

食品製造における変敗防止法の確立

—変敗微生物の分離と性状解析—

長沼孝多・斎藤美貴・恩山匠・乙黒親男

Microbial Control in Food-Manufacturing Process

—Isolation and Identification of Bacteria from Spoiled Foods—

Kohta NAGANUMA, Miki SAITO, Takumi ONDA and Chikao OTOGURO

要 約

加工食品メーカーにおいて、レトルト処理された卵水煮製品に白濁・溶解などの変敗が認められた。そこで、変敗菌の分離同定、製造工程中の生菌検査、及び変敗防止法の検討を行った。変敗卵水煮製品から8株の*Bacillus*属細菌 (*B. licheniformis*または*B. subtilis*) が検出された。製造工程及び出荷前製品からも同様に*Bacillus*属細菌が検出された。分離株の芽胞は、95~100℃の加熱処理では滅菌されず、105℃ 30分で滅菌された。変敗が発生する原因としては、卵水煮製品の一部加熱不十分が考えられた。また変敗防止のために、加熱調理工程 (90~98℃処理) において、グリシン1.5~2.0%を添加することも有効であった。

Abstract

8 strain of *Bacillus* sp. were isolated from spoiled retort products. They were identified as *B. licheniformis* and *B. subtilis*. Spores of these microbes were sterilized at 105°C for 30min. Thus, it is thought that the cause of spoilage in the products was insufficient sterilization. For preventing of spoilage, it seemed to be useful to add glycine (1.5% over) before heating.

1. 緒 言

加工食品の多くは、微生物に汚染されると食味の劣化や腐敗臭の発生などの変敗が起り、商品価値が著しく低下するため、微生物の殺菌・制御が食品の品質保持上重要である。

レトルト処理は、120℃ 4分が基準である高温高压殺菌法で、芽胞を有する食中毒菌であるボツリヌス菌の殺菌を目的としている¹⁾。しかし、レトルト食品にも変敗事例報告がみられる^{2)~4)}。これらの原因の多くは*Bacillus*属や*Clostridium*属など芽胞を形成する細菌の増殖によるもの^{5)~7)}である。芽胞⁸⁾は、一部の微生物と植物が形成する生殖細胞で、耐熱性や耐薬品性が高いのが特徴である。レトルト処理の条件 (温度、処理時間など) によっては、芽胞が完全に死滅しないで加工食品に残存し、その後発芽して変敗を起こすことが報告されている^{9)~11)}。レトルト処理条件は加工食品の品質に影響するため、現在では、添加物と高温処理とを組み合わせ、発芽を抑制する¹²⁾方法が見られる。

今回、県内の某メーカーでレトルト処理された卵水煮

製品が変敗したので、その変敗菌の同定や変敗防止法について検討したので報告する。

2. 実験方法

2-1 製造工程の細菌検査

卵水煮製品の製造工程を図1に示す。本製品は原料を加熱調理し、充填水 (約1%の食塩水) とともにポリプロピレン (PP) 製カップに充填し、レトルト処理を行っている。レトルト処理条件は110℃以上30分であり、昇温に約30分を要する。

2-2-1 空中落下菌検査

汚染が想定される製造機器の周辺において、標準寒天培地 (日本製薬) 4枚を5分間開放後、35℃で48時間培養した。生育コロニー数の平均値を求め、5分間あたりの落下菌数を計測した。

2-1-2 製品内充填水中の細菌検査

製品内充填水 (食塩濃度約1%) を1ml採取し、標準寒天培地を用いて混釈した。35℃で48時間培養し、製品内

充填水1mlあたりの生菌数を計測した。

2-1-3 機器ふきとり検査

ふきふきチェック2 (栄研機材, 10ml希釈液) を用い, 製造機器のうち汚染が想定される部分の100cm²を拭き取った。このうち1mlを標準寒天培地で混釈した。35℃で48時間培養し, 100cm²あたりの細菌数を計測した。ふきとりは作業終了直後に行った。

