

# 市販果汁飲料からの耐熱性好酸性菌の検出

*Isolation of Thermotolerant Acidophilic Bacteria (TAB) from Fruit Juices*

古畑勝則, 福山正文, 大仲賢二

麻布大学大学院環境保健学研究科

Katsunori Furuhashi, Masahumi Fukuyama, Kenji Oonaka

School of Environmental Health, Azabu University

**Abstract.** To investigate contamination of commercial fruit juice beverages with thermostable acidophilic bacteria in Japan, 208 samples of fruit juice beverages produced in Japan and 162 samples of import beverages (total of 370 samples) purchased in 2005 were investigated according to the 'Standard Test Method for Thermostable Acidophilic Bacteria' proposed by the Japan Fruit Beverage Association. TAB was isolated from 9 of the beverages made in Japan (4.3 %) and 19 of the import beverages (11.7 %), showing about a 3-fold higher isolation rate. The origins of the import beverages from which TAB was isolated were widely distributed: Thailand, Indonesia, Korea, France, Germany, Spain, Australia, America, Mexico, and South Africa.

Three of the 9 domestic products from which TAB was isolated were mix juice. As the 2nd most frequently contaminated beverage, 2 orange juice products were contaminated, and 1 sample each of apple, grape, grape fruit, and pineapple juices were also contaminated. Regarding the import beverages, 5 of the 19 samples from which TAB was isolated were mix juice, as in the Japan-made products. The 2nd most frequently contaminated beverages were 3 orange juice products. TAB was also isolated from 2 samples each of grape, mango, and pineapple juices, and 1 sample each of apple, cherry, peach, and prune juices. TAB was isolated from various fruit juice beverages regardless of whether they were domestic products or imports.

All of the 9 Japan-made beverages contaminated with TAB were concentrated products, and the bacteria were not detected in any of the pure direct products. The same tendency was noted in the import beverages. Ten of the 19 samples (52.6 %) contaminated with TAB were concentrated, and only 1 straight sample (5.3 %) was contaminated. Seven of the 9 contaminated domestic products (77.8 %) were paper-packed, and 1 sample each was packed in a can or PET bottle. As for the import beverages, 8 beverages (42.1 %) were most frequently paper-packed, as in the Japan-made products, and 6 (31.6 %), 3 (15.8 %), and 2 (10.5 %) beverages were packed in a bottle, PET bottle, and can, respectively.

## 序 文

近年, ヨーロッパやアメリカのみならず日本でも果汁飲料において耐熱性好酸性菌 (Thermotolerant Acidophilic Bacteria, TAB) が原因と思われる汚染事例が報告されるようになった<sup>1)</sup>。本菌群による果汁飲料の汚染は, ヒトに対して食中毒のような健康被

害をもたらすものではないが, 食品の安全性に感心が高まっている昨今では, 果汁飲料における重要な品質管理対象菌である。

果汁飲料の変敗菌である TAB は, かつては *Bacillus* 属の種に分類されていた<sup>2,3)</sup>。ところが1992年, Wisotzkeyらは16S rRNA遺伝子の解析結果と特徴的な脂肪酸を有することから, *Bacillus acidocaldarius*,

*B.acidoterrestris* および *B.cycloheptanicus* の3菌種を *Bacillus* 属から独立させ、新属 *Alicyclobacillus* 属を提唱した<sup>4)</sup>。その後、次々に新種が報告され<sup>5-7)</sup>、分類学的には混沌とした状態である。

TABのなかでも特に *A.acidoterrestris* が果汁飲料中で増殖すると、グアイアコールなどを生成して酸味を帯びた異臭を発生することが知られている<sup>8)</sup>。これらによる果汁飲料の変敗は一旦発生すると、製品の回収、廃棄などによる企業の損失は極めて大きい。我国では各企業がモニタリングや汚染防止対策を講じているが、その現状はほとんど明らかにされていない。そこで、我国で市販されている果汁飲料におけるTAB汚染状況を調査した。

### 材料および方法

#### 1. 供試試料

2005年に購入した国産果汁飲料208試料、および輸入果汁飲料162試料の合計370試料について調査を実施した。

#### 2. 耐熱性好酸性菌 (TAB) の分離

本菌の分離方法は日本果汁協会によって提唱された「耐熱性好酸性菌統一検査法<sup>9)</sup>」に準拠した。すなわち、YSGブイヨン(メルク)90mlに供試試料10mlを加えてから70℃で20分間熱処理を行い、45℃で3日～5日間前培養した。この0.1mlをYSG平板培地(メルク)全体にコンラージ棒で塗抹して45℃で3日～5日間培養した。出現した集落はTABを疑い、グラム染色での芽胞形成およびpH7での不発育を確認した。

