

炊飯器での保温中に米飯を変敗させる細菌の推定

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	入澤,友啓 辻井,良政 岡,大貴 野口,治子 内野,昌孝 高野,克己
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	40巻5号
掲載ページ	p. 241-246
発行年月	2014年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



炊飯器での保温中に米飯を変敗させる細菌の推定

入澤友啓*[§]・辻井良政*・岡 大貴*
野口治子*・内野昌孝*・高野克己*

* 東京農業大学応用生物科学部

Estimation of Bacteria in Spoiled Cooked Rice

IRISAWA Tomohiro*[§], TSUJII Yosimasa*, OKA Daiki*,
NOGUUCHI Haruko*, UCHINO Masataka* and TAKANO Katsumi*

* Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Spoilage of cooked rice occurred as a result of heat insulation. The cooked rice had an off-flavor that was caused by spoilage. This phenomenon is thought to be caused by microorganisms. Therefore, in this study, we attempted to isolate the contaminating microorganisms from cooked rice and identify them by using polymerase chain reaction (PCR) and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). No microorganisms were detected in normal cooked rice; however, microorganisms were detected at 4.6×10^6 cfu/g in rice spoiled by 72h of heat insulation. The isolates were able to grow at 60~65°C on the cooked rice, and they produced an off-flavor. Based on phylogenetic analysis, the isolates were identified as members of the genus *Geobacillus*, and were closely related to *Geobacillus thermoleovorans*. Contaminating microorganisms in the cooked rice were identified by PCR using bacterial universal primers and *G. thermoleovorans* was only detected using PCR-DGGE. These results suggest that *G. thermoleovorans* was the contaminating microorganism in the spoiled cooked rice and produced the off-flavor.

(Received Feb. 17, 2014; Accepted Jul. 16, 2014)

Key words: cooked rice, thermal insulation, spoilage, thermophilic, *Geobacillus*
米飯, 保温, 変敗, 好熱性細菌, *Geobacillus*

炊飯は、現在では電気炊飯器が主流となっている。電気炊飯器は1950年代に登場し、その後1960年には保温機能が開発され、米飯を移し替える手間を省き、炊飯から保温の一台二役の電気炊飯器となった。この保温機能により、米飯は温かく、おいしい状態を維持できるようになった。

しかし、保温機能の向上により長時間の保温が可能となった反面、それに伴う異臭や変敗が問題視されるようになってきた。米飯およびその加工食品の汚染の主たる原因として、*Bacillus*属細菌や*Clostridium*属細菌に関する報告が多く、中でも*B. cereus*など食中毒に関与する細菌についての報告が特に多い^{1)~6)}。これまでは弁当のような容器包装米飯などの加工製品に関する変敗だけが問題視されてきた。そこで炊飯器での保温中においてもこのような変敗が生じる原因を考えた場合、微生物的要因による可能性が高いと考えられた。

これまでに米飯保温時に生じる変敗について松下ら⁷⁾が報告している。ガス炊飯器を用いて炊飯し、その後、60°Cにて保温をすると5時間後から細菌の繁殖が確認された。さらに、変敗を引き起こす原因細菌が*B. stearothermophilus* (現在は再分類され*Geobacillus stearothermophilus*) であると結論づけている。

以上の背景からも電気炊飯器での保温中に生じる変敗についても細菌によるものであると推測された。そこで、本研究では炊飯器での保温中に変敗した米飯を材料に培養法と分子生物学的手法を用いて、細菌の関与を明らかにすることを目的として研究を行った。

試料および実験方法

1. 供試炊飯器・試料米および炊飯・保温条件

同じ機種炊飯器を複数機体用いて保温試験を行い、常に保温中に変敗が生じる炊飯器 (Spoilage rice cooker,

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

§ Corresponding author, E-mail: sawa37@hotmail.com

SR)と変敗が生じない炊飯器 (Normal rice cooker, NR)の二種を選抜した。炊飯および保温は炊飯器に搭載されている通常炊飯および保温機能を使用した。試料米として富山県産コシヒカリを使用した。なお、炊き上がり直後の米飯に関しては、官能試験を行い喫食に問題がないことを確認した (データ未掲載)。

