加熱損傷を受けた *Clostridium botulinum* および *C. sporogenes* 芽胞の再生用培地について

(昭和 54 年 12 月 14 日受理)

駒 木 勝* 松 田 典 彦* 松 縄 桂 子*

Survey of Media Promoting the Recovery of Heat-damaged Spores of *Clostridium botulinum* and *C. sporogenes*

Masaru KOMAKI, Norihiko MATSUDA and Keiko MATSUNAWA

(The Canners Association of Japan, Research Laboratory:
460 Kariba-cho, Hodogaya-ku, Yokohama)

Spore counting media were compared for effect on the recovery of non-heat-treated and heat-treated spores of *Clostridium botulinum* and *C. sporogenes*. The spore count obtained with each of eight kinds of media was compared with that recovered with pork pea infusion agar (PPI). No difference was observed among the media in the recovery count of non-heat-treated spores. With heat-treated spores, however, the spore count recovered with yeast extract agar was largest, and was comparable to that recovered with PPI.

As regards reducing agent added to the recovery medium, no significant difference was observed between sodium thioglycollate and L-cysteine monohydrochloride. No inhibitory effect was observed when the reducing agent was added to the medium before autoclaving.

(Received December 14, 1979)

常温流通する容器詰低酸性食品には、少なくともボツリヌス菌芽胞を殺滅しうる加熱殺菌処理を施さなければならない。このようなところから、ボツリヌス A, B 型菌、または毒素産生能がないという点を除き生化学的性状が本菌に類似している *Clostridium sporogenes* の芽胞を食品に接種して耐熱性を測定し、得られた結果を基礎に食品の加熱殺菌条件を決定することがしばしば行われる。加熱損傷を受けた芽胞は発育しにくいので、この種の試験において、加熱処理後の生残芽胞数測定に性能の劣る培地を用いると、得られる生芽胞数がより少なくなり、結果的に芽胞の熱抵抗力をより弱く見誤る。

現在では、加熱処理後の嫌気性タンパク分解細菌芽胞数測定用寒天培地としては、Andersen¹⁾ の Pork pea infusion 寒天培地が最もよいとされている^{2), 3)}。しかし本培地は調製に手間どるため、より調製が容易で、しかもこれに比肩しうる性能を有する培地を捜す努力が重ねられている^{4)~6)}。

著者らは、過去の研究で *Clostridium* 属細菌の生芽胞数測定によいと報告されている 6 種類および常用される 2 種類の培地の性能を比較したので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

National Food Processors Association 西部研究所より分与された *Clostridium botulinum* 62A, 東海区水産研究所横関源延博士より分与された *C. botulinum* A90, B1G4 (以上 A 型), Lamanna, 169B, 213B (以上 B 型), および当研究所保存の *C. sporogenes* ATCC 19404, ATCC7955, PA3679NCA, PA3679JCA の 10 株を用いた。

2. 芽胞液の調製

芽胞を含む供試菌株の培養液 1 ml を中試験管に分注した GAM 半流動高層培地 (日水製薬 (株) 製) 10 ml に接種し、80° で 20 分間加熱処理して栄養細胞を殺滅し、芽胞を活性化した後 35° で 1 夜培養した。この全量を 2L 容三角フラスコに収容した 5% polypeptone 培地⁷⁾ (バクト・ペプトン 50 g, バクト・トリプトン 10 g, ゼ

* (社)日本缶詰協会研究所: 横浜市保土ヶ谷区狩場町 460

ラチン末 10 g, ブドウ糖 0.5 g, クエン酸ナトリウム 3 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.5 g, 炭酸カルシウム 1 g, 脱イオン水 1,000 ml, pH 7.0) 1 L に無菌的に投入し, 滅菌流動パラフィンを重層した後, 35° で培養した。

芽胞形成を鏡検により確認した後, 培養液 1 L 全部を滅菌ガーゼでろ過して粗大粒子を除去し, ろ液を滅菌 50 ml 容ふた付遠沈管にとり, 5° で, 3000G, 10 分間遠心分離して芽胞を濃縮した。ついで, 遠沈管に滅菌ガラス玉約 20 個を投入し, 滅菌 M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を適量加え, よく振とうした後, 再び上記の条件で遠心分離し, 上澄を滅菌駒込ピペットでとり, 捨てた。このよきな洗浄および遠心分離操作を 5 回繰り返した後, 得られた芽胞を上記緩衝液に浮遊させた。これを滅菌 50 ml 容ホモジナイザーカップに移し, 芽胞塊を破壊するためホモジナイズした後, 滅菌小試験管に 2 ml 宛分注した。これを 80° で 20 分間加熱処理して栄養細胞を殺滅した後, -20° に凍結保存しておき, 用に臨み解凍して用いた。