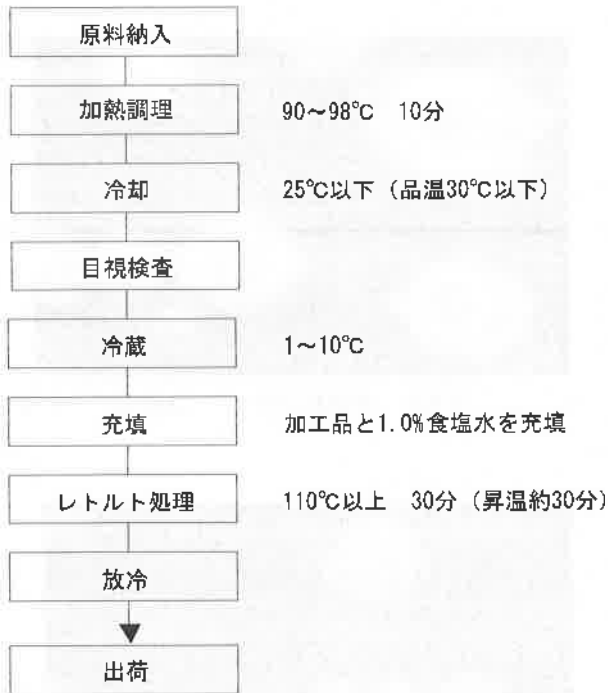


図1 製造工程図

2-2 製品からの微生物分離

2-2-1 変敗製品からの微生物分離

変敗卵水煮製品は, 卵の一部が溶解し充填水が著しく濁るものであった。この混濁部分を1ml採取し, 希釈後, 形態・色調が同系統の単一コロニーを選択し, 標準寒天培地で培養した。

2-2-2 出荷前加工品からの細菌分離

レトルト処理後の卵水煮製品20gにペプトン加生理食塩水180mlを加えて, ストマッカーによりホモゲナイズし, その1mlを標準寒天培地で混釈した。35℃で48時間培養し, 希釈後, 形態・色調が同系統の単一コロニーを選択し, 標準寒天培地で培養した。

2-3 分離菌の同定

2-3-1 供試菌株と培養法

2-2-1により5個の変敗製品から5菌株 (A1, A2, A3,

A4及びA5), 及び2-2-2により3個の出荷前製品から3菌株 (B1, B2及びB3) をそれぞれ分離し, これらの菌株はNutrient Broth (以下NB, 日本製薬) を用いて35℃で振盪培養した。

2-3-2 分離菌の簡易同定

平板培地上でのコロニー形態観察, グラム染色, カタラーゼ試験及び光学顕微鏡による細胞形態観察と芽胞形成により, 松田らの方法³⁾ によって属のレベルまで同定した。さらに同定キット (日本ビオメリュー, ID32アピシリーズアピCH50) を用いた同定試験を実施した。得られた結果についてBergey's Manual 第8版¹⁰⁾ の記載を参考に菌種を確定した。顕微鏡観察には位相差顕微鏡 (BX51, オリパス光学工業(株)) を用いた。

2-3-3 芽胞懸濁液の調製

芽胞形成培地は, 川村らのSCD培地¹²⁾ を用いた。すなわち, SCD寒天培地980ml (培地成分40g) を121℃, 15分加熱溶解後, 塩類溶液A (0.01N HCl中MnCl₂・2H₂O 0.25%, MgSO₄・H₂O 2.5%, FeSO₄・7H₂O 0.003%) と塩類溶液B (0.01N HCl中CaCl₂・2H₂O 1.5%) を10mlずつ, ろ過滅菌した後に加えて調製した。

供試菌株を標準寒天培地で35℃ 24時間培養し, 任意のコロニーを釣菌し上述した芽胞形成用培地に塗布した。これを35℃で7日間培養し, 位相差顕微鏡観察により芽胞の形成を確認した。次に, 培地上に生育した菌体を集め滅菌水に懸濁し, 遠心分離 (冷却下, 10,000rpm, 15分) を行い, ペレットの上層を洗い落として再度滅菌水で懸濁し, 遠心分離を行った。さらにペレットを滅菌水で懸濁し, 80℃ 10分間の加熱処理¹²⁾ で, 栄養型細胞を死滅させて芽胞懸濁液を得た。芽胞懸濁液は, 試験に供するまで4℃で冷蔵した。

2-3-4 芽胞の耐熱性試験

NB 5mlに, 孢子懸濁液を約10⁷CFU/mlの最終濃度で接種し, 沸騰水 (96℃), 100℃, 105℃及び110℃でそれぞれ30分加熱後, 水で急冷した。芽胞の生残確認は, 濁度の変化を肉眼で観察することにより行った。

2-3-5. グリシンの抗菌効果試験

0.5~2.0%の濃度でグリシン (和光純薬) を含むNB 5mlに, 孢子懸濁液を約10⁷CFU/mlの最終濃度で接種した。沸騰水にて30分加熱し, 流水で急冷後に35℃で14日間静置した。芽胞の発芽確認は2-3-4に従った。

