

〔醸工 第44巻, 第7号, p.450~457, 1996〕

熱殺菌に関する研究

(第5報) 細菌孢子凝塊の耐熱性と殺菌成功率におよぼす影響について

戸田 清・合葉 修一

(東京大学応用微生物研究所)

Some Discussions on the Thermal Characteristics of Spore Clumps

Kiyoshi Toda and Shuichi Aiba

(Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo)

It was shown from probability consideration that the life-span distribution of spore clumps could be represented as shown in Fig. 1. The following two conclusions were obtained from the results: the life-span distribution of spore clumps was similar to the normal distribution, the calculation of which was based on the negative exponential distribution for the life-span of single spores; the heat resistance of spore clumps, if represented by the average life-span, increased approximately proportionally to the logarithm of the number of single spores incorporated into the clumps as shown in Fig. 2.

Assuming that individual spores incorporated into spore clumps contribute to the probability of unsuccessful sterilization, curves of $(1-P^*)$ (curves 2 and 3) correcting for the value of $(1-P)$ (the probability of unsuccessful sterilization and the value can be determined experimentally from the plate counting method) was plotted against time, θ as shown in Figs. 3, 4, 5. It is clear that the corrected curves can much better account for the deviation of the data points from curve 1 (for $(1-P)$).

緒 言

細菌孢子が一部凝塊をなして存在する場合に全孢子が分散した形で存在する場合よりも熱殺菌が満足のゆくたしかさで遂行される確率が低下するであろうということは、全死滅時間 (thermal death time) の測定実験においてしばしば認める、いわゆる "skip" 現象を説明するために報告されたことがある¹⁾。その他にも孢子凝塊の耐熱性が単独孢子よりも強いという考えが発表されているが、いずれも孢子凝塊の大きさとその具体的な耐熱時間の増大率との関係についての考察がないため定量的な説明性に欠けるきらいがある。

細菌孢子の熱死滅現象を thermal death time test および一次反応速度説にもとづいて解析をおこなう限りにおいては孢子凝塊の耐熱性に関する説明が定性的な範囲にとどまることは止むを得ないことである。しかし細菌孢子個々の耐熱寿命分布に関する確率的な取り扱いを孢子凝塊の場合に拡張して適用することによりこの問題をより明らかにすることが可能であると思われる。

孢子凝塊の耐熱性に関してはつぎの3つの立場から検討をおこなうことができよう。

- (1) 凝塊内の熱移動速度
- (2) 単孢子と凝塊の耐熱寿命の比較

(3) 凝塊の存在による殺菌確率の低下

(1) 凝塊内の熱移動速度については前報²⁾において論じたのでここでは後の 2 つの立場について考察をすすめることにする。

理論的考察

I. 単胞子と孢子凝塊の耐熱性の比較 単胞子が n 個分散して存在する孢子懸濁液を一定の温度で θ 時間加熱をおこなった場合の殺菌成功率 $P(\theta)$ が次式であらわせることを既報³⁾において明らかにした。

$$P(\theta) = \{1 - e^{-k\theta}\}^n \dots \dots \dots (1)$$

今, n 個の単胞子分散系を考えるかわりに一個の孢子凝塊を考え, これが上述の n 個の単胞子より構成されているものとしよう。

既報^{3,2)}において, それぞれ実験的に証明をおこなったごとく

(1) 単胞子に関する耐熱寿命分布が負の指数分布を示す。

(2) 孢子凝塊内への熱拡散の遅れ時間は實際上無視しうるくらい極めて短い時間である。

とすると(1)式で示した $P(\theta)$ は孢子凝塊の内に含まれている孢子の中で最も強い耐熱性を有する単胞子が θ 時間よりも長くはない加熱時間で不活性化する確率, いいかえれば孢子凝塊がゼロから θ 時間の加熱の間に死滅する確率をあらわす。

したがって, n 個の孢子からなる孢子凝塊群の耐熱寿命分布を $f(\theta)_n$ とかくことにすると

$$P(\theta) = \int_0^\theta f(\theta)_n \cdot d\theta \dots \dots \dots (2)$$

(1), (2)式より $f(\theta)_n$ を求めると

$$f(\theta)_n = \frac{dP(\theta)}{d\theta} = nk(1 - e^{-k\theta})^{n-1} \cdot e^{-k\theta} \dots \dots \dots (3)$$

