

耐熱性芽胞菌による菓子変敗の防止に関する研究 - 芽胞の熱損傷促進物質の検索 -

鬼頭幸男*¹ 間瀬雅子*¹ 長谷川撰*¹ 藤井正人*¹

Studies on The Prevention of Confectionery Spoilage by Heat-resistant Sporeforming Bacteria

- A Search of Heat Damage Promotion Materials for Bacterial Spores -

Yukio KITO, Masako MASE, Osamu HASEGAWA, Masato FUJII

Food Research Center, AITEC *¹

B. subtilis の基準培養株 IFO13719 株、ATCC6633 株、いろいろ離水変敗品から分離、同定した *B. subtilis* SU-3 株を芽胞の熱損傷試験に用いた。平板法により種々のタイプの熱損傷芽胞を検出するための選択培地をいくつか考案した。非選択培地としては標準寒天培地が適していた。熱損傷の感受性要因を区別できないが、損傷促進を示す成分を平板法より迅速に検出できる濁度法を用いて、pH7 緩衝液中における芽胞の熱損傷促進物質をスクリーニングした。その結果、酢酸及びプロピオン酸に効果が認められた。

1. はじめに

水ようかんやいろいろなどの和生菓子の 100 以下での加熱殺菌では、耐熱性のバチルス属芽胞が残存し、密封製品の離水、変敗の原因となる事が多い¹⁾²⁾。しかし耐熱性芽胞菌の殺菌を達成できるレトルト殺菌は嗜好性を重視した製品づくりを目指す上で問題となる。そこで和生菓子製造工程で「加熱処理により芽胞を活性化後、同調発芽させ、増殖を開始する前に殺菌を行う製造法」あるいは「常圧加熱条件で残存する芽胞の熱損傷を促進するとともに熱損傷の回復を抑制する、すなわち芽胞を完全殺菌できなくても食品中での増殖を顕著に遅延させることができる製造法」を確立できれば、常圧加熱殺菌による製品変敗の減少に結びつくのみならず、消費者の嗜好にあった製品開発が容易となる。前者の方法はいろいろの製造で一部の企業に採用されているが、二回目の蒸し工程の前に積極的な同調発芽の制御はしていない。

本研究では、100 以下の加熱で *B. subtilis* 胞子の熱損傷促進を示す成分を、食品原材料から検索することを目的として、平板法（コロニーカウント法）による各種の熱損傷芽胞の検出法や芽胞の熱損傷促進効果を有する成分の一次スクリーニングのための迅速検出法について

検討するとともに、食品添加物や食品素材の一部について効果をスクリーニングした。

2. 実験方法

2.1 使用菌株及び培養条件

損傷芽胞の検出及び熱損傷促進成分のスクリーニングには *B. subtilis* IFO13719 (基準培養株)、*B. subtilis* ATCC6633 及び次項のようにして分離した変敗原因菌のうち最も耐熱性のある株を使用した。菌や芽胞の希釈水には滅菌リン酸緩衝食塩水を用いた。混釈平板培養法においては同種培地を重層した。培地の滅菌は 121、15 分間、培養温度は 30 で行った。

2.2 変敗原因菌の分離、同定及び耐熱性

離水やひび割れを生じたいろいろ（ケーシング詰結紮品）や水ようかん（プラスチックカップ詰）の変敗原因菌は沸騰水 10 分間加熱による耐熱性芽胞菌数計測プレートよりコロニーを釣菌後、画線培養により純粋分離した。離水試験は市販水ようかんに寒天を 1% 補足して滅菌後、シャーレに流し込み作製したプレートを利用した。菌株を塗抹したシャーレを、コスモ・バイオ(株)製の嫌気性培養キット FX-8 の袋内に

*1 食品工業技術センター加工技術室

密封し嫌気下で、あるいは好気下で、10 ~ 30 日間培養して観察した。分離株の同定は形態学的・生理学的性質の検討による方法^{3) 4)}及び日本ベクトン・ディッキンソン(株)製の BBL CRYSTAL™ GP 同定検査キットにより行った。耐熱性は沸騰水における D 値により判定した。

