

缶入り酸性食品からの変敗原因菌の分離とその性状

石原理子, 渡邊弥生, 青山康司

Characterization of bacterium isolated from spoiled canned acid food

Masako Ishihara, Yayoi Watanabe and Yasushi Aoyama

A food deterioration-causing organism was isolated from spoiled and swelled canned acid food. The organism could not grow under aerobic conditions, and produced gas with butyric acid odor and heat-resistant spore. The bacterium was identified as *Clostridium pasteurianum* by 16S rDNA analysis. Heat resistant tests of spores of the isolated bacterium showed that the D values were 18.3 minutes at pH7.0 and 10.4 minutes at pH4.0 at 95°C. Although the vegetative cells grew at pH3.8, their spores could not grow at pH 4.5 or below. We assume that the cause of this spoilage might be some stimulation that triggers germination and growth of the heat-resistant spores.

一般的に、pH4.6以上の食品を「低酸性食品 (Low-acid food)」、pH4.6未満の食品を「酸性食品 (Acid food)」と呼び区別される。容器詰食品を常温流通する場合、低酸性食品はボツリヌス菌の耐熱性を基に120°C・4分同等以上の殺菌 (レトルト殺菌) が食品衛生法で義務づけられている¹⁾。一方酸性食品では、ボツリヌス菌を含め多くの芽胞菌は発育不能であり、発育可能な菌種であっても酸性下では耐熱性が低いため、pH4.0以上4.6未満では85°C・30分、pH4.0未満では65°C・60分と同等以上殺菌が一般的に行われている。しかしながら、稀に酸性食品においても芽胞菌による変敗事故は起きている²⁾。

今回、pH3.8の野菜を原料とした缶入り酸性食品において、変敗による膨張事例が見つかった。著者らは、変敗品から原因微生物を分離して、菌の性状および分子生物学的手法を用いて菌種を推定した。また、分離菌の芽胞の耐熱性および分離菌とその芽胞の発育とpHの関係を調べ、それらの結果から変敗の原因を推察した。

材料および方法

1. 培地の調製

(1) 肝片加肝臓ブイヨン (肝々ブイヨン)

新鮮な牛肝臓500gを3~4cmに角切りし、脱イオン水1L中に投入し、沸騰してから1時間加熱した。これを2枚重ねたガーゼで濾過し、濾液を得た。肝臓片は水洗後、約5mmのさいの目に切った。濾液1Lに、ペプトン10g、酵母エキス3g、可溶性デンプン1g、グルコース5g、リン酸水素二カリウム1g、チオグリコール酸ナトリウム0.5gを加え、加温溶解した。pHは0.1N塩酸を用い、7.8に調整した。ねじ口試験管 (直径18mm, 長さ160mm) に肝臓片4~5個を投入し、上記の液10mlを加えた。これを121°Cで

15分間殺菌した。

(2) 肝々ブイヨン寒天培地

肝臓片を除いた肝々ブイヨン100mlに、寒天末1.5gを加えた。

(3) GAMブイヨンおよび寒天培地

日水製薬製を用いた。寒天培地は、GAMブイヨン培地1Lに寒天末20gを添加した。

(4) PE-2培地³⁾

トリプトン5g, 可溶性デンプン1g, 酵母エキス5g, チオグリコール酸ナトリウム0.5g, 寒天末1.5gを蒸留水1Lで加温溶解したものを、乾燥エンドウマメ3個を入れたねじ口試験管 (直径18mm, 長さ160mm) に10ml分注した。これを121°Cで20分間殺菌した。

(5) ピーインフュージョンおよび寒天培地³⁾

乾燥エンドウマメ50gを蒸留水1L中に投入し、沸騰してから1時間加熱した。これを2枚重ねたガーゼで濾過し、濾液を得た。濾液1Lに、トリプトン5g, 可溶性デンプン1g, 酵母エキス5g, チオグリコール酸ナトリウム0.5gを加え、121°Cで15分間殺菌した。

