

生乳・殺菌乳の耐熱性細菌の生態および
耐熱特性に関する研究

菊 地 政 則

Studies on the Thermal Resistance and Significance
of Thermoduric Bacteria in Raw
and Pasteurized Milk

Masanori KIKUCHI

(June 1996)

【目 次】			
		1. 緒言	… 10
		2. 実験材料および方法	… 10
第 1 編 緒論	… 2	3. 結果	… 10
		1) 菌相の季節別変動	… 10
第 2 編 研究史	… 3	2) 細菌の汚染度による構成細菌相	… 12
序	… 3	4. 考察	… 12
1. 生乳汚染細菌相	… 3	5. 小括	… 12
2. 耐熱性細菌相の分布	… 4		
3. <i>Microbacterium</i> の分類学的位置	… 5	第 3 章 生乳および低温殺菌乳の汚染耐熱性細菌	
4. 非致死性的 (sub-lethal) ストレスによる細胞損傷		についての実験	… 13
と増殖	… 5	1. 緒言	… 13
第 3 編 実験の部	… 6	2. 実験材料および方法	… 13
第 1 章 バルククーラ保存乳の細菌数推移	… 6	3. 結果	… 14
1. 緒言	… 6	1) 生乳および市販低温殺菌乳の各細菌相の	
2. 実験材料および方法	… 6	菌数分布	… 14
3. 結果	… 7	2) 耐熱菌相の分布	… 15
1) バルククーラ保存生乳中の細菌数の変動	… 7	4. 考察	… 15
2) 季節別、搾乳方式別の総菌数および各菌相の		5. 小括	… 17
菌数分布	… 8	第 4 章 生乳中の主要耐熱性細菌の同定	… 17
4. 考察	… 9	1. 緒言	… 17
5. 小括	… 10	2. 実験方法および方法	… 17
第 2 章 バルククーラ保存乳の汚染細菌相		3. 結果	… 18
についての実験	… 10	1) <i>Bacillus</i> 属の同定	… 18
		2) <i>Microbacterium</i> 属の同定	… 19

4. 考察	… 20
5. 小括	… 21
第5章 <i>Microbacterium lacticum</i> の耐熱性および耐熱性に及ぼす加熱条件の影響	… 21
1. 緒言	… 21
2. 実験材料および方法	… 21
3. 結果	… 23
1) <i>Microbacterium</i> の耐熱特性	… 23
2) <i>Microbacterium</i> の耐熱性に及ぼす加熱媒体の影響	… 23
4. 考察	… 25
5. 小括	… 26
第6章 <i>Microbacterium lacticum</i> の耐熱性に及ぼす非致死ストレスの影響	… 26
1. 緒言	… 26
2. 実験材料および方法	… 27
3. 結果	… 27
4. 考察	… 29
5. 小括	… 29
第7章 <i>Microbacterium lacticum</i> の加熱処理による細胞損傷とその修復	… 30
1. 緒言	… 30
2. 実験材料および方法	… 30
3. 結果	… 30
4. 考察	… 32
5. 小括	… 33
第8章 <i>Microbacterium lacticum</i> の耐熱性に及ぼす lactoperoxidase system の影響	… 33
1. 緒言	… 33
2. 実験材料および方法	… 33
3. 結果	… 33
4. 考察	… 35
5. 小括	… 35
第4編 総括	… 36
謝辞	
英文要約	… 37
第5編 引用文献	… 37

第1編 緒 論

タンパク質、脂肪、炭水化物、ミネラル、ビタミンなどがバランス良く水に分散あるいは溶けている牛乳は、優れた動物性食品として紀元前 4000 年頃から利用されてきた。人にとって優れた食品は同時に多くの微生物にとっても望ましい培養基である。微生物は自然環境に広く生息し、牛体、飼料、空気、搾乳器具類を介して生乳を汚染し、乳製品に移行することによって多大な欠陥を生じる。

これまで牛乳の微生物に関しては、微生物学者はもとより、酪農技術者によって、特にその汚染源、汚染菌の分類学的検討ならびに生乳の品質に及ぼす影響や各種乳製品に対する影響などについて広く検討されてきた。

牛乳の微生物については、これまで当然ながら衛生学的な見地から研究が進められた。生乳中の細菌は、搾乳から保存期間における二次的汚染と保存段階における増殖に起因する。衛生的な生乳の生産は、この汚染をできる限り少なくすることが最も重要な課題である。通常健康な牛体の乳房乳には 100 ~ 1000/ml 程度の細菌が存在する。しかもその細菌相は、牛体の健康状態、分房の位置、泌乳期、季節などによっても異なる。健康な牛の場合、*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, コリネ型細菌などが検出される。搾乳後、牛罐、バルククーラに移された段階における生乳の細菌数は $10^3 \sim 10^4$ /ml に増加し、上述の菌種のほかに、大腸菌群, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* 属などのグラム陰性菌が優勢菌相となる。これらの菌は広く自然界に分布し、その汚染源は搾乳器具と農場環境であるとされ、搾乳器具の洗浄殺菌が不完全であると著しく菌数が増加するとされている。

一方、汚染菌に対する衛生学的見地から、それらの微生物に対する防御および汚染菌に対する殺菌処理法などについても古くから研究されてきた。特に、生乳に対する殺菌法は、加熱殺菌が唯一の方法であることから、古くは、パスツールが開発した低温殺菌法を始め、殺菌時間の短い高温殺菌法、さらに作業および殺菌効率の関係から、高温でしかも短時間殺菌の可能な超高温殺菌法(UHT)などの開発が進んだ。その結果、技術的には生乳に汚染した細菌の殆どを死滅させることが可能になった。しかし、乳製品の多くは、このような超高温による殺菌法では、本来の製品を調製することができず、従来から行なわれている低温殺菌または高温殺菌に頼らざるを得ない製品も多い。低温殺菌法および高温短時間殺菌

法の殺菌効率はほぼ同様と考えられ、生乳汚染細菌とくに病原菌の死滅除去を目的にしているところから、病原菌はもちろん、殆どの無孢子細菌は死滅する。しかし、孢子形成細菌の *Bacillus*, *Clostridium* はもちろん無孢子細菌の中でも耐熱性細菌のグループは残存する。

牛乳の耐熱性細菌としてよく知られているものは、耐熱性連鎖球菌である *Streptococcus thermophilus*, *S. faecalis* など、*Micrococcus*, *Corynebacterium*, そして無孢子細菌としては最も耐熱性が高いといわれる *Microbacterium* 属および孢子形成細菌の *Bacillus*, *Clostridium* である。特に、*Microbacterium* 属は生乳の耐熱性細菌として良く知られている。

一方、細菌の耐熱性は、殺菌処理するまでに菌のおかれた環境状態、とくに菌体の生育期や生育段階の栄養状況などの生育環境によって異なると同時に、殺菌処理する前段階の温度環境、殺菌する際の媒体によってもその殺菌効率が大きく変動する。

また殺菌処理した菌は、一時的に細胞損傷を受ける。そのため、食品中の細菌数を測定する際に用いられる一般的な細菌検査法では、集落の形成能が低下しているため、規定時間までに集落を形成できないことがあり、衛生学的判断を遅らせることも問題とされている。

本研究は、乳製品の原料乳の衛生学的見地から、生乳の汚染細菌相を生態学的に検討し、さらに生乳の保存期間における汚染細菌の動態を検討すると同時に、生乳中の耐熱性細菌の動態を生態学的見地から検討したものである。また特に無孢子細菌の中で比較的耐熱性があり、しかも分類学的位置が不詳である、コリネ型細菌 (Coryneform bacteria) グループの *Microbacterium* に注目し、本属の分類学的検討、ならびに本菌の耐熱性特性、とくに耐熱性に及ぼす各種要因、加熱損傷細胞の修復についても検討を加えた。

第2編 研究史

序

従来の生乳は比較的短時間で加工し消費されていたが、現在、生乳の集乳は、隔日集乳が一般的になり、しかも集めた生乳も処理工場まで遠距離輸送され、さらに殺菌処理された製品も、消費者に到達するには数日間を要することなど、牛乳の長距離輸送や長期間保存の機会が多くなった。そのため、生乳の生産現場は勿論、殺菌処理後においても、その衛生管理の重要性がますます要求されることになる。さらに、牛乳の消費拡大を勧める

中で、乳製品の個性化や差別化が要求され、わが国でもナチュラルチーズの製造が各地で盛んに行なわれるようになった。これらを反映して生乳の衛生学的な品質も、これまでの菌数のみならず、生乳の汚染細菌相の実態についても十分認識しておく必要がある。

いっぽう、社会的にも食品の安全性が強く叫ばれ、製造物責任法 (PL 法) が 1995 年 7 月から施行され、食料生産現場における商品管理、衛生管理に関し製品の取扱いが従来にも増して厳しくなった。また、それらを背景に、各生産工場では自主衛生管理を個別から総合的に管理しようとする試み、いわゆる HACCP (hazard analysis critical control point: 危害分析・重要管理点) システムを導入する傾向にある。

生乳汚染細菌相についての研究は古く、これまでも多数の研究者によって行なわれてきた。しかし、この汚染細菌相は農場環境の変化、搾乳形態、搾乳器具や冷却装置の開発、輸送手段の変遷に伴い、汚染細菌相の変化も認められるところである。その典型的な例が、従来の汚染細菌相がグラム陽性細菌が中心であったのに対し、最近の生乳は、グラム陰性細菌やコリネ型細菌の汚染頻度が高くなっている。特に重要視すべき菌相について個別にみると以下ようになる。

1. 生乳汚染細菌相

1) グラム陽性細菌

旧来の生乳は、洗浄・殺菌が比較的不十分で、しかも保存温度が高かったことから、搾乳器具や集乳機器等の汚染細菌が、牛乳に移行することが多く、洗浄・殺菌の不備な箇所の栄養分を利用し、増殖した乳酸連鎖球菌や *Lactobacillus* 等を代表とする酸生成菌が主要な汚染細菌相であった^{78,135)}。また、牛体、空気、土壌などの環境由来菌である *Micrococcus*, 孢子形成菌の *Bacillus*^{23,141)} や *Clostridium*⁶⁾ などは、広く農場環境に存在し、汚染菌として普遍的なものであった。さらに生乳にはコリネ型細菌が汚染することが多く、耐熱性の高い *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* なども多く認められる¹⁴²⁾。特に、*Microbacterium* は生乳汚染細菌として、搾乳器具など牛乳成分が残存する部分に生息し、それが生乳を汚染することが明らかになっている。洗浄と殺菌の不備な搾乳器具類に付着した乳石 (milk stone) には、*Microbacterium* を始め、コリネ型細菌の多いことが報告されている^{19,156)}。これらのグラム陽性細菌は、一般に栄養要求がグラム陰性細菌に比べ複雑であり、しかも、中温発育性であることから、冷蔵機

器を効率よく使用する限り短時間で増殖することは少ない。しかし、これらの菌は耐熱性を示すために、殺菌処理によっても残存し、乳製品に移行するため、製品の品質に大きく影響することから汚染防止に心がけなければならないのは当然である。

2) グラム陰性細菌

グラム陽性細菌は、一般に冷蔵牛乳中において発育が緩慢であるのに対し、グラム陰性細菌は低温域においても発育可能なものが多い。グラム陰性細菌の汚染源は土壌、用水、空気、牧草などに由来するものが多く、また一部のものは搾乳器具を汚染し、搾乳時にそれが生乳を汚染する可能性が極めて高い。生乳からの分離報告が多い *Pseudomonas* は汚染細菌の代表的なものであるが、本菌はプロテアーゼ、リパーゼの生成能が高く、しかも低温発育性のために冷蔵乳で増殖し品質を劣化するため、特に注意を要するものである^[36,156,179]。また、非水溶性のカロチノイド系の黄色や橙色色素を生成する *Flavobacterium* も冷蔵生乳における主要汚染細菌で、プロテアーゼ、リパーゼ生成が活発なため生乳の品質を低下させる^[37,46,70,74]。他に *Achromobacter*^[22]、*Acinetobacter*^[58]、*Alcaligenes*^[51,174] および腸内細菌科に属する *Escherichia*^[52,162,174]、*Citrobacter*^[53]、*Klebsiella*^[53, 162]、*Serratia*^[53,174]なども多数見られる。特に *Pseudomonas* や *Flavobacterium* などのグラム陰性細菌はグラム陽性細菌に比べ、栄養要求が単純であるために、地下水のような極めて低栄養環境においても増殖が可能であることが知られている^[34,180]。従って、器具類の中に残存した濯水の中でも発育が十分可能であることから、不完全な洗浄・殺菌はこれらの菌の汚染を引き起こしてしまう。また、冷蔵保存乳は酸素が液中に溶け込み易いことから、好気呼吸を行なうこれらの菌にとって、発育はグラム陽性細菌より都合が良いとされている。

2. 耐熱性細菌相の分布

乳・乳製品における耐熱性細菌に関する研究の歴史は古く、1919年の Orla-Jensen の研究に始まる。彼は、耐熱性菌を牛乳や乳製品から分離し、これらの汚染源は、土壌、チリ、水、牧草、飼料などであると報告している^[112]。また Mackenzie^[69] は、耐熱性の *Microbacterium*、*Micrococcus* の汚染は、洗浄が不十分で乳石が残っているような搾乳器具において極めて高いと指摘した。低温殺菌乳は勿論、チーズ製造工程では一般に 62～65℃、30 分間の比較的低い加熱処理、いわゆる低温殺菌および

75℃、15 秒の高温短時間殺菌が行なわれる。そのため生乳を汚染した耐熱性細菌はそのまま残り製品の品質に重大な欠陥を起すことが危惧される。低温殺菌による残存菌相は、主に孢子形成細菌の *Bacillus*^[1,22,71,110,153,158,174] と *Clostridium*^[6, 29, 50] ならびにグラム陽性球菌の *Micrococcus*^[1,22,71,83,110,130,153,158,162]、*Streptococcus*^[10,22,71,72, 91,162,174] の一部、グラム陽性桿菌でコリネ型の *Microbacterium*^[21, 50, 98, 162]、*Corynebacterium*^[151, 162]、*Listeria*^[144] の一部が代表的なものである。*Bacillus* や *Micrococcus* などは、土壌、濃厚飼料、乾草などから汚染されることが多い^[23]。しかし、*Microbacterium* や *Streptococcus* は搾乳器具や貯乳器具からの汚染が多いとされている。また、この残存菌の菌相構成は生乳の生産された環境によって相違があり、また菌の培養令によっても加熱処理による残存率が異なると言われている。

牛乳・乳製品における耐熱性細菌相の中で最も耐熱性の高いものは、孢子形成菌の *Bacillus* および *Clostridium* である。

牛乳汚染の代表的な *Bacillus* 属は、*B. subtilis*、*B. licheniformis*、*B. cereus*、*B. sphaericus* などであり、牛乳 1 ml 当たり 10～10⁵ 程度の汚染があることが報告されている^[23,123]。*Bacillus* 属の一部には病原性を有するものや、食中毒原因菌も知られていることから牛乳・乳製品の汚染細菌として注意しなければならないグループである。特に、*B. cereus* は低温殺菌乳の主要な汚染菌とされている。この *B. cereus* は、食品 1 g 当たり 10⁶ 以上になると発症するとされている^[36,123]。また、本菌は牛乳のタンパク質を分解し、苦味を形成する腐敗菌であり、土壌、糞便など農場環境に広く分布している。また、*B. licheniformis* は日和見感染症の原因菌にもなると言われており、牛の流産、敗血症の原因菌となる^[84]。*Bacillus* 属は、耐熱性のみならず耐乾性、耐薬性を持つことから、薬剤による殺菌処理によっても抵抗性を示し、粉乳のような水分活性 (Aw) の低い製品にも長期間生残する。

Johnston と Bruce^[60] は牛乳の *Bacillus* 属の季節的汚染を検討し、冬期間の舎飼時期に多いとしているが、Mckinnon と Pettiper^[93]、Phillips と Griffiths^[169] は逆に夏期間に多かったと報告しており、季節的な汚染頻度については必ずしも明確でない。

一方、嫌気性菌の *Clostridium* も農場の環境に広く分布し、牛乳・乳製品の汚染細菌相として重要なものである。*Clostridium* の汚染源は、発酵不良のサイレージであるとされており、これが環境を汚染し牛乳や乳製

品に混入するといわれている。特に、*C. botulinum* と *C. perfringens* は生乳の 16-80 % のものを汚染しているといわれている。また、El-Bassiony²⁹⁾ は生乳の 45% に *C. perfringens* が存在し、その平均菌数は $54g^{-1}$ であったことを報告した。また、*C. perfringens* はチーズの中にもよく認められ、タンパク質、乳糖、ビタミン類、アミノ酸を利用し速やかに増殖する。したがって、*C. perfringens* の汚染した牛乳を飲んだ幼児は下痢症を生じる可能性が高い。また、毒素生成菌として良く知られている *C. botulinum* は発酵ソフトチーズを汚染し、エンテロトキシンを生成することが、Wagenaar と Dack¹⁷¹⁾ によって報告され、製品の食塩濃度が 8% では A 型トキシン、食塩 6% では B 型トキシンが生成されると報告したが、さらに毒素の生成にはチーズの水分、pH、塩濃度などの相互環境に依存されるとしている。

3. *Microbacterium* の分類学的位置

低温殺菌乳の汚染細菌として出現頻度の高い *Microbacterium* は、無孢子細菌として最も耐熱性が高く、63℃、30 分間の低温殺菌処理でも死滅せず、これを死滅させるためには、80℃で数分間の加熱が必要であるとされている。

Microbacterium は Orla-Jensen (1919) によって始めて提唱された属名であるが、その後、Bergey's Manual 5 版 (1937) で *Bacteriaceae* 科に位置付けられたが、第 6 版¹⁴⁾ では *Lactobacillaceae* 科に、そして第 7 版¹⁵⁾ で *Corynebacteriaceae* 科、第 8 版¹⁶⁾ の出版後に出された、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁶³⁾、更にその後に出版された Bergey's Manual 第 9 版⁴⁹⁾ では Irregular, Nonsporing Gram-Positive Rods のグループとして他の 36 属と共に位置付けられている。このグループには G-C 含量が 30 mol% のものから、*Microbacterium* のように 69 ~ 75mol% のような高いものまで含まれる。更に、この Irregular, Nonsporing Gram-Positive Rods には好気性菌、通性嫌気性菌、嫌気性菌が含まれ、*Microbacterium* が位置付けられている好気性グループには比較的 G-C 含量の高いものが集まっている。また、この好気性菌に属する菌は、菌学的性状が近似するため、これまで幾度も、その分類学的位置^{46,62)} について検討され、一時期、*Brochothrix thermosphacta*⁹⁾ を *M. thermosphactum* として本属に含めたこともあった。しかし、ペプチドグリカンの構造、ジアミノ酸の異性体の有無、グリコリル酸の有無、さ

らに新しい分子生物学の手法によって本菌の分類学的位置も次第に明らかにされてきた。その結果、Bergey's Manual 第 9 版⁴⁹⁾ では、*Microbacterium* 属にはこれまでの 3 種に、従来グラム陽性桿菌でありながら *Flavobacterium arborescens* とされていた *M. arborescens*⁵⁶⁾ を新しく加え、4 種が位置付けられるに至った。

4. 非致死の (sub-lethal) ストレスによる細胞損傷と増殖

食品加工における殺菌や滅菌は、重要なプロセスである。しかしこの熱による菌の死滅や細胞損傷についての明解な説明は十分されていない。

食品に関わる微生物は、食品製造の過程において細胞に何らかのストレスが負荷されることが多い。例えば、食塩処理、酸・アルカリ処理、加熱処理、凍結や冷凍処理、乾燥処理などである。様々な非致死のストレスにより細菌細胞の一部に損傷が生じるが、通常非選択性の培地ではその損傷も修復され、通常のコロニー形成がされる。しかしストレスを負荷された細胞は、微生物検査で使用される選択培地で発育が阻害されたり、遅延することが知られている。従って、ストレスを受けた微生物を検出する際に、誤った判断を下す原因となっている。この非致死のストレスについて報告は多数されてきた。*Escherichia coli* について、Przybylski と Witter¹²²⁾ は 0.3 mol の酢酸緩衝液 (pH4.2) に 60 分間曝すことによって、99% 以上の細胞が損傷を生じ、trypticase agar では発育するが、選択培地の violet red bile agar では発育ができなくなったとしている。また、*Streptococcus faecium*, *S. faecalis* の加熱による損傷細胞について、Magnus ら⁹⁰⁾ は 4 種の培地を用い、その菌数の回収率について検討し、All purpose tween agar (APT) が最も菌数が多く計測され、培地の栄養の重要性を示唆している。*Staphylococcus aureus* について、Minor と Marth¹⁰⁰⁾ は酸性環境におけるストレスがその後の発育に及ぼす影響について報告している。*Bacillus stearothermophilus* を異なった温度で加熱処理すると 0.9 % 以上の食塩を含む培地で発育が抑制され、しかも平板培地の培養温度が、発育適温や至適 pH より外れると極端にコロニーの形成能が低下することも報告されている³²⁾。このストレス付加による細胞損傷のメカニズムについては必ずしも一致した見解はないが、*E. coli* の凍結による損傷は、RNA やムコペプチド合成阻害によるものと報告されている¹²⁷⁾。しかし、Tsuchido ら^{163,164)} は *E. coli* に対する非致死のストレスは細胞膜

を損傷するとしての報告や、酸ストレスについても細胞膜に対して損傷を与えるとの報告がある¹³⁷⁾。また加熱により Hydrophobic dyes の透過、抗生物質に対する感受性の増加、細胞内物質の溶脱などによるものとする報告がある^{163,164)}。*Escherichia* を 0°C で保存したものは、その後の熱に対する抵抗性が高まったことを Katsui ら^{67,68)} が報告している。しかし、Humphrey ら^{51,52)} は *Salmonella enteritidis* を 4°C と、8°C で保存すると熱に対する耐性が低下したとしている。さらに、冷蔵したものを 37°C で培養すると 30-40 分間で正常に戻ったとしている。一般に細菌の細胞に非致死的高温、酸、食塩、エタノール処理、ウイルス感染などの処理を行なうと、通常の細胞に見られないタンパク質が生じることが認められる。このタンパク質は一般に加熱によって生成することから heat shock protein (HSP) と呼ばれている。

Volker ら¹⁷⁰⁾ は *Bacillus subtilis* を 48°C で予備加熱したのち加熱殺菌をすると、そうでないものに比べ耐熱性が高まること、また同様に 4% の食塩で予備処理すると、熱に対する抵抗性が高まり、その耐熱性の獲得は、食塩、熱ストレスに共通していることを明らかにした。Mackey⁸⁷⁻⁸⁹⁾ は *Salmonella typhimurium* を栄養豊富な培地と最小培地で増殖させ、その菌体に 55°C の加熱処理を施すと、栄養培地の菌体において耐熱性が高く、さらに、予め 48°C で加熱処理をすることによって耐熱性は高まったとしている。また、予備加熱により細胞内には、平常では認められない 83, 72, 64, 25kDa の新しいタンパク質が生成されるが、クロラムフェニコール処理すると、その耐熱性は獲得されなかった。さらに、そのタンパク質は常温に放置すると速やかに消失したとしている。

このように、細胞に非致死のストレス処理を施すことによって、ある種の防御反応がおこり、ストレスに対する耐性を示すことが広く知られるようになり、そのメカニズムについても精力的に検討されてきた。一般に、細胞に熱や化学物質でストレスをかけると、熱ショック遺伝子を誘導し、遺伝子発現の全パターンが切り替わる。この切り替わりに遺伝子 rpoH にコードされる σ^{32} を持つ RNA ポリメラーゼホロ酵素が熱ショックタンパク質のプロモーターを認識するとされている。

第3編 実験の部

第1章 バルククーラ保存乳の細菌数推移

1. 緒言

わが国の牛乳の生産地は、自給飼料の生産基盤の低下に伴う粗飼料の確保の難しさ、酪農による環境汚染により、都市近郊から益々離れ、地域分化の傾向に拍車をかけている。また、酪農後継者不足を解決するために、酪農の大型化に伴う省力化が必要になり、輸送形態の変遷も見られるところである。それらの事情を反映し、生産地と消費地の遠隔化が顕著になり、そのため生産地から消費地への長距離輸送が余儀なくされるようになった。生乳の汚染細菌相についての研究は古くから精力的に行なわれてきたが、搾乳器具、冷却装置、洗浄・殺菌法の開発、農場環境の変化などに伴い、汚染細菌相にも変化が認められるようになった^{65,104,155)}。

冷却装置や洗浄・殺菌処理法が充分普及していなかった時代の生乳汚染細菌相は、乳酸菌、*Micrococcaceae*、腸内細菌科を中心とする酸生成菌が主なものであったのに対し、洗浄・殺菌剤の普及や冷却装置の普及に伴い、それらの細菌相の占める割合は少なくなり、それに代わるグラム陰性細菌やコリネ型細菌が主要な汚染菌となった^{35,42)}。旧来の非冷却乳では、貯乳期間中に汚染細菌が増殖したものであった。しかし、近年のそれは直接的な汚染によるものが多くなった。従って、生乳汚染細菌相を正しく認識することは、汚染源の究明や細菌学的に高品質な生乳を確保するために極めて重要な課題と思われる。ここではバルククーラ保存乳の細菌相と、冷蔵保存乳における細菌の増殖性について検討した。

2. 実験材料および方法

1) 供試生乳および採取法

供試生乳は北海道の札幌、千歳、江別、苫小牧の各市および早来町の酪農家に付設されているバルククーラの生乳を出荷直前にアジテーターを 5 分間運転し、十分攪拌したのちに滅菌ビンに採取し、氷温保存し 5 時間以内に微生物学的分析を行なった。なお、試料の生乳は、主に隔日集乳のもので、4 回の搾乳分を合乳し、第 1 回目の搾乳から約 40 時間の保存のものである。

2) バルククーラ保存乳の細菌数の変動

バルククーラ冷蔵生乳中の生菌数の変動についての検討は、江別市内の酪農家に付設されたものを用いた。試料は隔日集乳の場合には、4 回の搾乳分を合乳する約

42時間まで、また、3日間保存の場合には、6回の搾乳分のもので、約64時間保存生乳である。なお、バルククーラは直膨式のもので、試料の採取、保存は上記と同様である。

3) 微生物の分析

(1) 総菌数

食品衛生法の乳・乳製品の成分規格における公定法に準じ、ブリード法によって行なった。なお、菌数計測は個体法によった。

(2) 一般細菌数

一般細菌数 (SPC) の測定は IDF 法¹⁰⁹⁾に準拠した。すなわち、採取した生乳をよく攪拌し、1/4 リンゲル氏液で10倍段階希釈し、乳製品用標準寒天培地 (栄研) で混釈平板法を行なった。30℃で3日間培養後、形成集落数から生乳1ml当たりの菌数を算出した。また、生乳保存中の細菌相のグラム染色性は、混釈平板上に形成した集落を無作為に釣菌し、常法によるグラム染色法によって判別した。なお、本論文において一般細菌 (数) とは、標準寒天培地を用い30または32℃で培養した際に形成する菌および集落数と定義する。

(3) 低温細菌数

低温細菌数は Thomas ら^{154,161)}が推奨する方法によった。すなわち、一般細菌数測定と同様に標準寒天培地によって作成した混釈平板培地を7±0.2℃で10日間培養し、形成した集落数から、生乳1ml当たりの低温菌数を算出した。

(4) 大腸菌群数

一般細菌数測定と同様に試料を適宜10倍段階希釈し、デソキシコレート培地 (栄研) 15ml による混釈平板を行ない、固化後、同一培地10mlで表面を重層した。培養は37℃、20時間行ない、赤色の大型集落を大腸菌群とした。

(5) 耐熱性細菌数

一般細菌数の測定と同様に試料を10倍段階希釈したものを、別に滅菌した10%還元脱脂乳に添加し、2mlのガラスアンプル管に封入したものを63±0.1℃に調節したウォーターバスで30分間加熱殺菌を行ない、この試料を標準寒天培地 (栄研) を用い、混釈平板を作成、32℃、72時間培養し形成した集落を耐熱性細菌とした。

3. 結果

1) バルククーラ保存生乳中の細菌数の変動

バルククーラに保存された生乳の細菌数の変動について、一般細菌数、低温細菌数および温度変化について調査した。Fig. 1-1には隔日集乳を行なっている農場における乳温の変動を測定した一例を示した。初回の搾乳により新しい生乳がバルククーラに入れられる段階で、乳温は搾乳開始時に30℃と高いが、1時間以内に10℃以下となり、その後1時間で4℃以下となった。また、2回目以降の搾乳による合乳のため、一時的に乳温は上昇するが10℃以上になることはなかった。したがって、今回実験に用いたバルククーラはいずれも米国の3A衛生規格の基準に合致した冷却能力を持つものである。

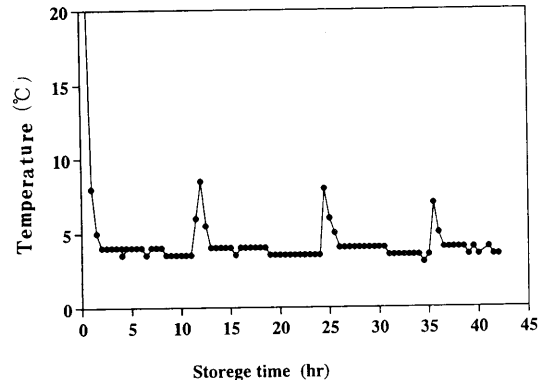


Fig. 1-1. Change of temperature in bulk-cooled milk during storage.

