報 文

Alicyclobacillus acidocaldarius およびその近縁菌の 酸性飲料での増殖性評価

中山素一^{1*}, 島谷佳奈果², 斎藤和広², 佐藤 惇², 園田拓三², 宮本敬久³

¹ 花王株式会社ヘルスケア食品研究所

² 花王株式会社安全性科学研究所

³ 九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座 食品衛生化学分野

Evaluation of the Behavior of Alicyclobacillus acidocaldarius and Related Species in Acidic Beverages

Motokazu Nakayama^{1*}, Kanami Shimatani², Kazuhiro Saito²,
Jun Sato², Takumi Sonoda² and Takahisa Miyamoto³

¹ Global R & D-Health Care Food Research, Kao Corporation, 2-1-3 Bunka, Sumida-ku, Tokyo 131-8501

² Global R & D-Safety Science, Kao Corporation, Akabane 2606, Haga-Gun, Ichikai-Machi, Tochigi 321-3497

³ Food Hygienic Chemistry, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University,
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

The behavior of *Alicyclobacillus acidocaldarius* and related species, isolated from food manufacturing environments and food ingredients, in acidic beverages was investigated. These bacteria are frequently detected in the raw materials of beverages. *A. acidocaldarius* and related species grew at temperatures between 40 and 55°C in beverages with an osmotic pressure from 250 to 300 mOsm, so-called isotonic drinks. Ascorbic acid at 350 mg/L inhibited growth, likely due to ascorbic acid's consumption of dissolved oxygen in the isotonic drinks. In contrast, bacterial growth was observed in the absence of ascorbic acid. No bacterial growth was detected in fruit drinks with an osmotic pressure of 700 mOsm in the absence of 350 mg/L ascorbic acid. Bacterial growth resulted in an off-odor and flavor deterioration of the drinks. Bacterial growth was promoted by the addition of 0.1 % fruit juice in a glucose solution at 700 mOsm. Moreover, the bacteria grew well even in the presence of 500 mg/L ascorbic acid in a hypotonic drink with an osmotic pressure of 200 mOsm. Our results suggest that *A. acidocaldarius* and related species are potential spoilage bacteria of acidic beverages, especially so-called hypotonic drinks. Therefore, bacterial decontamination using a membrane filter during the manufacturing process of acidic beverages is necessary. Further, detailed analysis of the beverage ingredients is important to control bacterial growth in acidic beverages.

(Received Jun. 13, 2016; Accepted Jul. 26, 2016)

Keywords : *Alicyclobacillus acidocaldarius*, thermo acidophilic bacilli (TAB), acidic beverage, fruit juice

キーワード : *Alicyclobacillus acidocaldarius*, 好熱性好酸性菌, 酸性飲料, 果汁

Alicyclobacillus 属細菌は、耐熱性を有する芽胞を形成し、幅広い温度域、酸性域で増殖することで好熱性好酸性菌 (TAB : Thermo Acidophilic Bacilli) とも総称され、酸性飲料の制御対象として重要である。1967年に初めて本属として *Alicyclobacillus acidocaldarius* が温泉地域の土壌から分離された¹⁾。温泉群から分離されたことから分かるように、本菌は高温菌で、芽胞の耐熱性が高く、通常の酸性飲料の殺菌条件では芽胞は残存するもののこれまで事故の報告例はない。

1982年にドイツで本属の中温菌でグアイヤコールを産

生する *A. acidoterrestris* が原因の果汁飲料での異臭事故が報告され²⁾、本属の食品汚染のリスクが顕在化した。我が国の食品衛生法で pH4.0 未満の酸性清涼飲料水に対して義務付けられている 65°C 10 分間の殺菌では中温菌 *A. acidoterrestris* は残存し、同様な事故を引き起こす可能性が懸念されたが、日本でも 1992年に丹羽らにより中温菌 *A. acidoterrestris* の汚染事故の報告がなされ、懸念が現実のものとなった³⁾。その後、*Alicyclobacillus* 属の中で異臭原因となるグアイヤコール産生能を有する *A. acidoterrestris* や *A. acidiphilus* 等の中温菌は、酸性飲料における

¹ 〒131-8501 東京都墨田区文花 2-1-3, ² 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606, ³ 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