3. 培地の調製

1) Pork pea infusion 寒天培地⁹⁾ (以下 PPI と略す)

豚肉エキス; 脂肪を除去した豚ひき肉 400 g を水 1,000 ml 中に投入し, かくはんしながら約 1 時間沸騰させた。これをガーゼ, ついで脱脂綿でろ過して粗大粒子を除去した。ろ液を約 0° で 1 夜放置し, 脂肪を固化させ, これを脱脂綿でろ過してろ液を得た。

エンドウ豆エキス; 乾燥エンドウ豆 (アラスカ種) 100 g を水 1,000 ml 中に投入し, 一夜放置した。これを約 1 時間沸騰した後, 脱脂綿でろ過し粗大粒子を除去した。

豚肉エキス 800 ml, エンドウ豆エキス 200 ml を合わせ, これにバクト・ペプトン 5 g, バクト・トリプトン 1.5 g, リン酸二カリウム 1.25 g, 可溶性デンプン 1 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.5 g, 寒天末 20 g を加熱溶解し, pH 7.0 に調整した。これを 2 L 容ビーカーに収容して, アルミホイルでおおい, 121° で 1 時間高圧加熱した後, 室温で一夜放置し, 固化した。ついで, ビーカーを倒立させ, 培地を取り出し, 沈殿物層を包丁で切り捨て, 残りをさいの目に切り, ビーカーに収容し, 加熱溶解した後, 500 ml 容培地びんに収容し, 121° で 30 分間高圧殺菌した。

2) Pea infusion 寒天培地 (以下 PIA と略す)

エンドウ豆エキス 1,000 ml にバクト・ペプトン 5 g, バクト・トリプトン 1.5 g, 可溶性デンプン 1 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.5 g, 寒天末 20 g を加熱溶解し, pH を調整せず, 500 ml 容培地びんに収容し, 121° で 30 分間高圧殺菌した。

3) Modified Angelotti 寒天培地 (以下 MAA と略す)

バクト・トリプトン 15 g, 酵母エキス 10 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.6 g, L-システイン塩酸塩 0.1 g,

寒天末 20 g を脱イオン水 1,000 ml に加熱溶解した。これを pH 7.0 に調整した後, 500 ml 容培地びんに収容し, 121° で 20 分間高圧殺菌した。

4) Reinforced Clostridium 寒天培地 (以下 RCM と略す)

バクト・トリプトン 10 g, 肉エキス末 (Lab-lemco powder) 10 g, 無水酢酸ナトリウム 5 g, 酵母エキス 1.5 g, L-システイン塩酸塩 0.5 g, 可溶性デンプン 1 g, 寒天末 20 g を脱イオン水 1,000 ml に加熱溶解した。以下 3) に同じ。

5) 酵母エキス寒天培地 (1)^{4), 6)} (以下 YEA-1 と略す)

酵母エキス 10 g, リン酸二カリウム 2 g, 可溶性デンプン 1 g, 寒天末 20 g を脱イオン水 1000 ml に加熱溶解した。以下 3) に同じ。

6) 酵母エキス寒天培地 (2) (以下 YEA-2 と略す)

上記 YEA-1 にチオグリコール酸ナトリウム 1.35 g を加えた。

7) T best 寒天培地⁹⁾ (以下 T best と略す)

バクト・トリプトン 10 g, 酵母エキス 1 g, 可溶性デンプン 1 g, リン酸二カリウム 1.25 g, 肉エキス (極東製薬 (株) 製) 3 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.5 g, 寒天末 20 g を脱イオン水 1,000 ml に加熱溶解した。以下 3) に同じ。

8) Trypticase peptone 寒天培地 (以下 TPA と略す)

トリプティケース (BBL) 50 g, バクト・ペプトン 5 g, チオグリコール酸ナトリウム 1 g, 寒天末 20 g を脱イオン水 1,000 ml に加熱溶解した。以下 3) に同じ。

9) 変法 TGC 寒天培地 (以下 TGCA と略す)

変法 TGC 培地 (日水製薬 (株) 製) 30 g, 寒天末 20 g を脱イオン水 1,000 ml に加熱溶解した。pH は修正しなかった。以下 3) に同じ。

