

生乳から分離された *Microbacterium lacticum* の耐熱性および加熱損傷の修復

菊地政則, 松本幸子, 梅沢ありさ, 高尾彰一

Thermal Inactivation and Injury of *Microbacterium lacticum* Isolated from Raw Milk

Masanori KIKUCHI, Yukiko MATSUMOTO, Arisa UMEZAWA and Shoichi TAKAO
(Sept. 1995)

緒 言

生乳の耐熱性細菌の汚染は、低温殺菌乳や乳製品の品質に大きな影響を与えることから、汚染菌に対して十分な認識が必要である。生乳を汚染する耐熱性菌の種類は多く、汚染源も、土壌、チリ、水、牧草、糞便など広範囲に分布している^{8,14,15}。*Microbacterium* や *Micrococcus* の汚染は、洗浄が不十分で乳石 (milk stone) が残るような搾乳器具において、汚染が極めて高いと指摘している^{16,26}。また、孢子形成細菌である *Bacillus* の汚染源は、土壌、飼料、牛床、乳頭などの環境からの汚染が多い⁴。さらに、Hull ら⁶ の報告によると、牛乳中の *Clostridium* の汚染源は、発酵不良のサイレージによるとしている。低温殺菌乳の汚染細菌として出現頻度の高い *Microbacterium* は、非孢子形成細菌としては最も耐熱性が高く、63℃、30 分間の低温殺菌処理でも死滅せず、これを殺菌するためには、80℃ で数分間の加熱が必要である²²。

この耐熱性を有する *Microbacterium* は Orla-Jensen (1919) によって初めて提唱された属名であるが、1990 年に出版の Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹¹) および Bergey's Manual Bacteriology 第 9 版⁵)では Irregular, Nonsporing Gram-Positive Rods のグループとして他の 36 属とともに位置付けられている。このグループには G-C 含量が 30mol% のものから、*Microbacterium* のように 69~75mol% の高いものまで含まれる。しかし、好気性グループに位置付けられている本菌は、比較的 G-C 含量が高いものが集まっている。この好気性菌に属する菌は、菌学的性状が近似

するため、これまでも幾度も、その分類学的特性が検討されたが、peptidoglycan type, DAP の異性体, glycolyl の種類、さらに新しい分子生物学の手法によって次第に明らかにされてきた^{3,9,25,27,28}。その結果、Bergey's Manual 第 9 版において、*Microbacterium* 属には、これまでの 3 種に加え、これまでグラム陽性桿菌でありながら *Flavobacterium arborescens* とされていた *M. arborescens* を新しく加え、4 種が位置付けられた⁹。

一方、加熱などによる非致死性的損傷を受けた細菌細胞は、選択培地や集積培地の選択阻害剤に対する感受性が高まり、増殖遅延や発育不能となったり、一時的に栄養要求が複雑となることが知られている^{1,2,21}。そのため、加工食品の微生物の検出や計測に際して、それ相応の注意が必要となる。従って、加熱処理による細胞の損傷程度を知ることは、日常的な食品衛生検査においても重要である。

我々は、生乳および市販低温殺菌乳における耐熱性細菌叢の出現頻度について検討しているが¹²、今回は低温殺菌乳やチーズ製造工程で広く使用される 63℃-30 分間の低温殺菌または 75℃-15 秒間の高温殺菌法で残存する *Microbacterium* の耐熱性ならびに牛乳中における増殖特性を検討した。また、本菌の加熱処理による非致死性的細胞損傷の程度とその損傷修復についても検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

実験に用いた菌株は、*Microbacterium lacticum* JCM 1379 T (type strain) および生乳から分離され、*M. lacticum* と同定した R1118 株を用い、市販の APT 培

