

平成28年11月29日
厚生労働省 薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会 食品規格部会 資料

豆腐中の微生物に関する試験検査

国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
朝倉 宏

背景

- 豆腐は、大豆を主原料とするため、土壌由来細菌の汚染を受ける可能性がある。
- 製造工程(特に加熱殺菌工程)においては、一定の微生物危害低減が図られるが、耐熱性の芽胞形成細菌(*Bacillus* spp.や*Clostridium* spp.)の制御には、概してより高い加熱条件が求められる。
- 米国では2006年、2012年に自家製発酵豆腐を原因食品とする食餌性ボツリヌス症が発生した他、英国でも2014年3月～5月に製造された充填豆腐製品については、ボツリヌス菌汚染危害が想定され、回収命令が出されている。

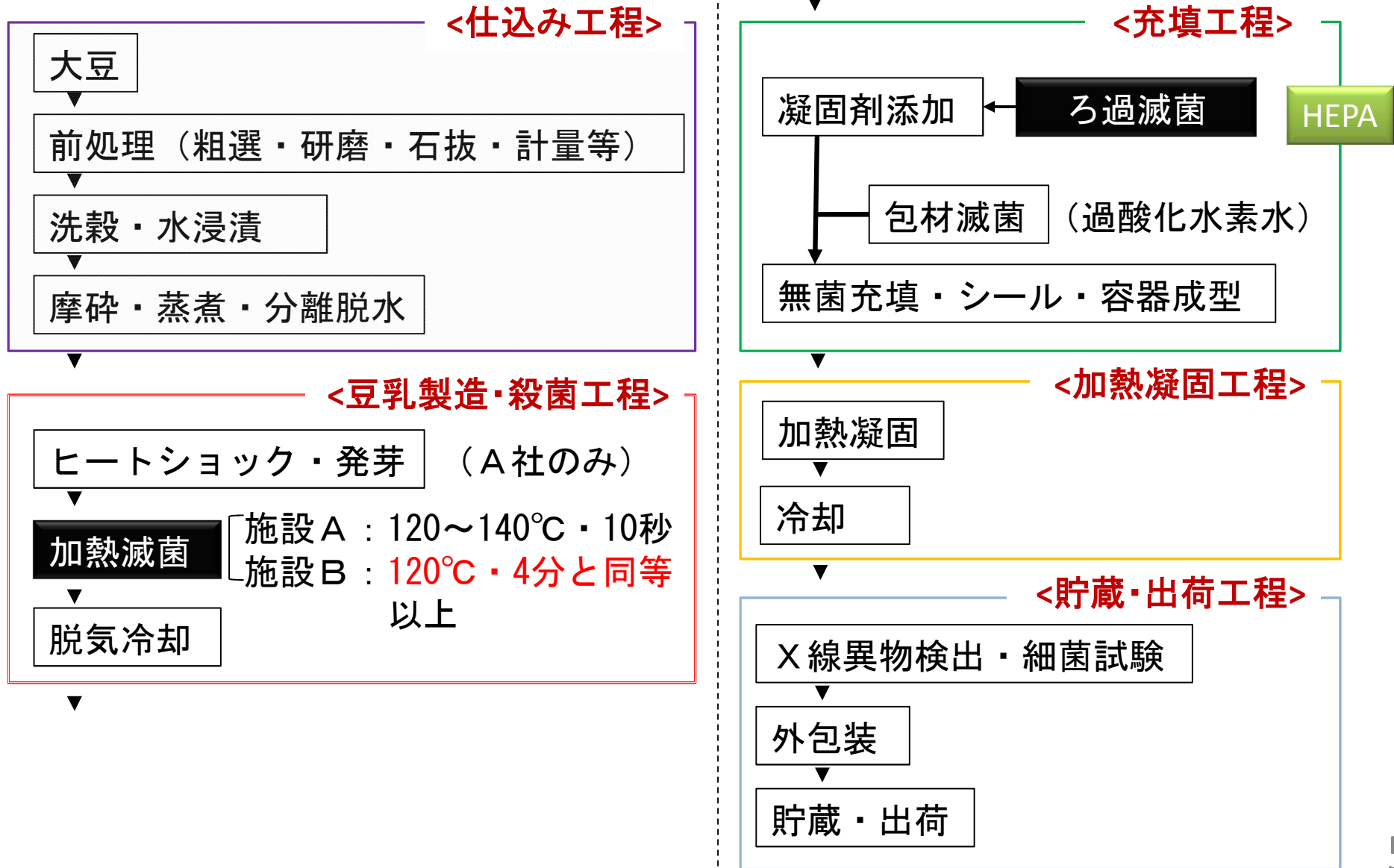
目的

- ・一般に流通する豆腐は、その製造実態から、無菌状態を保持することが事実上不可能とされ、製造後の保存状況によっては急激な細菌増殖も想定される。
- ・このため、食品衛生法第11条第1項の規定に基づく「食品、添加物等の規格基準」において、冷蔵で保存しなくてはならない旨の保存基準が定められている。
