

Bacillus 属細菌芽胞の油脂中での耐熱性について

高村一知・星野浩子

Heat Resistance of *Bacillus* Spores in Soybean Oil

KAZUNORI TAKAMURA and HIROKO HOSHINO

Heat resistance test (Decimal reduction time) of *Bacillus* spores suspension in soybean oil was examined. *B.cereus* IAM 1110 $D_{100^\circ}=12.55$, *B.licheniformis* IAM 11054 $D_{100^\circ}=11.38$, *B.subtilis* IAM 1145 $D_{100^\circ}=13.54$, *B.cereus* (spice TS-3) $D_{95^\circ}=8.95$, *B.licheniformis* (spice TS-1) $D_{140^\circ}=11.05$ and *B.subtilis* (spice TS-2) $D_{140^\circ}=24.47$.

市販されているスナック食品等は風味を出すために香辛料を添加したり、塩味をつけるために食塩を使用している。これら香辛料および食塩は一般細菌や芽胞菌に汚染されていることが報告^{1,2,6)}されている。しかし、スナック食品等は油脂を用いて加工されるので、その加熱温度のため一般細菌や芽胞菌は死滅すると考えられている。芽胞菌の油脂中での研究はMOLIN³⁾らの報告があるだけで比較的少ない。それに対して乾熱および湿熱の熱抵抗性についての報告は数多くある。しかし、これらの研究数値をそのまま油脂を用いる調理加工食品の加熱殺菌条件として使用することは多少疑問がのこる。そこで著者らは油脂中での好気性芽胞菌の死滅率(D値)を、香辛料中より分離した菌株^{5,6)}および標準菌株を用いて測定したので報告する。

実験方法

I 供試菌株

東京大学応用微生物学研究奨励会より分与

された *Bacillus licheniformis* IAM 11054, *Bacillus subtilis* IAM 1145 および *Bacillus cereus* IAM 1110 と昭和57年5月東京地区で市販されていた黒コショウより分離した *Bacillus licheniformis* TS-1, *Bacillus subtilis* TS-2 および *Bacillus cereus* TS-3^{5,6)} の6菌株を用いた。

II 芽胞形成培地および生菌数測定用培地

芽胞形成培地は前報⁶⁾で検討した土壌エキス加寒天培地を用い、生菌数測定用培地は日水製薬(株)の生菌数測定用標準寒天培地を使用した。

III 試験菌の調製

1) 芽胞懸濁液について

上記芽胞形成培地に供試菌株を塗抹し、 $35^\circ\text{C} \pm 3$ で4日間培養し、培地上に形成した菌集落を大型白金耳でかき取り、生理的食塩水20mlに懸濁した。得られた芽胞懸濁液を冷凍遠心器8,000r.p.m., 10分間遠心分離し、上

Key words : 1) *Bacillus* genus. 2) soybean oil 3) heat resistance
4) *Bacillus* spores 5) decimal reduction time

澄を捨て、再び生理的食塩水20mlに懸濁し遠心分離を行ない懸濁液とした。

2) 芽胞の真空凍結乾燥について

上記芽胞懸濁液を滅菌した10ml用サンプル管に1ml程度小分けして、真空凍結乾燥器（共和真空工業社製DL-200型）に入れ、真空度 10^{-3} m/mHgで20時間真空凍結乾燥を行い、大豆油およびリン酸緩衝液用試験菌とした。

3) 乾燥芽胞

2ml用注射器アンプル管に上記芽胞懸液を0.5ml中に $10^4 \sim 10^5$ 個の芽胞数になるようSORENSEN リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し、パスツールピペットで0.5ml入れ、前記と同様の条件で真空凍結乾燥を行いアンプル先端をガスバーナーで封入し、乾燥芽胞用試験菌とした。

4) 大豆油への懸濁

滅菌したステンレス製ワーリングブレンダーカップに50mlの大豆油を入れ、Ⅲ-2)で得た真空凍結乾燥芽胞を0.5ml中に $10^4 \sim 10^5$ 個の芽胞数になるよう加えて、5分間攪拌し、芽胞を油脂中に均一に懸濁した。この油脂0.5mlに相当する量を2ml用注射器アンプル管に入れ、先端を封入して油脂中の芽胞懸濁試験菌とした。

5) リン酸緩衝液への懸濁

Ⅲ-2)で得た真空凍結乾燥芽胞をSORENSEN リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5ml中に $10^4 \sim 10^5$ 個の芽胞数になるよう懸濁し、2ml用注射器アンプル管に0.5ml入れ、封入してリン酸緩衝液中の試験菌とした。

