

## 包装ゆで麺より分離した耐熱性細菌の特性

誌名	香川県発酵食品試験場報告
ISSN	03685640
巻/号	73
掲載ページ	p. 67-73
発行年月	1981年11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



## 10. 包装ゆで麺より分離した耐熱性細菌の特性

日野 康良

The Main Properties of Thermoduric Bacteria isolated  
from Packaged Cooked Japanese Noodle

Yasuyoshi HINO

### 1. 緒 言

芽胞形成菌に関する耐熱試験<sup>1)</sup>は数多くの報告がなされている。そこで、包装ゆで麺の殺菌条件を知るため、腐敗した包装ゆでうどんから耐熱性を有する *Bacillus* 属の細菌を分離同定し、その芽胞の耐熱性及び酸類による抗菌作用について検討したところ、包装ゆで麺の殺菌条件の基礎的知見を得たので報告する。

### 2. 実験方法

#### 1 実験材料

県下のゆで麺工場で製造された包装ゆでうどんを腐敗し、外観が糊状を呈しているものを検体とした。

#### 2 *Bacillus* 属の分離同定

検体より生菌数測定法<sup>2)</sup>に準じて耐熱性細菌を3株分離して、それについて生理活性及び形態試験<sup>3), 4)</sup>を行い、Bergey's Manual<sup>5)</sup>により *Bacillus* 属と同定した。なお、芽胞の観察は芽胞染色用セット(日水製薬)を用いた。分離菌株及び *Bacillus subtilis* IAM 12118 を以下の試験に供した。

#### 3 細菌芽胞の耐熱性測定

供試菌株を芽胞形成培地(1% peptone, 1% yeast extracts, 10 $\mu$ M glucose, 0.3% NaCl, 0.004% MgSO<sub>4</sub>, 1 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 0.7mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.2)<sup>6)</sup>に接種し、30 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで7日間培養し顕微鏡下で芽胞の形成を確認した。この培養液(10<sup>8</sup>/ml)を滅菌生理食塩水で希釈し、所定の芽胞液を含む希釈液を調整した。この希釈液1mlをメタリン酸ナトリウムでpH調整した生理食塩水9mlに添加し試料液とした。試料液の加熱処理方法は、次の条件で行った。沸騰水中では12分間、熱水中で30~80分間、又、蒸熱(80 $^{\circ}$ C, 90 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ C)では40分間加熱した後、直ちに、流水中で十分に冷却し、生存菌数を標準寒

天培地を用いたプレートカウント法(37°C, 7日間)により測定した。試料液の初発菌数の測定も同じ方法で行った。

#### 4 Gluconic acid 及び Sodium Metaphosphate による抗菌性試験

抗菌力の測定には、次の二種類の液体培地を用いた。ガス発生培地<sup>5)</sup>(0.5% peptone, 0.3% yeast extracts, 0.5% NaCl, 0.3% agar, 0.008% bromocresol purple, 1% glucose, pH 7.2)に gluconic acid を、耐熱性試験に用いた芽胞形成培地に Sodium Metaphosphate を添加して培地の pH を調整しオートクレーブで滅菌した。この培地 80 ml に耐熱性試験に用いた培養液(10<sup>8</sup>/ml) 1 ml を添加し、30 ± 1°C で振盪培養を行い分光光度計(日立 101)を用いて経時的に O・D 660 nm の吸光度を測定し、その値を菌の増殖の指標とした。抗菌力の測定は菌の増殖の程度から判定した。

### 3. 結果と考察

#### 1 Bacillus 属の同定

分離した3株の生理活性を表-1に示した。芽胞の形態及び生理活性からみて、ここに分離された3株は *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* と同定することが妥当であると考えた。

表-1 腐敗うどんより分離した耐熱菌の生理活性

	A	B	C
グラム染色	+	+	+
55°Cにおける発育	-	-	
65°Cにおける発育	-	-	
7%食塩における発育	+	+	+
嫌気性発育	+	+	+
マンニットより酸の生成	-	+	+
ブドウ糖より酸の生成	+	+	
デンプン加水分解	+	+	+
ゼラチン加水分解	+	+	+
ウレア - セ	-	+	+
V P 反応	+	+	+