寒天培地は、ピーインフュージョン培地1Lに寒天末20gを添加した。

(6) GCA培地⁴⁾

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を脱イオン水800mlに溶解した。これに塩類溶液 (塩化カルシウム・2水塩1g, 硫酸アンモニウム10g, 硫酸マグネシウム・7水塩1g, 硫酸マンガン・1水塩1g, 硫酸亜鉛・7水塩0.05g, 硫酸銅・5水塩0.05g, 硫酸第一鉄・7水塩0.005gおよび硫酸モリブデン0.01g) を脱イオン水100mlに溶解、冷暗所に保存) 100mlを加え、pHを7.0に調整した。これを広口びんに180mlずつ分注し、121°Cで15分間

殺菌した。使用時に、濾過滅菌した10%L-アラビノース溶液20mlを無菌的に加えた。

(7) ハートインフュージョン培地

牛の心臓約460gをミンチにし、蒸留水1Lを加えて1時間煮沸した。これをガーゼと脱脂綿で濾過し、濾液を得た。濾液1Lに、トリプトン10g、ゼラチン10g、グルコース0.5g、リン酸水素二カリウム4g、クエン酸ナトリウム3g、スキムミルク15gを加え、加温溶解した。5%水酸化ナトリウムでpHを8.5に調整した。広口瓶に液量の1/3量のミンチを入れ、培地180mlを加えた。121°Cで15分間殺菌した。

(8) サツマイモ培地

サツマイモ120gを蒸留水500mlに投入し、沸騰してから1時間加熱した。これをジューサーで粉碎後、1Lに定容した。クエン酸を用いてpHを調整し、30分間煮沸殺菌した。pHを調整しなかったものは、121°C、15分間殺菌した。

2. 菌の分離

変敗試料4mlを肝々ブイヨン、GAMブイヨンおよびPE-2培地10ml5本に無菌的に加え、35°Cで6日間増菌培養した。発育を確認したものを肝々ブイヨン寒天培地に画線塗抹し、35°Cで嫌気培養し、独立集落を得た。

3. 芽胞懸濁液の調製

芽胞形成用培地としてGCA培地、ハートインフュージョン培地およびピーインフュージョン寒天培地を用いた。肝々ブイヨンで前培養した培養液20mlをGCA培地およびハートインフュージョン培地に加え、35°Cで培養した。ピーインフュージョン寒天培地に肝々ブイヨンで前培養した培養液を塗抹し、35°Cで嫌気培養した。芽胞の形成を確認後集菌し、滅菌した1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄後、懸濁して芽胞懸濁液とした。芽胞懸濁液は使用時まで4°Cで貯蔵した。

4. 耐熱性試験

芽胞懸濁液を1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)およびMcIlvaine緩衝液(pH4.0)におよそ 10^5 cfu/mlになるように加え、よく攪拌混合した。TDTチューブ(硬質ガラス製、内径6mm、長さ100mm)に1.5mlずつ無菌的に分注し溶封した。90~105°Cで所定の時間加熱処理後、水中で急冷した。加熱した芽胞懸濁液をピーインフュージョン寒天培地に混合し、35°C、3日間嫌氣的に培養した。各加熱条件における生残芽胞数を測定し、各温度ごとの生残曲線の傾きからD値(芽胞数を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)を求めた。

5. pH発育試験

塩酸を用いてpHを2.6から4.5に調整後高圧滅菌した肝々ブイヨンおよびピーインフュージョン培地をそれぞれ2本ずつ調製した。これらに肝々ブイヨンで前培養した培養液

1mlを添加し、35°Cで培養した。

クエン酸を用いてpHを3.6, 3.8, 4.0, 4.4に調整したサツマイモ培地にピーインフュージョンで前培養した培養液1mlまたは芽胞懸濁液0.1mlを添加し、30°Cで培養した。

6. 菌種の同定

分離菌株の独立集落から、1白金耳量の菌体を採取し、ISOIL for Beads Beating(ニッポン・ジーン)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型とし、16S rDNAのV3-5領域を標的として341F(5'-CCTACGGGAG-GCAGCAG-3')と907R(5'-CCGTCGAATTC-CTTTRAGTTT-3')をプライマーとし*TaKaRa Ex Taq^R*(タカラバイオ株)を用いて増幅した。PCR反応はタカラサーマルサイクラーTP3000(タカラバイオ株)を用い、第1ステップとして94°C・2分間インキュベートした後、第2ステップは94°C・30秒間、56°C・30秒間、72°C・1分間という反応を30サイクル繰り返した。第3ステップは、72°C・7分間インキュベートした。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)で精製した後、341Fプライマーを用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応はBig Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit(Applied Biosystems)にて行い、ABI PRISM 310システム(Applied Biosystems)にて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、日本DNAデータバンクで公開されているBLASTサーチを用いて同定を行った。