2. 保温時間による菌数変化

供試炊飯器 (SRおよびNR)と試料米を用いて通常炊飯し、炊飯直後を0時間目とし、以降24時間毎に米飯を採取して保温72時間までの米飯中の菌数変化を測定した。採取した米飯0.5gに生理食塩水4.5mlを加え、十分に攪拌した。攪拌後、生理食塩水にて段階希釈を行った。この希釈液を培地に接種し、60℃で3日間培養した。分離培地として、0.6% gellan gum含有GS培地 (1.0lにつき1.0g MgSO₄, 2.0g yeast extract, 10g polypeptone)を溶解後、NaOHにてpH7.0に調整。121℃15分間、オートクレーブ滅菌)を用いた。培養後、出現したコロニー数を数えた。また、保温24時間目の試料について炊飯器釜内の米飯を上層、中層、下層に3分画し、それぞれの画分の菌数分布を調べた。

3. 変敗原因細菌の残存場所の推定

保温24時間後と炊飯釜および内蓋を洗浄・乾燥後の2つの時点で変敗原因細菌の残存性確認実験を行った。なお、拭き取り地点は炊飯器内部のうち、炊飯釜、内蓋 (表面・裏面)、パッキンとその隙間、水蒸気口など計16か所を選択した。まず、滅菌綿棒にて各試験箇所を拭き取った。それをGS液体培地に懸濁し、50℃にて3日間培養した。培養後に培地に濁りがみられ、生育が確認されたものを陽性と判断した。

4. 変敗原因細菌の分離

変敗を起こす炊飯器SRより、細菌の分離を直接分離法にて試みた。SRを用いて炊飯後に保温し、継時的 (0, 24, 48, 72時間)に米飯を採取した。培地や培養条件は上記2.に準じて行った。培地上に出現したコロニーを釣菌し、0.6% gellan gum含有GS培地 (GSG培地)を用いて純粋分離を行った。分離した菌株についてグラム染色し顕微鏡にて形態観察を行った。分離菌株は10%グリセロール溶液に懸濁後、-80℃にて保存した。

5. 16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析

分離菌株20株について16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った。分離菌株からのDNA抽出はZHUらの方法⁹⁾に従って行った。各遺伝子の増幅に用いたプ

ライマーと増幅条件、シーケンス解析および系統解析はIRISAWAらの方法⁹⁾に従った。

6. PCR-DGGE法による変敗原因細菌の検出

変敗原因菌について培養法による検出に加えてDNAレベルでの検出を行った。まず、上記2.と同様に供試炊飯器 (SRおよびNR)と試料米を用いて通常炊飯を行った。炊飯終了直後を0時間目とし、24時間毎に米飯を採取した。米飯は保温72時間まで採取をした。採取した試料1.0gに対して1.0mlの純水を加え、よく攪拌し、4℃にて1時間静置した。この上澄液を分取し、0.1gの乾熱滅菌したガラスビーズとともにBugCrasher (TAITEC)にて菌体を破碎した。以後は、フェノール・クロロホルム法にてDNA抽出を行った。一般細菌を対象としてTable 1に示したプライマーセットを用いてPCR法にて検出を行った¹⁰⁾。反応液25μl (5.0μl 5×PrimeSTAR® buffer, 2.0μl dNTP Mixture, 0.5μl each primer, 0.25μl TaKaRa PrimeSTAR®, 1.0μl 鋳型DNA, 15.75μl dH₂O)を用いて、PCR反応 (94℃ for 5 min, 94℃ for 1min*, 63℃ for 1min, 72℃ for 1min, go to *35times, 72℃ for 5min, 4℃ forever)を行った。アガロース電気泳動により増幅が確認されたPCR産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE)法に供した。DCode universal mutation detection system (Bio-Rad)を用い、アクリルアミド濃度8.0%、変性剤濃度勾配は35%から50%となるように調製した (100%変性剤は7M尿素と40%formamideを含む)。電気泳動は40V, 30分, 60℃の予備泳動後に60V, 12.5時間, 60℃の条件で本泳動を行った。電気泳動後、アクリルアミドゲルはSYBR® Green I nucleic acid gel stain (Lonza)溶液中で30分間の染色を行った。染色後、Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad)により検出した。検出されたバンドを切り出し、PCRによる再増幅を行った。さらに、PCR産物を用いて、1-5と同様の方法でシーケンス解析を行った。