+ : 陽性, - : 陰性

## 2 芽胞の耐熱性

分離菌株 *B. licheniformis* の耐熱性試験結果を表-2に示した。初発菌数  $10^3/ml$  の場合、 $90^\circ C$ 、40分間の蒸熱で各pHとも生存菌数は0となった。初発菌数  $3 \times 10^7/ml$  の場合も  $90^\circ C$ 、40分間の蒸熱では各pHともほぼ殺菌されているのに対して、 $80^\circ C$ 、40分間の蒸熱ではpH2以下でなければ殺菌効果は期待できず、温度による殺菌効果の著しい差がみられた。*B. licheniformis* は小麦粉中に相当分布<sup>7)</sup> していると考えられるが、今回の試験ではそれ程強い耐熱性はみられなかった。

表-2 *B. licheniformis* の耐熱性

初発菌数 ( $/ml$ )	殺菌条件	温度( $^\circ C$ )	時間(分)	試料液 pH					
				2	3	4	5	6	7
$1 \times 10^3$	水蒸気	90	40	0	0	0	0	0	0
	熱水	98	12	0	0	0	0	0	0
	水蒸気	80	40	0	$1 \times 10^2$	$4 \times 10^3$	$8 \times 10^3$	$9 \times 10^3$	$2 \times 10^4$
$3 \times 10^7$	水蒸気	90	40	0	0	0	1	1	3
	熱水	98	12	0	2	8	2	19	3

分離菌株 *B. subtilis* の耐熱性試験結果を表-3、表-4に示した。 $4 \times 10^7/ml$  の菌を  $92 \sim 94^\circ C$  の熱水で殺菌した場合、表-3の結果が示すように180分間の加熱でも菌の減少はほとんど認められなかった。表-4から初発菌数  $10^6/ml$  では、各条件共殺菌効果は期待できなかった。初発菌数の少ない  $8 \times 10^2/ml$  の場合では、 $80^\circ C$ 、40分間の蒸熱ではpH2で生存菌があり、 $90^\circ C$ 、40分間の蒸熱でもpH3で生存菌を示し、pH4では1/3程度の菌が残った。

表-3 *B. subtilis* の耐熱性

初発菌数 ( $/ml$ )	殺菌条件	殺菌時間(分)				
		30	60	90	120	180
$4 \times 10^7$	熱水 $92 \sim 94$	$4 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$

表-4 *B. subtilis* の耐熱性

初発菌数 ( $/ml$ )	殺菌条件			試料液 pH					
	温度(°C)	時間(分)	2	3	4	5	6	7	
$8 \times 10^2$	水蒸気	80	40	1	70	$4 \times 10^2$	$6 \times 10^2$	$6 \times 10^2$	$6 \times 10^2$
	水蒸気	90	40	0	0.5	$2 \times 10^2$	$6 \times 10^2$	$6 \times 10^2$	$6 \times 10^2$
	熱水	98	12	0	0	$2 \times 10^2$	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^2$
$10^6$	水蒸気	80	40	$2 \times 10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
	水蒸気	90	40	$4 \times 10^2$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
	熱水	98	12	3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$

*B. licheniformis* が  $90^\circ\text{C}$ 、40分、pH4 で  $10^7 / ml$  の殺菌が可能であったのに比べて、*B. subtilis* は相当強い耐熱性を持っていた。うどんの原料である小麦粉中に、この分離菌と同程度以上の耐熱性を持つ菌が  $10^2 / g$  単位で含まれていた場合、通常の殺菌条件 ( $90 \sim 95^\circ\text{C}$ 、40～60分間、pH 4.0～5.0) では腐敗の生じる可能性が多分にある。

*B. subtilis* IAM 12118 を用いた耐熱性試験結果を表-5 に示した。pH4～5 で殺菌できる菌数をみると、 $80^\circ\text{C}$  蒸熱では  $10^2$  以下、 $90^\circ\text{C}$  蒸熱では  $10^3$ 、 $100^\circ\text{C}$  蒸熱では  $10^4$  以上となり、特に  $100^\circ\text{C}$  蒸熱では pH7 でも  $2.5 \times 10^4 / ml$  の菌数が殺菌でき、殺菌条件における温度の重要性を考慮する必要がある。