*連絡先 (Corresponding author), nakayama.motokazu@kao.co.jp

重要な制御対象となり、近年では適正な加熱殺菌の採用等制御方法が確立され、現在ではほとんど事故の報告例は無くなってきた。

一方、本属の *A. acidocaldarius* 等の高温菌に関しては研究例も少なく、2001 年には丹羽らにより果汁飲料および酸性飲料において高温菌 *A. acidocaldarius* の増殖例は無いとの報告もあり⁴⁾ 制御対象としては重要視されてこなかった。しかしながら、これまで高温菌 *A. acidocaldarius* の酸性飲料における挙動の報告は、数種の果汁飲料に対し、標準株を中心に数種の菌株について評価が行われているだけである。近年、バラエティに富んだ特徴のある酸性清涼飲料が上市されており、丹羽らにより増殖が無いと報告された 2001 年とは飲料市場が大きく変化している。更には、地球温暖化から高温菌の汚染リスクが懸念されるようになってきている。そこで今回、酸性飲料における本属高温菌の危害性を評価する第一歩として、酸性飲料で用いられている原料等から分離された多数の高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌の株について各種酸性飲料中での増殖挙動、リスク、更には制御法について検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 原料からの TAB の検出と製造環境からの分離

原料試料 10 g をストマッカー袋に計量し、滅菌生理食塩水を用いて 10 倍希釈を行い、ストマッカーを用いて混和し 100 ml の溶液を調製した。本試料溶解液を孔径 0.45 μm のメンブランを用いて全量濾過を行い、メンブランを YSG (Yeast Extract-Soluble Starch-Glucose) 寒天培地 (2 g/L Yeast Extract (ベクトンデッキンソン社), 2 g/L Soluble Starch (ベクトンデッキンソン社), 1 g/L グルコース (和光純薬工業株式会社), 硫酸で pH 3.7 に調整) にのせ、45°C および 55°C で 7 日間培養後、菌数を計測した。検出菌数が 300 CFU/plate を超える場合は、試料溶解液を適宜希釈して濾過を行い、菌数を測定した。試料溶解液の粘性が高い、または試料が完全溶解せずメンブラン濾過が困難な場合は、試料溶解液 1 mL を用いて混釈法を行った。試料の一般生菌数も、同様に試料を処理し、SCD (Soybean-Casein Digest) 寒天培地 (日本製薬株式会社) にて培養し菌数を計測した。飲料製造環境からの分離は、試験箇所を綿棒で 100 cm² 程度拭き取り、滅菌生理食塩水に懸濁した後、メンブランを用いて濾過し、メンブランを YSG 寒天培地にのせ、45°C および 55°C で 7 日間培養して菌を取得した。YSG 培地上で検出した菌株は釣菌して純粋培養後、16S rRNA 遺伝子 (上流約 500 塩基) の配列を決定した。得られた配列はテクノスルガ・ラボ微生物同定システム (テクノスルガ・ラボ) を用いて塩基配列の相同性を比較し、高温菌 *A. acidocaldarius* との相同性が 98% 以上、かつその他の菌種との相同性が 98% 未満となった菌株を、高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌とした。

2. MALDI-TOF MS を用いた高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌の多様性解析

16S rRNA 遺伝子解析により高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌とされた 48 株と中温菌 *A. acidoterrestis* の標準株である NCIMB 13137^T と高温菌 *A. acidocaldarius* の標準株である NBRC 15652^T の 2 株計 50 株を YSG 寒天培地に塗抹し、45°C で 1 日間培養した。形成されたコロニーを 300 μL の滅菌水に懸濁し、900 μL のエタノールを加えてよく攪拌した。遠心して上清を除いた後、70% (v/v) 乙酸を 30 μL 添加して十分に懸濁した後、更に等量のアセトニトリルを加え、よく混合した。遠心して得られた上清 1 μL を MALDI-TOF MS 用のプレートに滴下し、よく乾燥させた。続いて CHCA (a-cyano-4-hydroxycinnamic) を含む市販のマトリクス溶液 (VITEK MS-CHCA : bioMérieux) をサンプルに滴下し、試料溶液が完全に乾燥するまで風乾した。サンプルは、MALDI-TOF MS AXIMA Performance (島津製作所) にセットし、解析を行った。SARAMIS ソフトウェア (bioMérieux) を用い、得られたマススペクトルから、クラスター解析を行い、デンドログラムを作成した。中温菌 *A. acidoterrestis* の標準株である NCIMB 13137^T は、National Collection of Industrial Marine and Food Bacteria (NCIMB) から購入した。高温菌 *A. acidocaldarius* の標準株である NBRC 15652^T は NITE Biological Resource Center (NBRC) から購入した。

3. 各種市販飲料、果汁への接種試験

(1) 使用菌株および前培養

中温菌 *A. acidoterrestis* の標準株である NCIMB 13137^T と高温菌 *A. acidocaldarius* の標準株である NBRC 15652^T、更に飲料原料や飲料製造環境より分離した高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌の菌株である A1, A2, A4, A7, A8, A9, A106, A153, A174, A176, A177, A191, A217, A229 株を接種試験に用いた。