地 (BBL) の斜面に保存した。

2. 耐熱性の測定

供試菌株の耐熱性は、APT 寒天培地の斜面で十分活性化した菌体を、APT 液体培地で 32℃、48 時間の前培養したものを、予め 110℃、5 分間の滅菌した 10% 還元脱脂乳培地ならびに APT 液体培地に菌数が一定になるように添加した。それを良く攪拌したのち、試料に対する加熱状態が均一になるようにするため、滅菌パスツールピペットで、1 ml のガラスアンプル管に移し、口を溶封した後、63±0.2℃ および 75±0.2℃ の各温度に調整したウォーターバス中に完全に浸漬し、所定時間の殺菌処理を行い、直ちに 15℃ まで冷却した。殺菌処理したアンプル管を開封後、リン酸緩衝生理的食塩水で 10 倍段階希釈し、生菌数を測定した。また、菌数測定は基本的に、標準寒天培地による混釈平板法ならびにスパイラルプレーター (SPIRAL SYSTEM INSTRUMENTS, Model D) によって表面塗抹し、32℃、72 時間培養後菌数を計測した。また、殺菌処理におよぼす環境因子の検討は、培養時間、殺菌時の媒体の影響等について行った。

3. 増殖特性の検討

供試菌株の増殖は、APT 培地で前培養し、活性化した菌体を直接または加熱処理したものを、初期菌数が 10⁵ml⁻¹ になるように接種、その増殖を標準寒天培地による混釈平板法、ならびに APT 液体培地による 660

nm の吸光度をバイオフィオトレコーダーによって測定した。

また、食塩が加熱処理した本菌の増殖におぼす影響については、予め食塩を添加した APT 液体培地に、非致死熱的加熱損傷を与えた供試菌を 10⁵ml⁻¹ になるように添加し、増殖に対する影響を確認した。加熱損傷細胞の計測は、非致死熱的加熱損傷を受けた *Microbacterium* が塩化リチウムにより増殖が遅延することを予め確認した。つまり、予め溶解した標準寒天培地に塩化リチウムを無菌的に添加した平板を作成したのち、加熱損傷を受けた菌をスパイラルプレーターで表面塗抹し、形成集落数を塩化リチウム無添加のものと比較して求めた。

4. TDR 曲線および D 値の算出

加熱時間と生存菌数の算出は、各殺菌時間に対する生存菌数を対数で表示した。また、殺菌処理による菌数の殺菌効率を示すために D 値 (decimal reduction time: D value) を用いたが、D 値の計算式は以下の通りである。

$$D = U / (\log a - \log b)$$

ここで U: 加熱時間 (分)

a: 殺菌前の生菌数

b: 殺菌後の生菌数

結 果

63℃ の加熱処理による耐熱性を Fig.1 に示した。*Microbacterium lacticum* の type strain である JCM

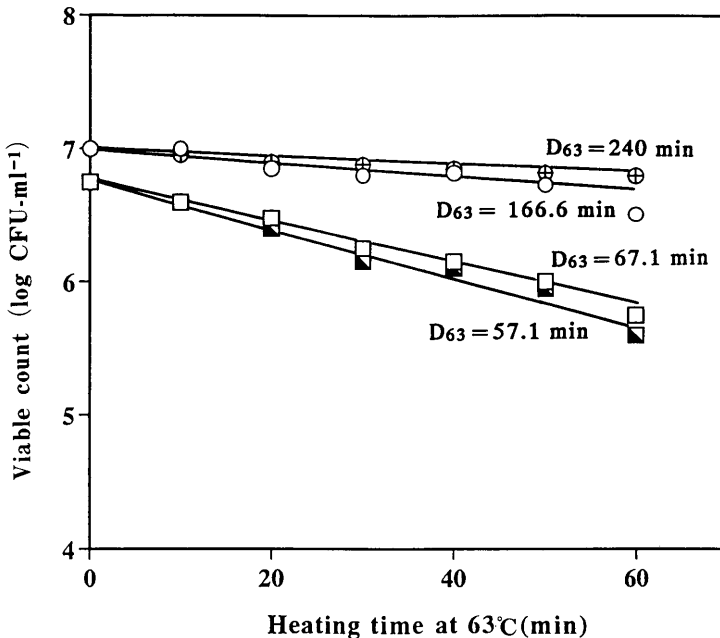


Fig.1 Survivor curves for *Microbacterium lacticum* heated at 63℃ and recovered in standard plate count agar at 32℃, strain JCM1379 (□, APT; ■, skim milk) and strain R1118 (○, APT; ⊕, skim milk).