表-2～5の結果から耐熱菌の生存菌数曲線を描きD値を求めたが、バラツキが多く再現性のある値は得られなかった。

小麦粉中には通常  $10^3 / g$  の生菌数が含まれているが、二次汚染により菌数(特に耐熱菌)が増加すると、必要度以上の殺菌エネルギーを用いないと殺菌効果が得られず、通常の殺菌条件では生存菌により腐敗を生じる可能性がある。従って、包装ゆで麺の製造に際しては、出来るだけ耐熱菌数の少ない小麦粉を用いると共に、製造環境・施設の浄化、食品残査の混入防止、落下菌対策等衛生状態の向上に努め二次汚染防止を徹底していく必要がある。

表-5 *B. subtilis* IAM12118の耐熱性

初発菌数 ( $\text{ml}$ )	殺菌条件			試料液 P H					
	温度(C)	時間(分)		2	3	4	5	6	7
$1.5 \times 10^2$	水蒸気	80	40	0	0	0	2	2	2
	水蒸気	90	40	0	0	0	0	0	0
	水蒸気	100	40	0	0	0	0	0	0
	水	98	12	0	0	0	0	0	0
$8 \times 10^2$	水蒸気	80	40	0	1	2	2	7	10
	水蒸気	90	40	0	0	0	0	0	0
	水蒸気	100	40	0	0	0	0	0	0
	水	98	12	0	0	0	0	0	0
$6 \times 10^3$ (2%小麦粉)	水蒸気	80	40	0	10	$9 \times 10^2$	$3 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$6 \times 10^3$
	水蒸気	90	40	0	0	0	1	$9 \times 10^2$	$3 \times 10^3$
	水蒸気	100	40	0	0	0	0	0	0
	水	98	12	0	1	4	2	11	24
$2.5 \times 10^4$	水蒸気	80	40	3	$10^3$	$5 \times 10^3$	$9 \times 10^3$	$8 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$
	水蒸気	90	40	0	10	10	$2 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	$8 \times 10^3$
	水蒸気	100	40	0	0	0	0	0	0
	水	98	12	0	0	0	$10^2$	$2 \times 10^2$	$10^2$

## 3 酸類による抗菌力試験

分離菌株 *B. cereus* に対する gluconic acid の抗菌性試験結果を図-1に示した。培地の初発 pH 7 及び 6 では、1 日後に定常期 (O. D 660 nm = 1.8) に達し完全に腐敗を示した。又、pH 5 でも 2 日後に増殖が認められ (O. D 660 nm = 2.4) 7 日後には定常期に達した。pH 4 では、抗菌作用を示し 7 日後にも増殖は抑制された。

分離菌株 *B. licheniformis* に対する gluconic acid の抗菌性試験結果を図-2に示した。初発 pH 5 で *B. cereus* は 2 日後に増殖したが、*B. licheniformis* は 4 日後にも増殖しなかった。

図-1, 2 より増殖に及ぼす pH の影響は、4~5 にあることが判明したので、更に pH を細分した抗菌作用試験の結果を図-3 に示した。培地の初発 pH を 4.0 から 0.2 きざみで 5.0 までに変え 11 日間振盪培養した結果、増殖を示さなかったのは pH 4.0 であった。pH 5.0 ~ 4.6 では 1 日後に、pH 4.4 では 3 日後に、pH 4.2 では 9 日後に増殖を示した。この培養

液の初発菌数は  $10^5 / ml$  で実験を行ったが、初発菌数を  $10^3 / ml$  に減少した場合も、図-3に示した通り pH 4.2 で9日後に増殖を認めた。更に初発菌数を  $20 / ml$  に減少し、小麦粉2%添加した培地では、吸光度の測定が不可能なため培養液の変色、臭い等の外観からくる腐敗状態から判断すると pH 5 以下の培地では外観上の変化は認められなかった。