#### 3. グアイアコール試験

TABと確定した菌株について、ペルオキシダーゼ法によりグアイアコール産生能について検討した。まず、グアイアコール生成用バニリン酸加YSG培地(極東製薬工業)に供試菌を懸濁させ、45℃で3時間培養した。その後、グアイアコール検出試薬(極東製薬工業)を加え、10分以内に培地の色調を目視で

確認し、対照と比較して判定した。

#### 4. pHの測定

供試試料のpH測定は、供試試料開封後、直ちにpHメーター(HORIBA, F-22)を用いて行った。

### 成績

#### 1. 供試試料のpHと耐熱性好酸性菌(TAB)の分離状況

供試試料のpHとTABの分離状況をTable 1に示した。国産試料208試料のpHは2.1～4.3の範囲であり、いずれも酸性飲料であった。これらのうち9試料(4.3%)からTABが分離され、そのpHは3.1～3.9であった。また、輸入試料162試料のpHは2.5～4.2の範囲であった。これらのうちTABが分離された試料は19試料(11.7%)であり、国産より約3倍高い分離率であった。これらTABが分離された試料のpHは2.9～3.9であり、国産と類似した傾向であった。

#### 2. TABが分離された原産地

TABが分離された輸入試料の原産地をみると、アジア(タイ、インドネシア、韓国:各2試料)とヨーロッパ(フランス、ドイツ、スペイン:各2試料)がそれぞれ6試料(31.6%)と多かった。このほか、オセアニア(オーストラリア)と北アメリカ(アメリカ:2試料、メキシコ:1試料)から各3試料(15.8%)、およびアフリカ(南アフリカ)から1試料(5.3%)分離された。このように、特定の地域に限らず世界各国の製品からTABが分離された。

#### 3. 果汁別分離状況

Table 2にはTABの分離状況を果汁ごとに国産試料と輸入試料に分けて比較した。国産試料ではTABが分離された9試料のうち3試料がミックスジュースであり、3試料ともオレンジを含んでいた。次に多かった果汁はオレンジの2試料で、ほかにアップル、グレープ、グレープフルーツ、パイナップルがそれぞれ1試料であった。また、輸入試料について

Table 1. pH of acidic beverage samples and incidence of thermotolerant acidophilic bacteria.

Kind of samples	No. of samples examined	No. of positive samples (%)	pH	
			Samples examined	Positive samples
Domestic products	208	9 (4.3)	2.1-4.3	3.1-3.9
Imports	162	19 (11.7)	2.5-4.2	2.9-3.9
Total	370	28 (7.6)	2.1-4.3	2.9-3.9

Table 2. Incidence of thermotolerant acidophilic bacteria in acidic beverages.

Fruit juices	Domestic products		Imports	
	No. of samples examined	No. of positive samples (%)	No. of samples examined	No. of positive samples (%)
Apple	50	1 (2.0)	15	1 (6.7)
Cherry	1	0 (0)	1	1 (100)
Grape	28	1 (3.6)	6	2 (33.3)
Grapefruit	22	1 (4.5)	6	0 (0)
Mango	2	0 (0)	16	2 (12.5)
Orange	42	2 (4.8)	20	3 (15.0)
Peach	7	0 (0)	1	1 (100)
Pear	2	0 (0)	2	1 (50.0)
Pineapple	15	1 (6.7)	8	2 (25.0)
Prune	4	0 (0)	1	1 (100)
Mix juice	12	3 (25.0)	44	5 (11.4)
Others	23	0 (0)	42	0 (0)
Total	208	9 (4.3)	162	19 (11.7)

みると、TABが分離された19試料のうちミックスジュースが5試料と最も多く、国産と同様であった。ミックス果汁の種類はオレンジとパイナップルが各3試料、グレープとマンゴーが各2試料、洋なしとグァバが1試料ずつであった。次にオレンジが3試料と多く、グレープ、マンゴー、パイナップルがそれぞれ2試料ずつであった。このほか、アップル、チェリー、ピーチ、洋なし、プルーンが各1試料であった。このように、国産、輸入を問わず、多種類の果汁飲料から分離された。