- ・今般、業界団体より、無菌充填技術等を用いた豆腐については、常温流通を認めてほしい旨の要望を受けた。
- ・当該製品の規格基準を検討するための基礎知見を得ることを目的として、微生物危害性に関する諸検討を行うこととした。

検討項目

- 無菌充填豆腐製品製造施設(2施設;以下、施設A及びB)の製造工程に関する情報、ならびに製造工程を通じた細菌汚染動態
- 無菌充填技術を用いずに製造された充填豆腐製品からの細菌汚染実態
- *Bacillus*属菌株及び*Clostridium sporogenes*代表株の無菌充填豆腐製品中における増殖挙動
- 上記菌株の耐熱性ならびに加熱条件
- 常温下での長期保存試験および微生物試験法

無菌充填豆腐の製造工程概要



無菌充填豆腐の製造工程を通じた 細菌汚染動態

		衛生指標菌数 (平均値・CFU/g)			
施設	検体	一般細菌	大腸菌群	好気性芽胞形成菌	嫌気性芽胞形成菌
A	原料大豆	7.9E+03	ND	3.5E+03	ND
	浸漬大豆	4.3E+06	ND	3.4E+05	ND
	加熱殺菌凝固前	ND	ND	ND	ND
	最終製品	ND	ND	ND	ND
B	原料大豆	8.2E+03	3.8E+03	9.1E+03	ND
	浸漬大豆	7.3E+04	2.5E+04	4.9E+04	ND
	加熱殺菌凝固前	1.3E-01	ND	1.3E-01	ND
	最終製品	ND	ND	ND	ND

