

## レトルトパウチ食品からの変敗菌の分離とその孢子の耐熱性

岡崎 尚・角川幸治・米田達雄

### Heat-resistance of Spoilage Microbes Isolated from Retort Pouch Foods

Takashi OKAZAKI, Koji KAKUGAWA and Tatsuo YONEDA

Five microorganisms were isolated from the spoiling retort pouch products. Three of the microbes were identified as *Bacillus coagulans*. The other two were *Bacillus* sp. and *Clostridium* sp. The spores of these microbes had high heat-resistance, except for the spores of *Clostridium* sp. The highest D value in the three strains of *B. coagulans* isolated was 73.6 min at 110°C, whose value was considerably higher than the D values reported previously, and the D values of other strains were also not as low as the D values reported previously. Thus, it is thought that the cause of the spoilage in the products was insufficient sterilization. It was assumed that the spoilage of products was probably caused by heat-resistant spores derived from dried mushrooms.

加工食品の常温流通化およびボツリヌス菌に対する安全性などから、県内食品企業においてもレトルト殺菌装置の導入が進んだ。それに伴って当センターにレトルト食品の変敗相談が増加し、その原因や対策が急務となった。著者らは、変敗品から原因微生物を分離してその耐熱性および菌種を調べ、さらに、その原因微生物の由来を推定した。

### 実験方法

#### 1. 培地

PE-2培地<sup>1)</sup>：トリプトン (Difco) 5 g, 可溶性デンプン 1 g, 酵母エキス (日本製薬) 5 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.5g, 寒天 1.5g を蒸留水 1000ml で加熱溶解し、乾燥エンドウマメ 3 個を入れた試験管に、10ml 分注した。これを 121°C で 20 分間殺菌した。

Pea Infusion Agr 培地<sup>1)</sup> (PIA)：乾燥エンドウマメ 100g に水を 1000ml 加えて一夜浸漬後、100°C・60 分間煮沸した。ろ過後水を加えて 1000ml とし、これに Bacto Tryptone (Difco) 5 g, 可溶性デンプン 1 g, チオグリ

コール酸ナトリウム 0.5g, 寒天 20g を加え、加熱溶解し、pH7.0 に調整後、121°C・20 分間殺菌した。

ブドウ糖ブイヨン (GB)：Meat Extract (OXOID, 'LAB-LEMCO') 3 g, 酵母エキス 3 g, Bacto Peptone (Difco) 10g, ブドウ糖 5 g, 塩化ナトリウム 5 g を蒸留水 1000ml で加熱溶解し、pH7.0 に調整後、121°C で 15 分間殺菌した。

ブドウ糖寒天 (GA)：GB に寒天 20g を加えた。

GAM ブイヨン (GAM)：市販の日水製薬製のものを用いた。

#### 2. 菌の分離

変敗試料約 1 ml を PE-2 培地 2 本に無菌的に注入し、1 本を 35°C で、残りを 55°C で 7 日間培養した。発育を確認したものから、GA または PIA 平板培地に画線塗抹し、嫌氣的または好氣的に培養した。独立した集落を平板 1 枚当たり 3 個選び分離菌株とした。

#### 3. 分離菌の簡易同定

Bergy's Manual<sup>2)</sup>, 松田ら<sup>3)</sup>, 中條ら<sup>4)</sup>の方法に従って、同定した。

顕微鏡観察は、ノルマルスキー微分干渉顕微鏡（オリンパス、BH2-NIC）を用いた。

#### 4. 孢子の調製

GBまたはPE-2培地で前培養し、その1 mlを普通寒天培地（日水製薬）またはPIA培地上に塗抹し、35℃・5日間培養した。孢子の形成を確認後、集菌して水で洗浄し、1/15Mリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁して5℃で貯蔵した。

#### 5. 耐熱性試験

胞子液をGB、GAM培地または1/15Mリン酸緩衝液（pH7.0）で $10^5 \sim 10^7$ CFU/mlに希釈して、TDTチューブ（硬質ガラス製、内径6 mm、長さ100mm）に分注し、90～120℃で所定の時間加熱処理した。GBおよびGAM培地に懸濁した場合は、35℃・7日間培養した。リン酸緩衝液の場合は、各加熱条件における生残孢子数を測定し、各温度ごとの生残曲線の傾きからD値（菌数を1/10に減少させる時間）を求めた。また、D値と温度の関係（TDT曲線）からZ値（D値を1/10にするための温度変化）を計算した。

