

研究ノート

芽胞状態にあると考えられる納豆菌の耐熱性について（第1報）

—加熱温度および加熱時間による生菌数の挙動—

Heat resistance of *Bacillus natto* presumable state of spores (I)

—Change in the number of viable bacteria due to different temperatures and heating time—

池田 大佑 ¹⁾	大室 愛海 ¹⁾	須藤 剛士 ¹⁾
Daisuke Ikeda	Narumi Ohmuro	Tsuyoshi Sudo
赤星 文月 ¹⁾	朝日 直人 ¹⁾	岩井 秀明 ^{1,2)}
Mizuki Akahoshi	Naoto Asahi	Hideaki Iwai

¹⁾ 武蔵野栄養専門学校 ²⁾ 武蔵丘短期大学

Abstract

An investigation was made into the effect of heating temperature and time to study the heat resistance of *Bacillus natto* presumable state of spores.

Bacterial cultures of *Bacillus natto* were divided into two groups. One group was heated up to the temperature of 75°C, and the other group was heated up to 85°C. Immediately after that, in each group, some cultures continued to be heated for 15 minutes and others for 30 minutes to keep the same temperatures. Then, each of them was incubated.

In the group of the cultures heated up to 75°C, no change in the number of variable bacteria was observed, but in the other group of the cultures heated up to 85°C, a decrease in the number of bacteria was observed when heated further at 85°C for 15 minutes, and the number was reduced apparently when heated for 30 minutes. Thus, an interesting phenomenon was observed.

Key words : *Bacillus natto*, spore, heat resistance, heating temperature, heating time

I はじめに

芽胞形成能を有する細菌は、環境が適さないと芽胞を形成して休眠型となり耐熱性を示す。この性質をもつ食中毒細菌は、セレウス菌、ウェルシュ菌およびボツリヌス菌で、これらは土壌等の常在菌である¹⁾ことから、農畜水産物食品の汚染が危惧されている。わが国におけるこれらの食中毒事件数はそれほど多くないが、ウェルシュ菌による食中毒は、飲食店や事業場で発生しやすく、1事件当たりの患者数が多い²⁾ことに留意し、栄養士養成校で教育すべき内容であると考えらる。

当校では、食中毒の実態と予防対策の理解を深めるために、芽胞状態にある細菌の耐熱性を確認する実習を行ってきた。その際、食中毒細菌は扱えないため、近年は非病原細菌である納豆菌の菌液を試料としている。

納豆菌は、グラム陽性桿菌である枯草菌(*B.subtilis*)の一種で、熱に強い抵抗性を示す芽胞を形成するため、発酵食品のひとつである納豆の製

造に利用されている³⁾。村松⁴⁾らは、芽胞状態にある納豆菌(納豆菌芽胞)の耐熱性試験の結果、90°C以下の加熱では減少せず、100°C、5分間で減少したと報告しているが、加熱調理において、100°Cとするのは現実的でないことが多い。

また、加熱による殺菌は加熱温度および加熱時間が重要である。例えば、細菌性食中毒予防対策では、食品の中心温度が75°C以上、1分間以上⁵⁾とされている。高圧蒸気滅菌法は、2気圧、121°C、15～20分間加熱により、芽胞状態にある細菌を含めた全ての微生物を死滅させる方法である。

このような観点から、本研究では、芽胞を有すると考えられる(以下、芽胞性と略す)納豆菌の耐熱性を更に検討するために、加熱温度の他に、新たに加熱時間による生菌数の挙動を観察した。

II 方法

1. 原液(芽胞性納豆菌液)及び試薬類の調製

1) 原液(芽胞性納豆菌液)の調製

平成 27 年 5 月、当校近隣スーパーにおいて T 社の市販納豆を購入後、その納豆から標準寒天培地平板に画線塗抹し、37℃、48 時間培養した。次に、得られたコロニーを普通ブイヨン培地に移し、37℃、48 時間培養した後、実験に供するまで約 3 か月間 -18℃で冷凍保存した。

実験時に原液を解凍し、滅菌生理食塩水で希釈して試料液とした。

2) 試薬類の調製

- ①滅菌生理食塩水：国産化学（株）社製の塩化ナトリウム 9g に 1L の精製水を加え溶解後、オートクレーブにて 121℃、15 ～ 20 分間、高圧蒸気滅菌した。
- ②普通ブイヨン培地：栄研化学（株）社製の培地 18g に 1L の精製水を加え溶解後、同様に高圧蒸気滅菌した。
- ③標準寒天培地：栄研化学（株）社製の培地 23.5 g に 1L の精製水を加え溶解後、同様に高圧蒸気滅菌した。

2. 実験方法

芽胞性納豆菌液の加熱温度は大腸菌等の一般細菌が死滅する 75℃と、芽胞性納豆菌は死滅しないとされている 85℃とし、加熱時間は各温度に到達直後の他に 15 分間、30 分間とした。

