を液体培地に移し、濁度 (OD) 測定などの方法によってその後の発育を追跡すれば、Fig. 5a のような発育曲線が得られる。この場合、無傷集団と処理集団は、同一の比発育速度 μ (h^{-1}) で発育すると仮

Fig. 5 Growth curves of intact and stressed cell populations as measured by optical density (a) and as supposed with the real number of survived cell (b).

定すると、それらの発育曲線はそれぞれ、式(1)と(2)で示される。

$$N=N_0 \exp[\mu(t-l)] \quad (1)$$

$$N=N_0 \sum_{i=1}^k n_i \cdot \exp[\mu(t-l-\lambda_i)] \quad (2)$$

ここで、各亜集団の λ は、 $0 < \lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{k-1} \ll \infty$ 、また $\lambda_k \doteq \infty$ とおくことができ、

$$\sum_{i=1}^k n_i = 1 \quad (3)$$

また、 k 番目の亜集団は死滅したものとすれば、生存数は1から $k-1$ 番目までの亜集団となり、これを生存割合 n_v とすれば、式(4)のようになる。

$$\sum_{i=1}^{k-1} n_i = n_v \quad (4)$$

ここで、換算生存率 ν を下記の式(5)によって定義する

$$\nu = \sum_{i=1}^k n_i \cdot \exp(-\mu \lambda_i) = \sum_{i=1}^{k-1} n_i \cdot \exp(-\mu \lambda_i) \quad (5)$$

一般には $\lambda_i > 0$ なので、

$$\nu < n_v$$

式(5)を式(2)に代入することにより、処理集団の生存数は式(6)

$$N = \nu N_0 \exp[\mu(t-l)] \quad (6)$$

となり、これを式(1)と比較することによって、Fig. 5bに示したように、処理によって生存数が初発値 N_0 から νN_0 に低下したとみなせる。そこで、Fig. 5に示すように、対数期のある一定の菌数 N_a に達する時間を無傷集団について t_c 、処理集団は t' とすれば、式(1)と式(6)は、それぞれ、

$$N_a = N_0 \exp[\mu(t_c - l)] \quad (7)$$

$$N_a = \nu N_0 \exp[\mu(t' - l)] \quad (8)$$

となる。式(7)と(8)から、

$$\nu = \exp[-\mu(t' - t_c)]$$

処理集団の無傷集団に対する発育遅延時間をFig. 5に示すように τ (h)とおくと、

$$\nu = \exp(-\mu\tau)$$

すなわち、

$$-\log \nu = \mu\tau/2.303 \quad (9)$$

ここで、無傷集団について、接種菌数を10倍ごと希釈して培養すると N_a に到達する時間 t_c は一定時間ごとに遅延する。そこで、初発生存数 N_0 を N_0' としたときの t_c を t_c' とし、そのときの発育遅延時間を τ_c とすると、

$$\log(N_0'/N_0) = \mu(t_c' - t_c) = -\mu\tau_c \quad (10)$$

そして、無傷集団の接種菌数を1桁低下させて培養したときの発育遅延時間を G_{10} (h)と定義すると、 $N_0' = N_0/10$ のとき、 $\tau_c = G_{10}$ となり、これを式(10)に代入して、

$$\mu \cdot G_{10} = 2.303 \quad (11)$$

式(10)が処理集団についても成立し、 $\mu(G_{10})$ が無傷集団のそれとほぼ同じであることを確認すれば、式(11)と式(9)から

$$-\log \nu = \tau/G_{10} \quad (12)$$

となる。

つまり、式(5)によって生存割合とその誘導期延長時間の関数として定義された換算生存率 ν の対数的低下は、式(12)で表されるように、殺菌処理による発育遅延時間 τ を接種菌数の1/10低下による発育遅延時間 G_{10} で除したものと表記できる。この方法の適用にあつては上述のいくつかの条件を満足する必要があるが、少なくとも物理的な殺菌処理の場合はほぼ問題なく適用できる。

この方法が平板法に勝る最大の利点は、自動発育測定装置を用いることによって極めて簡便に結果が得られ、独立した細胞だけでなく集合性のものや菌糸状のものでも適用可能なことである(Table 1)。筆者らの研究室では、最大48本の試料について培養とその間の濁度変化が最短2分程度の間隔で測定可能なバイオスキャナー(大岳製作所製OT-BS-48)を用い、処理後の各試料をこの装置にまとめてセットして培養と濁度測定を開始し、翌日各データを発育遅延時間計測ソフトウェアによってコンピュータ処理し、即座に τ を求めている。生存率の結果としては、一般に、細胞損傷の回復に時間的余裕を与える平板法よりもやや低い値が得られることが多い。

