

食品保存へのオゾンの利用に関する研究 (第35報) 糸引納豆の納豆菌バクテリオファージによる素豆生成と オゾンによる防止に関する研究

内藤茂三

納豆は大別して糸引納豆と塩納豆に分けることができる。糸引納豆とは蒸した大豆に納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) を接種し、適温に保ち、繁殖発酵熟成をせしめてつくったもので、塩納豆は *Aspergillus oryzae* を蒸し大豆に接種繁殖させ、塩漬けして耐塩性酵母、乳酸菌等の力をかりて熟成して作ったものである。一般の納豆と称するのは糸引納豆であり、全国的に普及していてその生産数量も多い。塩納豆は浜納豆、大徳寺納豆等でありその生産量も少ない。良質の糸引納豆は納豆菌が旺盛に繁殖して、白色の菌膜が大豆粒の全面をおおい、かつ粘質物を充分つくらせて糸引きが強いことが条件である。納豆製造にあたっては活性の高い選択された菌種を接種し、発酵条件、ことに温湿度条件の適正な管理に注意が払われる。納豆製造工場は小規模な事業所が多く、製造設備、発酵管理には不備な点がかなりあって、実際の製造工場では変質納豆が多く製造される。今回、糸引納豆に糸引きが不十分であるか、または全く糸を引かない素豆製品が多量に生成された。糸引性が失われる原因として納豆菌バクテリオファージ (以下「ファージ」と略す) 感染^{1), 2)}、乳酸菌³⁾ による汚染が考えられる。今回はこの素豆生成原因のうち、ファージ感染を検討するとともに、これを防止するためにオゾンを利用して検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

名古屋市内で販売されていた16種類の納豆。さらに愛知県内納豆工場で生産された製品及び同工場の製造工程よりサンプリングした半製品及び納豆製造工場の発酵室内の壁、床、棚などの塵埃、作業現場の溜り水、排水口などの泥を採取した。納豆の製造工程を図1に示した。

2. 微生物菌数の計数及び分離

細菌の計数及び分離には標準寒天培地を用い、試料の10倍段階希釈を作製し、混濁法により30℃、2日間培養後に出現したコロニーを計数及び分離した。乳酸菌の計数及び分離にはBCP加プレートカウント寒天培地とGYP白垂寒天培地を用い、同様に試料の10倍段階希釈

を作製し、塗抹法により寒天平板を作製した。培養は、ガスパック嫌気システム (BBL社製) を用い、30℃、3日間行い、BCP加プレートカウント寒天培地では黄変したコロニーを計数し、GYP白垂寒天培地では炭酸カルシウムを溶解したコロニーを計数した。また出現したコロニーを釣菌し、上記寒天平板への塗抹法により純化した。

3. ファージの検出

試料10gに50mℓの滅菌生理食塩水を加えてよく懸濁し、遠心分離して上澄を取り、これに数滴のクロロホルムを加えて振とう後静置し、上澄の0.5mℓを取って、Adamsの寒天重層法⁴⁾を用いて宿主菌と共に37℃で20時間培養してファージの検出を行った。培地は肉エキス1%、ポリペプトン1%、食塩0.5%、pH6.8のブイヨンを用い、重層用の下層培地には寒天1.5%、上層には0.5%加えたものを用いた。この実験を通じて *Bacillus subtilis natto* Naruse を宿主菌として用いた。



図1 糸引き納豆の製造工程

4. ファージの増強

ファージが検出されたプレートより、白金耳でブランクの単一分離実験を行ない、冷生理食塩水に懸濁し希釈して宿主液と重層し、ブランクを形成させた。再びブランクを単一分離し、5 ml のブイオン培地を入れた試験管に採取し、37℃ で20時間静置培養した。別に対数増殖期にある宿主培養液を用意し、これに上記培養ファージ液を接種して溶菌するまで振とう培養した。溶菌液は10,000rpm で10分間遠心分離し、上清を実験に用いた。

5. ファージ宿主菌

宿主域を検討するために以下の *Bacillus* を用いた。 *B. subtilis* IFO 3007, *B. subtilis* IFO 3022, *B. subtilis* IFO 3025, *B. subtilis natto* IFO 3009, *B. megaterium* IFO 3970, *B. coagulans* IFO 3557, *B. coagulans* IFO 12583, *B. stearothermophilus* ATCC 14580, *B. subtilis natto* Miyagino, *B. subtilis natto* Naruse。これらの菌株の20時間培養液を重層法でプレートした後、上記で得られたファージ溶菌液を滴下し、37℃ で20時間培養した。ファージに対する感受性は生じる溶菌斑によって判定した。

