

フィルターによる糖液および清涼飲料水中に
懸濁した耐熱性細菌芽胞の除去

櫻岡 睦^{1*}, 駒木 勝², 大久保良子²,
山口 敏季², 早坂伊吹喜³

Removal of Heat Resistant Bacterial Spores Suspended in
Syrups and Soft Drinks by Means of a Filter

Atsushi SAKURAOKA^{1*}, Masaru KOMAKI², Ryoko OHKUBO²,
Toshiki YAMAGUCHI² and Ibuki HAYASAKA³

¹*Scientific and Laboratory Services Department, Nihon Pall Ltd., 46 Kasuminosato,
Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0315, Japan*

²*Research Laboratory, Japan Canners Association, 2-5-3, Fuku-ura,
Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan*

³*Food & Beverage Division, Nihon Pall Ltd., 1-5-1, Nishi-Gotanda,
Shinagawa-ku, Tokyo 141-0031, Japan*

ISSN 0385-5201

防菌防黴誌

Bokin Bobai

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

技術論文

フィルターによる糖液および清涼飲料水中に 懸濁した耐熱性細菌芽胞の除去

櫻岡 睦^{1*}, 駒木 勝², 大久保良子²,
山口 敏季², 早坂伊吹喜³

Removal of Heat Resistant Bacterial Spores Suspended in Syrups and Soft Drinks by Means of a Filter

Atsushi SAKURAOKA^{1*}, Masaru KOMAKI², Ryoko OHKUBO²,
Toshiki YAMAGUCHI² and Ibuki HAYASAKA³

¹Scientific and Laboratory Services Department, Nihon Pall Ltd., 46 Kasuminosato,
Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0315, Japan

²Research Laboratory, Japan Canners Association, 2-5-3, Fuku-ura,
Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan

³Food & Beverage Division, Nihon Pall Ltd., 1-5-1, Nishi-Gotanda,
Shinagawa-ku, Tokyo 141-0031, Japan

In this study, for the purpose of controlling heat-resistant bacterial spores suspended in syrups and soft drinks, the efficiency of membrane filters to remove these spores was analyzed. Spores from six bacterial species (*Bacillus stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Clostridium thermosaccharolyticum* and *C. thermaceticum*) were selected as test organisms because they are often isolated as contaminating bacteria in soft drinks. Spores of each bacterial species were suspended in 0.067M phosphate buffer solution (pH 7.0), 68% sucrose, 75% fructose, 20% apple juice, coffee extracts with sugar and green tea in a concentration estimated to be approximately 10⁹ CFU/ml. Each 1,000ml suspension was filtered through a 47 mm ϕ test disk with a membrane. The filtrate was assayed for the presence of viable spores. As for filter membranes having pore size ratings of 0.45 μ m, no spores were detected in the filtrate. As for filters having pore size ratings of 0.65 μ m and 0.8 μ m, however, spores were detected. The result showed that filters having pore size ratings of 0.45 μ m were effective in removing heat-resistant bacterial spores, which suggests a potential application of these filters for bacterial control in the soft drink manufacturing process.

(Accepted 4 December 2001)

Key words : Membrane Filter (メンブランフィルター)/ Syrup (糖液)/ Soft Drinks (清涼飲料水)/ Bacterial Spore (細菌芽胞)/ Acidophilic bacteria (好酸菌)

緒 言

缶、びんおよびペットボトルなどの密封容器詰清涼飲料水は、通常、その製造工程において加熱

殺菌が施される。これは当該製品の商業的無菌状態を保持するためであり、この加熱殺菌の条件(温度・時間)は当該製品の成分組成などにより異なる。

¹日本ポール(株)応用技術研究所 〒300-0315 茨城県稲敷郡阿見町大字香澄の里46

²(株)日本缶詰協会・研究所 〒236-0004 横浜市金沢区福浦2-5-3

³日本ポール(株)食品フィルター部 〒141-0031 東京都品川区西五反田1-5-1

0385-5201/2002/0410-0207 \$ 02.00/0© 2002 Soc. Antibact. Antifung. Agents, Jpn.

加温販売されるミルクコーヒーやココアなどのいわゆる低酸性飲料缶詰においては著しく耐熱性の強い有芽胞細菌による変敗事例が報告されている¹⁻⁷⁾。しかし、乳化剤による発育阻止効果⁸⁻¹²⁾や原材料の紫外線照射¹³⁻¹⁵⁾によって制御されている。

近年、リンゴジュースやオレンジジュースなどの酸性飲料において耐熱性好酸性菌による変敗事例が散見されている¹⁶⁾。従来から、酸性飲料は比較的緩やかな加熱殺菌で商品価値が保たれていた。しかし、耐熱性好酸性菌はこれら酸性飲料に施される加熱処理では到底殺滅できない^{17, 18)}。また、耐熱性好酸性菌を対象にした殺菌条件による製造では品質の劣化が著しく、もはや商品価値が失われてしまう。

