

## 研究論文

# 水煮大豆製造過程における微生物増殖要因の検討

近藤温子\*1、安田(吉野)庄子\*1、丹羽昭夫\*1、鳥居貴佳\*1

## Microbial Growth in Boiled Soybean Production Process

Atsuko KONDO\*1, Shoko YOSHINO-YASUDA\*1, Akio NIWA\*1  
and Takayoshi TORII\*1

Food Research Center\*1

水煮大豆製造過程における細菌の増殖挙動を分析したところ、浸漬工程では温度依存的な菌数増殖が認められた。また、中温菌が増殖しやすい 25℃前後の浸漬では、わずかな温度差が浸漬後の菌数に大きく影響した。危害モデル微生物として枯草菌及び黄色ブドウ球菌を用い、滞留時間を想定した植菌試験を行ったところ、どちらの菌も 30℃での滞留では短時間で急速な菌数増加が確認され、各工程での温度管理の重要性が示唆された。

### 1. はじめに

水煮大豆は製造過程において、**図 1**に示すように長時間水に浸漬させる工程や調理加熱(釜煮)から殺菌までの間に滞留時間がある事例があり、微生物制御に関して潜在的リスクを抱えている食品の一つと考えられる。これまで、関連業界では大規模な食中毒事故や回収事件などは起こっていないが、2018年の食品衛生法改正により HACCP が制度化されるなど、近年では食品業界全体として衛生管理方法の見直しや改善がなされている。

HACCP は“Hazard Analysis and Critical Control Point(危害分析・重要管理点管理システム)”の略語で、“食品の安全性”を保証する仕組みとして、世界的に認められている管理システム<sup>1)</sup>である。国内における HACCP の制度化では「原則、全ての食品等事業者が HACCP に基づく(もしくは HACCP の考えの考え方に沿った)衛生管理」が求められる。HACCP の実施にあたり前提条件として「一般衛生管理」の着実な実施が必要不可欠であり、製造過程における細菌増殖の知見を得ることで詳細な危害分析や一般衛生管理の向上が可能になると考えられる。

本研究ではこうした食品衛生に関する社会環境の変化を背景とし、衛生管理向上の観点から水煮大豆製造過程における微生物増殖要因とその増殖挙動を明示することを目的に、**図 1**に示す水煮大豆製造工程に従い「浸漬工程」及び「釜煮から殺菌までの滞留時」における細菌の増殖傾向をモデル実験により分析した。

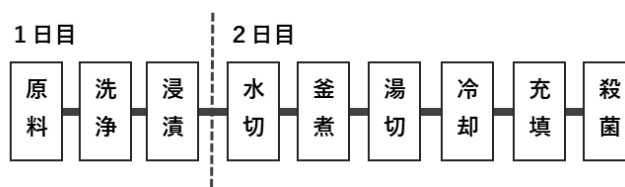


図 1 水煮大豆製造工程の例

### 2. 実験方法

#### 2.1 材料

県内の卸売業者より入手した国産大豆(ユキホマレ)及び輸入大豆(銘柄不明)を原料大豆とした。

#### 2.2 微生物菌数の測定

生菌数の測定には、標準寒天培地を使用した。混釈法により 35℃で 48 時間培養し、出現したコロニーの数を測定した。

#### 2.3 浸漬処理

原料大豆に 4 倍重量の滅菌水を加え、初発菌数を均一にするために 10℃で 30 分間静置した。その後、大豆と液体部(以下、浸漬液)の重量を計測し、同じ比率になるように滅菌容器に小分けした。これらを 20℃、24℃、25℃、26℃、27℃及び 30℃に設定した恒温器内で 16 時間保存した。浸漬液の初発菌数及び保存後の浸漬液と大豆の生菌数を測定した。