6. ファージの安定性

pH、熱及びオゾンに対する安定性は、処理時のファージ濃度が 1.2×10^8 /ml になるようにして行った。すなわち、pH 安定性には種々な pH のブイオン培地を10ml 調製し、これに 1.2×10^{10} /ml のファージ液を0.1ml 加え、37℃ で1時間保持した。熱失活では10ml のブイオン培地を予め所定の温度に保持し、これに 1.2×10^{10} /ml のファージ液を0.1ml 加え、5分間保った後直ちに氷水中に急冷した。

7. ファージのオゾンによる不活化試験

オゾンによる失活は、 10^{-2} M の Mg を含む M/20 トリス緩衝液中に懸濁したファージ液の1ml を9ml の所定濃度のオゾン水に混合し、所定時間処理後一定量を採取し、ブイオン培地に入れて反応を停止した。

8. オゾン水の製造

オゾン水の製造は、オゾン水製造ユニット（西日本水質保障(株)製、NOR-2Z-WL-2 I-RKS-250型）を用いた。本装置は高濃度のオゾン水を製造するために、酸素ポンプよりオゾンを生じ、これを水に溶解させる溶解器（MPG）が備えられ、製造したオゾン水は気液分離タンク（100L用、材質 SUS 製で内面テフロンコーティング）に貯蔵した。使用水はイオン交換水を用い、水温 5℃、酸素0.74kg/cm²、酸素流量1.2ℓ/分、MPG 圧力 0.70kg/cm² の条件で行った。

9. オゾン水濃度の測定

オービスフェア Model-2750（オービスフェアラボラトリーズ・ジャパン(株)製）を用いた。

実験結果

1. 納豆からファージの検出

糸引性を失った納豆（素豆）10袋（試料1～10）を試料とし、簡単なスポット試験法によりファージの検出を行った。すなわち、溶菌斑形成法においてファージを加えることなく対象菌（*B. subtilis natto* Naruse）だけをスポットし、その上に被検液を1滴スポットして37℃ で培養し、20時間培養後スポットした部分の溶菌の有無を検討した。なお被検液としては、試料納豆を無菌水で洗った洗液の遠心分離上清及び試料納豆を対象菌と20時間振とう培養してファージを増強したものの遠心分離上清との2種類を用いた。その結果を表1に示した。試料1, 3, 5, 8では納豆洗液及び増強液ともに溶菌が認められファージの存在が確認されたが、その他の試料ではさらに溶菌性酵素の存在や、菌が溶原菌である可能性も考えられた^{5), 6)}。

表1 納豆菌バクテリオファージによるスポット溶菌斑の形成

試料糸引き 納豆番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
納豆洗液	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
増強液	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+

+: 溶菌斑生成。 -: 溶菌斑生成せず
対象菌: *Bacillus subtilis natto* Naruse

2. ファージの分離とその性質

常に溶菌が認められた試料1, 3, 5, 8での溶菌の原因がファージであることを確認するために、その分離及び耐熱性、継代性、宿主特異性の検討を行った。試料1の納豆の洗液をブイオンで希釈し、対象菌を指示菌として重層法で溶菌斑を形成させ、単一溶菌斑からの分離を繰り返して均一な溶菌斑を生じることを認めた。溶菌斑は平均直径約1mmの不正円形、透明で、周辺ははっきりしておりハローは認められなかった。試料3, 5, 8においても同様な溶菌斑が認められた。このようにして得られたものを純粋な溶菌源とした。これらの4試料の前記増強上澄について、100℃、10分間の加熱処理を行ったところ、溶菌斑形成力を失った。試料1の単一溶菌斑を白金線で穿刺し対象菌と37℃、20時間振とうした培養液上澄には 3.0×10^7 /ml の溶菌源が認め

られ、この1mlを再び対象菌と培養し、同様の操作を3回行った後の上澄にも $5.7 \times 10^9/\text{ml}$ の溶菌源を認めた。このことから溶菌源が増殖していると考えられる。試料3, 5, 8から分離された溶菌斑についても同様なことが認められた。種々の *Bacillus* 属細菌を用いて、スポット試験法で宿主域を調べた結果を表2に示した。いずれの試料から分離された溶菌斑においても作用域は全て *Bacillus subtilis natto* に限定され、宿主特異性が顕著であった。種々の pH に調製した培養液に1/100容の試料1より分離したファージ液を加え、37℃ に1時間保った後の残存ファージを定量した結果を図2に示した。pHは5~9の範囲で安定であった。所定温度の培養液に1/100容のファージ液を混合し、10分間保った後急冷し、残存ファージ数を測定した結果を図3に示した。80℃、10分間で完全に死滅した。その他の試料から分離したファージ液についてもほぼ同様の結果を得た。