培地調製時にすべての培地びんにテフロン被覆マグネチック・スターリング・バー 1 本を投入しておいた。使用時に上記培地を加熱溶解し, すべての培地 500 ml に対しろ過滅菌した 10% 炭酸水素ナトリウム溶液 5 ml を無菌的に加え, マグネチック・スターラーでかくはんした後, 55° に保持した。ただし, YEA-1 には, 培地 500 ml に対しろ過滅菌した 10% チオグリコール酸ナトリウム液 6.3 ml をも加えた。

4. 芽胞の加熱処理

上記芽胞液 1 ml を滅菌 M/15 リン酸緩衝液 100 ml で希釈した後, これらを滅菌硬質ガラス製小試験管 (内径 7 mm, 外径 9 mm, 長さ 15 cm) に 2 ml 宛分注し, 酸素炎で溶封した。これらを恒温油槽 ($\pm 0.1^\circ$, サーモニクス (株) 製エパボレスを使用) 中で所定時間加熱した後, 流水で急冷した。正確な加熱時間を求める必要はないので, 加熱時間は補正しなかった。

5. 生芽胞数の測定

加熱処理した芽胞液 1 ml を滅菌 0.1% ペプトン水で 10 倍段階希釈した。上記培地 10 ml を滅菌アナエロビック・パウチ (勝見薬品商会製) 1 枚にとり、上記希釈芽胞液 1 ml を加え、よく混和し、平板に固化した後、30° で 7 日間培養した。1 希釈段階に平板 2 枚を用い、各平板に形成した集落数 11~200 個のものを数え、その平均値を生芽胞数とした。

結果および考察

1. 各種再生用培地の性能の比較

供試培地の PIA は、PPI から豚肉エキスをリン酸二カリウムを除いた培地で、調製時に沈殿物を生じないので PPI に比較して調製が容易であるため用いた。MAA は Greenberg ら⁹⁾ が生鮮食肉中の嫌気性タンパク分解細菌芽胞数を測定するのに性能がよいと報告している。RCM は、Gibbs ら^{10), 11)} が *Clostridium* 属細菌数の測定には PPI と同程度によいと報告し、欧州で常用されている。YEA-1 は Odlaug ら⁹⁾ が加熱損傷ボツリヌス菌芽胞の再生用培地としては PPI より優れていると報告している。YEA-2 は、YEA-1 が還元剤チオグリコール酸ナトリウムを加熱殺菌後の培地に添加するので、比較のため、常法通り同物質を加熱殺菌前の培地に加えたものである。T best は、Wheaton ら⁹⁾ が、天然物エキスをを用いず、市販培地材料のみで調製した培地の中では最も優れていると報告している。TPA および TGCA は嫌気性細菌数測定に常用される培地である。

これらの培地を用いて測定した嫌気性タンパク分解細菌芽胞数および培地の性能の比較を Table 1, 2 および 3 に示した。無加熱 (Table 1) とは、致死効果のある温度域で加熱処理していないことであり、芽胞を活性化するため、80° で 20 分間加熱処理した。強度の加熱 (Table 3) とは、予備実験により決めた、生芽胞数が約 10²/ml に減少する程度の加熱処理であり、中等度の加熱 (Table 2) とは、強度の加熱の 3 分の 1 の時間の加熱処理である。

培地の性能は、PPI により得られた生芽胞数に対する各培地のその比 (R) を求め、R 値の分布により比較した。無加熱芽胞では、いずれの培地でも R 値が 0.5~1.9 の範囲内にあり、培地間に性能の差は認められなかった (Table 1)。中等度の加熱処理をした芽胞では、YEA-1 および YEA-2 が優れていた (Table 2)。R 値を分散分析した結果、PIA, RCM, TPA および TGCA は PPI に比較して明らかに劣ることが示された。強度の加熱処理をした芽胞では、YEA-1 が PPI よりも優れた結果を示したが、有意差は認められなかった (Table 3)。ついで、YEA-2, T best がよく、MAA がやや劣るが、これらと PPI との間に有意差は認められなかった。中等度の加熱処理をした場合と同様に、PIA, RCM, TPA および TGCA は明らかに劣ることが示された。