#### 2.4 微生物の分離と同定試験

##### 2.4.1 微生物コロニーの外観観察

2.3 の操作で標準寒天培地上に出現したコロニーの外観観察を行った。

\*1 食品工業技術センター 保蔵包装技術室

## 2.4.2 MALDI-TOF MS による同定試験

AXIMA 微生物同定システム((株)島津製作所)を使用した。試料調製は 70%エタノール処理後 25%ギ酸処理を行った。解析は、ソフトウェア SARAMIS Premium(データベース Version4.13、ビオメリュー、(株)島津製作所)を使用した。

## 2.4.3 16S rDNA 配列による同定試験

第十七改正日本薬局方の参考情報「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に準じて行った。PrepMan ULTRA(ライフテクノロジーズ社)を用いて細菌コロニーの DNA を抽出し、約 1.5 kbp の 16S rDNA 領域を PCR 増幅した後、前半約 500 bp の塩基配列を決定した。得られた配列を NCBI(National Center for Biotechnology Information)<sup>2)</sup>の BLASTN プログラムに供し、相同性検索により種を推定した。

## 2.5 危害微生物の植菌試験

原料大豆(国産大豆)に 4 倍重量の水を加え、20℃に設定した恒温器内で 16 時間静置した。水切りした大豆を耐熱袋に移して沸騰水中で 15 分間湯煎処理を行った。この大豆を滅菌容器に 10g ずつ分注し、枯草菌(*Bacillus subtilis* ATCC19659)あるいは黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* NBRC12732)を 1 白金耳量生理食塩水に懸濁させたものを 100 $\mu$ L 植菌した。これらを 10℃、20℃及び 30℃に設定した恒温器内で保存し、初発、4 時間後、8 時間後及び 24 時間後の生菌数を測定した。

## 2.6 大豆由来の栄養分が微生物増殖に与える影響の検討

原料大豆(国産大豆)に 4 倍重量の滅菌水を加えて 10℃で 30 分静置後に大豆を除去し、浸漬液のみ(以下、大豆の短時間浸漬液)を回収した。これを滅菌容器に分注し、20℃、25℃及び 30℃に設定した恒温器内で 16 時間保存した。なお、比較対照として生理食塩水に黄色ブドウ球菌(*S. aureus* NBRC12732)を植菌し、20℃、25℃及び 30℃に設定した恒温器内で 16 時間保存した。これらの初発菌数及び保存後の生菌数を測定した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 浸漬温度が微生物増殖に与える影響

一般に、自然界に分布する腐敗原因菌や病原菌は中温菌が大半であることから、20℃、25℃及び 30℃で浸漬処理後の浸漬液及び大豆の生菌数を測定した。その結果を図 2 に示す。浸漬処理温度 20℃、25℃及び 30℃では、国産大豆及び輸入大豆の双方において温度が高いほど生菌数が増加した。

次に、国産大豆を用いて 24℃、25℃、26℃及び 27℃で浸漬処理後の浸漬液及び大豆の生菌数を測定した。その結果を図 3 に示す。浸漬処理温度 24℃、25℃、26℃

及び 27℃における浸漬液の生菌数は 24℃と 25℃で同等であり、26℃と 27℃は 25℃から約 1 桁菌数が増加する傾向が得られた。大豆では 24℃と 25℃で約 1 桁菌数に差があり、26℃と 27℃は同等の菌数であり 25℃試験区より約 1 桁菌数が高い傾向が得られた。浸漬処理後の菌数変化は原料大豆に付着していた微生物の種類によっても異なると考えられるが、同様の試験を繰り返し行った結果から、中温細菌が増殖しやすい 25℃前後では 1℃や 2℃のわずかな温度差が浸漬処理後の菌数に大きく影響を与えると考えられた。