1379 株は、我々が牛乳から分離した R1118 株より耐熱性が低い、63℃、30 分間の低温殺菌処理によっても 1 オーダー以下の減少であり耐熱性を示した。この時の D 値はスキムミルクで 57.1min, APT 培地中で 67.1 min であった。一方、R1118 株の D 値は、スキムミルクで 240min, APT 培地で 166.6min と、63℃ では長時間の加熱に耐性を持っていた。また、63℃ の加熱処理時における媒体の差については、JCM1379 株においてスキムミルクに比べ、APT 培地を加熱媒体としたものが若干 D 値が高かった。しかし、R1118 株では

逆にスキムミルクを媒体とした方が D 値が高く、菌株によって媒体の影響が異なった。また、Fig.2 には 75℃ における耐熱性を示した。R1118 株の 75℃ における D 値はスキムミルクで 46.2min, APT で 27.2 min であるのに対し、type strain の JCM1379 では、スキムミルクで 5.0min, APT 培地では 9.09min であり、いずれも、R1118 株に比べ耐熱性が低く、また耐熱性に対する加熱媒体の影響は 63℃ の加熱処理と同傾向であった。

次に、*Microbacterium* に対する加熱処理による細胞

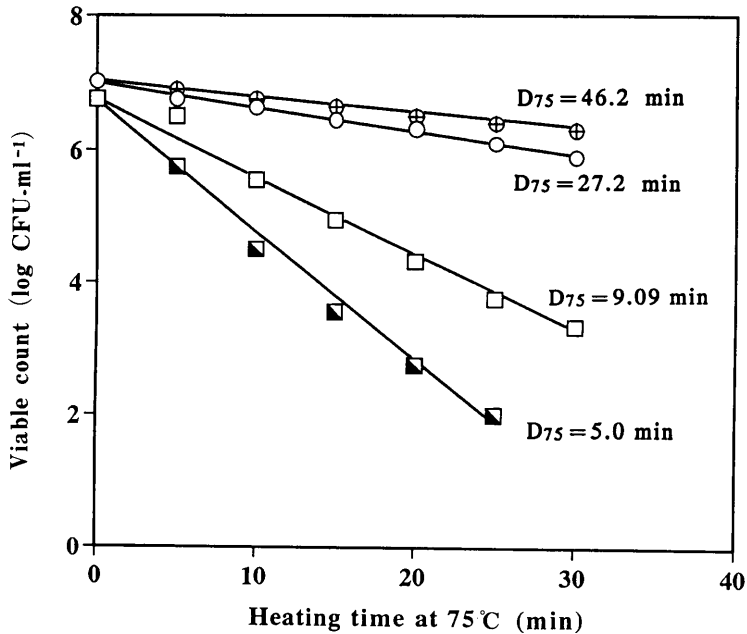


Fig.2 Survivor curves for *Microbacterium lacticum* heated at 75℃ and recovered in standard plate count agar at 32℃, strain JCM1379 (□, APT; ■, skim milk) and strain R1118 (○, APT; ⊕, skim milk).

