

[J. Ferment. Technol., Vol. 52, No. 9, p. 657~661, 1974]

## 種麴乳酸菌の熱殺菌について

菅間誠之助・本郷 和男\*・村上 英也

国税庁醸造試験所

Heat Sterilization of Lactic Acid Bacteria Contaminating *Tané-koji*

Seinosuke Sugama, Kazuo Hongô, and Hideya Murakami

Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo

Commercially available *tané-koji*, sporulated *koji* used as the seed for *koji* making, is sometimes regarded as one of the sources of infection by lactic acid bacteria in *saké* brewing. To sterilize these contaminants by heat and, at the same time, to minimize the heat inactivation of *Aspergillus oryzae* conidiospores, the heat drying conditions of *tané-koji* have been examined.

1) The heat resistance of lactic acid bacteria was different depending on species and cultural age: *Leuconostoc mesenteroides* B-95 was more stable than *Lactobacillus casei* B-83 and, in regard to the same species, the cells harvested from the culture at the maximum growth were most stable (see Fig. 1, Fig. 2 and Table 1). Therefore, *Leuc. mesenteroides* B-95 cells at the maximum growth was used for determination of the drying conditions.

2) The patterns of thermal death of the test organisms on the surface of steamed rice or on *tané-koji* seemed to be related to the patterns of heat drying of solid materials: the velocity of thermal death in the constant rate period of drying was more rapid than that in the falling rate period. In the latter period, the spores of *Asp. oryzae* became very stable (see Table 2). In the drying of steamed rice, the critical moisture content was in the range from 0.15 to 0.20 g H<sub>2</sub>O per g dry stock.

According to these results, a two steps method for drying of *tané-koji*, namely low temperature drying at constant rate period succeeded by high temperature drying at falling rate period, has been proposed. For example, in the case of the low temperature drying at 40°C (wet-bulb temperature ( $t_w$ ): 28°C) for 3 hours and high temperature drying at 60°C ( $t_w$ : 32°C) for 12 hours, the concentration of *Leuc. mesenteroides* diminished to 10<sup>-8</sup> times the initial. Under these conditions, the rate of inactivation of *Asp. oryzae* spores was only 10 per cent.

## 緒 言

清酒醸造工程への細菌汚染の1つの窓口として種麴製品に随伴する細菌,特に乳酸菌が問題になっている。種麴乳酸菌の除去にはその製造過程における微生物管理が有効なことは勿論であるが,種麴製品中の乳酸菌を麴菌胞子の活性を損うことなく殺菌することができれば,より直接的かつ効果的である。

\* 現在,株式会社桃屋三左衛門

種麴乳酸菌の殺菌には薬剤による方法も考えられるが,種麴製造工程で普通行なわれている熱乾燥を利用し,熱殺菌効果が期待できると考え,熱処理条件について検討した。

麴菌胞子の耐熱性については Yanagida と Yamagishi<sup>1)</sup> は *Aspergillus niger* について 51.5°C, 3 min の湿熱処理でその 50%が死滅すると報告している。*Asp. oryzae* についてわれわれが柳田ら<sup>1)</sup>の方法で測定したところでは 47°C (湿熱), 3 min で 50%死滅し,

黒麹菌より耐熱性はよわい。微生物の熱感受性は水分の存在状態によってことなり、乾熱より湿熱の方が死滅しやすい。渋川<sup>3)</sup>は種麹を熱乾燥した場合、乾燥麹では70~73°C, 1.5 hr 処理でなお生存胞子を検出するが、2 hr 処理では検出されなくなる。また湿潤麹では60~63°C, 1 hr 処理で生存胞子は検出されなくなることをみている。このことより熱処理時の麹の含水率が麹菌胞子の生存率に大きく影響することが予想された。われわれは清酒モロミの腐造菌である *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides* について湿熱処理および麹表面付着状態における熱処理を行ない、熱死滅速度を測定し、麹菌胞子のそれと比較して麹菌胞子をできるだけ失活させることなく乳酸菌を熱殺菌するための条件を検討した。

### 実験方法

1. 供試菌株 麹菌胞子として株式会社桃屋三左衛門製粉状および粒状の清酒用種麹 (*Asp. oryzae* strain G 単菌使用) を使用した。乳酸菌としては当所第1研究室外池ら<sup>4)</sup>が腐造清酒モロミより分離した *Lact. casei* B-83, *Leuc. mesenteroides* B-95 を使用した。