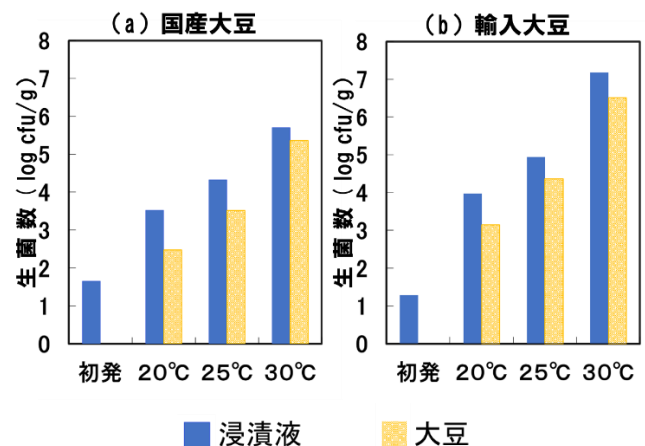


図 2 浸漬処理温度と微生物菌数

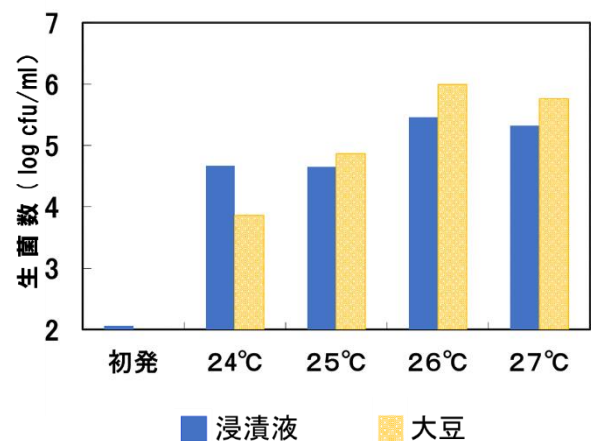


図 3 浸漬処理温度 25℃前後の微生物菌数(国産大豆)

### 3.2 細菌の分離と同定

3.1 で生菌数測定を行った際に検出したコロニーの外観を図 4 に示す。初発で検出したコロニーの外観から、原料大豆には多種類の細菌が存在していると推測された。一方、浸漬処理後に観察されるコロニーの外観は同一もしくは類縁と推測されるものが多く、増殖の速い細菌など優勢菌の存在が考えられた。

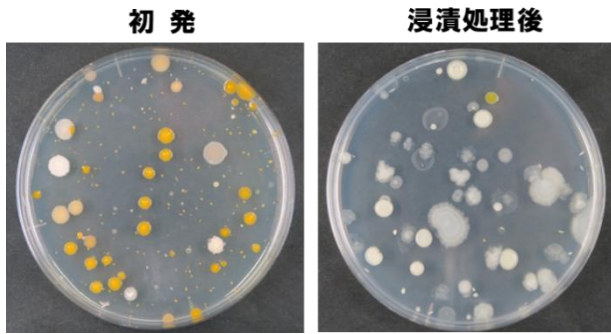


図4 初発及び浸漬処理後に検出した微生物コロニーの外観例

初発で出現したコロニー約 130 個について MALDI-TOF MS によるクラスター解析を行ったところ、国産大豆の分離菌と輸入大豆の分離菌の多くは共通の種に分類された。また *B.subtilis* や *B.pumilus* など *Bacillus* 属細菌が多数検出された。*Bacillus* 属細菌は耐熱芽胞菌であることから、釜煮による加熱でも死滅せずに生存する可能性が考えられる。さらに、*Bacillus* 属細菌に属するセレウス菌(*Bacillus cereus*)は毒素生産型食中毒菌であり、他の *Bacillus* 属細菌と同様に原料大豆に付着している可能性が考えられた。セレウス菌が生産する嘔吐毒(セレウリド)は耐熱性であり、126℃で 90 分の加熱処理でも失活しないと報告されている<sup>3)</sup>。また、発症菌量の目安は  $10^5 \sim 10^8/g$  と考えられている<sup>3)</sup>。これらの特徴より、原料由来の食中毒危害微生物としてセレウス菌が考えられ、腐敗や品質低下の原因菌として *Bacillus* 属細菌が考えられた。

