

微生物の熱死滅のデータベースと予測モデリング

土戸 哲明⁽¹⁾, A. Jagannath⁽¹⁾

中村 一郎⁽²⁾

1. 加熱殺菌と微生物の耐熱性に影響する因子

加熱殺菌は食品中の病原菌や腐敗菌を殺滅することによって食中毒や腐敗を防止するための手段として最も広く利用されており、二次汚染や品質劣化などの弱点もあるが簡便で経済的、有効性も大きいものである¹⁾。しかし、食品中における微生物の耐熱性は、ある温度での死滅速度に相当する D 値 (90% 死滅時間で、単位は一般に分; 図 1) とその温度依存性の指標である z_T 値

(D 値が 1 桁低下するのに要する加熱温度差、単位は $^{\circ}\text{C}$) によって表せるが、これらの指標値は実際にはさまざまな因子によって変動する。著者は、これらの影響因子を次の 3 つに分けている

(表 1)。①微生物因子: 微生物の種類や生育条件, ②食品因子: pH, 水分活性など食品の特性, ③殺菌処理における操作因子: 加熱温度や時間, 昇温速度や昇温前の保温温度などの温度履歴が代表的なものである^{2,3)}。一般には、微生物の種類, 食品の性状 (pH や水分活性), 加熱条件 (温度と時間) は留意されるが、これら以外にも加熱前の微生物の発育条件や保持条件は微生物がもつ固有の耐熱性を変化させるし、

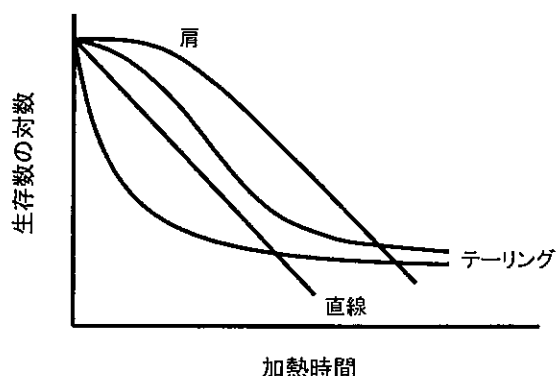


図 1 対数的熱死滅と非対数的熱死滅

表 1 微生物の耐熱性に影響を及ぼす因子³⁾

プロセス	影響因子		
	環境 (食品) 因子	細胞因子	操作 (工程) 因子
加熱前	温度・pH・水分活性 酸素・酸化還元電位 栄養素とその種類 予備保温温度	菌種 培養齢 (生育相) 前処理 (感受性化 ・抵抗性化)	保持時間
加熱中	温度・pH・水分活性 酸素・酸化還元電位 溶質とその種類 (栄養素・阻害剤など)	菌種 細胞密度	加熱時間 昇温速度 (伝熱速度)
加熱後	冷却温度 温度・pH・水分活性 酸素・酸化還元電位 栄養素とその種類	菌種 後処理 (回復促進 ・阻害)	保存時間 冷却速度 (伝熱速度)

(1) つちど てつあき, A. ジャガナス (関西大学工学部生物工学科)

(2) なかむら いちろう (中京短期大学生生活学科)

加熱後の保持・保存条件は加熱によって発生する損傷菌の回復に影響して結果的に生存率の値を変化させる。

近年、各種食品へ HACCP の導入が図られ、加熱殺菌プロセスの条件に関する考え方は、殺菌後の微生物試験に頼るのではなく、温度変化の計測、モニタリングを重視し、予め取得しておいたデータをもとに微生物の死滅を予測する手法が取り入れられるようになってきている⁴⁾。従って、微生物の耐熱性の変動について定量的、系統的にデータを収集して解析し、上述のさまざまな因子がどのように影響するか、予め把握しておく必要がある。このことが、最近になって微生物の熱死滅データベースを構築することの意義が認識され、それを実プロセスや商品開発などに有効活用することが期待される所以であろう。この辺りの経緯については最近の拙著解説⁵⁾を参照されたい。

