

## 殺菌牛乳中の蛋白分解酵素生産菌の研究

### 1. 殺菌乳中より分離された *Bacillus subtilis*

菊地政則\*・橋詰喜代子\*・松井幸夫\*

(酪農微生物学研究室)

### Studies on the Proteolytic-Enzyme-Producing Bacteria in Pasteurized Milk

#### 1. A Bacterium, *Bacillus subtilis*, Isolated from Pasteurized Milk

Masanori KIKUCHI\*, Kiyoko HASHIZUME\*,  
and Yukio MATSUI\*

(May, 1972)

現在、牛乳の殺菌は低温殺菌(LTGT), 高温殺菌(HTST), 超高温殺菌(UHT)法により行なわれており、特に HTST 法と UHT 法が牛乳の殺菌法として広く利用されている。

これらの殺菌により生乳に混在している大半の細菌は死滅すると思われている。しかし胞子形成菌は非常に耐熱性があり、これらの温度にても殺菌されないものが知られている。このような胞子形成菌はほとんど土壠、飼料、敷ワラなどから由来する *Bacillus* 属が多いと考えられている。

HARTIN<sup>4)</sup> らは 104.5°C の超高温殺菌によっても *Bacillus catorespora*, *B. megatherium*, *B. circulans*, *B. cereus* などの *Bacillus* 属の胞子がほとんど殺菌されないことを明らかにしている。また、これらの胞子は殺菌など加熱により休眠状態の胞子を逆に発芽させられる結果になると述べている。

一方、MIKOLATCIK<sup>6)</sup> らは牛乳中の *B. cereus* の胞子で実験を行なった結果、牛乳を加熱することによりその後の胞子発芽を促進することを明らかにした。同様に MARTIN<sup>4)</sup> らも 104.5°C で牛乳を殺菌したものと、121°C 殺菌した場合を比較し、後者の牛乳に混在している胞子の発芽後に形成された菌体の細胞分裂が前者の二倍以上速度をはやめた事を報告している。

これら *Bacillus* 属の菌には牛乳中の蛋白質を分解し甘性凝固の原因とならしめるも

\* Lab. of Dairy Microbiology, The College of Dairy Agriculture, Nopporo, Hokkaido, Japan

のがあり、牛乳の品質低下に過大な影響をもたらしている。

筆者らは、牛乳の殺菌に対し生存可能な *Bacillus* 属の菌を分離し、それらの菌による牛乳汚染と品質劣化との関係について検討しているが、今回は牛乳中で蛋白分解作用を行なうやや性状の異なる *Bacillus* 属の菌を分離したので報告する。

### 実験材料及び方法

#### 1. 胞子形成菌、蛋白分解菌の分離

生乳を滅菌試験管に 2 ml ずつ採取し、それを 85°C のウォーター・バス中で 15 分間加熱殺菌したのち滅菌水で希釀後、常法通り普通寒天培地で 37°C、2 日間培養した。

蛋白分解性を判定するには菌を接種したカゼイン平板寒天培地を 37°C、2 日間培養後平板に出現した集落上に 3% 硫酸をふりかけ集落の周囲が透明になったものを蛋白分解菌と判定した。

カゼイン寒天培地の組成（カゼイン 3.5 g, 酸化カルシウム飽和溶液 72 ml, クエン酸カリウム 0.35 g, 2 倍濃厚肉汁 10 ml, 0.15% 塩化カルシウム 100 ml, SÖRENSEN リン酸溶液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.035 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.105 g, 蒸留水 100 ml) 100 ml, 蒸留水 300 ml, 寒天 15 g), 100°C で 15 分間、3 回の間歇滅菌をした。

胞子形成菌か否かについては顕微鏡的観察によって判定した。

#### 2. 分離菌株の同定法

分離菌株の同定における培地及び方法は以下の通りである。

1) 形態……普通寒天培地において 37°C で 48~72 時間培養後、普通染色法により検鏡観察した。

2) グラム染色性……普通寒天培地において 37°C で 48~72 時間培養後、石炭酸ゲンチアナ紫液を用い常法により染色・検鏡判定を行なった。

3) 胞子染色……普通寒天培地において 37°C で 3~10 日間培養後、MÖLLER 法による染色法を用いた。

4) 空胞の存在……ブドウ糖寒天培地において 37°C で 24 時間培養後、メチレン青による瞬間染色によって判定した。

5) 鞭毛染色……普通寒天上において 15~20 時間培養後、懸滴法、西沢・菅原法によって鞭毛の有無、着生の状態を検鏡した。

6) 大豆寒天上での発育……黄色大豆 100 g を 1,000 ml の水に一昼夜浸漬した後、それを 90 分間煮沸、ろ過しそのろ液に 0.5 g のリン酸二カリ、15 g の寒天を加え、pH を 6.8 に調整後高圧滅菌した培地を用い、普通寒天斜面上の発育状態と比較検討した。