MALDI-TOF MS にて同定できなかったコロニーの一部を選抜して 16S rDNA 配列による種の同定を行ったところ、バチルス属細菌と同様に耐熱芽胞菌である *Paenibacillus* 属が同定された。その他に *Pantoea* 属や *Sphingomonas* 属など自然界に広く分布する細菌が検出された。また検出頻度は非常に少ないが低温細菌の *Pseudomonas* 属や、*Staphylococcus* 属が検出された。

*Staphylococcus* 属細菌はヒトの皮膚や粘膜の常在菌であり、この中には黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)も含まれる。黄色ブドウ球菌はヒトを取り巻く環境中に広く分布し、健康人の鼻腔、咽頭、腸管等にも生息しており、その保菌率は約 40%と報告されている<sup>4)</sup>。黄色ブドウ球菌自体の耐熱性は高くないものの、産生されるエンテロトキシンは耐熱性が高く、通常の加熱調理では活性を失わない<sup>4)</sup>。黄色ブドウ球菌が食品中で増殖し  $10^5 \sim 10^9/g$  程度になると、その過程で産生されるエンテロトキシンが発症毒素量に達すると考えられている<sup>4)</sup>。原料大豆から黄色ブドウ球菌は検出されなかった

が、これらの特徴より二次汚染の危害微生物として黄色ブドウ球菌が考えられた。また、黄色ブドウ球菌やセレウス菌が生産する毒素は耐熱性であることから、製造中に発症目安菌数まで増殖させないことが重要と考えられた。

### 3.3 危害微生物の植菌試験

危害モデル微生物として枯草菌(*B.subtilis*)及び黄色ブドウ球菌(*S.aureus*)を用い、釜煮から殺菌までの滞留時間を想定した危害微生物の増殖挙動を分析した。その結果を図5に示す。

枯草菌と黄色ブドウ球菌どちらも 10℃、24 時間では菌数の増加は起こらず、20℃では 8 時間から 24 時間の間に 1 桁から 2 桁の菌数増加、30℃では 4 時間から 8 時間の間に対数増殖した。これらの結果より、夏場など気温の高い環境で停電や冷蔵庫の故障、窯煮後の冷却トラブルなど条件が重なると、日中の数時間でこれらの細菌が  $10^5/g$  まで増殖する可能性が考えられた。