清涼飲料水は1999年7月22日付で、総合衛生管理製造過程の承認制度の対象食品に指定された。これに伴い改正された食品、添加物等の規格基準の中で「ろ過器等による除菌」が従来の「殺菌」と同等の位置づけで認められた¹⁹⁾。このことにより、フィルターによる除菌の技術確立が期待されている。

食品業界におけるろ過による微生物の管理すなわち精密ろ過フィルターによる除菌は、生ビールや非加熱ミネラルウォーターなど一部の製品²⁰⁾またはユーティリティー関係を除くといまだ一般的なものではない。製菓業界で用いられている0.2または0.22ミクロンフィルターと呼称される滅菌用グレードフィルターは、その細かいろ過精度のため、例えば清涼飲料水の除菌には除菌よりもむしろ飲料自体の必要な成分も除去されてしまうため採用できない。

従って、滅菌用グレードフィルターよりもろ過精度の粗いフィルターによって耐熱性細菌芽胞を除去できれば最終製品への加熱量が最小限度に抑えられ、より良い品質の清涼飲料水が省エネルギーで製造できることが予想される。そこで、清涼飲料水の製造におけるフィルターによる除菌技術の確立を目的として、各種水溶液中に懸濁した耐熱性細菌芽胞の除去試験を行なったのでここに報告する。

実験方法

実験方法の概念図を Fig. 1 に示す。

1. 供試菌株

日本缶詰協会保存の *Bacillus stearothermophilus* 1001 (日本缶詰協会保存整理番号, 以下同じ, IAM1035), *B. coagulans* 1101 (IAM 1115), *B. subtilis* 1401 (IAM1026), *Alicyclobacillus acidoterrestis* 3001 (DSM2498), *Clostridium thermosaccharolyticum* 5604 (変敗調理食缶詰由来) および *C. thermaceticum* 5801 (変敗飲料缶詰由来) の6株を用いた。

2. 培地の調製

1) ブドウ糖ブイヨン培地 (以下, GB と略す) 常法²¹⁾ によった。

2) ブドウ糖ブイヨン寒天培地 (以下, GA と略す)

上記1) の組成に寒天末20gを加えた。ねじ口

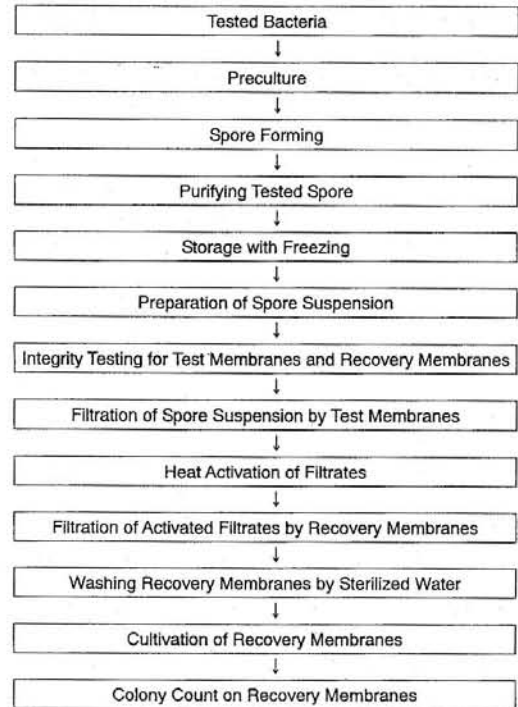


Fig.1. Test Procedure

びん (500ml容, Duran 製, 以下同じ) に適量分注し, 121°C, 20分間高圧殺菌した。

3) 土壌エキス加普通寒天培地 (以下, SEA と略す)

土壌エキス: 園芸用 “赤玉土” 400gをアルミ製盆 (横350mm, 縦250mm, 深さ15mm) 上に広げ, 乾熱で160~170°C, 6時間の条件で5日間, 開けつ滅菌した。この全量 (400g) を2l容のビーカーに入れ, 水道水960mlを加えオートクレーブで121°C, 1時間高圧殺菌した。そのまま1夜静置した。翌日, ろ紙 (東洋濾紙製, No.101) でろ過し, ろ液約600mlを得た。

肉エキス2g, 酵母エキス3g, ポリペプトン10g, 塩化ナトリウム5g, 寒天末20g, 土壌エキス250mlを脱イオン水750mlに加え, 加熱溶解し, pH7.0に調整した。これをねじ口びんまたは亀の子培養びんに適量分注し, 121°C, 20分間高圧殺菌した。

4) 変法 YPG 培地 (以下, mYPG と略す) 常法¹⁷⁾によった。

5) 変法 YPG 寒天培地 (以下, mYPGA と略す)

