

醱酵乳用原料乳から分離した耐熱性細菌 の性状について

中江利孝, 片岡 啓, 花田英雄

On the Properties of Thermoduric Bacteria from Raw Milk for Fermented Milk Beverage

Toshitaka NAKAE, Kei KATAOKA and Hideo HANADA

Seventy-four strains of thermoduric bacteria from raw milk for fermented milk beverage and processed milk sold in the market were isolated after heat treatment at 63°C for 30 minutes. By microscopical and physiological examinations, including the tests for proteolysis and lipolysis, the isolates were classified into six groups of bacterial species, of which five groups belonged to aerobic spore-formers. *Bacillus cereus* reached the highest percentage, 21.6% of the total isolates, followed by *B. subtilis*, 20.3%; *B. pumilus*, 17.6%; *B. megaterium*, 13.5%. These bacilli had substantially strong proteolytic abilities while their lipolytic activities were not so significant.

In the further experiment on susceptibility of the selected thermoduric strains to heat, the vegetative cells of some strains in skim milk survived the heat treatment at 63°C for 30 minutes or 85°C for 20 minutes, but not survived at 100°C for 10 minutes.

The same selected strains were also inoculated into the commercial products of sweetened fermented milk beverage, and incubated. There was no serious change in organoleptic property and titratable acidity of the milk beverage during incubation at 38°C for six days.

緒 言

乳酸菌スターターを用いて製造されるヨーグルト類, 加糖酸乳飲料, 乳酸菌飲料等の醱酵乳は国民の保健栄養上重要な乳製品として, その需要が増大している. これらの製品の品質は原料生乳の乳質と, 製造およびその後の保存中の取扱に影響されるが, とくに原料乳および醱酵乳製造処理過程において, 耐熱性細菌の残存は製品の品質と風味に影響を与えることがある¹⁻³⁾. このような醱酵乳用原料培地またはその基本となる牛乳培地の下で耐熱性細菌の生育と代謝の性状を検討することは, 醱酵乳製造上重要な意義があるものと考えられる.

本研究の目的は, 醱酵乳用原料生乳および市乳に存在する耐熱性細菌を分離同定し, その主要な性質を明らかにするとともに, 分離菌株を醱酵乳の基礎培地に接種培養することによ

て、その生育と代謝の性状を究明するものである。

I. 実験方法

1. 耐熱性細菌の分離

醗酵乳用原料生乳 40点 および市販牛乳 10点、計 50点を供試々料として、耐熱性菌数測定のための標準法⁴⁾に準じ、これをあらかじめウォーターバスで 63℃、30分加熱し、この加熱試料をそのまま 38℃、24時間培養したものを、耐熱性菌含有牛乳試料とした。この試料を常法⁵⁾の生菌数測定法に準じて 38℃、48時間平板培養し、発生した代表的集落を分離して、半高層培地に純培養、保存した。

2. 供試菌の同定試験

分離された耐熱性菌株の性質の検索と同定のために、鏡検下の菌の形状、寒天培地における集落の性状、液体培地における発育性状、グラム染色性、リトマス牛乳の変化、孢子染色性、酸素要求性、糖類の醗酵性等の一般性状を常法⁶⁾に従って調べた。それらの結果から、BERGEY'S manual の細菌分類表⁷⁾にもとづき、概ね菌種の同定を行なった。

また、同定された供試菌のうち、代表的な菌株を選び、その主な代謝的性質としてタンパク分解性と脂肪分解性を検索した。タンパク分解性の判定には、脱脂乳を含む標準寒天培地を用いて 38℃、48時間培養し、集落周囲に生成する透明環の有無から、その判定を行なった⁸⁾。一方、脂肪分解性はビクトリアブルー染色脂肪を均一に分散させたクロスリー寒天培地で培養し、赤色脂肪を青変させた集落から、これを陽性と判定した⁹⁾。

3. 耐熱性の試験法

分離同定を行なった菌株から代表的菌株を選び、これを加糖ブイヨン培地に 38℃、24時間培養し、再度同じ培養を行なった菌液 0.2 ml を供試菌液とした。標準法⁴⁾および中西ら¹⁰⁾の方法に準じてあらかじめウォーターバスまたはオイルバスで所定温度に保持した脱脂乳 10 ml に上記菌液を添加し、正確に所定時間加熱保持後急冷した。その加熱条件は 63℃、30分、85℃、20分および 100℃、10分とし、処理後の残存菌数を生菌数測定法⁴⁾に準じて計測した。実験結果から供試菌の生存率を求め、耐熱性の性質に検討を加えた。

