

# 窒素濃度および二酸化炭素濃度を調整したガス置換雰囲気における低温性*Bacillus*属細菌および*Paenibacillus*属細菌の発育

小林 哲也

## Growth of Psychrotolerant *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. in Modified Atmospheres with N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> Gases

Tetsuya Kobayashi

The growth of psychrotolerant *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. in modified atmospheres with N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> gases was investigated. Among 36 psychrotolerant *Bacillus* strains inoculated on agar plates, 30, 16, and 2 strains showed growth when subjected to culture conditions with modified atmospheres containing 0%, 25%, and 50% CO<sub>2</sub> respectively. Furthermore, no strains showed growth when subjected to culture conditions with 75% or more CO<sub>2</sub>. Contrariwise, most of the tested *Paenibacillus* strains demonstrated an ability to grow when subjected to culture conditions with gases containing high concentrations of CO<sub>2</sub>, in which no growth of *Bacillus* spp. was observed. These results were considered to be due to the difference in sensitivity of the two genera to cold stress.

**KEY-WORDS :** *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., Psychrotolerant, Modified Atmosphere Packaging, CO<sub>2</sub>

**キーワード :** バシルス属細菌, パエニバシルス属細菌, 低温性, ガス置換包装, 二酸化炭素

袋物惣菜の市場規模は1,996億円(2012)から8,109億円(2019)に成長した<sup>1, 2)</sup>。この背景には社会構造の変化に伴う消費者の食志向の変化がある。すなわち、共働き世帯や単身世帯の増加、少子高齢化の進展によって食の簡便化志向が高まっている。近年では、利便性をいっそう向上させるために、成型トレイに様々な惣菜を充填し、トップシール機で密封した製品も多く見られるようになった。このような製品では、内容物の酸化劣化による品質低下の防止を目的にガス置換包装と呼ばれる密封方法が採られている。すなわち、気相(ヘッドスペース)から酸素を除去し、代わりに窒素や二酸化炭素などのガ

スを充填して密封する。

ガス置換包装は食品中に存在する微生物の制御手段としても有効であり、酸素の除去による好気性細菌の発育抑制や二酸化炭素置換による食中毒細菌の発育遅延、芽胞の発芽や発芽後生育の抑制が報告されている<sup>3~5)</sup>。ガス置換包装によって酸素濃度が低下すると偏性嫌気性菌が発育する可能性が高まる。そのため、イギリス食品基準庁(Food Standards Agency)の定めたガイドライン<sup>6)</sup>では、ガス置換包装製品に10日以上保存性を付与するためには、E型ボツリヌス菌芽胞の殺滅を目的に90℃で10分以上の加熱殺菌が求められている。また、殺菌後の

事業名：公募型研究(公益財団法人大下財団2018年度研究助成)

課題名：ガス置換包装による加熱後芽胞の制御に関する研究

二次汚染が生じないように包装後の加熱殺菌が推奨されている。このガイドラインに則ると、加熱殺菌や静菌剤でガス置換包装製品の保存性向上を検討する場合には、E型ポツリヌス菌よりも芽胞の耐熱性が高く、10℃以下でも発育する低温性の芽胞形成菌が指標菌となる。

指標菌となり得る芽胞形成菌のひとつに低温性の *Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属の細菌<sup>7,8)</sup> が挙げられるが、これらのガス置換雰囲気での発育に関する知見は少なく、特に *Paenibacillus* 属細菌に関しては報告が見当たらない。ガス置換雰囲気における低温性の *Bacillus* 属細菌や *Paenibacillus* 属細菌の生理特性を明らかにすることは、ガス置換包装製品の保存性を向上させるための指標菌の設定につながり、加熱殺菌条件や静菌剤の処方などより詳細な制御手法を検討できるようになる。そこで本研究では、10℃でも発育する低温性の *Bacillus* 属細菌および *Paenibacillus* 属細菌を対象に、窒素濃度および二酸化炭素濃度を調整したガス置換雰囲気における発育を評価した。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