さらに, グリシンによる芽胞の生残を確認するために, 14日後に試験液100μlを新しいNBに接種した。生残確認は2-3-4に従った。

3. 実験結果及び考察

3-1 製造工程内細菌の分布

製造工程より検出した細菌について表1に示した。衛生規範の基準¹⁾では、弁当・そうざい・洋菓子等の食品製造工程において、落下細菌数が30個以下である区域を清潔作業区域としている。今回の試験ではいずれの工程も30個以下であり、製造環境は清潔作業区域内であった。つぎに空中落下菌及び機器ふきとり検査にて検出されたコロニーを、形状と色により簡易分類したところ、合計67株の細菌が検出された。検鏡したところ、66株が球菌、1株が桿菌であった。球菌は通常非耐熱性であるため、この桿菌1株についてさらに調査した。この桿菌は簡易検査から、グラム陽性、カタラーゼ陽性、好気性芽胞形成桿菌であったことから、*Bacillus*属細菌と推定された。なお、本菌は標準寒天培地上で*Bacillus*属細菌に特徴的なしわ状のコロニーを形成した。

なお、約1%食塩水である充填水も調査したが、細菌は検出されなかった。

3-2 分離菌の簡易同定

変敗製品5品 (A1~A5) から細菌を5株及び出荷前製品3品 (B1~B3) から細菌を3株分離し、その諸性質を表2に示した。分離菌8株はいずれも、グラム陽性、カタラーゼ陽性の好気性芽胞形成桿菌であったことから、*Bacillus*

属細菌であることがわかった。また、標準平板寒天培地上で*Bacillus*属に特徴的なコロニーを形成した (写真1、写真2)。

つぎに各分離株を同定キット (アピ50CH) を用いた同定結果を表3に示した。分離株8株はD-glucose, L-arabinose, D-xylose及びmannitolを資化し、A1, A3, A5, B2及びB3株はさらにamygdalineを資化した。これらの結果から、分離菌は*B. licheniformis* (A1, A3, A5, B2及びB3) または*B. subtilis* (A3, A5及びB1) と判明した。

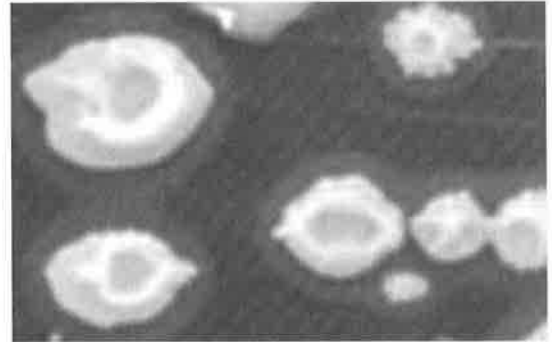


写真1 隆起状コロニー (A4)

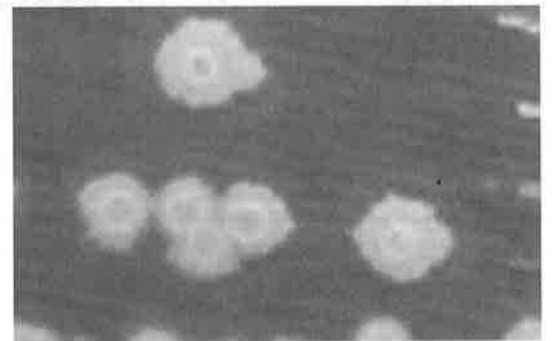


写真2 しわ状コロニー (A3)

表1 製造工程の細菌検査

工程	空中 落下菌数 (個)	ふきとり検査 検出細菌数 (個/100cm ²)	検出 細菌種数
加熱調理	2.0	255	40
冷蔵	0.25	415	6
充填	0	500	18
レトルト	0.75	-	3

表2 分離菌の諸性状

分離源	変敗製品					出荷前製品		
	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3
サンプル								
コロニー色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色
コロニー形状	しわ	隆起	しわ	隆起	しわ	隆起	しわ	隆起
カタラーゼ活性	+	+	+	+	+	+	+	+
グラム染色	+	+	+	+	+	+	+	+
細胞形態	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌
芽胞形成	+	+	+	+	+	+	+	+
糸引き	-	+	-	+	-	+	-	+

表3 分離菌の同定キットによる簡易同定

分離源 サンプル	変敗製品					出荷前製品		
	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3
糖資化性 ¹⁾								
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	=	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Xylose	=	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+
Galactose	=	-	+	=	-	=	=	+
Amygdaline	+	=	+	=	+	=	+	+
D-Turanose	=	=	=	=	+	=	+	+
同定結果	B. l	B. s	B. l	B. s	B. l	B. s	B. l	B. l