2. 乳酸菌の培養 1%寒天添加の YAS 培地<sup>5)</sup>に34°C で穿刺培養した乳酸菌を YAS 培地に1白金耳接種し、34°C で所定時間 (24, 48, 72 hr) 培養し、供試した。

3. 湿熱処理の方法 さきに清酒中の乳酸菌の熱死滅速度を測定した著者らの方法<sup>6)</sup>に準じて行なった。粉末種麹 (10<sup>9</sup> 胞子/g 種麹) は Tween 80 を0.05%含む生理食塩水で100倍に希釈する。乳酸菌培養液(約10<sup>10</sup> cells/ml) は生理食塩水で100倍に希釈する。これらの希釈液を2 ml あて7 ml 容のアンフルに分注し、アンフルの口を封じ、所定の処理温度に調節した恒温水槽に浸し、振とう (120回/min) する。ストップウォッチで処理時間を測り、経時的にアンフルを恒温水槽よりとりだし、冷水中に入れて急冷し、アンフルの内容物を生理食塩水で適宜希釈し、生存菌数をプレート法で計数する。すなわち乳酸菌の場合は熱処理した菌希釈液0.5~10 ml を0.5%炭酸カルシウムを含む1%寒天添加 YAS 培地に加え、分散させた後全量をプレートし、34°C, 2日培養後出現する炭酸カルシウム溶解性の集落数を計数し、シャーレ5枚についての計数値の平均値を求める。麹菌胞子の場合は3%寒天添加麹汁培地表面に熱処理した希釈液0.02~0.05 ml を塗抹し、34°C, 1~2日培養後出現する集落数を計数し、乳酸菌の場合同様平均値を求める。

4. 麹表面における熱処理 前項で使用した乳酸菌培養液の100倍希釈液0.1 ml をエーテル気流中2日間おいて麹菌胞子を殺菌し、エーテルを駆逐した生種麹 (乾燥前の種麹) 3g に加え、所定処理温度に調節した恒温通風式乾熱器中におき、所定時間経過したものをとり出し、全量を生理食塩水100 ml に加え、振とう抽出機 (Iwaki の KM-shaker) で15 min 振とう後、適宜食塩水で希釈、前項同様乳酸菌数を計数する。また麹菌胞子については生種麹 (10<sup>8</sup> 胞子/g 麹) 3g を秤量ビンにとり、乳酸菌付着麹の場合と同様熱処理後全量を0.05%の Tween 80 を含む生理食塩水100 ml に加え、15 min 振とう後前項同様生胞子数をプレート法で計数する。

5. 蒸米表面における熱処理 蒸米の含水率を任意に調節しようように蒸米をアルコールで脱水した $\alpha$ 米<sup>7)</sup>を使用した。 $\alpha$ 米 (dry stock 0.8964 g/g  $\alpha$ 米) 3g を秤量ビンにとり、前記の湿熱処理の項で使用した麹菌胞子および乳酸菌培養液の100倍希釈液を加えて所定の含水率の蒸米をうると同時に菌を蒸米に付着させる。例えば $\alpha$ 米3g に菌希釈液0.5 ml を滴加し、よく混合すると含水率 (gH<sub>2</sub>O/g dry stock) 0.3 の蒸米となる。これを前項同様熱処理する。

6. 熱死滅速度 熱処理後の生存菌 (胞子) 数を  $n$  (熱処理前の試料の単位重量あたりに換算), 処理前のそれを  $n_0$  とし、生存率  $n/n_0$  を片対数紙の縦軸に対数目盛でとり、熱処理時間  $\theta$  [min] を横軸に普通目盛でプロットしてえられる直線の傾斜より熱死滅速度定数  $k$  [min<sup>-1</sup>] を求める。