7. モデル試験による米飯変敗の再現実験

スクリーキャップ付き試薬ビンに未汚染米飯20gを分取し、10³spore/gになるように分離菌株の芽胞を接種した。これを60, 70, 75, 80℃にて保温し、接種直後から12時間おきに72時間後まで米飯を0.5g分取した。分取した米飯を用いて上記2.と同様の方法にて培養を行い、出現したコロニー数を測定した。なお、米飯に接種した芽胞はスポア実験マニュアル¹¹⁾に従って調製した。

Table 1 PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Target microorganisms	Reference
U968GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCCCG CCAACGCGAAGAACCTTAC	Bacteria	8
R-1401	CGGTGTGTACAAGACCC	Bacteria	8

実験結果および考察

1. 保温時間による菌数変化

保温時間による菌数の経時的変化をFig. 1に示した。NRでは、保温を72時間継続しても菌数は検出限界以下 ($<1.0 \times 10^1$) であった。一方、SRでは0時間後で菌数は 3.6×10^2 colony form unite (cfu)/gであり、24時間後には 1.6×10^4 cfu/gと保温開始時の約100倍に達していた。さらに保温を継続することにより菌数は増加し、72時間後には 4.6×10^6 cfu/gにまで増加した。また、細菌の分布を検討したところ、上層部、中層部および低層部の菌数はそれぞれ 3.3×10^5 cfu/g, 1.3×10^4 cfu/gおよび 3.3×10^3 cfu/gであった。最も生菌数が多かったのが上層部であったことから、変敗の原因となる細菌は好気性である可能性が示唆された。変敗が繰り返し起るSRからのみ、細菌の存在が確認されたことから、変敗に関与している可能性が高いと考えられた。

2. 変敗原因細菌の残存場所の推定

保温時の変敗は繰り返し生じることから、炊飯器内のいずれかの箇所の変敗原因細菌が残存している可能性が予想された。そこで、炊飯器の内部の拭き取り試験を行った。保温時には16か所中11か所から細菌が検出された。また、洗浄後も16か所中10か所から細菌が検出された。特に内蓋のパッキンやその隙間などから高頻度に検出された。これらの部位は保温時に水蒸気が凝縮した水分が特に溜まりやすい部分であった。通常の洗浄ではこれらの細菌を除去することは難しいと考えられた。米飯は 100°C 以上で炊き上げることからほぼすべての細菌は死滅してしまうことから、耐熱性芽胞細菌が関与していることが考えられた。耐熱性芽胞であれば、洗浄や炊飯時の熱では死滅せず、休眠することが可能である。つまり、炊飯後の保温中に芽胞が発芽し、栄養細胞へと変化するため、変敗が繰り返し生じると考えられた。

3. 変敗原因細菌の分離

変敗が確認された米飯から細菌の分離を試みると培地上にコロニーが確認された。この中から保温時間 (0, 24, 48, 72時間) ごとに5株釣菌し、計20菌株について純粋分離し、保存を行った。全分離菌株を顕微鏡にて観察をしたところ、全菌株はグラム陰性桿菌で芽胞を形成していた。このことから変敗の原因菌は好熱性の芽胞形成細菌であることが示唆された。

4. 16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析

分離菌株の16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析より得られた塩基配列を用いて、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 2)。すべての分離菌株は系統的に *Geobacillus* 属に属することが明らかになった。また、各配列についてEMBL/GenBank/DDBKのデータベースにて相同性検索をしたところ、*Geobacillus thermoleovorans*^{12),13)}と99%以上の相同性を示した。*Geobacillus* 属細菌は *Bacillus* 属から再分類された一属であり、一般的にはグラム陽性を示す。しかし、菌種によってはグラム陰性と同じ色に染色されることがある。*G. thermoleovorans* もグラム陰性に染色されることがあることから、前述のように分離菌株がグラム陰性と判定された結果と一致した。*Geobacillus* 属細菌は耐熱性芽胞を形成する、好熱性細菌であり、食品製造においてフラットサワー菌と呼ばれている^{14),15)}。この細菌は芽胞の耐熱性が高いことから、レトルト殺菌で完全に殺菌ができない。そのため、容器詰食品や飲料を加熱販売する際に特別な注意が必要とされている。

