変敗した低酸性食品缶詰より分離した *Bacillus coagulans* 孢子の耐熱性

中 條 均 紀・石 津 弥 生

Heat Resistance of *Bacillus coagulans* Spores Isolated from Spoiled Canned Low-Acid Foods

Masanori NAKAJYO* and Yayoi ISHIZU*

*Horinouchi Kanzume Co. Ltd., Technology Department,
286 Horinouchi-machi, Kita Uonuma-gun, Niigata, 949-74

Bacillus coagulans is well known as a causative organism of flat-sour type spoilage of canned foods. The organism is generally considered to be an important target in heat processing not for low-acid foods (pH value is more than 4.6) but for acid foods (pH value is equal to or less than 4.6), because it can grow well in acidic foods and it had been isolated frequently from spoiled tomato products. Authors, however, isolated the organism from canned low-acid foods such as corn soup (pH 6.2), corned beef (pH 6.1), sukiyaki beef (pH 5.5) and formulated liquid meals for medical use (pH 6.3) representing flat-sour spoilage. One of the isolates grew well at 65°C. Three of four isolates examined produced spores having strong heat resistance. The D (decimal reduction time of survival spores) and z (the slope index of a thermal death time curve) values for the spores heated in 0.01 M phosphate buffer solution (pH 7.0) were 1.4 to 1.6 minutes at 121°C and 7.2 to 7.8°C, respectively. The spores showed the similar strong heat resistance also in the food substrates. The D values for the spores heated and subcultured in food substrates were 11.2 minutes at 115°C in corn soup, 4.5 minutes at 110°C in corned beef, 6.5 minutes at 115°C in sukiyaki beef, and 11.3 minutes at 115°C in formulated liquid meals for medical use. Thus, it might be difficult to inactivate the organism, maintaining desirable food quality, solely by means of heat processing.

(Received Dec. 14, 1985)

缶詰食品のフラットサワー型変敗の代表的原因菌として、*Bacillus coagulans* はよく知られている。本菌は、一般には、酸性食品 (pH 4.6 以下) の加熱殺菌の指標菌として重要視されているが、低酸性食品 (pH 4.6 以上) では、特に問題にされていない¹⁾。しかし、本菌孢子を殺菌するに充分と推察される加熱処理を施された低酸性食品缶詰においても、*B. coagulans* 類似菌によるフラットサワー型変敗が発生した。これら製品から分離した菌株の孢子は、異常に耐熱性が高いことから、その耐熱性を測定したので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株

フラットサワー型変敗を生じた缶詰から分離した4菌株 (菌株番号, 028, 110, 111 および 310) を用いた。028 株はコーンスープ缶詰 (正常品の pH は 6.2, 以下同様) 110 株はコンビーフ缶詰 (pH 6.1), 111 株は牛肉すき焼缶詰 (pH 5.5), および 310 株は療養用流動食缶詰 (主原料は牛乳, pH 6.3) から分離した。

2. 生物学的性状試験

松田ら²⁾の方法により生物学的性状を調べ、BERGEY'S Manual³⁾に従って同定した。

* 堀之内缶詰 (株) 技術部 (〒 949-74 新潟県北魚沼郡堀之内町大字堀之内286)

3. 胞子形成用培地

普通寒天培地 (栄研化学(株)製, 以下 NA-1 と略す), カルシウム・マンガニ加普通寒天培地 (NA-1 1000 ml に塩化カルシウム 0.05 g, 硫酸マンガニ 0.05 g を添加, 以下 NA-2 と略す), 土壌エキスを加普通寒天培地⁴⁾ (以下 NA-3 と略す), Polypepton peptone 寒天培地 (ポリペプトン 10 g, ペプトン 10 g, 硫酸マンガニ 0.05 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1000 ml, 以下 PA と略す), 標準寒天培地 (栄研化学(株)製, 以下 SA と略す), および Thermoacidurans 寒天培地⁵⁾ (以下 TA と略す) の平板を用いた。TA は pH 5.0, 他は pH 7.0 に調整した。