- 7) 食塩耐性……食塩 5, 7, 及び 12% 含有肉汁培地に菌を接種した後, 37°C で 10 日間培養し菌の発育の有無を培地の濁度によって肉眼的に検討した。
- 8) 濃粉分解性……可溶性濃粉 1% 添加普通寒天培地において 37°C で 3~7 日間培養後, 沢度加里溶液で濃粉反応を行なった。
- 9) 硝酸塩の還元性……硝酸カリ 0.1% 添加普通寒天培地において, 37°C で 3~7 日間培養後 GRIESS 試薬を用い亜硝酸の検出を行なった。
- 10) 馬鈴薯切片上での発育状態……新鮮な馬鈴薯を楔形に切り, それを少量の水を入れた試験管に入れ高圧滅菌した後, 菌を接種し 2~10 日間培養したのち菌の発育状態, 色素の生成を検討した。
- 11) 嫌気状態での硝酸塩からガスの生成……菌を接種したのち培地と同容量の滅菌パラフィンを重層し, 32°C で 7~14 日間培養したのちガスの生成有無を調べた。
- 培地組成(トリプトン 10 g, リン酸二カリ 5 g, 肉エキス 3 g, 酵母エキス 1 g, 硝酸ナトリウム 10 g, 蒸留水 1,000 ml)。
- 12) チロシン寒天上の発育状態……L-チロシン 0.1% 添加普通寒天上での菌の発育, 色素の生成有無の検査を行なった。
- 13) クエン酸塩の利用性……KOSER 変法クエン酸寒天培地における発育状態を検査した。
- KOSER 変法クエン酸寒天培地の組成(硫酸マグネシウム 0.2 g, 食塩 0.1 g, リン酸アンモニウム 1.0 g, リン酸一カリ 0.5 g, クエン酸ナトリウム 2.0 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml)。
- 14) アセチルメチルカルビノールの生成……下記培地で 32°C 及び 37°C において, 2, 4, 6 日間培養後 40% 苛性ソーダ溶液を培養液と同量添加, 更にクレアチン 0.5~1.0 mg を添加混和したのち 30~60 分後の反応を検査した。
- 培地組成(プロテオースペクトン 7 g, 食塩 5 g, ブドウ糖 5 g, 蒸留水 1,000 ml)。
- 15) グルコース・アスパラギン寒天培地上の発育……グルコース・アスパラギン斜面寒天培地に菌を接種した後, 37°C, 2~5 日間培養後, その発育状態を普通寒天培地上のものと比較検討した。
- グルコース・アスパラギン寒天培地の組成(リン酸二カリ 1 g, ブドウ糖 10 g, 炭酸ナトリウム 1 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml)。
- 16) 糖発酵性……下記培地を高圧滅菌したのち, あらかじめ 10~15% 濃度の糖(グルコース, シューカロース, キシロース, アラビノース, ラクトース)を無菌ろ過したもの最終濃度が 0.5% になるよう無菌的に調整した培地を用いた。菌を接種後 37°C で 3~20 日間培養し, ガスの生成はグラム管内のガスの有無, 酸生成は培地内の BTB 指示薬の変

色によって判定した。

培地組成（リン酸アンモン 1.0 g, 塩化カリ 0.2 g, 酵母エキス 0.2 g, BTB 少量, 蒸留水 1,000 ml）。

17) ゼラチン溶解性……ゼラチン 0.4% 添加普通寒天の平板培地に菌を画線培養し, 20°C で 3~5 日間培養後, 100 ml の蒸留水に 15 g の塩化第二水銀と 20 ml の塩酸を加えた液を 10 ml 流し込み, 画線上の透明環の有無を観察した。

18) カゼイン分解性……牛乳添加寒天培地に菌を画線培養し, 37°C で 3~7 日間培養後カゼインを分解して生じる透明環の有無を調べた。

19) 発育温度……普通寒天培地, 肉汁において 28°C, 40°C, 50°C 及び 55°C で発育するか否か, またその発育適温を斜面培地上での発育状態及び液体培地の濁度を肉眼的に調査した。

## 実験結果

### 1. 蛋白分解菌の分離

分離した菌株より蛋白分解力の強いものをカゼイン平板寒天培地に接種, 間隙の大きさによって分離した。分離菌株のうち比較的分解力の強いものを分離菌株 0-1 とした。

また, 分離菌株 0-1 株とその他の *Bacillus subtilis* (保存番号, B. subtilis 2011, B. subtilis 1090, B. subtilis 1095) をカゼイン平板寒天培地上で比較したものを Fig. 1 に示す。