この孢子凝塊群についての平均耐熱寿命 $\bar{\theta}_n$ は

$$\bar{\theta}_n = \int_0^\infty f(\theta)_n \cdot \theta \cdot d\theta \dots \dots \dots (4)$$

(4)式に(3)式を代入し, 部分積分後, $1 - e^{-k\theta} = X$ とにおいて解けば

$$\bar{\theta}_n = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^n \frac{1}{i} \dots \dots \dots (5)$$

なおここにもとめた細菌孢子凝塊の平均耐熱寿命 $\bar{\theta}_n$ は照井⁴⁾が確率過程論的に導びいた微生物細胞集団の理論全死滅時間 $\tau_{N \rightarrow 0}$ と同一の意味をもつものである。

単胞子 ($n=1$) の場合は

$$\bar{\theta}_1 = \frac{1}{k} \dots \dots \dots (6)$$

であるから

孢子凝塊と単胞子の平均耐熱寿命の比は

$$\frac{\bar{\theta}_n}{\bar{\theta}_1} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{i} \dots \dots \dots (7)$$

n が10以上の値であれば近似的につきのようにかける

$$\frac{\bar{\theta}_n}{\bar{\theta}_1} \approx 0.577 + 2.303 \log n \dots \dots \dots (8)$$

n 個の孢子からなる孢子凝塊の耐熱寿命分布を $k=1$ (min^{-1}) の場合を例にとって, (3)式を用いて電子計算機 (OKITAC 5090) で計算した結果は Fig. 1 に示すごとくである。図から明らかごとく, 単胞子の耐熱寿命が負の指数分布を示すのに対し, 孢子凝塊の場合は正規分布に似た中央値を有する山型の分布を示すことがわかる。

また, (8)式を用いて孢子凝塊の平均耐熱寿命の単胞子との比と凝塊構成孢子数の関係を示したものが Fig. 2 である。凝塊の大きさが孢子数で $10^1, 10^2, 10^3, 10^4$ と大きくなるにつれ, 耐熱寿命が3倍, 5倍, 7.5倍, 10

倍という割合で増大することがわかる。

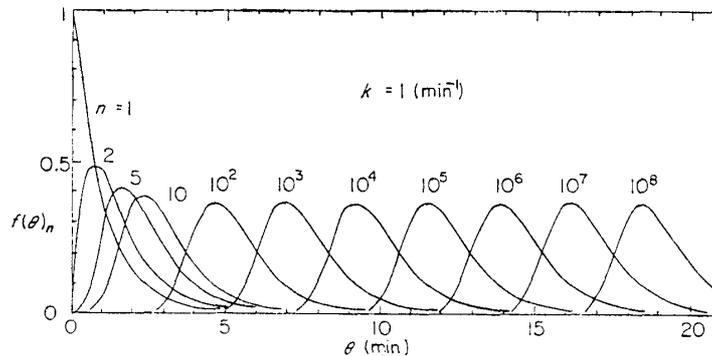


Fig. 1. Life span distribution of single spores and spore clumps.

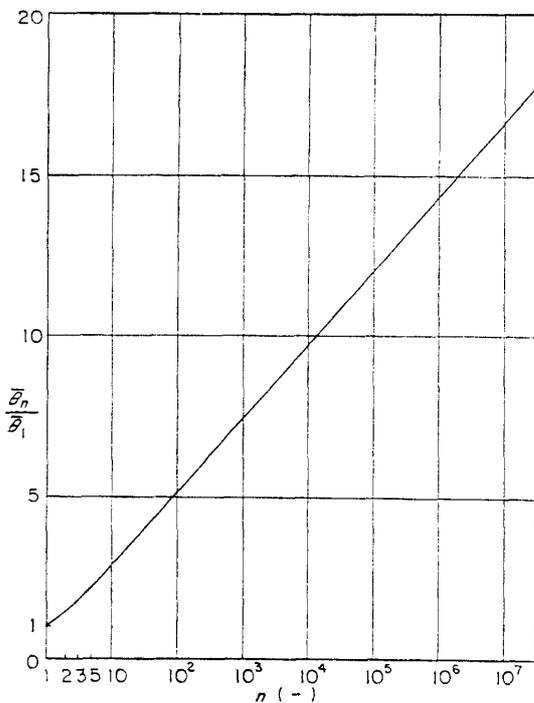


Fig. 2. Dependence of average life span on the size of spore clump.