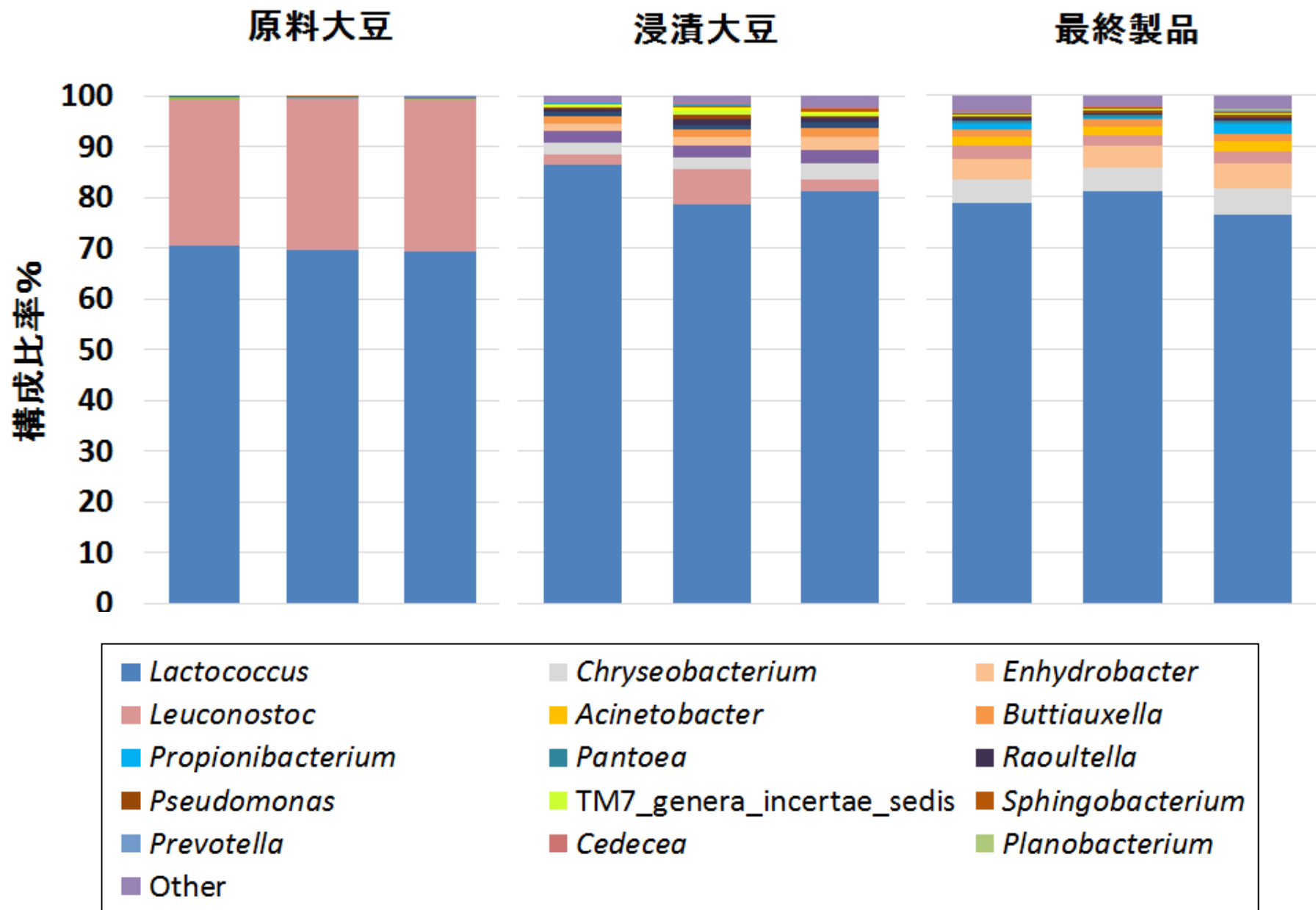
(ND, 検出されず)

無菌充填豆腐の製造環境における 細菌検出状況

施設	検体	衛生指標菌数(平均値・CFU/g)			
		一般細菌	大腸菌群	好気性 芽胞形成菌	嫌気性 芽胞形成菌
A	大豆秤量槽内壁	9.8E+01	ND	ND	ND
	大豆浸漬槽内壁	3.9E+05	4.0E+01	3.8E+05	1.5E+03
	床(豆乳製造・殺菌工程)	1.0E+05	ND	1.8E+05	ND
	床(充填工程)	1.2E+02	ND	6.0E+02	ND
B	大豆秤量槽内壁	7.0E+02	ND	2.0E+02	2.5E+00
	大豆浸漬槽内壁	2.7E+07	5.0E+05	9.4E+06	2.9E+04
	床(豆乳製造・殺菌工程)	1.1E+04	2.5E+01	5.2E+03	ND
	床(充填工程)	8.8E+03	5.0E+01	1.8E+03	ND

(ND, 検出されず) 7

無菌充填豆腐の製造工程(A社)における構成菌叢動態



無菌充填豆腐製品の細菌試験

- 施設A・Bは、主に一般細菌を対象とした自主検査を実施
- 各製品につき、計120検体を細菌試験に供試
 - 一般細菌は検出されず（混釈法、60検体）
 - 容器包装詰加圧加熱殺菌食品に対する
無菌試験にて、発育し得る微生物は陰性（60検体）
（好気性・嫌気性細菌の両者を対象に含む）