前培養として YSG 寒天培地に接種し、中温菌 *A. acidoterrestis* は 45°C にて 20 時間、高温菌 *A. acidocaldarius* およびその近縁菌は 55°C にて 20 時間前培養し接種試験に供した。

(2) 使用した市販飲料および果汁、グルコース溶液

増殖リスクのある酸性飲料として、酸性飲料においては高浸透圧に分類される果汁飲料 (浸透圧 578~761 mOsm) を 4 社 7 製品、低浸透圧に分類されるスポーツドリンク (浸透圧 215~301 mOsm) を 4 社 4 製品接種試験に用いた。更に、静菌効果が知られている炭酸ガスを含有する炭酸飲料については 4 社 5 製品を試験に供した。官能評価用には、増殖が良好な 2 社 3 製品のスポーツドリンクを用いた。また、グルコース (和光純薬工業株式会社) を溶解したグルコース溶液、濃縮果汁を希釈した果汁希釈液を接種試験に供した。果汁は、リンゴ 5 倍濃縮果汁、オレンジ 6 倍濃縮果汁、グレープフルーツ 5 倍濃縮果汁、グレープ 6 倍濃

縮果汁, レモン6倍濃縮果汁(以上株式会社果香), みかん5倍濃縮果汁(南海果工株式会社)を用いた。グルコース溶液, 濃縮果汁は滅菌イオン交換水を用いて, 浸透圧が100, 200, 280, 400, 700 mOsm になるように調整した。グルコース溶液, 果汁希釈液は, 硫酸を用いて pH 3.7 に調整した。浸透圧は浸透圧測定装置オズモスタット OM-6040 (アークレイ株式会社) を使用して測定した。

(3) 飲料, グルコース, 果汁を用いた接種試験

(1) に記載した前培養で得られた菌体を, 滅菌生理食塩水に懸濁し, 200 mL 容量ペットボトルに対し 200 mL 分注したサンプルに 10 CFU/mL となるよう接種した。生育に対する温度依存性を確認する試験においては, 35, 40, 45, 55°C の4温度帯で試験を行った。それ以外は, 中温菌 *A. acidoterrestris* は 45°C, 高温菌 *A. acidocaldarius* および今回分離した近縁菌については 55°C でそれぞれ増殖が確認されない場合最大で 14 日間静置培養を行った。培養後のサンプル 100 μ L を YSG 寒天培地に塗抹し, 菌数を測定した。培養期間中の最低菌数から 1 オーダー以上の増殖を確認した場合を, サンプル中での増殖性あり, 1 オーダー未満の増殖または菌数の減少が認められた場合を, サンプル中での増殖性なしと判断した。

4. アスコルビン酸の添加の影響

滅菌イオン交換水にて浸透圧 700 mOsm に調整したリンゴ濃縮果汁に, L-アスコルビン酸(和光純薬株式会社) 350 mg/L を添加したもの, または添加しない果汁希釈液に, 高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌である A177 株を接種しアスコルビン酸の影響を確認した。前培養, 接種試験は 3. で示した方法で行った。

5. 高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌が増殖した飲料の官能評価および香気成分の分析

高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌である A174 株を 10² CFU/mL となるように, 200 mL ペットボトルに分注した市販のスポーツドリンク A, E, F に接種し, 45°C または 55°C で 2 日間培養を行ったサンプルを, 官能評価および香気成分の分析に用いた。A174 株を接種せずに, 同様の条件で保管したサンプルを対照区とした。

官能評価は, 訓練された花王の研究員 3 名で実施し, コントロールとサンプルの違いの有無について, 香気を嗅いで判定した。また, 55°C で A174 株の増殖が確認された製品 E と対照区について固相マイクロ抽出 (SPME) 法を用い香気成分を解析した。香気成分の解析は検体 2 g を 20 mL バイアル瓶に密栓し, 加熱後, ヘッドスペースガスについてガスクロマトグラフ 7890 A/5975C (Agilent Technologies, Inc.) を用いて行った。

6. 高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌芽胞の耐熱性測定試験

高温菌 *A. acidocaldarius* の標準株である NBRC 15652^T, 更に飲料原料や飲料製造環境より分離した高温菌 *A. acido-*

caldarius 近縁菌の菌株である A1, A7, A67, A68, A70, A174, A217, A227, A228 株を芽胞耐熱性測定試験に用いた。YSG 寒天培地で 55°C, 7 日間の培養で, 供試菌株は顕微鏡観察において芽胞形成率 95% 程度であった。その芽胞を滅菌水に懸濁し, 滅菌水で 3 回洗浄した後, 滅菌水に懸濁したものを芽胞液とした。芽胞液 100 μ L に対し, McIlvane 緩衝液 (pH 4.0) 900 μ L と混和し, 1.0 $\times$ 10⁶ CFU/mL となるようにサンプル液とした。サンプル液を TDT チューブに 2 mL ずつ分注後, 溶封し, TDT チューブを 100 または 110°C で加熱処理した。加熱処理を行った芽胞液は YSG 寒天培地にて, 損傷回復を考慮して 14 日間まで 55°C で培養を行い, 生菌数を計測した。得られた生菌数から各温度における D 値(生残細胞数を 1/10 低下させるのに必要な加熱時間)を算出した。