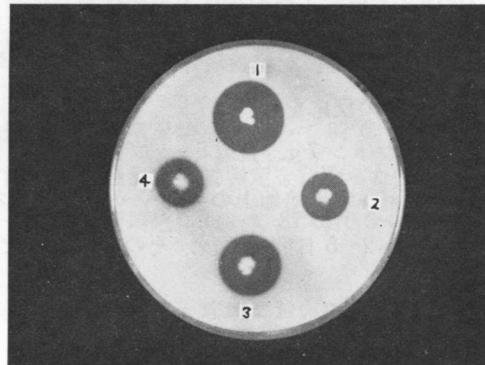


Fig. 1. Comparative degrees of proteolytic activity among the isolated bacterium and the others.

Clear zones (black rings on the photograph) on casein media were indicated.

1: 0-1 (the isolated bacterium) 2: 1090 3: 1095 4: 2011

## 2. 分離菌株の同定

純粋培養した菌株を BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (7th Edition)<sup>1)</sup> 及び Aearobic Sporeforming Bacteria<sup>7)</sup> に従って検索同定を行なった。その結果菌の分類学的特徴は次の通りである。

- 1) 普通寒天斜面及び平板上の集落の形態……斜面上での生育は良好で拡布状、色調は白色半透明、平板上での集落は直径 3~6 mm 程度、集落の周縁は波状、集落の表面は偏平。
- 2) 細胞……桿状、 $0.8 \sim 0.9 \times 2.7 \sim 5.5 \mu$ 、単独～連鎖状 (Fig. 2)。

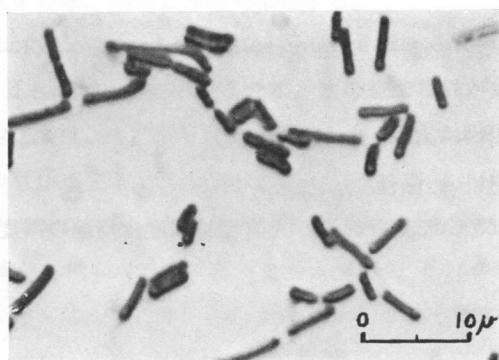


Fig. 2. The morphology of the bacterium isolated from pasteurized milk.

- 3) グラム染色性……陽性、3~4 日間培養でグラム染色性を失なうものが多い。
- 4) 孢子染色……普通寒天培地上ではほとんど孢子を形成しない。しかし、土壌抽出液添加普通寒天培地、ブドウ糖寒天培地上では培養 3~4 日後孢子形成が普通寒天上より数倍多く認められた。  
孢子は  $0.6 \times 1.0 \sim 1.3 \mu$  楕円、中心性または偏在性。孢子のうは、わずかに栄養細胞より膨大。
- 5) 空胞の存在……認められず。
- 6) 運動性……運動性有、周毛性。
- 7) 大豆寒天培地での発育……普通寒天培地の場合より発育旺盛。
- 8) 食塩耐性……5% 食塩にて発育良好、7% 食塩では発育不良、沈澱あり。12% 食塩では発育しなかった。
- 9) 淀粉分解性……陽性。
- 10) 硝酸塩の還元性……陽性。
- 11) 馬鈴薯切片上での発育……発育旺盛、水面に被膜、色素はクリーム色、または淡

灰褐色、表面しづ状で粘着性あり。

- 12) 嫌気状態での硝酸塩からのガス生成……陰性。
- 13) チロシン寒天培地での発育状態……普通寒天と同様な発育、色素生成認められず。
- 14) クエン酸塩の利用性……陰性。
- 15) アセチルメチルカルビノールの生成……非常に微弱であるが生成。
- 16) グルコースアスパラギン寒天培地での発育……普通寒天と同様に発育。
- 17) 糖 発 酵 性  
酸生成……グルコース(+)、シュクロース(+)、キシロース(+)、アラビノース(+),  
ラクトース(-)。  
ガス生成……グルコース(-)、シュクロース(-)、キシロース(-)、アラビノース(-),  
ラクトース(-)。
- 18) ゼラチン溶解性……液化大、層状液化。
- 19) カゼイン分解性……陽性。
- 20) 発育温度……55°C で発育せず、発育至適温度は培地の濁度より 35~38°C と認められた。
- 21) 分離源……殺菌乳。

### 考 察

殺菌牛乳を汚染する *Bacillus* 属による蛋白分解酵素についての研究は 2, 3 の研究者によって行なわれている<sup>2), 3), 5)</sup>。しかしそれが殺菌乳中においてどのような品質劣化を起すかについてはまだ不明な点が多い。*Bacillus cereus* は牛乳中において蛋白分解を起し甘性凝固の原因となる菌として重要視されている。

