A および B 型ボツリヌス標準菌株の芽胞の耐熱性

(昭和 55 年 4 月 25 日受理)

松田典彦^{*1} 駒木 勝^{*1} 松縄桂子^{*1}

Heat Resistance of Spores of Some *Clostridium botulinum* Type A and B Strains

Norihiko MATSUDA, Masaru KOMAKI and Keiko MATSUNAWA

(Japan Canners Association, Research Laboratory; 460, Kariba-cho,
Hodogaya-ku, Yokohama)

A および B 型ボツリヌス菌 (以下ボ菌と略す) 芽胞は耐熱性が強く、諸外国では、加熱殺菌処理が不足したかん詰食品中に生き残り、食中毒を起こした事例がある。このため、低酸性食品 (pH 4.6 以上) のかん詰では、本菌芽胞の食品中における耐熱性を基礎にして、その加熱殺菌条件を決定する必要がある。

食品中におけるボ菌芽胞の耐熱性測定試験には、耐熱性の強い芽胞を形成する菌株を用いることが望ましい。というのは、供試芽胞の耐熱性があまりに弱ければ、得られた耐熱性値を基礎に決定した加熱殺菌条件では、食品中のボ菌芽胞を殺滅し得ない恐れがあるからである。

このようなところから、米国 FDA は、かん詰食品の加熱殺菌条件決定のための耐熱性測定試験を行うときには、試験のつど、あらかじめ供試芽胞の耐熱性を標準的方法により検定し、そのデータを付記することを要求している^{*2}。

食品中におけるボ菌芽胞の耐熱性測定試験には、*Clostridium botulinum* 62A 株がよく用いられる。著者らは、American Type Culture Collection (以下 ATCC と略す) より分与を受けた 62A 株の芽胞の耐熱性があまりに弱く、試験に用いることができなかったところから、他の標準菌株を入手し、これら芽胞の M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における耐熱性を測定し、食品の加熱殺菌条件決定のための試験に用いるのに適当であるかどうか検討したので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

ATCC より分与を受けた *C. botulinum* 62A (ATCC 7948), National Food Processors Association 西部研究所 (以下 NFPA と略す) より分与を受けた同 62A, 東海区水産研究所 (以下 TRFRL と略す) 故横関源延博士より分与を受けた同 62A, A90, B1G4 (以上 A 型), B Lamanna, 169B および 213B (以上 B 型) の合計 8 株を用いた。

2. 芽胞形成用培地

Pork broth¹⁾ に、土壌浸出液、鉄釘および炭酸カルシウムを加えて用いた。すなわち、トリプトン (Difco) 10 g, 酵母エキス 3 g, 可溶性デンプン 1 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.3 g, L-システイン塩酸塩 0.3 g, 土壌浸出液²⁾ 250 ml および脱イオン水 750 ml の割合で加熱溶解した液 2L を 3L 容三角フラスコに収容した。これに脂肪を除去し、一辺 2 cm のさいの目に切った豚肉 800 g, 炭酸カルシウム 2 g および無メッキ鉄釘 (長さ 3 cm) 10 本を投入し、1 時間煮沸した。冷却後、pH 7.2 に調整した後、流動パラフィンを厚さ約 3 cm に重層し、121°, 40 分間高圧殺菌した。

3. 芽胞形成

供試菌株の芽胞を含む培養液 1 ml を肝片加肝臓ブイヨン³⁾ に接種し、80°, 20 分間加熱処理して芽胞を活性化した後、35° で 1 夜培養した。この液 5 ml を、あらかじめ 30° に保温しておいた芽胞形成用培地に接種し、30° で 10 日間培養した。