2. 熱死滅のデータベース

これら微生物の耐熱性についての膨大なデータを系統的にまとめてデータベースとし、検索や一覧化、統計処理などの機能をもたせたものが公開されている。アメリカ農務省の ComBase は、熱死滅に限らず増殖や保存中の生存のデータも含み、無料でインターネット公開 (<http://wyndmoor.arserrc.gov/combase/>) されている⁶⁾。

一方、著者の土戸と中村ら^{7,8)}が開発した ThermoKill Database R9100 (検索画面例を図 2 に示す) は、1991年から 2000年までの間学術雑誌に発表された加熱殺菌に関する論文から上述の多くの耐熱性に影響する因子の項目と耐熱性データを抽出し、検索可能なよう

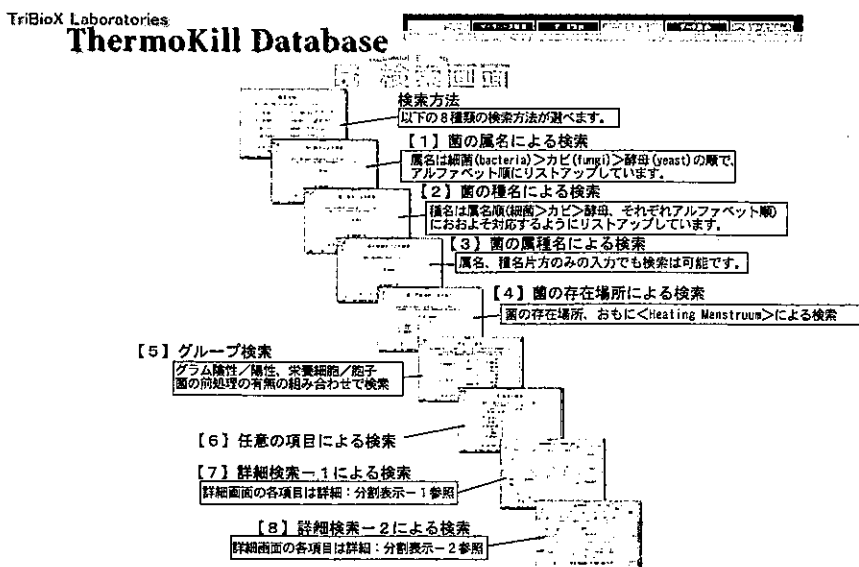


図 2 ThermoKill Database R9100の検索画面

に作製されたデータベースである (<http://www.h7.dion.ne.jp/~tbx-tkdb/>)。このデータベース構築作業は、その後、1980年代、さらに2001年以降へも展開しており、2004年5月1日現在、R9100の分を含めて6619件のレコード数、12,155件のD値数が集積されている。これらは改訂版として2005年内の公開を予定している。ThermoKill DatabaseはComBaseにないいくつかの特徴があるが、その詳細については近著解説⁹⁾を参照されたい。さらに標準化された実験系において取得される熱死滅データの蓄積も行われており、現状では枯草菌孢子と大腸菌に限られているが、ThermoKill Database Eとして将来公開の予定である。このデータベースでは、各種因子の影響が系統的に解析されて因子間の相互作用やデータ補正に利用する目的も含まれている。

食品産業センターのホームページ (www.shokusan.or.jp/haccp/)にも独自の微生物汚染・制御のデータベースが掲載されており、これには上述のThermoKill Databaseからもデータが一部供与されているが、別様式で構成された中小企業向けのHACCP対応型となっているのが特徴である。

これら熱死滅データベースをもとに次項以下に述べる予測モデリングが行われ、HACCPやリスクアセスメントへ活用が提案されている。しかし、データの適合性の問題や予測値の変動幅が大きいことなどのために、現状ではむしろデータベース自体の方が直接、商品開発や製造仕様変更などにおいて有用と考えられているようである。