● 容器包装詰加圧加熱殺菌食品の規格基準

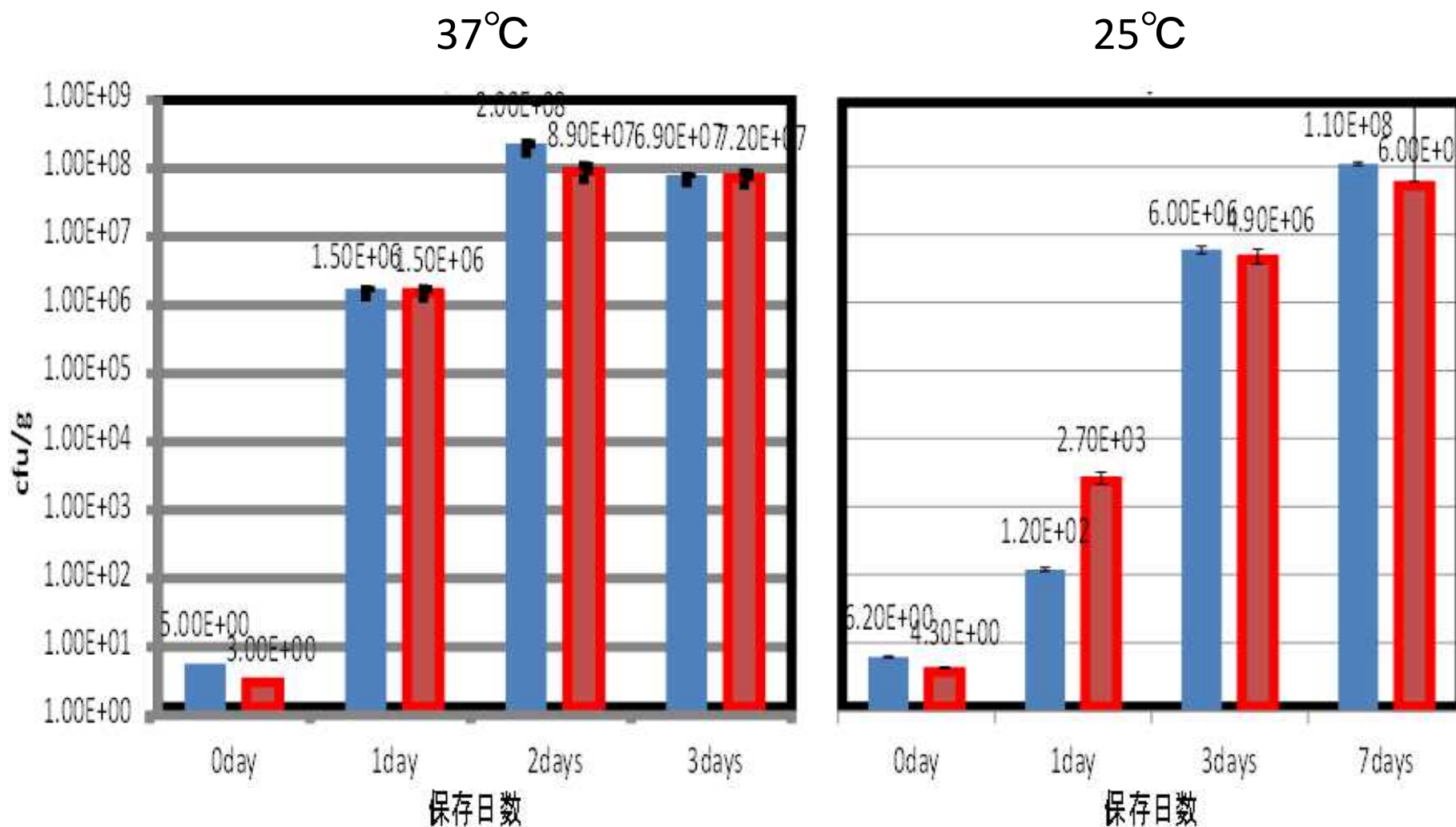
試験項目	操作概要	確認事項	対応
恒温試験	35℃で14日間保持	容器包装の膨張、内容物の漏えいの有無を確認	陰性の場合、細菌試験を実施
細菌試験	10倍乳剤をチオグリコール酸塩培養基にて、35℃で48時間培養する	培養基の肉眼観察により、細菌増殖の有無を確認	培養基のいずれかに細菌の増殖を認めたものを陽性とする。