4. 芽胞液の調製

前報⁴⁾と同一の方法で調製した。

5. 加熱処理

前報⁴⁾と同一の方法で処理した。ただし、1 加熱処理温度・時間条件に、芽胞を収容した小試験管 1 本を供し

^{*1} (社) 日本缶詰協会研究所: 横浜市保土ヶ谷区狩場町 460

^{*2} FDA information letter dated April 13, 1977 received from Food and Drug Administration, HFF-414, Attention: LACF Process Review, 200 "C" St., S. W., Washington, D. C. 20204

Fig. 1. Survival curves for *C. botulinum* A90 spores ($1.4 \times 10^6/\text{ml}$) heated in *M/15* phosphate buffer solution (pH 7.0)
N, Number of spores survived; No, Initial number of spores subjected

Fig. 2. Survival curves for *C. botulinum* B1G4 spores ($5.3 \times 10^6/\text{ml}$) heated in *M/15* phosphate buffer solution (pH 7.0)

た。

6. 加熱処理時間の補正

芽胞を収容した小試験管の幾何学的中心に、外径 0.075 mm の銅線およびコンスタンタン線（テフロン被

覆）で作製した熱電対の感温部を固定し、加熱初期および冷却初期における経時的温度変化を測定し、Sognefest および Benjamin⁵⁾ の方法にならい、Hayakawa⁶⁾ の数式を用いて、加熱初期および冷却初期の温度上昇お

Fig. 3. Survival curves for *C. botulinum* 62A spores of different sources heated in M/15 phosphate buffer solution (pH 7.0)
Figures in parentheses show the initial number of spores subjected.

よび下降遅滞を補正した。補正時間は -1.5 分であった。

7. 生芽胞数の測定

前報⁷⁾のパウチ法により測定した。ただし、加熱処理済み芽胞液の1希釈段階に平板1枚を用いた。

結 果

1. 生残曲線の形

供試ボ菌芽胞を定温加熱処理して得られた生残曲線は、菌株によって、その形が異なっていた。すなわち、①加熱初期に凹型、その後直線になるもの (Fig. 1, 以下 I 型と呼ぶ) ②加熱初期に凸型、その後直線になるもの (Fig. 2, 以下 II 型と呼ぶ) ③全体が凹型で、いわゆる tailing を示すもの (Fig. 3, 以下 III 型と呼ぶ) が認められた。62A (NFPA), A90, B Lamanna および 169B は I 型, BIG4 および 213B は II 型, 62A

(ATCC 7948) および同 (TRFRL) は III 型であった。

2. 耐 熱 性

微生物の耐熱性は、一般に、D 値 (生菌数が 90% 減少するに要する時間) および z 値 (D 値の 10 倍または 1/10 倍の変化に対応する温度変化) で表示されるので、下記の方法により、これらの値を求めた。

すなわち、D 値は生残曲線がほぼ直線を示す部分のプロットから最小自乗法により求めた回帰曲線 (Fig. 1, 2) より算出した。通常、微生物の耐熱性は、一定温度における D 値により比較されるが、本実験で得られた生残曲線のように、その形が異なる場合には、同一 D 値であっても耐熱性が同一とはいえない。たとえば、213B と A90 の芽胞の 105° における D 値は、いずれも 6.8 分であったが、前者の生残曲線は II 型、後者のそれは I 型であったため、前者の耐熱性は明らかに後者より強かつ

Fig. 4. Survival curves for *C. botulinum* 213B ($1.1 \times 10^6/\text{ml}$) and A90 ($1.4 \times 10^6/\text{ml}$) spores heated in *M/15* phosphate buffer solution (pH 7.0) at 105°C . I.R., Intercept ratio ($\log R$), see Table 1; D, Decimal reduction time.