3. 予測モデリングの技術的背景

前述のデータベースをもとに死滅の数学モデルを構築し、それを予測ソフトウェアとして一般に提供され、利用できるようになってきている。すでに、欧米では政府機関が中心の国家プロジェクトとして、熱死滅以外にも増殖や保存中の生残に加えて予測できるソフトウェアが開発されている。最初にイギリスのフードマイクロモデル（現在は廃止されている）が世に出されたあと、アメリカの病原菌モデリングプログラム（農務省東部地域研究センターのウェブサイト—<http://www.arserrc.gov/mfs/> から無料入手可能）が公開され、さらにフランスでもSym'Previsがまもなく公表されるはずである。前2者の利用方法については藤川¹⁰⁾がわかりやすく解説しているので参照されたい。

このように微生物の熱死滅挙動が予測できても、データが取得された条件が適用しようとする食品の系と同じではなく、また増殖と異なって熱死滅には多くの因子が多様に影響することによるため、現実には実用性は期待されるほどではない。後述のように実際の系では適合性よりも単に予測値よりも安全圏に入っていればよしとする“フェールセーフ”の概念が取られており、予測は一応の目安として利用できるという程度で、提示された予測値で結果を保証するものではないことに留意すべきである。

予測モデリングに利用される数学モデルには、線形重回帰モデル、変型ゴンペルツモデル、変型ロジスティックモデル、ワイブルモデル、バラニーモデルなどがよく利用される。冒頭に示したように、熱死滅の時間経過（生存曲線）は本来一次反応に従うとされるが、加熱時間に対して生存数の対数をプロットすると直線が得られ、その勾配の逆数が D ということになるが、場合によっては肩やテーリング、その複合型の S 字状になることも少なくない(図 1)。上記各モデルはこれらの形状の生存曲線を適合性よく表現するために導入されたもので 1 次モデルと呼ばれる。一方、 D の温度や pH など環境因子に対する依存性が平方根モデルやアレニウスモデルによって示されており、これらは 2 次モデルである^{9,12)}。応答曲面モデルは 3 次元的にパラメーター相互の関係を表現したもので、視覚的に環境因子の影響がわかるようになっている。

4. 緩衝液中における枯草菌胞子の熱死滅に対する加熱温度, pH, 食塩濃度の影響のモデリング

それでは実際に、著者らが検討した枯草菌 (*Bacillus subtilis* 168) 胞子を例に、50mM リン酸緩衝液中での熱死滅に対する加熱温度, pH, 食塩濃度の影響を取り込んだモデリングの検討例¹³⁾を紹介することにしよう。この研究は、先の ThermoKill Database E のデータ収集の一環として、また主要な影響因子である加熱温度 (89~98°C), pH (6.0~8.0), 食塩濃度 (0~5% の範囲) の異なる条件下での熱死滅を予測することを目的として実施された。

枯草菌は生化学的、分子生物学的に最もよく理解されており、著者らの研究室でもグラム陽性細菌の代表として度々用いてきているが、ここでは食品腐敗菌の代表として、また加熱殺菌対象微生物として重要な胞子を形成する細菌として選んだ。またリン酸緩衝液は基本加熱液として利用されるものである。これらの条件における本胞子の熱死滅データをとり、 D 値に関して次のような線形 2 次重回帰多項式モデルを構築した。