3. ファージによる糸引き阻害

水に18時間浸漬して吸水させた大豆100粒を三角フラスコに入れて、120℃、20分間加圧滅菌したものに対象菌—白糸耳及び試料1の各種濃度のファージ液1mlを接種し、糸引きに対するファージの影響を検討した。37℃ で20時間培養後、20℃ に放置し、7日間観察した結果を表3に示した。ファージ濃度は大きいときは、はじめから完全に糸引き性が阻害され、低濃度の時には、はじめは糸引きが認められるが次第に糸引き性が失われることが認められ、ファージ感染が糸引き阻害の原因であることが認められた。その他の試料(3, 5, 8)から分離したファージも同様の結果が認められた。

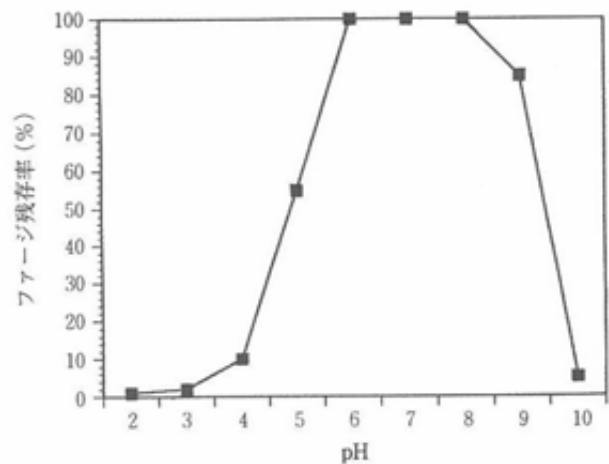
4. オゾン水によるファージの不活化

オゾン水による試料1のファージ液の不活化を検討した結果を表4に示した。オゾン水濃度は0.3~10ppmで行い、処理時間は30~300秒間で行った。その結果、

表2 納豆菌バクテリオファージの宿主域

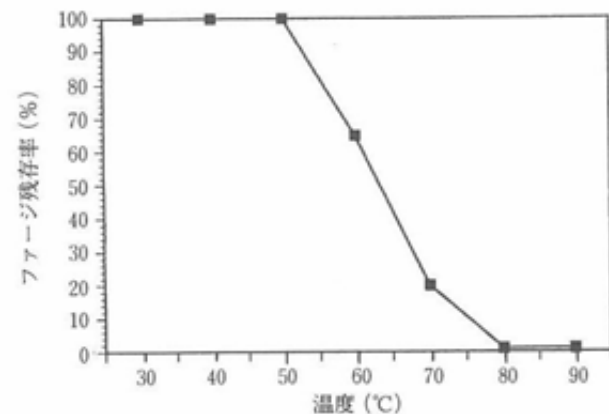
供試菌株	溶菌斑			
	試料1	試料3	試料5	試料8
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3007	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3022	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3025	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis natto</i> Naruse	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis natto</i> Miyagino	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis natto</i> IFO 3009	+	+	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> IFO 3557	—	—	—	—
<i>Bacillus coagulans</i> IFO 12583	—	—	—	—
<i>Bacillus megaterium</i> IFO 3970	—	—	—	—
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 14580	—	—	—	—

+: 溶菌斑生成, —: 溶菌斑生成せず



ファージ初発濃度: $1.2 \times 10^8/\text{ml}$

図2 培養液のpHと試料から分離した納豆菌バクテリオファージの安定性



加熱条件: 10分間, ブイヨン培地 (pH7.0)
ファージ初発濃度: $1.2 \times 10^8/\text{ml}$

図3 加熱温度と試料から分離した納豆菌バクテリオファージの失活

表3 試料1より分離した納豆菌バクテリオファージによる納豆の糸引き阻害

培養日数	添加ファージ量 (/大豆100粒)			
	無添加	1.2×10^2	1.2×10^4	1.2×10^8
1	+	+	+	—
2	+	+	—	—
3	+	—	—	—
4	+	—	—	—
5	+	—	—	—
6	+	—	—	—
7	+	—	—	—