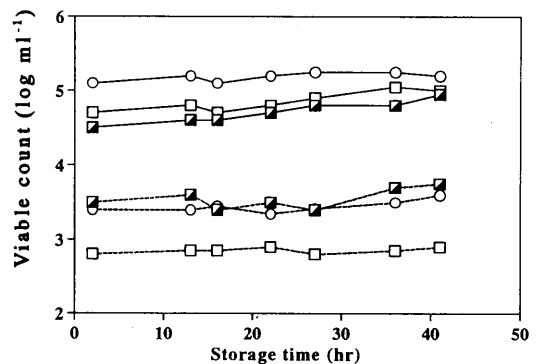


Fig. 1-2. Changes in the number of SPC and psychrotrophic bacteria in the bulk-cooled milk during storage.

SPC bacteria	Psychrotrophic bacteria
(solid line)	(dashed line)
—■— farm No.1	—■— farm No.1
—○— farm No.2	—○— farm No.2
—□— farm No.3	—□— farm No.3

ることが確認された。また、バルククーラ保存中の生乳の細菌数の動態について Fig. 1-2 と Fig. 1-3 に示した。この例から、いずれの試料においても、隔日集乳の保存時間である 42 時間前後までは、一般細菌および低温細菌についても増殖はほとんど認められなかった。いっぽう、3 日間保存乳においての例を Fig. 1-3 に示した。一般細菌数および低温細菌数ともに 48 時間を経過した頃から若干の増殖が認められた。したがって、4℃の冷却乳であったとしても、3 日間以上の保存になると保存の後半で、菌の増殖が開始される可能性が高いものと思われる。また、Fig. 1-4 には、42 時間バルククーラ低温保存された生乳を、4℃の小型冷却タンクに移し、その後の菌数の動態を 5 日後まで経時的に検索し、その保存性を確認したものを示した。その結果、初期菌数

が、 10^4 から 10^5 ml^{-1} 程度の生乳でも、保存 3 日後に菌数が増加し始め、5 日間に 10^7 ml^{-1} 以上に増殖した。この時、増殖する菌相はグラム陰性の桿菌であることが特徴であった。したがって、低温保存生乳における増殖可能な菌相は一般にグラム陰性の低温細菌であることが示唆された。

2) 季節別、搾乳方式別の総菌数および各菌相の菌数分布

各農家における出荷直前の生乳の総菌数および各菌相の菌数分布を調査したが、Table 1-1 には乳牛の舎飼期間の冬季間と放牧期間の夏季間に大別し、季節別細菌数

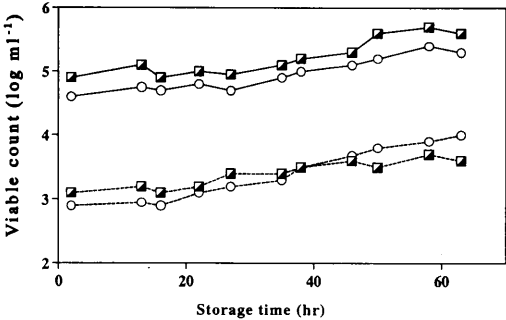


Fig. 1-3. Changes in the number of SPC and psychrotrophic bacteria in the bulk-cooled milk during storage.

SPC bacteria (solid line) Psychrotrophic bacteria (dashed line)
—■— farm No.4 —■— farm No.4
—○— farm No.5 —○— farm No.5

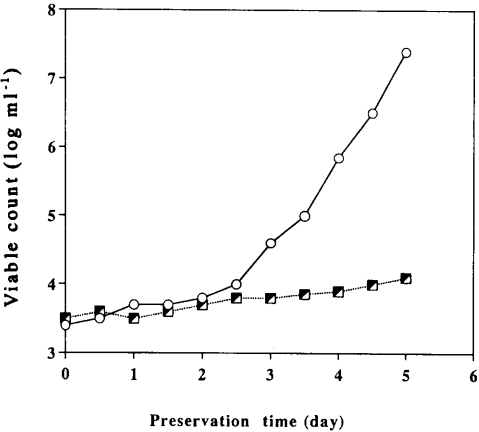


Fig. 1-4. Changes in the number of Gram-positive and Gram-negative bacteria in the raw milk during storage at 4℃

—○— Gram-negative bacteria
...■... Gram-positive bacteria

Table 1-1. Seasonal variations in the bacterial content of farm bulk-collected raw milk.

Milking system	Season	Bacterial content of raw milk ml ⁻¹						
		DMC ¹⁾ × 10 ⁵	SPC ²⁾ × 10 ⁵	PC ³⁾ × 10 ⁴	CC ⁴⁾ × 10 ²	TC ⁵⁾ × 10 ⁴	PC/MC ⁶⁾ (%)	TC/MC ⁷⁾ (%)
Bucket milking	Winter	5.0	2.6	3.3	130.0	1.6	12.7	6.2
	Summer	6.7	2.4	5.4	19.0	1.3	22.5	5.4
	Mean	6.3	2.4	4.9	44.0	1.4	20.4	5.8
Pipeline milking	Winter	5.9	2.4	4.0	1.9	1.5	30.3	6.7
	Summer	7.4	4.0	11.6	10.3	4.8	27.5	3.3
	Mean	6.9	3.6	9.7	8.2	4.1	26.9	3.9

1) DMC, birect microscopic counts
2) SPC, standard plate counts
3) PC, psychrotrophic counts
4) CC, coliform counts;
5) TC, thermoduric counts
6) PC/MC, psychrotrophic counts per standard plate counts(%)
7) TC/MC, thermoduric counts per standard plate counts(%)

および搾乳方式別の菌数分布について示した。総菌数(DMC)については平均が 6.3×10^5 – 6.9×10^5 ml⁻¹ となり、搾乳方式による差異は顕著ではなかった。また、季節的変動も少なかった。

一般細菌数 (SPC) については 2.4×10^5 – 3.6×10^5 ml⁻¹ であり、パイプライン方式による搾乳形態のものが、バケット方式に比較し、菌数が僅かながら高かった。低温細菌数については、 4.9×10^4 – 9.7×10^5 ml⁻¹ と広範囲に分布した。この低温菌相においても一般細菌と同様にパイプライン方式のものが菌数が高い傾向にあった。一般細菌数に対する低温細菌数の割合を比較すると、バケット方式のものが平均 20.4%、パイプライン方式のものが 26.9% となりパイプライン方式のものが若干高い傾向にあった。

次に、大腸菌群数については、搾乳形態、季節的変動の大きい菌相であり、バケット方式の菌数が高く、しかも冬期間は特に汚染が高かった。

耐熱性細菌については、 1.4×10^4 ml⁻¹ 程度であるが、ここではパイプライン方式による搾乳形態で菌数が高かった。また、一般細菌数に対する耐熱性菌数の割合は、バケット方式で平均 5.8%、パイプライン方式で 3.9% となり、バケット方式で若干その割合が高い傾向にあった。

更に Table 1-2 には、一般細菌に対する低温細菌数の割合の分布を示した。これによると、バケット、パイプライン方式ともにその割合が 25% 以下のものが全試料の 60% に及ぶが、パイプライン方式に一般細菌数に対する低温細菌数が 75% 以上を占める試料が 15% もあったのが特徴であった。

Table 1-2. Distribution of samples of bulk-collected raw milk according to percentage of psychrotrophic bacterial count to standard plate counts.

Milking system	No. of samples	Distribution of samples of bulk-collected according to percentage of psychrotrophic counts to standard plate counts.				
		<10	10-25	>25-50	>50-75	>75
Bucket milking	59 (%)	21 (35.6)	13 (22.0)	16 (27.1)	7 (11.9)	2 (3.4)
Pipeline milking	20 (%)	8 (40.0)	4 (20.0)	4 (20.0)	1 (5.0)	3 (15.0)

4. 考 察

米国の 3A 衛生規格によるとバルククーラの冷却能力は、1 回目に搾乳された生乳は 1 時間以内に 10℃ 以下、さらにその後 1 時間以内に 4.4℃ 以下に、また、2 回目

以降の合乳の際にも 10℃ を越えないこととされている。わが国においてもこの 3A 規格を準用している。今回の実験に用いたバルククーラの能力はこの規格に十分合致し、合乳の際にも 8℃ を越えることはなかった。4 回の搾乳分を合乳した 40 時間までの保存期間では、細菌数の増加はほとんど認められなかった。しかし、6 回の搾乳分を合乳する 3 日間保存では、後半になってグラム陰性細菌の菌数が僅かながら増加傾向を示した。この傾向については、山本ら¹⁷⁸⁾ や Blackburn⁷⁾ の報告においても 5 回以上の搾乳後に細菌が増加を開始するとしている。実験室的に保存期間を延長した実験においても、明らかにグラム陰性細菌が増加することから、酪農家における保存期間は 2 日間保存が妥当なものと思われる。しかしながら、この保存期間の決定は、初期段階での細菌の汚染程度や細菌相によっても当然ながら変動することは考えられ、初期菌数を少なくすることが重要である^{9,31,105,142)}。次に季節別の菌数変動については、総菌数、一般細菌数、低温細菌数のいずれにおいても、乳牛の舎飼時期である冬季間が夏季間より若干低い傾向にある。これは、農家における繁忙期におけるバルククーラの洗浄・殺菌の不十分と関係すると同時に、気温の高い夏季において汚染箇所における汚染細菌の増殖の可能性が示唆される。特に、パイプラインシステムにおいて低温細菌数が高い傾向にあることから、洗浄・殺菌の不徹底によって、搾乳器具に残存する汚れによる細菌の汚染の可能性が考えられる^{26,103,174)}。また、一般細菌数に対する低温細菌数の割合は、25% 以下のものが、バケットシステムとパイプラインシステムの両方において 57.6–60% を占めた。しかし、パイプラインシステムの一部には 75% 以上のものも多少認められることから、低温細菌が汚染している可能性を示唆している。このことは特に自動洗浄装置による洗浄・殺菌は、十分な温水と規定量の洗剤の供給が必要であるが、農家によっては、温水量の不足ならびに洗浄剤溶解槽の管理の不徹底が認められることなどに起因すると思われる。特に低温細菌数が夏季間に多いことは、使用搾乳器具の洗浄・殺菌の不備により、器具に残存する牛乳の残さに細菌が増殖した可能性があると考えられる。

次に大腸菌群数がバケット方式で高かったのは、搾乳時における作業体系による差と思われる。とくに大腸菌群数は各農家によって汚染度の変動が大きいことから、搾乳環境や衛生管理の差によるものと考ええる。また、季節的にみると、冬期間に細菌数が多いことは、舎飼中心のために、牛体、敷料などからの汚染である可能性が高い。

生乳における微生物汚染は、それを原料とした低温殺菌乳やチーズなどの製品の品質と保存性に直接関わることから、衛生的で高品質な生乳を生産することが重要である^{8,42,124}。また、耐熱性細菌は、土壌、飼料、敷料などからの汚染はもとより、Thomas ら^{161,162}、Orr ら¹¹³ は洗浄の不備な搾乳器具が耐熱性細菌の汚染源であることを指摘していることから、パイプライン、バルククーラなどの搾乳器具類の洗浄・殺菌の徹底が必要であると考えられる。

5. 小 括

4 回の搾乳分を合乳したバルククーラ保存乳における各細菌相の汚染菌数と保存期間における細菌数の変動について検討した。

42 時間保存の隔日集乳では、細菌数の増加は認められなかったが、それ以上の保存によってグラム陰性細菌数が増殖した。また、搾乳方式、季節別による各細菌相の汚染菌数は、総菌数、一般細菌数、耐熱性細菌数については、顕著な差は認められなかった。しかし、大腸菌群数とグラム陰性細菌数がパイプライン方式で高かったことから、洗浄・殺菌の重要性が示唆された。また、バケット方式における冬季間の大腸菌群数は、夏季間のそれより高く、舎飼中心の飼養管理の特徴と思われた。

第 2 章 バルククーラ保存乳の汚染細菌相に関する実験

1. 緒 言

生乳を汚染する菌相の把握は、その菌の汚染源を究明するにも、また食品衛生の見地からも重要である。生乳の汚染菌相についての研究は、古くから精力的に行なわれ、Johns と Landerkin⁵⁹、Druce と Thomas²⁷、Thomas らの報告や総説¹⁵²⁻¹⁶²、Cousin²¹の総説で詳細に報告されている。一方、わが国におけるこれらに関する研究は、古くは中西¹⁰⁷、兵庫ら⁴⁸、荒井ら³、小川ら¹¹⁰ 日越ら⁴⁷、また、バルククーラ冷蔵生乳については、矢野ら¹⁸⁰、筆者ら⁷¹⁻⁷³、三河⁹⁶の報告がある。しかし、この汚染細菌相も時代と共に変化していることはよく知られている事実である。そこで、ここでは衛生的な見地ならびに乳製品の品質向上のために、北海道内の生乳における季節的な汚染細菌相の変動について明らかにすることとした。

2. 実験材料および方法

1) 試料の採取

実験に供した生乳の試料は、第 1 章と同様に、北海道札幌、江別、苫小牧、千歳の各市および早来、日高町の農家に付設されているバルククーラ乳を出荷直前に採取したものである。採取した試料は直ちに氷温に冷却し、5 時間以内に実験に供した。菌の分離は一般細菌数を計測した標準寒天培地ならびに低温細菌数を計測し平板上に形成した集落を無菌的に釣菌し、同じ組成の平板培地上で画線培養を行ない、形成した集落から菌を再分離した。なお、肉眼および顕微鏡的に純粋分離されていない場合には再度の画線培養を繰り返した。また、低温細菌については画線した平板を 7℃ で再培養して低温発育性を確認した。分離菌株については、標準寒天培地に GAM ブイヨン (白水) を 1,000 ml 当たり 8 g 添加し、養分を補給した半斜面培地の高層部ならびに斜面部に接種し培養した。菌株は、低温室 (4℃) に保存し必要に応じて新しい培地に移植して各種試験に用いた。

2) 分離菌の同定法

分離菌株の同定試験については、Manual of Microbiological Methods¹⁴³、Mitruka ら¹⁰¹の方法に準拠した。また、分類については Bergey's Manual of Determinative Bacteriology を参考に、ペプチドグリカン、グリコリル型の確認などについては、鈴木¹⁴⁶の方法に準拠した。

3. 結 果

1) 菌相の季節別変動

バルククーラ保存生乳から分離された一般細菌の季節的変動については Table 2-1 に示した。年間を通じて最もよく分離される菌は、*Micrococcus* やコリネ型細菌などのグラム陽性細菌で全体の 62% を占めた。これに対し、グラム陰性細菌は 38% であった。また、季節的変動については、*Micrococcaceae* が夏季間 28.9%、冬季間 18.9% と夏の期間に多く分離されたのに対し、コリネ型細菌は夏季間 14.2%、冬季間 26.5% となり冬季間に多く分離された。また、グラム陰性細菌においては冬季間と夏季間における差は少なかった。Table 2-1 に示した Other Gram positive rods には *Bacillus*、*Lactobacillus* などが、Other Gram negative rods には *Achromobacter*、*Alcaligenes* などが認められた。

次に、7℃ で 10 日間の培養で増殖可能な低温細菌相については、Table 2-2 に示した。低温細菌相においては全体の分離菌株の内、グラム陽性細菌が 45% であるのに対し、グラム陰性細菌が 55% を占め、一般細菌の

Table 2-1. Seasonal change of different types of standard plate count bacteria isolated from bulk-collected raw milk.

Type of cultures	Summer season ¹	Winter season ²	Total samples examined
	No.* (%)	No.* (%)	No.* (%)
<i>Micrococcaceae</i>	415 (28.9)	87 (18.9)	502 (26.5)
<i>Streptococcaceae</i>	85 (5.9)	34 (7.4)	119 (6.3)
Coryneform bacteria	203 (14.2)	122 (26.5)	325 (17.2)
Other Gram-positive rods	191 (13.3)	34 (7.4)	225 (11.9)
<i>Pseudomonas</i>	78 (5.4)	33 (7.2)	111 (5.8)
Coliform bacteria	54 (3.8)	9 (1.9)	63 (3.3)
<i>Flavobacterium</i>	109 (7.6)	43 (9.3)	152 (8.0)
Other Gram-negative rods	300 (20.9)	98 (21.3)	398 (21.0)
	1435(100.0)	460(100.0)	1895(100.0)

* Number of cultures

¹ Summer season, May to October² Winter season, November to April

Table 2-2. Seasonal change of different types of psychrotrophic bacteria isolated from bulk-collected raw milk.

Type of cultures	Summer season ¹	Winter season ²	Total samples examined
	No.* (%)	No.* (%)	No.* (%)
<i>Micrococcaceae</i>	376 (28.5)	40 (8.5)	416 (23.3)
<i>Streptococcaceae</i>	130 (9.9)	27 (5.8)	157 (8.8)
Coryneform bacteria	38 (2.9)	40 (8.6)	78 (4.4)
Other Gram-positive rods	130 (9.9)	22 (4.7)	152 (8.5)
<i>Pseudomonas</i>	141 (10.7)	58 (12.4)	199 (11.1)
Coliform bacteria	35 (2.6)	11 (2.4)	46 (2.6)
<i>Flavobacterium</i>	71 (5.4)	114 (24.4)	185 (10.4)
Other Gram-negative rods	396 (30.1)	155 (33.2)	551 (30.9)
	1317(100.0)	467(100.0)	1784(100.0)

* Number of cultures

¹ Summer season, May to October² Winter season, November to April

Table 2-3. Standard plate count bacterial flora isolated from two kinds types of milking systems.

Type of bacteria	Bucket milking system	Pipeline milking system
	No.* (%)	No.* (%)
<i>Micrococcaceae</i>	420 (29.7)	82 (17.5)
<i>Streptococcaceae</i>	84 (5.9)	35 (7.5)
Coryneform bacteria	221 (15.6)	93 (19.8)
Other Gram-positive rods	165 (11.7)	60 (12.8)
<i>Pseudomonas</i>	84 (5.9)	27 (5.7)
Coilform bacteria	47 (3.3)	16 (3.4)
<i>Flavobacterium</i>	107 (7.6)	45 (9.6)
Other Gram-negative rods	287 (20.3)	111 (23.7)
Total	1415(100.0)	469(100.0)

* Number of isolated cultures

場合とは逆の割合となった。これはグラム陰性細菌の低温発育の特性を示すものである。これらの結果から、年間を通じて多数分離される菌相は、グラム陽性細菌の *Micrococcaceae* であり全体の 23.3% を占めた。また、この低温細菌においても *Micrococcaceae* は夏季間に多く分離される傾向があった。いっぽう、グラム陰性細菌としては、*Pseudomonas* 11.1%, *Flavobacterium* 10.4%, その他のグラム陰性細菌が 31% 分離された。

また、季節的な変動をみると、*Micrococcaceae* は夏季間に全分離菌株の 28.5% を占めるのに対し、冬季間には 8.5% と少なく、比較的気温の高い時期に多かった。それに対し、冬季間には *Flavobacterium* が 24.4% と夏季間の 5.4% に比較し主要菌相となった。

次に、Table 2-3 には、搾乳方式別の一般細菌の汚染菌相を示した。バケツ式による生乳には、グラム陽性細菌が 63%, グラム陰性細菌が 37% であるが、パイプラインによる搾乳方式の生乳では、グラム陽性細菌が 57.6%, グラム陰性細菌が 42.4% となり、パイプライン方式でグラム陰性細菌が若干高い傾向にあった。また個別の菌種についてみると、バケツ方式で *Micrococcaceae* が 29.7% であるに対し、パイプライン方式で 17.5% であった。その他の菌種についての顕著な差は認められなかった。

次に、低温細菌相については Table 2-4 に示した。この低温細菌における菌相分布は、先の一般細菌相とは異なり、バケツ、パイプライン方式ともにグラム陽性細菌の占める割合が 45% なのに対し、グラム陰性細菌が 55% を占めた。しかも、バケツ、パイプラインの搾乳方式による細菌相の違いはほとんど認められなかった。

Table 2-4. Psychrotrophic bacterial flora isolated from two kinds of milking system.

Type of bacteria	Bucket milking system	Pipeline milking system
	No.* (%)	No.* (%)
<i>Micrococcaceae</i>	309 (23.4)	107 (23.1)
<i>Streptococcaceae</i>	122 (9.2)	36 (7.8)
Coryneform bacteria	57 (4.3)	21 (4.5)
Other Gram-positive rods	107 (8.1)	45 (9.7)
<i>Pseudomonas</i>	157 (11.9)	42 (9.1)
Coilform bacteria	18 (1.4)	28 (6.0)
<i>Flavobacterium</i>	151 (11.4)	34 (7.3)
Other Gram-negative rods	400 (30.3)	151 (32.5)
No. of cultures	1321(100.0)	464 (100.0)

* Number of isolated cultures

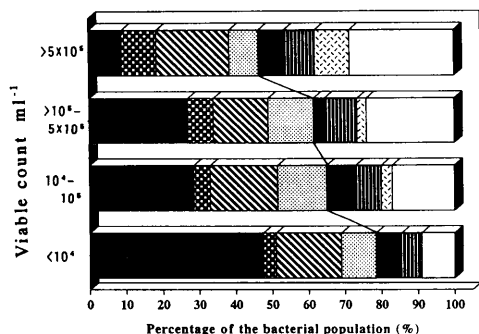


Fig. 2-1. Difference of bacterioflora in bulk-cooled raw milk according to the range of mesophilic bacteria.