4. 胞子けん濁液の調製

供試菌株をブドウ糖ブイヨン⁶⁾ 中で 45°C, 24 時間培養し, この培養液 1 滴 (約 0.3 ml) を上記の胞子形成用培地上に滴下し, 滅菌 コンラージ氏棒で塗抹した。これを 45°C で, TA は 5 日間, その他の培地は 3 日間培養した。次に, 培地上に生育した菌苔を集め, 滅菌 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にけん濁した。得られた液を約 10°C で 5000 rpm, 5 分間遠心分離し, 上澄液を捨て, 前記緩衝液を加えてよく洗い, 再び遠心分離した。この操作を 3 回繰り返した。得られた胞子を前記緩衝液にけん濁し, 試験に供するまで冷蔵 (3°C) した。

5. 胞子の耐熱性

(1) 基礎耐熱性

胞子けん濁液を前述の緩衝液で約 10^7 /ml になるように希釈し, Thermal Death Time (以下 TDT と略す) チューブ (内径 7 mm×長さ 100 mm) に 1.5 ml ずつ分注したのち, 酸素炎で溶封した。これらを恒温油槽 ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) 中で所定時間加熱処理し, 水で急冷した。各加熱温度・時間条件に TDT チューブ 1 本を供し, その中の生残胞子数を測定した。

(2) 食品中における耐熱性

食品は供試菌株の分離源となったものと同一組成のもの (未殺菌) を用いた。コーンスープと療養用流動食はそのまま, コンビーフとすき焼きは, チョッパー (3 mm ϕ) で挽き, 均一にした。この 5 kg に胞子けん濁液 (約 10^8 /ml) 50 ml を加え, よく混和した。これを TDT 缶に一定量 (食品により 18~20 g) ずつ充填し, ホームシーマー (東洋製缶(株)製) を用い, 真空度 20 cmHg で巻締めた。これらの操作は, 品温が 10°C 以上にならないように注意して行なった。

これらの缶詰をレトルト (0.122 m³) を用い, 定温 ($\pm 1.0^\circ\text{C}$ 以内) で所定時間加熱処理したのち, 水で急

冷した。1 加熱温度・時間条件に試料 13 缶を供し, これらのうち 1 缶は内容物の温度測定に, 2 缶は生残胞子数の測定に用いた。残りの 10 缶は, 35°C で 60 日間貯蔵した。生育の有無は, 内容物の pH の低下により判定した。

加熱時間の補正は缶内の最遅速加熱点 (缶底から高さ 4 mm, 缶壁から内側へ 8 mm の点) における食品の温度履歴曲線 (直径 0.08 mm の銅・コンスタンタン製熱電対を用いて測定) に基づいて計算した補正值 (約 3.0 分) によった。

6. 生残胞子数の測定

加熱処理済み TDT チューブまたは TDT 缶の試料を, 滅菌 0.1% ペプトン水で 10 倍段階希釈し, その 1 ml を滅菌ペトリ皿にとり, あらかじめ加熱溶解して 55°C に保温しておいた Dextrose tryptone 寒天培地 (Difco 製) 約 20 ml を加え, よく混和したのち平板に固化した。これらを 45°C で 3 日間培養し, 形成した集落を数えた。1 希釈段階に平板 2 枚を用い, その平均値に基づいて生残胞子数を求めた。

加熱処理前の初発胞子数は, TDT チューブまたは TDT 缶の試料を沸騰水中で 20 分間加熱処理して胞子を活性化したのち, 上記の方法で測定した。

7. 胞子の生育温度域の測定

培地による場合には, 次の方法によった。胞子けん濁液を前記の緩衝液で胞子数 10^8 /ml になるように希釈し, 栄養細胞を殺滅するため沸騰水中で 20 分間加熱処理した。この 1 ml を, あらかじめ加熱溶解し 55°C に保温しておいた Dextrose tryptone 寒天培地 1000 ml に加え, よく混和したのち, 中試験管に分注し, 水で急冷し, 固化した。これを温度勾配培養装置 (東洋科学産業(株)製, TN-3 型) を用い, 15~67°C で 1 か月間培養した。生育の有無は肉眼により判定した。