+: 糸引き性あり, —: 糸引き性なし
培養条件: 37℃, 20時間培養後, 20℃ 放置

表4 納豆菌バクテリオファージのオゾン水による不活化

オゾン水濃度 (ppm)	処理時間 (秒)					
	30	60	120	180	240	300
0.3	2.8×10^7	2.2×10^7	3.1×10^7	2.0×10^7	3.2×10^7	5.2×10^7
0.5	3.5×10^7	5.1×10^7	3.1×10^7	2.1×10^7	5.7×10^7	6.2×10^7
0.8	3.9×10^7	4.6×10^7	6.2×10^7	5.2×10^7	4.1×10^7	3.8×10^7
1.0	1.1×10^5	7.3×10^4	—	—	—	—
2.0	—	—	—	—	—	—
5.0	—	—	—	—	—	—
8.0	—	—	—	—	—	—
10.0	—	—	—	—	—	—

初発納豆菌バクテリオファージ量： 3.2×10^7 /g

—：検出せず

オゾン水濃度1.0ppm、120秒接触でファージは失活した。また2.0、5.0、8.0、10.0ppm 接触ではいずれも30秒接触で完全に不活化した。しかし0.3、0.5、0.8ppm 濃度では接触時間を30秒から300秒に延長しても失活せず安定であった。

5. 納豆工場のファージ汚染

原料大豆、浸漬、蒸煮、菌接種、容器への充填（盛り込み）、発酵、放冷・冷蔵工程におけるファージの汚染について検討した結果を表5に示した。

浸漬工程においては、洗浄した大豆を2.5～3.0倍の水に浸漬するが、浸漬時間は原料大豆により異なる。一般

表5 納豆製造工場の納豆菌バクテリオファージ汚染

製造工程	測定場所		
	床	機械・器具	側溝・壁・棚
洗浄	—	—	—
浸漬	—	—	—
蒸煮	—	—	—
納豆菌接種	+	—	+
容器充填	+	+	+
発酵	+	+	+
放冷・冷蔵	—	—	—

+：納豆菌バクテリオファージ検出

—：納豆菌バクテリオファージ検出せず

表6 納豆製造工場の納豆菌バクテリオファージ汚染防止へのオゾン水処理

製造工程	測定場所		
	床	機械・器具	側溝・壁・棚
洗浄	—	—	—
浸漬	—	—	—
蒸煮	—	—	—
納豆菌接種	—	—	—
容器充填	—	—	—
発酵	—	—	—
放冷・冷蔵	—	—	—

+：納豆菌バクテリオファージ検出

—：納豆菌バクテリオファージ検出せず

約3か月間、毎日、水洗後0.5～1.0ppmのオゾン水で洗浄

的には夏で10～12時間、冬は18～24時間浸漬すると体積は約2倍となる。この工程におけるファージ汚染は全く認められず、乳酸菌による汚染が認められた。蒸煮工程は高压釜を用いて行うが、圧力は1.0～1.4kg/cm²で約30分間程度、指で大豆がつぶれる程度に行っている。この工程におけるファージ汚染は全く認められなかった。納豆菌の接種工程は蒸煮大豆130kgに対して2～5gの市販納豆を2～5ℓの煮沸殺菌した水にけん濁させ、この液を蒸煮大豆の品温が80℃程度になったときに噴射接種し、混合する。この工程において一部床よりファージが検出された。容器への充填工程とは接種蒸煮大豆を容器に盛り込む工程であり、機械詰の自動工程であるが二次汚染菌の最も多い工程であり、多くのファージが床及び機械より検出された。また作業現場の溜り水、排水口などの泥よりファージが検出された。発酵工程は盛り込んだ容器を仕入箱に並べ、35℃の室に入れて発酵させる工程であるが、納豆菌は35℃、80～90%の湿度に保つと1～2時間で発芽を始め、6時間で品温が上昇し、10～12時間で発熱量が最高になり、50℃を超えるため温度、湿度を下げる。このためファージの増殖は極めて早く、発酵室では床よりファージが検出された。発酵室内の壁、床、棚等の塵埃よりファージが検出された。発酵は15～18時間行い、室出しを行い、直ちに冷蔵庫に入れて後熟発酵を行い製品とするがこの工程におけるファージの汚染はほとんど認められなかった。

6. 納豆製造工場のオゾン水によるファージ不活化

ファージが検出された納豆菌の接種工程、容器への充填工程、発酵工程の床等の洗浄にオゾン水を用いて検討した結果を表6に示した。約3か月間、0.5～1.0ppmのオゾン水を用いて洗浄した結果、いずれの工程においてもファージは検出されなかった。