菌株分譲機関 (NBRC, JCM および MAFF) から入手、ならびに食品製造環境等から分離した10℃でも発育する *Bacillus* 属細菌 4 種36菌株および *Paenibacillus* 属細菌 3 種11菌株を用いた。

### 2. 注入ガス

高純度窒素 (>99.99995%, 大陽日酸, 以下 0% CO<sub>2</sub>), 高純度二酸化炭素 (>99.995%, 大陽日酸, 以下100% CO<sub>2</sub>) および窒素と二酸化炭素の混合ガス (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>: 75/25, 50/50, 25/75, いずれも大陽日酸, 以下, 25% CO<sub>2</sub>, 50% CO<sub>2</sub>, 75% CO<sub>2</sub>) を用いた。

### 3. 芽胞形成菌の発育における雰囲気ガス組成および培地pHの影響

供試菌株を Tryptic soy broth (Bectone Dickinson) に接種し、30℃で24時間培養した。滅菌シャーレ (φ90mm, 栄研化学) に標準寒天培地 (日水製薬) 20mL を注いで固化させた平板に培養液0.01mL を1株当たり 3~6 箇所滴下した。数分間放置して培地に培養液を吸収させたのち、平板 6 枚を嫌気培養用パウチ袋 (A-94, 300mm×300mm に成形, 三菱ガス化学) に並べ入れてガス置換包装した。10℃で4週間および30℃で1週間培養したのち、コロニー形成の有無を目視で判定

した。6 N塩酸で無菌的にpH4.5~7.0に調整した標準寒天培地20mLを固化させた平板にも同様に培養液を滴下し、大気雰囲気にて10℃で4週間および30℃で1週間培養してコロニー形成の有無を目視で判定した。1箇所でもコロニー形成が認められた場合には発育したとみなした。

なお、pH調整した標準寒天培地について、呈色面が培地と接触するようにpH試験紙 (MColorpHast, pH4.0-7.0, メルク) を平板上に置き、呈色を目視で判定したところ、pH4.5, 5.0, 5.5, 6.0および7.0の標準寒天培地は、それぞれpH4.4~4.7, 5.0~5.3, 5.5~5.8, 5.8~6.1および7.0を指示する呈色を示した。

### 4. ガス置換包装条件

卓上型自動真空包装機 (V-490G, チャンバー容積約40L, TOSEI) を用いてガス置換包装した。チャンバー内を99%容量真空引きした後、注入圧0.07MPaでチャンバーの90%容量のガスを注入して密封した。

### 5. ガス置換包装した平板の培地pH

呈色面が培地と接触するようにpH試験紙を平板上に置き、ガス置換包装した。呈色を目視で判定し、培地pHとした。

### 6. ガス組成分析

ガス組成はガスクロマトグラフ (GC-15A, 島津製作所) で分析した。カラムにはパックドカラム (WG-100, ジーエルサイエンス) を用い、測定条件はキャリアガス:ヘリウム 20mL/min, 検出器:TCD 120mA, カラム温度:50℃, 試料容量:0.5mLとした。各ガスの濃度は、標準ガスのピーク面積比より算出した。

## 実験結果

### 1. ガス置換包装したときの雰囲気ガス組成と培地pH

ガス置換包装したパウチ袋内の雰囲気ガス組成は、概ね注入ガスの組成と一致した。また、O<sub>2</sub>はいずれのガスを注入したときも1~2%残存した。pH試験紙で判定した培地pHは、10℃培養ではそれぞれpH6.5~7.0 (0% CO<sub>2</sub>), 5.5 (25% CO<sub>2</sub>), 5.3~5.5 (50% CO<sub>2</sub>), 5.0~5.3 (75% CO<sub>2</sub>), 4.7~5.0 (100% CO<sub>2</sub>), 30℃培養ではそれぞれpH6.5~7.0 (0% CO<sub>2</sub>), 5.5~5.8 (25% CO<sub>2</sub>), 5.5 (50% CO<sub>2</sub>), 5.3~5.5 (75% CO<sub>2</sub>), 5.0~5.3 (100% CO<sub>2</sub>) であった (表1)。