### 実験結果および考察

乳酸菌の age と耐熱性 YAS 培地で34°C にそれぞれ24, 48, 72 hr 培養した乳酸菌を50°C で湿熱処理したときの熱死滅曲線 (実験方法2, 3, 6による) を Fig. 1 および2にしめた。この曲線の直線部分の傾斜より乳酸菌の生理食塩水中における熱死滅速度定数  $k$  を求めたところ Table 1 にみられるように培養液の菌濃度からみて供試した *Leuconostoc*, *Lactobacillus* のいずれも最大増殖期にある菌体がかつとも耐熱性がよく、死滅期に入ると耐熱性が弱まることが認められた。また生育のいずれの時期をとわず供試菌については *Leuconostoc* の方が *Lactobacillus* より耐熱性はつよい。

製麹過程で乳酸菌の生育可能な時期は引込み以降より麹菌の増殖が旺盛となる盛時期 (床もみ後約20時間) までの間であり<sup>8)</sup>、その後出麹までに乳酸菌は静止期をへて死滅期に入っており、したがって種麹製品の乳

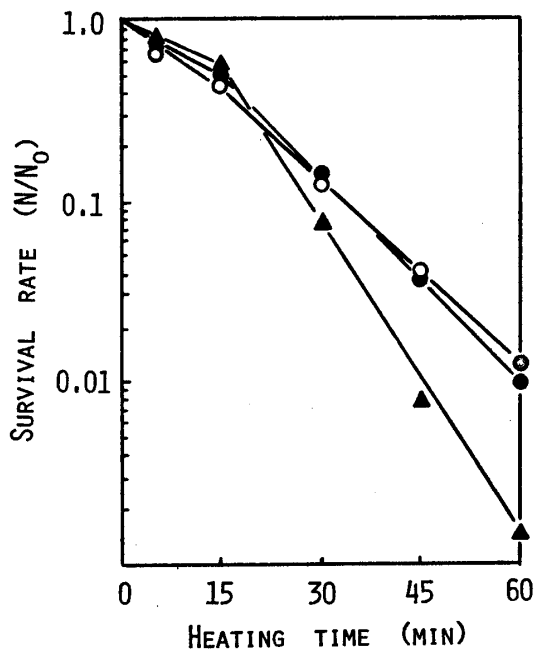


Fig. 1. Thermal death curve of *Leuconostoc mesenteroides* cells at 50°C in wet condition.

Two ml samples of diluted culture medium of *Leuc. mesenteroides* B-95 (cell concentration: about  $10^8$  cells per ml) were poured into 7 ml ampoules. Sealed ampoules were immersed in a water bath regulated at 50°C and were shaken 120 times a minute. After a lapse of definite heating time, ampoules were taken out one by one and immersed immediately in cold water. Survival cell concentration (N) was measured by plate culture method using YAS<sup>4)</sup> agar medium with 0.5% CaCO<sub>3</sub>. Survival rate was calculated as follows: (survival cell concentration after t minutes of heat treatment (N))/(initial cell concentration before heating (N<sub>0</sub>)).

○—○: thermal death curve of cells harvested from 24 hours culture in YAS medium at 34°C;  
●—●: cells harvested from 48 hours culture;  
▲—▲: cells harvested from 72 hours culture.

酸菌の熱殺菌を考える場合、死滅期の細胞の熱死滅速度より処理条件を設定すればよいと思われるが、安全を考慮し、以後の実験では *Lactobacillus* にくらべ耐熱

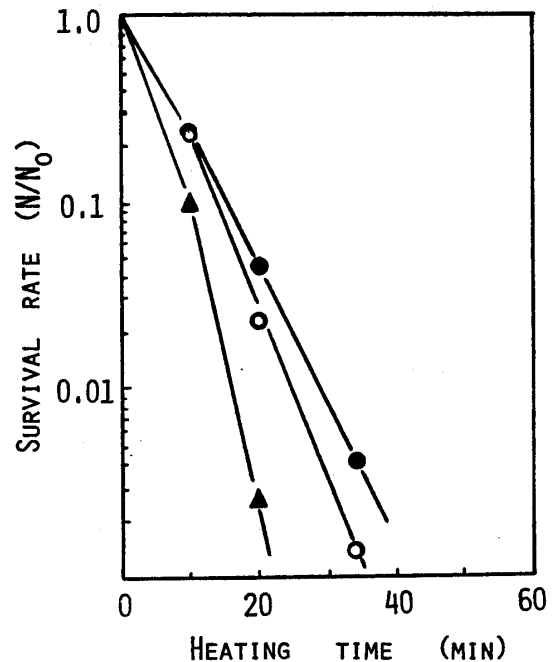


Fig. 2. Thermal death curve of *Lactobacillus casei* cells at 50°C in wet condition.