考 察

納豆における素豆の原因は納豆菌ファージと乳酸菌による2種類が認められる。今回は、納豆菌ファージによる素豆生成とその防止をオゾンを用いて検討した。ファージの感染によって納豆菌が生成する粘質物である γ -ポリグルタミン酸が分解され、粘度が低下することは既に明らかにされている⁷⁾。納豆菌の宿主範囲は比較的広く、分離されたファージ菌は全ての納豆菌を侵す、比較的特異性の狭いファージであると考えられる。このように、わが国には納豆菌ファージに抵抗性を示す菌株はないので、ファージ汚染対策として最も実用的な、ファージ抵抗性菌株を利用したローテーション法は採用することはできない。実際に2~3種の納豆菌がブレンドされている場合が多いが、これは風味等に寄与するものでファージ対策にはならないことを示している。今回納豆製造工場の床等よりファージが検出されたことより、下水は常時納豆菌が流入しているため、ファージの存在する可能性は高く、また多くの事例が報告されている⁸⁾。下水からのファージの検出は、感染源となるファージの探索とともに、その工場におけるファージ汚染の指標となるものであるから極めて重要である。ファージは熱に弱く、普通60℃、10分間で失活する。従って、ファージ汚染が起きた場合には、製造工程各ラインの熱湯消毒が有効である。その際、機械の上下に付着している納豆やその粕はファージ汚染につながるのので、取り除いて熱湯消毒する必要がある。しかし、熱湯消毒は有効であるが、作業性が悪く、毎日処理することは不可能であり、ファージによる納豆の素豆ができてからの処理となるのが普通である。そこで今回、簡易にファージを失活させる方法としてオゾン水を利用して検討した結果、オゾン水はファージに有効であり、毎日作業後オゾン水処理することにより失活させることは可能であった。ファージは細菌を侵すウイルスで、植物ウイルス、動物ウイルスに対して細菌ウイルスとも呼ばれる。ウイルスはオゾン耐性が弱く、通常0.05~0.45ppmのオゾン水濃度、120秒処理で失活する⁹⁾。納豆のファージの場合にはその製品中に存在しており、納豆菌が存在するところには必ず生育する。納豆菌が 10^4 /m^g以下ではファージが感染する機会はなく、従ってファージによる増殖も起こらない。

このことは、ファージの感染には納豆菌の濃度が重要な因子となっていることを示している。このため納豆製造工場は多くの納豆菌を毎日噴霧しているためにファ-

ジの感染の機会が多い。しかし、納豆製造工場においてファージ汚染の防除を容易にしているのは、納豆製造が固体発酵であるため、たとえ毎日ファージの汚染があっても他の納豆に急激に汚染する機会が少ないので多くの場合気づくのが遅れる。このため製造工程の一つとして毎日オゾン水で工場を洗浄することは有効であると考えられる。

要 約

- 1) 糸引性を失った納豆10袋のうち4袋から納豆菌バクテリオファージが検出された。
- 2) 納豆菌バクテリオファージを分離して、耐熱性、継代性、宿主特異性、pH安定性について検討した結果、耐熱性はなく80℃、10分間で失活し、継代性は認められ、宿主特異性は納豆菌にのみ認められ、pHは5~9の範囲で安定であった。
- 3) 納豆菌バクテリオファージを接種することにより完全に糸引き性は認められなくなった。
- 4) オゾン水による納豆菌バクテリオファージの不活化を検討した結果、オゾン水濃度1.0ppmで120秒処理で完全に不活化された。
- 5) 納豆製造工場のバクテリオファージ汚染について検討した結果、納豆菌バクテリオファージは納豆菌の接種工程、接種蒸煮大豆盛り込み工程、発酵工程より検出された。
- 6) 納豆工場より納豆菌バクテリオファージが検出された工程を約3か月間、毎日水洗後0.5~1.0ppmのオゾン水で処理することにより納豆菌バクテリオファージは完全に除去することができる結果を得た。

文 献

- 1) 藤井久雄, 沖邦子, 牧原ミヨ子, 芥野淳子, 武谷立子: 農化, 41, 39 (1967)
- 2) 藤井久雄, 白石淳, 吉柳公恵, 藤本幸枝: 福岡女子大学家政学部紀要, 14, 1 (1983)
- 3) 内藤茂三: 未発表
- 4) Adams, M. H.: Bacteriophages, Interscience Publishers, Inc., New York p. 443 (1959)
- 5) 野村真康, 細田淳子: 農化, 30, 233 (1956)
- 6) 里村幸男, 岡田茂孝, 福本寿一郎: 農化, 31, 281 (1957)
- 7) Yoshimoto, A., Nomura, S., Hongo, M.:

Agric. Biol. Chem. , 37, 83 (1973)

8) 吉本明弘, 野村繁幸, 本江元吉: 発工, 48, 660
(1970)

9) 合田 健: 日本水処理生物誌, 16, (2), 15
(1975)