実験結果

1. 変敗品の性状

変敗品の外観は容器が著しく膨張していた。開封したところ、酪酸臭およびガスが発生しており、内容物の一部は凝集していた。

2. 変敗菌の分離および芽胞の形成

変敗試料を肝々ブイヨン、GAMブイヨンおよびPE-2培地に加え、35°Cで培養した結果、肝々ブイヨンにおいて5本中3本、GAMブイヨンにおいて5本中2本で菌の発育が観察された。PE-2培地では5本とも菌の発育が確認できなかった。変敗試料を培地に添加して菌の発育を観察するためには、6日間程度の培養が必要であった。

独立集落を得るため、増菌培養した液を肝々ブイヨン寒天培地およびGAMブイヨン寒天培地に画線塗抹し、嫌気培養を行ったところ、GAMブイヨン寒天培地では菌の発育は見られなかったが、肝々ブイヨン寒天培地で独立集落が得られた。

次に、芽胞形成用培地の検討を行った。芽胞形成用培地として用いた培地のうち、GCA培地、およびピーインフュージョン寒天培地で芽胞の形成が確認された。GCA培地では菌の発育が遅く、芽胞の形成を確認するまでに14日程度を要した。また、GCA培地で取得した芽胞の量も少なかったため、分離菌の芽胞の形成には、7日間程度で

耐熱性試験を行うのに十分な量の芽胞を形成したピーインフュージョン寒天培地が適していた。

3. 分離菌の同定

変敗品から分離した菌を写真1に示す。分離菌は嫌気条件下では発育するが、好気条件下では発育しない桿菌であり、準端部に芽胞を形成した。グラム染色を行ったところ陽性を示した。また、可燃性のガスが旺盛に発生した。これらの特徴から、分離菌は *Clostridium* に属すると推定された。

さらに、分子生物学的手法を用い、菌種の同定を行ったところ、分離菌は16SrDNA の V3-5領域において *Clostridium pasteurianum* と最も相関性が高く99%一致した。

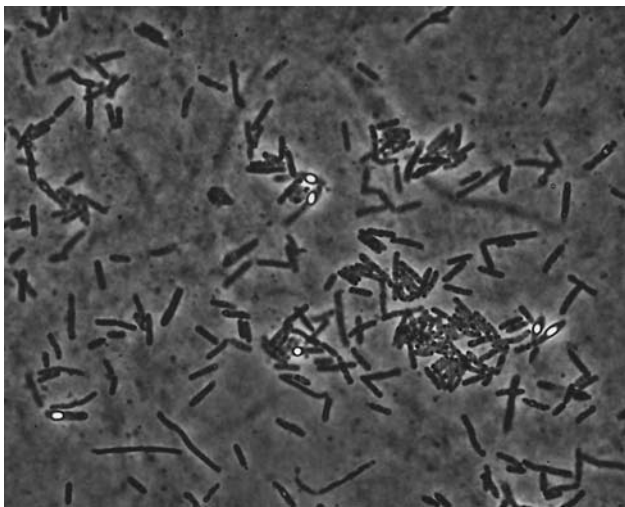


写真1 変敗品から分離した微生物

4. 分離菌芽胞の耐熱性

分離菌芽胞のリン酸緩衝液 (pH7.0) 中での生残曲線を図1に示し、McIlvaine 緩衝液 (pH4.0) 中での生残曲線を図2に示した。90℃~105℃の範囲で測定したD値およびz値を表1に示した。

pH7.0における $D_{95^\circ\text{C}}$ 値は18.3分、pH4.0における $D_{95^\circ\text{C}}$ 値は10.4分であることから、分離菌芽胞は中性下と比べ酸性条件下で耐熱性が低下していた。