5. PCR-DGGE法による変敗原因細菌の検出

一般細菌を検出するプライマーセットにてPCRを行ったところ、増幅が確認された (Fig. 3)。このPCR産物をDGGEに供し、菌叢をモニタリングした。その結果、保温0時間目には細菌は検出されなかった。しかし、保温24時間目になるとバンドが複数確認され、これらのシー

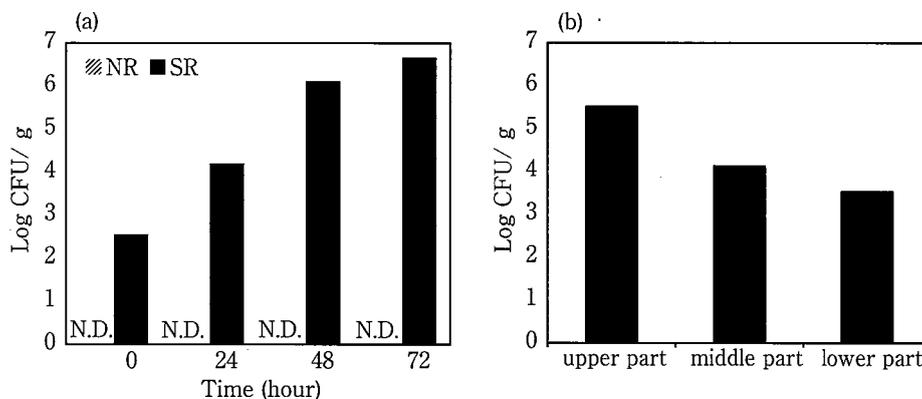


Fig. 1 Comparison of the number of cells during heat insulating (a) and distribution of contaminated bacteria in the cooked rice (b)

NR; normal rice cooker, SR; spoilage rice cooker.

*N.D. : Not Determined

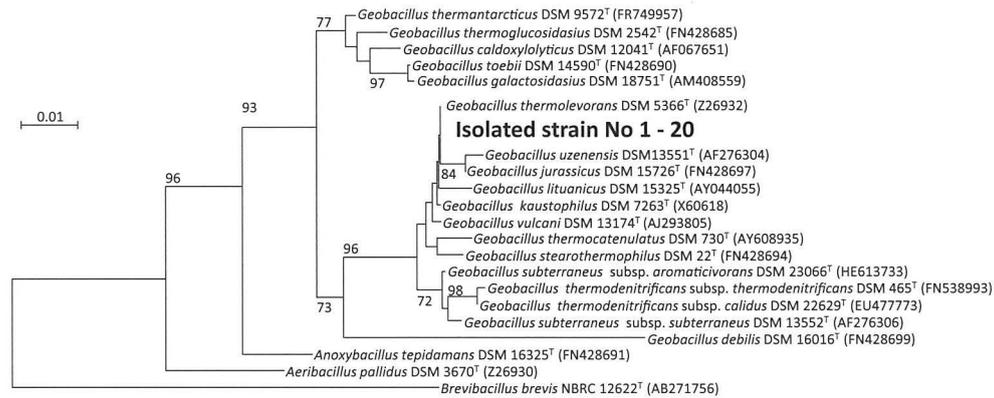


Fig. 2 Phylogenetic relationship of the isolates and closely related species based on 16S rRNA gene

The tree was constructed by neighbour-joining method. *Brevibacillus brevis* NBRC 12622^T was used as an outgroup. Bootstrap percentages above 70% are given at branching points. Bar indicates 1.0% sequence divergence.

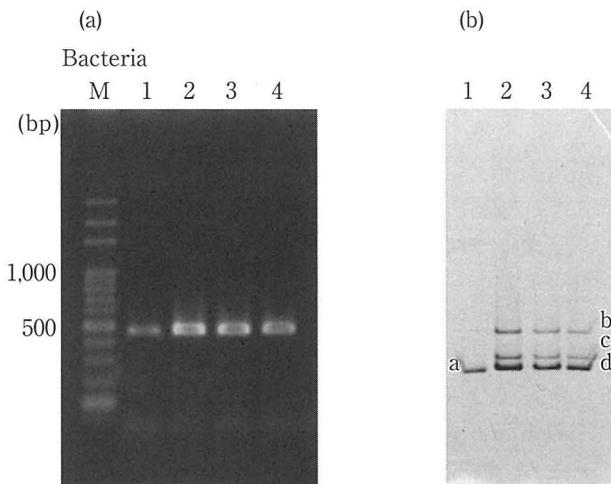


Fig. 3 Detection of contaminated microorganisms by PCR (a) and PCR-DDGE (b) method