常法¹⁷⁾によった。

6) ピーインフュージョン寒天培地 (以下, PIA と略す)

常法²¹⁾によった。

7) GCブロス B 培地²²⁾ (以下, GCB と略す)

ミネラル溶液 I: リン酸水素二カリウム0.6gを脱イオン水100mlに溶解した。

ミネラル溶液 II: リン酸二水素カリウム0.6g, 硫酸アンモニウム1.2g, 塩化ナトリウム1.2g, 硫

酸マグネシウム0.12g, 塩化カルシウム0.12gを脱イオン水100mlに溶解した。

バクトペプトン5g, 酵母エキス5g, L-システイン塩酸塩0.5g, ミネラル溶液 I 75ml, ミネラル溶液 II 75mlを脱イオン水850mlに加え, 加熱溶解しpH7.0に調整した後, L-アラビノース5gを加えた。これをねじ口びんに適量分注し121°C, 20分間高圧殺菌した。

8) Beerens & Des Rosiers 培地 (以下, BD と略す)

常法²³⁾によった。ただし, ブドウ糖は10g/lとした。

9) Beerens & Des Rosiers寒天培地 (以下, BDA と略す)

上記8)の組成に寒天末20gを加えた。

3. 芽胞形成

1) *Bacillus* 属および *Alicyclobacillus* 属

供試菌株の芽胞を含む保存培養液1白金耳を, *Bacillus* 属細菌はGBに, *Alicyclobacillus* 属細菌はmYPGに接種し, 芽胞を活性化するためTable 1に示す条件で加熱処理したのち培養した (前培養)。

前培養液約0.3mlを, *Bacillus* 属細菌はSEA平板 (*B. stearothermophilus* は亀の子培養びん, その他はペトリ皿) 上および *Alicyclobacillus* 属細菌はmYPGA平板上に滴下し, 平板表面に拡散させたのち培養した (Table 1)。

2) *Clostridium* 属

供試菌株の芽胞を含む保存培養液0.5~1mlを, 芽胞形成用培地に直接接種し, 芽胞を活性化する

Table 1. Subculture conditions for sporulation

Species	Preculture			Sporulation	
	Media	Heat actn. ^a (min/°C)	Incubation ^b (day/°C)	Media	Incubation ^b (day/°C)
<i>B. stearothermophilus</i> 1001 (IAM1035)	GB ^d	10/100	1/55	SEA ^e	5/55
<i>B. coagulans</i> 1101 (IAM1115)	GB	10/100	1/45	SEA	5/45
<i>B. subtilis</i> 1401 (IAM1026)	GB	20/80	1/35	SEA	5/35
<i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	mYPG ^f	20/80	2/45	mYPGA ^e	5/45
<i>C. thermosaccharolyticum</i> 5604 ^e	—	10/100	—	GCB ^h	5/55
<i>C. thermaceticum</i> 5801 ^e	—	30/100	—	B&D ⁱ	14/55

^aHeat activation conditions for spores.

^bIncubation time and temperature.

^cNo preculture.

^dGlucose broth

^eSoil extract agar

^fModified YPG

^gModified YPG agar

^hGC broth B

ⁱBeerens & Des Rosiers

ため加熱処理したのち、アネロパック角型ジャー(三菱ガス化学製)を用いて嫌氣的に培養した。

前培養および芽胞形成の条件を Table 1 に示す。

4. 供試芽胞液の調製

1) *Bacillus* 属および *Alicyclobacillus* 属

供試菌株の平板は 5℃ に冷却した滅菌脱イオン水(以下同じ)で平板表面の菌体を洗い落とし、集菌した。さらに、滅菌遠沈管(ポリカーボネイト製, NALGENE®社製)に集菌した液をとり、遠心分離器(H-500R 型, 国産遠心器製)で 5℃, 5,000rpm, 10分間の条件で芽胞を濃縮した。次に、遠沈管に滅菌ガラス玉約 20個を投入し、滅菌脱イオン水を適量加えよく振とうしたのち、同条件で遠心分離した。さらに同条件で 2 回集菌、洗浄したのち、滅菌脱イオン水 10ml に懸濁した。

2) *Clostridium* 属

供試菌株の培養液は上記滅菌遠沈管に適量とり、上記同条件で芽胞を濃縮した。さらに上記同様滅菌ガラス玉と滅菌脱イオン水を加え集菌、洗浄操作を 3 回行ない、滅菌脱イオン水 10ml に懸濁した。