実験結果

1. 酸性飲料に用いる原料からの TAB の分離状況

各原料から一般生菌, TAB の検出を行った結果, 一般生菌については全ての原料において未検出であった。一方, TAB の検出については, 今回検査した全ての原料において検出された。特に液糖, 果汁, 柑橘類やリンゴの果皮を原料とするペクチンから多くの TAB が検出された。これらの原料からは, 中温菌 *A. acidoterrestris* の検出が報告されている^{2)5)~8)}。これら検出菌の 16S rRNA 配列の上流約 500 bp についてテクノスルガ・ラボ微生物同定システムを用いて解析した結果, 分離株の多くが中温菌 *A. acidoterrestris* ではなく, 高温菌 *A. acidocaldarius* と 98% 以上の相同性を示したことから, 高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌と同定された。この結果から, 高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌が, 酸性飲料に用いられる原料から高い頻度で分離されることが明らかとなった(表1)。

2. MALDI-TOF MS 法を用いた高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌の多様性解析

テクノスルガ・ラボ微生物同定システム(テクノスルガ・ラボ)を用いた相同性検索の結果から, 高温菌 *A. acidocaldarius* に近縁な菌とされた菌株について, MALDI-TOF MS を用いて解析を行い, 得られた結果からデンドログラムを作成した。その結果, 分離株(48 株)は, 中温菌高温菌 *A. acidoterrestris* を含むクラスターと高温菌 *A. acidocaldarius* の標準株を含む 2 つのクラスターに大きく分類された。分離株のほとんどは, 後者のクラスターに属した(46 株)。また後者のクラスターは, 高温菌 *A. acidocaldarius* の標準株を含むサブクラスター A (38 株) と含まないサブクラスター B (9 株) に分類された。同一のクラスター内でも Similarity が, 50% 程度から枝分かれをしており遺伝的に多様性に富んでいるものと考えられた(図1)。デンドログラムの結果と, 各菌株の分離源の種類を考慮し, A1, A2, A4, A7, A8, A9, A67, A68, A70, A106,

表 1 酸性清涼飲料に用いる原料の TAB 汚染状況

原料名	一般生菌 検出数 (cfu/10 g)	TAB			
		最大検出数 (cfu/10 g)		菌種解析	
		TAB (45℃)	TAB (55℃)	16S rRNA 解析 (500 bp) 実施コロニー数	同定菌種
アミノ酸	0	2	2	1	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：1 株
液糖	0	23	14	17	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：16 株 <i>A. sacchari</i> ：1 株
果汁	0	52	50	18	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：17 株 <i>A. acidoterrestris</i> ：1 株
植物由来色素	0	0	4	1	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：1 株
キサンタンガム	0	1	0	1	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：1 株
ペクチン	2	191	231	14	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：13 株 <i>A. acidoterrestris</i> ：1 株
デキストリン	0	96	168	5	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：5 株
デキストリン	0	59	123	43	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：43 株
デキストリン	0	130 000	290 000	4	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌：4 株

A153, A174, A176, A177, A191, A217, A227, A228, A229 株を選択し、飲料の接種試験や芽胞の耐熱性測定に用いることとした。

3. 各種市販酸性飲料における *A. acidocaldarius* 近縁菌の増殖性

市販の酸性飲料（スポーツドリンク、高果汁飲料、炭酸飲料）に、NBRC 15652^T および原料や環境から分離した株の中からサブクラスター A に属する A1, A2, A217 の 3 株、サブクラスター B に属する A7, A9, A174, A176 の 4 株の計 8 株を接種し、増殖性を確認した（表 2, 表 3）。高果汁飲料の場合、対照とした中温菌 *A. acidoterrestris* NCIMB 13137^T は 100 % (v/v) 果汁では増殖しなかったものの、20～40 % (v/v) の果汁飲料では 3 製品で増殖した。一方、高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌は、試験に供した 8 株全てにおいて、果汁飲料中では非増殖であった。浸透圧が低いスポーツドリンクにおいては、対照とした中温菌 *A. acidoterrestris* NCIMB 13137^T は、試験に供した全ての製品で増殖した。一方、高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌 8 株は、全ての菌株が A と D の 2 製品において増殖し、B と C では増殖しなかった。増殖したスポーツドリンク A は、浸透圧が最も低い製品であった。スポーツドリンク D は、B と C と同様の浸透圧であるもののアスコルビン酸を含有せず、果汁が添加されているという特徴を有していた。また、市販の炭酸飲料 5 製品を用いた場合、対照区の中温菌 *A. acidoterrestris* NCIMB 13137^T については 1 製品で増殖したのに対し、高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌の A176 株では増殖したサンプルは認められなかった。