Lane M, 100bp ladder ; 1, 0h heating insulating ; 2, 24h heating insulating ; 3, 48h heating insulating ; 4, 72h heating insulating. DGGE profile of PCR products of the cooked rice samples obtain with the bacterial universal primer set (U968 GC and R-1401). Labeled bands with letters a to d were identified to the following species: a, *Oryza sativa* ; b, c, d, *Geobacillus thermoleovorans*

クエンス解析およびデータベース上のデータとの相同性検索を行った結果、すべて*G. thermoleovorans*と99%以上の相同性を示した。この菌叢は保温72時間目においても菌叢に変化はなく安定したものであった。この結果は分離の結果を支持するものであった。なお、カビや酵母についてはPCR法にて検出されなかった（データ未掲載）。この結果より、*G. thermoleovorans*以外の微生物が変敗に関与した可能性は非常に低いと考えられた。

6. モデル試験による米飯変敗の再現実験

分離菌株が炊飯器内と同じ状況下で米飯を変敗させる

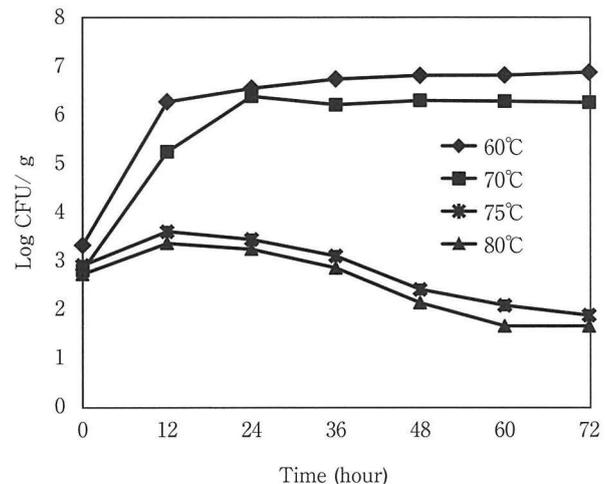


Fig. 4 Reproducibility of cooked rice deterioration by the model test

The spore of the used strain were inoculated to cooked rice and incubated at 60, 70, 75 and 80°C.

かをモデル試験にて確認した。変敗の原因となる細菌が生菌体として炊飯器内で生育していることは考えにくく、分離菌株が芽胞を形成することから本実験では培養菌体よりも芽胞を添加したほうが、より炊飯器での変敗に近い状況での再現ができると判断し、芽胞を接種後、経過を観察した。その結果、保温温度60°Cと70°Cで生菌数の増加が認められた (Fig. 4)。さらに米飯からの離水や異臭が確認され、炊飯器での変敗と同様の現象が確認された。*Bacillus*属細菌はデンプン含有する食品で増殖することにより離水現象を引き起こすことがある¹⁶⁾。今回の離水現象も同様に細菌が影響していると推察される。一方、75°Cと80°Cでは生菌数の増加や米飯からの離水は認められなかった。つまり、分離菌株が有する芽胞は保温時に発芽し、増殖することが示された。

本研究により、耐熱性芽胞を形成する好熱性細菌である *G. thermoleovorans* が米飯の変敗に関与していたことを明らかにした。これまで米飯をはじめとするデンプンを含む加工食品の汚染は、中温域 (30~37°C 付近) で良好な生育を示す、*Bacillus* 属細菌によるものが多く報告されている。米飯保温中の変敗に関与する細菌としてこれまでに *B. stearothermophilus* が報告されているが *G. thermoleovorans* の報告例はこれが初めてとなる。

炊飯器への混入経路を明らかにするために、これまで *Geobacillus* 属細菌の分離報告例のある糠をはじめとして、精米後の白米などから分離を試みたが、分離には至らなかった (データ未掲載)。本研究により、*Geobacillus* 属細菌による米飯の変敗事例に関する知見を得ることができた。これらの知見が今後、食品業界における細菌汚染事故の対策に役立てられることを期待したい。