2.3 芽胞の調製³⁾

普通ブイヨン培地で一夜振盪培養した前培養液 0.1ml を Schaeffer's sporulation medium agar プレートに塗抹し、位相差顕微鏡でスポアの形成を観察しながら、数日 ~ 20 日間培養した。冷却したプレート上に冷滅菌水をかけ放置した後、コンラージ棒で菌をほぐして菌懸濁液を集めた。菌塊を超音波洗浄機中でよく分散した後、遠心分離(2 040 × g、15 分)により集菌した。ペレットは冷却滅菌水で 4 ~ 5 回遠心洗浄した。芽胞数が約 10⁸/ml となるように滅菌水で菌懸濁液を再調製して、冷蔵保存した。

2.4 平板法による損傷芽胞の検出法

非選択培地を選定するために、保存芽胞懸濁液を 100 倍希釈して芽胞原液とし、80、10 分間あるいは沸騰水中 10 分間加熱した後、芽胞数を混釈平板培養法により計測した。培地は標準寒天培地(ニッスイ)、普通寒天培地(栄研)、ニュートリエント寒天培地(DIFCO)、トリプチソイブロス寒天培地(DIFCO)を用いた。

種々のタイプの損傷芽胞を検出するために、選択寒天培地として Bx40%水ようかんエキス寒天培地：寒天を加えていない水ようかん培地²⁾を熱時吸引口紙口過して得たエキスに寒天を 1.5%添加、Bx40%加糖標準寒天培地：Bx40%のグラニュー糖水溶液に標準寒天培地を添加、枯草菌用最少寒天培地、ピルビン酸ナトリウム 0.5%添加標準寒天培地、カタラーゼ添加標準寒天培地：カタラーゼ(牛肝臓製、和光)の口過滅菌液を添加、リゾチーム添加標準寒天培地：リゾチーム(卵白製、和光)の口過滅菌液を添加した培地を検討した。

高温加熱により発生する熱損傷芽胞数は、芽胞原液を加熱した後、非選択培地と選択培地を用いて芽胞数を計測し、その差より求めた。

2.5 濁度法を用いた生育遅延による損傷芽胞の検出

滅菌標準液体培地(標準寒天培地から寒天を除いたもの)12ml 入りの L 字型培養管に保存芽胞懸濁液 0.12ml を接種、加熱した後、温度勾配バイオフィォトレコーダー TN-112D(アドバンテック東洋製)を用いて 60rpm で振盪培養した。15 分間隔で 2 分間自動的に 660nm における吸光度を測定し増殖経過を測定した。

2.6 熱損傷促進物質のスクリーニング

ショ糖モノパルミテート(Mono-P)、ショ糖パルミテート(P-1670)、ショ糖オレエート(OWA-1570)、ショ糖ステアレート(略 HLB の異なる S-1170 と S-570)、デカグリ・ミリストート(M-10D)は三菱化学フーズ製、デカグリ・カプリレート(MCA750)、デカグリ・カプレート(MD-750)、デカグリ・ステアレート(SWA-10D)は坂本薬品工業製、アルコール製剤(甘草抗菌物質他)「つゆキープ」は丸善製薬製、貝殻焼成カルシウム「ポラパックス」は極東商事製の食品添加物を使用した。その他の検定試料は試薬特級及びそれに準ずるものを用いた。以上の添加物は全て 0.2%(W/V)、pH 7の水溶液にし、加熱滅菌、要すればろ過滅菌して検定試料液とした。

スクリーニングには *B. subtilis* IFO13719 株を主に使用し、促進効果の見られた成分には他の 2 株も使用した。保存芽胞懸濁液の 10 倍希釈液と検定試料液(対照には滅菌水)各 0.5ml を微量遠心管に加え、95、30 分間加熱した。冷却後、遠心分離(13 000 × g、10 分)して慎重に上清を除去した。さらに 2 回、滅菌水で遠心洗浄した後、滅菌リン酸緩衝食塩水 1ml に懸濁、超音波でよく分散させた。12ml の滅菌標準培地の入った L 字型培養管に芽胞濃度が約 10⁶/ml となるように芽胞懸濁液を接種、2.5 項のように振盪培養して増殖経過を測定した。