※ B. l. : *B. licheniformis* B. s. : *B. subtilis*

1) アピ50CHの49種の糖類のうち、同定上キーとなる糖を示した。

3-3 分離菌の殺菌条件の検討

3-3-1 芽胞の加熱による殺菌

分離菌8株は、芽胞形成培地で7日間の培養により、芽胞を形成した。調製した芽胞について、耐熱性を調べた結果を表4に示した。8株の芽胞は、96℃あるいは100℃ 30分の加熱処理では死滅しなかったが、105℃以上 30分で死滅した。

この結果から、いずれの分離菌も一般的な高温処理により滅菌が可能と推定された。本卵水煮製品のレトルト処理条件は110℃以上 30分であるため、卵水煮製品の変敗が発生する理由として、レトルト処理時の加熱が、製品の重なりなどにより不均一であったことが考えられた。

表4 分離菌（芽胞）の加熱による殺菌

加熱温度(℃)		96	100	105	110
加熱時間(min)		30			
サ ン プ ル	A1	+	V	-	-
	A2	+	V	-	-
	A3	+	V	-	-
	A4	+	V	-	-
	A5	+	V	-	-
	B1	+	V	-	-
	B2	+	V	-	-
	B3	+	V	-	-

+ : 生存 - : 死滅 V : variable

3-3-2 芽胞のグリシンによる静菌

卵水煮製品は、図1に示すように原料を搬入後、90~98℃の温度で加熱調理されている。この温度では3-3-1から分離菌は死滅しない。そこでこの工程での*Bacillus*属細菌芽胞の生育抑制を目的として、加熱処理(96℃ 30分)とグリシン添加の併用による、芽胞の静菌を検討した。その結果を表5に示した。グリシンを1.5あるいは2.0%添

加することで、14日間、菌の増殖が見られなかった。この場合、菌が死滅したかどうか不明であったため、14日目に芽胞の生残確認を行ったところ、全ての分離菌の芽胞は生残していることがわかった。すなわち、グリシンは芽胞菌を抑制していたことがわかる。

表5 分離菌（芽胞）のグリシン添加と加熱による静菌

加熱温度(℃)		96		
加熱時間(min)		30		
グリシン添加濃度(%)		1.0	1.5	2.0
サ ン プ ル	A1	+	-	-
	A2	+	-	-
	A3	+	-	-
	A4	+	-	-
	A5	+	-	-
	B1	+	-	-
	B2	+	-	-
B3	+	-	-	

+ : 混濁あり - : 混濁なし

4. 結 言

レトルト処理された卵水煮製品の変敗菌の分離・同定、と変敗防止法について検討した。

- 1) 変敗製品及び出荷前製品の計8品から、8株の*Bacillus*属細菌を分離した。
- 2) 分離菌は5株が*B. licheniformis*, 3株が*B. subtilis*であった。
- 3) 製造工程からは、球菌がほとんどであるが、一部*Bacillus*属細菌も検出された。
- 4) 分離菌の芽胞は、105℃ 30分以上の加熱処理で滅菌された。
- 5) 加熱調理時に、グリシン1.5%以上を添加することにより、芽胞の静菌効果が得られた。

以上の結果、今回の卵水煮製品の変敗は芽胞菌である *Bacillus* 属細菌によるものであり、製造工程における加熱不良が原因と推定された。

参考文献

- 1) 藤井建夫：微生物制御の基礎知識（中央法規出版、東京）、107-111（1997）
- 2) 岡崎尚、角川幸治、米田達雄：広島食工技研報、22、35-38（2000）
- 3) 松田典彦、駒木勝、市川良子、後藤幸恵：日食工、32（6）、399-406（1985）
- 4) 中條均紀、石津弥生：日食工、32（10）、725-730（1985）
- 5) 諏訪伸行、久保田春美、高橋和子、町田肇：日食工、33（1）、44-51（1986）
- 6) 渡部一仁：PDA Journal of GMP and Validation in Japan、3（2）、67-72（2001）
- 7) 内藤茂三：フードケミカル、6、19-24（2003）
- 8) 美野勉：フードケミカル、3、23-27（1998）
- 9) 深尾正：フードケミカル、10、19-25（2003）
- 10) BREED, R.S., et al. : Bergey's Manual of Systematic Biotechnology 8th ed., (The Williams and Wiking Co.), (1974)
- 11) 白川武志：香川発食試報、83、11-16（1992）
- 12) 川村邦夫、佐々木次雄、棚本憲一：GMP微生物試験法（講談社サイエンティフィック、東京）、430（2000）
- 13) 厚生省生活衛生局通知：弁当及びそうざいの衛生規範について、環食第161号、昭54年6月29日