なお、ここでは省略するが、薬剤や食塩など発育阻害作用をもつ化合物が解析用培地に含まれる場合についても検討し、その生存率低下の理論を導出した[11]。

4.2 細胞運動速度法[13-15]

運動能をもつ細菌は、鞭毛によって移動するが、そのエネルギー源は細胞膜を介したプロトン勾配である。細胞が殺菌処理にさらされて損傷を受けると、そのエネルギーレベルが低下し、そのため運動の速度も低下する。鞭毛は左回転して細胞が直進泳行し、右回転で移動停止してタンブリングとよばれる方向転換をする。細胞は、この鞭毛の2つの回転モードを繰り返して移動するが、変異処理によってタンブリング能を欠損させた細胞では、運動速度は処理による損傷の程度に直

Table 1 Advantages and disadvantages of the growth-delay analysis method and the bacterial motion analysis method in comparison with colony counting method.

Item	Growth-delay analysis method (Growth method)	Bacterial motion method (No-growth method)
Advantage	<ul style="list-style-type: none"> Simple (not necessary for dilution and plating) Small experimental errors Many samples simultaneously available Applicable for chain-forming, clustering or mycelial-type cells Applicable to other growth assay methods available besides turbidity 	<ul style="list-style-type: none"> Rapidly measurable (about 1 sec/screen for measurement, about 2 min for data analysis and about 3 min for sample preparation) Evaluation possible for both individual cell and cell mass levels Low running cost Simple operations
Disadvantage	<ul style="list-style-type: none"> Time-consuming (cultivation necessary) Install cost necessary for an apparatus for measurement Computer software necessary for analysis of delay-time 	<ul style="list-style-type: none"> Not available for non-motile, easily attaching, and morphologically changing microorganisms Distribution of motion speed in a cell population Install cost necessary for an image analyzer for measurement Restriction of three-dimensional motion.

接対応して変化する。また、運動能を全く失ったもの（ブラウン運動レベル）を死菌、運動性を保持しているものを生菌と定義できる。

ここで開発した方法は、枯草菌や大腸菌のタンブリング能欠損株を検定菌として用い、殺菌処理後、光学顕微鏡下にその運動画像軌跡の解析によって運動速度を計測し、細胞の死滅や損傷の評価に応用するものである。最大の長所は、0.05 秒間隔で 1 分間程度の画像計測を行うので極めて迅速な評価ができることである。欠点としては、上記検定菌を使用するのでなければ、運動性細菌でしかもタンブリング能欠損株を取得する必要があること、運動速度は細胞間で分布があるため最低 50 細胞くらいを対象に計測する必要があることである（Table 1）。

4.3 緑色蛍光タンパク質利用蛍光法 [16–17]

種々の殺菌処理における細菌胞子や栄養細胞の死滅・損傷過程を迅速に評価するため、市販の緑色蛍光タンパク質（GFP）をもとに、それを耐熱性化したものや pH、塩濃度、酸化などを感知する各種の GFP 変異体を作製し、それらを胞子コアや細胞内に発現させ、処理中のそれらの蛍光の変化を解析した。

細菌胞子の場合、ベクター pET21a 内でシグマ G 因子支配下の *sspB* 遺伝子のプロモーターの下流に GFP 変異体の遺伝子を連結してコア内に発現させた。その 1 つの YFP3.2 発現胞子を用いて加熱処理を行ったところ、その初期過程では胞子コアへの水の浸入に伴うとみられる蛍光上昇が、そしてその後に発現タンパク質の変性によると推察される蛍光低下がみられ、反応速度の解析によって両反応の特性を明らかにした。また、次項に述べる酸化系殺菌剤による胞子コア内の酸化も roYFP 1 と命名した GFP 変異体の酸化による 2 量体化

によって評価することができた。

大腸菌においても外膜、ペリプラズム、内膜、細胞質にそれぞれ発現・局在化させた GFP 変異体を用い、加熱や食塩ショックによる局所的な損傷を解析して有用な知見を得た。

現在、上述の一般的なレポーター用のものや細胞内局在型のほかに、目的に応じて FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）型やプロモーターアッセイ型など、新たに種々の GFP 変異体を構築中であり、それらを様々な殺菌効果の評価に用いるべく実用化を図るとともに、胞子や細胞の損傷・修復の反応特性の解析に利用すべく検討を進めている。