#### 6. 原材料中の耐熱性菌の測定

原料10gに滅菌希釈水90gを加えて、ストマッカーで1分間混合した。この液を100℃で20分間加熱処理後、生残菌数を測定して、原材料中の耐熱性菌数とした。

### 実験結果および考察

#### 1. 変敗品の性状

正常品と変敗品についてその性状（容器の形態、重量、

表1 試料の性状

No	試料	容器の状態	重量(g)	におい	粘性	pH	微生物*
1	正常品		250			6.2	—
	変敗品	Flat	250	正常	正常	6.2	桿菌
2	正常品		287			6.0	—
	変敗品	Flat	283	酸臭	低下	4.4	桿菌
3	正常品		490			6.3	—
	変敗品	Flat	483	異臭	正常	4.8	桿菌
4	正常品		1226			5.2	—
	変敗品	Flat	1218	異臭	低下	4.5	桿菌
5	正常品		1000			5.1	—
	変敗品	Soft swell	1000	糞便臭	正常	4.5	桿菌

\* 変敗品から直接顕微鏡で観察

におい、粘性、pH）を調べその結果を表1に示した。試料1～4の容器はいずれも膨張していなかった（Flat）。試料5の変敗品についてはやや膨張していた（Soft swell）。試料1では、変敗品と正常品には、容器の状態、臭い、粘性、pHなどに違いが認められなかった。試料2～4の変敗品はいずれも酸敗臭、異臭を感じた。pHはそれぞれ4.4、4.8、4.5であり、正常品（pH6.3～5.2）と比べて著しく低下していた。試料5の変敗品は、糞便臭およびガスが発生しており、pHは4.5に低下していた。

#### 2. 分離菌の形態

試料1～5の変敗品から分離した菌は、写真1に例示したとおり、いずれも桿菌であった。その中で、試料5の分離菌の形態は他の分離菌と比べて短かった。

#### 3. 分離菌の同定

分離菌の同定は、グラム染色、孢子の形成の有無、カゼイン分解等を調べると共に標準菌株を選定し、その合致性から同定した。試料1以外の変敗品はいずれもpH

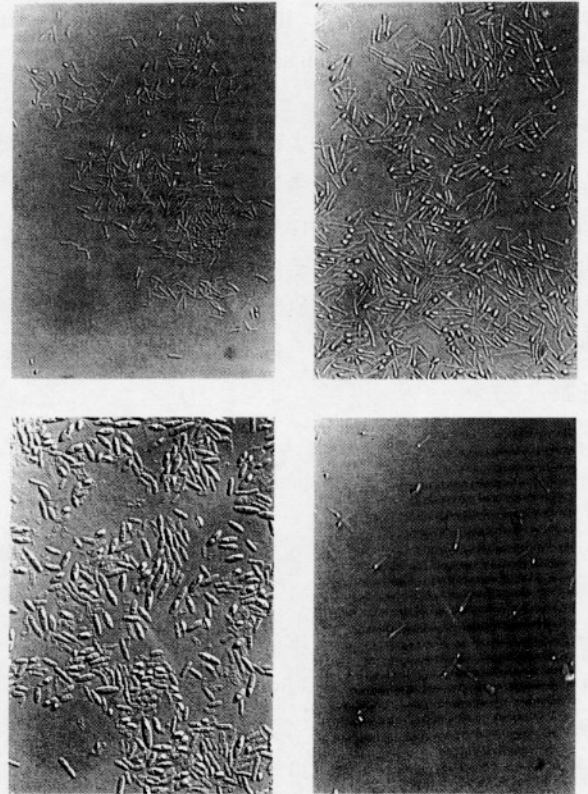


写真1 変敗食品から分離した微生物（×1000倍）  
試料番号1（上左）、同2（上右）、  
同5（下左）、標準菌*B.coagulans*（下右）

が低下し、ガスを発生しないので、フラットソー型変敗菌として知られている *Bacillus coagulans* (ATCC7050) を標準菌株として用いた。各試料から1株を選んで性状分析した結果を表2に示した。各試験項目における標準菌株との合致性から、試料2, 3および4の分離菌はいずれも *B.coagulans* と同定された。試料1の分離菌は、*B.coagulans* によく似ていたが、ブドウ糖からの酸生成およびデンプン分解性が非常に弱いこと、さらに、カゼインの分解性がわずかながら認められることから、*B.coagulans* の変異株、または別の種と推定された。また、試料5の分離菌は、ガス発生および胞子形成があること、好氣的に発育しないことなどから、*Clostridium* に属するものと推定された。