3. 結果及び考察

3.1 使用した菌株の特性

(1) 耐熱性変敗原因菌の分離、同定

離水した水ようかんや離水・ひび割れしたいろいろな変敗品の生菌数と耐熱性芽胞菌数(80、10 分間)は、ほぼ同一のオーダーを示し、変敗主要原因菌が耐熱性芽胞菌であることを示した。沸騰水、10 分間加熱による耐熱性芽胞菌計測プレートから、分離源やコロニーの性状を参考にして 13 株(ういろう 4 個より 5 株、水ようかん 4 個より 8 株)分離した。

生理学的、形態学的性質により、分離 13 菌株はいずれも *B. subtilis* と同定した。さらに BBLCRYSTAL GP 同定検査キットによっても、反応ウエルの結果がすべて明瞭に判定された株は、SU-3 株(ういろうより分離)を含めいずれも *B. subtilis* と同定された。

(2) 離水試験

水ようかん培地を用いた離水試験の結果、好気下ではすべての分離菌株が 10 日以内に離水・ひび割れを引き起こした。嫌気下では、30 日以内に 3 株を除く 10 株が離水を引き起こした。これら 10 株は明らかに離水を伴う変敗の原因菌と推定された。SU-3 株は好気下で強い離水を示すとともに嫌気下でも離水

を示した。*B. subtilis* IFO13719 及び ATCC6633 も SU-3 株と同様な離水能を示した。

(3) 芽胞の形成及び耐熱性

Schaeffer's sporulation medium agar プレート 1 枚当たりの孢子形成量は、分離株が $1 \sim 6 \times 10^9$ (SU-3 株は 1.95×10^9)、IFO13719 株が 8.20×10^9 、ATCC6633 株が 12.2×10^9 であった。分離株芽胞の 100 (沸騰水) における D 値は約 1 ~ 5 時間であり、SU-3 株孢子の値が最も大きく、強い耐熱性を示した。芽胞の D 値は、全ての分離株が ATCC6633 株やそれよりも耐熱性のある基準培養株 IFO13719 株より大きかった。

3.2 平板法による損傷芽胞の検出

(1) 非選択寒天培地の選定

損傷芽胞は選択培地で生育できなくても、阻害物質を含まず栄養素の豊富な培地では増殖して多くのコロニーを形成できる⁵⁾⁶⁾。沸騰水中 10 分間の加熱処理をした芽胞の、栄養の豊富な培地における計測数を比較すると(表 1)、標準寒天、ニュートリエント寒天が最も大きかった。しかし、IFO13719 株では後者は前者の 77% と少なく、他方、ATCC6633 株では前者は後者の 92% と小さかったが問題となるほどではなく、標準寒天培地が非選択培地としてより適していた。なお、両菌株とも非加熱と 80、10 分間加熱の計測数はほぼ同じであり、保存芽胞懸濁液中に栄養細胞の混入は認められなかった。

(2) 選択寒天培地の選定

種々の要因に感受性となった熱損傷芽胞がコロニー

表 1 各種プレートによる *B.subtilis* の孢子計測数

プレート	IFO13719	ATCC6633
標準寒天	6.0×10^5 (100)	6.8×10^5 (92)
普通寒天 (栄研)	3.1×10^5 (52)	3.8×10^5 (51)
ニュートリエント寒天(DIFCO)	4.6×10^5 (77)	7.4×10^5 (100)
トリプチソイ ロス寒天	1.4×10^5 (23)	1.9×10^5 (26)

孢子の加熱処理は沸騰水、10分間
数値上段は試料 1 ml 中の計測芽胞数、下段()
内の数値は最大計測数を 100とした時の割合

表 2 非選択寒天培地(標準寒天培地)と選択寒天培地の計測数の比較

選択寒天培地	計測数の比較		所用計測日数(30)		損傷芽胞の感受性及び損傷要因
	IFO13719	ATCC6633	IFO13719	ATCC6633	
Bx40%水ようかんエキス			5~7	6~100	高い糖度(浸透圧)、栄養の偏り
Bx40%加糖標準			4~6	4~6	高い糖度(浸透圧)
枯草菌用最少培地			14~20	5~7	栄養要求
0.5%ピルビン酸Na添加標準			2~3	2~3	活性酸素
カタラーゼ添加標準(500U/ml)			2~3	2~3	活性酸素
リゾチーム添加標準(0.025mg/ml)			2~3	2~3	細胞壁溶解酵素の損傷