無菌充填技術を用いず，一般的な方法により製造された 充填豆腐計8製品における細菌検出状況

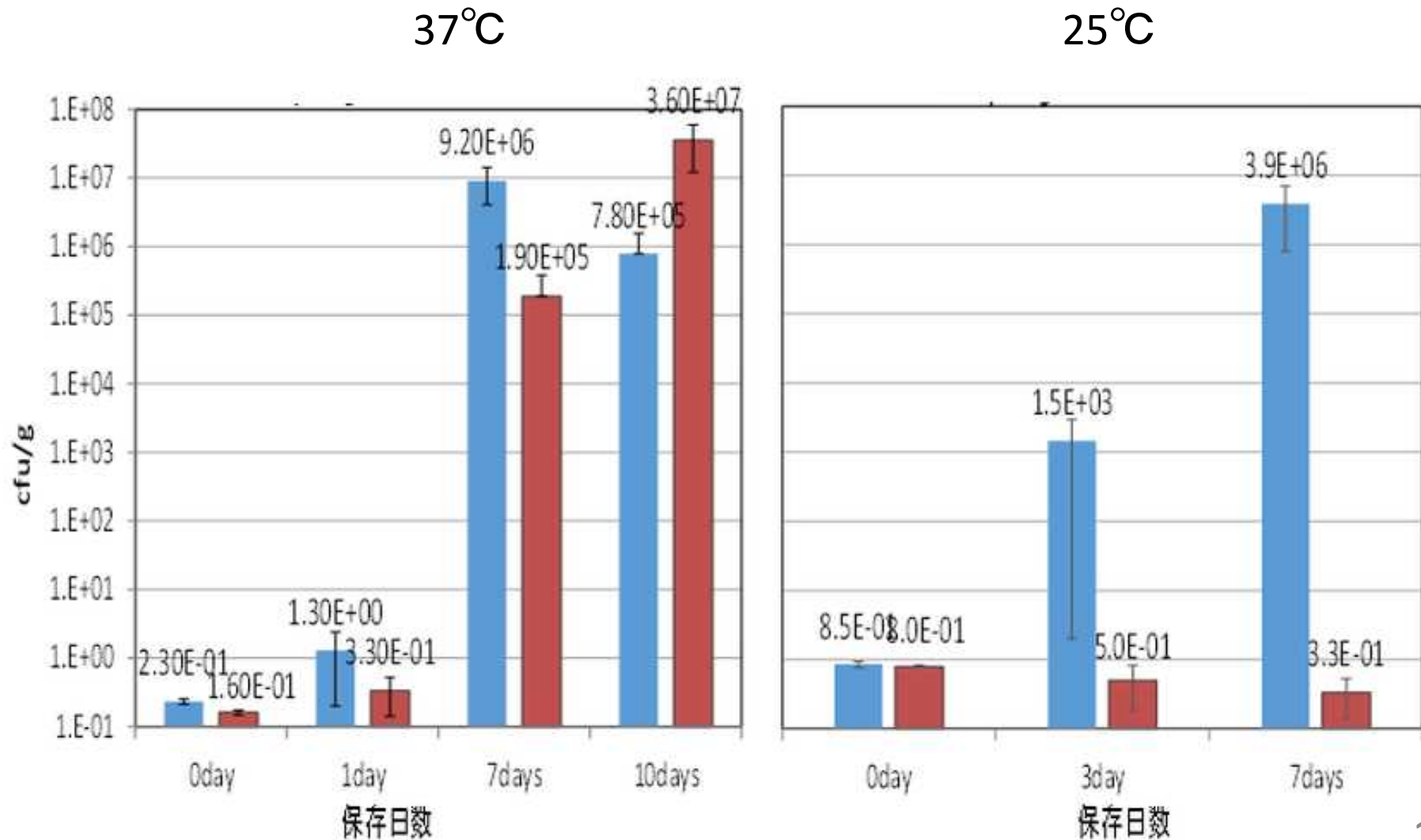
製品番号	理化学性状		検体番号	指標菌数(CFU/g, 混釈法による)				容器包装詰加圧加熱殺菌食品の規格基準			分離菌株 (16S rRNA配列による)
	pH	ORP (mV)		一般細菌	大腸菌群	好気性芽胞形成菌	嫌気性芽胞形成菌	恒温試験		細菌試験	
								膨張	保存日数		
A	6.3	7.5	1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
			2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
			3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
			4	0.6	<0.1	0.4	0.2	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
B	5.9	42.1	5	0.8	<0.1	0.4	0.4	+	9	+	<i>B. licheniformis</i>
			6	0.6	<0.1	0.6	0.2	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
			7	0.4	<0.1	0.2	<0.1	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
C	5.1	92.1	8	0.2	<0.1	0.2	<0.1	+	13	+	<i>B. coagulans</i>
			9	0.4	<0.1	0.2	0.2	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
			10	0.8	<0.1	0.6	0.2	-	-	-	<i>B. coagulans</i>
D	5.8	51.8	11	1.0	<0.1	0.8	0.4	+	9	+	<i>B. licheniformis</i>
			12	1.2	<0.1	1.0	0.4	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
			13	0.4	<0.1	0.2	0.2	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
E	5.7	53.2	14	0.2	<0.1	0.2	<0.1	+	12	+	<i>B. licheniformis</i>
			15	0.2	<0.1	0.2	0.2	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
			16	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
F	6.9	-12.7	17	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
			18	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
			19	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
G	6.8	-9.8	20	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
			21	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	-
			22	0.2	<0.1	0.2	<0.1	-	-	-	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
H	6.8	-10.0	23	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	+	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
			24	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-	-	-	<i>Brevibacillus borstelensis</i>