以上の結果から、加熱処理をした嫌気性タンパク分解細菌芽胞の再生用培地としては YEA 培地が優れていることがわかった。

再生用寒天培地の性能は、測定値のみによって比較するだけでなく、集落の判別が容易であるかどうかによっても比較する必要がある。PPI においては供試菌株の大半が球状のしっかりした集落を形成し、ガス発生による培地の亀裂発生が少ないため集落の読み取りが容易であった。これに対して YEA-1 および 2 では、菌株によって集落が円盤状に拡散し、集落を数えにくいものがあった。RCM は細菌の発育に伴い培地の一部が黒変するため、T best および TGCA はガス発生による亀裂を生じやすいため、集落を数えにくかった。

上記培地のほか、GAM 寒天培地 (日水製薬 (株) 製) および TEP 寒天培地 (栄研化学 (株) 製) を試験したが、これらの培地は供試菌株が産生するガスにより亀裂を生じ、集落を数えることができなかった。

2. 還元剤の種類と添加方法の違いが培地の性能に及ぼす影響

嫌気性細菌用培地に添加する還元剤としてはチオグリコール酸ナトリウムまたはシステインが用いられるが、歴史的には前者が長く、より一般的である。Hirsch ら¹²⁾ および Mossel ら¹³⁾ は、チオグリコール酸ナトリウムが *Clostridium* 属細菌芽胞の発芽を阻害することを示し、還元剤としてはシステインを用いるべきであると報告した。しかし現在でも前者を用いる研究者は多い。また Odlaug ら⁹⁾ は、YEA-1 を調製するのに、通常加熱殺菌前に加えるチオグリコール酸ナトリウムを、わざわざろ過滅菌して加熱殺菌後に加えている。しかもその量が通常添加される量 (0.5 g/L) の約 2 倍 (1.25 g/L) である。

このようなところから、YEA の組成にチオグリコール酸ナトリウムまたは L-システイン塩酸塩を、加熱前または加熱後に添加し、これらのちがいが培地の性能に及ぼす影響を検討した。芽胞は強度の加熱処理をしたものをを用いた。結果を Table 4 に示した。

培地の性能は、Odlaug ら⁹⁾ のろ過滅菌したチオグリコール酸ナトリウム 1.25 g/L を含有する YEA-1 により得られた生芽胞数に対する各培地のその比 (R) を求め、R 値の分布により比較した。その結果、チオグリコール酸ナトリウムの添加量のちがいが (1.25 g/L および 0.5 g/L) および各還元剤の添加方法のちがいは培地の性能に影響を及ぼさなかった。チオグリコール酸ナトリウムとシステインでは前者の方が良い成績を得ているが、R 値の分散分析の結果、両者間の危険率 P は 0.3~0.4 であり、有意差は認められなかった。

これらのことから、加熱処理した嫌気性タンパク分解細菌芽胞の再生用培地には、1) 還元剤としてチオグリコール酸ナトリウムを用いても特に問題ないこと、2)

Table 1. Recovery Count of Putrefactive Anaerobe's Spores, Not Heated

Recovery medium	<i>C. botulinum</i>						<i>C. sporogenes</i>				R ^{a)}			
	Type A			Type B			ATCC 19404	ATCC 7955	PA3679 (NCA)	PA3679 (JCA)	More than 2.0	1.0 to 1.9	0.5 to 0.9	Less than 0.5
	62A ($\times 10^6$)	A90 ($\times 10^7$)	B1G4 ($\times 10^6$)	Lamanna ($\times 10^7$)	169B ($\times 10^6$)	213B ($\times 10^7$)	($\times 10^6$)	($\times 10^7$)	($\times 10^5$)	($\times 10^4$)				
PPI (Ref.)	6.7 ^{b)}	1.2	8.2	0.9	3.1	1.3	1.5	4.7	1.5	2.4	—	—	—	—
PIA	4.4	1.3	7.1	1.1	2.7	1.4	1.6	5.6	0.9	2.2	0 ^{c)}	5	5	0
MAA	7.9	1.3	7.0	1.1	3.1	1.4	1.7	5.3	1.9	2.6	0	9	1	0
RCM	4.9	1.1	6.8	1.1	2.7	1.2	1.8	4.0	1.6	2.0	0	3	7	0
YEA-1	6.9	1.2	7.7	1.2	2.8	1.5	1.9	5.3	1.7	2.9	0	8	2	0
YEA-2	7.2	1.3	8.1	1.0	2.6	1.5	1.9	6.0	1.6	2.9	0	8	2	0
T best	5.6	1.3	7.8	1.2	2.9	1.4	1.7	4.8	1.2	2.8	0	6	4	0
TPA	6.1	1.3	8.6	1.2	3.0	1.3	2.1	5.6	2.2	2.7	0	8	2	0
TGCA	4.7	1.1	5.8	1.1	2.0	1.4	1.7	4.8	1.1	2.6	0	5	5	0