5. 加熱殺菌における微生物死滅データベースの作成と予測微生物学的アプローチ

近年、食品製造における HACCP（危害分析重要管理点）システムの導入が進展しつつあり、食品の微生物的安全性について無菌試験などの事後評価方式から、微生物の死滅挙動を予め推定したモデリング技術を取り入れ、加熱温度や時間などの条件管理に基づく事前予測方式に移行する方向にある。この目的で、殺菌のデータベースの構築とそれに基づく微生物挙動の数学モデルの開発が進みつつあり、その最初の実用的なものとして、イギリス政府研究機関を中心にフードマイクロモデルが発表された。筆者らのグループとアメリカ農務省は、ほぼ時を同じくしてデータベースの構築を始め、その後も拡大・充実化を進めており、各国研究機関においてもそれぞれ特徴的なモデリングの取り組みがなされている。

1996 年から取り組みを始めた筆者ら [18–19] の加熱殺菌データベースである「サーモキル・データベース R」

は、食品工場の殺菌工程管理や商品開発などの際の標的微生物に関する殺菌条件設計での実用に供することを目的として作製したものである。これは、主要学術誌に発表された過去の論文から種々の実験条件データと死滅データを抽出し、種々の食品や微生物など65に及ぶ項目について収集、整理し、検索可能としている。検索用画面の例をFig. 6に示す。これまで1991年から2000年の発表論文をベースとしたR9100、つづいて1981年からのものを併合したR8100を発表し、さらに最新版の1981年～2005年版のR8105が完成している。この最新版では、レコード数が12,000余り、D値数は17,000余りを収載している（データベースのウェブサイトは<http://www.h7.dion.ne.jp/~tbx-tkdb/>）。現在では、薬剤殺菌データベースの構築も始めている。

様々な条件での微生物の増殖や死滅の挙動を予測する手法は、予測微生物学としてその活用が有望視されている。筆者ら[20-22]は、緩衝液系と食品系を用い、加熱殺菌における枯草菌孢子の非対数的熱死滅に対する加熱温度、pHや塩濃度の影響について、線形ビゲロウモデルやワイブルモデルを用いた死滅予測モデルを提示するとともに、先のサーモキル・データベースRによってそれらの結果を検証した。

6. 謝 辞

筆者は、長年殺菌を含めた微生物制御の分野で活動してきたが、このたび思いがけず本学会の学会賞を受賞し、身に余る光栄と感じている。日本食品工学会の

関係各位に深甚の謝意を表するとともに、会員の皆様方に厚く御礼を申し上げたい。

また、本研究の推進にあたり、ご指導・ご助言いただいた大阪大学芝崎勲名誉教授、同高野光男名誉教授をはじめ多くの先生方に深謝申し上げる。また、研究に協力いただいた中村一郎聖母女学院短期大学教授をはじめ、関西大学の松村吉信准教授、坂元 仁研究員、Aswathanarayana Jagannath ポスドク研究員、阿部智子氏、また実験に携わっていただいた大阪大学と関西大学の多くの学生諸君と研究補佐をいただいた関係各位に感謝申し上げたい。さらに、受託研究や共同研究で実用上の問題解決に関わる研究テーマを与えていただき、多くのご示唆をいただいた関係企業の方々に厚くお礼申し上げる。

引 用 文 献

- 1) T. Tsuchido; Studies on microbiological basis of microorganism control-Stress microbiology and control of microorganisms (in Japanese). J. Antibacterial Antifungal Agents, **32**, 251-263 (2004).
- 2) T. Tsuchido, M. Takano, I. Shibasaki; Effect of temperature-elevating process on the subsequent isothermal death of *Escherichia coli* K-12. J. Ferment. Technol., **52**, 788-792 (1974).
- 3) N. Katsui, T. Tsuchido, M. Takano, I. Shibasaki; Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid compositions. J.

Fig. 6 An example of the screen for presentation of data in "ThermoKill Database R".