た (Fig. 4). このような差異を識別するために、上記の回帰曲線の截片定数 (直線の延長が、加熱時間 0 において縦軸と交叉する点の生残率の対数、以下 IR と略す) を求めた。生残曲線が I 型であれば IR は負数に、II 型であれば正数になる。

また、得られた D 値を基礎にして、加熱温度と D 値の対数との関係を示す回帰曲線 (Fig. 5) を最小自乗法により求め、同曲線より z 値を得た。

A 型芽胞の耐熱性値を Table 1 に、B 型芽胞のそれを Table 2 に示した。62A (ATCC 7948) および同 (TRFRL) は、生残曲線に直線部分がなく、D 値を求めることができなかった。99.99% 減少時間で示した。A 型芽胞では、生残曲線のプロットに直線部分が認められなかった上記 2 株を除けば、残る 3 株の芽胞の D_{110° 値は 1.7~1.9 分であり、菌株による極端な耐熱性の違いは認められなかった。 z 値は $8.1 \sim 10.6^\circ$ であった。B 型芽胞でも、供試 3 株の芽胞の D_{110° 値は 1.3~1.7 分、 z 値は $8.5 \sim 10.1^\circ$ であり、A 型芽胞とはほぼ同程度の耐熱性を示した。供試 8 株の芽胞の中では、生残曲線の形が II 型であった B1G4 株の芽胞の耐熱性

Fig. 5. Thermal death time curve for *C. botulinum* A90 spores heated in *M/15* phosphate buffer solution (pH 7.0).

Table 1. Intercept Ratio, D and z Values for *C. botulinum* Type A Spores Heated in M/15 Phosphate Buffer Solution (pH 7.0)

Strain	Initial No. of spores (/ml)	Heating temp. (°C)	Intercept ratio (log $R^{a)}$	D ^{b)} (min)	z ^{c)} (°C)	Referential D at 110°C (min)
62A (ATCC 7948)	3.5×10^7	102.5	—	(14.0) ^{d)}	10.0	(2.1) ^{d)}
		105.0	—	(6.6)		
		107.5	—	(3.4)		
		110.0	—	(2.3)		
62A (TEFRL ^{e)})	3.6×10^6	102.5	—	(26.0)	9.0	(3.2)
		105.0	—	(13.0)		
		107.5	—	(6.2)		
		110.0	—	(3.2)		
62A (NFPA ^{f)})	2.8×10^7	102.5	-1.43	16.4	8.1	1.9
		105.0	-1.90	7.8		
		107.5	-0.83	4.2		
		110.0	+0.71	1.9		
		112.5	-1.01	0.9		
A90	1.4×10^6	102.5	-1.03	12.4	9.2	1.7
		105.0	-1.26	6.8		
		107.5	-0.58	2.8		
		110.0	-0.50	1.6		
		112.5	-0.60	1.0		
B1G4	5.3×10^5	100.0	+0.25	20.0	10.6	1.9
		102.5	+0.27	11.7		
		105.0	+1.52	4.6		
		107.5	+1.20	2.3		
		110.0	+0.98	1.7		
		112.5	-0.15	1.2		
		115.0	-2.90	0.8		

^{a)} Log R , the zero-time intercept of the regression line. See Figs. 1 and 2.

^{b)} Decimal reduction time.

^{c)} The slope index of the thermal death time curve. See Fig. 5.

^{d)} Since the survival curves for *C. botulinum* 62A (ATCC 7948 and TRFRL) spores showed the tailing at every temperatures, a straight regression line could not be determined. Therefore, the time for 99.99% reduction of survivors was given in parentheses.

^{e)} Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.

^{f)} National Food Processors Association.

が最も強かった。

考 察

食品の加熱殺菌条件決定の基礎データを得るために行う耐熱性測定試験の供試芽胞としては、その生残曲線が直線になるものが望ましいと、著者らは考える。これは次の理由による。すなわち、食品中における芽胞の耐熱性を測定するとき、通常、食品と芽胞の混合物を小試験管または特殊小型かんに収容、密封し、加熱処理前の生芽胞数 (a) と、これらを定温で所定時間 (U) 加熱処理した後の生芽胞数 (b 、複数の供試試料中の発育陽性試