^{a)} R=Number of spores recovered/Number of spores recovered with PPI
^{b)} Number of spores recovered
^{c)} Number of strains

Table 2. Recovery Count of Putrefactive Anaerobe's Spores, Mildly Heated

Recovery medium	<i>C. botulinum</i>				<i>C. sporogenes</i>				R ^{a)}			
	Type A		Type B		ATCC 19404 ($\frac{10}{100}$) ($\times 10^3$)	ATCC 7955 ($\frac{10}{100}$) ($\times 10^4$)	PA3679 (NCA) ($\frac{10}{110}$) ($\times 10^3$)	PA3679 (JCA) ($\frac{10}{105}$) ($\times 10^3$)	More than 2.0	1.0 to 1.9	0.5 to 0.9	Less than 0.5
	62A ($\frac{5}{100}$) ($\times 10^4$)	A90 ($\frac{5}{100}$) ($\times 10^4$)	BiG4 ($\frac{5}{105}$) ($\times 10^4$)	Lamanna ($\frac{10}{100}$) ($\times 10^4$)	169B ($\frac{10}{100}$) ($\times 10^3$)	213B ($\frac{10}{105}$) ($\times 10^4$)						
PPI (Ref.)	24 ^{c)}	120	31	50	8.1	25	42	29	6.5	7.7	—	—
PIA	1	10	8	6	2.1	10	6	18	2.3	5.1	0 ^{d)}	8 ^{**e)}
MAA	8	36	14	23	4.4	15	18	13	8.9	6.8	0	3
RCM	5	24	6	14	4.3	7	21	20	6.6	6.5	0	5*
YEA-1	23	80	10	39	6.8	20	45	36	9.1	9.0	0	1
YEA-2	10	69	8	27	5.5	14	40	38	8.3	7.6	0	2
T best	11	37	15	24	2.3	17	41	52	6.2	7.6	0	5
TPA	2	3	2	4	1.5	1	7	6	6.3	4.2	0	8**
TGCA	2	2	2	3	1.2	1	6	4	3.1	3.0	0	10**

a) R=Number of spores recovered/Number of spores recovered with PPI

b) Time-temperature(min./°C) for heat treatment

c) Number of spores recovered

d) Number of strains

e) * and ** are significant difference from PPI at the 5% and 1% levels, respectively.

Table 3. Recovery Count of Putrefactive Anaerobe's Spores, Severely Heated

Recovery medium	<i>C. botulinum</i>						<i>C. sporogenes</i>				<i>R^a</i>			
	Type A			Type B			ATCC 19404	ATCC 7955	PA3679 (NCA)	PA3679 (JCA)	More than 2.0	1.0 to 1.9	0.5 to 0.9	Less than 0.5
	62A ^{b)} $\left(\frac{15}{100}\right) (\times 10^2)$	A90 $\left(\frac{15}{100}\right) (\times 10^3)$	BIG4 $\left(\frac{15}{105}\right) (\times 10^2)$	Lamanna $\left(\frac{30}{100}\right) (\times 10^2)$	169B $\left(\frac{30}{100}\right) (\times 10^2)$	213B $\left(\frac{30}{105}\right) (\times 10^3)$	$\left(\frac{30}{100}\right) (\times 10^2)$	$\left(\frac{30}{100}\right) (\times 10^2)$	$\left(\frac{30}{110}\right) (\times 10^2)$	$\left(\frac{30}{105}\right) (\times 10^2)$				
PPI (Ref.)	50 ^{c)}	39	4.5	2.6	51	7.5	1.7	2.2	3.6	7.6	—	—	—	—
PIA	15	6	<1.0	<1.0	6	6.5	<1.0	1.4	1.8	1.5	0 ^{d)}	0	3	7 ^{***e)}
MAA	15	12	1.1	<1.0	14	7.5	<1.0	1.8	3.2	3.1	0	1	2	7
RCM	<1	<1	<1.0	<1.0	<1	6.9	<1.0	<1.0	1.4	1.8	0	0	1	9 ^{**}
YEA-1	78	46	9.8	5.5	100	6.8	2.1	3.0	6.9	9.3	2	7	1	0
YEA-2	57	42	5.9	2.7	67	7.7	2.1	1.9	4.1	7.2	0	8	2	0
T best	39	23	4.7	1.2	27	5.6	1.7	2.4	3.3	4.9	0	3	6	1
TPA	6	3	<1.0	<1.0	3	4.7	<1.0	1.0	3.5	3.2	0	0	2	8 ^{**}
TGCA	27	5	2.7	1.1	4	6.2	<1.0	1.6	1.6	3.5	0	0	4	6 ^{**}