表1 標準寒天平板をガス置換包装したときの雰囲気ガス組成と培地pH

注入ガスのCO <sub>2</sub> 濃度 (%)	雰囲気ガス組成 (%) <sup>a</sup>			培地pH <sup>d</sup>	
	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	10°C	30°C
0	96.2±2.3 <sup>b</sup>	ND <sup>c</sup>	1.4±0.2	6.5～7.0	6.5～7.0
25	76.6±0.8	23.0±0.8	1.7±0.3	5.5	5.5～5.8
50	53.1±2.8	47.3±2.9	1.4±0.5	5.3～5.5	5.5～5.8
75	29.8±0.3	73.1±2.1	1.9±0.3	5.0～5.3	5.5
100	4.5±0.9	92.3±1.8	1.7±0.9	4.7～5.0	5.0～5.3

<sup>a</sup>標準ガスに対するピーク面積比から算出

<sup>b</sup>平均値±標準誤差

<sup>c</sup>検出せず

<sup>d</sup>pH試験紙で目視判定

## 2. *Bacillus*属細菌の発育

4種36菌株の*Bacillus*属細菌を標準寒天平板に接種してガス置換雰囲気中で培養したところ、10°Cで4週間の培養では、0% CO<sub>2</sub> (100% N<sub>2</sub>)、25% CO<sub>2</sub>および50% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には、それぞれ30菌株、16菌株および2菌株が発育したが、75% CO<sub>2</sub>および100% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には1菌株も発育しなかった。30°Cで1週間の培養では、0% CO<sub>2</sub> (100% N<sub>2</sub>) ガスで置換した場合には全ての菌株が発育し、25% CO<sub>2</sub>、50% CO<sub>2</sub>、75% CO<sub>2</sub>および100% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合でも*B. simplex*を除くほとんど全ての菌株が発育した。*B. simplex*は、25% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には2菌株が発育したが、50% CO<sub>2</sub>、75% CO<sub>2</sub>および100% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には発育した菌株はなく、10°C培養のときと同様の発育結果であった(表2)。塩酸でpH調整した標準寒天平板に接種して大気雰囲気中で培養したところ、10°Cで4週間の培養では、pH5.5の培地で32菌株が発育したが、pH5.0および4.5の培地では、それぞれ12菌株および2菌株しか発育しなかった。30°Cで1週間の培養では、pH4.5の培地でも33菌株が発育した(表3)。

## 3. *Paenibacillus*属細菌の発育

3種11菌株の*Paenibacillus*属細菌を接種した標準寒天平板をガス置換雰囲気中で培養したところ、10°Cで4週間の培養では、0% CO<sub>2</sub> (100% N<sub>2</sub>) ガスで置換した場合には全ての菌株が発育し、25% CO<sub>2</sub>、50% CO<sub>2</sub>および75% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合でも*P. polymyxa* JCM2507<sup>T</sup>を除く10菌株が発育した。100% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合でも*P. polymyxa* JCM2507<sup>T</sup>および*P. odorifer*を除く7菌株が発育した。30°Cで1週間の培養では、25% CO<sub>2</sub>、50% CO<sub>2</sub>、75% CO<sub>2</sub>および100% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合でも*P. polymyxa* JCM2507<sup>T</sup>が発育したこと以外は10°C培養のときと同様であった(表4)。塩酸でpH調整した標準寒天平板に接種して大気雰囲気中で培養したところ、10°Cで4週間の培養では、

pH5.5の培地で全ての菌株が発育したが、pH5.0の培地では2菌株の*P. odorifer*が発育せず、pH4.5の培地では3菌株の*P. odorifer*と*P. polymyxa* JCM2507<sup>T</sup>が発育しなかった。30°Cで1週間の培養では、pH4.5の培地でも全ての菌株が発育した(表5)。

