

## カラギーナンから分離したガス産生の好熱性嫌気性細菌の 性状について

遠田 昌人・池上 義昭・中尾 マリ・村山寿美江

### Characteristics of Thermophilic Gas-producing Strict Anaerobes Isolated from Carrageenan

Atsuhito ENDA, Yoshiaki IKEGAMI, Mari NAKAO and Sumie MURAYAMA

Carrageenan, which is often used in canning low-acid beverages as an ingredient, has been known to be contaminated with spores of thermophilic bacteria. Therefore, spore-forming thermophiles in carrageenan were investigated.

Thermophilic strict anaerobes producing gas and hydrogen sulfide were isolated from carrageenan with heated  $F_0$  value above 30 minutes.

The thermophiles isolated were classified into two groups (Group A and B). Group A was identified as *Clostridium thermohydrosulfuricum* by testing morphological, cultural and biochemical characteristics, but Group B was not identified.

From the result of organic acid and gas analysis of the growth culture of Group A, main fermentation end-products were lactic acid, carbon dioxide and hydrogen. The values of  $z$  and  $D$  at 121.1°C for the spores of Group A were 8.8°C and 7.5 minutes respectively in a mTG C medium. The optimum growth temperature of the isolates of two groups ranged from 65.0°C to 70.0°C.

ミルク入りのコーヒー缶詰やしるこドリンク缶詰などの低酸性飲料缶詰を加温販売することによって起こるフラットサワー様変敗の主要原因菌は好熱性細菌である *Clostridium thermacetium* であることが知られている。<sup>1)2)3)4)</sup>

この好熱性細菌の汚染源として砂糖が挙げられる。<sup>5)</sup> その他、カラギーナンもこの細菌に汚染されていることが報告されている。

カラギーナンは缶詰に量的には少ないが増粘剤として使用されている。また、低酸性飲料缶詰にも使用されることがある。従って、カラギーナンを使用した低酸性飲料缶詰を加温販売した場合には、この細菌によって変敗する危険性がある。

今回このカラギーナンから *C. thermacetium* と性状が異なるガス産生の好熱性細菌を分離した。ガス産生の好熱性嫌気性細菌として *C. thermosaccharolyticum* があるがこれとも異なる。従って、カラギーナンから分離した細菌について、その性状を試験し、併せてこの細菌による変敗防止法を検討したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 供試材料

A社のカラギーナンを使用した。

## 2. 好熱性細菌の分離方法

嫌気性の好熱性細菌の分離では中試験管に分注し殺菌された変法TGC培地（mTGC、日水製薬）にカラギーナン0.1g、0.01g、0.001gをそれぞれ10本ずつ加え、攪拌しながら加熱溶解し、流動パラフィンを重層後100°C、10分加熱、冷却後65°Cで培養した。また、カラギーナンの10倍希釈液を100°C、10分加熱し、この希釈液1mlをmTGC培地に寒天末を更に1.5%加えた培地（mTGCA培地と略す）に移植し、65°Cで嫌氣的に混釈培養した。

耐熱性の好熱性細菌の場合にはmTGC培地にカラギーナンを0.1g加え攪拌しながら加熱溶解し、流動パラフィンを重層後120°CでF<sub>0</sub>を10から35まで5間隔の殺菌を行い、冷却後65°Cで培養した。それぞれ10本ずつ行い、ガス直火型オートクレーブで殺菌した。F<sub>0</sub>値の測定はデンマーク、エラブ社製の温度測定用のアプリケーション（DGK33-2）を試験管に入れ、温度測定装置Z4FDを使用した。

また、好気性の好熱性細菌の分離は、カラギーナンの100倍希釈液を100°C、10分加熱し、この希釈液1mlをデキストローストリプトンアガー培地（DTA、Difco）を使用し、55°Cで混釈培養した。