4. 高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌の増殖に与える浸透圧の影響

浸透圧を調整した pH3.7 のグルコース溶液で原料や環境から分離した株の中からサブクラスター A に属する A1, A4, A8, A106, A153, A191, A217, A229 の 8 株、サブクラスター B に属する A174, A177 の 2 株、そして NBRC 15652^T の計 11 株の培養を行った。1～2 オーダーの増殖ではあるものの試験に供した 11 株のうち 6 株が 100 mOsm のグルコース溶液で増殖し、培養菌体由来の極めて少ない窒素量しかない、極めて増殖に不利な条件下でも菌株によっては増殖し得ることが明らかとなった。増殖した 6 株において、増殖し得る最大浸透圧が異なり、200 mOsm では 4 株、280 mOsm では 3 株が増殖したものの、試験した中で最も高い 700 mOsm では A177 株のみしか増殖せず、他の一般的な菌と同様に浸透圧が高くなるに従って増殖が悪くなる傾向が確認された。

5. 高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌の増殖に与える果汁の影響

市販果汁飲料およびグルコース溶液への接種試験で全ての浸透圧で増殖できなかった標準株 NBRC 15652^T と 700 mOsm のグルコース溶液では増殖せず最大増殖浸透圧も異なる分離株 4 株について、増殖できなかった 700 mOsm のグルコース溶液に各種濃縮果汁 0.1 % (v/v) を添加し培養を行った。その結果、200 mOsm までしか増殖しなかった A153 株がリング果汁で 1 オーダーまでの明確な増殖を示さなかったものの、それ以外の菌株は試験に用いた全果汁中で 1 オーダー以上の増殖を示し、低濃度の果汁添加は増殖促進因子となることが明らかとなった。

次に上記試験に用いたリング、オレンジ、グレープフルー

図 1 飲料製造環境および原料から分離した TAB 菌株の MALDI-TOF MS による系統解析

ツ、みかん、レモンにブドウを加えそれぞれの濃縮果汁を滅菌水で希釈し浸透圧を調整した果汁を用いて、増殖可能な上限の浸透圧を調べた (表 4)。ブドウ果汁を除く果汁においては、試験した 11 株全てが、実施した何れかの浸透圧で増殖した。リンゴ果汁が試験した全ての菌株において、増殖可能な限界浸透圧が最も高い傾向にあった。ブドウ果汁においては 6 株が全く増殖せず、増殖した 5 菌株においても増殖しうる限界浸透圧が他の果汁に比べ低い傾向にあった。レモン果汁においては全ての菌株が増殖したもののブドウを除く他の果汁に比べ低浸透圧でしか増殖出来ない傾向であった。レモン以外の柑橘系果実であるグレープフルーツ、みかんもリンゴ果汁に比べ低浸透圧でしか増殖できない傾向であった。

6. 増殖に対するアスコルビン酸の影響

柑橘系の果汁に多く含まれているアスコルビン酸の高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌の増殖に対する影響について

調べた (図 2)。A177 株はアスコルビン酸無添加の 700 mOsm に調整したリンゴ濃縮果汁の希釈液では増殖したが、アスコルビン酸 350 mg/L の添加により増殖が抑制された。この結果から、アスコルビン酸が高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌の増殖抑制因子の一つであることが示唆された。

7. 増殖に対する温度の影響

市販製品 (スポーツドリンク A) に原料、環境等から分離した 43 株を接種し、35、40、45、55℃ の 4 温度帯で培養を行った。35℃ では全ての株が非増殖であったのに対し、40℃ では 43 株中 34 株が増殖した。日本の夏場を想定した 40℃ でも酸性飲料中で増殖可能な高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌が存在することから、夏場の流通過程で増殖する可能性が有ることが明らかとなった。