要 約

家庭用の炊飯器にて米飯を保温するとその過程で米飯から異臭がする事例が生じた。この原因が細菌によるものと考え、変敗原因細菌の特定を試みた。培養法にて原因細菌を分離したところ、炊飯器の保温温度である60°Cで旺盛に生育する好熱性の細菌を分離した。これらは16S rRNA遺伝子に基づく系統解析とEMBL/GenBank/DBJのデータベースを用いた相同性検索から *G. thermoleovorans* であると考えられた。さらにPCR-DGGE法を用いて変敗した米飯から遺伝子レベルでの細菌の検出を行った。その結果、培養法と同様に *Geobacillus* 属細菌が検出された。以上の結果より、炊飯器の保温環境という特殊な環境に好熱性芽胞形成細菌である *G. thermoleovorans* が混入し、変敗を引き起こすとともに *G. thermoleovorans* が形成する芽胞が炊飯器内に残存することにより繰り返し、変敗が起ること考えられた。

謝 辞 本研究を遂行するにあたりご協力頂いた、川口祐来氏、島田麻央氏 (東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科) をはじめ、関係の方々に感謝申し上げます。

文 献

- 好井久雄・金子安之・山口和夫：食品微生物学ハンドブック，技報堂出版，p.322 (1995)
- 石田和夫：生米における *Bacillus cereus* の汚染実態と米飯での増殖，名古屋文理短期大学紀要，13，25~31 (1988)
- OKAHISA, N., INATSU, Y., JUNEJA, V. K. and KAWAMOTO, S.: Evaluation and control of the risk of foodborne pathogens and spoilage bacteria present in Awa-Uirou, a sticky rice cake containing sweet red bean paste, *Foodborne Pathog Dis.* 5, 351~359 (2008)
- KASAL, Y., KIMURA, B., KAWASAKI, S., FUKAYA, T., SAKUMA, K. and FUJII, T.: Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere, *J. Food Prot.*, 68, 1005~1011 (2005)
- 小田隆弘：ブドウ球菌食中毒と原因物質，月刊 HACCP, 2 (3), 67~73 (1996)
- 柳川義勢：セレウス菌食中毒，月刊 HACCP, 2 (7), 54~57 (1996)
- 松下 功・尾山祥子・城野久美子：ガス加熱の特性を活かしたガス炊飯中の米飯の保存性，防菌防黴誌, 27, 495~503 (1999)
- ZHU, H., QU, F. and ZHU, L. H.: Isolation of genomic DNAs from plants, fungi, and bacteria using benzyl chloride, *Nucleic Acids Res.*, 21, 5279~5280 (1993)
- IRISAWA, T. and OKADA, S.: *Lactobacillus sucicola* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (*Quercus* sp.) sap, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2662~2665 (2009)
- HUWS, S. A., EDWARDS, J. E., KIM, E. J. and SCOLLAN, N. D.: Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. *J Microbiol Methods.*, 70, 565~569 (2007)
- 近藤雅臣・渡部一仁：スポア実験マニュアル－微生物の芽胞・胞子の基礎研究から応用まで－，技報堂出版，p.22 (1995)
- ZARILLA, K. and PERRY, J. J.: *Bacillus thermoleovorans* sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria, *Syst. Appl. Microbiol.*, 9, 258~264 (1987)
- NAZINA, T. N., TOUROVA, T. P., POLTARAU, A. B., NOVIKOVA, E. V., GRIGORYAN, A. A., IVANOVA, A. E., LYSENKO, A. M., PETRUNYAKA, V. V., OSIPOV, G. A., BELYAEV, S. S. and IVANOV, M. V.: Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 433~446 (2001)
- CAMERON, E. J. and ESTY, J. R.: The examination of spoiled canned foods. 2. Classification of flat-sour

- spoilage organisms from non-acid foods, *J. Infect. Dis.*, **39**, 89~105 (1926)
- 15) FIELDS, M. L.: The flat sour bacteria, *Adv. Food Res.*, **18**, 163~217 (1970)
- 16) 内藤茂三: *Bacillus*属細菌による食品の変敗と防止技術, *SUNATEC e-Magazine*, **39**, 1~9 (2009)
(平成26年2月17日受付, 平成26年7月16日受理)
-