a), b), c), d), e), See Table 2

Table 4. Effect of Reducing Agents and of Addition Methods of the Agent on Recovery Count of Putrefactive Anaerobe's Spores, Severely Heated

Reducing agent (g/L)	<i>C. botulinum</i>				<i>C. sporogenes</i>		R ^{a)}	
	Type A		Type B		ATCC 19404	PA3679 (NCA)	More than 2.0	Less than 0.5
	A90 ($\frac{15}{100}$) ^{b)}	B1G4 ($\frac{15}{100}$)	Lamanna ($\frac{30}{100}$)	213B ($\frac{30}{105}$)				
Sodium thioglycollate	18 ^{e)}	500	12	60	150	25	4.1	3.1
AS ^{e)} (1.25)							—	—
AS (0.50)	24	440	10	63	180	29	3.7	2.1
BS ^{d)} (0.50)	22	530	8	50	170	25	3.9	4.6
L-cysteine monohydrochloride								
AS (0.50)	8	250	2	21	90	22	2.9	4.9
BS (0.50)	14	270	5	33	190	23	3.4	2.5

^{a)} R = Number of spores recovered/Number of spores recovered with the medium containing filter sterilized sodium thioglycollate (1.25 g/L)

^{b)} See Table 2

^{c)} Filter sterilized reducing agent was added to the medium which had been sterilized

^{d)} Reducing agent was added to the medium before heat sterilization

^{e)} Number of spores recovered; $\times 10^2$

^{f)} Number of strains

Basic medium used was YEA.

添加量は常法通り培地 1 L 当たり 0.5 g でよいこと, 3) 常法通り加熱殺菌前に添加してもよいことがわかった。

要 約

各種培地を用いて, 加熱処理した *C. botulinum* A, B 型, および *C. sporogenes* の芽胞数を測定し, 性能を比較したところ次のことがわかった。

1) Odlaug ら⁶⁾ の YEA-1 培地は PPI と同等に優れていること。

2) 培地に添加する還元剤は, チオグリコール酸ナトリウムとシステインとの間に差異がないこと。

3) 還元剤を培地に添加する場合, 加熱殺菌前に添加しても, 加熱殺菌後に無菌的に添加しても差異がないこと。

終わりに供試菌株の分与を賜った東海区水産研究所故横関源延博士に深謝します。

文 献

- 1) Andersen, A. A.: J. Bacteriol., **62**, 425~432 (1950).
- 2) Wheaton, E., Pratt, G. B., Jackson, J. M.: Food Res., **24**, 134~145 (1959).
- 3) Wheaton, E., Pratt, G. B.: J. Food Sci., **26**, 261~268 (1961).

- 4) Wynne, E. S., Schmieding, W. R., Daye, G. T. Jr.: Food Res., **20**, 9~12 (1955).
- 5) Augustin, J. A. L., Pflug, I. J.: Appl. Microbiol., **15**, 266~275 (1967).
- 6) Odlaug, T. E., Pflug, I. J.: Appl. Environ. Microbiol., **34**, 377~381 (1977).
- 7) Alderton, T., Ito, K. A., Chen, Y. K.: *ibid.*, **31**, 492~498 (1976).
- 8) National Canners Association, Research Laboratories: "Laboratory Manual for Food Canners and Processors, 3rd Ed." p. 22 (1968) Avi Publishing Co., Westport Connecticut.
- 9) Greenberg, R. A., Bladel, B. O., Zingelman, W. J.: Appl. Microbiol., **14**, 223~228 (1966).
- 10) Gibbs, B. M., Hirsch, A.: J. appl. Bact., **19**, 129~134 (1956).
- 11) Gibbs, B. M., Freame, B.: *ibid.*, **28**, 95~111 (1965).
- 12) Hirsch, A., Grinstead, E.: J. Dairy Res., **21**, 101~109 (1954).
- 13) Mossel, D. A. A., Beerens, H.: J. Hyg., Camb., **66**, 269~272 (1968).