## 3. 分離菌の生物学的性状

純粋分離した菌株をmTGC培地中で65°C、2日培養した培養液を使用した。結果の判定は常法に従った。

- 1) チオ硫酸塩の還元能：TYTSI培地（バクト トリプトン 10g、酵母エキス 2g、塩化ナトリウム 2.5g、寒天末 1g、チオ硫酸ナトリウム 5水塩 0.2g、精製水 1000ml、pH 7.5、殺菌後、無菌の5%クエン酸鉄（Ⅲ）アンモニウム溶液を0.05%になるように加える）に細菌を接種し、流動パラフィンを重層、2週間培養後、黒変の状態を観察した。
- 2) 亜硫酸塩の還元能：TYSI培地（バクト トリプトン 10g、酵母エキス 2g、塩化ナトリウム 2.5g、寒天末 1g、亜硫酸ナトリウム 0.2g、精製水 1000ml、pH 7.5、殺菌後、無菌の5%クエン酸鉄（Ⅲ）アンモニウム溶液を0.05%になるように加える）または鉄サルファイト寒天培地（ISA培地と略す）<sup>6)</sup>に細菌を接種し、流動パラフィンを重層、2週間培養後、黒変の状態を観察した。
- 3) 硫酸塩の還元能：TYSIA培地（バクト トリプトン 10g、酵母エキス 2g、塩化ナトリウム 2.5g、寒天末 1g、硫酸ナトリウム 0.5g、精製水 1000ml、pH 7.5、殺菌後、無菌の5%クエン酸鉄（Ⅲ）アンモニウム溶液を0.05%になるように加える）または Modified Starkey's Medium Cの組成を一部変更した培地（mST培地と略す）<sup>1)</sup>に細菌を接種し、流動パラフィンを重層、2週間培養後、黒変の状態を観察した。
- 4) 肉の消化：クックドミート培地（日水製薬）に細菌を接種し、流動パラフィンを重層、3週間培養後、肉片の消化を観察した。
- 5) ゼラチンの液化：ゼラチン培地（日水製薬）に細菌を穿刺培養し、流動パラフィンを重層、3週間培養後、ゼラチンの液化を観察した。
- 6) 凝固卵白の変化：凝固卵白片の入った mTGCB培地（mTGCの寒天を含まない培地）に細菌を接種し、流動パラフィンを重層、3週間培養後、卵白の消化を観察した。
- 7) ミルクの凝固及び消化：鉄ミルク培地（10%スキム ミルクに還元鉄を0.05~0.1g/10mlを加える）に細菌を接種し、流動パラフィンを重層、2週間培養後、ミルクの凝固、消化及びガス産生能を観察した。
- 8) 硝酸塩の還元：INペプトン培地（トリプトケース ペプトン 20g、リン酸二カリウム 2g、ブドウ糖 1g、硝酸カリウム 1g、寒天末 1g、精製水 1000ml、pH 7.5）に細菌を接種し、流動パラフィンを重層、2週間培養後、常法に従って試験した。

9) 糖の分解：TY培地（バクト トリプトン 10g、酵母エキス 2g、チオグリコール酸ナトリウム 0.5g、寒天末 1g、精製水 1000ml、pH7.5）を基礎培地とし、これを中試験管に12mlずつ分注、121°C、15分間高圧滅菌した。この培地に濾過滅菌した各種の糖類を0.5%から1.0%になるように添加して使用した。細菌の接種後、嫌気状態で2週間培養し、pHを測定して未接種培地との差が0.5以上のものを陽性と判定した。

#### 4. 分離菌の発酵生成物

1) ガス組成：mTGCB培地の入ったスミスの発酵管でA群及びB群の細菌（1021、1028）を65°C、72時間培養し、発生したガスを島津製のガスクロマトグラフGC-3BTを使用してガス組成を分析した。

2) 有機酸組成：TYG培地で65°C、72時間培養したA群及びB群の細菌（1021、1028）の培養液を昭和電工製の有機酸分析器（Shodex OA）を使用して有機酸組成を分析した。