損傷の程度を検討するために、R1118 と JCM1379 株を 63℃、30 分間の加熱処理を行なった後に、同じ APT 液体培地に初期菌数が 10^5 ml^{-1} になるように接種し、32℃ における増殖性を検討した (Fig.3)。その結果、耐熱性の低い JCM1379 株の増殖は加熱処理によって著しく低下した。また、耐熱性の高い R1118 株は 63℃、30 分間の加熱により発育遅延がみられるが、JCM1378 より増殖が速かった。

一般に *Microbacterium* は食塩に対する感受性が高いとされている。ここでは、加熱処理した R1118 株の増殖におよぼす液体培地中の食塩の影響について検討した。その結果、Fig.4 に示したように、食塩無添加で非

加熱菌液のものは、誘導期が約 5 時間程度であるが、加熱処理した菌では誘導期が約 2.5 時間延長され 7.5 時間であった。また、細胞損傷の受けた R1118 株は、食塩 0 %で、7.5 時間の誘導期であるのに対し、1 %食塩添加により無添加に比べ 5 時間以上の延長となり、食塩に対し感受性が高まった。

加熱処理の受けた細胞が食塩に対し感受性が高まることから、加熱によって細胞損傷が生じていることが明らかになった。そこで、加熱処理による細胞損傷の程度および修復時間を知る目的で、加熱処理した菌体について、一般に選択培地の添加剤として利用される塩化リチウムに対する感受性を検討した。つまり、塩化リチウムを所

定の濃度になるように標準寒天の平板に添加したものに、スパイラルプレーターにより適宜希釈した菌液を塗抹し、塩化リチウム無添加培地における形成集落数と比較し、

加熱による損傷細胞数を推定した。その結果、Table 1 に示したように、JCM1379 株の非加熱処理菌体では 0.75% 濃度まで菌数の減少は認められないのに対し、

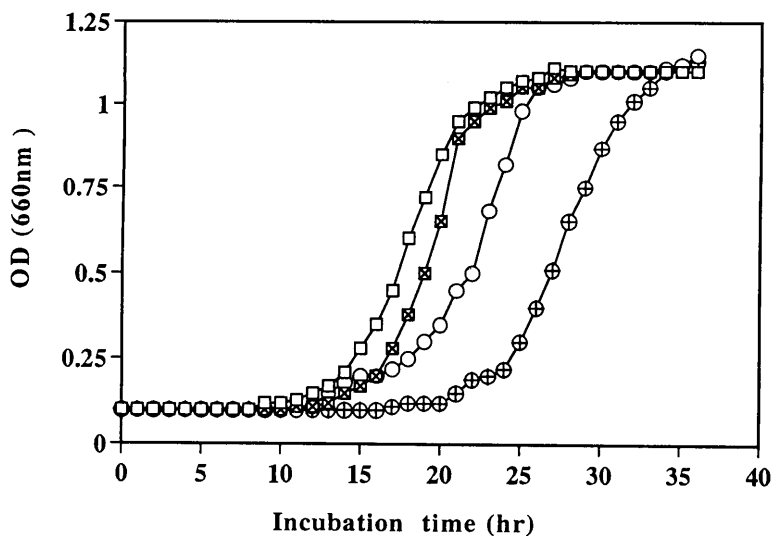


Fig.3 Growth curves of heat-treated *Microbacterium lacticum*.

Cells were heated at 63°C for 30min.

-□-, unheated R1118 strain; -■-, heated R1118 strain;
-○-, unheated JCM1379 strain; -⊕-, heated JCM1379 strain.