■ Micrococci; ▨ Coryneform; ▩ Streptococci;
 ▤ Other Gram-positive rods
 ▦ Pseudomonas; ▧ Flavobacteria; ▨ Coliform;
 □ Other Gram-negative rods

2) 細菌汚染度別による構成細菌相

低温保存生乳の細菌汚染度別から見た菌相構成を Fig. 2-1 に示した。生乳の一般細菌数を、 10^4 ml^{-1} 以下の比較的高品質のもの、 $10^4 \sim 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 、 $10^5 \sim 5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 以上の4段階に大別した際の各々の構成菌相である。その結果、 10^4 ml^{-1} 以下の高品質生乳では、*Micrococcaceae*、コリネ型細菌などのグラム陽性細菌が多く分離され、全体の78%を占めたのに対し、汚染細菌数が多くなるにつれて、グラム陰性細菌の割合が高まり、 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 以上の生乳では全体の54%を占めた。

4. 考 察

生乳の汚染細菌相に関する研究は、国内外においてこれまで多数の研究者によって実施されてきた¹³⁾。わが国では、1950年代に佐々木ら¹³⁵⁾による全国の生乳の菌相についての報告があるが、その汚染菌相は *Lactobacilli* が78%、*Bacillus* 9.2%、*Micrococcaceae* 6.3%と、その90%以上がグラム陽性細菌であったとしている。更に1960年代の小川ら¹¹⁰⁾は、グラム陽性細菌が63%、*Micrococcus* 13%、*Alcaligenes* 9%と報告している。これらのことから、旧来の生乳は、乳酸菌を中心とする酸生成菌が主要な細菌であったと思われる。しかし、それらに対し、最近の報告によると、生乳の細菌相は、従来の乳酸菌類の割合は少なくなり、それに代わってコリネ型細菌やグラム陰性細菌の占める割合が多くなった⁷⁵⁾。一方、酪農先進国であるヨーロッパで行なわれた Thomas ら^{159,169)}のデータによると、*Micrococcaceae* が32%、*Streptococcus* が12.2%、*Bacillus* 10.4%、さらにコリネ型細菌13.4%、その他グラム陰性細菌が

35.7%であったと報告した。これらのことから、生乳の生産環境の改善、洗浄・殺菌剤の開発と利用、技術指導の徹底、冷却装置などの開発などによって、その構成菌相は変動するものと考えられる。また、わが国においても、旧来の生乳と現在のものとは菌相の変遷を生じているものと思われる。

また、細菌の汚染度による構成細菌相についても、汚染の少ない生乳には、グラム陽性の *Micrococcaceae* やコリネ型細菌が多いのに対し、細菌汚染の高い生乳では、グラム陰性細菌が多くなった。この結果は、Thomas ら^{159,160)}も報告しているように、細菌学的品質の良質な生乳は *Micrococci* などが優勢菌相であるが、細菌数の多い試料ほどグラム陰性細菌が多くなるとする報告や、ニュージーランドの Twomey と Crawley^{165,166)} による、細菌数の少ない生乳は *Micrococci* が多く、細菌数が多いものほど、コリネ型細菌や *Streptococci* の占める割合が増加するとする報告とやや一致した。このように一般的には、細菌数の多い生乳には、グラム陰性細菌が多いことは共通しているようである。これは、生乳を汚染したグラム陰性細菌が比較的低温において増殖する可能性を示しているものであろう。しかし、この菌相構成は冷却程度や保存期間など生乳の取り扱いによって差異を生じることは当然考えられところである。

5. 小 括

バルククーラ保存乳の汚染細菌相を季節、搾乳方式別に検討した。その結果、一般細菌では、年間を通じ全分離菌株の62%がグラム陽性細菌であった。また、分離頻度の高かった菌相は、*Micrococcaceae* (21.0%)、コリネ型細菌 (17.2%) であったが、*Micrococcaceae* は夏季間に汚染が高かったのに対し、コリネ型細菌の汚染は逆に冬季間に高かった。その他、グラム陰性細菌は年間を通じ変動が少なかった。

いっぽう、低温細菌相については、グラム陰性細菌が全体の55%を占めた。特に多く分離された菌相は、グラム陽性細菌の *Micrococcaceae* (23.3%)、グラム陰性細菌の *Pseudomonas* (11.1%)、*Flavobacterium* (10.4%) であった。夏季間における *Flavobacterium* は、5.4%であるのに対し、冬季間で24.4%と分離割合が高かった。

また、生乳の細菌汚染度別の構成菌相をみると、細菌数の少ない生乳の汚染菌はグラム陽性細菌が優勢であるのに対し、細菌数の多い試料では逆にグラム陰性細菌が優勢になった。

第3章 生乳および低温殺菌乳の汚染耐熱性細菌 についての実験

1. 緒言

乳・乳製品における耐熱性細菌に関する研究の歴史は古く、1919年の Orla-Jensen の研究に始まる。その報告によると、耐熱性のある *Streptococcus*, *Microbacterium* を牛乳や乳製品から分離し、これらの耐熱性細菌の汚染源は、土壌、チリ、水、牧草、糞便などであるとしている¹¹²⁾。また、*Microbacterium* や *Micrococcus* の汚染は、洗浄が不十分で乳石が残存しているような搾乳器具において、それらの微生物の汚染が極めて高いと指摘した。

低温殺菌乳は勿論であるが、チーズ製造工程でも一般に 62～65℃、30 分間の比較的低い加熱処理、いわゆる低温殺菌が行なわれるが、そのため生乳を汚染した耐熱性細菌は残存し、製品の品質に重大な欠陥を起すことが危惧される。低温殺菌処理による残存菌相は、主に孢子形成細菌の *Bacillus* 属^{1,22,71,110,152,174)} と *Clostridium* 属^{24,29,50)} ならびにグラム陽性球菌の *Micrococcus* の一部^{1,22,71,83,110,152,158,162)}、*Streptococcus*^{10,22,71,73,99,162,174)} の一部、コリネ型菌の一部である *Microbacterium*^{22,50,98,162)}、*Corynebacterium*^{23,151,162)} などが代表的なものである。

Bacillus など孢子形成菌や *Micrococcus* などは、土壌、濃厚飼料、乾草などから汚染されることが多い。しかし、*Microbacterium*, *Streptococcus* は、搾乳や貯乳器具などからの汚染が多いとされている^{13,23,141)}。また、製品に残存する菌相構成は、生乳の生産された環境によって相違があり、また殺菌処理前の菌の age によっても異なると言われている。

そこでここでは、低温殺菌乳やチーズ製造における製品の安全性を確保することを目的として、生乳の細菌汚染とくに耐熱性細菌の汚染の実態、ならびに市販低温殺菌乳と生乳の耐熱性細菌相の比較検討を行なった。

2. 実験材料および方法

1) 供試牛乳

試料の生乳は、北海道内の酪農家で生産され、全ての試料が、4 回の搾乳分を混合した出荷直前のもので、バルククーラに 3～5℃ で保存されたものである。試料は滅菌サンプルビンに採取し、直ちに水温に冷却し実験室に持ち帰り分析した。また、搾乳器具やパイプラインにおける汚染細菌の調査については、搾乳開始の約 1 時

間前に拭き取り、洗落し法によってそれぞれの部位から採取した。つまり、ミルクカーのテートカップ内については、20ml の滅菌生理食塩水をテートカップに入れ、滅菌ゴム栓で密封、充分振盪して菌を洗い落とした。ミルククロー、パイプラインのレリーザー内壁は、滅菌綿棒を使用し、クロー内部全体、レリーザ内面は約 400cm² を拭き取り、そして 10ml の滅菌水に懸濁した。また、パイプライン内は、殺菌処理前に滅菌水を通し、排出した洗水、またスポンジはパイプ内を一巡したものから水分を搾汁したものを、それぞれ原液とし、菌数測定時に菌相に応じて 10 倍段階希釈液を調製した。

また低温殺菌乳は、市販されているものを製造日から 2 日以内に購入し、直ちに混釈平板法によって各菌相に応じて分析した。

2) 殺菌処理法

実験室的殺菌法である 63℃、30 分間の殺菌法は、乾熱滅菌した 1 ml のガラスアンプル管に試料をパスツールピペットで注入し、口を溶封した後、63±0.2℃ に調整した振盪ウオータバスに入れ規定時間の加熱処理を行なった。なお予め熱電対温度計を入れたアンプル管を用い、内部の試料が 63℃ に達する時間を測定し殺菌時間を調整した。

また、75℃の殺菌は、Fig. 3-1 に示したような密封恒温水槽にステンレス細管（外径 2m/m、内径 1m/m、長さ 100cm）を装着し、ペリスタルポンプを用い、生乳をステンレス細管を規定時間で通過するようにした。また、ステンレス細管の出口には、ウオータージャケットを付け直ちに 15℃ まで冷却した。

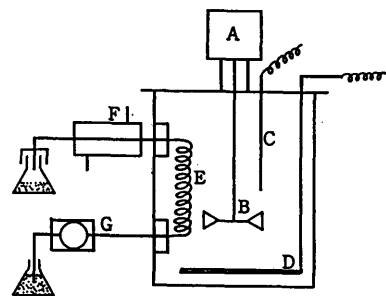


Fig. 3-1. Schematic illustration of experimental pasteurizer.

A, motor; B, agitator; C, thermister; D, heater; E, stainless tubule; F, cooler; G, pressure delivery pump

3) 菌数測定法

生菌数の測定は、0.01mol 滅菌リン酸緩衝液 (0.15

mol NaCl, pH 7.0) を用い, 10 倍段階希釈を行ない, 混釈平板法ならびに表面塗抹法による培養を行なった。一般細菌数, 耐熱性細菌数は, スパイラルプレーター (SPIRAL SYSTEM INSTRUMENT Model D) を用い表面塗抹。耐熱性高温細菌数は, 標準寒天培地 (栄研) を用い混釈平板法によったが, 拡散集落を防ぐために, 混釈平板培地が十分固化したのち 1% 滅菌寒天を重層した。グラム陰性細菌数については, CVT 寒天培地 (日水) を用い, スパイラルプレーターによる表面塗抹法を行なった。乳酸菌数の計測には, BCP 加プレートカウント培地 (栄研) を用い混釈平板法によった。また, 培養温度は, 一般細菌, 耐熱性細菌, 乳酸菌については 32°C で 72 時間, 耐熱性高温細菌は 55°C, 48 時間, グラム陰性細菌は 28°C, 72 時間培養を行なった。

4) 分離菌の同定試験

殺菌処理後の残存菌相についての同定は, Bousfield と Calley¹²⁾, Mitruka と Bonner¹⁰⁾, Jones⁶²⁾, Bergeys Manual⁶³⁾ およびその他の参考書によった。細胞壁ペプチドグリカンの分析については鈴木¹⁴⁶⁾, Uchida と Aida^{167, 168)} の方法に準拠した。

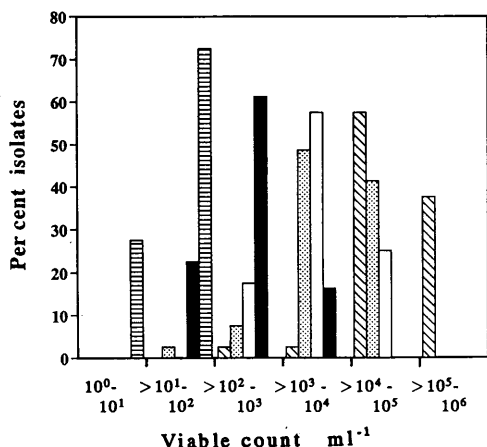


Fig. 3-2. Distribution of different types of bacteria in 80 samples of raw milk from different dairy farms.

□ standard plate count; ▨, lactic acid bacteria;
 □, Gram-negative bacteria; ■, thermophilic bacteria;
 ▤, thermophilic thermophilic bacteria.

3. 結果

1) 生乳および市販低温殺菌乳の各細菌相の菌数分布

北海道内の市乳用生産地における酪農家の出荷直前の冷却乳を採取し, 各細菌相の菌数分布について, 調査したものを Fig. 3-2 に示した。

一般細菌数の分布範囲は, $10^4 \sim 5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ のものが大半であり, 10^3 ml^{-1} 以下の試料もあった。グラム陰性細菌と乳酸菌は, 同様な菌数分布であるが, グラム陰性細菌数は $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ に集中していたのに対し, 乳酸菌数の分布は $10^2 \sim 10^5 \text{ ml}^{-1}$ と広範囲に分散した。耐熱性細菌数は, 10^2 ml^{-1} 前後のものが大部分であったが, 一部には, 10^3 ml^{-1} 以上の試料も数点認められた。また, 耐熱性があり, しかも 55°C 培養でよく増殖する耐熱高温細菌はその大半が 10^4 ml^{-1} 程度の菌数であった。また, これらの耐熱性高温菌は, 大部分が *Bacillus* に属する菌であったが, 一部に放線菌も分離された。次に, これらの菌のうち, 耐熱性細菌の汚染源を明らかにする目的で, 搾乳器具類の汚染状況を調査した結果を, Fig. 3-3 に一般細菌を, Fig. 3-4 には耐熱性細菌を示した。その結果, 一般細菌が最も汚染した部位は, ミルカーのミルクロー部であり, $10^3 \sim 2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 程度の菌数が認められた。特に, ミルクローのゴムパッキンの洗浄が不十分で牛乳成分が残っているような部分に細菌汚染が多かった。また, 殺菌処理前のレリーザ, パイプラインなどにおいても細菌の汚染が認められ, $10^1 \sim 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 程度の菌数となった。さらに, 耐熱性細菌についても, ミルクロー内には, $10^2 \sim 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 程度の高い細菌汚染が認められた。しかし, パイプライン, レリーザ内の耐熱性細菌は幾つかの試料に高い汚染のものもあるが, 一般的に低く, 10^2 ml^{-1} 程度であった。

このように, 生乳における一般細菌と耐熱性細菌数の分布について検討したが, 両者の関係については広範囲

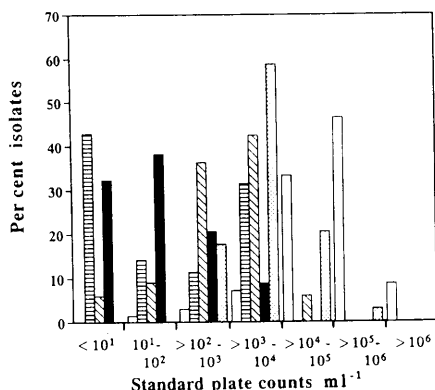


Fig. 3-3. Comparison of standard plate counts from some parts of milking equipment.

□, milk clow (n=138); ▤, pipeline rinse (n=70);
 ▨, teat cup (n=136); ■, milk receiver (n=68);
 ▤, raw milk (n=68).

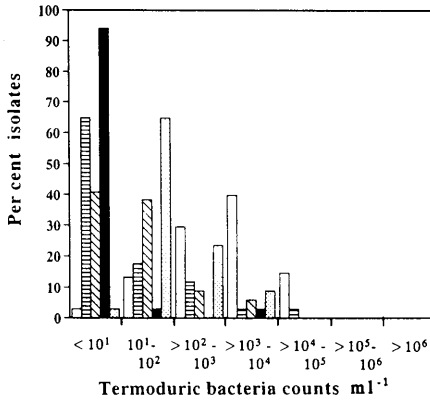


Fig. 3-4. Comparison of thermophilic bacteria counts from some parts of milking equipment.

□, milk clow (n=138); ▨, pipeline rinse (n=70);
▤, teat cup (n=136); ■, milk receiver (n=68);
▧, raw milk (n=68).

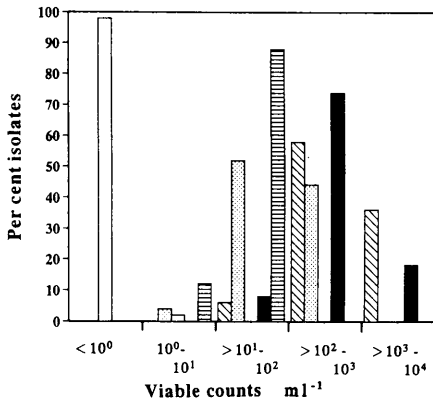


Fig. 3-5. Distribution of different types of bacteria in 50 samples of commercially pasteurized milk.

□, standard plate count; ▤, lactic acid bacteria;
▧, Gram-negative bacteria; ■, thermophilic bacteria;
▨, thermophilic thermophilic bacteria.

に分布し、殺菌率は試料によってかなりの差があった。それらの差は、汚染している菌相の違いによるものであると思われる。また、殺菌の処理法による残存菌数の比較を Table 3-1 に示した。実験では採取した生乳を $63 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 30 分間および $75 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 15 秒間の加熱殺菌処理を行ない、その残存菌数と殺菌率を示した。その結果、 63°C 殺菌の殺菌率の範囲は 91.2 ~ 99.9% でその平均値は 98.6% であった。また、 75°C 殺菌では、90 ~ 99.9% の範囲でその平均は 96.8% であり、両者の殺菌法における殺菌効果には大きな差がなかった。

次に、市販低温殺菌乳のうち、 63°C の低温殺菌乳における各菌相とその菌数分布を調査した (Fig. 3-5)。その結果、一般細菌数は 10^3 ml^{-1} のオーダーに集中し、しかも耐熱性細菌数の菌数分布とほぼ同様な傾向であることから、低温殺菌乳の汚染菌は、その総てが、耐熱性の細菌とみられる。また、乳酸菌は一般細菌の 10% 程度が残存し、耐熱性をもつ菌種が存在した。

2) 耐熱菌相の分布

次に、耐熱性細菌数を測定した平板から分離した耐熱性菌相について検討した結果を Table 3-2 に示した。生乳および市販低温殺菌乳のいずれも全分離菌株のうち胞子形成菌である *Bacillus* 属が全体の 30.7 ~ 33.4% と最も多く分離された。次いで、グラム陽性桿菌の *Microbacterium* 属が、ほぼ同じ割合の 28 ~ 33.6% となった。更に、*Micrococcaceae* が 17.4 ~ 23.4% と、これら 3 種類の菌で全体の 82 ~ 84% を占めた。その他、少数であるが *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, 放線菌などが分離された。また、生乳の実験室的低温殺菌法 ($63 \pm 0.2^\circ\text{C}$) と市販低温殺菌乳における分離菌相には大きな差が認められなかった。

4. 考 察

今回の試験に用いた生乳の汚染細菌数は、 10^4 ml^{-1} か

Table 3-1. Distribution of standard plate counts in milks sterilized by two methods.

Sterilization methods (and no. of samples)	Log. mean CFU ml ⁻¹ (Fatality rate %)	Viable counts (CFU ml ⁻¹)					
		<10 ¹	10 ¹ -10 ²	>10 ² -10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴ -10 ⁵	<10 ⁵
		Percentage distribution of samples(%)					
Raw milk (40)	5.16	0	0	2.5	2.5	57.5	37.5
LTLT ¹⁾ method (40)	2.74 (98.2±2.2) ³⁾	0	22.5	60.0	17.5	0	0
HTST ²⁾ method (40)	2.86 (98.0±2.2) ³⁾	2.5	15.0	62.5	20.0	0	0

¹⁾ Low temperature long time (63°C , 30 min.)

²⁾ High temperature short time (75°C , 15 sec.)

³⁾ The data are presented as the mean ± standard deviation of 40 samples.

Table 3-2. Types of thermodruic microbial flora of raw milk and commercial pasteurized milk.

Flora	Raw milk		Commercial pasteurized milk	
	No. of isolates	(%) ¹⁾	No. of isolates	(%) ¹⁾
<i>Bacillus</i>	356	(30.7)	326	(33.5)
<i>Microbacterium</i>	311	(26.9)	328	(33.7)
Coryneform-bacteria	92	(7.9)	74	(7.6)
<i>Lactobacillus</i>	16	(1.4)	16	(1.6)
<i>Micrococcaceae</i>	271	(23.4)	169	(17.4)
<i>Streptococcus</i>	78	(6.7)	36	(3.7)
Other Gram-positive bacteria	23	(2.0)	15	(1.5)
Actinomycetes	10	(0.9)	9	(0.9)
Yeast	1	(0.09)	1	(0.1)
Total	1158	(100.0)	974	(100.0)

¹⁾ Percentage of total isolates

ら 10⁶ml⁻¹ 前半のものが全体の 95% を占めた。また、グラム陰性細菌数は、10²ml⁻¹ から 10⁵ml⁻¹ まで広範囲に分布した。さらに、耐熱性細菌数については、10¹ml⁻¹ から 10³ml⁻¹ のものが 84% を占めた。

生乳の各菌相の菌数分布については、1970 年代後半に同じ北海道内の生乳の菌数分布について検討した筆者ら^{71,73)}の結果と比較すると、一般細菌数についてはほとんど同じ傾向であった。しかし、グラム陰性細菌数については、今回の試料で僅かながら低い傾向にあった。また、耐熱性細菌については、今回の試料のものが菌数が低く、菌相の変化および細菌汚染の改善が認められた。生乳における耐熱性菌の汚染状況については、Thomas¹⁵⁶⁾の報告によると、10²~10³ml⁻¹のものが全試料の約 38% を占め、さらに 10²~10⁴ml⁻¹の範囲では全体の 67% になることを報告している。同様に、Davies²⁵⁾は、パイ プラインシステムの生乳中の耐熱性細菌数は、10³ ml⁻¹ 以上のものが全試料の 40.7% であったと報告している。また、Mackenzie⁸⁶⁾は、バルクミルクタンクの耐熱性細菌の汚染は、洗浄・殺菌の不十分な設備を使用した際に多いことを指摘している。今回の調査においても、搾乳器具類の細菌汚染程度は酪農家によっても、器具の種類によっても差が大きいものであった。これらの菌数の差は主に搾乳器具類の洗浄や殺菌処理によって、広範囲に分布したものと考えられる。また、殺菌処理後の牛乳や他の乳製品の保存性については、汚染した耐熱菌相や殺菌後の二次的再汚染による菌の種類によって大きく影響されるが、特に原料乳に耐熱性細菌が多く汚染する場合には、殺菌によっても残存し、品質の劣化が起こる可能性が高い^{22,23,25,81,82,140)}。また、Ravanis と Lewis¹²⁴⁾は低温殺菌乳の保存性を検討

し、生乳を生産後、直ちに殺菌処理したもののより、冷蔵温度で 2~3 日間保存したものが、その後の保存性を高めると報告し、その理由をラクトパーオキシダーゼ・システム作用によるものと結論している。Lehmann ら⁸¹⁾、および Lehmann⁸²⁾によると、低温殺菌乳の汚染細菌数は殺菌前の生乳の細菌数に影響を受け、しかも殺菌処理によって残存する耐熱性細菌は、チェダーチーズの製造工程中に増殖し、品質に重大な欠陥をひき起こすとし、生乳の衛生管理の重要性を示唆している。

低温殺菌乳の残存菌についての研究の歴史は古く、市販低温殺菌乳を検討した Thomas¹⁵⁶⁾の報告では、好気性孢子形成菌が全体の 32%、Micrococci が 39%、Corynebacteria が 19.5% で、これらの 3 種で全体の 90% を占めたとしている。また、Credit ら²²⁾の報告でも、*Bacillus* が全体の 84% を占め、*Microbacterium* が 9%、その他、*Micrococcus*、*Achromobacter*、*Alcaligenes* などが分離したとされている。最近、Crielly ら²³⁾は生乳を汚染する *Bacillus* の菌種について調査した結果、高頻度に分離される種は、*B. licheniformis*、*B. cereus* であると報告している。さらに、*B. licheniformis* は農場環境から、*B. cereus* は飼料からの汚染であるとしている。Hull ら⁵⁰⁾は、63℃、30 分間の実験室的殺菌法によると、*Microbacterium* や *Bacillus* の孢子は 100% 生き残るが、*Micrococcus* は 1~10%、*Streptococcus* や *Lactobacillus* は 1 % 以下しか生き残れないと報告した。今回の殺菌乳の一部には、汚染こそ少ないが、放線菌の一部が残存した。この放線菌の種類や耐熱特性については詳細に検討していないが、放線菌特有の異臭を生成することから、製品に及ぼす影響についても検討する必要があると考える。また、三河⁹⁶⁾は、殺菌乳に残存する低温細菌相について報告し、残存菌相の大半は *Pseudomonas* であるとしている。しかし、これらの菌は概して耐熱性が低いことから二次汚染の可能性を示唆している。このように、低温殺菌乳の残存菌相についての報告は、必ずしも一致したものではない。これは、搾乳環境や搾乳器具の洗浄・殺菌の処理程度などによって汚染細菌相が異なることや、さらに、殺菌処理条件などによる複雑な要因が関与するためであると考えられる。しかしながら、低温殺菌処理によって残存する菌種は、耐熱性を持つ *Bacillus*、*Clostridium*^{148, 149, 151)} などの孢子形成菌、*Microbacterium* を含めたコリネ型細菌、*Micrococcaceae* が優勢であることは共通している。これらの耐熱性細菌が残存した原料乳によるチーズ製造は、製品の品質に大きく影響することから、各生産現場

における衛生管理,とりわけ搾乳器具類の洗浄・殺菌の徹底が衛生的生乳生産の基本であることが再認識された。

5. 小 括

低温殺菌乳や各種乳製品の安全性を確保するため、生乳および市販低温殺菌乳における耐熱性細菌数ならびに耐熱性菌相の分布について検討した。その結果、生乳の耐熱性細菌数は、 10^2ml^{-1} 程度のものが一般的であったが、 10^3ml^{-1} 以上の試料も一部みられた。

耐熱性菌の菌相は、*Bacillus* (30.7-33.5%), *Microbacterium* (26.9-33.7%), *Micrococcaceae* (17.4-23.4%) が優勢で、この3グループで全体の約80%を占めた。その他、*Streptococci*, *Lactobacilli*, *Actinomycetes* も分離された。低温殺菌法 ($63\pm0.2^\circ\text{C}$, 30 min) と高温短時間殺菌法 ($75\pm0.2^\circ\text{C}$, 15 sec) による殺菌効果を比較したところ、低温殺菌法では、平均98.6%、高温短時間殺菌法で、平均96.8%と、両殺菌法に顕著な差は認められなかった。

第4章 生乳中における主要耐熱性菌の同定

1. 緒 言

前章では、生乳および低温殺菌乳より分離された耐熱性細菌相についてその概要を検討した。生乳・低温殺菌乳には幅広い菌相が認められるが、分離菌の全てがグラム陽性細菌であった。

牛乳の耐熱性細菌については、これまで、Bhadsavle ら⁶⁾、Tanaka¹⁴⁸⁾、Tanakaら¹⁴⁹⁾ による *Clostridium* の汚染、Credit ら²²⁾ による低温殺菌乳の汚染菌の同定、Lehmann ら⁸¹⁾、Crielly ら²³⁾ による牛乳・乳製品における *Bacillus* の生態学的研究、Hull ら⁵⁰⁾ によるチーズ製造原料乳における耐熱性菌についての報告、また、生乳や殺菌乳の低温細菌についての三河^{96,97)}、Washam ら¹⁷²⁾ の報告などがある。しかし、耐熱細菌相の中でも、*Microbacterium* 属についての研究は少ない。それは、*Microbacterium* 属の分類が煩雑であり、これまで分類学的な位置が曖昧であったことにも原因している。また、それと同時に、本菌が *Clostridium* や *Bacillus* の一部に見られるような病原性を持たないことなどにもよるものと思われる。