4. 分離菌胞子の耐熱性

分離菌胞子の耐熱性試験結果を表3に示した。各試料から2株を選んで試験した。試料1の分離菌胞子は、120℃で15分の加熱でも生残しており、強い耐熱性を示した。試料2~4の分離菌胞子については、120℃で5~10分の加熱で生残し、強い耐熱性が認められた。試料5の分離菌胞子は90℃・30分、95℃・20分で死滅し、

比較的耐熱性が弱かった。

特に強い耐熱性を示した分離菌(930901株と940902株の胞子)について、110℃~125℃の範囲でD値測定し表4に示した。このD値から求められたZ値を表4の右側に示した。*B.coagulans* と同定された940902株胞子(試料2)のD<sub>110℃</sub>値は73.6分となった。中條ら<sup>6)</sup>は食品およびその原料から*B.coagulans* を34株分離し、その中に、D<sub>110℃</sub>値が70分を越える耐熱性の強いものが数種存在することを報告している。また、本研究で用いた *B.coagulans* (ATCC7050) 胞子のD<sub>110℃</sub>値は13.9分であることから、分離株940902株の胞子は*B.coagulans* の中でも耐熱性がかなり強いことがわかる。さらに、未同定の930901株(試料1)の胞子のD<sub>110℃</sub>値も、37.7分であり、耐熱性が強いことがわかった。

変敗食品から分離した*B.coagulans* 胞子のZ値は、7.2~7.8℃と報告<sup>4)</sup>されているが、940902株胞子のZ値

表2 分離菌株の性状

試験項目	分 離 株					
	B.coagulans *1) (ATCC 7050)	930901	940901	950907	951012	951001
		(試料1)	(試料2)	(試料3)	(試料4)	(試料5)
細胞の形態	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌
グラム染色	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ活性	+	+	+	+	+	+
楕円形胞子	+	+	+	+	+	+
胞子形成部の膨張	-	-	V	V	V	-
胞子形成位置	V *3)	V	V	V	V	V
ブドウ糖から酸の生成	+	+w *4)	+	+	+	+
7%NaCl添加培地での発育	-	-	-	-	-	-
カゼインの分解	-	+w	-	-	-	-
デンプンの分解	+	+w	+	+	+	+
好氣的発育	+	+	+	+	+	-
嫌氣的発育	+	+	+	+	+	+
65℃での発育	-	-	-	-	-	-
TAA <sup>2)</sup> 培地での発育	+	+	+	+	+	+

\* 1) 標準菌株  
\* 2) TAA: Thermoacidurans 寒天培地  
\* 3) V: 株変異性  
\* 4) w: 弱陽性

表3 分離菌の耐熱性結果 \*1)

試料 No	分離菌株	初発胞子数 (/チューブ)	115℃				120℃				
			10	20	30	40	5	10	15	20 <sup>(min)</sup>	
1	930901	2.0 × 10 <sup>6</sup>	+*2)	+	+	+	+	+	+	+	-
	930902	2.0 × 10 <sup>6</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2	940901	1.0 × 10 <sup>6</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	940902	8.4 × 10 <sup>5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	950907	1.2 × 10 <sup>6</sup>	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	950908	8.4 × 10 <sup>5</sup>	+	+	+	-	+	-	-	-	-
4	951012	4.7 × 10 <sup>5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	951020	8.7 × 10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			90℃				95℃				
			20	30	40		20	30	40	(min)	
5	951001	2.1 × 10 <sup>5</sup>	+	-	-		-	-	-		
	951002	1.4 × 10 <sup>6</sup>	+	-	-		-	-	-		