IV 死滅率 (D値) の測定方法

上記Ⅲ-3)、Ⅲ-4)およびⅢ-5)で調製した各試験菌を、オイルバスを用いて加熱処理を行なった。冷後、乾燥芽胞用試験菌およびリン酸緩衝液懸濁試験菌は生理的食塩水にて希釈し、生菌数測定用標準寒天培地の表面に0.1mlおとし、滅菌コンラージ棒で表面一面に塗抹し、 35°C 、 72 ± 3 時間培養し、出現した集落を数えて菌数を算定した。また、大豆油中へ懸濁した芽胞の希釈液はN.MOLIN³⁾ら

が用いた55%エチルアルコール液を用いて希釈し、上記と同様の培養操作を行ない菌数を算定した。

結果および考察

I Bacillus 属標準菌株の油脂中での死滅率 (D値) について

IVのD値測定法に従い、各試験菌の加熱による死滅経過を、加熱時間に対して生残菌数 (対数值) をプロットし図. 1, 2および3に示した。また計算によってD値を求めたものを表. 1に示した。

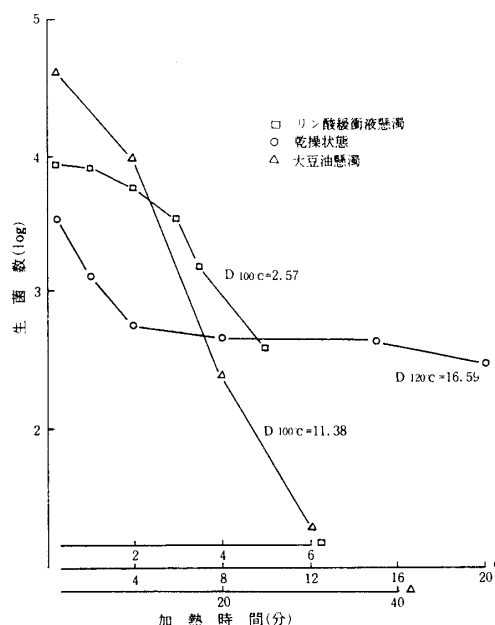


図. 1 *Bacillus licheniformis* IAM 11054菌株芽胞の死滅率 (D値)

この結果、標準菌株の *B.licheniformis* IAM 11054, *B.subtilis* IAM 1145 および *B.cereus* IAM 1110の大豆油中での芽胞耐熱性 (90%死滅率) は 100°C で11.38分、13.54分および12.55分で3菌株とも同様のD値を示した。また乾燥芽胞用試験菌は3菌株ともD値測定温度が 120°C および 140°C と高温であったのに対し、緩衝液中での芽胞は 100°C 2.5分前後のD値を示した。

このことは、大豆油中の芽胞は緩衝液中の芽胞よりも熱抵抗性は高く、乾燥状態の芽胞より低いD値を示している。これは古くから明らかにされているように、微生物に対する

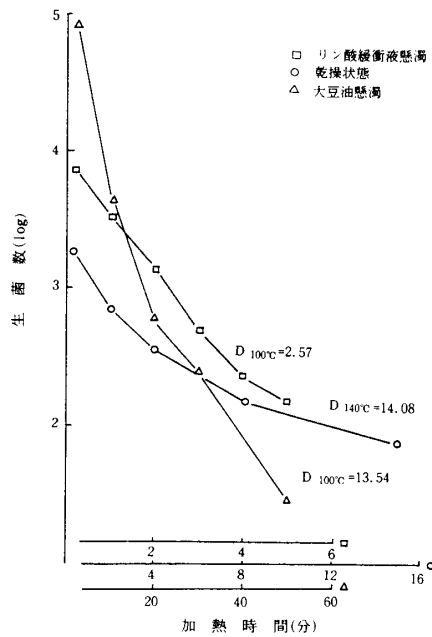


図. 2 *Bacillus subtilis* IAM 1145菌株
芽胞の死滅率 (D 値)

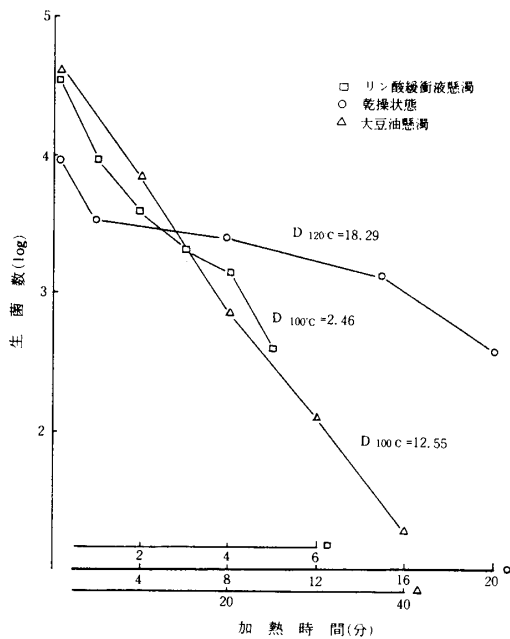


図. 3 *Bacillus cereus* IAM 1110菌株
芽胞の死滅率 (D 値)