- Gen. Microbiol., **122**, 357-361 (1981).
- 4) T. Tsuchido, M. Hayashi, M. Takano, I. Shibasaki; Alteration of thermal resistance of microorganisms in a non-isothermal heating process. J. Antibacterial Antifungal Agents, **10**, 105-109 (1981).
 - 5) N. Katsui, T. Tsuchido, M. Takano, I. Shibasaki; Viability of heat-stressed cells of microorganisms as influenced by preincubation and postincubation temperatures. J. Appl. Bacteriol., **53**, 103-108 (1982).
 - 6) Tsuchido, I. Shibasaki; Kinetics of microbial death by combined treatment with heat and antimicrobial agents. Biotechnol. Bioeng., **22**, 107-118 (1980).
 - 7) T. Tsuchido, T. Saeki, I. Shibasaki; Death kinetics of *Escherichia coli* in a combined treatment of heat and monolaurin. J. Food Safety, **3**, 57-68 (1981).
 - 8) H. Yamanaka, T. Tsuchido; Death kinetics for *Escherichia coli* cells heated in the presence of short- and medium-chain fatty acids. Biocontrol Sci., **5**, 17-23 (2000).
 - 9) T. Tsuchido; Combined effects of antimicrobial agents and heating on microorganisms. A monograph (in Japanese). Hakkokogaku, **55**, 144-155 (1977).
 - 10) M. Takano, T. Tsuchido; Availability of growth delay analysis for the evaluation of total injury in stressed bacterial population. J. Ferment. Technol., **60**, 189-198 (1982).
 - 11) T. Tsuchido, T. Koike, M. Takano; A modified assessment of growth inhibition from growth-delay time in a cell population exposed to an environmental stress. J. Ferment. Bioeng., **67**, 132-134 (1989).
 - 12) T. Tsuchido; A simple viability measurement for microorganism control. A theory and application of the growth-delay analysis method (in Japanese). Gien, **71**, 59-62 (1992).
 - 13) T. Tsuchido, H. Takeuchi, H. Kawahara, H. Obata; Evaluation of bacterial injury by image analysis of cell motion. J. Ferment. Bioeng., **78**, 185-187 (1994).
 - 14) T. Tsuchido, K. Yasunaga, Y. Matsumura, K. Oku; Efficacy evaluation of antimicrobial compounds by dynamic image analysis of bacterial motion. In "Biodeterioration and Biodegradation" (Proc. 10th Int. Biodeterioration Biodegradation Symp., Hamburg), Ed. by W. Sand, pp.45-50 (1996).
 - 15) T. Tsuchido, K. Yasunaga, Y. Matsumura, K. Oku; Use of a tumbling-defective mutant of *Escherichia coli* for evaluation of pollutant toxicity by dynamic image analysis of bacterial motion. Biocontrol Sci., **1**, 61-63 (1996).
 - 16) T. Tsuchido, J. J. Sakamoto; Killing of bacteria by induction of membrane damage and its monitoring as a membrane-stress biotechnology (in Japanese). Seibutsukogaku-kaishi (J. Soc. Biotechnol.), **82**, 193-196 (2004).
 - 17) T. Tsuchido, J. J. Sakamoto; An outline of stress microbiology for control of harmful microorganisms (in Japanese). Jpn. J. Food Microbiol., **26**, 70-75 (2009).
 - 18) I. Nakamura, T. Yokohara, T. Tsuchido; Database of microbial thermal death. Its construction design based on data from published papers and from experiments performed under defined conditions. Biocontrol Sci., **5**, 61-64 (2000).
 - 19) T. Abe, I. Nakamura, T. Yokohara, Y. Omura, T. Hiraga, T. Tsuchido; Construction of ThermoKill Database R8100, an expanded version of a microbial thermal death database developed on the basis of information in research papers published from 1981 to 2000. Biocontrol Sci., **12**, 35-38 (2007).
 - 20) A. Jagannath, I. Nakamura, T. Tsuchido; Modelling the combined effect of pH, temperature, and sodium chloride stresses on the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in a buffer system. J. Appl. Microbiol., **95**, 135-141 (2003).
 - 21) A. Jagannath, T. Tsuchido; Validation of a polynomial regression model: The thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in milk. Lett. Appl. Microbiol., **37**, 399-404 (2003).
 - 22) A. Jagannath, T. Tsuchido, J.-M. Membre; Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in foods by using the modified Weibull and Bigelow equations. Food Microbiol. **22**, 233-239 (2005).

要 旨

食品殺菌プロセスは、マクロ的視点に立つ工学とミクロ的立場からの微生物学が融合してこそ、より信頼性の高い評価や予測が可能となると考えられる。本稿では、それらの接点に位置づけられるいくつかの局面において筆者らが進めてきた研究成果を概説した。加熱殺菌における昇温過程の解析では、大腸菌の熱死滅に対して予備保温が影響する現象を見出し、これには細胞膜脂質の相転移・相分離が関与すること、またこれが非定温過程における昇温速度の効果に反映されることを明らかにした。加熱殺菌における薬剤併用効果の動力学的解析では、薬剤の特性によって2つの類型化が可能なことを示した。新規な殺菌および細胞損傷評価法の開発では、発育遅延解析による評価法、細胞運動速度法、緑色蛍光タンパク質利用による蛍光法を提唱し、それぞれの特性と有用性を提示した。加熱殺菌における微生物死滅データベースと予測微生物学のアプローチでは、それぞれ実用化のための開発の経緯・内容と検討例の概要を紹介した。