単孢子と孢子凝塊の耐熱性がどの程度ちがうか? という疑問に対する解答がここに示されたと考えが、熱殺菌において殺菌の成功・失敗を論ずる場合には平均耐熱寿命による比較は實際上無意味であるといえよう。

殺菌の究極の目標は対象とする微生物系において最も抵抗性の強い個体を死滅させることであって、それが凝塊の一構成成分として存在するか、単独で存在するかが問題になるのは凝塊内熱移動速度が著しく遅い場合であり、前節の仮定〔2〕の成立するような場合には単孢子であるか凝塊をつくっているかには全く無関係に殺菌不成功率を求めればよい。

ただ、ここで問題としなければならない点は、殺菌不成功率を求めるのに必要な全孢子数が凝塊の存在する場合にはプレート・カウント法によって測定された値で代表させることはできないということである。

II. 殺菌不成功率におよぼす孢子凝塊の影響 孢子凝塊の混在する細菌孢子集団に関する殺菌成功率は、全孢子のうちで最も耐熱性の強い孢子に着目し、これが $(k\theta)$ という無次元項であらわされる殺菌条件のもの

とで不活性化する確率をもとめればよい。前節と同様に〔1〕,〔2〕の前提のもとでは、殺菌成功率 P^* は

$$P^* = (1 - e^{-k\theta})^{N_0^*} \dots\dots\dots (9)$$

殺菌不成功率 $1 - P^*$ は

$$1 - P^* = 1 - (1 - e^{-k\theta})^{N_0^*} \dots\dots\dots (10)$$

ここで N_0^* は全活性孢子数であって、 n_j 個の孢子からなる孢子凝塊 ($n_j=1$ の場合は単孢子) が N_j 個存在するものとする

$$N_0^* = n_1 \cdot N_1 + n_2 \cdot N_2 + \dots\dots\dots + n_j \cdot N_j \\ = \sum_{j=1}^j n_j \cdot N_j \dots\dots\dots (11)$$

である。

プレート・カウント法により測定される孢子数 N_0 を用いて殺菌不成功率を求めた場合は

$$1 - P = 1 - (1 - e^{-k\theta})^{N_0} \dots\dots\dots (12)$$

ここで

$$N_0 = N_1 + N_2 + \dots + N_j$$

$$= \sum_{j=1}^j N_j \dots\dots\dots (13)$$

(10)式と(12)式を比較すると

$$N^* > N_0 \dots\dots\dots (14)$$

であるから

$$1 - P^* > 1 - P \dots\dots\dots (15)$$

すなわち, 孢子凝塊が混在する場合は, 生菌数測定値をもとにして(12)式を用い計算した殺菌不成功率値よりも, 実際の殺菌不成功率値が高くあらわれるはずである. どの程度殺菌不成功率値が増加するかを知るには, その場合場合について(11)式により N^* を計算する必要がある.

実験方法および結果

孢子凝塊の混在率 既報³⁾の方法にしたがって濾紙を用い巨大な孢子凝塊を除去して調製した *Bacillus mycoides* の孢子懸濁液について孢子凝塊の混在率を測定した. すなわち, トーマの血球計を用い単位容積に含まれる単孢子と孢子凝塊の割合を孢子凝塊の大きさが便宜上直径 5μ , 10μ , 15μ , 20μ , に大別できるとしてそれぞれにつき顕微鏡的に計数をおこなった.

孢子凝塊の直径 d とその内に含まれる孢子数 n の関係については孢子凝塊が直径 1μ の球形孢子が菱面格子配列(空間率26%)していると仮定し

$$n = 0.74 \times d^3 \dots\dots\dots (16)$$

を用いた.

Table 1. Distribution of spore clumps in a spore suspension.