計測数の比較は80、10分間加熱した孢子懸濁液について行った。印は選択培地の平均値±標準偏差の範囲内に標準寒天の平均値が含まれ、印は場合によりはずれることを示す。標準寒天の計測所要日数は両株とも2~3日であった。

を形成できるまたはできなくなる選択培地を検討した。非選択培地と選択培地の計測数の差がそれぞれの感受性要因に対応した熱損傷芽胞として検出される⁵⁾⁶⁾。非加熱と 80、10 分間加熱処理した芽胞の各選択培地による計測数はほぼ同一であり、80、10 分間の加熱では熱損傷が生じないと推定される。80、10 分間加熱処理した芽胞について非選択培地と選択培地で比較した結果、表 2 の計測数の比較欄に印の付いたものは両者の計測数に大きな差がみられず、正常な芽胞は標準寒天培地と同様に選択寒天培地においてもコロニーを形成できることを示した。したがって各々の選択培地で種々の要因に感受性となった損傷芽胞を検出できるが、枯草菌用最少寒天培地や Bx40%水ようかんエキス寒天培地は全てのコロニーの形成までにかかり日数を要する欠点がある。

(3) 沸騰水中 10 分間加熱による熱損傷

沸騰水中 10 分間加熱した時の熱損傷芽胞発生割合を表 3 に示した。選択培地における計測数は非選択培地の計測芽胞数を 100 とした時の値である。表 3 の上記 3 つの選択培地は損傷芽胞がコロニーを形成できないタイプであり、その他は損傷芽胞も回復してコロニーを形成できるタイプである。Bx40%水ようかんエキス寒天を選択培地とした時、生残芽胞の 98%以上が高い糖度や栄養の偏りに感受性となった損傷芽胞であり、それらは水ようかん中では増殖できないと考えられる。Bx40%加糖標準寒天を選択培地とした時は、高い糖度に対する感受性の

表 3 芽胞の沸騰水中 10 分間加熱による熱損傷

選択寒天培地	加熱処理 ¹⁾ 後の選択培地計測孢子数 ²⁾		生残芽胞に占める損傷芽胞の割合(%)	
	IFO13719	ATCC6633	IFO13719	ATCC6633
Bx40%水ようかんエキス	0.5	2.0	99.5	98.0
Bx40%加糖標準	28	51	72	49
枯草菌用最少	72	76	28	24
0.5%ピルビン酸Na添加標準	271	401	63	75
カタラーゼ添加標準(500U/ml)	127	138	21	28
リゾチーム添加標準(0.025mg/ml)	- ³⁾	100	- ³⁾	0

1)滅菌リン酸緩衝食塩水(pH7.2)中、芽胞数は約10/ml

2)非選択培地計測数を100とした時

3)未計測

みとなるため損傷芽胞は生残芽胞の 1/2 ~ 1/3 に減少した。ピルビン酸やカタラーゼ添加標準寒天培地では標準寒天培地に比べて計測数が大幅に増加した。両培地の計測数の差が活性酸素に感受性となった損傷芽胞数となる。この場合、選択培地による計測数が生残芽胞数となるが、ピルビン酸添加では生残菌の 63 ~ 75% が活性酸素に感受性となった損傷芽胞であった。このことは密封包装された酸素濃度の低い食品中の耐熱性芽胞菌を検出する時には、標準寒天培地による計測では増殖可能な芽胞を低く評価する危険があると思われる。

培地へのリゾチーム添加は、不活性化された芽胞固有の細胞壁溶解酵素のかわりとなって働き損傷芽胞を回復する⁶⁾とされている。しかし、標準寒天培地への 0.025mg/ml の添加では無添加と同じ計測数となり、それ以上の添加では、逆に計測数が低下し回復を阻害した。