食品により場合には, 次の方法によった。すなわち, 前記 5-(2) で調製した胞子けん濁液添加食品缶詰を, 生残胞子数約 10^8 /g が得られるような条件 (110 または 115°C, 30 分間, これらは予備試験の結果に基づき定めた) で加熱処理した。これらを 15, 20, 25, および 35°C に放置し, 一定期間ごとに試料を取り出し, 内容物の pH の変化に基づき変敗の徴候があったとき, 供試胞子が生育したとみなした。

結果および考察

1. 分離菌株の生物学的性状

分離菌株の生物学的性状は, 310 株の 65°C における

Table 1 Characteristics of the isolated Strains

Item	<i>B. coagulans</i> ^{a)}	Strain			
		028 ^{b)}	110 ^{c)}	111 ^{d)}	310 ^{e)}
Gram reaction	+	+	+	+	+
Terminal spore	V	—	—	—	—
Ellipsoidal spore	+	+	+	+	+
Swelling at sporulation	V	+	+	+	+
Acid from glucose	+	+	+	+	+
Acid from arabinose	V	+	—	+	+
Acid from mannitol	V	—	—	—	—
Acid from xylose	V	—	—	—	—
Gas from glucose	—	—	—	—	—
Alkali on citrate	—	—	—	—	—
Growth in 7% NaCl	—	—	—	—	—
Anaerobic growth	+	+	+	+	+
Acetoin from glucose	d	+	+	+	+
Nitrate to nitrite	d	+	—	+	+
Hydrolysis of casein	d	—	—	—	—
Hydrolysis of starch	+	+	+	+	+
Growth on TAA ^{f)} at 45°C	+	+	+	+	+
Growth at 65°C	—	—	—	—	+

a) BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology

b) Isolated from canned corn soup

c) Isolated from canned corned beef

d) Isolated from canned sukiyaki beef

e) Isolated from canned FM (Formulated meal consisting of milk, egg and comminuted vegetables)

f) +, Positive reaction; —, negative reaction; v, strain instability; d, 11-89% strains positive

g) Thermoacidurans agar (pH 5.0)

Table 2 The growth temperature of the isolates in dextrose tryptone agar (pH 7.0)

	Strain			
	028	110	111	310
Max. temp. (°C)	61	63	61	65
Min. temp. (°C)	18	16	16	16

生育が陽性である点を除き, *B. coagulans* のそれとよく一致した (Table 1)。BERGEY'S Manual には 65°C で生育する *Bacillus* 属細菌は, *B. stearothermophilus* しか記載がないが, HOMER ら⁷⁾ および WOLF ら⁸⁾ は, *B. coagulans* 類似株には 65°C で生育するものもあると報告している。

Table 2 に示したように, 分離菌株の最低生育温度は, Dextrose tryptone 寒天培地中では, 16~18°C であった。また, Table 3 に示したように, 食品中では,

20°C で 40 日以内に生育したが, 15°C では, 60 日後においても生育はみられなかった。

2. 基礎耐熱性

胞子の耐熱性を測定するためには, 大量の胞子が必要である。また, 得られた胞子の耐熱性があまり弱くては, 食品の加熱殺菌条件設定の基礎データとして役に立たない。そこで, 種々の培地を用い, 胞子の形成量と耐熱性を比較した。供試培地のうち, i) NA-1 は, *Bacillus* 属細胞の胞子形成に一般的に用いられているものである。ii) NA-2 は, NA-1 にマンガン塩とカルシウム塩を加えたものである。マンガン塩は胞子形成を促進し⁹⁾, カルシウム塩は胞子の耐熱性を強くする¹⁰⁾ といわれている。iii) NA-3 は, NA-1 に土壌のエキスを加えたものである。松本ら⁴⁾ は, 本培地を用いると *B. coagulans* の胞子の収量が増え, 耐熱性も強くなると報告している。iv) PA は, 著者らが *B. stearothermophilus*

Table 3 The growth temperature of the isolates in the food substrate

Incubation time (day)	Strain															
	028 ^{a)}				110 ^{b)}				111 ^{c)}				310 ^{d)}			
	Incubation temperature (°C)															
	15	20	25	35	15	20	25	35	15	20	25	35	15	20	25	35
5	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	+	+
10	—	+	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+
40	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+
60	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+

The test was conducted;