## 考 察

ガス置換雰囲気における*Bacillus*属細菌の発育について、これまでにいくつか報告されている。荻原らは*B. cereus*の栄養細胞の30°Cでの発育に対するCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>の混合ガスの効果をコロニー数とコロニー径で評価し、CO<sub>2</sub>濃度の増加に伴い、コロニー径は小さくなるが、コロニー数は変化しないことを示している<sup>9)</sup>。また、藤井らは*B. subtilis*の栄養細胞の10°Cでの発育に対するN<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の混合ガスの効果を評価し、100% N<sub>2</sub>ガスで置換した場合には栄養細胞の発育が見られたが、60%以上のCO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には発育が抑制されたことを示している<sup>10)</sup>。さらに、Thorsenらは*B. weihenstephanensis*の芽胞の8°Cでの発育に対するCO<sub>2</sub>の効果を評価し、60% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には5週間以上発育が抑制されることを示した<sup>11)</sup>。本研究においても、30°Cでの培養では100% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合でも*B. simplex*を除くほとんど全ての菌株が発育したことや、10°Cでの培養では0% CO<sub>2</sub> (100% N<sub>2</sub>) ガスで置換した場合でも全ての菌種が発育したこと、50% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合にはほとんど菌株の発育が抑制され、75%以上のCO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には発育する菌株はなかったことなど、これまでの報告と類似した結果が得られた。このことから、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の混合ガスでガス置換包装したときの*Bacillus*属細菌の発育は、*B. simplex*を除いて30°Cでの培養ではCO<sub>2</sub>濃度の影響を受けないが、10°Cでの培養では50～60%のCO<sub>2</sub>ガスを封入することで菌種に関わらず阻害されることが示唆された。

表2 ガス置換雰囲気における*Bacillus*属細菌の発育

供試菌株	10°C, 4週間培養					30°C, 1週間培養				
	注入ガスのCO <sub>2</sub> 濃度 (%)					注入ガスのCO <sub>2</sub> 濃度 (%)				
	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
<i>B. cereus sensu lato</i> <sup>a</sup>										
NBRC3003 ( <i>B. cereus</i> )	— <sup>b</sup>	—	—	+ <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+
NBRC15305 <sup>T</sup> ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
NBRC13690 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118482 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118519 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118524 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
MAFF118525 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
MAFF118590 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118591 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
MAFF118598 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118601 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
MAFF118607 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
NBRC101235 <sup>T</sup> ( <i>B. thuringiensis</i> )	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
NBRC101238 <sup>T</sup> ( <i>B. weihenstephanensis</i> )	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.1071, 冷凍カットポテト製造環境 <sup>d</sup>	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
No.1072, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.10711, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.10810, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.1093, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.1099, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.2611, チルド餃子	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
No.2625, チルド餃子	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>B. megaterium</i>										
NBRC15308 <sup>T</sup>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
No.17, チルド小豆菓子	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
No.19, チルド小豆菓子	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
No.1081, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i>										
NBRC12092 <sup>T</sup>	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.2, 低温殺菌乳	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.956, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.1082, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.2927, チルド餃子	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>B. simplex</i>										
JCM12307 <sup>T</sup>	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+
No.10, 低温殺菌乳	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+
No.433, ホワイトアスパラ缶詰製造環境	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+
No.1077, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+
No.2923, チルド餃子	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+

<sup>a</sup> 500bpの16S rDNA配列解析では野生菌株を正確に分類できないため、広義のセレウス菌 (*B. cereus sensu lato*) とした。