これら芽胞懸濁液は芽胞を精製するため

Lysozyme²⁴⁾ および Urografin²⁵⁾ 処理した。処理条件を Table 2 に示す。

最終的に滅菌脱イオン水 10ml に懸濁しこれを供試芽胞液とし、1 ml は初発芽胞数の測定に供し、残りは用いるまで -20℃ で凍結保存した。

供試芽胞液の初発芽胞数の測定は芽胞液 1 ml を滅菌 0.1% ペプトン水 9 ml (外径 18mm, 長さ 180mm の中試験管)に加え、栄養細胞を殺滅し芽胞を活性化させるため加熱処理し、これを検液とした。*Bacillus* 属および *Alicyclobacillus* 属は混積平板培養法により測定し、*Clostridium* 属はアナエロビックパウチを用いた混積平板培養法により測定した。加熱処理条件、培地および培養条件を Table 3 に示す。

5. 供試試験液

1) 0.067M リン酸緩衝液 (pH7.0) (以下、リン酸緩衝液と略す)

常法²⁶⁾により調製した。

2) 糖液

市販品の 68% 蔗糖液および 75% 果糖液をそのまま用いた。

3) 清涼飲料水

Table 2. Purifying conditions of tested spores

Species	Lysozyme		Urografin concentration (g/ml)
	Concentration (mg/ml)	Reaction time (min at 37°C)	
<i>B. stearothermophilus</i> 1001 (IAM1035)	1	30	0.93
<i>B. coagulans</i> 1101 (IAM1115)	1	60	0.65
<i>B. subtilis</i> 1401 (IAM1026)	1	20	1.025
<i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	1	30	0.80
<i>C. thermosaccharolyticum</i> 5604	1	30	1.025
<i>C. thermaceticum</i> 5801	1	15	0.93

Table 3. Method of initial spore count for tested strains

Species	Heat actn.* (min/°C)	Media	Incubation ^b (day/°C)
<i>B. stearothermophilus</i> 1001 (IAM1035)	10/100	GA ^c	4/55
<i>B. coagulans</i> 1101 (IAM1115)	10/100	GA	5/45
<i>B. subtilis</i> 1401 (IAM1026)	20/ 80	GA	5/35
<i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	20/ 80	mYPGA ^d	5/45
<i>C. thermosaccharolyticum</i> 5604	10/100	PIA ^e	4/55
<i>C. thermaceticum</i> 5801	30/100	BDA ^f	14/55

*Heat activation conditions for spores.

^bIncubation time and temperature.

^cGlucose agar

^dModified YPG agar

^ePea infusion agar

^fBeerens & Des Rosiers agar

Table 4. Characteristics of membranes used

Filter brand	Pore size rating (μm)	Filter grade ^a	Material	Purpose in this test	Minimum bubble point value (kPa)
EBW	0.45	microbial-control	PES ^b	test	124 ^c
EKW	0.65	microbial-control	PES	test	110 ^c
SCW800	0.8	microbial-control	PES	test	110 ^c
DFL	0.2	sterilizing	PVDF ^d	recovery	318

^aFilters for microbe removal were graded as sterilizing-grade filters or microbial-control grade filters.

^bPolyether sulfone

^cTentative values

^dPolyvinylidene difluoride

市販品のリンゴ果汁入り飲料(リンゴ果汁20%, ブリックス11.5%, pH3.6), コーヒー飲料(加糖ブリックス6.3%, pH5.4) および緑茶飲料(ブリックス0.2%, pH6.0)をそのまま用いた。

6. 供試フィルター

各種溶液の除菌用フィルターとして“スーポア EBW[®]”(ポール社製, 0.45 μm , 以下, EBWと略す), “スーポア EKW[®]”(同社製, 0.65 μm , 以下, EKWと略す) および “スーポア 800[®]”(同社製, 0.8 μm , 以下, SCW 800と略す)を, 除菌した溶液中の芽胞の有無を調べるための分析用フィルターには, “フロロダインII[®]” DFL (0.2 μm , 滅菌用グレードフィルター, 以下, DFLと略す)を用いた。

いずれのフィルターとも47mmディスクメンブランで, 実際に試験液が接触する有効ろ過表面積は約10cm²である。供試フィルターの性質をTable 4に示す。

これらフィルターは使用前に121°C, 30分間高圧殺菌し, 完全性試験(バブルポイント試験)²⁷⁾に適ったものを用いた。

7. チャレンジ試験

滅菌用フィルター(“フロロダインII[®]” DFL)でろ過滅菌した各供試試験液1,000mlに, 室温で解凍した供試芽胞液を約10⁵CFU/mlになるよう接種した。これらの芽胞懸濁試験液全量を定流量ポンプで試験フィルターに流す定流量ろ過を行ない, ろ液を滅菌済み容器に採取した(Fig. 2およびPhoto. 1)。なお, このときのろ過条件は, 試

験液がリン酸緩衝液および清涼飲料水の場合には常温で33ml/分, 糖液の場合は60°Cで5 ml/分の流速であった。これらの流速は, 実生産スケールで, 30インチサイズのカートリッジフィルター12本を使用すると仮定した場合, 有効ろ過表面積から換算すると, リン酸緩衝液および清涼飲料水の場合には常温で43ton/時間, 糖液の場合には60°Cで6.5ton/時間となることが予測された。