#### 5. 培養至適温度

mTGCB培地をマグネットの回転子が入った小試験管（15 x 150 mm）に8mlずつ分注し、120°C、15分間高圧滅菌した培地にmTGCB培地で培養した新鮮なA群の細菌（1021）を0.1ml接種し、流動パラフィンを重ね、50°Cから2.5°C間隔で72.5°Cまで調整した恒温槽で培養し、1～2時間間隔で600nmの吸光度を島津製のBaosch & Lomb SPECTRONIC 70を使用して測定した。

#### 6. 耐熱性の測定

1) 孢子懸濁液の調整：A群の細菌（1022）をTPY培地（バクト トリプトン 1.5g、フィトンペプトン 0.5g、酵母エキス 0.3g、チオグリコール酸ナトリウム 0.05g、精製水 100ml、pH7.5）に65°Cで20日培養し、その培養液を遠心分離（5000 rpm、20分）し、滅菌精製水で洗浄、これを2回繰り返してpH7.0のリン酸緩衝液に懸濁した。この懸濁液を100°C、10分加熱して孢子懸濁液とした。保管は通常5°Cであるが、長期に保管する場合には-30°Cで保管した。

2) 致死時間（LD<sub>50</sub>）の測定：孢子懸濁液（1022）をmTGCB培地で10倍に希釈、この希釈液をTDT管（外径7mm、長さ120mm）に1mlずつ分注し、マイクロバーナーで熔封後、一定温度に保持した恒温油槽中で所定時間加熱し、流水中で急冷後、そのまま65°Cで2週間培養した。各時間ごとに4本ずつ測定し、増殖本数よりLD<sub>50</sub>を算出した。すなわち、4本中2本が増殖した時の加熱時間を算出した。

3) D値の測定：LD<sub>50</sub>の測定と同じようにして121.1°Cで所定時間加熱し、流水中で急冷後、そのまま65°Cで2週間培養した。各時間ごとに20本ずつ加熱し、増殖本数より確率により残存孢子数を算出し<sup>8)</sup>、生残曲線より求めた。

### 結果及び考察

#### 1. 細菌の分離

カラギナン中の嫌気性の好熱性細菌の孢子数を測定した結果、Table 1に示すようにmTGCBを用いてMPN法で算出すると250/g（コンピュータで計算）である。希釈倍率1000倍における増殖本数より確率<sup>8)</sup>で算出すると510/gであった。また、mTGCAで求めた孢子数は675/gであった。これらの培地中で増殖した細菌から純粋培養により13株分離した。好気性の好熱性細菌の孢子数は450/gであった。

また、Table 2に示すようにF<sub>0</sub>が25以上でも生き残る耐熱性の細菌が存在することが分かったので、これより15株分離した。

#### 2. 分離菌の生物学的諸性状

好気性の好熱性細菌18株を常法に従って同定した結果、いずれも *B. stearothermophilus* であっ

Table 1. Contamination of carrageenan with thermophiles

| Quantity of sample examined (g) | Growth             | Numbers of colonies |                   |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
|                                 | mTGC <sup>a)</sup> | mTGCA <sup>b)</sup> | DTA <sup>c)</sup> |
| 0.1                             | +++++              |                     |                   |
| 0.01                            | +++++              | 9, 7, 6, 5          | 5, 5, 5, 3        |
| 0.001                           | ++++-              |                     |                   |

a) Incubated for 14 days at 65 °C anaerobically.

b) Incubated for 7 days at 65 °C anaerobically.

c) Incubated for 4 days at 55 °C aerobically.