<sup>b</sup> 1箇所もコロニー形成が認められなかった場合

<sup>c</sup> 1箇所でもコロニー形成が認められた場合

<sup>d</sup> 分離源

表3 大気雰囲気における*Bacillus*属細菌の発育

供試菌株	10°C, 4週間培養					30°C, 1週間培養			
	培地pH					培地pH			
	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0	4.5	5.0	5.5	6.0
<i>B. cereus sensu lato</i> <sup>a</sup>									
NBRC3003 ( <i>B. cereus</i> )	— <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+	+
NBRC15305 <sup>T</sup> ( <i>B. cereus</i> )	—	+	+	+	+	+	+	+	+
NBRC13690 ( <i>B. cereus</i> )	—	+	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118482 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118519 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118524 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118525 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118590 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118591 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
MAFF118598 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	+	+	+	+	+	+
MAFF118601 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	—	+	+	+	+	+	+
MAFF118607 ( <i>B. cereus</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
NBRC101235 <sup>T</sup> ( <i>B. thuringiensis</i> )	—	+	+	+	+	+	+	+	+
NBRC101238 <sup>T</sup> ( <i>B. weihenstephanensis</i> )	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.1071, 冷凍カットポテト製造環境 <sup>d</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1072, 冷凍カットポテト製造環境	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.10711, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	+	+	+	—	+	+	+
No.10810, 冷凍カットポテト製造環境	—	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1093, 冷凍カットポテト製造環境	—	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1099, 冷凍カットポテト製造環境	—	+	+	+	+	+	+	+	+
No.2611, チルド餃子	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.2625, チルド餃子	—	—	+	—	+	+	+	+	+
<i>B. megaterium</i>									
NBRC15308 <sup>T</sup>	—	—	—	—	+	—	+	+	+
No.17, チルド小豆菓子	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.19, チルド小豆菓子	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.1081, 冷凍カットポテト製造環境	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i>									
NBRC12092 <sup>T</sup>	—	—	—	+	+	+	+	+	+
No.2, 低温殺菌乳	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.956, 冷凍カットポテト製造環境	—	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1082, 冷凍カットポテト製造環境	—	+	+	—	+	+	+	+	—
No.2927, チルド餃子	—	—	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. simplex</i>									
JCM12307 <sup>T</sup>	—	—	+	+	+	—	—	+	+
No.10, 低温殺菌乳	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.433, ホワイトアスパラ缶詰製造環境	—	—	+	+	+	+	—	+	+
No.1077, 冷凍カットポテト製造環境	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.2923, チルド餃子	—	—	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> 500bpの16S rDNA配列解析では野生菌株を正確に分類できないため、広義のセレウス菌(*B. cereus sensu lato*)とした。

<sup>b</sup> 1箇所もコロニー形成が認められなかった場合

<sup>c</sup> 1箇所でもコロニー形成が認められた場合

表4 ガス置換雰囲気における*Paenibacillus*属細菌の発育

供試菌株	10°C, 4週間培養					30°C, 1週間培養				
	注入ガスのCO <sub>2</sub> 濃度 (%)					注入ガスのCO <sub>2</sub> 濃度 (%)				
	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
<i>P. odorifer</i>										
JCM13339	— <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>	+	+	+	—	+	+	+	+
JCM21743 <sup>T</sup>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+
No.3, 低温殺菌乳 <sup>c</sup>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+
<i>P. polymyxa</i>										
JCM2507 <sup>T</sup>	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
JCM20106	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM20385	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1, ホワイトアスパラガス水煮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.7, 低温殺菌乳	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1095, 冷凍カットポテト製造環境	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. terrae</i>										
JCM11466 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.9, ホワイトアスパラガス水煮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> 1箇所もコロニー形成が認められなかった場合

<sup>b</sup> 1箇所でもコロニー形成が認められた場合

<sup>c</sup> 分離源

ガス置換雰囲気における*Paenibacillus*属細菌の発育について報告した例はない。一方で、冷蔵食品において*Paenibacillus*属細菌が変敗原因となった事例はいくつか報告されており<sup>12, 13)</sup>, *Paenibacillus*属細菌は冷蔵食品の微生物制御を設計する上で重要な菌種と考えられる。