殺菌力は、湿熱殺菌法のほうが高く、乾熱殺菌方法が低いという結果と同様であった。

II 香辛料中より分離した *Bacillus* 属細菌芽胞の死滅率 (D 値)

図 4, 5, 6 および表 1 に示すように大豆油中での芽胞の D 値は *B.licheniformis* 140°C, 11.05分, *B.subtilis* 140°C, 24.47分, *B.cereus* 95°C, 8.95分であった。前記標準菌株と同様に大豆油中での芽胞の熱抵抗性は *B.subtilis* を除いた他の 2 菌株ともに緩衝液中より高く、乾燥状態より低い D 値を示した。このように大豆油中の芽胞が、緩衝液中の芽胞より耐熱性が高いのは、芽胞内の水分含量が極めて少ないことが大きく影響していることは知られている。

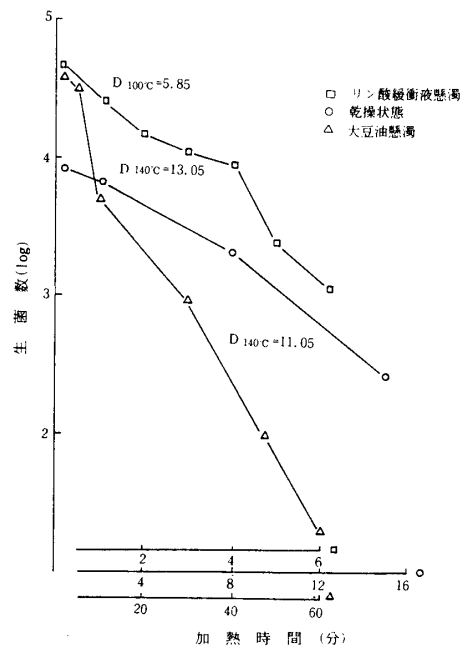


図. 4 *Bacillus licheniformis* (香辛料TS-1)
菌株芽胞の死滅率 (D 値)

表. 1 *Bacillus* 属細菌芽胞の死滅率 (D 値)

供試菌株	試験条件	乾燥状態	大豆油懸濁	リン酸緩衝液懸濁
<i>B.licheniformis</i>	IAM 11054	D 120°C = 16.59	D 100°C = 11.38	D 100°C = 2.57
<i>B.subtilis</i>	IAM 1145	D 140°C = 14.08	D 100°C = 13.54	D 100°C = 2.57
<i>B.cereus</i>	IAM 1110	D 120°C = 18.29	D 100°C = 12.55	D 100°C = 2.46
<i>B.licheniformis</i>	(spice) TS-1	D 140°C = 13.05	D 140°C = 11.05	D 100°C = 5.85
<i>B.subtilis</i>	(spice) TS-2	D 140°C = 4.02	D 140°C = 24.47	D 100°C = 6.78
<i>B.cereus</i>	(spice) TS-3	D 100°C = 14.10	D 95°C = 8.95	D 80°C = 26.97

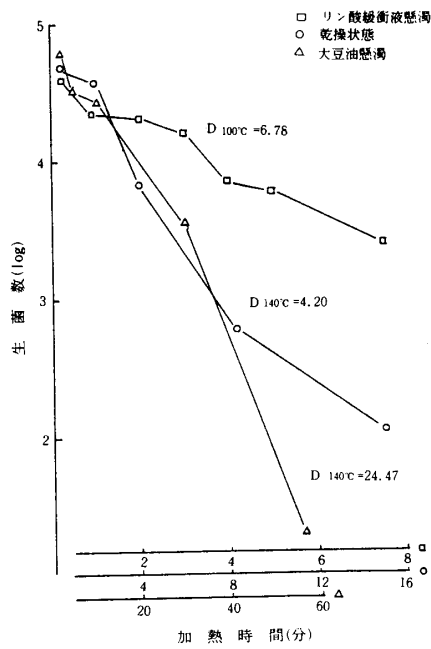


図. 5 *Bacillus subtilis* (香辛料TS-2) 菌株芽胞の死滅率 (D値)