^{a)} in corn soup (pH 6.2) with initial spores of 1.8×10^8 /g

^{b)} in corned beef (pH 6.1) with initial spores of 2.5×10^8 /g

^{c)} in sukiyaki beef (pH 5.5) with initial spores of 9.5×10^8 /g

^{d)} in FM (pH 6.3, see Table 1) with initial spores of 1.7×10^8 /g

の孢子形成用培地として常用しているものである。v) SA では、*Bacillus* 属細菌が一般的によく孢子を形成することを、著者らは経験している。vi) TA は、National Canners Association, Research Laboratory^{b)} が、*B. coagulans* の孢子形成用培地として推奨しているものである。

各培地で得られた孢子の収量を Table 4 に示した。どの菌株に対しても最もよい培地は、SA であった。TA 上では、110 株と 310 株はよく孢子を形成したが、028 株と 111 株の孢子形成量は著しく少なかった。その他の培地上においても分離菌株は、いずれもよく孢子を形成した。

Table 4 Sporulation of the isolates

Medium	Strain			
	028	110	111	310
NA-1 ^{b)}	$9.6 \times 10^{6a)}$	1.4×10^7	2.9×10^8	2.1×10^8
NA-2 ^{c)}	4.9×10^7	3.0×10^7	4.8×10^8	1.2×10^8
NA-3 ^{d)}	1.0×10^8	3.3×10^7	3.3×10^8	2.9×10^8
PA ^{e)}	3.3×10^8	2.9×10^7	4.3×10^8	2.5×10^7
SA ^{f)}	6.5×10^8	1.4×10^9	1.5×10^8	1.2×10^9
TA ^{g)}	3.5×10^4	4.2×10^8	3.5×10^4	7.4×10^8

^{a)} Number of spores harvested/plate

^{b)} Nutrient agar (Eiken)

^{c)} Nutrient agar containing CaCl_2 0.05 g/l and MnSO_4 4~6 H_2O 0.05 g/l

^{d)} Nutrient agar containing soil extract

^{e)} Polypepton peptone agar

^{f)} Standard agar (Eiken)

^{g)} Thermoacidurans agar (Proteose peptone acid agar)

得られた孢子の耐熱性を Table 5 に示した。耐熱性は D 値 (一定温度で加熱処理したとき、生残孢子数が 10 分の 1 に減少するに要する時間、生残曲線の勾配に基づき算出した。) で示した。孢子形成に用いた培地によって、D 値に著しい差異が認められたが、どの菌株にも共通する一定の傾向はなかった。最も耐熱性の強い (最大 D 値の) 孢子が得られたのは、028 株および 111 株では PA、110 株では NA-2、また 310 株では TA であった。これらの培地では、孢子の収量もよかった (Table 4)。

そこで、以下の試験では、028 株および 111 株では PA により、110 株では NA-2 により、310 株では TA により得られた孢子を用いた。

0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における分離菌株孢子の耐熱性を Table 6 に示した。 z 値 (D 値の 10 倍の変化に対応する温度変化) は、D 値の対数と加熱温度

Table 5 The D value of spores of the isolates in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)

Sporulating medium	Strain			
	028	110	111	310
NA-1 ^{c)}	6.5 ^{a)}	5.6 ^{b)}	8.0 ^{a)}	8.0 ^{a)}
NA-2 ^{d)}	7.3	10.8	9.7	8.1
NA-3 ^{e)}	7.5	9.4	9.7	7.6
PA ^{f)}	11.2	6.7	10.1	6.5
SA ^{g)}	5.1	3.2	3.5	4.1
TA ^{h)}	2.9	6.0	4.9	10.9

^{a)} D (min.) at 115°C

^{b)} D (min.) at 110°C

^{c), d), e), f), g), and h), see Table 4.}

Table 6 Heat resistance of spores of the isolates in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)

Heating temp. (°C)	Strain			
	028 D (min) z (°C)	110 D (min) z (°C)	111 D (min) z (°C)	310 D (min) z (°C)
106		28.7		
109		12.5		
112	22.3	4.4	22.4	22.6
115	9.9	1.7	9.8	10.4
118	4.1		3.1	3.8
121	1.6		1.4	1.6