1) 実験 1 (加熱前)

原液を 10 倍段階希釈によって、3 段階の濃度試料液を調製し、各々の試料液は標準寒天培地と混釈し、37℃、24 時間平板培養法により、コロニー数を測定し、生菌数（初発芽胞性納豆菌数）を算出⁶⁾した。

2) 実験 2 (75℃加熱)

原液を恒温槽水浴中で 75℃に加熱し、75℃到達直後、15 分間、および 30 分間加熱し、各々の試料液を実験 1 と同様に操作し、生菌数を算出した。

3) 実験 3 (85℃加熱)

原液を恒温槽水浴中で 85℃に加熱し、85℃到達直後、15 分間、および 30 分間加熱し、各々の試料液を実験 2 と同様に操作し、生菌数を算出した。

3. 統計解析

各平板のコロニー数は、平均値 ± 標準偏差値 (S.D.) で示し、群間の平均値の差の検定には t 検定を用いた。

III 結果

加熱前の実験 1 の結果は表 1 に、75℃加熱の実験 2 の結果は表 2 ～ 4 に、85℃加熱の実験 3 の結果は表 5 ～ 7 に示した。

表 1 実験 1 (加熱前)

希釈倍数	× 10	× 10 ²	× 10 ³
平板 1	TNTC	TNTC	181
平板 2	TNTC	TNTC	202
平板 3	TNTC	TNTC	153
平板 4	TNTC	TNTC	143
平均値 ± S.D.	—	—	169.8 ± 19.5

生菌数（初発芽胞性納豆菌数）：1.7 × 10⁵/mL

TNTC：Too numerous to count（数えるにはあまりに多い）

表 2 実験 2 (75℃到達直後)

希釈倍数	× 10	× 10 ²	× 10 ³
平板 1	TNTC	TNTC	128
平板 2	TNTC	TNTC	158
平板 3	TNTC	TNTC	167
平板 4	TNTC	TNTC	182
平均値 ± S.D.	—	—	158.8 ± 19.0

生菌数：1.6 × 10⁵/mL

表 3 実験 2 (75℃継続 15 分間)

希釈倍数	× 10	× 10 ²	× 10 ³
平板 1	TNTC	TNTC	181
平板 2	TNTC	TNTC	179
平板 3	TNTC	TNTC	162
平板 4	TNTC	TNTC	134
平均値 ± S.D.	—	—	164.0 ± 21.7

生菌数：1.6 × 10⁵/mL

表4 実験2 (75℃継続 30分間)

希釈倍数	× 10	× 10 ²	× 10 ³
平板1	TNTC	TNTC	135
平板2	TNTC	TNTC	163
平板3	TNTC	TNTC	127
平板4	TNTC	TNTC	127
平均値 ± S.D.	—	—	138.0 ± 17.1

生菌数 : 1.4 × 10⁵/mL

表5 実験3 (85℃加熱到達直後)

希釈倍数	× 10	× 10 ²	× 10 ³
平板1	TNTC	TNTC	220
平板2	TNTC	TNTC	200
平板3	TNTC	TNTC	155
平板4	TNTC	TNTC	173
平均値 ± S.D.	—	—	187.0 ± 28.7

生菌数 : 1.9 × 10⁵/mL

表6 実験3 (85℃加熱継続 15分間)

希釈倍数	× 10	× 10 ²	× 10 ³
平板1	TNTC	374	40
平板2	TNTC	305	35
平板3	TNTC	TNTC	46
平板4	TNTC	TNTC	48
平均値 ± S.D.	—	—	42.3 ± 5.9

生菌数 : 4.2 × 10⁴/mL

表7 実験3 (85℃加熱継続 30分間)

希釈倍数	× 10	× 10 ²	× 10 ³
平板1	56	5	0
平板2	58	11	0
平板3	37	7	0
平板4	34	7	0
平均値 ± S.D.	46.3 ± 12.5	7.5 ± 2.5	0

生菌数 : 4.6 × 10²/mL

次に加熱温度 75℃の加熱時間による生菌数の変化を図1に示した。75℃の加熱前の生菌数(初発芽胞性納豆菌数)は、1.7 × 10⁵/mLで、75℃到達直後は1.6 × 10⁵/mL、15分間加熱では1.6 × 10⁵/mLとなり芽胞性納豆菌数は減少しなかった。30分間加熱では1.4 × 10⁵/mLとなりやや減少傾向が見られたがp < 0.01の有意差は見られなかった。

加熱温度 85℃の加熱時間による生菌数の変化は図2に示した。15分間加熱を継続すると芽胞性納豆菌数は4.2 × 10⁴/mLに減少し(p < 0.01)、30分間加熱を継続すると4.6 × 10²/mLに激減し(p < 0.001)、統計解析でも有意差をもって減少した。