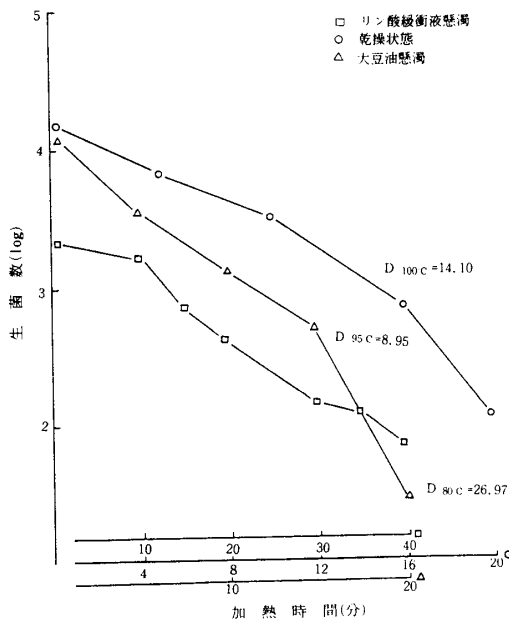


図. 6 *Bacillus cereus* (香辛料TS-3) 菌株芽胞の死滅率 (D値)

その他の因子として, YESAIR⁸⁾らは脂質中に浮遊させた球菌の耐熱性が増大することを報告し, 脂質は保護作用があるとしている。MOLIN³⁾らは *B.cereus* 芽胞はリン酸緩衝液

中でのD値は100°C, 8分であったが, 大豆油中では 121°C, 7~30分のD値を示したと報告している。

また, 標準菌株D値と香辛料からの分離菌株D値を比較すると香辛料より分離した菌株の大豆油中の耐熱性が標準菌株より40°C高かった。

微生物の耐熱性に影響する諸因子は, 耐熱性試験前までの環境因子と細菌細胞自体の内部因子に大別されるが, 前者の場合, わが国で市販されている香辛料 (コショウ) は自然乾燥商品が輸入されていることを考慮すれば, 香辛料中の芽胞は, 太陽光線, 乾燥, ガス殺菌等の処理を行なっていることから芽胞は大きな損傷を受けていると思われるが, 結果は逆であった。芝崎⁴⁾らは油脂食品から細菌を分離すると分離時は脂質に対して浸潤性であるが, 栄養培地に何回も植継ぐと水に浸潤性となる性質があると述べている。実体顕微鏡で香辛料 (コショウ) を見ると, その表面には精油が多量に分布しており, これに付着した芽胞菌は油脂に対し浸潤性を持ち安定状態にあるので, 水相の性質を持つ標準菌株よりD値が高いことが考えられる。以上の結果より油脂中に存在する芽胞は熱抵抗性が非常に高いことがわかった。

要 約

油脂中の *Bacillus* 属細菌芽胞の耐熱性についての死滅率 (D値) を測定した。

1. *Bacillus* 属標準菌株の大豆油でのD値は *B.licheniformis* IAM 11054, 100°C, 11.38分, *B.subtilis* IAM 1145, 100°C, 13.54分, *B.cereus* IAM 1110, 100°C, 12.55分であった。いずれの菌株も緩衝液中の芽胞よりも熱抵抗性は高く, 乾燥状態の芽胞より低いD値を示した。

2. 香辛料より分離した菌株の大豆油中でのD値は *B.licheniformis* TS-1, 140°C, 11.05分, *B.subtilis* TS-2, 140°C, 24.47分, *B.cereus* TS-3, 95°C, 8.95分で緩衝液中の芽胞よりも熱抵抗性は高かった。また, 香辛料より分離

した菌株の大豆油中D値は標準菌株より熱抵抗性が非常に高かった。

以上の結果から油脂中に存在する芽胞は、熱抵抗性が非常に高いことがわかった。

本研究は第47回日本食品衛生学会で発表した。

文 献

- 1) YESAIR, J., and WILLIAMS O.B. : Food Res., **7**, 118 (1950).
- 2) 小久保彌太郎, 神保勝彦, 村上文子, 村上一 : 東京衛研年報., **33**, 155 (1982).
- 3) MOLINN., and SNYGS B.G. : Applied Microbiology., **15**, 6, 1422 (1967).
- 4) 芝崎勲 : 新・食品殺菌工学., 29 (1982).
- 5) 高村一知, 渡部智子 : 聖徳栄養短大紀要., **13**, 7 (1982).
- 6) 高村一知, 星野浩子, 渡部智子 : 聖徳栄養短大紀要., **15**, 31 (1984).
- 7) 上田成子, 浅草すみ, 桑原祥浩 : 日食工誌., **27**, 8, 30 (1980).
- 8) YESAIR Y., BOHRER C.W., and CAMERON E. T. : Food Res., **11**, 327 (1946).