5. 分離菌の pH 発育試験

分離菌の生育可能 pH 領域を調べるため、*Clostridium* 属の増殖に適している肝タピオンおよびピーインフュージョン培地の pH を変化させたところ、酸性領域において培地に含まれるタンパク質の等電点による沈殿が観察された。そのため、これらの培地は分離菌の発育 pH 領域の正確な判定には不適であった。

サツマイモを用いた培地は、等電点付近に pH を変化させてもタンパク質の沈殿がみられず、菌の増殖の確認も容易であった。サツマイモ培地に前培養した培養液 (栄養細胞) を添加したところ、pH3.8に調整した培地では菌の発

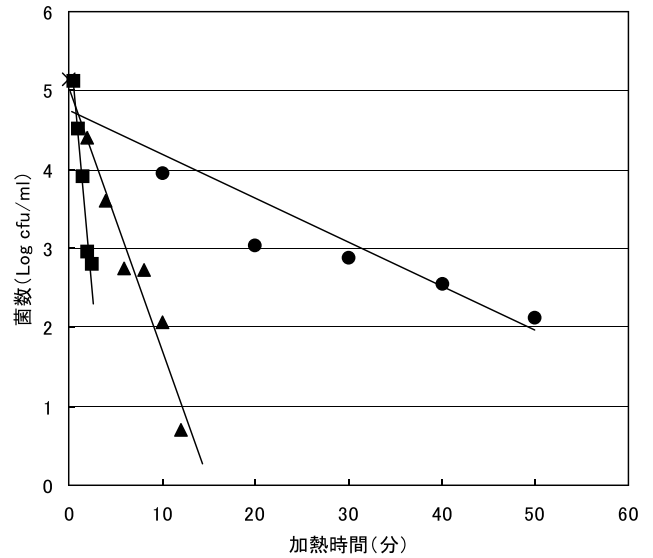


図1 分離菌胞子の pH7.0における生残曲線
初発菌数, ×; 加熱温度 ●, 95℃; ▲, 100℃; ■, 105℃

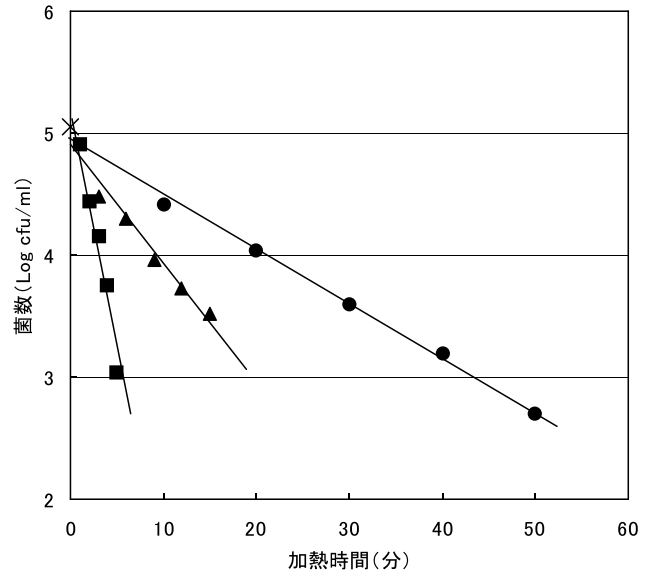


図2 分離菌胞子の pH4.0における生残曲線
初発菌数, ×; 加熱温度 ●, 90℃; ▲, 95℃; ■, 100℃

表1 分離菌胞子の D 値および z 値

加熱媒体	加熱温度(℃)	D 値 (分)	z 値 (℃)
リン酸緩衝液 (pH7.0)	95	18.3	7.1
	100	3.3	
	105	0.7	
McIlvaine緩衝液(pH4.0)	90	23.6	9.7
	95	10.4	
	100	2.4	

育が観察されたが、pH3.6では菌の発育はみられなかった。また、芽胞懸濁液を用いて同様の試験を行ったが、今回設定した試験条件の pH4.5以下では菌の発育は観察されなかった。