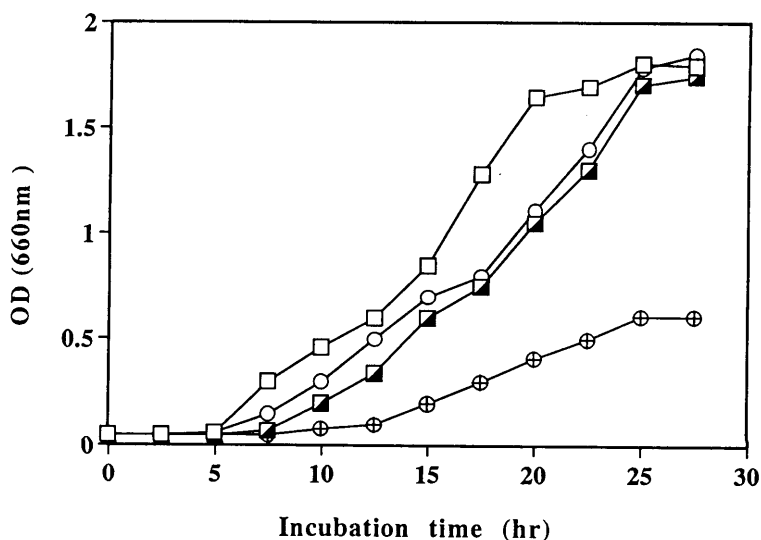


Fig.4 Effect of NaCl added and heat-treatment on the growth of *Microbacterium lacticum* R1118 strain.

-□-, 0% NaCl and unheated; -■-, 0% NaCl and heated;
-○-, 1% NaCl and unheated; -⊕-, 1% NaCl and heated.

加熱処理した細胞では、0.25% 添加ですでに非加熱細胞に比べ 2 オーダーの菌数減少となり、加熱処理により塩化リチウムに対し感受性が高まった。一方、耐熱性の高い R1118 株では、非加熱細胞に対しては塩化リチウム 1.5% の濃度まで、増殖に影響が認められないのに対し、加熱処理細胞では同濃度で 2 オーダーの菌数低下となり、非致命的加熱により、塩化リチウム存在下で正常な生育が困難になった。

次に、この加熱損傷の修復が、非選択培地の ATP 液体培地でどのように行なわれるかについて、R1118 株を用い確認した。つまり、加熱によって細胞損傷を与えた R1118 株を、APT 液体培地で培養し、経時的に塩化リチウムを 1.5% 添加した標準寒天培地と無添加培地によって菌数を計測、その菌数の差を損傷菌数とした。その結果、Fig.5 に示したように、非選択培地の初期菌数は、 $10^{6.3}\text{ml}^{-1}$ であるのに対し、塩化リチウム

Table 1 The effect of lithium chloride concentration of recovery media on the apparent heat resistance of *Microbacterium lacticum* R1118.

Strain No.	Treatment	Lithium chloride concentration (%)						
		0	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	2.00
Log. 10 CFU·ml ⁻¹								
JCM 1379	unheated	6.76	6.69	6.70	6.58	5.40	4.80	⟨1.0
	heated (75℃ , 20 min.)	5.78	4.69	⟨1.0	⟨1.0	—	—	—
R1118	unheated	6.72	6.72	6.66	6.61	6.52	6.50	5.71
	heated (75℃ , 20 min.)	6.60	6.59	6.50	6.55	5.28	4.48	⟨10

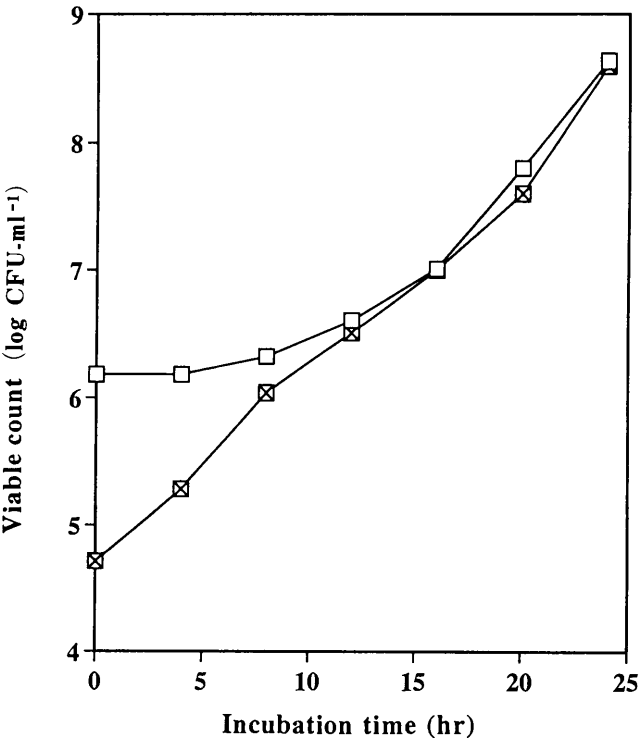


Fig.5 Growth of heat-treated *Microbacterium lacticum* R1118 in APT broth at 32℃. Samples were surface plated on standard plate count agar (SPC: □) and SPC+1.5% lithium chloride (⊗).