Microbacterium はコリネ型細菌の仲間として、好気性、グラム陽性、無孢子の桿菌で、V字型やジグザグの細胞配列を示す細菌であり、古くから牛乳や乳製品の耐熱汚染細菌として扱われてきた。Bergey's Manual

of Systematic Bacteriology (1987) によると Irregular nonsporing Gram-positive rods に位置付けられているが、現在、このグループには、*Microbacterium* 属以外に36属が含まれる。しかも、このグループの菌は、GC含量が幅広く、これまでもその分類学的位置についての論議が絶えないものである。*Microbacterium* もこれまで、何回かの分類編成がされたが、耐熱性があるとする特性から、他の属と区別してきた。しかし、その分類学的な特性については必ずしも明確なものではなかった。本菌属は一般に、乳・乳製品に由来するものが多かったが、詳細な生態学についての知見は乏しいのが現状である。前章の低温殺菌乳における主要な菌相を見ると、孢子形成菌の *Bacillus* 属が全体の30.0~33.5%、*Microbacterium* 属の26.9~33.7%、次いで *Micrococcaceae* の11.4~23.4%となり、これらのグループで全体の81~84.6%と大半を占めた。それ以外のものとして、*Microbacterium* と類似したコリネ型細菌が若干分離された。

そこで本章では、生乳や殺菌乳から分離される主要な菌相である *Bacillus* 属、*Microbacterium* 属について更に詳細な同定を試みた。

2. 実験材料および方法

1) 供試菌株

ここで用いた菌株は生乳および殺菌乳から分離された *Bacillus* 属、*Microbacterium* 属として大別されたものを無作為に選抜したもので、*Bacillus* 属については322株、*Microbacterium* 属220株のそれぞれについて同定した。これらの菌株の保存は、標準寒天培地に栄養補給のためGAMブイヨン(日水製薬製)を1,000 ml 当たり8 g 添加した半斜面培地に植菌し、 -90°C で凍結保存、実験に供する際には、同一培地に植菌し、3週間ごとに新しい斜面培地で継代培養した。

2) 同定法

Bacillus 属については、Mitruka と Bonner¹⁰¹⁾ の方法に準拠して同定試験を行い、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology の各データ者を参照した。なお、*Bacillus* の発育温度の測定は、ハートインフュージョンブイヨン(栄研)に予め同一液体培地で活性を高めた菌液を0.5%量植菌し、ウオータバスで10日間まで培養し600nmの濁度を測定することによって、発育を確認した。また *Microbacterium* の同定については、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology に記載されている方法に準拠して行なったが、化学分類

に関する分析については、ペプチドグリカンの DAP 分析については鈴木¹⁴⁶⁾の方法、グリコレート試験は Uchida と Aida^{167,168)}の方法によった。また、その他の試験については、Robinson¹³¹⁾, Bousfield¹¹⁾, Bousfield と Calley¹²⁾, Davis と Newton²⁴⁾, Harrington⁴⁴⁾, Imai ら⁵⁶⁾, Jones⁶²⁾, Keddle ら⁶⁹⁾, Nigel ら¹⁰⁸⁾の方法を参考にした。

① DAP 組成による *Microbacterium* の同定

ジアミノピメリン酸 (DAP) 異性体の分析は、鈴木¹⁴⁶⁾の方法に準拠した。つまり、APT 平板寒地培地に表面塗抹培養した菌体をスバチュラで集め、滅菌蒸留水で洗菌を 2 回行なった菌体を凍結乾燥した。その菌体 10mg をガラスアンプル管に入れ、1ml の 6N HCl と窒素ガスを封入して 100℃ で 18 時間加水分解した。この加水分解物を水で湿らした口紙で過したものを、ロータリエバポレーターで濃縮・乾固し、残渣を蒸留水 300μl で溶かしたものを分析試料とした。DAP の確認は、HPTLC (MERCK, No.5787) を使い、メタノール：水：6N 塩酸：ピリジン (80：26：4：10, v/v) で展開し、乾燥後、ニンヒドリンをスプレーし 100℃ で 5～10 分間加熱発色した。

② グリコリル試験

DAP と同様に調製した乾燥菌体を、6N HCl 100μl で加水分解し、その分解物を、Fig. 4-1 に示したような、マイクロカラムに予め酢酸型にしたイオン交換樹脂 (BIO-RAD, Dowex 1-×8) を充填した直径 6mm、長さ 50mm のマイクロカラムに流し、更に 1ml の純水を 2 回、1ml の 0.5N HCl を 1 回、最後に 2ml の 0.5N HCl を通し、溶出した液をグリコリル画分とした。こ

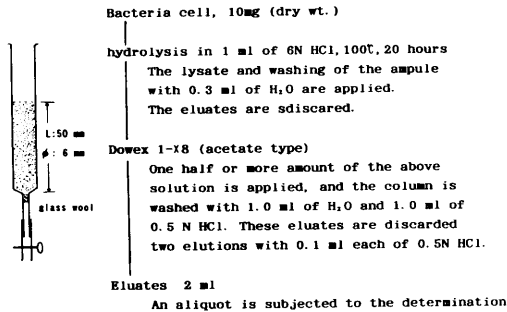


Fig. 4-1. Separation method for glycolic acid from acid hydrolysate of bacterial cell with micro-scale resin columns.

Table 4-1. Characteristics differentiating the species of the genus *Bacillus* isolated from milk.

Characteristics	Group					
	A	B	C	D	E	F
Endospore-forming	+	+	+	+	+	+
Cell diameter >1.0 μm	-	-	-	-	-	-
Spores round	-	-	-	-	+	-
Sporangium swollen	-	-	+	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	+	+	-	-	-
VP test	+	+	-	+	-	-
pH in VP broth <6	±	+	+	+	-	-
>7	-	-	-	-	+	+
Acid from						
D-glucose	+	+	+	+	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	-	-
D-Xylose	+	+	+	+	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	-	-
Gas from glucose	-	-	±	-	-	-
Hydrolysis of						
Casein	+	+	-	+	±	+
Gelatin	+	+	+	+	±	+
Starch	+	+	+	-	-	-
Utilization of						
Citrate	+	+	+	+	-	-
Propionate	-	+	±	±	±	-
Degradation of tyrosine	-	-	-	-	-	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+	+	±	-
Formation of						
Indole	±	-	-	-	-	-
Dihydroxyacetone	±	-	-	-	-	-
NaCl and KCl required	-	-	-	-	-	-
Growth at pH						
6.8	+	+	+	+	+	+
5.7	+	+	+	+	+	-
Growth in NaCl						
2%	+	+	+	+	+	+
5%	+	+	±	+	±	+
7%	+	+	-	+	-	-
10%	±	-	-	-	-	-
Growth at						
5°C	-	-	-	±	±	-
10°C	-	±	±	+	+	-
30°C	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+
50°C	±	+	±	±	-	+
55°C	±	±	-	-	-	-
No. of Strains	71	188	11	37	12	3 322
%	22.0	58.4	3.4	11.5	3.7	0.1 100.

Group: A, *B. subtilis* B, *B. licheniformis* C, *B. macerans*
D, *B. pumilus* E, *B. sphaericus* F, *B. badius*

のグリコリル画分を別のテフロンシール付きの小試験管に 100μl 採り、2 ml の DON 試薬を添加し、100℃ で 10 分間加熱、赤色を呈するものをグリコリル存在と判断した。

3. 結果

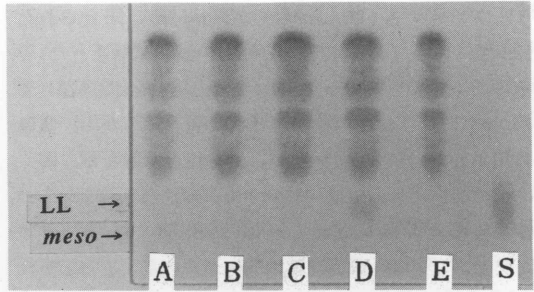
1) *Bacillus* 属の同定

生乳および低温殺菌乳から分離された *Bacillus* 属 322 株の同定試験の結果をまとめたものを Table 4-1 に示した。供試菌を内生孢子の大きさや型、さらに孢子の形などにより大別し、更に好気・嫌氣的培養による増殖の有無、増殖可能な pH 範囲など 38 項目について試

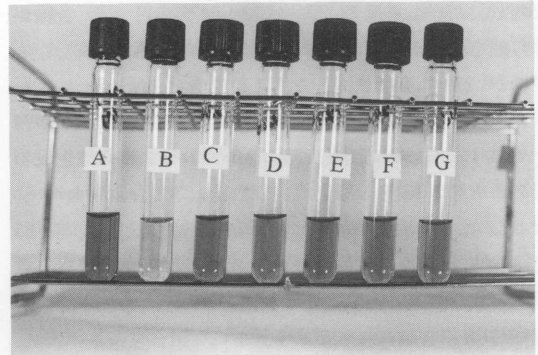
Table 4-2. Characteristics differentiating the species of the genus *Microbacterium* isolated from milk.

Characteristics	Group		
	A	B	C
Gram-stain	+	+	+
Irregular form	+	+	+
Catalase	+	+	+
Pigmentation*	+	+	+
Peptidoglycan			
DAP	-	-	+
n-Glycolyl residue	+	+	+
Survive heating at 63°C for 30 min	+	±	-
Nitrate reduced to nitrite	+	±	-
Arginine utilized	-	+	+
H ₂ S produced	-	±	-
Acid production from			
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Inulin	-	+	-
Sucrose	-	+	±
Trehalose	-	+	±
Raffinose	-	±	-
Inositol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Glycerol	-	±	-
L-Lactate produced	+	+	±
No. of isolated (%)	213 (96.8%)	5 (2.3%)	2 (0.9%)

* Pigmentations, yellow, yellow-white and orange.

A, *L. lacticum*; B, *M. levaniformans*; C, *M. imperiale***Photo 4-1.** Diamino acid in peptide part of the cell-walls components among genus *Microbacterium* and related coryneform bacteria.

- A, *Microbacterium lacticum* JCM 1379
 B, *Microbacterium arborescens* JCM 5884
 C, *Microbacterium laevaniformans* IFO 14471
 D, *Coryneform bacteria* 1-20 (isolated from raw milk)
 E, *Microbacterium lacticum* R1118 (isolated from raw milk)
 S, meso-DAP standard

**Photo 4-2.** Content of glycolyl residue in whole cells of genus *Microbacterium*.

- A, glycolic acid-Na(control) : 10 μ mol ml⁻¹
 B, blank : H₂O
 C, *Microbacterium arborescens* JCM-5884
 D, *M. imperiale* IFO 12610
 E, *M. lacticum* IFO 14137
 F, *M. laevaniformans* IFO 14471
 G, *M. lacticum* JCM 1379

験した。その結果、孢子囊が栄養細胞より大きく膨潤化を呈するものが23株分離され、その内12株(3.7%)については、孢子の形態が球形で、ブドウ糖、アラビノース、キシロース、マンニトールから酸を生成しない菌であった。これを *B. sphaericus* と同定した。また、孢子囊が膨大するが、孢子の型が、卵型・楕円であったものを *B. macerans* とし11株(3.4%)を同定した。また、その他の分離株については全て孢子が栄養細胞より小型のものでブドウ糖、アラビノース、キシロース、マンニトールから酸を生成、嫌気培養では全く生育せず、しかもVP反応、ブドウ糖からのガス生成、5°Cおよび10°C発育がいずれも陰性のAグループが71株分離され、これを *B. subtilis* と同定した。この種は全分離菌株の22%にあたり、2番目に多かった。今回、*Bacillus* 属のなかで最も多数分離された種は、嫌氣的発育、糖からの酸生成、タンパク質分解、プロピオン酸塩利用、硝酸塩還元性が何れも陽性で、ブドウ糖からガス生成、インドール、ジハイドロオキシアセトン生成などが陰性のBグループで、322株のうちの188株(58.4%)を占めた *B. licheniformis* であった。次に、*B. subtilis* と類似しているがVP反応、インドール、ジハイドロオキシアセトンが陰性であり、比較的低温発

育性を示したDグループが37株(11.5%)分離され、これを *B. pumilus* と同定した。また、3株のみであったが、孢子囊や孢子の形態を除くと、*B. sphaericus* と類似し、ブドウ糖、アラビノース、キシロース、マンニトールから酸を生成せず、嫌気培養では全く生育しない、しかもVP反応、ブドウ糖からのガス生成、5°Cおよび10°C発育がいずれも陰性のFグループで *B. badius* と同定した。

2) *Microbacterium* 属の同定

Microbacterium 属は現在、*M. arborescens*, *M. imperiale*, *M. lacticum*, *M. laevaniformans* の4種を含むが、今回、生乳から分離された耐熱性細菌の中からスク

リーニングテストで *Microbacterium* 属と同定された 220 株について種を決定するための同定試験を行ない、その同定結果を Table 4-2 にまとめた。分離菌株は予め、63℃で 30 分間加熱処理されていることから、試験に用いた菌株は、当然ながら耐熱性を示したが、ごく一部の菌株については、63℃での耐熱性を示さないものがあった。*Microbacterium* 属は細胞壁の DAP (ジアミノピメルリン酸) の異性体の有無が決め手になるとされている。ここで分離された 220 株については、全て DAP の異性体が認められず、しかも細胞壁のグリコリル酸が陽性であることを確認した (Photo 4-1 には TLC による DAP の結果の一例を、Photo 4-2 にはグリコリル酸の発色反応を示した)。分離された 220 株について Table 4-2 に示した項目を試験したが、その結果から、63℃、30 分間の実験室的低温殺菌によって生残し、硝酸塩を還元、ブドウ糖、フラクトース、乳糖から酸を生成するが、その他の糖類からは酸を生成しない株が 213 株 (96.8%) あり、これらを、*Microbacterium lacticum* と同定した。また、硝酸塩還元が無いが微弱であり、イヌリン、ショ糖、トレハロースから酸生成のあるものが 5 株分離され、これを、*M. levaniformans* とした。また、*Microbacterium* の特性を持つが、63℃、30 分間の低温殺菌処理で死滅し、しかも硝酸を還元するものが 2 株分離され、これを *M. imperiale* と同定した。

4. 考 察

生乳や殺菌乳の耐熱性菌は多種類にのぼるが、主なものは、孢子形成細菌や *Microbacterium*, *Micrococcus* の一部、*Streptococcus* の一部である。Crielly ら²³によると、牛乳や乳製品から最も多く分離される *Bacillus* の菌種は *B. licheniformis* と *B. cereus* であるとしている。また、Hull ら⁵⁰⁾は、生乳から優勢に分離される *Bacillus* は、*B. licheniformis*, *B. subtilis* および *B. pumilis* であるとし、*B. cereus* や *B. circulans* はまれに分離されるものであるとしている。今回の実験では、*B. licheniformis*, *B. subtilis* が全体の 80% を占めた。また、今回の生乳や殺菌乳からは、*B. cereus* は全く分離されなかったことが特徴であった。

次に、生乳における耐熱性菌の一つである *Microbacterium* は、無孢子細菌として最も強い耐熱性を持ち、低温殺菌乳やチーズ原料乳に残存することが懸念される。しかも、本菌の同定に最も重要とされていた耐熱性についても、63℃で 30 分間の低温殺菌法で死滅しない

とされている特性が、*M. lacticum* については当てはまるが、その他の 3 種については必ずしも当てはまらない。最近の化学分類学の発展に伴い、*Microbacterium* の分類・同定法については種々検討され、細胞壁のペプチドグリカンの構造やその組成、さらに細胞壁の脂肪酸組成等についての検証による方法が利用されるようになった^{147,176)}。しかしながら、同じ好気性を示す他の属と区別するのは必ずしも容易ではない。今回、生乳や低温殺菌乳から分離された *Microbacterium* は、耐熱性細菌の 30% を占める優勢な菌種であるが、このコリネ型細菌のグループである *Microbacterium* を他の類似した属と区別するために、耐熱性と同時に、細胞壁の化学組成の特徴である DAP の異性体の確認と、グリコリル試験を併用することによって、比較的容易にしかも正確に *Microbacterium* を区別することが可能であった。

また、*Microbacterium* には現在 4 種が設定されているが、今回分離した *Microbacterium* 220 株のうち、耐熱性があり、しかも硝酸の還元力を持つ *M. lacticum* が全体の 96.8% を占める結果になった。もちろん、今回の分離菌株は全て、予め加熱殺菌処理されたものから分離された菌株であることから、耐熱性を示すのが当然であるが、実際に再度 63℃、30 分間の殺菌処理を施すと 3 株が死滅した。このことは、殺菌処理する際の環境条件によって耐熱性が微妙に異なることを意味していると考ええる。今回の分離株には、*Flavobacterium* から *Microbacterium* に改められた *M. arborescens* と思われるものは分離されなかった。これらのことから、低温殺菌によって生残する *Microbacterium* は *M. lacticum* が主な種と思われる。

Microbacterium 属の分類・同定においては耐熱性が大きな指標としているが、本属で耐熱性を示す種は *M. lacticum* であることから、コリネ型細菌のグループから *Microbacterium* を分別するには、耐熱性と同時に DAP の異性体、グリコリル酸の確認が簡便で確実であると思われる。

5. 小 括

生乳や低温殺菌乳の主要耐熱性細菌相である *Bacillus* 属と *Microbacterium* 属の同定を試みた。なお、*Bacillus* 属については 322 株、*Microbacterium* については、化学分類の手法で予め選抜した 220 株を用いた。分離された *Bacillus* 属を同定したところ、322 株中、*B. licheniformis* が 188 株 (58.4%)、*B. subtilis* が 71 株 (22.0%) でこの 2 種で全体の 80% を占めていた。その他、*B.*

pumilus (11.5%), *B. macerans* (3.4%), *B. sphaericus* (3.7%), *B.adius* (0.1%) であった。

Microbacterium 属については、予め 63℃、30 分間の加熱処理したものであるため、耐熱性の強い *M. lacticum* の分離割合が高く、220 株中、213 株 (96.8%) であり、他に *M. levaniformans* (2.3%), *M. imperiale* (0.9%) が認められた。Irregular nonsporing Gram-positive rods のグループから *Microbacterium* を選抜するには、これまでの耐熱性の確認のほか、細胞壁の DPA の異性体の有無、グルコリル酸の確認が重要であると考えられる。

第 5 章 *Microbacterium lacticum* の耐熱性
および耐熱性に及ぼす加熱条件の影響

1. 緒 言

生乳の耐熱性細菌の種類は *Bacillus*, *Clostridium* などの孢子形成菌を始め、*Micrococcus* や *Streptococcus* の一部、*Microbacterium* などのコリネ型細菌の汚染が多く、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、汚染菌に対しての十分な認識が必要である。

低温殺菌乳の汚染菌として出現頻度の高い *Microbacterium* は、無孢子細菌としては、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、75℃ で数分間の加熱が必要であるとされている¹³¹⁾。 *Microbacterium* の分類はこれまで幾度の変遷を経て、*Bergey's Manual* 第 9 版では、従来の 3 種に加え、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⁵⁶⁾。細菌の細胞に対する加熱の殺菌効果については、殺菌前の菌の履歴、とりわけ栄養状態、水分活性、pH、酸素、保存条件などによって左右されることが知られている^{30, 33, 51, 52, 54, 55, 58, 114, 117, 119, 120, 132, 148)}。

本章では低温殺菌乳やチーズ製造過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* について、本菌の耐熱性ならびにその耐熱性に及ぼす加熱条件の影響について検討した。

2. 実験材料および方法

1) 供試菌株

供試菌株は *M. arborescens* JCM 5884 (type strain), *M. imperiale* IFO 12610 (type strain), *M. lacticum* JCM 1379 (type strain), IFO 14137, *M. laevani-*

formans IFO 14471 (type strain) および生乳から分離され、*Microbacterium lacticum* と同定した、R 1118, R 1119 株を用いた。供試菌株は、標準寒天斜面培地および APT 培地の斜面に保存した。

2) 培 地

供試菌株は、APT 斜面寒天培地に植菌して活性化し、同組成の APT 液体培地で菌体を調製した。APT 培地の組成は、ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 5.0 g, 麦芽エキス 5.0 g, カザミノ酸 5.0 g, 牛肉エキス 2.0 g, グリセリン 2.0 g, ツイーン# 80 0.05 g, 硫酸マグネシウム 1.0 g, 純水 1000ml, pH 7.2 で必要に応じて粉末寒天を添加し、寒天培地を調製した。

3) 耐熱性の確認

供試菌の耐熱性は、APT 培地の斜面で十分活性化した菌体を、APT 液体培地で 32℃、48 時間前培養したものを、予め 110℃、10 分間滅菌した 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。これを良く攪拌したのち、滅菌パスツールピペットで、1ml のガラスアンプル管に移し、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で規定時間の加熱処理を行い、直ちに 15℃ まで冷却した。また、75℃ の高温瞬間殺菌法は、第 3 章の Fig. 3-1 に示したような密封恒温水槽にステンレス細管 (外径 2mm, 内径 1mm, 長さ 100 cm) を装着し、ベリスタルポンプを用い、生乳をステンレス細管内を規定時間で通過するようにした実験室用高温殺菌装置を用いた。殺菌処理した試料およびアンプル管は開封後、リン酸緩衝生理的食塩水で 10 倍段階希釈した。菌数測定法は、基本的に混釈平板法、ならびに標準寒天培地にスパイラルプレーター (SPIRAL SYSTEM INSTRUMENTS, Inc. 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。

Table 5-1. Thermal resistance of *Microbacterium* at 63 and 75℃.

Strain	63℃ (min)			75℃ (sec)	
	5	10	30	15	30
<i>M. arborescens</i>					
JCM 5884(T)	—	—	—	—	—
<i>M. imperiale</i>					
IFO 12610(T)	—	—	—	—	—
<i>M. lacticum</i>					
JCM 1379(T)	+	+	+	+	+
IFO 14137	+	+	+	+	+
R 1118	+	+	+	+	+
R 1119	+	+	+	+	+
<i>M. laevaniformans</i>					
IFO 14471(T)	+	—	—	—	—

(T), type strain

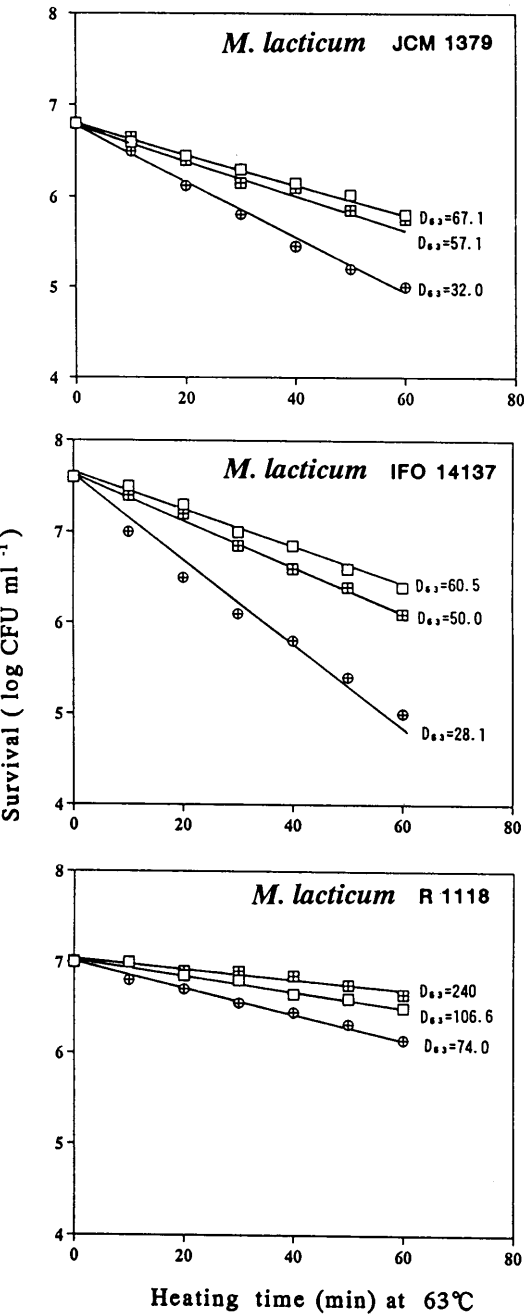


Fig. 5-1. Survival curves of *Microbacterium lacticum* heated in APT broth (□), skim milk (⊞) and physiological saline (⊕).

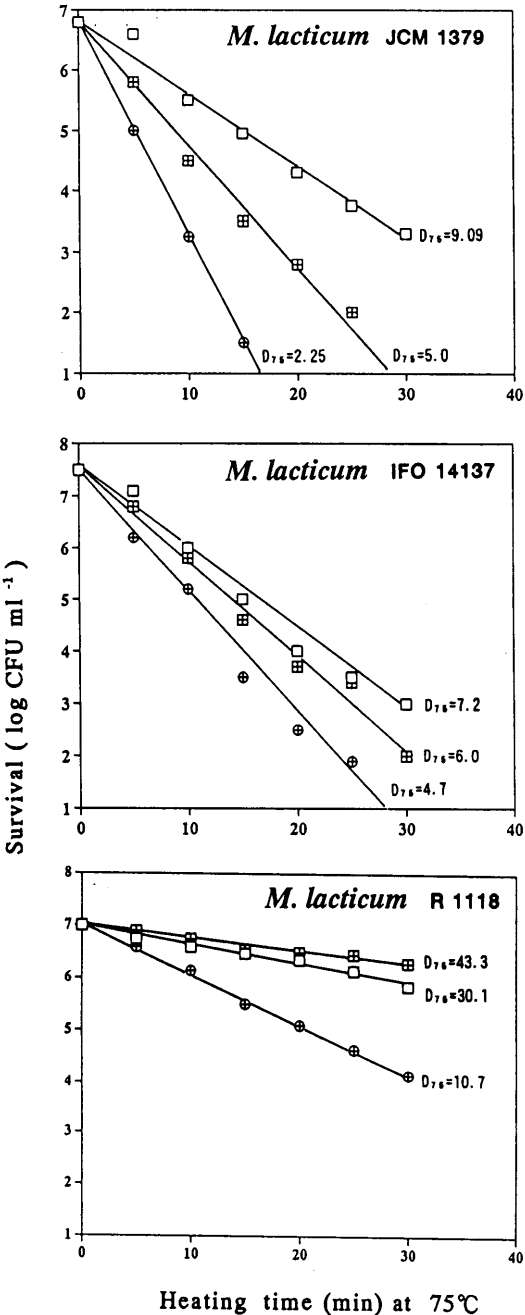


Fig. 5-2. Survival curves of *Microbacterium lacticum* heated in APT broth (□), skim milk (⊞) and physiological saline (⊕).