Table 2. Heat resistance of thermophile spores isolated from carrageenan.

| Fo Value (min) | Number of positive growth tubes (per 10 tubes) |
|----------------|--|
| 9.9            | 10   |
| 14.6           | 10   |
| 20.0           | 10   |
| 25.3           | 8  |
| 29.3           | 6  |
| 35.1           | 1  |

た。

嫌気性の好熱性細菌28株について諸性状を試験した結果、Table 3に示すように2群（A群、B群）に分けられ、A群の細菌は糖を分解してガスを産生し、また、ミルクを凝固し、チオ硫酸塩及び亜硫酸塩を還元して硫化水素を産生するが、硫酸塩は還元しない。B群の細菌は普通の培地では発育が悪く、クッドミート培地及び鉄ミルク培地で僅かにガス産生が認められたが、ミルクは凝固しなかった。チオ硫酸塩を分解して硫化水素を産生するが、硫酸塩及び亜硫酸塩は還元しなかった。

好熱性偏性嫌気性有芽細胞菌で硫化水素を産生し、缶詰の変敗原因菌としてよく知られている細菌として *C. thermacetivum* あるいは *Desulfotomaculum nigrificans* があるが、A群の細菌はガス産生能、ミルクの凝固及び糖の分解能などの点でこれらと異なる。また、ガスを産生しミルクを凝固させる細菌として *Clostridium thermosaccharolyticum* があるが、硫化水素産生能の点で異なる。

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (vol. 2) に掲載されている好熱性偏性嫌気性有芽細胞菌でこれら以外の細菌には *Clostridium thermautotrophicum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Clostridium thermosulfuringens* などがある。A群の細菌はこれらの細菌の中で *C. thermohydrosulfuricum* と生物学的性状がよく一致していた。しかし、B群の細菌はこれらと一致するところがなく同定できなかった。

これらの分離菌は孢子を形成するが、その形成能は弱いので、形態、位置を観察することは出来なかった。

Table 3. Characteristics of the isolates, *C. thermacetikum* and *C. thermohydrosulfuricum*

| Item                                   | Group A<br>(1021, 1022) | Group B<br>(1028, 1029) | <i>C. therma-<sup>a)</sup></i><br><i>ceticum</i> | <i>C. thermohydro-<sup>a)</sup></i><br><i>sulfuricum</i> |
|--|-------------------------|-------------------------|--|--|
| Optimum growth temp. (°C)              | 65-70                   | 65-70                   | 55-60  | 67-69  |
| Hydrolysis of gelatin                  | -                       | -                       | -  | -  |
| Digestion of coagulated<br>egg albumin | -                       | -                       | -  | -  |
| Digestion of meat                      | -                       | -                       | -  | -  |
| Reaction in milk                       | ACG                     | G                       | -  | C-   |
| Reduction of nitrate                   | -                       | -                       | +  | -  |
| sulfite                                | +                       | -                       | +  | +  |
| thiosulfate                            | +                       | +                       |  | +  |
| sulfate                                | -                       | -                       | -  | -  |
| Gas from glucose                       | +                       | W                       | -  | +  |
| Acid from                              |                         |                         |  |  |
| arabinose                              | -                       | -                       | -  | ±  |
| rhamnose                               | -                       | -                       | -  | ±  |
| xylose                                 | +                       | -                       | +  | +  |
| galactose                              | +                       | +                       | W  | +  |
| glucose                                | +                       | +                       | +  | +  |
| mannose                                | +                       | +                       | -  | +  |
| lactose                                | +                       | W                       | -  | d  |
| maltose                                | +                       | -                       | -  | +  |
| sucrose                                | +                       | -                       | -  | +  |
| raffinose                              | +                       | -                       | -  | d  |
| inuline                                | -                       | -                       | -  | -  |
| starch                                 | +                       | W                       | -  | +  |
| salicin                                | +                       | -                       | -  | +  |
| sorbitol                               | -                       | -                       | -  | d  |
| mannitol                               | -                       | -                       | -  | d  |
| cellobiose                             | +                       | -                       | -  | +  |

a) Bergey's manual of systematic bacteriolog (Vol. 2). +: 90-100% positive ±: 61-80% positive d: 40-60% positive ±: 11-39% positive -: 90-100% negative  
A: Acid C: Coagulation G: Gas W: Weak

m T G C A上から分離した13株は9株がA群の細菌で4株がB群の細菌であった。また、F<sub>0</sub>が25以上の加熱で生き残った15株は5株がA群の細菌で10株がB群の細菌であった。尚、F<sub>0</sub>が35の加熱で生き残った1株はB群の細菌であった。