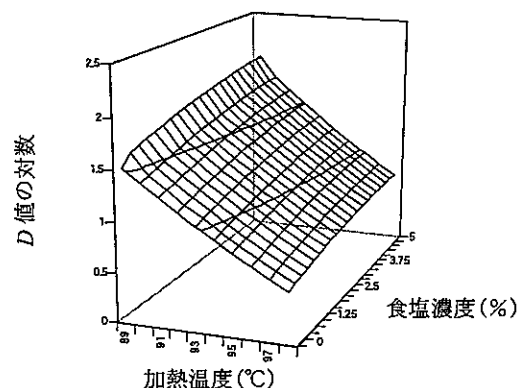


図 3 pH6.5での熱死滅に対する温度と食塩濃度の影響を表す応答曲面モデル¹³⁾

$$\log D = A_0 + A_1(T) + A_2(C) + A_3(\text{pH}) + A_4(T)_2 + A_5(C)_2 + A_6(\text{pH})_2 + A_7(T \cdot C) + A_8(C \cdot \text{pH}) + A_9(\text{pH} \cdot T)$$

ここで、pHのほか T は加熱温度、 C は食塩濃度である。 A_0 から A_9 までは係数で、ここでの回帰分析によって得られた値はそれぞれ、13.81803, -0.49951, 1.066985, 4.183748,

0.02126, - 0.00846, - 0.25667, - 0.00391, - 0.09187, - 0.00177であった。応答曲面モデルによって $\log D$ に対する加熱温度, 食塩濃度の影響について pH6.5を例に図示したものが図3である。上述の予測モデルから求めた D 値の予測値と先に測定した実測値との両対数プロットをとってその間の差異を検討したところ, 高い相関が得られた (図4)。

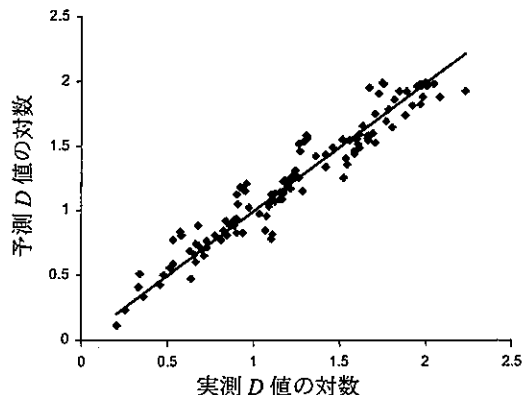


図4 枯草菌胞子について得られた結果の予測値と実測値との比較プロット¹³⁾

5. 牛乳中における枯草菌胞子熱死滅予測モデルのバリデーション

予測モデルが構築されると, その適用性について検証作業であるバリデーションを行うが, これには内部バリデーションと外部バリデーションとがある。前者はモデル構築と同じ系で実測し, その適合性を調べるもので, 後者は過去の文献との比較や実際の食品を用いて比較検討するものである。ここでは外部バリデーションについての検討結果を紹介する。

過去の文献値との比較については, 前項に述べた ThermoKill Database R9100を用いて検討し, これまでに報告されている枯草菌胞子についてのデータは比較的少ないが, これを含めて TDT (加熱致死時間) 曲線の形で図5に示すような結果¹³⁾を得た。文献値はここでこのモデル構築系と異なることが通常であるので直接的な比較はできないが, 直線の勾配から得られる m の値からはほぼ妥当なものと推察される。

次に著者らは, このモデルを実際の食品例として牛乳に適用したので, その結果¹⁴⁾を紹介する。方法としては, まず先のモデル構築の加熱液系であった緩衝液の代わりに, 脂肪含量と pH に相違がある超高温 (UHT) 処理全乳とスキムミルクを用いて枯草菌胞子をそれぞれに接種後, 89~98°Cで加熱処理した。生存試験の結果では, UHT 処理全乳がスキムミルクよりも耐熱性が高かったが, いずれも各温度での D 値は緩衝液中よりも低く, 予測値よりも安全な範囲に入っていることが明らかであることから, 牛乳中ではいわゆる“フェールセーフ”であることが示された。この要因については原著で考察しているので参照していただくことに