4) TDR 曲線および D 値の算出

加熱時間と残存菌数の算出は、各殺菌時間に対する生存菌数を対数でとり表示した。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

3. 結果

1) *Microbacterium* の耐熱特性

牛乳から分離された *Microbacterium* の中から任意に選抜した *Microbacterium lacticum* R 1118, R 1119, IFO 14137, および JCM 1379, *M. arborescens* JCM 5884, *M. imperiale* IFO 12610, *M. laevaniformans* IFO 14471 を用い、 $63 \pm 0.2^\circ\text{C}$ および $75 \pm 0.2^\circ\text{C}$ の加熱処理した際の耐熱性について Table 5-1 にその概要を示した。 75°C における耐熱性は、*M. lacticum* IFO 14137, JCM 1379, R 1118, R 1119 のみに認められるが、他の *M. arborescens* JCM 5884, *M. imperiale* JCM 12610, *M. laevaniformans* IFO 14471 についてはいずれも耐熱性が認められなかった。また、 63°C における耐熱性は、*M. lacticum* の全株で 30 分間まで、*M. laevaniformans* IFO 14471 では 63°C , 5 分間のみが耐熱性を示した。

2) *Microbacterium* の耐熱性に及ぼす加熱媒体の影響

次に、特に耐熱性の高かった *M. lacticum* の 3 株について、その耐熱性におよぼす加熱媒体の影響を検討し

た。まず、 63°C における TDR の結果を Fig. 5-1 に示した。*M. lacticum* の type strain である JCM 1379 の D 値は 10% 還元脱脂乳で $D_{63}=57.1$ min, APT 培地で $D_{63}=67.1$ min, 生理食塩水で $D_{63}=32.0$ min であった。同様に *M. lacticum* JCM 14137 については、脱脂乳の $D_{63}=50.0$, APT 培地で $D_{63}=60.5$, 生理食塩水で $D_{63}=28.1$ min。また、今回、生乳より分離同定した *M. lacticum* R 1118 は、還元脱脂粉乳で $D_{63}=240$ min, APT 培地で $D_{63}=106.6$ min, 生理食塩水 $D_{63}=74.0$ min となり最も耐熱性が高かった。一方 75°C における殺菌処理は Fig. 5-2 に示したように、JCM 1379 で脱脂乳の $D_{75}=5.0$, APT の $D_{75}=9.09$, 生理食塩水の $D_{75}=2.25$ min であった。JCM 14137 では、 $D_{75}=6.0$, $D_{75}=7.17$, $D_{75}=4.7$ min となった。また R 1118 株では、 $D_{75}=43.4$, $D_{75}=30.1$, $D_{75}=10.7$ min となり、*M. lacticum* 3 株の中で最も高い耐熱性を示した。一般に、*M. lacticum* を死滅させるには、 75°C では数分間、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、菌株によって D 値にかなりの差があることが示唆された。また、*M. imperiale* については 63°C での耐熱性はないとされている。また、*M. arborescens* JCM 5884 についても、Table 5-1 に示したように、 63°C , 10 分間、 75°C , 2 分間以上の殺菌処理によって死滅し、耐熱性が認められなかった。次に、菌の培養時間が耐熱性に及ぼす影響について検討し、その結果を Fig. 5-3 に示した。24 時間培養菌体での D 値は、R 1118 株で $D_{75}=40.1$ min, 菌の age が比較的古い 48 時間培養の D 値は $D_{75}=82$ min となった。また、JCM 1379 では 24 時間

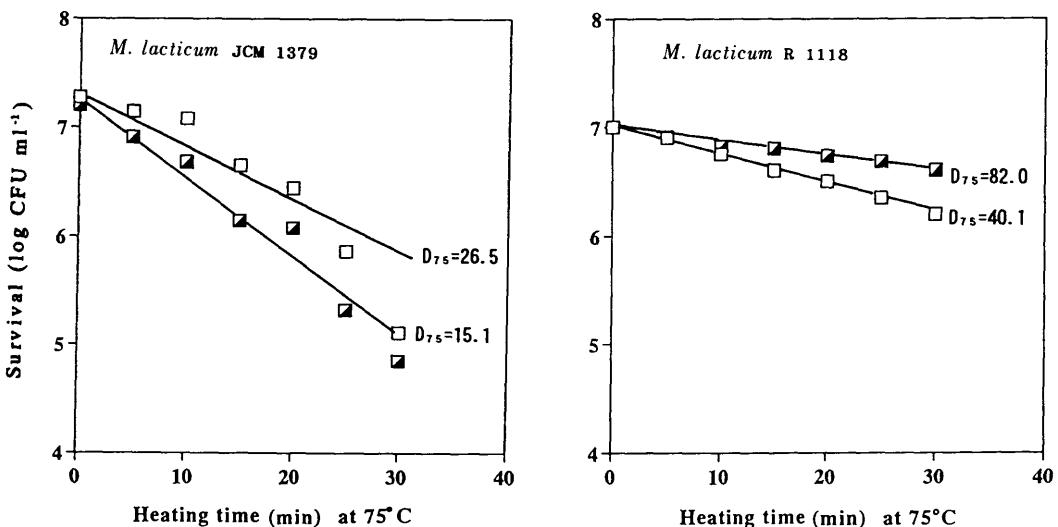


Fig. 5-3. The influence of incubation time on heat resistance of *Microbacterium lacticum* at 75°C

Incubation time: □, 24 hours; ■, 48 hours

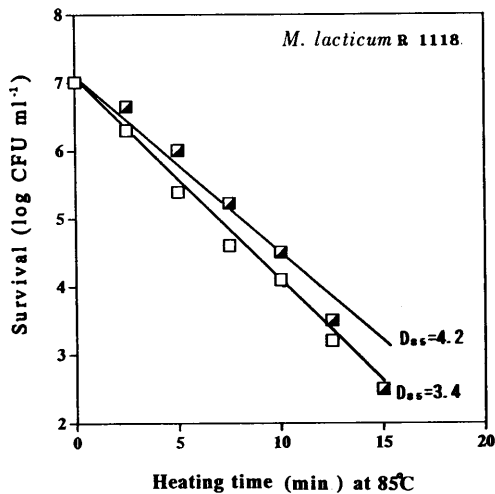


Fig. 5-4. The influence of incubation time on heat resistance of *Microbacterium lacticum* at 85°C

□, 24 hr incubation ■, 48 hr incubation

培養で $D_{75}=26.5$ min, 48 時間培養で, $D_{75}=15.1$ min となった (Fig. 5-3). 同様に, 耐熱性の高かった *M. lacticum* R 1118 における D_{85} については, Fig. 5-4 のように 24 時間培養の菌体が $D_{85}=3.4$ min, 48 時間が $D_{85}=4.2$ min となった.

また, Fig. 5-5 には加熱媒体の pH が耐熱性に及ぼす影響を示した. 牛乳の pH を 5.5, 6.5, 7.5 になるように乳酸で調整し, それに 24 時間培養した菌体を添加して試験を行なった. その結果, JCM 1379 では pH 7.5 のものが最も耐熱性が高く, $D_{75}=9.01$ min であった. また, R 1118 株については, pH 6.5 と pH 7.5 はほとんど

と同様な耐熱性を示し, $D_{75}=47.0$, $D_{75}=32.0$ min となり, 何れの菌株も中性域での耐熱性が高く, 酸性域で耐熱性が低下した. 次に, 先の実験結果から, JCM 1379 株が APT 培地より, 牛乳を加熱媒体とした際に耐熱性が低下する原因について検討した. 加熱媒体をペプトンと, 還元脱脂乳を使用した比較を Fig. 5-6 に示した. その結果, ペプトンを加熱媒体としたものが高い耐熱性を示したのに対し, 10% 還元脱脂乳を加熱媒体にした菌体では耐熱性が低かった. また, 10% 還元脱脂乳から調製したホエーを純水で 40% 濃度に希釈したもの, 更に, その希釈ホエーにペプトンを加えた培地の何れの媒体においても耐熱性がペプトン水のものに比べて低下した. また, ホエーとそのホエーを透析したものを加熱媒体として同様に菌の耐熱性に及ぼす影響について検討したものを Fig. 5-7 に示した. ホエーのみでは先の脱脂乳と同様な傾向を示したが, それを透析したり, 透析ホエーを凍結乾燥処理したものでは耐熱性が高まった. また, 脱脂乳の加熱処理による影響を検討し, Fig. 5-8 に示したが, 加熱温度や加熱時間による影響は顕著なものではなかった. このように, 加熱媒体が耐熱性におよぼす影響については, JCM 1379 のようにペプトン, 酵母エキス, 麦芽エキスを主成分とする APT 液体培地が高く, 食塩水が低く, 還元脱脂乳がその中間的な結果となるものや, R 1118 のように還元脱脂乳培地と APT 培地ではほとんど差異が認められない菌株もあり, 菌株による差が認められた. しかし生理食塩水のような高分子物質の存在しない媒体では D 値はいずれも低い結果となり保護作用のないことが明らかである.

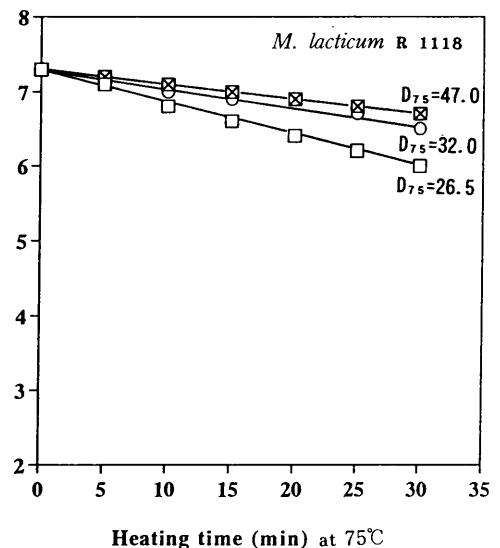
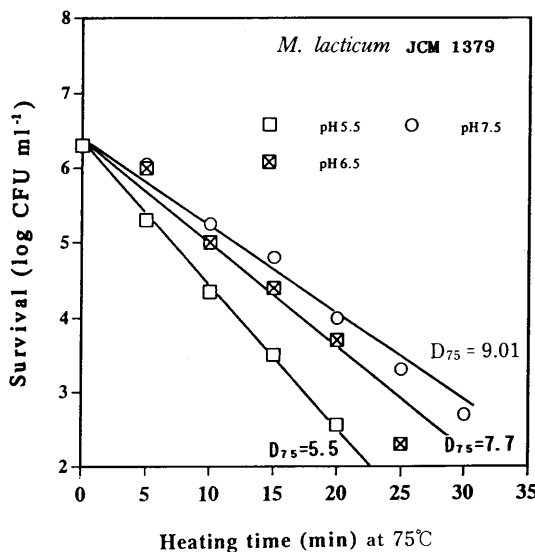


Fig. 5-5. The influence of pH value of skim milk on survival curves of *Microbacterium lacticum* at 75°C.

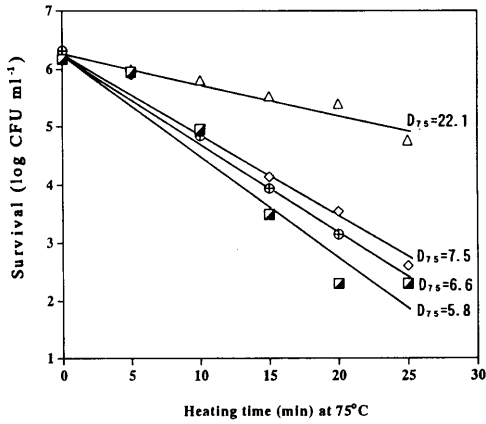


Fig. 5-6. The influence of skim milk on the heat resistance of *Microbacterium lacticum* JCM 1379 at 75°C.

- , skim milk
- △, peptone water(1%)
- ◇, 2.5-fold diluted whey
- ⊕, 2.5-fold diluted whey + peptone water(1%)

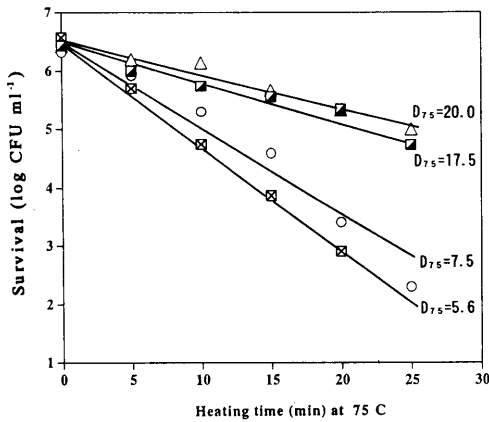


Fig. 5-7. The influence of skim milk and whey on heat resistance of *M. lacticum* JCM 1379 at 75°C.

- , peptone water(1%)
- ⊗, whey
- , dialyzed whey
- △, dialyzed and lyophilization whey

4. 考 察

生乳・乳製品の汚染菌は多種にわたるが、無孢子細菌として最も高い耐熱性を有する *Microbacterium* は搾乳器具等から生乳を汚染し、殺菌処理によっても残存し、乳製品を汚染するとされている¹⁶²⁾。この *Microbacterium* には現在 4 種⁴⁹⁾ 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

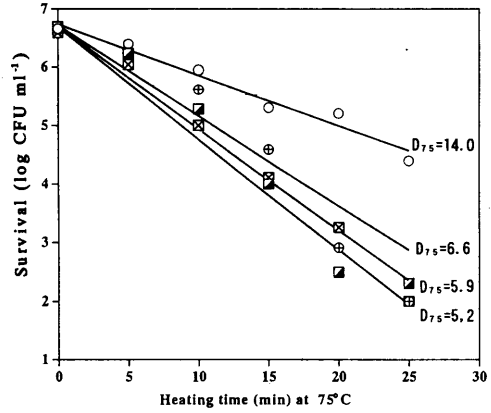


Fig. 5-8. The influence of heated skim milk on the heat resistance of *M. lacticum* JCM 1379 at 75°C.

- , peptone water(110°C, 5 min)
- ⊕—, skim milk (110°C, 5 min)
- , skim milk(100°C, 5 min)
- ⊗—, skim milk(120°C, 20min)

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、75°C 以上の加熱が必要とされている。しかし、この耐熱性は菌の 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¹³¹⁾。Murano と Pierson¹⁰⁶⁾ は、*E. coli* の耐熱性には培養時における酸素量が影響すると報告している。今回、*M. lacticum* の type strain である JCM 1379 株と筆者らが生乳から分離した R 1118 株について、それらの耐熱性を検討したところ、脱脂乳と APT 培地を加熱媒体としたときの JCM 1379 の 63°C における D 値は $D_{63}=50 \sim 57$ min, $D_{75}=5.0 \sim 9.09$ 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 R 1118 株では $D_{63}=240 \sim 106.6$ min, $D_{75}=43.3 \sim 30.1$ min となり、75°C, 30 分間の殺菌でも初期菌数を 1/5 に減少させるのみとなり、高い耐熱性が認められた。今回の殺菌試験は、APT 液体培地で 24 時間培養したものであり、増殖の定常期の菌であるため、比較的熱に対して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^{40,77,79,132,138)}。

最近、UF 処理を使った乳製品の開発や応用が進んでいるが、牛乳の成分の調整によって、汚染菌の殺菌効果が異なると言われることから、それらについての研究も進んでいる^{43,79)}。また、UF 処理乳は水分活性 (Aw) が変動することから、殺菌効果に対する影響があることも知られてきた¹¹⁷⁻¹²¹⁾。今回の供試菌株でも JCM 1379 株については、ペプトンを主成分とする APT 培地を加熱

媒体としたものが、還元脱脂乳に比べて耐熱性が高いのに対し、R 1118 株は APT 培地と還元脱脂粉乳による差は顕著でなかった。JCM 1379 株の耐熱性にペプトンそのものが保護作用をする可能性より、牛乳の成分が耐熱性を低下させている可能性が考えられる。したがって、媒体による耐熱性の影響は菌によって相違があると思われる。また一見、耐熱性の高い菌株は媒体にあまり影響を受けないように見られるが、より高い加熱温度で処理すると加熱媒体による差が明らかとなると思われる。

M. lacticum は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殺菌法では、ほとんど死滅しないことが明らかである。今回のように生乳において、低温殺菌や高温瞬間殺菌処理で残存する *Microbacterium* の種類は、*M. lacticum* に属するものが主なものと考えられる。*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、一般に細胞に加熱障害を受けるため、製品の細菌検査時に熱損傷を受けた菌体は標準寒天のような培地上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^{126,128,129)}。

この点については、次章で取り扱いたい。

5. 小 括

Microbacterium の耐熱性に及ぼす加熱条件の影響について検討した。*Microbacterium* の type strain の各菌株のうち、低温殺菌法で生残できる菌種は *M. lacticum* のみで、*M. laevaniformans* は、63°C、5 分間以内の加熱処理にのみ耐性があった。*M. lacticum* は一般に耐熱性を有する菌で、63°C、30 分間、75°C、15 秒間の殺菌法では死滅しない。しかし、耐熱性は加熱処理する際の加熱媒体によって変動し、特に牛乳中の *M. lacticum* R 1118 株は、 $D_{63}=240$ min、 $D_{75}=43.4$ min と高い耐熱性を示した。いっぽう、JCM 1379 株は、脱脂乳で $D_{63}=57.1$ min、ペプトン水で $D_{63}=67.1$ min と脱脂乳に比べ、ペプトン水を媒体としたものが耐熱性が高く、また中性域における pH で耐熱性が高く、酸性域で低下した。

第 6 章 *Microbacterium lacticum* の耐熱性に及ぼす非致死性ストレスの影響

1. 緒 言

第 5 章において、*Microbacterium* の耐熱性に及ぼす要因について検討したが、本菌の耐熱性は菌の前歴や加熱

媒体などによって差異のあることが確かめられた。しかし *Microbacterium* の中でも特に *M. lacticum* は、63°C で 30 ~ 60 分間の加熱で 1 対数値程度の菌数低下であり、73°C の高温瞬間殺菌でもほとんどが生残する耐熱性細菌であることも確かめられた。

ある種の微生物は殺菌処理前に非致死的なストレスを負荷させることによって、その後の致死性ストレスに対して抵抗性を示すことが知られている^{67,68,150)}。このような穏やかな加熱ショックによる耐熱性の獲得は、原核細胞のみならず真核細胞や高等生物の一部にも認められている¹³³⁾。特に、細菌を発育の最高温度より、5 ~ 10°C の高い温度で処理すると耐熱性が高まることが知られている^{87,89,95,173)}。更に、この耐熱性の獲得の因子を HSP (Heat shock protein) の形成によるものであるとする報告が多数みられる^{2,4,66,88,95,177)}。この HSP は細胞のストレスに対する防御反応で、大腸菌の HSP は分子量が約 1 万 ~ 7 万で、他の細菌の生成するものも比較的相同性が高いとされている^{61,66,139,170)}。また、この HSP は、細胞外から短時間に取り込まれたアミノ酸によって合成されるとの報告もある^{2,4,35,102,170)}。また、生成された HSP は、代謝活性の高い細胞内では速やかに消失するとされている。このことは、正常な代謝過程において、HSP は異常分子と認識され、細胞の代謝活性の高まりによって速やかに分解されるためであると解釈できる。

本章では、低温殺菌乳やチーズ製造過程で広く使用される 63°C、30 分間の低温殺菌、または 75°C - 15 秒間の高温瞬間殺菌処理を施す前に幾つかの非致死的な前処理することによって *Microbacterium* の耐熱性がいかに影響を受けるかについて検討した。

2. 実験材料および方法

1) 供試菌株

供試菌株は、*M. lacticum* JCM 1379 (type strain) および生乳から分離された *M. lacticum* R 1118 の 2 株を用いた。供試菌株は、標準寒天斜面培地に保存し必要に応じて同培地の斜面培地で活性を高めて実験に供した。

2) 耐熱性の確認

供試菌株の耐熱性は、十分活性化した菌体を、APT 液体培地で 32°C、48 時間前培養したものを、予め 110°C 10 分間滅菌した 10% 還元脱脂粉乳培地ならびに APT 液体培地に菌数が一定になるように添加した。これを良く攪拌したのち、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°C および 75 ± 0.2°C の各温度に調整したウォーターバスで

所定時間の加熱処理し直ちに 15℃ まで冷却した。殺菌処理した試料は、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。菌数測定法は、スパイラルプレーターによって表面塗抹し、32℃、72 時間培養後菌数を計測した。

3) TDR 曲線および D 値の算出

TDR 曲線および D 値の算出は、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。D 値の計算式は前章と同様である。

4) 耐熱性に及ぼす予備加熱の影響

殺菌処理前における予備加熱処理は以下に行なった。つまり、耐熱性の確認と同じく、予め APT 液体培地で前培養した菌体を、滅菌した 10% 還元脱脂乳培地に添加し、更に 1ml のアンプル管に封入した。それを、殺菌処理前にウオータバスで一定時間の予備加熱を行なった。殺菌処理は予備加熱した菌液を、前記と同様にウオータバスで行なった。

5) 耐熱性に及ぼす化学物質による予備処理

前述した予備加熱処理と同様に、殺菌処理前にクロラムフェニコール、ならびに食塩を非致死の濃度で作用させ、冷蔵温度においてメンブランフィルター上で APT 液体培地で洗浄し添加物質を除去したのち耐熱性試験を行なった。また、pH の影響については、乳酸によって調整した APT 液体培地に活性を高め集菌した菌体を一定時間作用させ、その後、中性にした APT 液体培地に戻し、加熱殺菌処理を施した。生菌数測定法は前述と同様に標準寒天培地の表面にスパイラルプレーターによって塗抹した。

3. 結果

Microbacterium 属は種によって差はあるが、比較的耐熱性の高い菌が多い。この耐熱性は一般に、加熱殺菌処理時の媒体や菌の前歴に支配されることは前章で既に述べた。また、ある種の微生物は殺菌処理前に、非致死のストレスを負荷させることによって致死のストレスに対し抵抗性を示すことが知られている。ここでは、殺菌前に行なった幾つかの予備的ストレス処理が、その後の殺菌に対していかなる影響を及ぼすかを検討した。

Fig. 6-1 Fig. 6-2 は耐熱性に対する予備加熱の影響を示したものである。つまり、*M. lacticum* R 1118, JCM 1379 株をそれらの発育最高温度より 10℃ 程度高い非致死の温度で予備加熱し、その後、75℃ で加熱殺菌した際

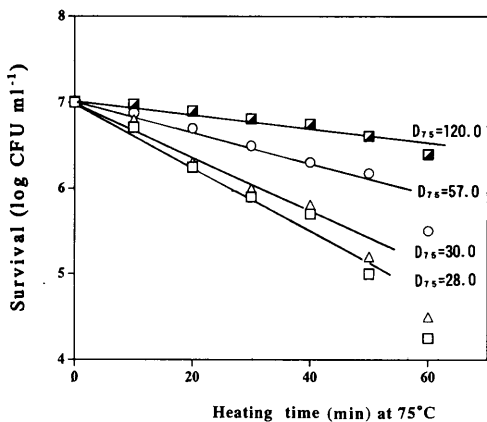


Fig. 6-1. Effect of pre-heating on acquisition of heat resistance of *M. lacticum* R 1118 at 75°C. Survival after a standard heat challenge at 75°C was determined at intervals during exposure to a preliminary heat shock at 32(□), 40(△), 45(■) and 50°C(○).

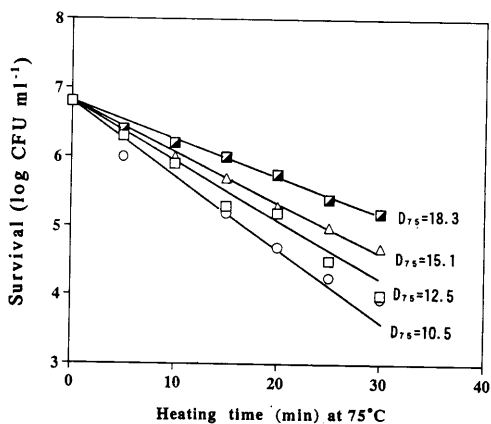


Fig. 6-2. Effect of pre-heating on acquisition of heat resistance of *M. lacticum* JCM 1379 at 75°C. Survival after a standard heat challenge at 75°C was determined at intervals during exposure to a preliminary heat shock at 32(□), 40(△), 45(■) and 50°C(○).

の耐熱性に及ぼす影響をみた。その結果、*M. lacticum* R 1118 株は、本来 32℃ 前後が発育適温であり、発育最高温度は 40℃ 前後の菌であるが、それより数度高い、45℃ で加熱ショックを短時間与えることによって、未処理の $D_{75}=28$ min に比べ、約 4 倍の $D_{75}=120$ min に延長された。同様に、*M. lacticum* JCM 1379 も 45℃ の非致死の加熱ショックによって、 $D_{75}=12.5$ から $D_{75}=18.3$ min に耐熱性が高まった。さらに、*M. lacticum*

R 1118 株の耐熱性の獲得におよぼす予備加熱の影響について Fig. 6-3 に示したが、耐熱性は比較的短時間の 30 分間程度の予備処理で獲得されることも明らかになり、それ以上の加熱時間では変動しなかった。

次に、殺菌前に加熱以外の非致死性のストレスを与えた場合の、加熱に対する耐熱性の影響を検討した。Fig. 6-4 には、APT 液体培地に *M. lacticum* R 1118 株を一定量接種し、クロラムフェニコールを APT 培地 1 ml 当たり 0, 20, 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ となるように添加した。このクロラムフェニコール濃度では供試菌は増殖が出来ないが、クロラムフェニコール存在下で 2 時間処理するこ

とによってその後の 75°C による殺菌処理に対して D 値が、 $D_{75}=19.2$ から $D_{75}=67$ min まで高まった。また、Fig. 6-5 (A) には、*M. lacticum* JCM 1379 株を予め加熱殺菌前に pH、食塩によるストレス処理を施した菌体の 75°C における耐熱性に及ぼす影響を示した。つまり、pH を調整した APT 培地に菌体を混ぜ合わせ、その後、pH を中性に戻した後に加熱処理を行ない、生残する菌数を測定し、無処理のものと耐熱性を比較した。その結果、pH を酸性にした培地で作用させた菌体では、僅かながら殺菌処理に対する耐熱性を高めることが確認された。しかし、食塩を作用させたものではその後

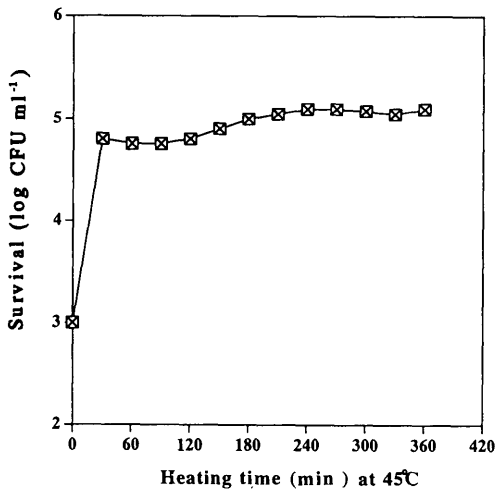


Fig. 6-3. Effect of pre-heating on acquisition of heat resistance of *M. lacticum* R 1118 at 75°C. Survival after a standard heat challenge at 75°C was determined at intervals during exposure to a preliminary heat shock at 45°C.