次に, ろ液中の芽胞を活性化するため加熱処理したのち, ろ液の全量を分析用フィルターで, 試験フィルターの場合と同一条件でろ過した(Fig. 2)。ろ過終了後, 分析用フィルターを洗浄するため滅菌水200mlを通液させた。ディスクホルダーから分析用フィルターを取り出し, 平板培地上に静置, 培養した。加熱処理条件, 培地および培養条件は上記4. (Table 3)と同じであるが,

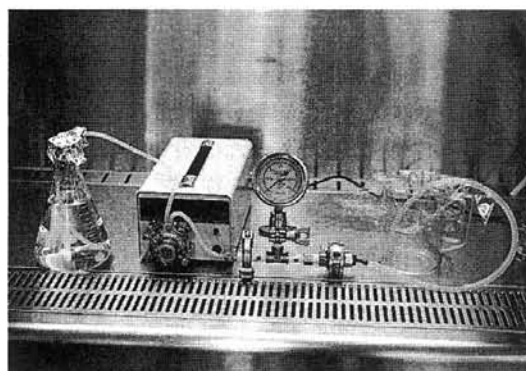


Photo. 1 Challenge Test Line

Photo. 1 shows a line where the spore suspension liquid is filtrated by a test membrane and the effluent is received in a sterilized flask. Tests were carried out in a clean booth. In Photograph 1, the apparatuses seen from left to right in order are a spore suspension flask, quantitative pump, pressure gauge, test membrane (with a disk of 47mm in diameter) and effluent flask.

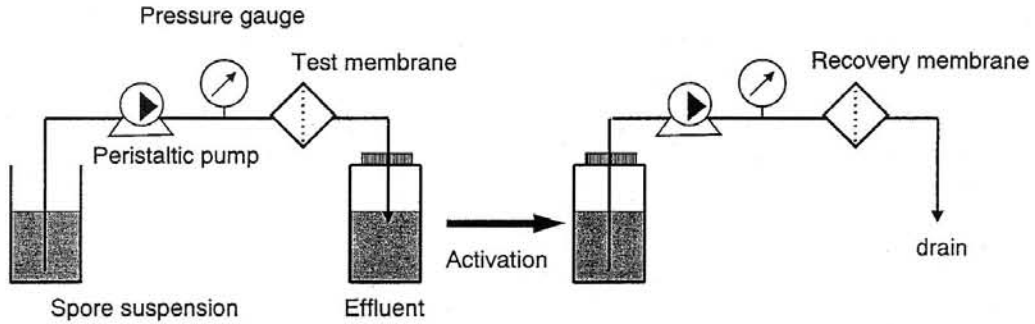


Fig.2. Schematic diagram of the Bacteria Challenge Test Line

Clostridium 属細菌についてはアネロパック角型ジャー（三菱ガス化学社製）を用いて嫌氣的に培養した。各供試フィルターによるチャレンジ試験は芽胞懸濁試験液毎に同一ロットのフィルターを用いて3回行なった。3回の試験のうち1回でも集落が1 CFU 以上検出された試験フィルターは陽性（+）、一度も検出されなかったフィルターは陰性（-）と表記した。

チャレンジ試験に用いる供試菌株芽胞を懸濁した各試験液の初発芽胞数の測定は以下のように行なった。すなわち、試験用フィルターを用いずにチャレンジ試験時と同様の操作を行い、分析用フィルター上に検出された集落を計数した。

実験結果

1. 供試菌株芽胞の精製度

供試芽胞は試験の目的から精製度が要求される。すなわち、芽胞が単離された状態で芽胞単体として存在しなければならない。従って、培養により得られた芽胞が芽胞嚢を含む母細胞から完全に除去されなければならないため常法²⁸⁾により処理

した。

供試菌株芽胞の精製度を顕微鏡で観察した結果を Table 5 に示す。供試菌株のうち、*B. stearothermophilus* および *B. coagulans* の芽胞液は、その他の4株の芽胞液に比べ、Lysozyme 処理による母細胞の除去は困難で、成書²⁹⁾と同じ結果であった。そこで、芽胞形成のための培養時間の延長、Lysozyme の増量および反応時間の延長により同様の処理を試みたが効果はみられなかった。むしろ、Lysozyme 処理を過酷な条件で行なうと初発芽胞数に減少がみられた。しかし、芽胞液の直接鏡検では芽胞単体として存在するものも観察されたため試験に供することにした。