Experimental conditions were the same as in Fig. 1. *L. casei* B-83 was used as the test organism. ○—○: thermal death curve of the cells harvested from 24 hours culture in YAS medium at 34°C; ●—●: cells harvested from 48 hours culture; ▲—▲: cells harvested from 72 hours culture.

のつよい *Leuconostoc* の最大増殖期にある細胞を使用し熱殺菌条件をもとめた。

#### 種麴表面における麴菌胞子および乳酸菌の熱死滅

実験方法 4 および 6 にしたがって種麴を 60°C の恒温通風式乾燥器 (湿球温度 32°C) で熱処理し、麴菌胞子および *Leuc. mesenteroides* の生存率および麴の含水率の変化を経時的に測定した結果を Fig. 3 にしめした。種麴という固体表面における麴菌胞子および乳酸菌の熱死滅曲線は生理食塩水けん濁液における湿熱の場合と異なり、2つの折れまがった曲線となる。この

Table 1. Influence of the culture age of lactic acid bacteria upon the velocity of thermal death.

Test organism	Age (hr)	Population $\times 10^{10}$ /ml medium	Rate constant of thermal death
<i>Leuc. mesenteroides</i> B-95	24	3.3	0.078 min <sup>-1</sup>
	48	2.4	0.087
	72	0.8	0.131
<i>L. casei</i> B-83	24	1.8	0.210
	48	2.9	0.159
	72	2.0	0.347

Results of Fig. 1 and Fig. 2 are summarized in this table.

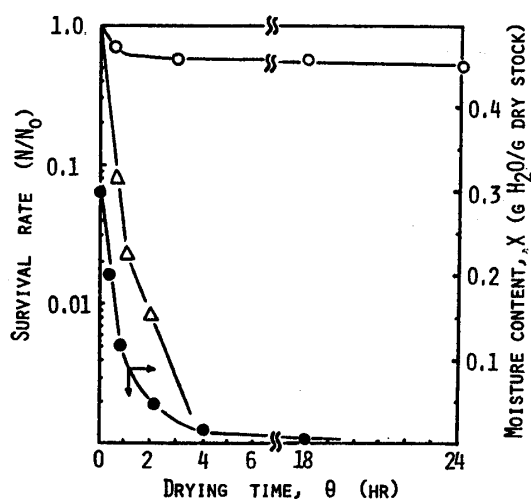


Fig. 3. Thermal death of *Aspergillus oryzae* conidiospores and of *Leuconostoc mesenteroides* cells on the surface of *tané-koji* in drying.

Cylindrical glass-vessels (base diameter: 4 cm; height: 4 cm) containing each 3 g of *tané-koji* were placed in the air circulating drying room where the air temperature was regulated to 60°C and the wet-bulb temperature was 32°C. In the course of drying, the vessels were taken from the room one by one and the survival spore concentration was measured by the ordinary plate culture method. In the case of *Leuc. mesenteroides* cells, the conidiospores of *Asp. oryzae* of *tané-koji* had been killed previously by exposure to ether vapour. After the elimination of ether by aeration, 0.1 ml of diluted culture medium of *Leuc. mesenteroides* B-95 was added to 3 g of *tané-koji* (cell concentration was approximately  $3 \times 10^6$  cells per gram *tané-koji*).

○—○: thermal death curve of *Asp. oryzae* conidiospores; △—△: thermal death curve of *Leuc. mesenteroides* cells; ●—●: moisture content of *tané-koji*.