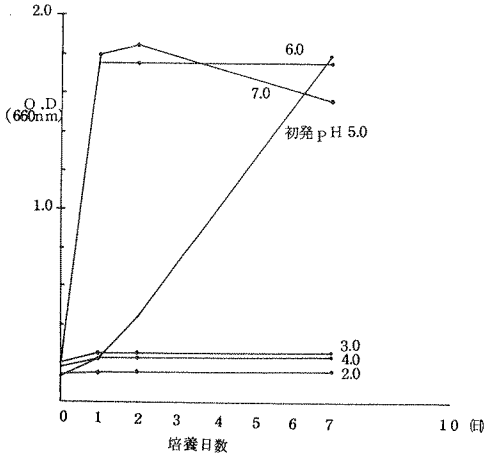


図-1 *B. cereus* の増殖に及ぼす gluconic acid の影響

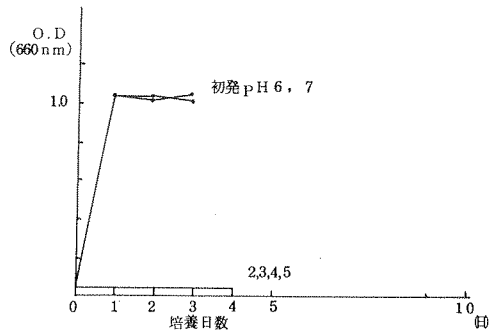


図-2 *B. licheniformis* の増殖に及ぼす gluconic acid の影響

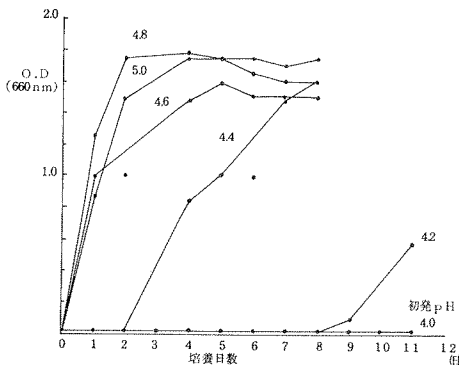


図-3 *B. subtilis* IAM12118 の増殖に及ぼす sodium metaphosphate の影響

#### 4. 要 約

- 腐敗した包装ゆでうどんより、*Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* の3株を分離同定した。
- 分離株の耐熱性試験の結果、培地 pH 4 では  $90^\circ\text{C}$ 、40分間の殺菌条件で *B. licheniformis* は  $3 \times 10^7 / ml$  の菌数が殺菌できたが、*B. subtilis* は  $8 \times 10^2 / ml$  の菌数が1

以上の結果から、加熱殺菌後相当数の耐熱菌が生残した場合、pH 4.0 以下であれば増殖を抑制できるものと考えられる。これは試験培地での結果であるため、包装ゆでうどんの保存に pH 調整を適用する場合は、成分組成の相違や酸による食味の変化等を考慮して更に検討を加えていく必要がある。

／3近く生存した。

3. 同一菌株では、培地pHの低い程、又、殺菌温度の高い程殺菌効果は秀れており、同一条件では初期菌数の少ない程殺菌エネルギーは少なくして済み二次汚染の防止の重要性が確認された。
4. 酸類による抗菌力試験結果から、gluconic acid, sodium metaphosphate共に、培地pH 4.0で耐熱性細菌の増殖は抑制された。

終りに臨み、本実験の施行に際して試料採取等に当り色々とお協力御援助頂きました香川県包装麵事業協同組合の各位に深謝致します。

#### 文 献

1. 芝崎勲：新しい食品の殺菌・除菌技術， 1（1980）
2. 厚生省環境衛生局（鈴木昭）：食品衛生検査指針， I. p 93（1973）
3. 長谷川長治：微生物の分類と同定， 203（1975）
4. Cowan & Steel（坂崎利一訳）：医学細菌同定の手びき“第2版”， 94（1974）
5. R. E. Buchanan & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 ed. 529（1974）
6. Sawano Murao *et al*: *Agric. Biol. Chem.* 44, 2773（1980）
7. 上田成子ら：食品工誌， 27, 453（1980）