一般細菌および好気性芽胞形成菌については5製品・13検体が陽性

B. licheniformis #b-1株を用いた添加回収試験

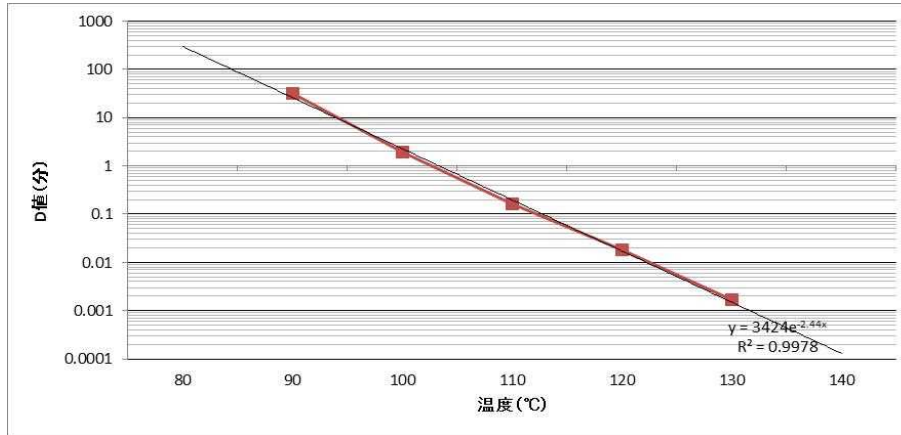


C. sporogenes #1073/1074株を用いた添加回収試験

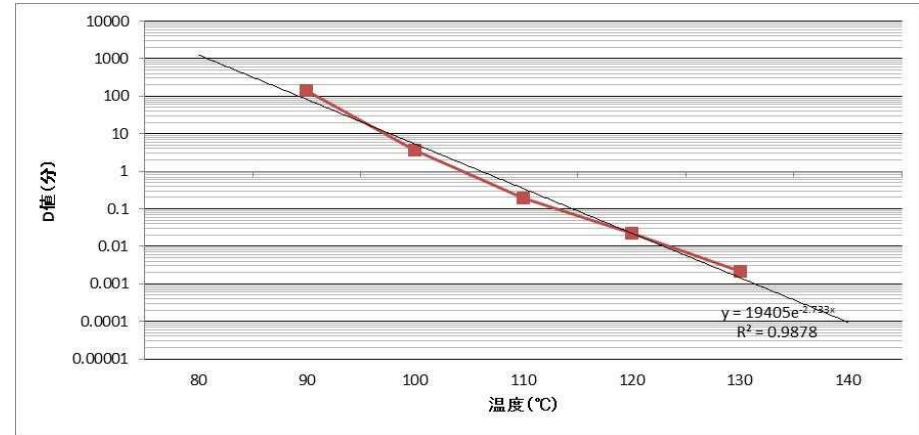


豆乳中における耐熱性試験(添加回収試験)

C. sporogenes #1074株芽胞



B. licheniformis #b-1株芽胞



D値: 90%死滅時間

Z値: D値の10倍の変化に対応する温度変化

供試菌株(芽胞)	D ₉₀	D ₁₀₀	D ₁₁₀	D ₁₂₀	D ₁₃₀	Z