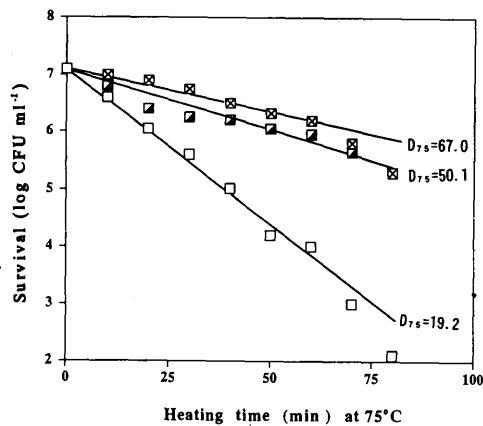


Fig. 6-4. Effect of chloramphenicol on acquisition of thermotolerance of *M. lacticum* R 1118. Pre-treatment with chloramphenicol was carried out in APT medium for 2 hrs and then removed.

Chloramphenicol con :
□, 0 $\mu\text{g/ml}$; ▤, 20 $\mu\text{g/ml}$; ■, 40 $\mu\text{g/ml}$.

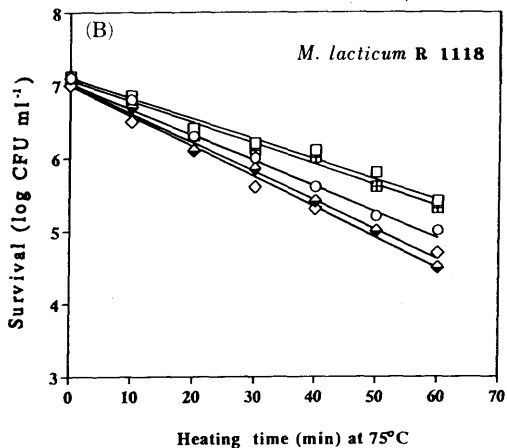
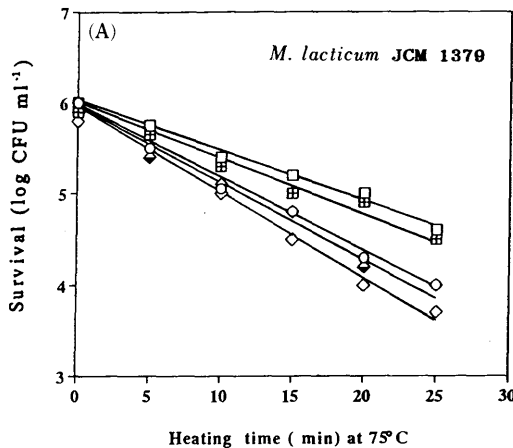


Fig. 6-5. Effect of salt and low pH stress challenge on survival of *Microbacterium lacticum* at 75°C in APT broth.
—○—, control; —□—, pH 3.0; —▤—, pH 4.0; —◇—, 3% NaCl; —◆—, 5% NaCl.

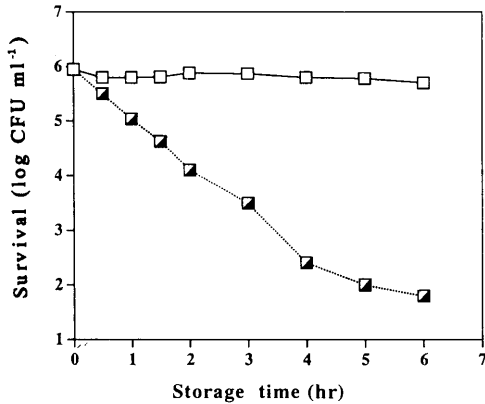


Fig. 6-6. The influence of storage temperature on the heat resistance of *M. lacticum* R 1118.

Storage temperature: □, 5°C; ■, 30°C

の耐熱性に顕著な影響を認められなかった。また, Fig. 6-5(B)には同様に *M. lacticum* R 1118 株の結果を示した。この菌株においても, pH の影響は若干認められるも顕著な差ではなかった。

次に, この予備加熱による非致死性のストレスによって獲得される耐熱性因子の細胞内保存性について検討し, その結果を Fig. 6-6 に示した。予備処理によって獲得された耐熱性因子は, その菌の増殖に近い 30°C に培養すると, 速やかに消失した。しかし, 5°C の冷蔵温度に保存すると長期間その性質が維持され, 殺菌処理に対して耐性を維持した。

4. 考 察

菌に対する熱処理による殺菌効果については, その菌の age, 栄養状態, 加熱媒体の種類など, その菌の履歴によって差があることはこれまでも幾つかの菌種によって確かめられている^{43,77,79,117,132,173}。しかし, 穏やかなストレスが負荷されるような状態におかれると一時的に耐熱性が高まる可能性があり, この耐熱性の獲得は, HSP (Heat shock protein) の形成によるとの報告がされている^{34,169}。

供試菌の *Microbacterium* の細胞に対して非致死性の加熱処理を与えることによって, その後の致死性の加熱処理に対する耐性が高まることが確認された。しかも, その耐熱性の因子は 30 分間という比較的短時間で獲得されるが, その菌の発育最適温度に放置すると速やかに消失するのに対し, 低温に保存することにより, 長期間細胞内に維持されることが明らかとなった。したがって, 発育適温ではその耐熱因子は速やかに分解するものと推測できた⁷⁶。

一方, 抗生物質 (クロラムフェニコール) によって非致死性のショックを与えた際の影響も予備加熱処理と同様に耐熱性を高めることが確かめられた。その結果, 抗生物質を非致死濃度で処理すると, 前述の加熱ショックと同じく, その後の殺菌処理に対する耐熱性を高めることができた。このように, 耐熱性の獲得が, 加熱のみならず, 他のストレスによっても獲得できることが明らかとなった。つまり, *M. lacticum* における予備加熱による耐熱性の獲得は, 他の非致死性の処理によっても, 加熱に対する耐性が獲得され, 共通した機構が働くことが示唆された。このような例は, 他の菌種についてもいくつか報告されている。例えば, Volker ら¹⁷⁰ は食塩によるストレスが耐熱性を高めたと報告している。また, 酸によるストレスによって, 同じようにその後の加熱処理に対し耐性が高められることなど, 穏やかなストレスによる耐熱性の獲得が知られている^{17,37,38,39,45,54}。したがって, この耐熱性を高める因子は, 予備加熱処理のみならず, 他の抗生物質, アルカリ, 重金属, 酸, H₂O₂ によるストレス負荷によっても高められることから, これらには共通の因子が関与していると思われる^{20,52,53,54,55,58}。

食塩の予備処理による耐熱性の獲得は顕著なものではなかった。これは, 食塩の影響が弱かったか, または食塩そのものの浸透圧などの影響が細胞に直接作用し, 細胞に対し致死的な影響を与えたものと推定されるが, 詳細については確認できなかった。

このように, 細菌に対する熱による殺菌効果については, その菌の age, 栄養状態, 加熱媒体の種類など, さらに菌の履歴によって差があること。また, 殺菌処理前に穏やかなストレスが負荷されるような状態におかれると一時的に耐熱性が高まる可能性がある。これらのことから, 食品の殺菌に際しては, 汚染されている菌の種類は勿論, 殺菌処理前に菌の置かれた環境等を加味した上で, 加熱条件を決定することが必要であると思われる。

5. 小 括

細菌細胞に非致死性の処理をすると, その後の加熱殺菌に対して耐熱性を示すことが明らかになっている。ここでは, 元来, 耐熱性を有する *Microbacterium* に対し, この非致死性の前処理が耐熱性にどのように作用するのかを検討した。その結果, *M. lacticum* JCM 1379, R 1118 株を発育最高温度より若干高い 45°C で 30 分間処理すると, その後の致死性の耐熱性が高まった。しかも, その非致死性の前処理は加熱処理のみならず, クロラムフェニコールのような抗生物質や酸処理によっても高められ

た。このことから、耐熱性を高める因子の細胞内誘導は、予備加熱のほか、化学的な非致死処理による誘導とも共通した機構が働いていることが示唆された。また、この耐熱性因子は、菌を低温保存すると比較的長時間維持されるが、発育適温では短時間で細胞から消失した。

第7章 *Microbacterium lacticum* の加熱処理 による細胞損傷とその修復

1. 緒言

Microbacterium 属には、現在4種が位置付けられている⁵⁶⁾。しかし、実際に低温殺菌や高温瞬間殺菌法で残存するものは、*M. lacticum* と *M. laevaniformans* の2種である。これらの *Microbacterium* は耐熱性を示し、牛乳に残存する可能性が高い菌である。しかし、加熱などによる非致死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、増殖遅延や正常な発育が不能となったり、一時的に栄養要求が複雑となることが知られている^{5,18,92,111,129)}。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。したがって、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。

本章で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* に対する加熱処理による非致死細胞損傷の程度とその損傷修復について検討した。

2. 実験材料および方法

1) 供試菌株

供試菌株は、*Microbacterium lacticum* JCM 1379 および生乳から分離した *M. lacticum* R 1118 株の2株である。

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時間前培養したものを、予め110℃、5分間滅菌した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、滅菌バスツールピペットで1 ml のガラスアンプル管に移し、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に完全に浸漬し、所定時間の殺菌処理を行な

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、菌数測定は適宜希釈した液を標準寒天培地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。

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10⁵ ml⁻¹ になるように接種し、その増殖を標準寒天培地による表面塗抹平板法、ならびに APT 液体培地による660 nm の吸光度をバイオフォトレコーダーによって測定した。

また、加熱処理した本菌の増殖に及ぼす食塩の影響については、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10⁵ ml⁻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。

3. 結果

Microbacterium に対する加熱処理による細胞損傷の程度を計測するために、R 1118 と JCM 1379 株を63℃、30分間加熱処理を行なった後に、同じ APT 液体培地に初期菌数が10⁵ ml⁻¹ になるように接種し、32℃における増殖を検討した。その結果をFig. 7-1に示したが、耐熱性の低い JCM 1379 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 R 1118 株は63℃、30分間の加熱により発育が遅延するが、JCM 1379 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 R 1118 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. 7-2に示したように、食塩無添加で非加熱菌体のものは、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 時間となった。また、細胞損傷の受けた R 1118 株は、食塩無添加で、誘導期が 7.5 時間であるのに対し、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ことが確認できた。

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示唆された。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、一般に選択培地の増殖の選択阻害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平板に添加した培地に、スパイラルプレーターにより適宜希釈した菌液を表面塗抹し、塩化リチウム無添加培地における形成集落数と比較し、加熱による障害細胞数を推定した。その結果、Table 7-1 に示したように、JCM 1379 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、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約 2 対数の菌数減少となり、加熱処理によって塩化リチウムに対する感受性が高まった。一方、耐熱性の高い R 1118 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

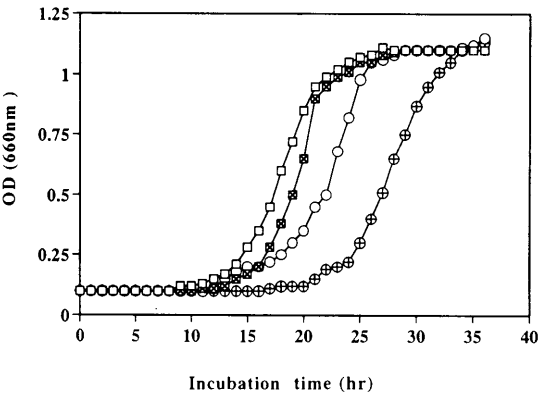


Fig. 7-1. Growth curves of heat-treated *M. lacticum*. Cells at 75°C for 30 min.

—□— : unheated R 1118; —○— : unheated JCM 1379
—⊗— : heated R 1118; —⊕— : heated JCM 1379

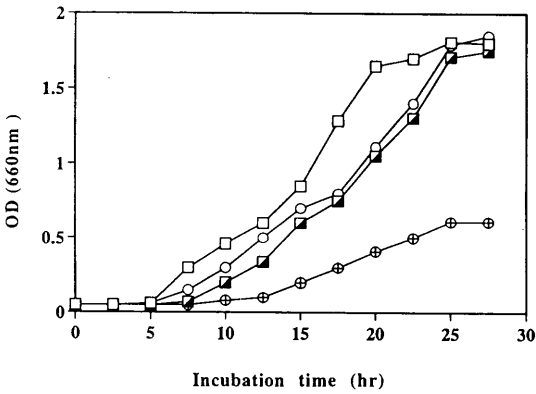


Fig. 7-2. Effect of NaCl and heat-treatment on the growth of *M. lacticum* R 1118.

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

Table 7-1. Effect of lithium chloride in recovery medium on heat resistance of *M.lacticum* R1118.

Strain No.	Treatment	Lithium chloride concentration (%)						
		0	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	2.00
		Log CFU·ml ⁻¹						
JCM 1379	unheated	6.76	6.69	6.70	6.58	5.40	4.80	<1.0
	heated (75°C, 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°C, 20 min.)	6.60	6.59	6.50	6.55	5.28	4.48	<10

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、非致死の加熱により、塩化リチウム存在下で生育が困難になった。

そこで、75°C で加熱処理した R 1118 株の細胞損傷率を知るために、加熱処理した菌数を測定する際に、平板培地に各濃度の塩化リチウムを添加し、その培地に形

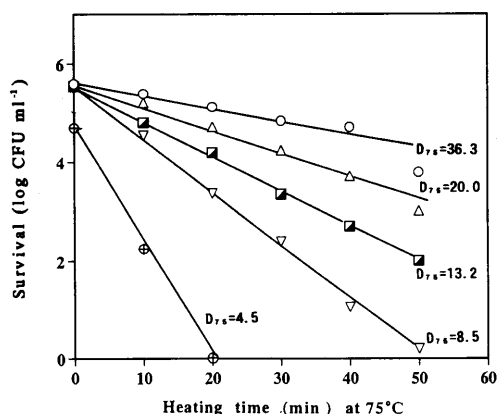


Fig. 7-3. Effect of lithium chloride in recovery medium on the colony count of *M. lacticum* R 1118.

Lithium chloride concentration: —○—, 0%; —△—, 0.5%; —■—, 1.0%; —▽—, 1.5%; —⊕—, 2.0%.

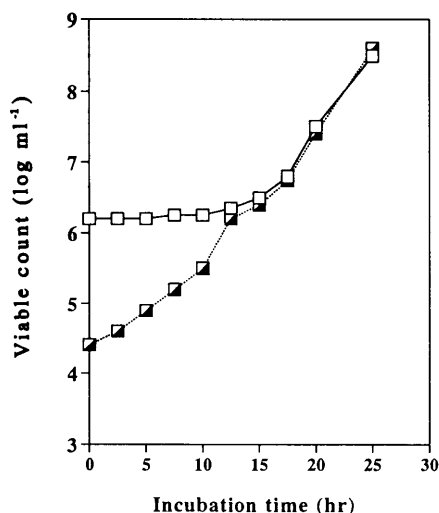


Fig. 7-4. Effect of APT broth on the repair of heat-injured cell of *M. lacticum* R 1118 on SPC agar with or without lithium chloride.

Lithium chloride concentration: —□—, 0%; —■—, 1.5%.

成する集落数を測定した。その結果を Fig. 7-3 に示したが、塩化リチウム無添加の平板上における集落形成数は、75°C で加熱処理した菌であっても減少率が小さかったが、塩化リチウム濃度が高くなるにつれて集落の形成能が低下した。つまり、加熱処理時間が長くなるにつれて、細胞の損傷率が高まることが確認された。

さらに、この加熱損傷の修復が、非選択培地の APT 液体培地でどのように行なわれるかについて、R 1118 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 R 1118 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. 7-4 に示したように、非選択培地の初期菌数は $2.0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ であるのに対し、塩化リチウムを添加した培地では、 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 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% であると推定できた。さらに加熱損傷を受けた細胞は、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の修復が終了したものと確認できた。

4. 考 察

生乳・乳製品の汚染菌は多種にわたるが、無孢子細菌として最も強い耐熱性を有する *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¹⁶²⁾。したがって基本的にはこれらの耐熱性細菌の汚染の防止が重要となる。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とな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^{18, 129)}。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。Mendonca と Knabel⁹⁴⁾ は、低温殺菌乳に汚染する *Listeria* が塩化リチウムを添加した培地で感受性が高まり、発育が制限されたと報告している。今回の実験においても、加熱処理の時間が長くなるにつれて塩化リチウム添加培地上で集落数が減少し、加熱による細胞の損傷率が高まっていることが確認できた。

このように、加熱や凍結処理など非致死の障害を受けた菌体が、一時的に増殖が制限される現象は、Humphrey ら^{54, 55)}、Ray ら¹²⁵⁾ による *Salmonella*, Przybylski と

Witter¹²²⁾, Ray と Speck^{126,127)} による *Escherichia* などの食品汚染細菌で、今井と加藤⁵⁷⁾ による *Lactobacilli* などによく検討されている。また、グラム陽性菌である *Listeria*^{5,18,138,145)} 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類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性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関する情報を収集することが必要と思われる。

5. 小 括

加熱処理など非致死性のストレスをかけた細菌細胞は非致死性の損傷を受けるために、選択培地や集積培地で発育が遅れ、菌数の計測を正確に判断できない問題がある。そこで、ここでは、*Microbacterium* に加熱処理を与えた際の非致死性の損傷の程度と、その損傷の修復について検討した。加熱処理した *Microbacterium* は、塩化リチウムや塩化ナトリウムを添加した標準寒天培地上で発育阻害または発育の遅延が見られた。特に耐熱性の低い菌株では塩化リチウム添加培地での発育阻害が明確に示された。しかし、損傷を受けた菌体を非選択培地で培養するとその損傷を修復し、塩化リチウムに対する感受性も低くなり、塩化リチウム添加培地においても正常な集落を形成することが確認できた。

第8章 *Microbacterium lacticum* の耐熱性及び lactoperoxidase system の影響

1. 緒 言

細菌細胞の耐熱性は、これまでも述べたように、その細胞の増殖期、培養時の培地組成、殺菌時の加熱媒体などによって異なることが明らかである。Ravanis と Lewis¹²⁴⁾ は、生乳の保存期間が殺菌効果ならびにその後の保存性に及ぼす影響について検討し、搾乳直後の生乳を加熱したものより、ある一定期間冷蔵保存された生乳を加熱処理したもので殺菌効果が高められたと報告している。この理由を生乳に含まれる lactoperoxidase system (LP system) によるものであるとしている。

Lactoperoxidase (EC 1. 11. 1. 7) は牛乳 1 L 当たり 30mg 程度含まれ、KSCN のような基質に H_2O_2 から酸素を転移させ、OSCN⁻を生成する触媒作用を持つ酵素である。OSCN⁻は細菌の細胞膜に存在する各種酵素

の SH 基に作用することによって、糖類やアミノ酸類の輸送および核酸物質の代謝を妨害するために正常な増殖を阻害するものである。

生乳の汚染細菌に対する LP system による効果については、これまでも Kamau ら⁶⁴⁾, Gaya ら⁴¹⁾, Zapico ら¹⁸²⁾ による *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* に対する効果、Earnshaw ら²⁸⁾ による *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, Santos ら¹³⁴⁾ による *Aeromonas* などに対する効果についての報告がある。しかし、この LP system が生乳汚染細菌に対して加熱時に如何なる影響があるかについては Zall ら¹⁸¹⁾ の報告などに限られている。そこでこの LP system が無孢子細菌として最も強い耐熱性を持つ *Microbacterium* の殺菌処理の際に如何なる影響を与えるかを検討した。

2. 実験材料および方法

供試菌株は、*Microbacterium lacticum* JCM 1379 (T) と R 1118 を用い、標準斜面寒天培地で十分活性化した菌株を、トリプチケースソイブイオンに 24 時間培養し菌液を調製した。

Lactoperoxidase (SIGMA) は、基本的に 0.8% の塩化ナトリウムを含む 10 mmol l⁻¹ リン酸緩衝液 (pH 7.0) に最終濃度が 0.4 μg ml⁻¹ (ABTS U ml⁻¹) になるように調製し、使用直前に 0.2 μm のメンブランフィルターで無菌濾過した。また、 H_2O_2 と KSCN (和光純薬) は、純水で最終濃度が 2.5mmol l⁻¹ になるように混合し、0.2 μm のメンブランフィルターで無菌濾過した。なお、 H_2O_2 、KSCN 溶液は試験直前に調製した。また試験の内容に応じて、LP、KSCN+ H_2O_2 は各濃度に調製した。LP system の試験は、予め培養した菌液に LP 溶液を 1 ml、 H_2O_2 +KSCN の混合液 1 ml、そして菌液 1 ml を滅菌したトリプチケースソイブイオン 7ml と混合し、その後の菌数を LP 無添加のものと比較した。また、LP 反応が菌体の耐熱性に及ぼす影響については、上記と同様に反応させた菌液を 1 ml のガラスアンプルに封入しウォーターバスで加熱処理した。

3. 結 果

M. lacticum の増殖に対する LP system の影響について Fig. 8-1 に示した。この結果、LP 無添加の菌体については、培養 10 時間後から増殖を開始したのに対し、LP 処理した菌体においては増殖が遅れ、12 時間後から増殖を開始し、LP 添加による増殖は若干遅れが生じた。それに対し LP を添加し 30 分後に 75°C、10 分間の

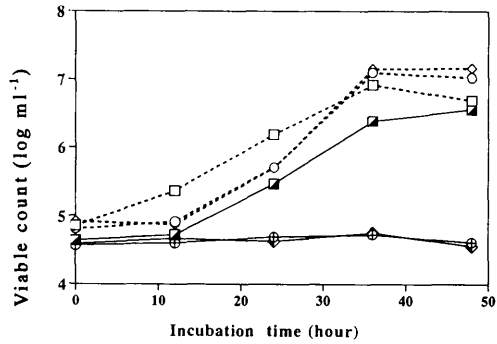


Fig. 8-1. Effect of lactoperoxidase system on the growth of *M. lacticum* JCM 1379 in tryptone soya broth.

- , LP without/unheated ;
- , LP (0.4 μg ml⁻¹)/unheated ;
- ◇, LP (1.0 μg ml⁻¹)/unheated ;
- , Lp without/heated at 75°C for 10 min.
- ⊕, Lp (0.4 μg ml⁻¹)/heated at 75°C for 10 min.
- ◆, Lp (1.0 μg ml⁻¹)/heated at 75°C for 10 min.

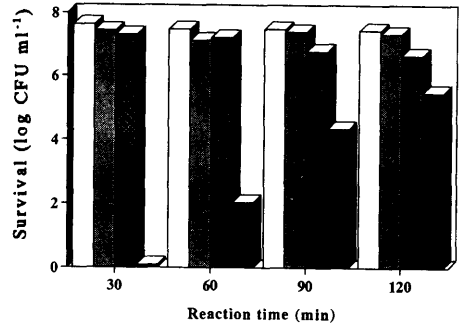


Fig. 8-3. Effect of reaction time with lactoperoxidase system on the thermotolerance of *M. lacticum* R 1118.

- , LP without/unheated ;
- ▨, LP (0.4 μg ml⁻¹)/unheated ;
- ▤, LP without/heated at 75°C for 20 min ;
- , LP (0.4 μg ml⁻¹)/heated at 75°C for 20 min.

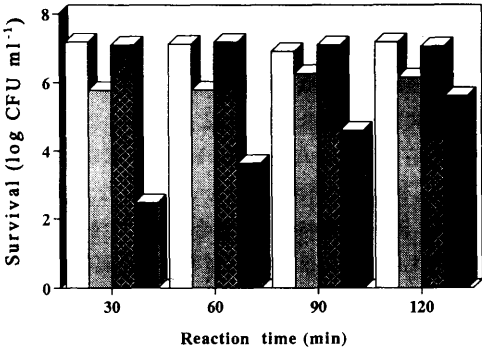


Fig. 8-2. Effect of reaction time with lactoperoxidase system on the thermotolerance of *M. lacticum* JCM 1379.

- , LP without/unheated ;
- ▨, LP (0.4 μg ml⁻¹)/unheated ;
- ▤, LP without/heated at 75°C for 10 min ;
- , LP (0.4 μg ml⁻¹)/heated at 75°C for 10 min.

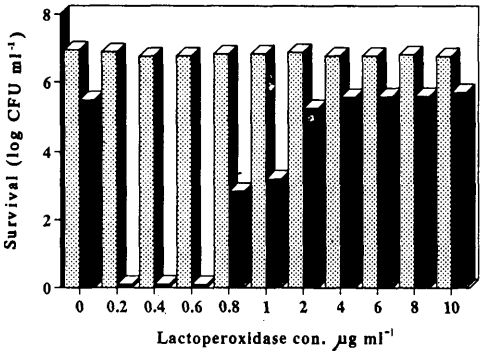


Fig. 8-4. Effect of lactoperoxidase concentration on the thermotolerance of *M. lacticum* JCM 1379.

- ▤, unheated
- , heated at 75°C for 20 min.