\* 1) 培養条件: 40℃・8日間  
\* 2) +: 発育陽性, -: 発育陰性

表4 分離菌胞子のD値およびZ値

試料No	菌株No	加熱温度(℃)	D値(分)	Z値(℃)
1	930901	110	37.7	8.5
		115	19.9	
		120	3.8	
		125	0.73	
2	940902	110	73.6	7.3
		115	12.3	
		120	3.2	

(7.3℃)もこの範囲内にあった。レトルト食品の加熱殺菌条件の目安として用いられている $F_0$ 値(121℃の時の加熱致死時間)は、 $Z=10$ ℃として計算されている。したがって、本分離菌のように $Z$ 値が小さいとき、殺菌不足を招く恐れがある<sup>4)</sup>。

また、レトルト殺菌条件は、対象食品へ実際に混入する可能性のある微生物およびその胞子の耐熱性の試験結果から計算するのが望ましいとされている。この場合、加熱殺菌時間の設定は安全性を考慮して $D$ 値の5倍とされているので、120℃で殺菌する場合、930901株胞子は19分、940902株胞子は16分が加熱殺菌時間となる。一般に、耐熱性変敗菌を対象とした殺菌条件は、 $F_0=7\sim 8$ 分とされており、これに従うだけでは本菌株が混入したとき、明らかに殺菌不足となる。

以上のことから、試料1および2においては、 $F_{120}$ ℃( $Z=7\sim 8$ ℃)=20分とする加熱殺菌時間が必要である。

## 5. 原材料中の耐熱性菌数

フラットソー型変敗を生じた製品に使われた原材料の耐熱性菌数を、表5に示した。乾燥シイタケは $1.1 \times 10^3 \sim 3.5 \times 10^3$ 胞子/g、乾燥キクラゲは $2.5 \times 10^3$ 胞子/gであった。これらの原材料が製品当たり1%添加されたとき、製品100g中の耐熱性菌数はおよそ $10^3$ オーダーと計算される。さらに、業務用1kg詰製品または配合率10%以上のような場合、最終製品への耐熱性菌の移行は著大である。また、表5に示した原材料以外に、耐熱

表5 変敗原因と推定される原料の耐熱性菌数\*<sup>1)</sup>

試料No	原料	CFU/g	配合率(%)	移行菌数* <sup>2)</sup>
1	乾燥キクラゲ	$2.5 \times 10^3$	—* <sup>3)</sup>	
2	乾燥シイタケ	$1.1 \times 10^3$	0.7	$7.7 \times 10^2$
4	乾燥シイタケ	$3.5 \times 10^3$	10	$3.5 \times 10^5$

\*1) 原料を100℃・20分間処理後の発育集落数

\*2) 最終製品中に移行する耐熱性菌の数

性菌に汚染されている可能性の高いもの(土壌が付着し易い原材料)についても、あらかじめ菌数を測定し、製品中への菌種および菌数の移行量を把握しておくことも殺菌条件決定の上から重要となる。

本報告で示した耐熱性の強い菌を殺菌するために、120℃で20分以上のような加熱殺菌条件を適用するとき、食品の品質が著しく低下する。したがって、原材料の微生物管理や耐熱性菌が最終製品に混入しない手段を講じることが重要である。

## 要 約

変敗したレトルトパウチ食品から変敗菌を分離し、同定を行った。その結果、*Bacillus coagulans*による変敗が3件あった。また、菌が増殖したにもかかわらず製品の品質変化が官能的に認められないものもあった。この原因菌は*Bacillus*に属した。これらの菌は、いずれも耐熱性が強かった。次に、ガスを発生し糞便臭を伴った変敗では、*Clostridium*属の菌が分離された。変敗した5品目中3品目について、乾燥キノコに付着した耐熱性菌が製品中に移行したためと推定された。

## 文 献

- 1) Hersom, A.C., Hulland, E.D.: *Canned Foods 5th ed.* (J.A.Churchill Ltd., London) p.323 (1963).
- 2) Peter H.A.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2*, P.1104 (1986).
- 3) 松田典彦・駒木勝・市川良子: 日食工誌, **32**, 399 (1985).
- 4) 中條均紀・石津弥生: 日食工誌, **32**, 725 (1985).
- 5) 相磯和嘉監修: 食品微生物学(医歯薬出版(株), 東京), p.208 (1976).
- 6) 中條均紀・森山裕子: 日食工誌, **38**, 211 (1991).