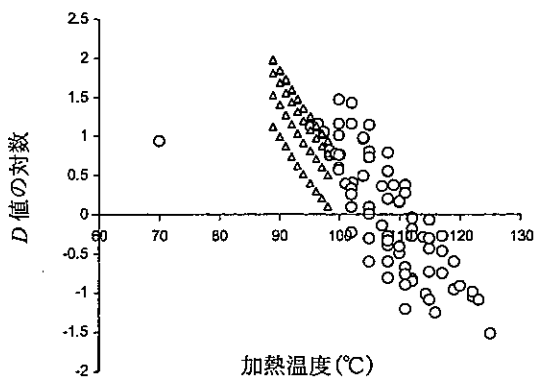


図5 実測値と文献値との枯草菌胞子の熱死滅に対する TDT 曲線¹³⁾

して、ここでは、このバリデーションによる予測からの逸脱の程度の評価について触れる。

Ross¹⁵⁾は予測モデリングの評価に、次式で示されるバイアスファクター (BF) の導入を提唱している。

$$BF = 10^{|\sum \log \{D(\text{pred}) / D(\text{obs})\} / n|}$$

ここで n は試行回数で、予測値 $\{D(\text{pred})\}$ と実測値 $\{D(\text{obs})\}$ が全く一致する場合は、この BF 値が 1 となり、1 以下の場合には“フェールデンジャラス”で、以上の場合は“フェールセーフ”である。ここで検討した牛乳の場合には BF 値は全乳で 1.44、スキムミルクで 1.60 である。

6. 食品における変形ワイブルモデルと線形ビゲロウモデルを併用した枯草菌孢子の熱死減予測

著者らは、枯草菌孢子の熱死減予測モデリングについてさらに研究を進め、上述の線形重回帰モデルと異なる変形ワイブルモデルと線形ビゲロウモデルの併用を試みた¹⁶⁾。対象の加熱液は、まず 50mM リン酸緩衝液でモデル化を行い、ついで牛乳、かゆ、醤油を用いて比較検討した。加熱温度と食塩濃度は先と同様、それぞれ、89~98℃、0~5% とし、pH は 6.0、6.5、7.0 で行った。なお、牛乳の pH は 6.6 前後、脂肪含量は全乳で 3.6%、スキムミルクで 0.6%、醤油の pH は 4.8、食塩濃度は 16.3% である。

変形ワイブルモデルは次式で表され、 N は生存数、 N_0 は初発生存数、 t は加熱時間、 p は肩あるいはテーリングを生ずる生存曲線の形状に影響する評価変数である。 p が 1 のときに対数的死滅となる (図 1 参照)。

$$\log N = \log N_0 - (t / D)^p$$

また、線形ビゲロウモデルは Mafart と Leguerinel¹⁷⁾ によって提示されたもので、次式のように各環境因子の変数の独立した項の和で示されること、また分子にその変数の基準あるいは最適値との差を入れ、各項の分母に z 値を利用している点の特徴である。ここでは、加熱温度、pH、水分活性 (a_w) の項で構成する式を用いた。

$$\log D = \log D^*_{\text{matrix}} - (T - T^*) / z_T - \{(pH - pH^*) / z_{pH}\}^2 - (a_w - 1) / z_{a_w}$$

ここで、 $T^* = 121.1^\circ\text{C}$ 、 $pH^* = 7$ である。 z_T は通常温度依存性を示す z 値で、 z_{pH} は \sqrt{D} の 1/10 低下に相当する pH^* と pH との差で、 z_{a_w} は D の 1/10 低下に相当する a_w の 1 との差である。これら 3 つの z 値は細菌の種に依存するが、食品の種類や加熱液には影響を受けないものと仮定する。 D^*_{matrix} は $T = T^*$ 、 $pH = pH^*$ 、 $a_w = 1$ のときの D に相当し、これは食品や加熱液に依存するパラメーターである。したがって、 D^*_{matrix} が D^*_{buffer} に近い値をとるときには予測モデルがその食品に適用できることを示すことになる。