との回帰曲線（ここには示さない）に基づき算出した。分離菌株のうち 028, 111 および 310 の 3 株の孢子は、 $D_{110^\circ\text{C}}$ 値 22.3～22.6 分であったが、110 株のそれは 4.4 分であった。 z 値は 4 株ともほぼ同一の 7.2～7.8°C であった。

過去には、トマト加工品など酸性食品缶詰由来 *B. coagulans* の孢子では、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における $D_{110^\circ\text{C}}$ 値が 0.20～0.65 分¹¹⁾¹²⁾¹³⁾ と報告されている。また、低酸性食品では、ほうれんそう缶詰由来株の $D_{110^\circ\text{C}}$ 値が 2.4 分¹⁴⁾、クリーム状コーンスープ缶詰由来株のそれが 6.1 分¹⁵⁾、包装餅（プラスチック容器）由来株のそれが 10 分¹⁶⁾ であったと報告されている。標準菌株の場合、*B. coagulans* (IAM 1115, ATCC 7050) 孢子の $D_{110^\circ\text{C}}$ 値が 12 分であったとの報告⁴⁾ がある。著者らの分離菌株のうち、028, 111 および 310 の 3 株の孢子は、 $D_{110^\circ\text{C}}$ 値が 42～43 分と推定されるので、過去の報告に比較すると著しく耐熱性が強い。

z 値については過去に報告が少ないが、芝崎¹⁷⁾ は *B. coagulans* の孢子の z 値が 8.0～8.6°C、また、*B. coagulans* と類似性の高い *B. stearothermophilus* のそれが 7～8°C と述べている。これらは、本菌孢子の z 値 7.2～7.8°C とほぼ一致している。

分離菌株のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における $D_{121^\circ\text{C}}$ 値は、1.4～1.6 分であった。缶詰食品の加熱殺菌条件を設定する場合には、A および B 型ボツリヌス菌孢子を除く、一般の耐熱性細菌孢子を指標とすると、 D 値の 5 倍に相当する加熱処理をすればよいとされている。したがって、ここに分離されたような耐熱性の強い *B. coagulans* の孢子を殺滅するには、121°C で 7～8 分に相当する殺菌加熱処理をする必要がある。

ここに分離された菌株の孢子の z 値は、7.2～7.8°C であった。低酸性食品缶詰の加熱殺菌効果は、一般に、

F_0 値 ($z=10^\circ\text{C}$ と仮定して算定したとき、食品の中心が 121°C で加熱処理されたのに相当する時間) で評価されているが、分離菌株の孢子を殺滅するのに F_0 値を 7～8 分とすると殺菌不足を招く恐れがある。したがって、 F_0 値で評価するには、補正が必要である。松田¹⁸⁾ らの補正法によるならば、 F_0 値は 30～40 分 ($D_{100^\circ\text{C}} \times 5 \times 10^{(100-121)/10}$) となる。つまり、*B. stearothermophilus* を殺滅するために必要な加熱時間¹⁹⁾ と同程度の厳しい殺菌加熱処理を要することになる。

3. 食品中における耐熱性

食品中における分離菌株孢子の耐熱性は、2 種類の方法により測定した。一つは、孢子を食品中で加熱処理したのち、Dextrose tryptone 寒天培地を用い、食品中の生残孢子数を測定する方法（以下方法 I と略す）、他は、加熱処理後の食品をそのまま恒温貯蔵し、フラットサワー型変敗の発生の有無により測定する方法（以下方法 II と略す）である。 D 値は、方法 I による場合には、生残曲線の勾配に基づき算出した。方法 II による場合には、次の一般式によった。

$$D = \frac{U}{\log a - \log b}$$

但し、 U 、加熱処理時間

a 、加熱処理前の孢子数/缶

b 、変敗缶数/供試缶数（ここでは 10 缶）

得られた結果を Table 7 に示した。方法 I と方法 II により得られた D 値は、110 株を除きほぼ同じであった。110 株では差異がみられ、前者による $D_{110^\circ\text{C}}$ 値が 6.9 分、後者によるそれが 4.5 分であった。リン酸緩衝液中で加熱処理したとき、異常に強い耐熱性を示した 028, 111 および 310 株の孢子 (Table 6) は、食品中においても、緩衝液中とはほぼ同程度の強い *B. coagulans* 孢子を殺滅しうるような殺菌処理を施せば、製品はもは