<i>C. sporogenes</i> #1074	32.4分	1.9分	0.162分	0.0181分	0.0017分	9.07°C
<i>B. licheniformis</i> #b-1	143.9分	3.7分	0.197分	0.022分	0.0022分	6.98°C

F値: 主にレトルト食品の殺菌強度を規定するもので、121°C・1分をF値=1と定義。

国内のレトルト食品では、F=4以上(概ね120°C・4分以上)の殺菌強度が求められる。

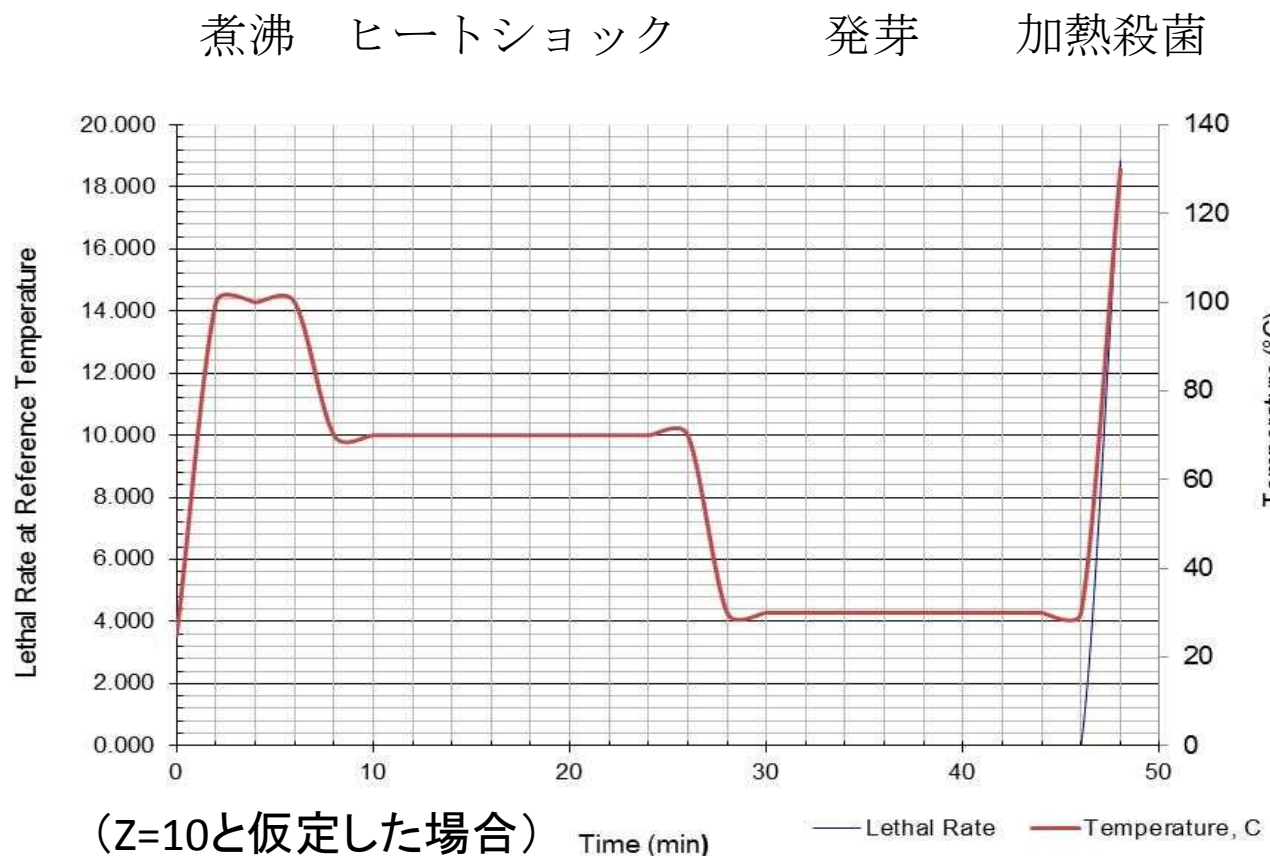
施設	加熱殺菌条件	<i>C. sporogenes</i>	<i>B. licheniformis</i>
A	120~140°C・10秒	0.95分	2.03分
B	120°C・4分と同等以上	18.38分	166.60分