著者らの実験では殺菌乳から比較的蛋白分解力のある胞子形成の *Bacillus* 属の菌を分離した。著者らは BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology (7th Ed.), Aerobic Sporeforming Bacteria に従って分離菌の分類学的検索を行ない、この分離菌の胞子形成が非常におそく、また形成数も少ないため普通寒天培地上で培養したものは粗雑な検鏡においては見落す程であった。またこの菌は、普通寒天培地よりブドウ糖寒天培地及び土壤抽出液添加寒天培地上にて胞子形成が良好であることが明らかになった。また、アセチルメチルカルビノールの生成が微弱であること、クエン酸を利用しないことなどの特徴がある。しかし現在の *Bacillus subtilis* の分類同定については多少性質を異にする菌も含有されている。本菌も主要な事項については *Bacillus subtilis* の記載事項と一致したので本菌を *Bacillus subtilis* COHN と同定した。

更に本菌は、*Bacillus* 属に共通な蛋白分解酵素を生成するが、この菌が牛乳中においてどのような蛋白分解過程をとるか、また本菌の分泌する蛋白分解酵素等については現在研究中である。

### 要 約

牛乳中に混入する胞子形成菌は HTST 法、UHT 法などの殺菌によっても生存可能なもののが存在することが知られている。これらの菌には *Bacillus* 属の菌が多いが、この属の菌は一般に蛋白分解作用が強く甘性凝固の原因となる。本実験においても比較的強い蛋白分解力を有する菌株を分離、同定したので報告する。

分離菌株は、BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology に記載されている *Bacillus subtilis* の性質とおおまかに一致したが、次の点で相異があった。

1. 普通寒天培地上では、ほとんど胞子を形成しなく、また胞子形成速度も遅かった。
2. クエン酸塩の利用が認められなかった。
3. アセチルメチルカルビノールの生成が非常に微弱であった。

以上のような 2, 3 の一致しない点があったが、現在の *B. subtilis* の分類については多少、性質を異にする菌も含めていることから、本菌株を *Bacillus subtilis* COHN と同定した。

終わりに分離菌の同定に際し懇篤な指導を賜わった北海道大学農学部農芸化学応用菌学講座佐々木博博士に深甚な謝意を表する。

### 文 献

- 1) BREED, R. S., E. G. D. MURRAY, and N. R. SMITH, 1957. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7th Ed.) The Williams and Wilkins Company.
- 2) CHOUDHERY, A. K. and E. M. MIKOLAJCIK, 1970. Activity of *Bacillus cereus* proteinases in milk. J. Dairy Sci., **53**: 363-366.
- 3) FISH, N. L., P. J. PINKSON, and T. J. CLAYDON, 1969. Comparison of milk proteolysis by *Bacillus subtilis* protease and by *Pseudomonas fluorescens*. J. Dairy Sci., **52**: 2039-2041.
- 4) MARTIN, J. H., W. J. HARPER, and I. A. GOULD, 1966. Ultra-High temperature effects on selected *Bacillus* species. J. Dairy Sci., **49**: 1367-1370.
- 5) MELACHOULS, N. and S. L. TUCKEY, 1968. Properties of a milk-clotting microbial enzyme. J. Dairy Sci., **51**: 650-655.
- 6) MIKOLATCIK, E. M. and M. KOKA, 1968. *Bacilli* in milk. 1. Spore germination and growth. J. Dairy Sci., **51**: 1579-1582.
- 7) SMITH, N. R., R. E. GORDON, and F. E. CLARK, 1952. "Aerobic Sporeforming Bacteria" U.S. Department of Agriculture.

### Summary

It has been reported that the air-born spore forming bacteria in milk are viable even by High-Temperature Short-Time Pasteurization and Ultra-High-Temperature Sterilization. Most of these bacteria belonging to Genus *Bacillus*, generally show strong proteolytic activity, and cause sweet curding of milk.

We isolated a strain of which showed a vigorous proteolytic activity from pasteurized milk and identified it as *Bacillus subtilis* COHN.

The strain had almost the same characteristics as ordinary *B. subtilis* isolated from the surrounding environment but showed some differences in the following characteristics;

- (1) Sporulation was hardly found and was delayed on the nutrient agar culture.
- (2) The utility of citrate was not detected.
- (3) The production of Acetyl-methyl-carbinol was limited.

In the present classification system of *B. subtilis*, this species includes some bacteria which have some different characteristics from the classification kies of the bacteria listed on *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. No report of these differences of *B. subtilis* are available. Therefore, it may be stated that there is little doubt that the isolate was identical with *B. subtilis*.

At present, we are continuing to study proteolytic activity of the bacterium and the proteolytic process to milk.