Table 7 The D values of spores of the isolates suspended in the food substrates

Strain	Heating medium (pH)	Heating temp. (°C)	Recovery medium	
			Dextrose tryptone	Food substrate
028	Corn soup (6.2)	115	10.2 ^{a)}	11.2
110	Corned beef (6.1)	110	6.9	4.5
111	Sukiyaki beef (5.5)	115	7.3	6.5
310	FM ^{b)} (6.3)	115	10.6	11.3

^{a)} D (min)^{b)} See Table 1.

や食用に耐えないものとなろう。したがって、本菌による低酸性食品缶詰のフラットサワー型変敗を加熱処理によってのみ防止するのは困難なので、i) 本菌孢子による汚染のない原材料を用いる、ii) 食品の pH または水分活性を調節する、あるいは iii) 保存料を添加するなど、何らかの補助的手段が必要であろうと思われる。

要 約

フラットサワー型変敗を起こしたコーンスープ、コンビーフ、牛肉すき焼、および療養用流動食の缶詰から *B. coagulans* 類似菌が分離された。これらの中には 65°C で生育するものもあった。分離した4菌株のうち3菌株の孢子は、異常に耐熱性が強く、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中では、121°C における D 値が 1.4~1.6 分、z 値が 7.2~7.8°C であった。これらの孢子は分離源となった食品中においてもほぼ同一の強い耐熱性を示した。

終わりに、本報告をまとめるにあたり、ご助言を賜った、社団法人日本缶詰協会研究所、松田典彦氏に感謝する。

文 献

- 1) STUMBO, C. R.: Thermobacteriology in Food Processing, 2nd ed., (Academic Press, New York), p. 111, 113 (1973).
- 2) 松田典彦・駒木 勝・市川良子・後藤幸恵: 日食工誌, **32**, 399 (1985).
- 3) BREED, R. S., et al.: BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. (The Williams and Wiking Co.), (1974).
- 4) 松本直起・松田典彦・掛川洋子: 缶詰時報, **57**, 159 (1978).
- 5) National Canners Association: Laboratory Manual for Food Canners and Processors, (AVI Publ. Co.), p. 22, 166 (1968).
- 6) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針 I, ((社)日本食品衛生協会), p. 93 (1973).
- 7) HOMER, W. WALKER: Food Microbiology, (Mc Graw Hill), p. 367 (1973).
- 8) WOLF, J., and BARKAR, A. N.: Identification Methods for Microbiologists, (Academic Press), p. 93 (1968).
- 9) AMAHA, M., ORDAL, Z. J., and TOUDA, A.: J. Bacteriol., **72**, 34 (1956).
- 10) 蜂須賀養悦・堀越弘毅: 耐久型細胞, (岩波書店), p. 210 (1976).
- 11) AMAHA, M., and ORDAL, Z. J.: J. Bacteriol., **74**, 596 (1957).
- 12) FRANK, H. A., and CAMPBELL, L. L. Jr.: Appl. Microbiol., **5**, 243 (1957).
- 13) YORK, G. K., HEIL, J. R., MARSH, G. L., ANSAR, A., MERSON, R. L., WOLCOTT, T., and LEONARD, S.: J. Food Sci., **40**, 764 (1975).
- 14) PUT, H. M. C. and WYBINGA, S. J.: J. Appl. Bacteriol., **26**, 428 (1963).
- 15) FEIG, S., and STERSKY, A. K.: J. Food Sci., **46**, 135 (1981).
- 16) 山口尹通・生島文雄・小松美博・岸本 昭: 日食工誌, **18**, 84 (1971).
- 17) 芝崎 勲: 新・食品殺菌工学, (光琳)p. 88 (1983).
- 18) 松田典彦・駒木 勝・松縄桂子: 缶詰時報, **61**, 832 (1982).
- 19) REED, J. M., BOHRER C. W. and CAMERSON, E. J.: Food Res., **16**, 383 (1951).

(昭和59年12月14日受理)