Spore clumps		(No. of spore clumps/No. of single spores) × 100					
$d(\mu)$	n	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Average	Maximum
5	90	0.08	0.07	0.05	0.03	0.06	0.08
10	740	0.08	0.04	0.02	0.06	0.05	0.08
15	2500	0.04	—	0.01	—	0.01	0.04
20	5900	—	0.01	—	0.03	0.01	0.03
Total		0.20	0.12	0.08	0.12	0.13	0.23

結果を Table 1 に示す. 平均して0.1%の孢子凝塊が混在していることがわかる.

今, かりに Table 2 に示すごとき孢子凝塊群の存在する孢子懸濁系(2), (3)* について, プレート・カウン
ト法により N_0 をもとめると(13)式から

(2)については

$$N_0 = \sum N_j = 1.0013 \times 10^4$$

(3)については

$$N_0 = \sum N_j = 1.0023 \times 10^4$$

一方, 全孢子数 N^* は(11)式から

(2)については

$$N^* = \sum n_j N_j = 2.2640 \times 10^4$$

(3)については

$$N^* = \sum n_j N_j = 4.4320 \times 10^4$$

Table 2. Examples for calculating the values of N^*/N_0 .

(2)

j	1	2	3	4	5	Sum
n_j	1	90	740	2500	5900	
N_j	10^4	6	5	1	1	1.0013×10^4
$n_j N_j$	10^4	540	3700	2500	5900	2.2640×10^4

(3)

j	1	2	3	4	5	Sum
n_j	1	90	740	2500	5900	
N_j	10^4	8	8	4	3	1.0023×10^4
$n_j N_j$	10^4	720	5900	10000	17700	4.4320×10^4

したがってプレート・カウント法にもとづく孢子数より全孢子数をもとめるには

(2)について

$$\frac{N^*}{N_0} = 2.26 \dots\dots\dots (17)$$

(3)について

$$\frac{N^*}{N_0} = 4.42 \dots\dots\dots (18)$$

を乗ずればよいことになる。

殺菌不成功率と孢子凝塊

初発孢子数 N_0 , 熱死滅速度定数 (または熱死滅反応確率) k は, 殺菌不成功率と加熱時間の関係を計算によりもとめる上で必要な基礎的数値であるが, これは既報³⁾ に示したごとく, 加熱時間と生残孢子数を半対数紙上に点綴してえられるいわゆる熱死滅曲線のデータを最小自乗法で処理することによりえられる数値を用いばよい。 N_0 の値はプレート・カウント法による実測値ではなく, 上記のデータの外挿値を用いたが,

これは試験管内で孢子懸濁液を加熱する際の温度上昇のおくれ時間の影響を除くための意味もある。

Table 3 に *Bacillus mycoides* の孢子懸濁液を用いておこなった3種の熱死滅曲線の測定実験の結果えられた N_0, k の値をそれぞれについて示す。Run 1, Run 2, は既報³⁾ による結果であり Run 3 は定温に保ったジャー内の液 (10l) に極少量の孢子液を投入することにより加熱実験をおこなったものである。

Table 3. Determinations of N_0, k , and N^* from the thermal death curve data.

Run	Temp.	Experimental		Calculated N^*		
		N_0	k	(1)	(2)	(3)
	°C	—	min	—	—	—
1	90.1 ± 0.4	2.1×10^5	0.374	2.1×10^5	4.7×10^5	9.3×10^5
2	93.5 ± 0.3	4.7×10^5	0.547	4.7×10^5	1.1×10^6	2.1×10^6
	°C	1/ml	min	1/ml	1/ml	1/ml
3	90.2 ± 0.3	2.9×10^3	0.320	2.9×10^3	6.6×10^3	1.3×10^4

ここに示したみかけ上の初発孢子数 N_0 が

- (1) すべて単孢子であって, 孢子凝塊を含まない
- (2) 孢子凝塊が Table 1 に示した平均値の割合で混在する
- (3) 孢子凝塊が Table 2 に示した最大値の割合で混在する