添加培地は、 $10^{4.7}\text{ml}^{-1}$ となった。この数値から加熱損傷を受けた細胞は全細胞の 97.3% であった。加熱損傷の受けた細胞は、APT 液体培地中で損傷を徐々に修復し、約 10 時間で塩化リチウム添加の選択培地において非選択培地とほぼ同等の菌数となり、加熱によって受けた損傷細胞を修復した。

考 察

生乳・乳製品の汚染菌は多種にわたるが、非孢子形成細菌として最も耐熱性を有する *Microbacterium* は搾乳器具等から生乳を汚染し、その後の殺菌処理によっても死滅しないために乳製品に残存するとされている²⁶⁾。今回、*M. lacticum* の type strain である JCM1379 株と我々が生乳より分離した R1118 株の耐熱性について検討した。その結果、JCM1379 の 63°C における D 値は、 $D_{63}=57.1-67.1\text{min}$ 、 $D_{75}=5.0-9.09\text{min}$ であり、 63°C における耐熱性は相当高いものであった。また、生乳より分離された R1118 株のそれは $D_{63}=166.6-240$ 、 $D_{75}=27.2-46.2$ であり、 75°C 、30 分間の殺菌処理でも初期菌数を 1 オーダー程度しか減少させず、高い耐熱性を有した菌株である。今回の殺菌試験は、APT 液体培地で 48 時間培養したものであり、増殖の定常期の菌であるため、比較的熱に対し安定性があると思われるが、生育の条件や殺菌処理条件によってこの耐熱性は変動するものと考えられる^{13,23,24)}。

今回の供試菌株でも JCM1379 株は APT を媒体としたものが、耐熱性が高いのに対し、R1118 はスキムミルクを媒体としたもので耐熱性が高かったことから、媒体による影響は菌株によって相違があると思われる。この *Microbacterium* には現在 4 種⁶⁾ が位置付けられているが、いずれも耐熱性を持つとされている。しかし、実際に低温殺菌法で残存する菌種は、*M. laevaniformans* と *M. lacticum* である。特に、*M. lacticum* を完全に死滅させるには、 80°C 以上の加熱が必要とされているが、菌の age、栄養状態、殺菌時の媒体など複雑な殺菌条件に左右されるものと思われる²²⁾。しかし、何れにしても低温殺菌乳やチーズ製造時に利用される低温殺菌法や高温短時間殺菌法では、ほとんど死滅しないことが明らかになった。

このように *Microbacterium* が牛乳に残存すると保存中に酸敗の原因になるとされていることから汚染の防止が重要である。また、殺菌処理した菌体は、細胞に加熱損傷を受けるため、製品の細菌検査時に標準寒天培地やその他の選択培地で正常に集落を形成しなかったり、極端に形成集落が微小であるために菌数測定に支障をきたすことも危惧されている。実際に加熱処理した菌は食塩