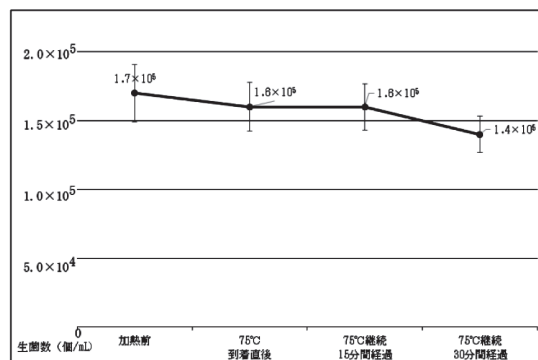


図1 : 75℃加熱の加熱時間による生菌数の変化

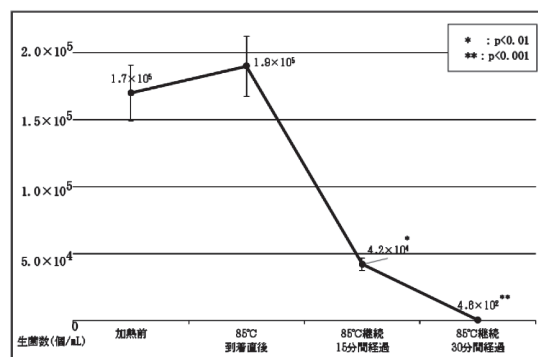


図2 : 85℃加熱の加熱時間による生菌数の変化

Ⅳ 考察

細菌は一般に低温に強く高温に弱いとされるが、芽胞形成能を有する細菌が芽胞を形成すると、耐熱性を示し、通常の加熱調理では生き残ることができる。

村松ら⁴⁾は、有芽胞納豆菌(納豆菌芽胞)の耐熱性試験の結果、90℃以下の加熱では減少しないと報告している。しかし、今回の我々の実験結果では、85℃到達直後では減少しなかったが、15分間継続して加熱すると減少し、30分間継続加熱では激減する結果が得られ(図2)、加熱時間の重要性が示唆された。

バチルス属有芽胞菌の耐熱性については、有機酸Na塩、薬剤、添加物など種々の溶存物質やpHが影響を及ぼすとの報告^{7, 8)}があるが、今回の実験に供した標準寒天培地および普通ブイヨン培地には、このような影響を与える要因はない。

宮本は⁸⁾、食品における耐熱性芽胞形成菌の生育特性と制御について、85℃、10分間の加熱により完全に死滅したと報告しているが、これはそばつゆ中のバチルス属(未同定)栄養型細胞であった。この報告から、我々が実験に供した試料は芽胞性納豆菌として調製した原液であったが、その全てが芽胞状態ではなかった可能性がある。また、市販納豆を培養した後、-18℃の環境で凍結保存した過程で、なんらかの影響があった可能性も推察される。さらに、解凍過程で発芽し栄養型細胞が存在していた可能性も否定できない。

以上の考察から、これからの課題として凍結前の栄養型細胞数や芽胞数、芽胞性納豆菌の発芽温度などを確認し、検討する必要があると考えられた。

V まとめ

芽胞性納豆菌の耐熱性を更に検討するために、加熱温度のみならず新たに加熱時間による生菌数の挙動を観察した。

85℃加熱では、15分間加熱を継続すると菌数の減少が観察され、30分間加熱を継続すると菌数が激減する興味深い現象が観察された。

この現象については、凍結前の栄養型細胞数や芽胞数、芽胞性納豆菌の発芽温度などを更に検討する必要がある。

【参考文献】

1) 東京都福祉保健局：食品衛生の窓、食中毒を起こす微生物
<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/micro/index.html>

- 2) 厚生労働省：食中毒統計
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 3) 吉本櫻：納豆菌の耐熱性・薬剤耐性、日本農芸化学会、化学と生物 Vol.48, No.5, p355～357 (2010)
- 4) 村松芳多子・高島浩介・勝俣理恵・渡辺杉夫・内藤準哉・木内幹：納豆菌のヒートショック効果、日本農芸化学会学術講演会要旨集(東京ビックサイト) 74, p91、2F019a (2000)
- 5) 厚生労働省：大量調理施設衛生管理マニュアル平成9年3月24日付け衛食第85別添(最終改正：平成25年10月22日付け食案発1022第10号)、2.加熱調理食品の加熱時間温度
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解(2015)金原出版株式会社、p58～60
- 7) 犬飼進・菊地順子・渡辺忠雄：Bacillus属芽胞及び耐熱性に及ぼす有機酸ナトリウム塩の影響、食衛誌 Vol.25, No.2, p125～131 (1984)
- 8) 宮本敬久：食品における耐熱性芽胞形成菌の生育特性と制御、日本微生物学会雑誌、26 (2)、p92～97 (2009)