固体表面における熱死滅のパターンは固体の乾燥のパターンと関係があるように思われる。すなわち Fig. 3

において麴の乾燥速度  $-dX/d\theta$  が一定である恒率乾燥期と  $-dX/d\theta$  が減小する減率乾燥期の境界付近で熱死滅速度が変化している。Table 2 にみられるように麴表面における麴菌孢子および乳酸菌の熱死滅速度は減率乾燥期間より恒率乾燥期間で大きく、麴菌孢子的場合特に著しく、減率乾燥期で孢子はほとんど安定化される。このことから恒率乾燥期を比較的低温で処理することにより麴菌孢子的の死滅をさげ、減率乾燥期に処理温度をあげ、乳酸菌を殺菌する処理方法の可能性が予想された。

**種麴乳酸菌の熱殺菌条件の設定** 恒温乾燥期と減率乾燥期とで処理温度をことにする殺菌条件を満足させるため、まず含水率0.15, 0.20, 0.25, 0.30の蒸米を $\alpha$ 米<sup>6)</sup>に水を適宜添加することにより調製し、乾燥室温度 40°C, 湿球温度 28°C で乾燥を行ない含水率の変化を経時的に測定したところ、Fig. 4 にしめすように蒸米の含水率が0.15~0.20の間で恒率乾燥から減率乾燥に移行することがわかった。

次に実験方法の5にあげた方法で麴菌孢子  $10^6$ /g 蒸米, *Leuc. mesenteroides*  $7 \times 10^6$ /g 蒸米の濃度に蒸米表面に付着させた含水率0.30の蒸米をつくり、40°C で含水率0.11となるまで乾燥(湿球温度 28°C) 後温度を60°C にあげ乾燥をつづけ、麴菌孢子および乳酸菌の生存率を経時的に測定した結果を Fig. 5 にしめた。これより40°C の乾燥では麴菌孢子は測定にかかるほどの失活が認められないが、乳酸菌は熱死滅速度定数  $k=0.026$  [ $\text{min}^{-1}$ ] なる速度で死滅し、3時間処理で約1/100に減少した。次に60°C 処理で麴菌孢子的の10%が失活したが、乳酸菌は  $k=0.020$  [ $\text{min}^{-1}$ ] の速さで死滅し、 $2.303 \div 0.020 = 115.3$  [min] で1/10に減少した。すなわち乾燥当初からみて3時間の40°C 処理+12時

Table 2. Thermal death rate under various heating conditions.

Test organism	50°C in wet*	Heating conditions			
		On the surface of <i>tané-koji</i>			
		50°C		60°C	
		at CRP**	at FRP***	at CRP	at FRP
<i>Aspergillus oryzae</i> strain G	0.012	0.003	0.00008	0.011	0.00006
<i>Leuc. mesenteroides</i> strain B-95	0.078	0.058	0.012	0.083	0.022
<i>Lactobacillus casei</i> strain B-83	0.210	0.105	0.017	0.217	0.021

Figures in the table show the rate constant of thermal death ( $\text{min}^{-1}$ ).

\* Treated in physiological saline solution.

\*\* Constant rate period of drying.

\*\*\* Falling rate period of drying.

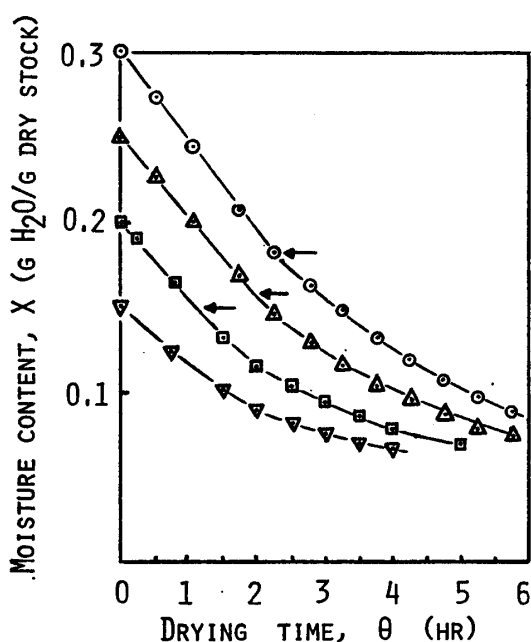


Fig. 4. Drying curve of steamed rice.

Experimental conditions were the same as in Fig. 3, but the drying room temperature was regulated to 40°C and the wet-bulb temperature was 28°C. Initial moisture content of steamed rice was regulated as follows: dehydrated steamed rice prepared by ethanol-extraction was hydrated by addition of a calculated amount of water to attain the required moisture content. Arrows show the positions of critical moisture content between the constant rate period and the falling rate period.

