CO₂ ガスと微生物の増殖

木村 凡・藤井建夫

(東京水産大学食品生産学科)

Effect of CO₂ on Microbial Growth

Bon KIMURA and Tateo FUJII

(Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries,
4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108)

Key words: Modified atmosphere, Carbon dioxide, Microbial growth, Food packaging

1. はじめに

近年、食肉・水産業界における切り身加工は、スーパーなどのバックヤードで加工する方式に代わり、セントラル食肉加工場や水揚げ加工団地で一括して切り身加工・包装して流通する傾向が強まっている。また、賞味期限表示やPL法などの背景もあって、ガスバリア性フィルムによるガス置換(MA)包装が食品全般で普及しつつある。現在、ガス置換包装に用いられているガスはO₂ガス、N₂ガスおよびCO₂ガスの3種が主なものであるが、このうち、N₂ガスを用いる意味は酸素の除去効果であり、微生物による腐敗・変敗防止という観点からは真空包装や脱酸素剤を用いた包装と本質的に同じであり、好気性菌の増殖抑制が主たる効果と考えられている。また、O₂ガスは主として畜肉保存時の色調保持を目的として用いられている。一方CO₂ガスは、ある種の嫌気性細菌の増殖に不可欠であったり²⁸⁾、また菌類の孢子形成や、形態形成に不可欠な役割⁶⁰⁾を果たす一方、微生物一般に対する増殖抑制効果も認められている^{5, 13, 30)}。このようにCO₂ガスの微生物の増殖生理に及ぼす影響は複雑であり、CO₂ガスと微生物の増殖の関係についてはいまだ十分な知見が整理されておらず、しばしばCO₂ガスの食品保存への利用において情報の混乱の原因となっている。そこで、本稿ではCO₂ガスと微生物の増殖について最近の知見を中心に整理してみたい。

2. CO₂ガスによる食品中の微生物増殖防止

生鮮魚介類や畜肉のCO₂ガス置換包装によるシェルフライフの延長については数多く報告されており^{17-19, 34, 37, 48, 61)}、総説も出されている^{3, 4, 13, 16, 33, 41, 43, 54, 56)}。CO₂濃度が高いほど、細菌の増殖抑制に効果的であることが多くの研究^{5, 13, 37, 48)}で確認されている(図1)³⁷⁾。鮮魚や食肉の代表的好気性腐敗細菌

の *Pseudomonas* はCO₂ 20% 程度以上で増殖が抑制される^{13, 17, 34)}。 *Pseudomonas* を中心とした好気性腐敗細菌に対してのCO₂の増殖抑制効果および食品のシェルフライフの延長についてはすでに多数の総説があるので、本稿では通性嫌気性および偏性嫌気性の食中毒細菌の増殖に及ぼすCO₂の影響を中心に述べる。

食中毒細菌の大半を占める通性嫌気性細菌に関しては、これまでの報告を総括的にみると、*Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus* など、ほとんどすべての食中毒菌に関して概してCO₂による増殖抑制が認められている^{9, 25, 42, 47, 55)}。例えば *Salmonella* を牛肉に植菌し 10℃ で貯蔵した実験では、含気包装では、10日で3 log の増加が認められたのに対し、MA包装貯蔵(60% CO₂, 25% O₂, 15% N₂)では0.5 log のみの増加であったとする報告⁵⁵⁾や、牛肉を10℃ で9日間貯蔵すると、含気包装で3 log 増加した

図1 マアジフィレーを種々のガス置換包装で貯蔵(5℃, 4日)した場合における生菌数³⁷⁾。

がMA貯蔵(60% CO₂, 40% O₂)では*Salmonella*の増殖は完全に抑制されたという報告⁴²⁾などがある。*Staphylococcus aureus*をローストビーフに植菌し12.8℃で貯蔵した実験では、含気包装では貯蔵5日で2 logの増加を示したのに対し、CO₂ 75% (N₂ガス中)包装では貯蔵30日間にわたりほとんど増殖は認められなかったという報告もある²⁵⁾。この際、含気包装とMA包装での顕著な増殖の差がCO₂ガスによるものなのか、あるいはO₂ガス除去によるものかを明確にするために、CO₂ガス75%にO₂ガスを2~25%の種々の濃度で混合した実験も行われているが、O₂ガスの混合割合に関わりなく本菌の増殖は認められなかったことから、本菌に対する顕著な増殖抑制効果はCO₂ガスによるものであると結論されている²⁵⁾。

ガス置換包装による微生物の増殖抑制効果は後述するように20℃以上の中温ではほとんど期待できず、10℃以下のチルド流通と併用されることが前提条件であるとされている。このため、ガス置換包装下で上述した食中毒菌(ほとんどが最低増殖温度7~8℃以上)に関して危惧されているのは、主として流通時あるいは消費者の手に渡ったあとの一時的な温度管理不備条件下における挙動であり、この分野の研究も現在活発に行われている。また食品が温度管理不備下におかれた際の微生物の増殖を考える場合、温度履歴の観点から低温下での死滅および損傷の度合いにおよぼすMA貯蔵の影響も考慮に入れておく必要がある。*E. coli*, *S. aureus*, *C. perfringens*では、5℃付近の増殖もせず死滅もしない温度では、含気、N₂包装、CO₂包装などのガス組成による生残率に顕著な差が認められないが³⁵⁾、35℃以上でないで増殖せず20℃以下ではむしろゆるやかに死滅していくと考えられている*Campylobacter*では、含気区よりN₂区³¹⁾、さらにはN₂区よりはCO₂区の方が若干ではあるが死滅速度が緩やかになるとされている²⁾。特にO₂の除去によって*Campylobacter*の生残性は著しく高まることは多くの実験で確認されている^{2, 31)}。しかし、*Campylobacter*は低温ではいずれにせよ死滅していくわけであり、例えば、21℃、48時間保存した七面鳥では含気で3.6 log (/g)の*C. jejuni*数の低下に対し、CO₂ 100%でも2.3 log (/g)の低下が認められている⁵¹⁾。このことから、食品へのMA包装導入に伴う現実的なリスク防除の観点からは、ガス組成よりも原料肉の初発汚染菌数の方が問題であるとする考えもある⁵¹⁾。なお、*Campylobacter*は至適増殖温度である37℃下では気相中に10%程度のCO₂下で最適増殖を示すが、CO₂ 20%, N₂ 80%での増殖はCO₂ 10%に比べて抑制される²⁴⁾。