の3つの場合を仮想し, それぞれについて前節の方法により初発孢子数 N^* を計算した結果を Table 3 に同時

* 脚註(2)(3)は殺菌不成功率と孢子凝塊の節 (後述) の本文中に述べる(2), (3)の場合に対応する。

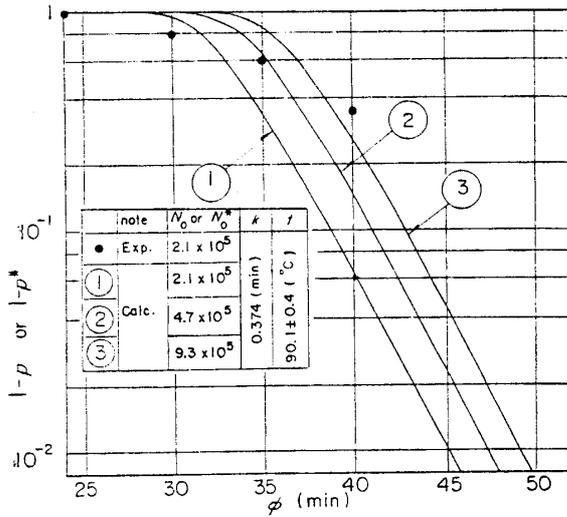


Fig. 3. Time-probability relationship of sterilization (Run 1).

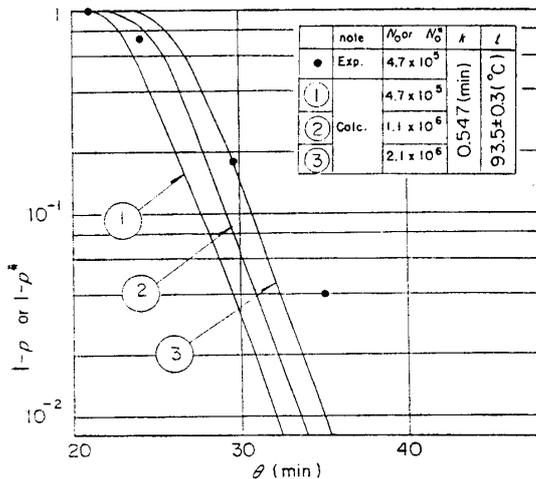


Fig. 4. Time-probability relationship of sterilization (Run 2).

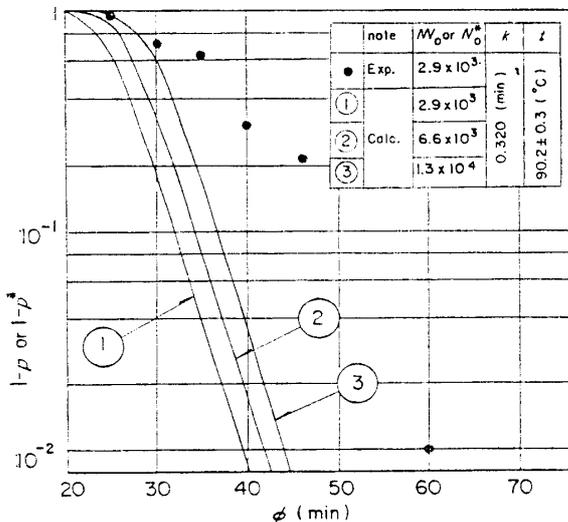


Fig. 5. Time-probability relationship of sterilization (Run 3).

に示した。

(10)式に N_0^* ならびに k を代入することにより加熱時間 θ と殺菌不成功率 $1-P^*$ の関係が(1), (2), (3)それぞれの場合についてもめられる。これを Figs.3~5 に(1), (2), (3)の番号を附した実線で示した。

また既報³⁾に示したごとくプレート・カウント法にもとづく無菌テストにより測定をおこなった殺菌不成功率の実測値を比較のために同時に示した。

Fig. 3 ならびに Fig. 4 にあらわれた結果からわかるように、既報³⁾において指摘しておいた殺菌不成功率曲線(供試孢子懸濁液がすべて単孢子からなりたっているものと仮定し、(12)式にもとづいて計算をおこなった)と実測値の偏倚が、孢子凝塊の混在の影響を考慮することによってかなりよく説明しうるのである。