に対する感受性が高まり、食塩の添加された培地や、選択阻害剤を含む選択培地では発育が制限されることが確認された。

以上のように、加熱処理や凍結処理など、非致死の損傷を受けた菌体が、一時的に増殖が制限される現象は、Humphrey ら^{7,8)}、Ray ら¹⁸⁾による *Salmonella*、Przybylski と Witter¹⁷⁾、Ray と Speck^{19,20)}による *Escherichia* など食品汚染細菌で、今井と加藤¹⁰⁾による lactobacilli などよく検討されている。また、グラム陽性菌である *Listeria*^{1,2,24)} でも同様な傾向が認められることから、細菌に共通した特性と思われる。しかし、この特性は微生物の種や加熱法さらにその程度によっても差があるといわれている。このように選択培地における集落形成能の差は非致死のストレスの程度と修復の栄養要求の差によるものと解釈されている。これらのことから、食品汚染微生物の個々について、それぞれの損傷特性についての情報を収集することが必要と思われる。

要 約

生乳や乳製品から分離される耐熱性細菌は、streptococci, micrococci, coryneform 細菌の一部、および孢子形成細菌である。これらの菌叢のうち Coryneform 細菌の一種である microbacteria は非孢子形成細菌として最も耐熱性が高く、低温殺菌乳や乳製品からしばしば分離される優勢菌である。

今回、我々は、*Microbacterium lacticum* の 2 菌株を用い、本菌の耐熱性について検討し、併せて加熱損傷を受けた細胞の修復について検討した。

その結果、*M. lacticum* の type strain である JCM1379 株の D 値は、スキムミルクを加熱媒体としたとき、 $D_{63}=57.1\text{min}$ 、 $D_{75}=5.0\text{min}$ であるのに対し、我々が生乳から分離した R1118 株では、 $D_{63}=240\text{min}$ 、 $D_{75}=46.2\text{min}$ であり、耐熱性が高かった。また、この *M. lacticum* R1118 株を 75°C 、20 分間の加熱処理をすると、1% の食塩が添加された APT 液体培地においても増殖が遅延し、食塩に対し感受性が高まった。さらに、この加熱による細胞損傷は APT 液体培地中において約 8 時間で完全に修復することが明らかになった。

文 献

- 1) Bailey, J. S., D. L. Fletcher and N. A. Cox, 1990. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. J. Food Protection, 53: 473-477.
- 2) Busch, S. V. and C. W. Donnelly, 1992. De-