8. 増殖した飲料の官能評価および香気成分の分析

官能評価の結果から増殖したサンプルは対照区に比べ香

表 2 原料から分離された *A. acidocaldarius* 近縁菌の酸性飲料中での増殖特性

	原材料 ^{a)}		物性			飲料における増殖性 ^{b)}									
						<i>A. acido- terrestris</i>	<i>A. acido- caldarius</i>	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌							
	果汁	アスコル ビン酸	pH	Brix (%)	浸透圧 (mOsm)	NCIMB 13137 ^T	NBRC 15652 ^T	A1	A2	A7	A9	A174	A176	A217	
スポーツドリンク A	—	+	3.6	3.1	215	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
スポーツドリンク B	+	+	3.5	6.6	292	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
スポーツドリンク C	—	+	3.4	4.5	285	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
スポーツドリンク D	+	—	3.3	5.3	301	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

	原材料 ^{a)}		物性			飲料における増殖性 ^{b)}									
						<i>A. acido- terrestris</i>	<i>A. acido- caldarius</i>	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌							
	果汁	アスコル ビン酸	pH	Brix (%)	浸透圧 (mOsm)	NCIMB 13137 ^T	NBRC 15652 ^T	A1	A2	A7	A9	A174	A176	A217	
100% リンゴ果汁飲料	+	+	3.7	10.9	671	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
100% オレンジ果汁飲料	+	+	3.8	11.8	未測定	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
40% オレンジ果汁飲料	+	+	3.3	10.8	633	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
20% リンゴ果汁飲料 A	+	—	3.5	11.2	578	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
20% リンゴ果汁飲料 B	+	—	3.2	11.3	618	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
20% みかん果汁飲料	+	+	3.3	10.6	612	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
10% リンゴ果汁飲料	+	+	3.5	12.0	761	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

a) +, 添加あり（濃度、果汁の種類は不明）；—, 添加なし。

b) +, 1 オーダー以上の増殖あり；—, 1 オーダー以上の増殖なし。

表 3 *A. acidocaldarius* および近縁菌の炭酸飲料での増殖性

	原料 ^{a)}	製品物性		飲料における増殖性 ^{b)}	
				<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidocaldarius</i> 近縁菌
	アスコルビン酸	pH	浸透圧 (mOsm)	NCIMB 13137 ^T	A176
10% リンゴ果汁炭酸飲料	+	2.6	866	—	—
10% 赤ブドウ果汁炭酸飲料	—	2.7	697	—	—
10% 白ブドウ果汁炭酸飲料	—	2.6	680	—	—
15% レモン果汁炭酸飲料	+	2.6	281	—	—
30% オレンジ果汁炭酸飲料	+	3.8	767	+	—

a) +, 添加あり（濃度は不明）；—, 添加なし。

b) +, 1 オーダー以上の増殖あり；—, 1 オーダー以上の増殖なし。

表 4 種々の果汁希釈液における *A. acidocaldarius* 標準株および近縁菌分離株の増殖可能な上限浸透圧

果汁	増殖上限浸透圧 (mOsm)										
	A1	A4	A8	A106	A153	A174	A177	A191	A217	A229	NBRC15652 ^T
グルコース	100	n.g.	n.g.	n.g.	200	280	700	n.g.	n.g.	400	n.g.
リンゴ	400	400	400	400	400	700	700	400	400	400	400
オレンジ	280	280	400	400	400	400	400	280	400	400	400
グレープフルーツ	280	280	400	400	400	280	400	400	400	400	400
ブドウ	n.g.	n.g.	100	400	100	100	n.g.	n.g.	n.g.	100	n.g.
レモン	200	100	200	200	100	200	280	100	280	200	100
ミカン	400	200	280	280	280	200	400	280	400	400	400

n.g. : no growth

りが変化しており、香りの変化は、ほぼ不快臭として捉えられることが明らかとなった。このことから、高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌が増殖した場合、異臭クレームの可能性が有ると考えられた。官能評価により香気成分の変化が確認された試料について、ガスクロマトグラフ分析により、成分変化を確認した(図3)。55℃で高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌が増殖した市販製品Eと対照区のク

ロマトグラフのチャートと比較した結果、増殖により一部の香気成分のピークに変化が認められた。

9. 芽胞の耐熱性

試験に供した高温菌 *A. acidocaldarius* NBRC 15652^T、飲料原料や飲料製造環境から分離した菌株9株の $D_{110^\circ\text{C}}$ 値は0.6~2.6分であった(表5)。中温菌 *A. acidoterrestris* の対策として酸性飲料の製造で用いられている殺菌条件である110~115℃、30秒程度の殺菌では殺滅効果が低く、多くの菌株において混入すれば残存する可能性が明らかとなった。

表5 *A. acidocaldarius* 標準株および近縁菌分離株の芽胞の耐熱性

Kao No.	分離源	D 値(分)	
		100℃	110℃
NBRC 15652 ^T	酸性温泉	32.5	1.3
A1	飲料製造環境	56.2	2.6
A7	液糖	9.4	0.6
A70	増粘多糖類	34.6	1.2
A67	液糖	21.5	1.5
A68	増粘多糖類	34.2	1.7
A174	飲料製造環境	18.1	0.9
A217	増粘多糖類	45.0	1.5
A227	飲料製造環境	26.4	1.2
A228	飲料製造環境	34.9	1.2