本研究では、10°Cでの培養では*Bacillus*属細菌が発育しないガス置換雰囲気においても*Paenibacillus*属細菌は発育すること示し、数種類の*Paenibacillus*属細菌が高濃度のCO<sub>2</sub>ガス置換雰囲気に高い耐性を示すことを明らかにした。このことは、*Bacillus*属細菌と比較して*Paenibacillus*属細菌が低温ストレスに強いことに由来すると考えられた。細菌の発育抑制に対するCO<sub>2</sub>の作用メカニズムは、気相から溶媒への溶解による周辺環境のpH低下や細胞内に侵入したCO<sub>2</sub>がH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>となりH<sup>+</sup>を放出してプロトンポンプを駆動させることによるATPの枯渇であると提唱されており、培養温度も大きく影響すると言われている<sup>3)</sup>。細菌は、低温ストレスに曝されると細胞膜中の不飽和脂肪酸比率を上げて細胞膜の流動性を強めるが、弱酸や低pHストレスに曝されると細胞膜中の飽和脂肪酸比率を下げて細胞膜の流動性を弱める<sup>14)</sup>。すなわち、細菌は低温ストレスと弱酸および低pHストレスに対して細胞膜が対極の応答を示す。高濃度のCO<sub>2</sub>ガスに曝されることが、弱酸や低pHに曝されることと同義であると考え、低温ストレスがその効果を高めることは妥当である。

大気雰囲気では培養したときの*Bacillus*属細菌および*Paenibacillus*属細菌の発育pHを比較すると、*Bacillus*属細菌のほとんどの菌株は、30°Cでの培養よりも10°Cでの培養で発育pHの下限が高くなったが、*Paenibacillus*属細菌の多くの菌株は10°Cで培養しても発育pHの下限に変化はなかった(表3および表5)。ガス置換雰囲気で培養したときにも培養温度によって*Bacillus*属細菌は発育範囲が大きく変化した、*Paenibacillus*属細菌は*P. polymyxa* JCM2507<sup>T</sup>を除き変化せず(表4)、高濃度のCO<sub>2</sub>ガス置換雰囲気に高い耐性を示したことは、低温ストレスに強いことが一因であると推察された。

また、大気雰囲気とガス置換雰囲気における10°Cでの発育を培地pHに着目して比較すると、*Bacillus*属細菌は、塩酸でpH5.5に調整した培地では32菌株が発育し、pH5.0に調整した培地でも12菌株が発育したが、25% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合(培地pH5.5)には16菌株、50% CO<sub>2</sub>ガスで置換した場合(培地pH5.3~5.5)には2菌株しか発育しなかった。すなわち、ガス置換雰囲気での培養では、大気雰囲気での培養よりも発育pHの下限が高くなった(表2および表3)。一方、*Paenibacillus*属細菌でこのような挙動を示したのは、*P. polymyxa* JCM2507<sup>T</sup>だけであった(表4および表5)。このことは、低温ストレスに強い*Paenibacillus*属細菌は、*Bacillus*属細菌と比較して低温下でもpHストレスや弱酸ストレス、気相の低酸素ストレスにも強いことを示唆している。

表5 大気雰囲気における*Paenibacillus*属細菌の発育

供試菌株	10°C, 4週間培養					30°C, 1週間培養			
	培地pH					培地pH			
	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0	4.5	5.0	5.5	6.0
<i>P. odorifer</i>									
JCM13339	— <sup>a</sup>	—	+ <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+
JCM21743 <sup>T</sup>	—	—	+	+	+	+	+	+	+
No.3, 低温殺菌乳 <sup>c</sup>	—	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. polymyxa</i>									
JCM2507 <sup>T</sup>	—	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM20106	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM20385	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1, ホワイトアスパラガス水煮	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.7, 低温殺菌乳	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.1095, 冷凍カットポテト製造環境	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. terrae</i>									
JCM11466 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.9, ホワイトアスパラガス水煮	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> 1箇所もコロニー形成が認められなかった場合

<sup>b</sup> 1箇所でもコロニー形成が認められた場合

<sup>c</sup> 分離源

すなわち、*Paenibacillus*属細菌は*Bacillus*属細菌よりも有機酸でpH調整した製品や真空包装した製品などで発育しやすいと考えられた。

以上のことから、窒素濃度および二酸化炭素濃度を調整したガス置換雰囲気では、*Bacillus*属細菌よりも*Paenibacillus*属細菌の方が発育する可能性が高く、*P. polymyxa*や*P. terrae*が加熱殺菌条件や静菌剤の処方などの制御方法を検討するための指標になると推察された。