4. 加糖酸乳飲料への耐熱性菌接種の試験

市販の加糖酸乳飲料 10 ml を無菌的に試験管にとり、代表的耐熱性菌の 38℃、24時間または 72時間培養液 0.2 ml を接種し、38℃、6日間培養して製品の風味、酸度、物理的状態の変化を観察した。その結果から市販酸乳製品の保存性と耐熱性菌の関係に検討を加えた。

II. 実験結果および検討

1. 耐熱性菌の分離同定結果

牛乳試料 50点より分離した耐熱性菌株は 74株で、その同定試験の結果から類似の性質のものを分類整理して 6群に分けた。その性状は Table 1 のとおりである。

供試々料はあらかじめ加熱処理後 24時間培養を行なったため、耐熱性のある菌群で、しかも優勢に残存した菌群が選択的に分離された。その同定試験の結果から、大部分が好気性で孢子をつくる *Bacillus* であって、中西ら¹⁰⁾の結果とほぼ一致した。集落は主として灰白色で、黄白色のものも認められた。同定された *Bacillus* の菌種は、*B. cereus*, *B. subtilis* および

Table 1. The Properties of Thermoduric Bacteria Isolated from Raw and City Milk

Group	I	II	III	IV	V	VI
Species	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. megaterium</i>	Unidentified
Pigmentation of colony	GW-YW	GW	GW	GW	GW-YW	GW-W
Morphology	SR, long	SR, long	SR, long	SR, short to long	SR, short to long	SR, long, partly spherical
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+
Pellicle on broth	-	±~+	±~+	-	-	-~±
Gram stain	+	+	+	+	+	+
Litmus milk: Rennet-like coagulation	+	+	+	-	+	±~+
Peptonization	±~+	+~+++	+++	-~±	±~+	±~+++
Spore formation	+	+	+	+	+	+~-
Proteolysis	+	+	+	-	+	+~-
Lipolysis	-	-~±	-~±	-	-	+
Number of strains	16	15	13	6	10	14
Percentage (%)	21.6	20.3	17.6	8.1	13.5	18.9

+++ : Strongly positive, + : Positive, ± : Weakly positive, - : Negative
 GW : Grayish white, YW : Yellowish white, W : White, SR : Straight rods

B. pumilus の順に多く分離され、その全分離菌に対する出現頻度はそれぞれ 21.6%、20.3% および 17.6% であった。また、これらの *Bacillus* はいずれもタンパク分解力が強かった。脂肪分解性の高い菌株は未同定の菌株に一部みられたが、概してその作用は低かった。また、*B. brevis* 以外の菌株はリトマス牛乳において、CHOUHERRY ら¹¹⁾ が指摘するようなレンネット様凝固を示し、長時間の培養でさらにペプトン化を起した。

2. 脱脂乳培地における耐熱性

分離菌から代表的菌株 23 株を選び、脱脂乳培地における 63℃、30 分、85℃、20 分 および 100℃、10 分の加熱処理によって残存する菌数を未加熱区の場合と比較してその生存率で示すと、Table 2 のとおりである。

耐熱性の高かった菌株は *B. megaterium* No. 11-4, *B. subtilis* No. 2, *B. cereus* No. 13-2, 未同定菌株 No. 11-1, *B. pumilus* No. 12-5 等であり、63℃、30 分の加熱処理で約 40% 以上残存したが、この条件で完全に死滅する菌株も認められた。また、供試菌は 85℃、20 分加熱で 2 例を除き、ほとんど死滅し、100℃、10 分の加熱処理では供試菌株のすべてが死滅した。以上の結果の一部は兵庫ら^{12,13)} の成績と類似の傾向を示したが、牛乳から分離したときの予備加熱 (63℃、30 分) で生存できた菌株のうち、同じ 63℃、30 分加熱の耐熱性試験で生存できなかった事例があり、この菌株が牛乳からの分離の際に耐熱性の胞子の形態をとっていたものと考えられる。