図2 *A. acidocaldarius* 近縁菌 A177 株のリンゴ果汁中での増殖に対するアスコルビン酸添加の影響

滅菌水で浸透圧を700mOsmに調整したリンゴ濃縮果汁を使用した。
○, アスコルビン酸無添加; ●, アスコルビン酸添加(350 mg/1L)

図3 *A. acidocaldarius* 近縁菌の増殖による飲料中の香気成分の変化

考 察

高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌は土壌菌であり、土壌が付着した農産物等を介して製造ラインへ混入する。例えば多くの菌が検出されたペクチンでは、原料である果皮と共に混入し、ペクチンを抽出した後の製造ラインで増殖し加工後に残存したと考えられた。また、日本では液糖やデキストリンといったデンプン由来の糖はコーンスターチを出発原料として製造される。コーンスターチ製造においては、デンプンの抽出を容易にするためトウモロコシの外皮を膨潤軟化させる目的で酸浸漬を行う。その条件が高温菌である高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌の増殖条件と一致しており、この酸浸漬工程で増殖したため加工後に多くの細菌芽胞が残存したと考えられた。窒素源をほとんど含まないグルコース溶液でも増殖することを合わせて考えると、農産物を出発原料とし、製造工程で酸性高温下になるプロセスが存在する原料に関しては、高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌が残存または混入するリスクが有ることが明らかとなった。一方で、発酵培養液を精製、晶析、遠心分離、乾燥して得られるアミノ酸のような原料、製造工程からの混入可能性が極めて低いと考えられる原料においても僅かながら TAB が検出されることから、製造環境や使用水等のユーティリティからの混入についてもリスク評価を行う必要が有ると考えられた。

また、今回試験した原料では一般生菌が検出されないにもかかわらず、極めて多くの TAB が検出される原料が存在したことから、一般生菌数は酸性飲料で危害となる TAB の汚染の指標とならず、TAB に対する検査方法を用いて、その汚染度を評価する必要性があると考えられた。

今回、低浸透圧のスポーツ飲料においては組成によって増殖リスクおよび異臭発生の可能性が有ることが明らかとなった。300 mOsm 程度の浸透圧では、果汁の添加とアスコルビン酸を添加していない製品のみが増殖したことから、アスコルビン酸には増殖阻害効果があるものと思われる。

高浸透圧の果汁飲料ではアスコルビン酸の添加により生育が阻害された。柑橘系果汁では浸透圧が 200 mOsm 程度でも非増殖になる場合があり、これはアスコルビン酸が柑橘系果汁に多く含有されていることが要因の一つと考えられた。果汁飲料においてアスコルビン酸の添加が制御に有効である 1 つの理由として、*Alicyclobacillus* 属は好気性細菌であり、抗酸化剤であるアスコルビン酸が溶存酸素レベルを低下させたことにより増殖を抑制した可能性が考えられた⁹⁾。

一方で、スポーツドリンクで低浸透圧の 215 mOsm の製品 A においてはアスコルビン酸が添加され、増殖因子である果汁も添加されていないにもかかわらず増殖した。また、スポーツドリンク E は今回最も低い浸透圧 180 mOsm

であり、今回の増殖を抑制したリンゴ果汁に添加した 350 mg/L よりも多い 500 mg/L のアスコルビン酸を添加されていたが増殖を抑制できなかった。以上のことから、200 mOsm 程度の極めて低い浸透圧のスポーツドリンクについてはアスコルビン酸の増殖を抑制効果がなく、増殖リスクを評価するには処方毎に接種試験を実施する必要があると考えられた。

また、グレープ果汁は果汁に含まれるアスコルビン酸が極めて少ないにもかかわらず、増殖抑制効果が高いことから、グレープ果汁中のポリフェノールに抑制効果があると考えられた¹⁰⁾¹¹⁾。

炭酸飲料を用いた接種試験の結果、*A. acidocaldarius* および近縁菌については全ての製品において非増殖であったが、この理由として pH が 3.0 以下で、生育下限域に近く、かつ静菌効果のある炭酸ガスを含有しており、生育が困難だったものと考えている¹²⁾。一方で中温菌 *A. acidoterrestris* NCIMB 13137^T については、pH 3.8 のオレンジ果汁を含有した炭酸飲料で増殖が認められ、抗菌性を有するとされている炭酸飲料において生育した。また、我々は上述の低浸透圧酸性飲料 E の組成をベースにして作成したガス圧 GV 2.2 (v/v) 程度のモデル炭酸飲料では高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌増殖することを確認している (Data not shown)。炭酸飲料においてもガス圧が低い微炭酸で低浸透圧の製品については、増殖の可能性を評価する必要があると考えられた。