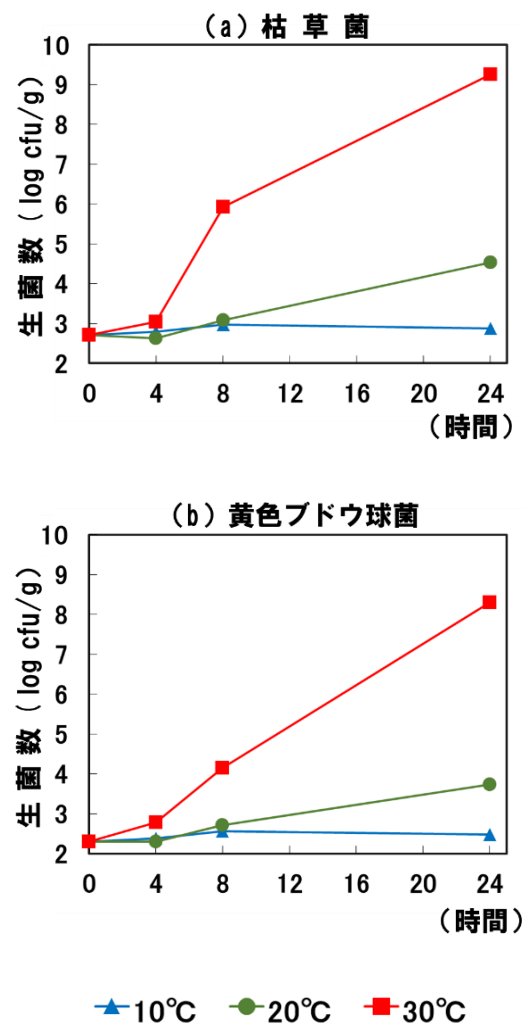


図5 危害微生物の植菌試験

### 3.4 大豆由来の栄養分が微生物の増殖に与える影響

微生物が増殖する主要因の一つに栄養分が挙げられる。そこで、大豆由来の栄養分が微生物の増殖に与える影響を検討するため、国産大豆に4倍重量の滅菌水を加えて10℃で30分静置させた後に大豆を除去し、大豆の短時間浸漬液における微生物の増殖挙動を検討した。なお、対照として生理食塩水に黄色ブドウ球菌を植菌したものをを用いた。その結果を図6に示す。

短時間浸漬液では、図2と同様に温度が高いほど生菌数の増加が認められ、短時間浸漬により溶出した栄養分であっても大豆を一晩浸漬させた際と同レベルの微生物増殖を引き起こすことが示唆された。一方、黄色ブドウ球菌が資化する栄養分を含まない生理食塩水中では、菌数変化は起こらなかった。この結果より、水煮大豆の製造工程では温度管理だけでなく、製造設備の清掃などによる栄養分の除去や二次汚染の防止も重要と考えられた。

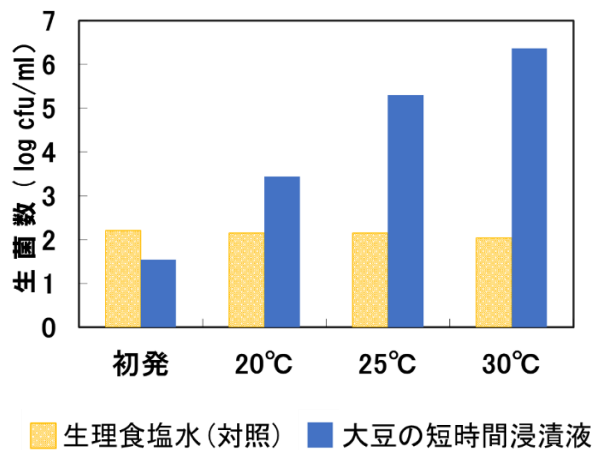


図6 大豆の短時間浸漬液に含まれる栄養分が原料大豆由来の微生物増殖に及ぼす影響

## 4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

- (1) 大豆浸漬工程では、温度依存的な微生物増殖傾向が認められた。また、25℃前後ではわずかな温度差でも浸漬後の菌数に差が生じた。
- (2) 原料由来の危害菌としてセレウス菌を含む *Bacillus* 属細菌が考えられ、二次汚染の危害菌として黄色ブドウ球菌が考えられた。
- (3) 釜煮から殺菌までの滞留時間を想定した枯草菌と黄色ブドウ球菌の植菌試験では、どちらも30℃、4時間から8時間で対数増殖した。
- (4) 水煮大豆製造工程では微生物の増殖に必要な3大要素(温度、水、栄養)が全て揃っていることから、製造過程の微生物制御では人為的にコントロールできる温度管理が非常に重要と考えられた。
- (5) 大豆を短時間浸漬した際に溶出する栄養分でも微生物が十分に増殖したことから、温度管理だけでなく設備の清掃や二次汚染防止も重要と考えられた。

## 文献

- 1) 米虫節夫ら：やさしい ISO22000 食品安全マネジメントシステム, 11(2017), 一般財団法人日本規格協会
- 2) ホームページアドレス: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (2020/6/8)
- 3) 食品安全委員会: セレウス菌食中毒 (*Bacillus cereus* foodborne poisoning), [https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/06bacillus\\_cereus.pdf](https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/06bacillus_cereus.pdf) (2020/5/1)
- 4) 食品安全委員会: ブドウ球菌食中毒(Staphylococcal foodborne poisoning), <https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/09staphylococcal.pdf> (2020/5/1)