その他の4株の芽胞液は常法により精製が十分であると判断した。

2. 各種試験液中の供試菌株の初発芽胞数

チャレンジ試験に用いた供試菌株を接種した各試験液の初発芽胞数の測定結果を Table 6 に示す。供試リン酸緩衝液中の供試菌株の初発芽胞数は $7.0 \times 10^3 - 4.0 \times 10^6$ CFU/ml であった。また、供試糖液および市販清涼飲料水中の供試菌株の初発

Table 5. Purity of tested spore suspensions

Species	Sensitivity of vegetative cell to lysozyme	Purity of spore suspension
<i>B. stearothermophilus</i> 1001 (IAM1035)	× ^a	+ ^b
<i>B. coagulans</i> 1101 (IAM1115)	×	+
<i>B. subtilis</i> 1401 (IAM1026)	◎	+++
<i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	○	++
<i>C. thermosaccharolyticum</i> 5604	○	++
<i>C. thermaceticum</i> 5801	○	++

^a × : Non, ○ : Moderate, ◎ : High.

^b + : Bad, ++ : Good, +++ : Very good.

Table 6. Initial spore count of test strains in 0.067M phosphate buffer (pH7.0), syrups and soft drinks

Species	Count of spores (CFU/ml)	
	Phosphate buffer	Syrup and soft drinks
<i>B. stearothermophilus</i> 1001 (IAM1035)	1.4×10^4 - 1.0×10^5	NT ^a
<i>B. coagulans</i> 1101 (IAM1115)	7.0×10^3 - 1.2×10^5	5.5×10^4
<i>B. subtilis</i> 1401 (IAM1026)	3.8×10^4 - 2.5×10^5	1.0×10^5 - 7.1×10^5
<i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	6.8×10^4 - 4.0×10^5	2.3×10^4 - 4.7×10^5
<i>C. thermosaccharolyticum</i> 5604	3.3×10^4	NT
<i>C. thermacetium</i> 5801	3.3×10^4	1.0×10^4 - 3.5×10^4

^aNot tested.

芽胞数は 1.0×10^4 - 7.1×10^5 CFU/mlであった。

ずれの供試菌株芽胞も検出されなかった。

3. リン酸緩衝液中に懸濁した耐熱性細菌芽胞の除去

供試菌株芽胞を接種した0.067Mリン酸緩衝液 (pH7.0) の供試フィルターによる除去試験結果を Table 7 に示す。供試 SCW800 (0.8 μ m) フィルターによりろ過したろ液からは、すべての供試菌株芽胞が検出された。また、供試菌株 3 株について試験した供試 EKW (0.65 μ m) フィルターによるろ液からは、*B. coagulans* および *A. acidoterrestris* 芽胞は検出されなかったが、*B. subtilis* 芽胞が検出された。しかし、供試 EBW (0.45 μ m) フィルターによるろ液からはい

4. 糖液および市販清涼飲料水に懸濁した耐熱性細菌芽胞の除去

A. acidoterrestris 芽胞を接種した68%蔗糖液および75%果糖液、*A. acidoterrestris*、*B. subtilis* および *B. coagulans* 芽胞を接種した市販品の清涼飲料水、さらに *C. thermacetium* 芽胞を接種した68%蔗糖液の供試フィルターによる除去試験結果を Table 8 に示す。供試 SCW800 (0.8 μ m) フィルターによりろ過した糖液および清涼飲料水のろ液からは *C. thermacetium* 芽胞を除くすべての芽胞が検出された。供試 EKW (0.65 μ m) フィルターによりろ過した68%蔗糖

Table 7. Spore removal characteristics of each tested membrane in 0.067M phosphate buffer(pH7.0)

Membranes ^a	Strains						
	<i>B. stearothermophilus</i> 1001 (IAM1035)	<i>B. coagulans</i> 1101 (IAM1115)	<i>B. subtilis</i> 1401 (IAM1026)	<i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	<i>C. thermosaccharolyticum</i> 5604	<i>C. thermacetium</i> 5801	
SCW800 (0.8 μ m)	+ ^b	+	+	+	+	+	
EKW (0.65 μ m)	NT ^c	- ^d	+	-	NT	NT	
EBW (0.45 μ m)	-	-	-	-	-	-	

^a47mm ϕ disc membrane^bSpores were detected in the effluent one or more times within three runs of the challenge tests.^cNot tested.^dNo spores were detected in the effluent within three runs of the challenge tests.**Table 8.** Spore removal characteristics of each tested membrane in syrups and soft drinks

Membranes ^a	Spore suspensions						
	68% Sucrose solution added <i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	68% Sucrose solution added <i>C. thermacetium</i> 5801	75% Fructose solution added <i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	20% apple juice drink added <i>A. acidoterrestris</i> 3001 (DSM2498)	Coffee drink with sugar added <i>B. coagulans</i> 1101 (IAM1115)	Green tea drink added <i>B. subtilis</i> 1401 (IAM1026)	
SCW800 (0.8 μ m)	+ ^b	- ^c	+	+	NT ^d	+	
EKW (0.65 μ m)	+	-	-	-	-	-	
EBW (0.45 μ m)	-	-	-	-	-	-	

^a47mm ϕ disc membrane^bSpores were detected in the effluent one or more times within three runs of the challenge tests.^cNo spores were detected in the effluent within three runs of the challenge tests.^dNot tested.