得られた生存曲線はいずれも若干の肩をもち、上述のワイブルモデルの適用によって p

は 1.325 と決定された。次にそれら生存曲線から線形ビゲロウモデルによって上記パラメーターの値を求め、表 2 の結果を得た。これから、 D^* matrix が牛乳では D^* buffer に近いが、醤油やかゆでは異なっていることが示された¹⁶⁾。さらに、これら 3 種の食品についてそれぞれの食品のもつ pH と水分活性条件下で予測モデリングを行い、その結果得られた生存曲線を実測値とともに図示し、緩衝液中での予測モデルと比較した (図 6)。図に明らかなように、牛乳の場合は緩衝液とほぼ同様の形状を示すが、醤油では緩衝液中求めた予測よりも殺菌不十分であり、かゆでは逆に過剰な殺菌処理であることが示された¹⁶⁾。

ここでの予測モデルの適用例から考えると、冒頭に示したさまざまな熱死滅への影響因子の定量的な効果を予測するためには、線形ビゲロウモデルが有用であるとみられ、ここで例として示した枯草菌胞子の熱死滅に対する加熱中の因子に限らず、加熱前および加熱後の因子にも適用することが可能であろう。Mafart と Leguerinel のグループ¹⁶⁾ は、そのような検討例を報告しており、著者の一人、土戸ら¹⁹⁾ も現在、枯草菌胞子の熱死滅における加熱温度に加えて発育温度と生存孢子回収温度 (回復温度) の影響を表す線形ビゲロウモデルを提出している。

表 2 枯草菌胞子の熱死滅予測のための線形ビゲロウモデルにおけるパラメーター値¹⁵⁾

マトリックス非依存パラメーター		マトリックス依存パラメーター	
p	1.325	D^* buffer	0.0056 分
T^*	121.1°C	D^* milk	0.0054 分
pH*	7	D^* soy sauce	0.0311 分
z_T	7.8°C	D^* kayu	0.0029 分
z_{pH}	1.38		
z_{aw}	0.085		

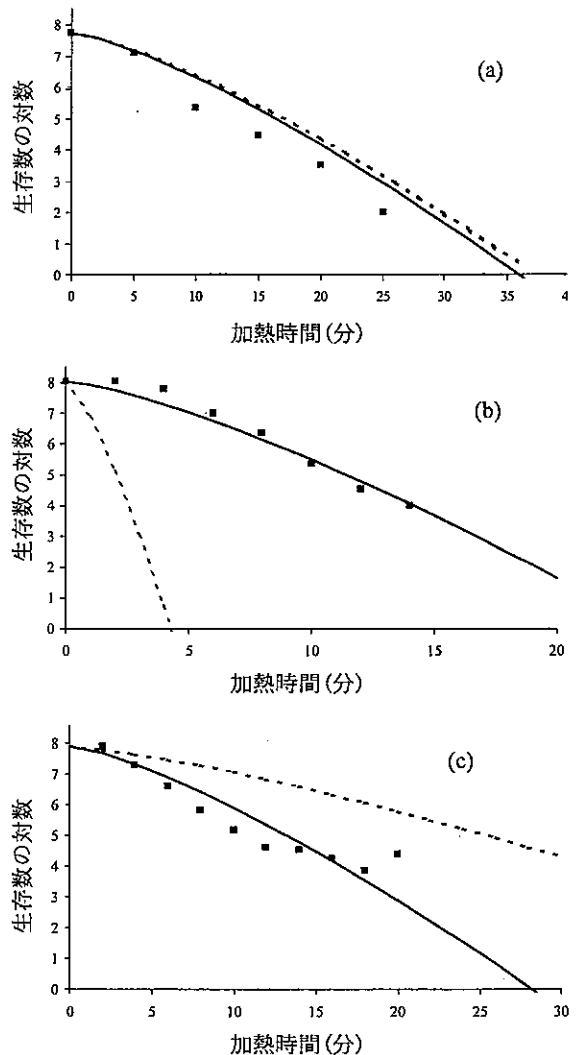


図 6 牛乳 (a)、醤油 (b)、かゆ (c) 中での枯草菌胞子の熱死滅モデリングの図示結果¹⁶⁾。加熱温度は 95 °C で、実測値は記号で、予測値は実線で示し、緩衝液中での予測結果を破線で示す。