考 察

菌の分離および同定によって、変敗原因菌は *C. pasteurianum* であると推定された。*C. pasteurianum* は、芽胞を形成する偏性嫌気性菌であり、果実、果汁および菓子の容器詰食品の変敗原因菌として知られている⁵⁾。容器詰食品の変敗原因菌となる有芽胞細菌の多くは、pH4.5以下では発育しないが、*C. pasteurianum* は pH3.7以上で生育することが可能であるとされている⁶⁾。池上らは *C. pasteurianum* 芽胞 (10⁵個) を接種したミカン缶詰 (pH4.42~3.67) の保存試験において、pHを3.90~3.97に調整した試料の膨張率は33%で膨張の開始時期は遅れるが、膨張を完全に抑制するには pHを3.75以下にする必要があることを報告している⁷⁾。特殊な例として、pH3.5のみつ豆缶詰において *C. pasteurianum* による変敗事故が発生した事例がある²⁾。このとき赤エンドウ豆を除去したときには pH4.0未満の製品中では発育しなかったが、赤エンドウ豆が入った製品中では pH3.3以上で発育したと報告されている²⁾。

今回の pH 発育試験の結果において、分離菌の芽胞は pH4.5以下のどの試験区でも発育が見られなかったが、栄養細胞は pH3.8まで発育し、pH3.6では発育が見られなかった。これらの結果から、変敗品から分離した菌の発育特性は、これまで報告されている *C. pasteurianum* の特徴に類似しているといえる。

変敗した食品 (正常品 pH3.8) は、中心温度90℃・30分間程度の殺菌が行われているが、耐熱性試験の結果、分離菌芽胞の pH4.0の D_{90℃}値は23.6分あることから、殺菌後残存したと考えられる。完全に殺菌するには D 値の5倍以上の加熱が必要とされている¹⁾。

分離菌の発育特性および耐熱性試験の結果から、本変敗事例は、加熱殺菌後残存した芽胞が何らかの刺激で発芽および増殖したことが原因と考えられる。分離菌による変敗

を防止するためには、製品の pHを3.7未満にすること⁶⁾、加熱殺菌温度の上昇および処理時間を延長させることが考えられる。高温条件下での殺菌は着色により製品の品質を著しく低下させることから、原材料の微生物管理と製品の pHを管理することがより重要である。

要 約

変敗した缶入り酸性食品から変敗菌を分離した。変敗菌は好気条件下では発育せず、ガス発生および芽胞の形成が観察された。分子生物学的手法を用いた同定を行った結果、*Clostridium pasteurianum* と推定された。分離菌芽胞の耐熱性試験を行った結果、pH4.0における D_{95℃}値は10.4分であり酸性下で強い耐熱性を示した。また、栄養細胞は pH3.8での発育が観察されたが、芽胞は pH4.5以下で増殖しなかった。本変敗事例は、加熱殺菌後残存した芽胞が何らかの刺激で発芽および増殖したことが原因と考えられた。

文 献

- 1) 松田典彦, 藤原忠, 容器詰食品の加熱殺菌, 第3版 (日本缶詰協会, 東京), pp.3-17 (2006).
- 2) 松田典彦, 駒木勝, 市川良子, 後藤幸恵, 缶詰食品の変敗原因有芽胞細菌の種と食品の種類の関係, 日食工誌, **32**, pp.615-621 (1985).
- 3) Herson, A.C., Hulleand, E.D., Canned Foods 5th ed. (J.A.Churchill Ltd., London), pp.323 (1963).
- 4) 駒木勝, 市川良子, 松田典彦, *Clostridium thermosaccharolyticum* の芽胞形成用培地, 缶詰時報, **78**, pp.990-997 (1991).
- 5) 松田典彦, 新製品開発における微生物学, その制御および無菌試験法, 缶詰時報, **69**, pp.202-209 (1990).
- 6) 宇田川俊一, 微生物汚染事例・現場検査法 Q&A 集, (サイエンスフォーラム, 東京), pp.160-161 (2003).
- 7) 池上義昭, 岡屋忠治, 沢山善二郎, 下田吉夫, 森大蔵, 奥正和, フルーツ缶詰の酪酸菌による膨張防止に関する研究, 第1報 みかん缶詰について, 缶詰時報, **49**, pp.993-996 (1970).