高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌の増殖により異臭が生じた飲料のガスクロマトグラフ分析結果において、一部ピークで変化が認められた。これは産生された代謝物によるものと考えられた。今後は変化した物質の同定を行い、高温菌 *A. acidocaldarius* 近縁菌による香料成分の分解や増殖による香気成分変化のメカニズムについて精査する予定である。

高温菌 *A. acidocaldarius* の標準株および分離した近縁菌の芽胞の耐熱性評価を行った結果、酸性条件下 (pH 4.0) で高い耐熱性を有していることが明らかとなった。

今後はスポーツドリンク中での増殖に対する浸透圧、果汁、溶存酸素の影響とその機構を明らかにし低浸透圧飲料での制御法の確立に繋げていきたいと考えている。

要 約

高温菌 *A. acidocaldarius* および環境・原料から分離したその近縁菌について、酸性飲料における増殖性を評価した。高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌は、200~300 mOsm 程度の低浸透圧であるスポーツドリンクにおいては、製品によっては 40℃ において増殖し風味を劣化させたことから、飲料に混入した際は汚染事故を起こす可能性が有ることが明らかとなった。本菌群においては果汁が増殖因子となることから、低浸透圧の飲料の中でも特に果汁入りス

ポーツドリンクでの増殖の可能性が高いと考えられた。高浸透圧である市販の果汁飲料においては添加されているアスコルビン酸により制御が可能であることが示唆された。しかしながら、高浸透圧の果汁飲料においてもアスコルビン酸の濃度が低い飲料については増殖の可能性を評価する必要が有ると考えられた。また、これらの菌は環境や原料からの分離頻度が高く、高い耐熱性を有する芽胞を形成し、更には現行の酸性飲料で用いられている加熱殺菌条件で殺滅することが困難であることから、飲料中での増殖の可能性を見極め、高温菌 *A. acidocaldarius* および近縁菌に対応するためには製造工程中のフィルター除菌や、原料の選別等の対策が必要であると考えられた。

文 献

- 1) Uchino, F. and Doi, S., Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 817-822 (1967).
- 2) Cerny, G., Hennlich, W. and Poralla, K., Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and characterization of the spoilage organism. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **179**, 224-227 (1984).
- 3) 丹羽源廣, 廣田裕子, 白須由治, 輸入原料果汁より検出された新規耐熱性好酸性菌, 果汁協会報, **9**, 31-42 (1991).
- 4) 後藤慶一, 酸性飲料の腐敗に関与する好熱性好酸性有胞子細菌 *Alicyclobacillus* 属細菌, 日本食品微生物学会雑誌, **23**, 204-212 (2006).
- 5) 後藤慶一, 佐脇徹也, 高橋親二郎, 田中 孝, 徳田 一, 山本理恵, 好熱性好酸性菌—*Alicyclobacillus* 属細菌—, ILSI Japan 食品安全研究部会微生物分科会, (建帛社, 東京), pp. 1-3 (2004).
- 6) 古畑勝則, 原 元宣, 福山正文, 果汁飲料からの耐熱性好酸性菌の分離状況, 防菌防黴誌, **33**, 447-452 (2005).
- 7) Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Ozawa, C., Kasai, H. and Yokota, A., Diversity of *Alicyclobacillus* isolated from fruit juices and their raw materials, and emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Microbiol. Cult. Coll.*, **22**, 1-14 (2006).
- 8) Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D. and Worobo, R.W., Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *Int. J. Food Microbiol.*, **142**, 286-291 (2010).
- 9) 後藤慶一, 佐脇徹也, 高橋親二郎, 田中 孝, 徳田 一, 山本理恵, 好熱性好酸性菌—*Alicyclobacillus* 属細菌—, ILSI Japan 食品安全研究部会微生物分科会, (建帛社, 東京), pp. 75-86 (2004).
- 10) Splittstoesser, D.F., Churey, J.J. and Lee, C.Y., Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J. Food Prot.*, **57**, 1080-1083 (1994).
- 11) 老田 茂, 神山紀子, 耐酸耐熱性細菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* に対するブドウポリフェノールの抗菌効果, 日本食品科学工学会誌, **49**, 555-558 (2002).
- 12) 萩原博和, 蟹江 誠, 矢野信禮, 春日三佐夫, 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菌・腐敗細菌の発育に及ぼす影響, 食品衛生学雑誌, **34**, 283-288 (1993).

(平成28年6月13日受付, 平成28年7月26日受理)