T°Cでt分間加熱殺菌した時のF値は、以下の計算式により求められる。

$$F = t \times 10^{(T-120)/Z}$$

施設Aにおける製造工程の温度変化と殺菌効率予測

- 耐熱性試験成績より、A施設で用いられる加熱殺菌条件は、F=4に至らなかったが、同工程前に発芽促進のためのヒートショック処理等が設定されていた。
- 商業的殺菌では、加熱、冷却等に伴って温度が変化する。
- A施設の製造工程全般で用いられる加熱条件を踏まえ、致死率 L_i からF値を求めた。



$$L_i = \frac{1}{\log^{-1} \frac{Tr - T_i}{Z}}$$

T_i : 測定温度
 T_r : 加熱指標温度
 (約120°Cが汎用)
 T_i が一定の時を Δt
 Z : 10とすると、

$$F = \Delta t \sum_{i=1}^n L_i$$

F値は15.89分となり、
 120°C・4分間以上の
 殺菌効果を有す
 ると想定された。

施設A・Bで製造された無菌充填豆腐 製品の長期保存試験

- 各製品につき、120検体を供試
(A製品は6ヶ月、B製品は10ヶ月の賞味期限設定)
 - ⇒ 各1.1～1.2倍の期間、保存試験(25°C)を実施
 - ⇒ 一般細菌の検出試験(混釈法による)
 - ⇒ 容器包装詰加圧加熱殺菌食品の無菌試験
- 上記2法において、陽性検体は認められず
- 保存後の理化学性状にも顕変は認められず
(pHおよび酸化還元電位)

まとめ

- 無菌充填豆腐を製造する施設A・Bの製品については、製造工程を通じ、無菌状態を保持していることが実証された。
- 上記製品の殺菌条件は、施設間で異なっていたが、容器包装詰加圧殺菌食品で定められる120°C・4分間の製造基準と同等以上と考えられた。
- 当該製品の細菌試験にあたっては、嫌気性芽胞菌による汚染も考慮し、容器包装詰加圧加熱食品に対して定められる無菌試験を用いることが望ましいと考えられた。