ただし、Fig. 5 にあらわれた理論値と実測値の差は、孢子凝塊の存在を考慮に入れてもなお説明しえない点が残っている。

考 察

細菌孢子懸濁液を用いその thermal death time (T.D.T.) (全死滅時間)の測定をおこなう場合に一部の孢子が凝塊の形で存在していれば、その孢子凝塊の耐熱時間がほかの単孢子にくらべて長くなることはあってもみじかくなることはなからうということは誰しも考えつくところである。ではどのくらい長くなるかについてはいまだ明確な説明は与えてくれる報告はあらわれていないようである。多少とも孢子凝塊の耐熱性に結びつけて考えることのできる研究の一つとして、Rahn⁵⁾が発表した多細胞生物の熱死滅曲線に関する理論的研究がある。これは単細胞生物が対数死滅曲線を示すのに対して、多細胞生物は非対数死滅曲線を示すはずであることを代数計算によって示し、かつ実証として Wheat seeds⁶⁾, *Drosophila* などの死滅曲線実測値を例示したものであって、直接孢子凝塊の耐熱性増大あるいは殺菌における凝集現象による障害などについて触れたものではなかった。

孢子凝塊が殺菌に対してその効果を減ずる方向に作用することを定性的ではあるが明示したのは、T.D.T. test における skip 現象をとらえた Townsend, Esty, Baselt⁷⁾ 坂口, 天羽¹⁾らの実験的観察であろう。しかしこの場合には T.D.T. の本来有している確率的な性格からして完全に分散して懸垂する単孢子の懸濁系についても、一測定時点に使用する試験管数の多寡によっては skip 様現象のおこることは当然予想されるところである。滷過による孢子凝塊除去操作の有無によってこの skip 現象のあらわれやすさが変化するとい

う実験事実¹⁾はこの場合の skip 現象が孢子凝塊の存在に何らかの形で起因することを十分証明だてているようである。

いずれにせよ、従来おこなわれている T.D.T. に関する実験的研究あるいは一次反応速度論にもとづく熱殺菌理論より孢子凝塊の耐熱性を定量的に論ずることは困難であり、既報³⁾において採用したごとく単孢子集団における耐熱寿命分布の概念を適用することによってはじめて、Fig. 2 に示すような孢子凝塊耐熱性の増大率、あるいは Figs. 3, 4, 5 に示すような孢子凝塊の存在の殺菌不成功率におよぼす影響などの結論をひきだすことが可能になることを強調したい。

既報³⁾において認められた殺菌不成功率の計算値と実測値間のへだたりは Fig. 3, Fig. 4 に示したように孢子凝塊の混在の殺菌成功率におよぼすマイナスの効果を評価することによって埋めることができると考えるが、一方、Fig. 5 でもあきらかなようになお実測値が計算値よりも低い殺菌効率であられる場合がある。このような結果があらわれた原因を実験上の何らかの不手際に帰すことも不可能ではないと思われるが、ここでは実験に供与した孢子集団が孢子凝塊の影響をとりどりのぞいてもなお耐熱性の指数分布性(対数死滅法則性)にしたがわない耐熱寿命分布をとっていたためであるというように考えたい。

その理由は既報³⁾において示した耐熱寿命分布関数の形からもわかるように耐熱寿命の指数分布ということは最もあらわれやすい分布であるということではできるが、単孢子集団の耐熱寿命分布が常にかならずこの分布型であられるとはかぎらないからである。

このような耐熱寿命分布の蓋然性をもっと積極的に受け入れてゆくことにすると、殺菌不成功率の計算値と実験値のへだたりを埋めるためには Fig. 5 であらわされたような実験結果をもとにして、経験的な安全率という概念をとり入れる必要があろうという結論に到る。Fig. 5 に示した例でいえば、99%の殺菌成功率を得るためには40~45min の殺菌時間が理論上必要とされるが、実際にはこれに20min 位の殺菌時間をつけくわえなければならぬといえる。すなわち、殺菌時間に対する安全率として約1.5 という値が一例として与えられたと考えられよう。

しかし *Bacillus* あるいは *Clostridium* に属する細菌孢子のうち最大熱抵抗性の孢子を試験菌に用いてえられるところの、たとえば「120°Cで20min」というような従来の醸酵培地に関する熱殺菌基準についていえば、この数値は熱殺菌が不完全な場合に実際に雑菌として繁殖してくるであろう微生物を対象とした場合よりもはるかに過酷な殺菌条件において熱殺菌を論ずることより得られたものである。したがって、この120°C, 20min という殺菌条件の中には、ここにいう安全率に相当するものがすでに含まれていると考えてよいであろう。