間の 60°C 処理で乳酸菌数を始発時の 1 億分の 1 に減少させることができる。なお乾燥前の生種麴の含水率の含水率を製麴中に 0.15 以下まで減少させることができればさらに処理時間は短縮されよう。またかりに出麴時の含水率 0.3 でその乳酸菌数が  $10^8/g$  種麴であったとし、200g 入り製品をつくり、その製品 100 万缶に 1 缶の不良率にとどめるための乾燥条件は上記の結果より 3 時間の 40°C 処理 + 18~20 時間の 60°C 処理が必要である。

なお本実験では関与微生物の生存率を比較し、種麴の熱乾燥条件を設定したが、製品としての種麴を考慮する場合、当然麴菌胞子の発芽速度にあたる熱処理の影響も考慮すべきであり、60°C, 18~20 時間の乾燥による麴菌胞子の損傷が製麴時の発芽速度、初期の増殖速度にマイナスの影響を与えるかどうかを検討されなければならない。上記条件で処理した種麴を使用し製麴したところでは、対照にくらべその影響はほとんどみられなかったが、この点については次報の種麴の蒸米上における増殖に関する報告で詳細に検討したい。

#### 要 約

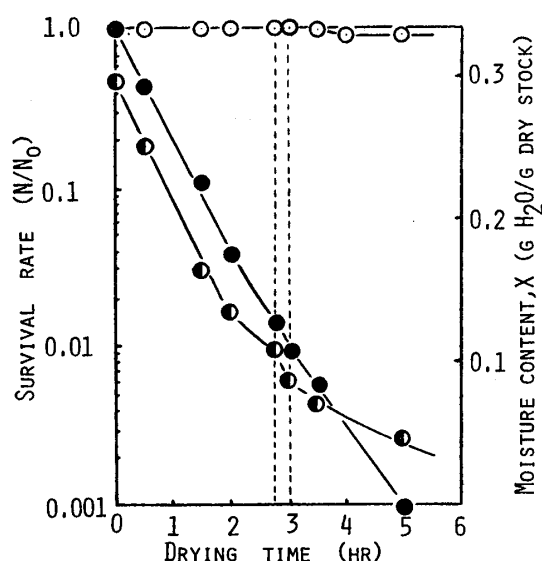


Fig. 5. Elimination of lactic acid bacteria during the drying process of *tané-koji*.

Experimental conditions were the same as in Fig. 3, but the drying room temperature was regulated to 40°C (wet-bulb temperature  $t_w$ : 28°C) during the first 2 hr 45 min of the constant rate period, then the room temperature was raised gradually and after 3 hr, the room temperature was maintained at 60°C ( $t_w$ : 32°C).

○—○ : survival rate of *Asp. oryzae* conidiospores;  
●—● : thermal death curve of *Leuc. mesenteroides* cells;  
◐—◐ : drying curve of *tané-koji*.

種麴に伴随する乳酸菌を乾燥工程で殺菌するための処理条件を検討した。

1. 蒸米あるいは麴表面における微生物の熱死滅のパターンは固体の乾燥のパターンと関係し、恒率乾燥期で死滅速度は大きく、減率乾燥期で小さい。

2. 恒率乾燥中の処理温度を 40°C とし、含水率 0.15 以下まで乾燥後 60°C で処理することにより、麴菌胞子の失活を最小にし、乳酸菌を殺菌するための種麴の乾燥条件を設定した。

おわりに、貴重な菌株を分譲いただいた株式会社桃屋三左衛門、当所第 1 研究室百瀬洋夫博士に感謝する。

#### 文 献

- 1) Yanagida, T., Yamagishi, S.,: *Appl. Microbiol.*, **6**, 375 (1958).
- 2) 菅間, 本郷: 醸酵工学会大会要旨集, p. 11 (1972).
- 3) 渋谷: 醸協, **4**, No. 4, 37 (1909).
- 4) 外池, 百瀬, 久富, 阿久津: 醸協, **58**, 647 (1963).
- 5) 菅間, 井口: 醸協, **65**, 526 (1970).
- 6) 永谷, 菊池, 菅間: 醸協, **65**, 159 (1970).
- 7) 川崎, 永谷: 醸協, **61**, 642 (1966).
- 8) 百瀬, 大沼, 外池: 醸協, **61**, 936 (1966).

(昭 49. 6. 24 受付)