- vepoment of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Appl. Environmental Microbiol., **58** : 14-20.
- 3) Bousfield, I. J. and A. G. Calley, 1978. Coryneform Bacteria. pp. 1-160, Academic Press, London.
- 4) Crielly, E. M., N. A. Logan and A. Anderton, 1994. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. J. Appl. Bacteriol., **77** : 256-263.
- 5) Holt J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. pp 571-596. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 1994.
- 6) Hull, R., S. Toyne, I. Haynes and F. Lehmann, 1992. Thermotolerant bacteria : a re-emerging problem in cheesemaking. Aust. J. Dairy Tech., **47** : 91-95.
- 7) Humphrey, T. J., N. P. Richardson, K. M. Statton and R. J. Rowbury, 1993. Acid habituation in *Salmonella enteritidis* PT4 : impact of inhibition of protein synthesis. Letter Appl. Microbiol., **16** : 228-230.
- 8) Humphrey T. J., N. P. Richardson, K. M. Statton and R. J. Rowbury, 1993. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella enteritidis* phage type 4. Appl. Environmental Microbiol., **59** : 3120-3122.
- 9) Imai, K., M. Takeuchi and I. Banno, 1984. Reclassification of *Flavobacterium arborescens*" (Frankland and Frankland) Bergey et al. in the genus *Microbacterium* (Orla-Jensen) Collins et al., as *Microbacterium arborrescens* comb. nov., nom. rev. Curr. Microbiol., **11** : 281-284.
- 10) 今井正武, 加藤牧子, 1975. 凍結保存による *lactobacilli* の損傷とその回復について. 農化, **49** : 93-98.
- 11) Jones, D. and M. D. Collins, 1986. Irregular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, eds.) Vol. 2, pp 1261-1434, Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- 12) Kikuchi, M., Y. Matsumoto, X. M. Sun and S. Takao, 1996. Incidence and significance of thermotolerant bacteria in farm milk supplies and commercially pasteurized milk. Animal Sci. Technol., **67** :
- 13) Kim K., E. A. Murano and D. G. Olson, 1994. Heating and storage conditions affect survival and recovery of *Listeria monocytogenes* in ground pork. J. Food Sci., **59** : 30-32.
- 14) Lehmann, F., P. S. Russell, L. S. Solomon and K. D. Murphy, 1992. Bacterial growth during continuous milk pasteurization. Australian J. Dairy Technology, **47** : 28-32.
- 15) Lehmann, F., 1992. Thermotolerant-thermophilic bacteria in continuous cheese making. Australian J. Dairy Technology, **47** : 94-96.
- 16) Mackenzie E., 1973. Thermotolerant and psychrotrophic organisms on poorly cleansed milking plants and bulk milk tanks. J. Appl. Bacteriol., **36** : 457-463.
- 17) Przybylski, K. S. and L. D. Witter, 1979. Injury and recovery *Escherichia coli* after sublethal acidification. Appl. Environmental Microbiol., **37** : 261-265
- 18) Ray, B., J. J. Jezeski and F. F. Busta, 1971. Effect of rehydration on recovery, repair, and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. Appl. Microbiol., **22** : 184-189.
- 19) Ray, B. and M. L. Speck, 1972. Repair of injury induced by freezing *Escherichia coli* as influenced by recovery medium. Appl. Microbiol., **24** : 258-263.
- 20) Ray, B. and M. L. Speck, 1972. Metabolic process during the repair of free-injury in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol., **24** : 585-590.
- 21) Ray, B., 1986. Impact of bacterial injury and repair in food microbiology : Its past, present and future. J. Food Protection, **49** : 651-655.
- 22) Robinson, K., 1966. Some observations on the taxonomy of the genus *Microbacterium*. I. Cultural and physiological reactions and heat resistance. J. Appl. Bacteriol., **29** : 607-615.
- 23) Rodriguez, J. H., M. A. Cousin and P. E. Nelson, 1993. Thermal resistance and growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in tomato juice. J. Food Protection, **56** : 165-168.

- 24) Schoeni, J. L., K. Brunner and M. P. Doyle, 1991. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. J. Food Protection, **54** : 334-337
- 25) Suzuki, K., T. Kaneko and k. Komagata, 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. Int. J. Systematic Bacteriol., **31** : 131-138
- 26) Thomas, S. B. and B. F. Thomas, The bacterial content of milking machines and pipeline milking plants. Dairy Ind., **20** : 839-932.
- 27) Uchida K. and K. Aida, 1977. Acyl type of bacteria cell wall : Its simple identification by colorimetric method. J. Gen. Appl. Microbiol., **23** : 249-260.
- 28) Uchida K. and K. Aida, 1979. Taxonomic significance of cell-wall acyl type in *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* group by a glycolate test. J. Appl. Microbiol., **25** : 169-183.

Summary

The thermophilic bacteria commonly found on farm dairy equipment and in raw milk are limited to a few species of four groups, viz. streptococci, micrococci, coryneform bacteria and aerobic sporeforming rods. *Microbacterium* are often prevalent in the microflora of commercially pasteurized milk.

The purposes of this investigation were to define thermal resistances of microbacteria.

Two strains of *Microbacterium lacticum* were heat-treated at two temperatures in skim milk and APT broth by the small ampoule (1 ml) tube method. The D-values of microbacteria in skim milk at 63 and 75°C were 240 min., and 46.2 min. for the *M. lacticum* R1118 strain and 57.1 min. and 5.0 min. for the *M. lacticum* JCM1379 strain, respectively. The ability of the heat-injured *M. lacticum* R1118 strain to repair itself was evaluated. *M. lacticum* were injured by heating at 75°C for 20 min. When incubated in APT broth at 30°C, heat-injured *M. lacticum* R1118 strain cells repair in 8 hours.