一方、この耐熱性試験に供した菌液が培養の早い時期、つまり発育細胞の多い時期の培養液であるにもかかわらず、耐熱性の比較的高い菌株がかなりあったことから、このような耐熱性

Table 2. Per Cent Survival of Thermoduric Bacteria when Exposed to Various Heat Treatments in Skimmilk

Species	Strain No.	Per cent survival after various heat treatments (%)		
		63°C—30 min.	85°C—20 min.	100°C—10 min.
<i>B. cereus</i>	No. 1	0.1	0.0	0.0
	No. 11-5	9.4	0.0	0.0
	No. 12-2	19.1	0.2	0.0
	No. 12-4	7.2	0.4	0.0
	No. 13-2	50.4	0.1	0.0
<i>B. subtilis</i>	No. 2	56.5	0.3	0.0
	No. 10-1	3.7	0.0	0.0
	No. 11-2	11.9	0.2	0.0
	No. 13-1	10.8	0.8	0.0
<i>B. pumilus</i>	No. 10-4	1.0	0.0	0.0
	No. 11-3	23.9	1.8	0.0
	No. 12-3	18.7	0.5	0.0
	No. 12-5	38.1	1.5	0.0
<i>B. brevis</i>	No. 13-4	12.3	1.2	0.0
	No. 13-5	1.1	0.2	0.0
<i>B. megaterium</i>	No. 11-4	76.0	49.8	0.0
	No. 12-1	0.0	0.0	0.0
	No. 13-3	0.0	0.0	0.0
Unidentified	To. 3	0.6	0.0	0.0
	No. 4	0.7	0.0	0.0
	No. 10-2	3.6	0.0	0.0
	No. 10-5	0.6	0.3	0.0
	No. 11-1	41.7	22.1	0.0

菌を含む牛乳を醸酵乳の原料牛乳として用いる場合に、その殺菌とその後の取扱に慎重を期すべき点が強調される。とくに孢子を多量に形成させるような条件を原料の生乳または殺菌乳に与えること^{3,14)}は耐熱性菌の残存の機会を最終製品にもたらずので注意が肝要である。

3. 加糖酸乳飲料への耐熱性菌接種の影響

殺菌済の市販加糖酸乳飲料に耐熱性菌23株を接種して、38°C、6日間における製品の変化を観察した結果、形成孢子の多い38°C、72時間培養液接種の場合、官能検査における風味の悪変、物理的性状の変化、酸度の変化はいずれもほとんど認められなかった。このことから、加糖酸乳飲料における高酸度（滴定酸度1.0~1.2%）の条件、および高濃度の砂糖の存在（つまり高い浸透圧）の条件では、孢子の発芽とそれに伴う菌の発育はほとんど起らないことが推論される。事実この一部の試料の鏡検の結果では、孢子の発芽は認められず、むしろ孢子数の減少と孢子形態の矮小化が観察された。

発育細胞の多い38°C、24時間培養液接種の場合は、Table 3に示すごとく、接種後38°C、6日間培養において製品表面に薄い皮膜かまたは凝固物をつくる例が33株中10株に認められた他、多くの例において酸度の減少（タンパク分解に伴う酸の中和現象）がわずかに認められた。

しかしながら、上記の変化を起した菌株を用いて、同じ方法で室温（15~20°C）に保存した場合では、いずれも6日後に製品の悪変は全く現われなかった。

ちなみに、本実験における耐熱性菌またはその孢子の接種濃度は製品1mlあたり 10^3 ~ 10^5 の菌数（または孢子数）であり、実際の市販製品が無菌的に近いことから考えて、また、上記の高い汚染度と高温長時間保存の条件で、はじめて製品にわずかな欠陥が現われることから考

Table 3. Changes of Sweetened Fermented Milk Beverage Inoculated with Thermoduric Bacteria

(After incubation at 38°C for six days)