### 3. 分離菌の発酵生成物

A群の細菌(1022)について、生成ガスの組成をTable 4に示した。約86%が炭酸ガスで残りは水素ガスであった。また生成有機酸の組成は、乳酸が多量に生成された。従って、この点からもA群の細菌は*C. thermohydrosulfuricum*と一致する。<sup>7)</sup> B群の細菌(1028)のガス産生能は弱く僅かしか産生しないが約70%は炭酸ガスで、生成有機酸は酢酸が主で、乳酸の生成は認められなかった。

Table 4. Fermentation products from glucose by Groups A and B

| Fermentation products       | Group A (1021) | Group B (1028) |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| Gas <sup>a)</sup>           | %              | %              |
| H <sub>2</sub>              | 14             | 31             |
| CO <sub>2</sub>             | 84             | 69             |
| Organic acids <sup>b)</sup> | mg %           | mg %           |
| Acetate                     | 38.4           | 73.0           |
| Lactate                     | 99.5           | trace          |
| Pyro-glutamate              | 74.0           | 41.4           |
| Iso-butylate                | trace          | 49.9           |

a) Incubated with mTGCB (mTGC without agar) medium for 72 hrs at 65 °C.

b) Incubated with TYG medium for 4 days at 65 °C.

#### 4. 分離菌の至適温度

A群の細菌 (1021) の増殖における至適温度は Fig. 1 に示すように高温で65°Cから70°Cであった。また、B群の細菌 (1028) も70°C付近が至適温度であった。

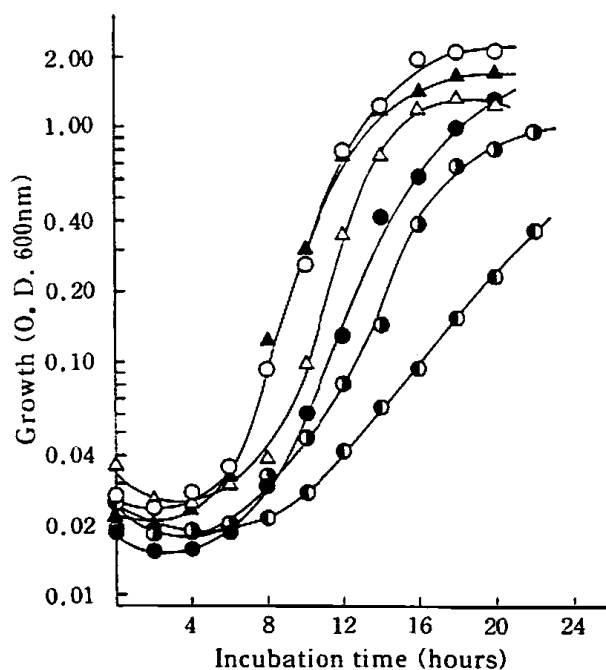


Fig.1 Growth curves of Group A (Strain No. 1021) at 70°C ( $\Delta$ ), 65°C ( $\circ$ ), 62.5°C ( $\blacktriangle$ ), 60°C ( $\bullet$ ), 57.5°C ( $\odot$ ) and 55°C ( $\bullet$ )

## 5. 分離菌の耐熱性

A群の細菌(1022)の孢子の耐熱性をmTGC培地中で行った結果、Fig. 2に示すように120°C、125°C、130°CのそれぞれのLD<sub>50</sub>は48.3、13.3、3.8分でZ値は8.8°Cであった。121.1°CにおけるD値はFig. 3に示すように7.5分であった。