液のろ液からは *A. acidoterrestris* 芽胞が検出された。しかし、供試 EBW (0.45 μm) フィルターによるろ液からはいずれの供試菌株芽胞も検出されなかった。

考 察

容器包装詰加熱殺菌食品の変敗原因となる代表的な耐熱性有芽胞細菌には *Bacillus* 属, *Alicyclobacillus* 属, *Clostridium* 属および *Desulfotomaculum* 属細菌が知られている。これらの耐熱性細菌芽胞の形成芽胞は楕円形または球形である³⁰⁾。一般に、細菌芽胞は短軸直径がおおよそ0.5~1.0 μm , 長軸直径がおおよそ1.0~2.0 μm とされている³⁰⁾。本来、試験の目的からすれば供試芽胞はより小さいものが望ましい。しかし芽胞のサイズを実測することは不可能なため、代表的な変敗原因菌の中から楕円形芽胞と球形芽胞を形成する耐熱性有芽胞細菌6株を供試菌株とした。

フィルターによる微生物除去の主要なメカニズムとしては、対象となる微生物のサイズとフィルターメディアの孔径の差によるフィルター表面あるいは内部でのふるい効果が知られている。しかし、実際に微生物をろ過した後のフィルターメディア表面および断面を電子顕微鏡で観察してみると、0.2あるいは0.22 μm と設定されているフィルターにも1 μm を超える孔が多く存在しており、微生物はメンブレン内部に入り込みろ材壁に吸着することで除去されている³¹⁾。従って、フィルターによる微生物除去はふるい効果と吸着という少なくとも2つのメカニズムから実現している。

ろ材の微生物に対する吸着能は、微生物およびろ材の表面の荷電、疎水性度合い、立体的構造などに左右されると考えられるが、それらは両者が接している流体の性質や挙動に依存するはずである。従って、フィルターによる微生物の除去効率を調査するためには、実際にろ過対象となる液に対象微生物を懸濁させた試験液を用いて、実生産スケールに相当するろ過条件を実験室レベルにスケールダウンした実験を行い評価することが最も

確実な方法である。

今回、試験液としてリン酸緩衝液、糖液および市販清涼飲料水を用い、これらの試験液1,000ml中に約 10^5 CFU/mlの濃度で懸濁させた耐熱性細菌芽胞が0.45 μm ミクロンフィルターにより完全に除去されたことを確認した。すなわち、47mmディスクメンブランあたり、リン酸緩衝液および清涼飲料水を試験液とした場合には常温で33ml/分、糖液の場合は60°Cで5 ml/分の流速で、 10^5 CFUの耐熱性細菌芽胞が、あるいはメンブラン表面積1 cm^2 あたり 10^7 CFUの耐熱性細菌芽胞が、検出できないレベルにまで除去された。この結果から、0.45 μm ミクロンフィルターが耐熱性細菌芽胞の除去に有効であることが示された。

結 論

耐熱性芽胞細菌である *Bacillus stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, および *C. thermaceticum* の芽胞を0.067Mリン酸緩衝液 (pH7.0), 68%蔗糖液, 75%果糖液, 市販の清涼飲料水 (リンゴ果汁入り, 加糖コーヒーおよび緑茶) 中に約 10^5 CFU/mlとなるよう懸濁し試験液とした。47mm ϕ ディスクフィルターで、リン酸緩衝液および清涼飲料水を試験液とした場合には常温で33ml/分、糖液の場合は60°Cで5 ml/分の流速で各試験液1,000mlをろ過し、ろ液中の芽胞数を測定した。その結果、ろ過精度が0.45 μm のフィルターのろ液には芽胞は全く認められなかった。一方、0.65および0.8 μm フィルターのろ液には芽胞が認められた。この結果から、清涼飲料水の製造工程における耐熱性細菌芽胞のろ過除菌に0.45 μm メンブランフィルターが有効であると考えられた。

文 献

- 1) Nakayama, A., Samo, S., Ikegami, Y. (1977) A New Type of Flat Sour Spoilage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 43, (7), 899.
- 2) Nakayama, A., Samo, S. (1980) Evidence of "Flat Sour" Spoilage by Obligate Anaerobes