加熱した菌体では、48 時間まで全く増殖は認められなかったことから、LP system と加熱処理による相乗効果が認められた。

次に、LP system において、菌液に添加する LP と H₂O₂+KSCN の反応時間がその後の加熱処理による殺菌作用に及ぼす影響について検討した。その結果、Fig. 8-2に示したように、JCM 1379 株においては、反応 30 分間以内で殺菌効果が最も高く、それ以上、反応時間を

延長することによって若干の菌数低下が認められるが、その殺菌効果は期待できなかった。また、Fig. 8-3 には R 1118 株の結果を示したが、30 分間の処理によって、菌数は無添加のものと比較し、7 対数値の低下となった。しかし、反応時間がそれ以上になると、JCM 1379 株と同様にその殺菌効果は低下した。次に、この LP system の反応時における LP 添加量が殺菌効果に及ぼす影響について検討し、結果を Fig. 8-4 に示した。

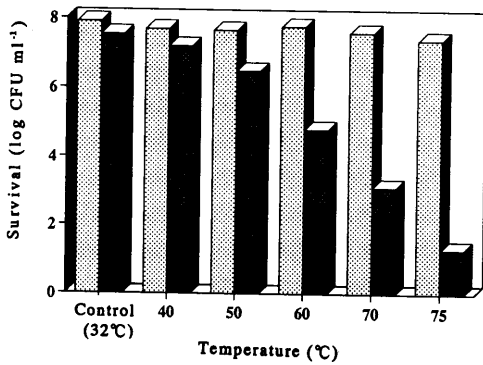


Fig. 8-5. Effect of lactoperoxidase system and heat-treatment on the thermotolerance of *M. lacticum* R 1118.

Lactoperoxidase conc. : □, 0 µg/ml; ■, 0.3 µg/ml.
Heat treatment : for 20 min. at each temperature.

H₂O₂+KSCN 量に対し、LP 添加量が 1 ml 当たり 0.2 ~ 0.6 µg の添加で最も効果的であった。しかし、LP 量がそれ以上高くなるにつれて効果は低下し、2.0 µg ml⁻¹ 以上では殆ど効果は認められなかった。

また、LP system と加熱ストレスの併用が細菌細胞の損傷に及ぼす影響を明らかにする目的で、耐熱性の高い *M. lacticum* R 1118 を用い、LP system と加熱処理を同時に作用させた。LP の添加量は菌液に 0.3 µg ml⁻¹ とし、加熱温度は 40°C から 75°C で各々 20 分間とした。その結果を Fig. 8-5 に示したように、LP 無添加では全く死滅しない 60°C においても LP system 下では、初期菌数を約 3 対数値低下させる効果が認められ LP system と加熱殺菌との相乗効果が確認された。

4. 考 察

LP system による牛乳汚染細菌に対する抗菌作用については、グラム陽性細菌、陰性菌の両方に対して効果が期待できるとされている¹⁷⁵⁾。

今回、*M. lacticum* に対し、APT 液体培地や牛乳における LP system の添加効果を試験したが、若干の効果は認められるが、LP system の持続時間は短時間であり、牛乳中の *M. lacticum* の増殖を長時間抑制することはできなかった。しかし、Fig.8-3, Fig.8-4, Fig. 8-5 に示したように、菌体に LP system を作用させながら加熱処理することによってその殺菌力は効果的に作用した。このことは、LP と H₂O₂ との反応は比較的短

時間で終了するため、LP system が効果的に作用している間に加熱するような条件で致死的な殺菌効果を発揮するものと思われる。また、LP 濃度による効果について検討した結果においても、H₂O₂+KSCN を 0.4 µg ml⁻¹ と一定にし、それに対する LP の濃度の影響を検討したところ、LP が 0.6 µg ml⁻¹ までの濃度で菌数を減少させる効果があった。しかし、それ以上の濃度になると逆に効果は低減することが明らかになった。このことは Fig.8-2, Fig. 8-3 と同様に、LP 濃度が高い場合には H₂O₂ との反応が急速におこり、OSCN の生成量が少なくなるため、結果的に、LP system の効果が低下する可能性があると考えられる。Gaya ら⁴¹⁾, Zapico ら¹⁸²⁾ は冷蔵保存した生乳に KSCN と H₂O₂ を各々 0.25 µg ml⁻¹ になるように添加した場合に生乳中の *L. monocytogenes* の増殖が抑制されたと報告している。また、Zall ら¹⁸¹⁾ はチェダーチーズやカッティジチーズの製造に用いる牛乳の加熱殺菌処理における LP system の効果について報告している。おそらく LP 濃度と SCN+H₂O₂ の比率はこの LP system の効果に重要な役割をはたすものと考えられる。また、牛乳中における H₂O₂ 量と汚染細菌のカタラーゼ活性などにも影響するものと思われる。この LP system による殺菌処理は、比較的低温処理においても効果が期待できることから、加熱殺菌の効率を高める際や、高温殺菌で変性するような物質に対する殺菌にも十分応用が可能であると考えられる。

5. 小 括

Microbacterium lacticum は耐熱性細菌であるが、この細菌の加熱時に lactoperoxidase system (LP system) を併用させた場合の耐熱性に及ぼす影響を検討した。*M. lacticum* は 63°C、30 分間の加熱殺菌では、1 オーダー程度の菌数減少がある。LP system 処理の *M. lacticum* JCM 1379 の増殖は、未処理のものとはほとんど差は認められなかった。*M. lacticum* R 1118 株では加熱時に処理したもので僅かながら抑制した。しかし、低温殺菌処理時に LP system を併用すると殺菌効果が著しく高まった。その処理による効果は、Lactoperoxidase 濃度および H₂O₂, KSCN の濃度割合が重要であり、しかも LP system の効果は短時間の処理で現われることが明らかになった。したがって、LP system の効果は処理時間と殺菌処理のタイミングが重要であることが確かめられた。

第4編 総 括

食品製造加工で広く用いられる殺菌法は、低温殺菌法 (LTLT)、高温殺菌法 (HTST) および超高温殺菌法 (UHT) に大別できる。乳製品の製造でもこれらの殺菌法がよく利用されている。超高温殺菌処理法によると生乳を汚染する大半の菌が殺菌され、無菌状態にすることが可能である。しかし、低温殺菌乳はもちろんチーズ製造においても、通常 63°C、30 分間の低温殺菌法や高温短時間殺菌法が適用される。これは、高温処理による乳成分の変質を防ぐためには必要不可欠な処理法である。そのため、生乳を汚染する幾つかの菌種は、殺菌処理によっても生残し、製品の品質に悪影響を与えるものも少なくない。

本研究は、乳製品の品質維持ならびに衛生学的見地から、生乳の汚染細菌相を生態学的に検討すると同時に、無孢子細菌の中で最も耐熱性が高いとされている *Microbacterium* 属に注目し、本菌の分類学的特性さらに耐熱特性、加熱殺菌処理による細胞損傷と損傷修復について明らかにすることを目的とした。まず、生乳の汚染細菌相の全体像を把握する目的で、北海道の酪農家に付設されているバルククーラに保存された生乳中の汚染細菌相について検討を行なった。バルククーラ保存の生乳は、隔日集乳の 42 時間までは生菌数の増加は認められなかったが、それ以上の保存によって低温細菌数の増加が認められた。これらのことから、酪農家における生乳の保存は 2 日間が限界と思われる。バルククーラ保存乳の総菌数、一般細菌数、耐熱性細菌数は季節的変動も少ないが、大腸菌群数は夏季間に比べ冬季間の生乳に多くなる傾向があった。また、搾乳方式別による菌数の変動は、大腸菌群数とグラム陰性細菌数はパイプライン方式によるもので高かった。

バルククーラ保存生乳における主要な汚染細菌相は、一般細菌の 62% がグラム陽性菌で、その中でも *Micrococcaceae* (21.0%)、コリネ型細菌 (17.2%) が多く分離された。季節別変動としては、*Micrococcaceae* が夏季間に多く、コリネ型細菌は逆に冬季間に多かった。一方、低温細菌については、グラム陰性細菌が全体の 55% を占めたが、グラム陽性の *Micrococcaceae* (23.3%) グラム陰性の *Pseudomonas* (11.1%)、*Flavobacterium* (10.4%) が主なものであった。さらに、細菌の汚染度の少ない生乳には *Micrococcaceae* やコリネ型細菌が多いのに対し、汚染が高くなるに連れて *Pseudomonas*、*Flavobacterium* などのグラム陰性細菌が多くなる傾向にあった。

生乳および市販低温殺菌乳の耐熱性細菌に関する調査では、生乳および市販低温殺菌乳ともにその菌数は概ね $10^2 \sim 10^3 \text{ ml}^{-1}$ 程度であった。耐熱性の細菌相は、*Bacillus* (30~33.5%)、*Microbacterium* (26.9~33.7%)、*Micrococcaceae* (17.4~23.4%) が優勢で、この 3 グループで全体の 80% を占めた。その他 *Streptococci*、*Lactobacilli*、*Actinomycetes* も少数分離された。生乳汚染細菌の低温殺菌法 (63°C、30 分間) と高温短時間殺菌法 (75°C、15 秒間) による殺菌率を検討したところ、低温殺菌法では、平均 98.6%、高温短時間殺菌法で 96.8% であり、両殺菌法に顕著な差は認められなかった。この低温殺菌法による生残菌相のうち、*Bacillus* 属では、*B. licheniformis* (58.4%)、*B. subtilis* (22.0%)、*B. pumilus* (11.5%)、*Microbacterium* 属では、*M. lacticum* (96.8%)、*M. levaniformans* (2.3%) などが主要なものであった。

生乳の耐熱性細菌の優勢菌相である *Microbacterium* 属の耐熱特性について検討した。*Microbacterium* の 4 種の type strain のなかで耐熱性を有する種は、*M. lacticum* と *M. levaniformans* であった。*M. lacticum* JCM 1379 の D 値は、脱脂乳で、 $D_{63}=57.1 \text{ min}$ 、 $D_{75}=5.0 \text{ min}$ 、APT 培地で、 $D_{63}=67.1 \text{ min}$ 、 $D_{75}=9.09 \text{ min}$ であり、APT 培地で高かった。また、生乳より分離した *M. lacticum* R 1118 株の D 値は、脱脂乳で $D_{63}=240 \text{ min}$ 、 $D_{75}=43.4 \text{ min}$ であり耐熱性が高い菌株であった。しかし、耐熱性は菌の培養条件、加熱媒体の種類などによって差が認められた。

細菌細胞に非致死のストレスを負荷すると、その後の致死の加熱処理に対し耐性を示すことが知られている。*M. lacticum* R 1118 は無孢子細菌としては耐熱性の高い菌株であるが、この菌に非致死のストレスを負荷した際、耐熱性がどのような挙動を示すかを検討した。活性の高い *M. lacticum* R 1118 の細胞に対し、発育最高温度より若干高い 45°C で 30 分間の加熱ショックを与えると、その後の耐熱性を高めることが明らかとなった。その耐熱性因子は 5°C の低温保存では長期間細胞内に維持されるが、発育適温の 30°C に放置すると速やかに消失した。また、この耐熱性の獲得は、加熱ショックのみならず、クロラムフェニコールや pH によるショックによっても同様に形成され、その後の殺菌処理に対し耐熱性を高めた。

耐熱性菌であっても、非致死の加熱を受けた菌は細胞に損傷を受けているため、選択培地や集積培地に添加された選択阻害剤や食塩などに対し感受性が高まるのが一

般的である。したがって、細胞損傷の程度を正確に把握することは食品中の微生物汚染を計測するためにも重要である。*M. lacticum* に対する 75°C、20 分間の加熱は、見掛け上、細菌数の減少はほとんど認められないが、塩化リチウム、食塩添加培地で増殖が遅延し、97% 以上の細胞になんらかの損傷が認められた。しかし、損傷菌を APT 液体培地で培養すると徐々に回復し、約 10 時間で完全にその損傷は修復された。

乳製品の一部には、原料の持つ特徴を維持させるためにも殺菌効率の高い高温殺菌を施すことができない製品も多い。そのため比較的低温で殺菌効率を高める方策はときに重要である。そこで lactoperoxidase system (LP system) を *M. lacticum* の加熱処理時に併用した際の相乗効果を検討した。その結果、LP system のみでは、長期間の静菌作用は期待できない。したがって、殺菌乳を長期間保存するような環境では単独で利用するのには難点がある。そこで加熱と LP system の併用効果を試験したところ、LP system の反応初期に加熱と併用することによって殺菌効果が高められた。*M. lacticum* は 75°C、20 分間の加熱で 1 対数程度の菌数減少に止まるが、LP system を併用すると 60°C、20 分間で 3 対数値の菌数を減少させることが可能であった。また、この LP system が十分効率よく作用するには、LP、 H_2O_2 、KSCN の濃度、反応時間などにより影響があることが明らかになった。

乳製品製造の殺菌処理に際し、その細菌の汚染程度や汚染菌相の把握は品質維持や衛生学的見地からも重要である。本論文の生乳における汚染細菌相とくに耐熱性菌相の研究はそのような意味からも重要なものであると考える。食品の安全性を確保するために広く応用されている加熱殺菌は適性な方法である。しかし、加熱殺菌の方法は出来るかぎり低温であることが望ましいのは当然である。そのためにも汚染細菌相に相応した加熱処理を選択することが重要である。また、今回使用した *Microbacterium* は耐熱性の高いものであるが、このような菌であっても加熱ストレスによって損傷を受けており、選択阻害剤の添加されている培地では集落形成能が低下している。したがって、食品を汚染する菌について、加熱ストレスを受けた損傷細菌を検出する際はこの点を十分注意する必要があることが明らかであり、その損傷菌を正確に検出するために、選択培地の開発も併せて進める必要があると考える。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始研究のご指導と励ましを戴きました上に、論文のご校閲を賜りました北海道大学名誉教授、酪農学園大学酪農学部食品科学科教授の高尾彰一先生、また、ご校閲と適切な御教示を賜りました酪農学園大学酪農学部食品科学科教授の斎藤善一先生ならびに酪農学園大学大学院酪農学研究科長鮫島邦彦先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するに際し、酪農学園理事長遊佐孝五先生、酪農学園大学学長平尾和義先生、食品科学科長塩見徳夫先生、元岡山大学(故)中江利孝教授には種々ご教示、ご助言と励ましを頂きました。

また、酪農学園大学名誉教授松井幸夫先生、酪農学科梶崎昇教授、食品科学科安藤功一教授、酪農学部教養科長加藤勲教授、酪農学部長安宅一夫教授には実験遂行にあたり貴重なご助言や実験のご指導を戴き厚くお礼申し上げます。

更に、今回の研究遂行にあたり、快く試料の採取に便宜を図って戴いた北海道生乳検査協会、雪印乳業株式会社、よつ葉乳業株式会社、新札幌乳業株式会社ならびに各農業協同組合(JA)の関係者、更に、施設やバルクラウ等の使用を快諾して戴いた酪農学園大学付属農場ならびに各酪農家の皆様には深謝申し上げます。

最後に、本研究の一部について実験にご協力をお願いした食品科学科応用微生物学研究室の専攻学生諸君に対しても深く感謝するところである。

引用文献

- 1) Andrey, Jr. J., and W. C. Frazier. 1959. Psychrophiles in milk held two days in farm bulk cooling tanks. *J. Dairy Sci.*, **42**:1781-1784.
- 2) Ang, d., G. N. Ghandraseker, M. Zylcz, and L. Georgopoulos. 1986. *Escherichia coli* grpE gene codes for heat shock protein B25. 3, essential for both σ DNA replication at all temperatures and host growth at high temperature. *J. Bacteriol.*, **167**: 25-29.
- 3) 荒井威吉, 大槻昌夫, 中西武雄. 1975. 原料乳の集乳経路における細菌汚染について. *酪農科学・食品の研究*, **24**: 141-144.
- 4) Auffray, Y., X. Gansel, B. Thammavongs, and P. Boutibounes. 1992. Heat shock-induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp.

- lactis*. Current Microbiol., **24** : 281-284.
- 5) Bailey, J.S., D.L. Fletcher, and N.A. Cox. 1990. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., **53** : 473-477.
 - 6) Bhadsavle, C. H., T. E. Shehata, and E. B. Collons. 1972. Isolation and identification of psychrophilic species of *Clostridium* from milk. Appl. Microbiol., **24** : 699-702.
 - 7) Blackburn, P. S. 1968. The cell count of cow's milk and the micro-organisms cultured from the milk. J. Dairy Res., **35** : 59-65.
 - 8) Blankenagel, G. 1982. Relationship between the bacteriological quality of raw milk and that of pasteurized milk and cream. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, **34** : 158-162.
 - 9) Bockelmann, I. V. 1966. Gesamtkeimzahl und psychrophile Bakterien in tiefgekuhlter Milch. Milchwissenschaft, **21** : 275-278.
 - 10) Bouman, S., D. B. Lund, F. M. Driessen, and D. G. Schmidt. 1982. Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating time. J. Food Prot., **45** : 806-812.
 - 11) Bousfield, I. J. 1972. A taxonomic study of some coryneform bacteria. J. Gen. Microbiol., **71** : 441-455.
 - 12) Bousfield, I. J., and A. G. Calley. 1978. Coryneform Bacteria. pp. 1-160, Academic Press. London.
 - 13) Bramley, A. J., and C. H. McKinnon. 1990. Microbiology of raw milk. In : Dairy Microbiology (Robinson RK ed.) Vol. 1. 163-208. Elsevier. London.
 - 14) Breed, R. S., E. G. D. Murray, and A. P. Hitches, 1948. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Sixth ed.). The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
 - 15) Breed, R. S., E. G. D. Murray, and N. R. Smith. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Seventh ed.). The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
 - 16) Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Eighth ed.). Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA.
 - 17) Bunning, V. K., R. G. Crawford, J. T. Tierney, and J. T. Peeler. 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. Appl. Environ. Microbiol., **56** : 3216-3219.
 - 18) Busch, S. V., and C. W. Donnelly. 1992. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Appl. Environ. Microbiol., **58** : 14-20.
 - 19) Collins-Tompson, D. L., Tsørhaug, L. D. Witter, and Z. J. Ordal. 1972. Taxonomic consideration of *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium flavum*, and *Microbacterium thermosphactum*. Int. J. Systematic Bacteriol., **22** : 65-72.
 - 20) Condon, S., P. Lopez, R. Oria, and F. J. Sala. 1989. Thermal death determination: Design and evaluation of a thermoresistometer. J. Food Sci., **54** : 451-457.
 - 21) Cousin, M. A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products : A review. J. Food Prot., **45** : 172-207.
 - 22) Credit, C., R. Hedeman, P. Heywood, and D. Westhoff. 1972. Identification of bacteria isolated from pasteurized milk following refrigerated storage. J. Milk Food Technol., **35** : 708-709.
 - 23) 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.
 - 24) Davis, G. H., and K. G. Newton. 1969. Numerical taxonomy of some named coryneform bacteria. J. Gen. Microbiol., **56** : 195-214.
 - 25) Davies, F. L. 1975. Heat resistance of *Bacillus* species. J. Soc. Dairy Technol., **28** : 69-78.
 - 26) Dempster, J. F. 1968. Distribution of psychro-

- trophic micro-organisms in different dairy environments. Appl. Bacteriol., **31** : 290-301.
- 27) Druce, R. G., and S. B. Thomas. 1972. Bacteriological studies on bulk collection : Pipeline milking plants and bulk milk tanks as sources of bacterial contamination of milk - A review. J. Appl. Bacteriol., **35** : 253-270.
 - 28) Earnshaw, R. G., J. G. Banks, C. Francotte, and D. Defrise. 1990. Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in an infant milk formula by an activated lactoperoxidase system. J. Food Prot., **53** : 170-172.
 - 29) El-Bassiony. 1980. Occurrence of *Clostridium perfringens* in milk and dairy products. J. Food Prot., **43** : 536-537, 542.
 - 30) El-gazzar, F.E., H.F. Bohner, and E.H. Marth. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* at 4, 32, and 40°C in skim milk and in retentate and permeate from ultrafiltered skim milk. J. Food Prot., **54** : 338-342.
 - 31) Erhola, A., P. Mykkanen, and O. Nykanen. 1970. The quality of farm tank milk collected every fourth day. XVIII Int. Dairy Cong. Vol. 1E 504.
 - 32) Feeherry, F. E., D.T. Munsey, and D. B. Rowley. 1987. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. Appl. Environ. Microbiol., **53** : 365-370.
 - 33) Fernandez, P.S., M.J. Ocio, T. Sanchez, and A. Martinez. 1994. Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in acidified mushroom extract. J. Food Prot., **57** : 37-41.
 - 34) Geringer, M., und G. Kieiwein, 1976. Untersuchungen zur einteilung der in Milch vorkommenden Flavobakterien. Archiv. fur Lebensmittelhygiene, **27** : 11-17.
 - 35) Gragerov, A. I., E. S. Martin, M. A. Krupenko, M. V. Kashlev, and V. G. Nikiforov. 1991. Protein aggregation and inclusion body formation in *Escherichia coli* rpoH mutant defective in heat shock protein induction. Feder. Eurp. Biochemi., Soc. **291** : 222-224.
 - 36) Fermanian, C., J. M. Fremy, and M. Claisse. 1994. Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus*. Lett. Appl. microbiol., **19** : 414-418.
 - 37) Foster, J. W. and H. K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella tyhimurium*. J. Bacteriol. **172** : 771-778.
 - 38) Foster, J. W., and H. K. Hall. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol., **173** : 5129-5135.
 - 39) Foster, J. W. 1991. Salmonella acid shock proteins are required for adaptive acid tolerance response. J. Bacteriol., **173** : 6896-6902.
 - 40) Gadzella, T. A., and S. C. Ingham. 1994. Heat shock, Anaerobic jar incubation and fluid tioglycollate medium have contrastioing effects on D-values of *Escherichia coli*. J. Food Prot., **57** : 671-673.
 - 41) Gaya, P., M. Medina, and M. Nunez. 1991. Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. Appl. Environ. Microbiol., **57** : 3355-3360.
 - 42) Gyllenberg, H. G., and E. Eklund. 1966. A taxonomic survey of the psychrophilic bacteria in milk and milk products. Milchwissenschaft, **21** : 261-265.
 - 43) Haggerty, P., and N. N. Potter. 1986. Growth and death of selected microorganisms in ultrafiltered milk. J. Food Prot., **49** : 233-235.
 - 44) Harrington, B. J. 1966. A numerical taxonomical study of some corynebacteria and related organisms. J. Gen. Microbaiol., **45** : 31-40.
 - 45) Hassani, M., D. H. Pincus, G. N. Bennett, and I. V. Hirshfield. 1992. Temperature-dependent induction of acid-inducible stimulation of *Escherichia coli* on broth. J. Appl. Environ. Microbaiol., **58** : 2704-2707.
 - 46) Hayer, P. R. 1977. A taxonomic study of flavobacteria and Gram-negative yellow pigment rods. J. Appl. Bacteriol., **43** : 345-367.
 - 47) 日越博信, 浜田輔一. 1976. 工場持込時生乳における低温細菌群. 食衛誌, **17** : 34-40

- 48) 兵庫 裕, 中西武雄. 1962. わが国における原料牛乳生産の衛生学的研究 II. 工場受入時の原料牛乳の細菌汚染について. 酪農科学の研究, **11** : 155-176.
- 49) Holt J.G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual Determinative Bacteriol., 9th ed. pp 571-596. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- 50) 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.
- 51) Humphrey, T. J. 1990. Heat resistance in *Salmonella enteritidis* phage type A : the influence of storage temperature before heating. Appl. Bacteriol., **69** : 493-497.
- 52) Humphrey, T. J., N. P. Richardson, A. H. L. Gawler, and M.J. Allen. 1991. Heat resistance of *Salmonella enteritidis* PT4 : the influence of prior exposure to alkaline conditions. Lett. Appl. Microbiol., **12** : 258-260.
- 53) Humphrey, T. J., M. Wallis, M. Hoad, N. P. Richardson, and R. J. Rowbury. 1993. Factors influencing alkali-induced heat resistance in *Salmonella enteritidis* phage type 4. Lett. Appl. Microbiol., **16** : 147-149.
- 54) 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. Lett. Appl. Microbiol., **16** : 228-230.
- 55) 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. Environ. Microbiol., **59** : 3120-3122.
- 56) Imai, K., M. Takeuchi, and I. Banno. 1984. Reclassification of "*Flavobacterium arbore-scens*" (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.
- 57) 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.
- 58) Jenkins, D.E., J.S. Schultz, and A. Martin. 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **170** : 3910-3914.
- 59) Johns, C.K., and G.B. Landerkin. 1969. Effects of preliminary incubation on the bacterial flora of bulk tank milks produced in three different Canadian milk sheds. J. Dairy Sci., **52** : 1935-1940.
- 60) Johnston, D. W., and J. Bruce. 1982. Incidence of thermotolerant psychrotrophs in milk produced in the west of Scotland. J. Appl. Bacteriol. **52** : 333-337.
- 61) Johnson, O., G.N. Chandrasekhar, and C. Georgopoulos. *Escherichia coli* DnaK and GrpE heat shock proteins interact both in vivo and in vitro, J. Bacteriol., **171** : 1590-1596.
- 62) Jones, D. 1975. A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. J. Gen. Microbiol., **87** : 52-96.
- 63) Jones, D. and M.D. Collins. 1986. Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. ed.) Vol.2. 1261-1434. Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA.
- 64) Kamau, D.N., S. Doores, and K.M. Pruitt. 1990. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. J. Food Prot., **53** : 1010-1014.
- 65) Kander, O. 1966. Zur Definition der "psychrophilen" Bakterien. Milchwissenschaft, **21** : 257-261.
- 66) Kanemori, M., H. Mori, and T. Yura. 1994. Induction of heat shock proteins by abnormal protein results from stabilization and not increased synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **176** : 5648-5653.
- 67) Katsui, N., T. Tsuchido, M. Takano, and I. Shibasaki. 1982. Viability of heat-stressed cells