料数を基礎に、最確数法により求める⁸⁾とを測定し、生残曲線が直線になるとの仮定に基づき、次式により D 値を推定する。

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

加熱殺菌条件の算出においては、安全をみて、試験に用いたよりもさらに多い芽胞の存在を考慮し、D 値に安全係数 n を乗じたもの (nD) を殺菌値とするが、もし供試芽胞の生残曲線が III 型であれば、実際に芽胞が生き残り得る確率は予測したよりも大きくなる恐れがある (Fig. 6)。特に、供試芽胞の耐熱性が弱く、その生残曲線

Table 2. Intercept Ratio, D and z Values for *C. botulinum* Type B Spores Heated in M/15 Phosphate Buffer Solution (pH 7.0).

Strain	Initial No. of spores (/ml)	Heating temp. (°C)	Intercept ratio (log $R^{a)}$)	D ^{b)} (min)	z ^{c)} (°C)	Referential D at 110°C (min)
B Lamanna	6.9×10^5	100.0	+0.32	12.0	10.1	1.3
		102.5	-0.40	8.7		
		105.0	-0.55	4.4		
		107.5	-0.06	1.9		
		110.0	-0.55	1.5		
		112.5	-0.22	0.7		
169B	1.7×10^6	100.0	-0.36	23.0	9.0	1.7
		102.5	-0.45	13.0		
		105.0	-0.56	6.2		
		107.5	-0.82	3.0		
		110.0	-0.38	2.0		
		112.5	-1.42	0.9		
213B	1.1×10^6	102.5	+0.47	12.0	8.5	1.7
		105.0	+0.46	6.8		
		107.5	+0.22	3.2		
		110.0	+1.06	1.4		
		112.5	-0.05	1.0		
		115.0	+0.30	0.4		

a), b), c) See Table 1.

がIII型であるときにはいっそう危険である。このようなところからすれば、62A (ATCC 7948) 株および同 (TRFRL) 株は、供試菌株として不適である。他の供試菌株の芽胞の生残曲線 (I および II 型) は、加熱初期に直線にならないが、これらは IR により初発生芽胞数の

補正が可能であり、その耐熱性も特に弱くはないから問題は無い。

耐熱性の強い嫌気性タンパク分解細菌芽胞を得るには、pork broth が最も良いといわれているが¹⁾、著者らが得た芽胞の耐熱性は予期したほど強くなかった。Alderton ら⁹⁾は、62A 芽胞の $D_{112.8^\circ}$ 値が 1.8 分、213B 芽胞のそれが 1.7 分であったと、また Odlaug および Pflug¹⁰⁾ は、62A 芽胞の D_{110° 値が 2.8 分であったと報告している。本実験において得られた D 値 (Table 1, 2) は、これらに比較して小さい。Kaplan ら¹¹⁾は、213B 芽胞の D_{115° 値が 0.38 分であったと報告しているが、本実験の結果 (Table 2) は、これとほぼ一致する。

ボツリヌス芽胞を加熱殺菌の対象とする場合には、生芽胞数

Fig. 6. Difference of probability between actual and estimated survivors

—, An actual survival curve; ---, A phantom survival curve; a, Initial number of spores subjected; b, Number of spores survived after heating time of U; n, Safety factor; D, Decimal reduction time; Na, Actual probability of survivors after heating time of nD; Ne, Estimated probability of survivors after heating time of nD.

Table 3. D and 12D Values at 120°C for *C. botulinum* Type A and B Spores Heated in M/15 Phosphate Buffer Solution (pH 7.0)

Strain	Intercept ratio (log $R^{a)}$)	D at 120°C (min)	12D ^{b)} at 120°C (min)
62A (NFPA)	-0.89±0.99	0.11	1.2±0.1
A90	-0.79±0.33	0.14	1.6±0.1
B1G4	+0.17±1.48	0.22	2.7±0.3
B Lamanna	-0.24±0.34	0.13	1.5±0.1
169B	-0.67±0.41	0.13	1.5±0.1
213B	+0.41±0.37	0.11	1.4±0.1