- in Marketed Canned Drinks. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, (9), 1117-1123.
- 3) Nakayama, A., Shinya, R. (1981) A New Type of Flat Sour Spoilage of Commercial Canned Coffee. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **22**, 30-36.
 - 4) Nakayama, A., Shinya, R. (1981) A New Type of Flat Sour Spoilage of Commercial Canned *Shiruko*. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **22**, 37-41.
 - 5) 松田典彦, 増田寛行, 駒木 勝, 松本直起 (1982) “しるこ” 及びミルクコーヒー缶詰から分離した高温性偏性嫌気性有芽胞細菌. 食衛誌, **23**, 480-486.
 - 6) 山本和則, 神谷隆久, 小室道彦, 掛札しげ子, 村上りつ子, 高井勝美 (1984) フラットサワー変敗しるこ缶詰から分離した好熱性, 偏性嫌気性有芽胞細菌の性状について. 食衛誌, **25**, 233-240.
 - 7) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正 (1988) 低酸性飲料缶詰の加温販売による変敗. 缶詰時報, **67**, (11), 1161-1167.
 - 8) 田中光幸 (1980) 缶コーヒーのキャンニング・殺菌技術の重点とフラットサワー対策. *Beverage Japan*, **3**, (2), 40-44.
 - 9) 金子 勉 (1981) 公開特許公報, 昭56-18578, pp.363-366.
 - 10) Nakayama, A., Sonobe, J., Shinya, R. (1982) Effects of Fatty Acids on Flat Sour Spoilage by Obligate Anaerobes. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **23**, 25-32.
 - 11) 諏訪信行, 久保田春美, 高橋和子, 町田 肇 (1986) コーヒー缶詰の耐熱性有芽胞細菌による変敗に対するシヨ糖脂肪酸エステル添加効果. 日食工誌, **33**, 44-51.
 - 12) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正 (1989) 低酸性飲料缶詰のシヨ糖脂肪酸エステルによる変敗防止法. 缶詰時報, **68**, (1), 86-90.
 - 13) Nakayama, A., Shinya, R. (1981) Influence of Ultraviolet Irradiation on Spores of Obligate Anaerobes Causing Flat Sour Spoilage of Canned Drinks. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **22**, 415-420.
 - 14) Nakayama, A., Shinya, R. (1981) Ultraviolet Sterilization of Sugar Solution Containing Spores of Obligate Anaerobes Causing Flat Sour Spoilage. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **22**, 421-424.
 - 15) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正 (1989) 低酸性飲料缶詰の汚染原料の紫外線照射による変敗防止法. 缶詰時報, **68**, (1), 91-95.
 - 16) 丹羽源廣, 廣田裕子, 白須由治 (1991) 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), 31-42.
 - 17) 山崎浩司, 磯田千恵子, 手塚裕和, 川合祐史, 信濃晴雄 (1997) 酸性飲料変敗菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の耐熱性とその制御. 食科工, **44**, (12), 905-911.
 - 18) 後藤慶一 (2000) 高温性好酸性芽胞形成細菌: *Alicyclobacillus* 属細菌. 防菌防黴, **28**, (8), 499-508.
 - 19) 厚生省, 告示第162号, 「2. 清涼飲料水の製造基準」, 官報, 平成11年7月22日.
 - 20) 大矢晴彦, 渡辺敦夫監修 (1999) 食品膜技術, pp.443-455, 光琳.
 - 21) 社団法人日本缶詰協会監修 (1984) 缶びん詰・レトルト食品事典, pp.521-525, 朝倉書店.
 - 22) 駒木 勝, 市川良子, 松田典彦 (1991) *Clostridium thermosaccharolyticum* の芽胞形成用培地. 缶詰時報, **70**, (10), 990-997.
 - 23) Beerens, H., Des Rosiers, A. (1968) *Ann. Inst. Pasteur Lille XIX*, 63-121.
 - 24) 近藤雅臣, 渡部一仁編著 (1995) スポア実験マニュアル, pp.20-22, 技報堂出版.
 - 25) 近藤雅臣, 渡部一仁編著 (1995) スポア実験マニュアル, pp.28, 技報堂出版.
 - 26) 東京大学医科学研究所学友会編 (1988) 微生物学実習提要, pp.57, 丸善株式会社.
 - 27) 日本工業標準調査会 (1990) 精密ろ過膜エレメント及びモジュールのバブルポイント試験方法, JISK3832, 日本規格協会.
 - 28) 近藤雅臣, 渡部一仁編著 (1995) スポア実験マニュアル, pp.20-28, 技報堂出版.
 - 29) 近藤雅臣, 渡部一仁編著 (1995) スポア実験マニュアル, pp.160-161, 技報堂出版.
 - 30) 近藤雅臣, 渡部一仁編著 (1995) スポア実験マニュアル, pp.32, 技報堂出版.
 - 31) 大隈正子, 山田直子, 戸谷美夏 (1991) メンブレンフィルターによる細菌の除去メカニズム. ファームテックジャパン, **7**, (11), 1-6.