3.3 熱損傷促進物質のスクリーニング

胞子は強い加熱処理により生から死に至る様々な状態の熱損傷を受けるが、阻害物質を含まない栄養の豊富な培地中では熱損傷芽胞は順次回復し増殖すると考えられる。熱損傷の程度が小さい集団ほどより速く増殖すると推定される。従って加熱処理時の共存添加物を洗浄除去した胞子と、無添加加熱処理の胞子との生育の差を標準培地培養液の濁度で計測⁷⁾すれば加熱時の共存添加物の熱損傷に対する効果を平板法よりかなり迅速にスクリーニングできる。

添加物共存時に加熱処理された IFO13719 株の芽胞培養液の OD が 0.1 に達するまでの時間を無添加処理芽胞のそれに対する比で表すと、シヨ糖脂肪酸エステル類や

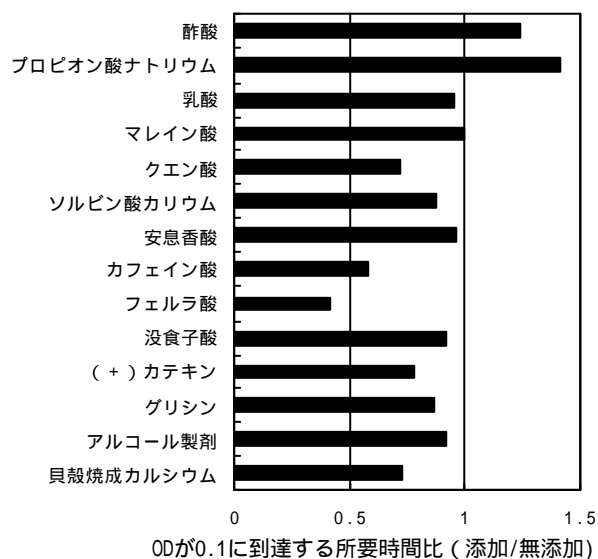


図1 添加物が芽胞の加熱損傷に及ぼす影響

菌株: *B. subtilis* IFO13719, 加熱処理: 95℃, 30分間, 所要時間比: 3回の平均

ポリグリセリン脂肪酸エステル類はいずれも1以下となり、熱損傷に対しては促進というよりむしろ抑制的であった。一部のシヨ糖脂肪酸エステルはフラットサワー菌による変敗防止の軽減に利用されており、細菌芽胞の発芽と生長の阻害作用が主要な効果とされている⁸⁾が、熱損傷促進効果はみられなかった。

抗菌効果の知られている有機酸や保存料、ポリフェノール、アミノ酸などの芽胞の加熱損傷に与える影響は図1のようになった。酢酸とプロピオン酸はODが0.1に到達する所要時間比が1を越えており中性下で、熱損傷促進効果を示した。この効果はATCC6633株やSU-3株の芽胞でも同様に認められた。その他の多くの抗菌性物質は効果がみられないかむしろ抑制的であった。

4. 結び

B. subtilis 胞子の熱損傷促進物質を見だし有効利用するために、さらに植物、発酵生産物、食品添加物などの広範囲な食品原材料の中からスクリーニングする必要がある。スクリーニングされた促進物質の熱損傷のタイプの判定には平板法の利用が必要である。特に選択培地としてBx40%水ようかんエキス寒天やBx40%加糖標準寒天を用いる平板法が、和生菓子の保存に適した熱損傷促進物質を見いだすのに有効である。

本実験を行うにあたり協力いただきました研修生の各務厚子、山田美代子の両氏に感謝いたします。

文献

- 1) 内藤茂三: 愛知食品工試年報, 26, 75 (1985).
- 2) 南場毅・長谷川雅則: 愛知食品工試年報, 28, 48 (1987).
- 3) 近藤雅臣・渡辺一仁編著: スポア実験マニュアル, (技報堂出版, 東京), p.3, p.19, p.111 (1995).
- 4) 駒形和男: 改訂微生物の分類と同定(下), 長谷川武治編(学会出版センター, 東京), p.105 (1985).
- 5) 土戸哲明: 食科工, 46, 1 (1999).
- 6) 森地敏樹: 食品危害微生物ハンドブック, 清水潮他編(サインエンスフォーラム, 東京), p.230 (1998).
- 7) 土戸哲明: 食品機械装置, 37, 46 (2000).
- 8) 松田敏生: HACCPの基礎と実際, 日本食品保全研究会編(中央法規出版, 東京), p.67 (1997).