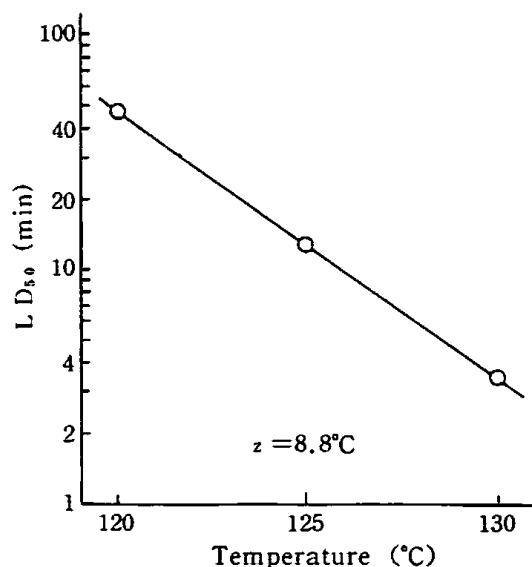


Fig. 2 Thermal death time curve of spores of Group A (Strain No. 1022)

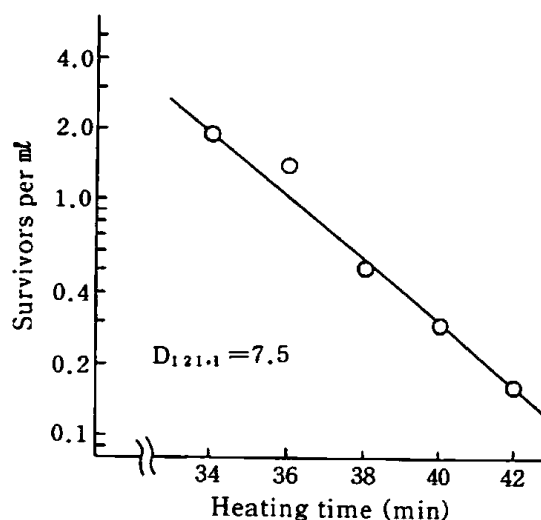


Fig. 3 Survival curve for spores of Group A (Strain No. 1022) heated in mTGC medium at 121.1°C

B群の細菌については孢子の耐熱性は測定しなかったが、Table 2においてF<sub>0</sub>が35でも生き残った細菌はB群であるのでA群の細菌より少し強いものと思われる。

## 要 約

カラギーナンから非常に耐熱性の孢子を形成する好熱性偏性嫌気性細菌を分離した。

これらの細菌は生物性状から2群(A群、B群)に分けられ、A群の細菌は発酵によって主に炭酸ガスと乳酸を産生する。また、ミルクを凝固し、亜硫酸塩を還元して硫化水素を産生する。また、増殖至適温度は65°Cから70°Cであった。糖の分解能など生物学的諸性状からA群の細菌は*C. thermohydrosulfuricum*と同定された。しかし、B群の細菌は生成有機酸が酢酸である点は*C. thermacetivum*に類似するが、ガス産生能、亜硫酸塩の還元、糖の分解能、至適温度などの点が異なり結局同定出来なかった。

このようにカラギーナンからF<sub>0</sub>が30以上の殺菌でも生き残るガス産生の好熱性細菌が分離されたことは、この原材料を使用して製造した低酸性飲料缶詰を加温販売する場合には膨脹変敗になる可能性があるので注意して製造しなければならない。

## 文 献

- 1) 松田典彦, 増田寛行, 駒木 勝, 松本直紀: 食衛誌, 23, 480 - 486 (1982).
- 2) Nakayama, A., Kadota, H., Sonode, J. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 25, (4) 297 - 309 (1984).

- 3) 山本和則, 神谷隆久, 小室道彦, 掛礼しげ子, 村上りつ子, 高井勝美: 食衛誌, 25, 233 - 240 (1984).
- 4) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正: 缶詰時報, 67, (11) 1168~1174 (1988).
- 5) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正: 缶詰時報, 67, (12) 1278~1283 (1988).
- 6) Cameron, E. J. : *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 21, 452 - 454 (1938).
- 7) Thomas, K. NG. and Zeikus, J. G. : *J. Bacteriol.*, 150, ( 3 ), 1391 - 1399 (1982).
- 8) 医科学研究所学友会編: 細菌学実習提要, 丸善, 東京, P 569 - 570 (1976).