Species	Strain No.	Organoleptic properties		Titratable acidity (%)
		Physical appearance	Flavor	
<i>B. cereus</i>	No. 1	Fine coagulants formed	Good	1.02
	No. 11-5	"	Somewhat poor	1.03
	No. 12-2	Good	Good	1.02
	No. 12-4	"	"	1.02
	No. 13-2	"	"	1.01
<i>B. subtilis</i>	No. 2	Fine coagulants formed	"	1.04
	No. 10-1	"	Somewhat poor	1.04
	No. 11-2	"	"	1.02
	No. 13-1	"	Good	1.02
<i>B. pumilus</i>	No. 10-4	Good	"	1.02
	No. 11-3	"	"	1.03
	No. 12-3	"	"	1.01
	No. 12-5	"	"	1.02
<i>B. brevis</i>	No. 13-4	Fine coagulants formed	"	1.02
	No. 13-5	"	"	1.02
<i>B. megaterium</i>	No. 11-4	Granular coagulants formed	"	1.03
	No. 12-1	Good	"	1.02
	No. 13-3	"	Somewhat poor	1.01
Unidentified	No. 3	"	Good	1.04
	No. 4	"	"	1.02
	No. 10-2	Fine coagulants formed	"	1.03
	No. 10-5	Good	"	1.03
	No. 11-1	"	"	1.02
Control (Uninoculated)		Good	Good	1.04

えて、市販加糖酸乳飲料の保存性はかなり高く、ふつうの市販段階では耐熱性菌による変敗はないものと推論される。

要 約

醸酵乳用原料生乳および一部の市販牛乳、計 50 点から 63°C、30 分加熱で生存する菌株 74 株を分離し、その一般性状とタンパク質および脂肪分解性を検索した。その結果から同定した菌群はすべて *Bacillus* 属であり、*B. cereus*、*B. subtilis*、*B. pumilus* の順に多く検出された。これらの菌株はタンパク分解力が大であったが、脂肪分解力は全般的に低かった。代表的分離菌株のうち、63°C、30 分または 85°C、20 分加熱処理における耐熱性のとくに高い菌株は *B. megaterium*、*B. subtilis*、*B. cereus* 等に属する数株であったが、100°C、10 分加熱ではその発育細胞の耐熱性は認められなかった。加糖酸乳飲料に実際に接種して 38°C、6 日間培養し

た結果では、38℃、24時間培養菌液の接種において、一部の例にわずかな異常が認められたが、市販条件の同種の製品では異常が起らないものと結論された。

本研究に際し、試料提供を頂いたカルピス食品工業株式会社岡山工場長砂山武雄氏、同製造課主任山崎哲雄氏に深謝します。なお、本研究の一部は昭和45年度三島海雲記念財団奨励金によった。併せて謝意を表します。

文 献

- 1) 中西武雄 (1967); 牛乳と乳製品の微生物, 地球出版: 153.
- 2) HUMPHREYS, C. L. and PLUNKETT, M. (1969); Dairy Sci. Abstr., 31 (11): 607—622.
- 3) JAYNE-WILLIAMS, D. J. and FRANKLIN, J. G. (1960); Dairy Sci. Abstr., 22 (5): 215—221 & 22 (6): 269—278.
- 4) Amer. Publ. Health Assoc. (1960); Standard methods for the Examination of Dairy Products, 11th Ed.: 142.
- 5) 厚生省纂 (1959); 衛生検査指針 III, 食品衛生検査指針 (I), III 細菌学的検査法, 協同医書出版: 33.
- 6) 乳業技術講座編集委員会編 (1964); 乳業技術講座 5, 牛乳乳製品検査, 朝倉書店: 238.
- 7) BREED, R. S., et al (1957); BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., Williams & Wilkins Co.: 33, 281 & 613.
- 8) FOSTER, E. M., et al (1957); Dairy microbiology, Prentice-Hall, Inc.: 141.
- 9) STADHOUER, J. (1966); Intern. Dairy Fed., VI-DOC-35 (日本国際酪農連盟, 第51回国際酪農連盟年次会議報告, 資料第12号, VI-1).
- 10) 中西武雄, 中江利孝, 湧口浩也 (1963); 酪農科学の研究, 12 (1): A1—8.
- 11) CHOUDHERY, A. K. and MIKOLAJCIK, E. M. (1971); J. Dairy Sci., 54 (3): 321—325.
- 12) 中西武雄, 兵庫 裕 (1964); 酪農科学の研究, 13 (3): A91—116.
- 13) 兵庫 裕 (1966); 酪農科学の研究, 14 (1): A1—10.
- 14) MIKOLAJCIK, E. M. and KOKA, M. (1968); J. Dairy Sci., 51 (10): 1579—1582.