^{a)} See Table 1.^{b)} 12D=(12+Intercept ratio)×D

10¹² 個を 1 個に減少させ得る殺菌値 ($n=12$ とする。以下 12D 値と略す) に相当する加熱処理をしなければならぬ¹²⁾。また、我が国の食品衛生法は、pH が 5.5 を超え、水分活性が 0.94 を超える容器包装詰加圧加熱殺菌食品にあっては、中心部を温度 120° で 4 分間加熱したと同等以上の効力を有する方法で加熱殺菌することと定めている¹³⁾。そこで、得られた耐熱性値 (Table 1, 2) に基づき、120° における 12D 値を算出し、Table 3 に示した。供試菌株の芽胞の 12D 値は 1.2~2.7 分であり、4 分を超えるものはなかった。また、IR の変動が 12D 値の変動に及ぼす影響は小さく、B1G4 芽胞以外では ±0.1 分以内であった。B1G4 芽胞では、IR の変動幅が最も大きく、その標準偏差は ±1.48 (これは、回帰曲線が示す架空の初発生芽胞数が 30 倍または 1/30 倍変動することを意味する) であったが、これが 12D 値の変動に及ぼす影響はわずか 11% であった。

要 約

A および B 型ボ菌 8 株の芽胞の M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における耐熱性を測定した。生残曲線の形には、①加熱初期に凹型、その後直線になるもの、②加熱初期に凸型、その後直線になるもの、および③全体が凹型で、いわゆる tailing を示すものの 3 種類が認められた。62A (NFPA), A90, B Lamanna および 169B の芽胞は ①、B1G4 および 213B の芽胞は ②、62A (ATCC 7948) および同 (TRFRL) の芽胞は ③ の形を示した。

供試 8 株中 6 株の芽胞の D_{110°} 値は 1.3~1.9 分、z 値は 8~10° であった。120° における推測 12D 値は B1G4 の芽胞が最も大きく、2.7 分であった。

おわりに、菌株を分与下さった東海区水産研究所故横関源延博士、本報告をまとめるに当たり御助言を賜った同研究所笹嶋正秋氏、および本研究に助成金を賜った

(財) 旗影会に深謝する。

文 献

- 1) National Canners Association, Research Laboratory: "Laboratory Manual for Food Canners and Processors", 3rd ed., p. 18 (1968), AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.
- 2) Gordon, R. E., Haynes, W. C.: "The Genus Bacillus", p. 100 (1973), U. S. D. A., Washington, D. C.
- 3) 伝染病研究所学友会編: "細菌学実習提要", p. 82 (1958), 丸善.
- 4) 駒木 勝, 松田 典彦, 松縄 桂子: 食衛誌. **21**, 252~259 (1980).
- 5) Sognefest, P., Benjamin, H. A.: Food Res., **9**, 234~243 (1944).
- 6) Hayakawa, K.: Food Technol., **24**, 89~99 (1970).
- 7) 松田 典彦, 駒木 勝: 食衛誌. **21**, 390~391 (1980).
- 8) Stumbo, C. R.: "Thermobacteriology in Food Processing", p. 93 (1965), Academic Press, New York.
- 9) Alderton, G., Ito, K. A., Chen, J. K.: Appl. Environ. Microbiol., **31**, 492~498 (1976).
- 10) Odlaug, T. E., Pflug, I. J.: *ibid.*, **34**, 23~29 (1977).
- 11) Kaplan, A. M., Reynolds, H., Lichtenstein, H.: Food Res., **19**, 173~181 (1954).
- 12) 相磯和嘉監修: "食品微生物学", p. 153 (1978) 医歯薬出版(株).
- 13) 厚生省環境衛生局食品衛生課, 乳肉衛生課, 食品化学課監修: "食品衛生小六法, 昭和 54 年度版", p. 205~206 (1979) 新日本法規出版.