- of micro-organisms as influenced by pre-incubation and post-incubation temperatures. J. Appl. Bacteriol., **53** : 103-108.
- 68) Katsui, N., T. Tsuchido, M. Takano, and I. Shibasaki. 1981. Effect of pre-incubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid composition. J. Gen Microbiol., **122** : 357-361.
- 69) Keddie, R.M., and G.L. Cure. 1977. The cell wall composition and distribution of free mycolic acid in named streins of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. J. Appl. Bacteriol., **42** : 229-252.
- 70) Kielwein, G., und M. Geringer. 1977. Die milchheyygienische Bedeutung von Flavobakterien. Archiv. fur Lebensmittelhygiene, **26** : 221-225.
- 71) 菊地政則, 松井幸夫. 1974. バルククーラ貯蔵生乳の細菌叢推移および菌叢に関する研究. 日畜会報, **45** : 592-596.
- 72) 菊地政則, 松井幸夫. 1976. バルククーラ貯蔵生乳の細菌学的品質に関する研究. 1. 細菌数の季節的変動. 酪農科学・食品の研究, **25** : 119-124.
- 73) 菊地政則, 松井幸夫. 1976. バルククーラ貯蔵生乳の細菌学的品質に関する研究. 2. 細菌叢の季節的変動. 酪農科学・食品の研究, **25** : 125-131.
- 74) 菊地政則, 川村俊子, 松井幸夫. 1979. 冷蔵保存生乳より分離された *Flavobacterium* 属の性状. 酪農学園大学紀要, **8** : 31-42.
- 75) Kikuchi, M., Y. Matsumoto, X.M. Sun, and S. Takao. 1996. Incidence and significance of thermophilic bacteria in farm milk supplies and commercially pasteuried milk. Anima. Sci.Technol., **67** : 265-272.
- 76) 菊地政則, 松本幸子, 梅沢ありさ, 高尾彰一. 1996. 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. 酪農学園大学紀要, **20** : 151-158.
- 77) 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.
- 78) Kleter, G. 1974. The bacterial flora in asptically drawn milk. Neth. Milk. Dairy J., **28** : 220-237.
- 79) Kornacki, J.L., and E.H. Marth. 1992. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium* in retentates from ultra filtered milk. Milchwissenschaft, **47** : 764-769.
- 80) Kornacki, J.L., and E.H. Marth. 1992. Thermal inactivation of *Staphylococcus aureus* in retentates from ultrafiltered milk. J. Food Prot., **52** : 631-637.
- 81) Lehmann, F., P. S. Russell, L. S. Solomon, and K.D. Murphy. 1992. Bacterial growth during continuous milk pasteurization. Australian J. Dairy Technol., **47** : 28-32.
- 82) Lehmann, F. 1992. Thermophilic bacteria in continuous cheese making. Australian J. Dairy Technol., **47** : 94-96.
- 83) Lewis, S.J., and A. Gilmour. 1987. Microflora associated with the internal surfaces of rubber and stainless steel milk transfer pipeline. J. Appl. Bacteriol., **62** : 327-333.
- 84) Logan, N. A. 1988. *Bacillus* species of medical and viterinary importance. J. Medical Microbiol., **25** : 157-165.
- 85) Luck, H. 1972. Bacteriological quality tests for bulk-cooled milk. Dairy Sci. Abst., **34** : 101-122.
- 86) Mackenzie, E. 1973. Thermophilic and psychrotrophic organisms on poorly cleansed milking plants and bulk milk tanks. J. Appl. Bacteriol., **36** : 457-463.
- 87) Mackey, B. M. and C. M. Derrick. 1986. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. J. Appl. Bacteriol., **61** : 389-393.
- 88) Mackey, B. M., and C. M. Derrick. 1987. Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at rising temperatures. Lett. Appl. Microbiol., **4** : 13-16.
- 89) Mackey, B. M. and C. Derrick, 1990. Heat shock protein and thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. J. Appl. Bacteriol., **69** : 373-383.
- 90) Magnus, C. A., A. R. McCurdy, and W. M. Ingledew. 1988. Evaluation of four media for

- recovery of heat-stressed streptococci. J. Food Prot., **51** : 895-897.
- 91) Magnus, C. A., A. R. McCurdy, and W. M. Ingledew. 1988. Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. Can. Inst. Food Technol., **21** : 209-212.
 - 92) 松本昌雄, 神保勝彦, 村上 一, 春田三佐夫. 1976. 乳・乳製品の損傷大腸菌群の検出法. 食衛誌, **17** : 85-88.
 - 93) Mckinnon, C.H., and G.L. Pettiper. 1983. A survey of sources of heat resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. J. Dairy Res., **50** : 163-170.
 - 94) Mendonca, A. F., and S. J. Knabel. 1994. A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk contaminating background microflora. Appl. Environ. Microbiol., **60** : 4001-4008.
 - 95) Michiels, J., C. Verreth, and J. vanderleyden. 1994. Effects of temperature stress on bean-nodulating Rhizobium stress. Appl. Environ. Microbiol., **60** : 1206-1212.
 - 96) 三河勝彦. 1987. 生乳および殺菌乳の低温細菌叢. 酪農科学・食品の研究, **36** : 197-201.
 - 97) 三河勝彦. 1987. 生乳ならびに殺菌乳由来の低温細菌の耐熱性. 酪農科学・食品の研究, **36** : 203-208.
 - 98) Milliere J.B., M.S. Ben Rachid, and A. Chadli. 1973. Bacteries psychrotrophes du lait cru. Archiv. de l'Institut Pasteur de Tunis, **50**: 189-209.
 - 99) Milliere, J. B., and L. Veillet-Poncet. 1973. Determination de la flore bacterienne caseolytique psychrotrophe des laits crus refrigeres. Le Lait, **59** : 56-78.
 - 100) Minor, T. E., and E. M. Marth. 1972. Loss of viability by *Staphylococcus aureus* in acidified media. II. Interraction by acids in combination with sodium chloride, freezing, and heat. J. Milk Food Tech., **35** : 548-555.
 - 101) Mitruka, B.M., and M.J. Bonner. 1976. Methods of Detection and Identification of Bacteria. CRC Press Inc., USA.
 - 102) Miyake, T., S. Araki, and T. Tsuchido. 1993. Synthesis and sedimentation of a subset of 15-kDa heat shock protein in *Escherichia coli* cells recovering from sublethal heat stress. Biosci. Biotech. Biochem., **57** : 578-583.
 - 103) 宮沢文雄, 野附 巖, 中野龍雄. 1965. 機械搾乳に関する衛生学研究. 食衛誌, **6** : 242-248.
 - 104) Morse, P. M., H. Jackson, C. H. Mcnaughton, A. G. Leggatt, G. B. Landerkin, and C. K. Johns. 1968. Investigation of factors contribution to the bacterial count of bulk tank milk. II. Bacteria in milk from individual cows. J. Dairy Sci., **51** : 1188-1191.
 - 105) Morse, P. M., H. Jackson, C. H. Mcnaughton, A. G. Leggatt, G. B. Landerkin, and C. K. Johns. 1968. Investigation of factors contribution to the bacterial count of bulk tank milk. III. Increase in count, from cow to bulk tank, and effects of refrigerated storage and preliminary incubation. J. Dairy Sci., **51** : 1192-1206.
 - 106) Murano E. A., and M. D. Pierson. 1992. Effect of heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Escherichia coli* 0157 : H7. J. Food Prot., **55** : 171-175.
 - 107) 中西武雄, 兵庫 裕. 1962. わが国における原料牛乳生産の衛生学的研究
I. 原料牛乳生産時に生じる細菌汚染について. 酪農科学の研究, **11** : 40-53.
 - 108) Nigel, G. A., and J. G. Holt. 1965. Numerical taxonomy of certain coryneform bacteria. J. Bacteriol., **90** : 921-927.
 - 109) 日本国際酪農連盟 (訳). 1980. 国際連合 FAO/WHO 乳及び乳製品基本法並びに関連規格・検査法. (社)日本国際酪農連盟, 東京.
 - 110) 小川益男, 高橋 久, 田中 博, 佐藤平吉, 木下 巖, 近藤 貢, 竹村和男, 久井伸次, 中野龍雄. 1967. 原料乳の低温菌汚染とその乳質におよぼす影響について. 酪農科学・食品の研究, **16** : 168-176.
 - 111) O'Neill, C.E., and G.K. Bissonnette. 1991. Antecedent oxygen growth conditions and recovery of heat-stressed *Escherichia coli*. J.

- Food Prot., **54** : 90-93
- 112) Orla-Jensen, S. 1919. The Lactic acid Bacteria, Andr. Fred Host & Son, Copenhagen. Cited in: Thomas S.B., and B.F. Thomas 1978. The bacterial content of milking machines and pipeline milking plants. Part 5. Thermotolerant organisms. Dairy Ind. Int., **43** : 17-21, 25. 1978.
 - 113) Orr, M. J., G. M. Mowat, and S. Baines. 1968. Pipeline circulation cleaning on the dairy farm. Milk Industry, 18-28.
 - 114) Payne, J. J., T. Gooch, and E. M. Barnes. 1979. Heat-resistant bacteria in pasteurized whole egg. J. Appl. Bacteriol., **46** : 601-813.
 - 115) Pelczar, Jr. M. J. 1957. Manual of Microbiological methods. McGraw-Hill Book Company, New York, USA.
 - 116) Phillips, J. D., and M. W. Griffiths. 1986. Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. pasteurized dairy products. J. Appl. Bacteriol., **61** : 275-285.
 - 117) Phillip, B., and H. Sucker. 1988. Heat sterilization of bioindicators in propylene glycol and propylene glycol water-mixtures. Pharm. Ind., **50** : 360-363.
 - 118) Phillip, B., and H. Sucker. 1988. Non-logarithmic survival curves, D- and Z-values of bioindicators in propylene glycol and propylene glycol water-mixtures. Pharm Research, **7** : 1273-1277.
 - 119) Phillip, B., and H. Sucker. 1989. Factors influencing the heat resistance of bioindicators in water, propylene glycol and propylene glycol water-mixtures. Pharm. Ind. **51** : 85-88.
 - 120) Phillip, B., and H. Sucker. 1990. Heat sterilization of bioindicators propylene glycol and propylene glycol-water mixtures : Arrhenius equation, thermodynamic data, and Z values. Pharm. Research. **12** : 1273-1277.
 - 121) Phillip, B., and H. Sucker. 1992. Repair and calcium dipicolinate release of bioindicators in propylene glycol and propylene glycol-water mixtures. J. Appl. Bacteriol., **72** : 154-159.
 - 122) Przybylski, K.S., and L.D. Witter. 1979. Injury and recovery *Escherichia coli* after sublethal acidification. Appl. Environ. Microbiol., **37** : 261-265.
 - 123) Rangasamy, P. N., M. Lyer, and H. Roginski. 1993. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. Aust. J. Dairy Tech., **48** : 93-95.
 - 124) Ravanis S, and M. J. Lewis. 1995. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. Lett. Appl. Microbi **20** : 164-167.
 - 125) 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.
 - 126) 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.
 - 127) Ray, B., and M. L. Speck. 1972. Metabolic process during the repair of free-injury in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol., **24** : 585-590.
 - 128) Ray, B. 1979. Methods to detect stressed microorganisms. J. Food Prot., **42** : 346-355.
 - 129) Ray, B. 1986. Impact of bacterial injury and repair in food microbiology : Its past, present and future. J. Food Prot., **49** : 651-655.
 - 130) Reddy, Y. K., R. R. R. K. Reddy, B.T. Jairam, S. Krishnaswamy, and D. Venkayya. 1984. Studies on heat resistant staphylococci in milk. Indian J. Dairy Sci., **37** : 217-219.
 - 131) Robinson, K., 1966. Some observations on the taxonomy of the genus *Microbacterium*. Cultural and physiological reactions and heat resistance. J. Appl. Bacteriol., **29** : 607-615.
 - 132) 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 Prot., **56** : 165-168.
 - 133) Russo, P., N. Kalkkinen, H. Sareneva, J. Paakkola, and M. Makarow. A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. Proc. Natl. Acad.

- Sci., **89** : 3671-3675.
- 134) Santos, J. A., C. Gonzalez, M. Garcia-Lopez, M. Garcia-Fernandez, and A. Otero. 1994. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* in broth, skim milk and ewes' milk. Lett. Appl. Microbiol., **19** : 161-164.
 - 135) 佐々木林治郎, 中江利孝, 1959. 日本の牛乳における乳酸菌の分布およびその性質に関する研究. IV. 日本全国の牛乳の細菌について. 日畜会報, 30. 11-15.
 - 136) 笹野 貢, 岡田迪徳, 長南隆夫・大浦義教. 1977. 冷蔵保存乳より分離した低温細菌の乳蛋白質分解作用. 日畜会報, **48** : 403-409.
 - 137) Scheusner, D.L., F.F. Busta, and M.L. Speck. 1971. Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents. Appl. Microbiol., **21** : 46-49.
 - 138) 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 Prot., **54** : 334-337.
 - 139) Seaton, B. L., and L. E. Vickery. 1994. A gene encoding a DnaK/hsp 70 homolog in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. (Biochemistry), **91** : 2066-2070.
 - 140) Seiler, H., S. Stor, and M. Busse. 1984. Identification of coryneform bacteria isolated from milk immediately after heating and following refrigerated storage. Milchwissenschaft, **39** : 346-348.
 - 141) Shehata, T.E., and E.B. Collins. 1971. Isolation and identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk. Appl. Microbiol., **21** : 466-469.
 - 142) 清水苗一. 1977. 生乳の長距離輸送と品質保持. 酪農科学・食品の研究, **26** : 221-227.
 - 143) Society of American Bacteriologist. 1957. Manual of Microbiological Methods, McGraw-Hill Book Company, New York.
 - 144) Sorqvist, S. 1993. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* by two recovery media used with and without cold preincubation. J. Appl. Bacteriol., **74** : 428-432.
 - 145) Sorqvist, S. 1994. Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol., **76** : 383-388.
 - 146) 鈴木健一郎. ペプチドグリカン. P.74-85. 日本細菌学会教育委員会, 新しい分類学に伴走する細菌同定法, 菜根出版, 東京.
 - 147) Suzuki, K., T. Kaneko, and K. Komagata. 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. Int. J. Systematic Bacteriol., **31** : 131-138.
 - 148) Tanaka, N. 1982. Challenge of pasteurized process cheese spreads with *Clostridium botulinum* using in-process and post-process inoculation. J. Food Prot., **45** : 1044-1050.
 - 149) Tanaka, N., E. Traisman, P. Plantinga, L. Finn, W. Flom, L. Meske, and J. Guggisberg. 1986. Evaluation of factors involved in antibotulinal properties of pasteurized process cheese spreads. J. Food Prot., **49** : 526-531.
 - 150) Teixeira, P., H. Castro, and R. Kirby. 1994. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. Lett. Appl. Microbiol., **18** : 218-221.
 - 151) Tekinson, O. C., and Rothwell J. 1974. A study of the effect of storage at 5 on the microbial flora of heat-treated market cream. J. Soc. Dairy Technol., **27** : 57-62.
 - 152) Thomas, S. B., 1958. Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. Part 1. Dairy Sci. Abst., **20** : 355-370.
 - 153) Thomas, S. B., 1958. Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. Part 2. Dairy Sci. Abst., **20** : 448-467.
 - 154) Thomas, S.B., J.M. Griffiths, and J.B. Foulkes. 1961. The psychrophilic colony count of milk. Dairy Engineering, **78** : 49-51.
 - 155) Thomas, S. E. 1966. Sources, Incidence and significans of psychrotrophic bacteria in milk. Milchwissenschaft, **21** : 270-275.
 - 156) Thomas, S. B., and R. G. Druce, G. J. Peters, and D. G. Griffiths. 1967. Incidence and significance of thermotolerant bacteria in farm supplies : A reappraisal and review. J. Appl. Bacteriol., **30** : 265-298.

- 157) Thomas, S. B., and B. F. Thomas. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. Part I. Dairy Ind., **38**: 11-15.
- 158) Thomas, S. B., B. F. Thomas. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. Part II. Dairy Ind., **38**: 61-64, 66, 68, 70.
- 159) Thomas, S. B. 1974. The microflora of bulk collected milk. Part 1. Dairy Ind., **38**: 237-240.
- 160) Thomas, S. B. 1974. The microflora of bulk collected milk. part 2. Dairy Ind., **38**: 279-282.
- 161) Thomas, S. B. and B.F. Thomas. 1975. The bacteriological grading of bulk collected milk. Dairy Ind., **39**: 478-480.
- 162) Thomas, S. B. and B. F. Thomas. 1978. The bacterial content of milking machines and pipeline milking plants. Part 5. Thermophilic organisms. Dairy Ind., **43**: 17-25.
- 163) Tsuchido, T., N. Katsui, A. Takeuchi, M. Takano, and I. Shibasaki. 1985. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. Appl. Environ. Microbiol., **50**: 298-303.
- 164) Tsuchido, T., and M. Takano. 1988. Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. Antimicrob. Agents chemother. **32**: 1680-1683.
- 165) Twomey, A., and W. E. Crawley. 1968. The microflora of raw milk. N.Z.J. Dairy Tech., **3**: 44-48.
- 166) Twomey, A., and W. E. Crawley. 1968. The microflora of raw milk in relation to quality testing. N.Z.J. Dairy Tech., **3**: 120-122.
- 167) Uchida, K., and K. Aida. 1977. Acyl type of bacterial cell wall: Its simple identification by colorimetric method. J. Gen. Appl. Microbiol., **23**: 249-260.
- 168) Uchida, K., and K. Aida. 1979. Taxonomic significance of cell-wall acyl type in *Corynebacterium* - *Mycobacterium* - *Nocardia* group by a glycolate test. J. Gen. Appl. Microbiol., **25**: 169-183.
- 169) Ueguchi, C., M. Kakeda, H. Yamada, and T. Mizuno. 1994. An analogue of the *DnaJ* molecular chaperone in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 1054-1058.
- 170) Volker, U., H. Mach, R. S. Schmid, and M. Hecker. 1992. Stress protein and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol., **138**: 2125-2135.
- 171) Wagenaar, R.O., and G.H. Dack. 1958. Factors influencing growth and toxin production in cheese inoculated with spore of *Clostridium botulinum* type A and B. studies with surface ripened cheese type. J. Dairy Sci., **41**: 1182-1190.
- 172) Washam, C. J., H. C. Olson, and E. R. Vedamuth. 1977. Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. J. Food Prot., **40**: 101-108.
- 173) Whitaker, R. D., and C. A. Batt. 1991. Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 1408-1412.
- 174) Witter, L. D. 1961. Psychrophilic bacteria. A review. J. Dairy Sci., **44**: 983-1015.
- 175) Wolfson, L. M., and S. S. Sumner. 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review. J. Food Prot., **56**: 887-892.
- 176) Yamada, K., and K. Komagata. 1970. Taxonomic studies on coryneform bacteria. III. DNA base composition of coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol., **16**: 215-224.
- 177) Yamamori, T., K. Ito, Y. Nakamura, and T. Yura. 1978. Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. J. Bacteriol., **134**: 1133-1140.
- 178) 山本藤五郎, 浜田 寛, 志賀勝治, 吉野正純, 小石川常吉, 石井徳蔵. 1969. バルクミルク・クーラーによる生乳の冷蔵試験. 畜産試験場研究報告, **20**: 13-23.
- 179) 柳谷孝幸, 三上正幸, 三浦弘之. 低温細菌による牛乳タンパク質の変化. 1973. 農化誌, **47**: 259-266.

- 180) 矢野信礼, 森地敏樹, 見坊 寛. 1974. 冷蔵生乳における低温細菌の増殖. 畜産試験場研究報告, 28 : 41-45.
- 181) Zall, R. R., J. H. Chen, and D. J. Dzurec. 1983. Effect of thiocyanate-lactoperoxidase-hydrogen peroxide system and farm heat treatment on the manufacturing of Cottage cheese and Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 38 : 203-206.
- 182) Zapico, P., P. Gaya, M. Nunez, and M. Medina. 1993. Goat's milk lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection*. 56 : 988-990.

Summary

Although there have been many bacteriological studies of bulk-cooled raw milk and milk products in Europe and U.S.A., there have been few such studies carried out in Japan. Raw milk quality is an important factor in the production of high-quality milk and other milk products for the market, and is especially important in the manufacturing process of dairy food products.

The aim of the present study was to investigate bacteria flora in fresh raw milk and commercial pasteurized milk, and to compare the different types of thermophilic bacteria, for the purpose of ensuring product safety in the manufacturing process of pasteurized milk and other milk products.

Experiments were designed to investigate the number of bacteria and changes in bacterial flora in farm bulk-cooled raw milk and commercial pasteurized milk, for the purpose of obtaining basic data necessary to improve the quality of milk products. The raw milk samples used in this study were all produced in dairy farms in Hokkaido, and all the samples were a mixture of four milkings which had been stored in bulk milk tanks at 3-5°C. Under these conditions, there was no rapid change in the number of standard plate count bacteria and psychrotrophic bacteria during the 42 hours of storage. The standard plate count (SPC) of bulk-cooled milk incubated at 30 was $2.4 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in milk obtained from the bucket milking system and $3.6 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in milk obtained from the pipeline milking system. Psychrotrophic bacterial counts in raw milk incubated at 7 were less for milk samples obtained in winter than for samples obtained in summer. Coliform- and thermophilic-colony counts were higher in milk samples obtained from bucket milking than in samples obtained from the pipeline system.

The predominant bacterial groups in the standard plate counts of milk samples incubated at 30°C for 3 days were *Micrococcaceae* (26.5 %), coryneform bacteria (17.2%), and other Gram-negative rods (21.0 %). *Micrococcaceae* colony counts in milk incubated at 30°C for 3 days accounted for 28.9% of the total SPC in milk samples obtained in summer, compared with 18.9% of the total SPC for milk samples obtained in winter. The proportion of coryneform bacteria in milk produced in summer (26.5%) was more than that in winter milk (14.2%). On the other hand, the predominant groups of psychrotrophic bacterial flora in milk incubated at 7°C for 10 days were *Micrococcaceae* (23.3%), *Pseudomonas* (11.1%), *Flavobacterium* (10.4%) and other Gram-negative rods (30.9%).

It was found that the proportion of *Micrococcaceae* and coryneform bacteria was 64.4% in raw milk with low standard plate counts ($<10^4 \text{ ml}^{-1}$), and this proportion was larger than those of the other groups. A decreasing tendency was seen in the number of *Micrococcaceae*, and an increasing tendency was seen in the Gram-negative rods in raw milk with high standard plate counts ($>5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$).

The thermophilic bacteria commonly found in raw milk and commercial pasteurized milk are limited to a few species of four groups: Streptococci, Micrococci, coryneform bacteria and aerobic spore-forming rods. *Microbacterium* are often predominant in the microflora of commercial pasteurized milk. In the present study, thermophilic bacterial flora in fresh raw milk and commercial pasteurized milk were investigated. The

raw milk samples used on this study were all produced in dairy farms in Hokkaido. The commercial pasteurized milk was purchased 2 days after production, and analysis of bacteria flora was immediately carried out using the pour plate and spiral plating methods. The distribution of thermophilic bacterial counts in raw milk were mainly around 10^2ml^{-1} , with a few counts being over 10^3ml^{-1} . *Bacillus* (30.7, 33.4%), *Microbacterium* (28.0%) and *Micrococcaceae* (17.4, 23.4%) were the predominant groups in the thermophilic bacteria isolated from raw milk and commercial pasteurized milk respectively. A small number of coryneform bacteria, Streptococci, Lactobacilli and Actinomycetes were also isolated.

Investigation of contamination in the milking equipment showed that the SPC was highest ($10^2 \sim 2 \times 10^6 \text{ml}^{-1}$) in one part of the milk claw. The degree of bacterial contamination was thought to be affected by the extent of cleaning and sanitization of milking equipment.

The presence of *Microbacterium* and spore-forming bacteria in both raw and processed milk has been well documented, and there have been many studies on the presence and significance of thermophilic bacteria in milk. Investigation has been carried out on the morphological, physiological and biochemical characteristics of 322 *Bacillus* and 220 *Microbacterium* isolated from raw and commercial pasteurized milk. It was found that *B. licheniformis* was the most dominant (58.4%) *Bacillus*, followed by *B. subtilis* (11.5%). On the other hand, the most commonly isolated species of *Microbacterium* found in raw milk and pasteurized milk were *M. lactium* (96.8%) and *M. levaniformans* (2.3%).

The heat resistance of microorganisms is known to be affected by conditions such as temperature during growth, composition of the medium and the stage of growth, as well as by environmental conditions during heating such as the composition and pH of the heating medium. One aim of this investigation was to clarify the thermal resistances of *Microbacterium* in dairy products. Two strains of *Microbacterium lacticum* were heat-treated at two temperatures in skim milk by the small ampoule tube method. The D values of *Microbacteria* in skim milk at 63°C and 75°C were $D_{63}=240$ min, and $D_{75}=43.4$ min for *M. lacticum* R 1118 strain, and $D_{63}=57.1$ and $D_{75}=5.0$ min for the *M. lacticum* JCM 1379 strain, respectively. The pH effect was lower with higher treatment temperatures. Acidification reduced the thermal resistance of *M. lacticum*.

Prokaryotic cells respond to environmental or chemical stress by inducing specific sets of proteins characteristic to each stress. The effect of prior heat shock on the thermotolerance of *M. lacticum* in an APT broth culture was investigated. *M. lacticum* were grown at the permissible temperature of 32°C , sublethally heated at 32°C (control), 40°C , 45°C and 50°C for various times, and inactivated at 75°C . The resistance of stationary phase *M. lacticum* R1118 to heating at 75°C was greater in cells grown in the APT broth and skim milk, but in all media, the tested resistance was enhanced by exposing cells to a primary heat shock at 45°C . Heat resistance increased rapidly with increases in temperature, reaching near maximum levels within 30 min. The ability to facilitate repair of heat-injured cells by heating at 75°C for 30 min was investigated with incubation in APT broth at 30°C , and it was found that heat-injured *M. lacticum* R 1118 strain cells were completely repaired in 8 hours.

The lactoperoxidase system (LP system) is an antimicrobial defense system commonly found in fresh mammalian milk, and its function is well understood. This paper describes the effect of an activated LP system catalyzed by an artificially added LP preparation on *M. lacticum* incubated in an APT medium. The activity of an APT medium-LP system on two *M. lacticum* strains at 30 min after the addition of $0.4\text{--}1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ lactoperoxidase, 0.25 mmol sodium thiocyanate and 0.25 mmol hydrogen peroxide was studied. The LP system exhibited a bactericidal activity against *M. lacticum* at 30°C , and the activity was dependent on reaction time, thiocyanate concentration, and the strain of *M. lacticum* tested. The thiocyanate concentration decreased considerably in an activated-LP system APT medium at 30°C during the first 30 min of incubation. Synergistic killing of *M. lacticum* was achieved with combinations of the LP system plus heat treatment.

From the results of these experiments it is concluded that preservation of the quality of refrigerated farm milk may be extended either by heating the milk prior to cooling or by activation of its LP system.