#### 4. 製法別分離状況

TABの分離状況を製法別にみると、国産試料ではTABが分離された9試料すべてが濃縮還元による製品であり、ストレートの製品からは1試料も分離されなかった。また、輸入試料でも同様の傾向を示し、TABが分離された19試料のうち10試料(52.6%)は濃縮還元の製品であり、ストレートでは1試料(5.3%)から分離されたに過ぎなかった。

#### 5. 包装容器別分離状況

TABの分離状況を容器別にみると、国産試料ではTABが分離された9試料のうち7試料(77.8%)は紙パックから分離され、他にはカンとペットボトルがそれぞれ1試料であった。他方、輸入試料では、やはり紙パックが8試料(42.1%)と最も多く、国産試料と同様であった。次にビンが6試料(31.6%)、ペットボトルが3試料(15.8%)、カンが2試料(10.5%)であった。

#### 6. 分離株のグアイアコール産生能

国産飲料9試料から分離された48株と、輸入飲料19試料から分離された107株、合計155株のTABに

ついてグアイアコール産生能を試験したところ、6株(3.9%)でグアイアコール産生を認めた。この6株はいずれも同一輸入飲料(チェリー)から分離されたTABであった。

#### 考 察

1984年、Cernyらによってドイツにおけるリンゴ果汁での大規模な微生物汚染事故が報告され<sup>2)</sup>、関係者には大きな衝撃を与えた。この事例が*Alicyclobacillus*属菌が関与した最初の報告であり、以後、清涼飲料水業界では本菌が注目されるようになった。

しかし、本属菌は好酸性であるため、通常の耐熱性芽胞形成菌を培養する培地では発育せず、検出は困難であった。また、食中毒菌のような公定法は定められておらず、各企業が独自の方法で検査しているのが現状であった。このため、用いられる培地の種類や培養条件によって成績が異なることから統一した検査法の確立が強く望まれていた。また、諸外国においても多数の検査法が存在したことから、品質管理の現場での煩雑さもさることながら、検査法の違いによって検出感度に差が生じ、原産国と輸入国での成績の相違から取引に支障をきたす場合もあった。

こうした背景から、国際的にはIFU(International Federation of Fruit Juice Producers)が主体となって好熱性好酸性菌検査法の統一を試み、概ねその概要が固まってきた<sup>1)</sup>。一方、我国では日本果汁協会が中心となって飲料メーカーとともに種々の報告<sup>10-12)</sup>を参考に「耐熱性好酸性菌」に関する検査法の検討

が行われ、2003年に業界統一検査法が提唱されるに至った<sup>1)</sup>。なお、この方法とIFU標準法ではヒートショック条件など若干異なる点もあるが将来的には国際的に統一されるものと考えられる。

今回はこの統一検査法に準拠して我国での市販果汁飲料におけるTAB汚染の現状を調査した。その結果、国産品では208試料中9試料(4.3%)から、輸入品では162試料中19試料(11.7%)からTABが分離され、輸入品は国産品と比べて約3倍高い検出率であった。我国の果汁飲料におけるTABの汚染状況調査結果は見あたらず、今回の検出率を客観的に比較評価できるものはなかった。このことはTABの検査法が十分に普及していないことや企業からはこうした調査結果が公表されにくいことが考えられた。しかしながら、鈴木<sup>13)</sup>(1989年)や丹羽ら<sup>10)</sup>(1991年)あるいはYamazakiら<sup>14)</sup>(1996年)の報告にあるように、我国の果汁飲料においてもTABが分離されることは明らかである。

一方、諸外国では先に示したとおり、1984年のCernyらの報告<sup>2)</sup>をはじめ、1994年にアメリカで初めてSplittstoesserらが果汁からの分離例を報告している<sup>15)</sup>。また、TABの汚染状況調査では、Pettipherら<sup>11)</sup>がイギリス製の果汁飲料74試料について調査し、このうち加熱処理済みの56試料からはまったく分離されなかったものの、無処理の18試料中5試料(27.8%)からTABを分離している。また、アメリカ製のアップルジュースでは4試料すべてから、濃縮アップル果汁でも4試料中1試料から*A.acidoterrestris*を分離している。さらにEiroaらは、ブラジルの11企業から入手した濃縮オレンジ果汁75試料のうち11試料(14.7%)からTABが分離されたことを報告している<sup>12)</sup>。このようにTABは日本に限らず世界各地で分離されており、分離率も著者らの成績と同程度であった。このことは今回の調査で輸入品における分離状況を原産国別にみた場合、アジアをはじめ、ヨーロッパ、オセアニア、アメリカ、アフリカと世界各国に広く分布していたことを裏付けている。