既報³⁾に示しておいた殺菌不成功率にかんする線図からもわかるようにある特定の初発孢子数を含む被殺菌系についてある特定の殺菌成功率を与えるような殺菌条件は $k\theta$ (-) という無次元項で決定される。今この殺菌条件 $k\theta$ を、前述のごとく最大耐熱性の *Bacillus stearothermophilus* ($k=1\text{min}^{-1}$ at 120°Cとする) についてみたとした場合と実際に培養工学において汚染雑菌としてあらわれる可能性が濃いとおもわれる *Bacillus subtilis* ($k=3\text{min}^{-1}$ at 120°Cとする) についてみたとした場合とを比較してみれば、 k 値で後者は3倍になっているから θ 値(熱殺菌時間)で後者は前者の $\frac{1}{3}$ で済むわけである。いいかえれば最大耐熱性孢子を対象として熱殺菌理論を進めることにより実際に必要であろうと考えられる熱殺菌時間のほぼ3倍の殺菌時間を適用する結果になっているといえる。

すなわち、この場合は熱殺菌時間に対する安全率として約3という数値を採用していることになるであろう。

要 約

細菌孢子凝塊の耐熱寿命分布が、単孢子の指数分布に対して正規分布に近い形をとること、ならびに平均耐熱寿命が凝塊構成孢子数の対数にほぼ比例して増大することを計算により示した。

孢子凝塊混在の殺菌成功率におよぼす影響を凝集のためプレート・カウント法によるみかけの生菌数測定値にあらわれなかった孢子数を加算することにより解析できることを実験例で明らかにした。

また、熱殺菌操作時間の決定における安全率の概念について論じた。

記 号

- d : 細菌孢子凝塊の直径 (μ)
 $f(\theta)_n$: n 個の孢子からなる孢子凝塊の耐熱寿命分布函数 (min^{-1})
 i : 整数
 j : 整数
 k : 細菌孢子的平均耐熱寿命の逆数 (min^{-1})
 N_j : n_j 個の孢子からなる孢子凝塊の数 (-)
 N_0 : plate count 法にもとづく初発孢子数 (-)
 N^* : 初発全孢子数 (-)
 n, n_j : 孢子凝塊内の孢子数 (-)
 $P, P(\theta)$: N_0 にもとづく殺菌成功率 (-)
 P^* : N^* にもとづく殺菌成功率 (-)
- θ : 加熱時間 (min)
 $\bar{\theta}_1$: 単孢子的平均耐熱寿命 (min)
 $\bar{\theta}_n$: n 個の孢子からなる孢子凝塊の平均耐熱寿命 (min)
 $\tau_{N^* \rightarrow 0}$: 最確全死滅時間 (min)

文 献

- 1) 坂口, 天羽: 農化, **25**, 104 (1951).
- 2) 戸田, 合葉: 本誌, **44**, 447(1966).
- 3) 合葉, 戸田: 本誌, **43**, 527 (1965)
- 4) 照井: 昭和40年度日本醸酵工学大会 (大阪)
- 5) Rahn, O.: *J. Gen. Physiol.*, **13**, 179 (1929).
- 6) Rahn, O.: *Temperature, its Measurement and Control in Science and Industry*, 409 Reinhold Publishing Corporation, N. Y. (1941).
- 7) Townsend, C. T., Esty, J. R., Baselt, F. C. : *Food Res.*, **3**, 323(1938).

(昭41. 2. 22 受付)

質 疑 応 答

小林次郎 (東京教育大)

耐熱寿命分布の定義ならびに照井先生の平均死滅所要時間とのちがいについて説明してください,

戸 田

耐熱寿命分布の定義は, N_0 個の細胞集団の中で耐熱寿命が θ である細胞 (群) の割合ということになります. 照井先生の発表されました平均死滅所要時間 (τ_N) は, N 個の細胞集団が ($N-1$) 個に減数するの

に要する最確時間であると考えられますから, もし上記の定義において耐熱寿命が θ より大きく ($\theta + \Delta\theta$) よりも小さい細胞の数が一個になるように $\Delta\theta$ をとれば, これが τ_N に相当すると考えられます.

照井 (大阪大学)

死滅速度が対数法則を示す微生物の場合に限ればいづれの考え方からも同一の結果が得られます.