## 要 約

窒素濃度および二酸化炭素濃度を調整したガス置換雰囲気における*Bacillus*属細菌および*Paenibacillus*属細菌の発育を明らかにした。*Bacillus*属細菌4種36菌株の発育は、30°Cでの培養ではCO<sub>2</sub>の影響をほとんど受けなかったが、10°Cでの培養ではCO<sub>2</sub>濃度の増加に伴い抑制される菌株数が増加し、75%以上のCO<sub>2</sub>ガスで置換した場合には完全に抑制された。一方、*Paenibacillus*属細菌3種11菌株は、*Bacillus*属細菌が発育しない高濃度のCO<sub>2</sub>ガス置換雰囲気でも発育した。*Bacillus*属細菌は、30°Cで培養したときよりも10°Cで培養したときに発育pHの下限が高くなる傾向があった。一方、*Paenibacillus*属細菌にはこのような傾向は見られず、高濃度のCO<sub>2</sub>ガス置換雰囲気に高い耐性を示したことは、低温ストレスに強いことが一因であると推察された。

本研究は、公益財団法人大下財団2018年度研究助成を受けて実施した。

## 文 献

- 1) 日本惣菜協会編(2015).「惣菜白書—拡大編集版—」2015年版, 日本惣菜協会, 東京.
- 2) 日本惣菜協会編(2020).「惣菜白書」2020年版, 日本惣菜協会, 東京.
- 3) 木村 凡, 藤井建夫(1996). CO<sub>2</sub>ガスと微生物の増殖. 日本食品微生物学雑誌, **13**, 1-8
- 4) Enfors, S.O. (1978). Mechanism of the inhibition of spore germination by inert gases and carbon dioxide, In, "Spores VII," ed. by Chambliss, G. and Vary, J.C., American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 80-84
- 5) Daniels, J.A., Krishnamurthi, R. and Rizvi, S.S.H. (1985). A review of effect of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *J. Food Prot.*, **48**, 532-537
- 6) Food Standards Agency (2017). The safety and shelf-life of vacuum and modified atmosphere packed chilled foods with respect to non-proteolytic *Clostridium botulinum*.
- 7) Luu-Thi, H., Khadka, D.B. and Michiels, C.W. (2014). Thermal inactivation parameters of

- spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, **189**, 183-188
- 8) 小林哲也, 八十川大輔, 中川良二, 川上 誠 (2016). 農産物チルド食品から分離した低温性細菌芽胞の発育特性と耐熱性. 日本防菌防黴学会誌, **44**, 509-514
- 9) 荻原博和, 蟹江 誠, 矢野信禮, 春田三左夫 (1993). ガス置換包装における二酸化炭素, 酸素, 及びその混合ガスが食品媒介病原細菌・腐敗細菌の発育に及ぼす影響. 食品衛生学雑誌, **34**, 283-288
- 10) 藤井建夫, 杉本和弘, 奥積昌世 (1993). ガス置換包装における食品関連細菌の挙動. 日本包装学会誌, **2**, 167-172
- 11) Thorsen, L., Budde, B.B., Koch, A.G. and Klingberg, T.D. (2009). Effect of modified atmosphere and temperature abuse on the growth from spores and cereulide production of *Bacillus weihenstephanensis* in a cooked chilled meat sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, **130**, 172-178
- 12) Hamasaki, Y., Kotoura, S., Nakane, M. and Sugiyama, M. (2006). Spoilage ability of psychrotrophic *Paenibacillus* spp. isolated from cooked food products. *Biocontrol Sci.*, **11**, 43-47
- 13) 稲津早紀子, 竹谷早稀, 松永藤彦 (2017). 変敗コーンペーストから分離された*Paenibacillus*属の生育性状解明. 日本食品微生物学雑誌, **34**, 126-130
- 14) Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **3**, 1-20