以上のように、国産品9試料および輸入品19試料の合計28試料からTABが分離されたが、このうち問題となるグアイアコール産生株は輸入品の1試料で認めたとすぎず、予想外に少なかった。しかしな

がら、TAB汚染は大きな損害を招くことから監視体制の早期確立が重要であろう。

今回の分離状況を果汁に注目してみると、国産、輸入を問わず、ミックス果汁からの分離率が高かった。単品ではアップル、オレンジの他、グレープ、グレープフルーツ、パイナップル、マンゴー、グァバ、チェリー、ピーチ、ブルーベリーなど多種類の果汁からTABが分離された。これまでの報告では、アップル<sup>10,11)</sup>やオレンジ<sup>12)</sup>に関するものが多かったが、決してこれらの果汁に限られたものではないことがわかった。

製法別のTAB分離状況において、国産品でTABが分離されたものはすべて濃縮還元であった。また、輸入品でもTABが分離された19試料のうち10試料(52.6%)は濃縮還元であり、ストレートでは1試料(5.3%)から分離されたに過ぎなかった。このように、濃縮還元による製品がTABに汚染されやすい理由として製造過程での殺菌工程の相違によるものと考えられ、今後のTAB汚染防止対策には有用なデータであると思われる。また、包装容器別にみると、国産、輸入ともに紙パックが占める陽性率の割合が高く、前者では77.8%、後者では42.1%であった。TABの汚染対策に関連して果汁飲料中での本菌の動態や制御に関する検討が種々なされているが<sup>16)</sup>、このような包装容器にも十分に考慮する必要がある。

## 結 語

市販果汁飲料における耐熱性好酸性菌(TAB)の汚染状況を把握するために、国産果汁飲料および輸入果汁飲料について調査を実施した結果、国産試料では4.3%、輸入試料では11.7%からTABが分離された。輸入試料の原産国は特定の地域に限らず、広範囲の国々であった。また、アップルやオレンジだけでなく、多種類の果汁飲料からTABが分離された。特にTABが分離された試料では、国産、輸入を問わず、濃縮還元で紙パック包装されたものが多かった。このように、広範囲の市販品においてTAB汚染が確認されたため、今後はTABの防除対策を目的にTABの生態学的検討を行いたい。

## 文 献

- 1) ILSI Japan 食品安全研究部会微生物分科会：好熱性

- 好酸性菌—*Alicyclobacillus*属細菌—, 建帛社, 東京, 2004.
- 2) Cerny, G., Hennlich, W., and Poralla, K.: *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, 179, 224-227, 1984.
  - 3) Deinhard, G., et al.: *System. Appl. Microbiol.*, 10, 47-53, 1987.
  - 4) Wisotzkey, J.D., et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 263-269, 1992.
  - 5) Goto, K., et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 109-113, 2002.
  - 6) Hiroshige, M., et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1681-1685, 2002.
  - 7) Goto, K., et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1537-1544, 2003.
  - 8) 後藤慶一: 防菌防黴, 28, 499-508, 2000.
  - 9) (社)日本果汁協会: 果汁協会報, 3, 4-12, 2003.
  - 10) 丹羽源廣, 廣田裕子, 白須由治: 果汁協会報, 9, 31-42, 1991.
  - 11) Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., and Murphy, J.M.: *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 185-189, 1997.
  - 12) Eiroa, M.N.U., Junqueira, V.C.A., and Schmidt, F.L.: *J. Food Prot.*, 62, 883-886, 1999.
  - 13) 鈴木俊光: 食品と容器, 30, 503-506, 1989.
  - 14) Yamazaki, K., Teduka, H., and Shinano, H.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 543-545, 1996.
  - 15) Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., and Lee, C.Y.: *J. Food Prot.*, 57, 1080-1083, 1994.
  - 16) 山崎浩司: 食品のストレス環境と微生物—その挙動・制御と検出—, pp.110-119, (株)サイエンスフォーラム, 東京, 2004.