7. おわりに

HACCPの普及は衛生管理についての新しい概念をもたらし、微生物の挙動の予測が重要なポイントになってきている。しかし、増殖や腐敗についてはある程度の適合性が得られても、熱死滅はずっと多くの因子の影響を受けてさまざまに変動するため、信頼性のある予測が可能となるにはまだ程遠いのが実状である。従来の単なる数学上の予測モデリングの方法では限界があり、実用には至らない自己満足的な数字合わせに終始するに留まる可能性がある。

著者らは、実用的な予測微生物学に進化させるには、単にさまざまな条件の死滅挙動をどの場合も力まかせに数学的モデルを駆使して表そうとするのではなく、地道ではあるがそれらの耐熱性変動の要因や原理を分子生物学や細胞生理学の手法によって明らかにし、得られた原理や成果を死滅挙動の予測理論に取り入れるアプローチ（決定論的方法）が不可欠と考え、検討を進めてきている^{20,21)}。

参考文献

- 1) 土戸哲明, 高麗寛紀, 松岡英明, 小泉淳一: 微生物制御—科学と工学, 講談社サイエンティフィック (2002).
- 2) 土戸哲明: 防菌防黴誌, 32, 251-263 (2004).
- 3) 土戸哲明: 食品と開発, 35, 8-10 (2000).
- 4) 土戸哲明: 食品と技術, No. 343, 1-10 (2000).
- 5) 土戸哲明, 阿部智子, 中村一郎: 食品工業, 印刷中 (2004).
- 6) Tamplin, M., Baranyi, J., and Paoli, G.: Modeling Microbial Responses in Food (ed. by McKellar, R. C. and Lu, X.), p.233-242, CRC Press, Boca Raton, 2004.
- 7) Nakamura, I., Yokohara, T., and Tsuchio, T.: Biocontrol Sci., 5, 61-64 (2000).
- 8) 土戸哲明, 中村一郎: 日本食品工学会誌, 3, 41-45 (2002).
- 9) 藤川 浩: 防菌防黴誌, 28, 649-656 (2000).
- 10) Jagannath, A. and Tsuchido, T.: Biocontrol Sci., 8, 1-7 (2003).
- 11) McKellar, R. C. and Lu, X.: Modeling Microbial Responses in Food (ed. by McKellar, R. C. and Lu, X.), p.21-62, CRC Press, Boca Raton, 2004.
- 12) Ross, T. and Dalgaard, P.: Modeling Microbial Responses in Food (ed. by McKellar, R. C. and Lu, X.), p.63-150, CRC Press, Boca Raton, 2004.
- 13) Jagannath, A., Nakamura, I., and Tsuchido, T.: J. Appl. Microbiol., 95, 135-141 (2003).
- 14) Jagannath, A. and Tsuchido, T.: Lett. Appl. Microbiol., 37, 399-404 (2003).
- 15) Ross, T.: J. Appl. Microbiol., 81, 501-508 (1996).
- 16) Jagannath, A., Tsuchido, T., and J. -M. Membre: Food Microbiol., in press.
- 17) Mafart, P. and Leguerinel, I.: J. Food Sci., 63, 6-8 (1998).
- 18) Mafart, P. and Leguerinel, I.: Abstract of 4th Int. Symp. Predictive Modelling in Food, Quimper, France (2003).
- 19) 玉川裕香子, 宮内秀彰, 坂元 仁, 土戸哲明: 日本食品工学会大会要旨集 (2004).
- 20) 土戸哲明: 日本食品科学工学会誌, 46, 1-8 (1999).
- 21) 土戸哲明: 日本食品微生物学会雑誌, 20, 141-149 (2003).