一方、最近、特にアメリカなどでローストビーフなどのクッキング済即席料理(ready-to-eat food)が普及し、これらをCO₂ガス置換包装すると、真空包装よりもシェルフライフが伸びることから、長期低温貯蔵下で増殖する低温性の食中毒菌として、*Listeria mono-*

図2 *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* および *Yersinia enterocolitica* を植菌した牛肉を真空包装とCO₂包装(100%)後、低温貯蔵した場合における各菌の増殖。
(Gill and Reichel²¹⁾の図を改変)。

cytogenes, *Aeromonas hydrophila*, および *Yersinia enterocolitica* がガス置換包装下における新たな危害菌として注目されている。これらの菌はいずれも低温増殖性であり、一見非腐敗食品のようにみえてもこれらの菌が増殖し食中毒を引き起こす可能性が危惧されている。そのため、CO₂ガス置換包装下におけるこれらの菌の増殖について最近活発に研究がおこなわれている。Farber¹⁴⁾は、七面鳥肉入りサンドウィッチのMA貯蔵(CO₂ガスとN₂ガスの混合気)中における*L. monocytogenes*の増殖を検討した結果、CO₂ガス50%以下(N₂ガス中)では、4℃および10℃において本菌の増殖が認められるが、CO₂ 75% (N₂ガス中)にすると4℃および10℃では全く増殖できず、これらサンドウィッチのMA貯蔵におけるCO₂混合比は少なくとも75% CO₂以上にすべきであると提唱している。Gill and Reichel²¹⁾は*L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *Y. enterocolitica*の低温増殖が可能な牛肉としてpHの比較的高い牛肉(pH 6.0以上)を用い、CO₂ガス置換包装の効果を検討している。pH 6.0以上の肉を保存試験の対象に選択した理由は、これらの食中毒菌は低温下ではpH 5.5以下で増殖しないからである。その結果、10℃の真空包装区、CO₂区(CO₂ 100%)および5℃の真空包装区では3菌ともに増殖したが、5℃のCO₂区では、*Y. enterocolitica* だけがかろうじて増殖したものの*L. monocytogenes*と*A. hyd-*

rophila は全く増殖を示さなかった。また、2℃では真空包装区ではやはり3菌とも増殖したが、CO₂区では3菌とも全く増殖しなかった(図2)²¹⁾。

一方、細菌の純粋培養を用いた連続培養系(chemostat)で、細菌の増殖に及ぼすCO₂ガスの影響を詳細に見た研究例もある。その中で、好気培養系においては、*Pseudomonas fragi*の最大比増殖速度はCO₂分圧の上昇とともに低下することが報告されている⁴⁴⁾。しかし、本菌のエネルギー生成系のどこにCO₂が抑制的に作用しているかなど、詳細な研究は行われていない。また、通性嫌気性菌についても、*Klebsiella aerogenes*の代謝にともなって産生されたCO₂分圧の上昇が、本菌の増殖収量を低下させることが明らかとなっている⁵⁸⁾。一方、アルコール発酵性のグラム陰性桿菌である*Zymomonas mobilis*についての研究では、その増殖がCO₂分圧上昇とともに抑制されるが、エタノール生産量はCO₂分圧によって影響されないことなども報告されている⁴⁶⁾。

以上のようにCO₂ガスは微生物の増殖に抑制的に作用する。以下にその抑制メカニズムについて現在までに得られている知見および仮説を整理してみる。

3. CO₂による微生物の増殖抑制メカニズム

一般に、低温になるほどCO₂による微生物の増殖抑制率は高くなる。魚肉や畜肉の保存性向上に関する研究でも、CO₂ガスによる微生物増殖抑制効果が明確に出るのは10℃以下の低温であり、20℃以上ではCO₂の細菌作用はほとんど認められていない^{5, 13, 37)}。CO₂による細菌増殖抑制効果の低温依存性の理由として、低温になるほど微生物のCO₂感受性が高まると考えるより、CO₂の溶解性が低温になるほど高くなり、その結果周辺環境のpH低下率、あるいは、微生物細胞の遭遇するCO₂量が多くなるからであるとする考えが有力である。Enfors and Molin¹⁰⁾はある温度でのCO₂ガスによる微生物増殖抑制率[(対照区での増殖速度-CO₂区での増殖速度)/対照区での増殖速度]×100とその温度でのCO₂溶解度の比を各温度ごとにとると、いずれの温度でも一定値になることを示している。

(1) 脱炭酸反応のフィードバック阻害

CO₂による微生物増殖抑制に関する一つのメカニズムとして、CO₂ガスによる細胞内の脱炭酸反応のフィードバック阻害が考えられる。CO₂が脱炭酸反応を阻害するなら、系のなかに複数の脱炭酸反応を持つTCA回路の代謝が大きなダメージを受けることが推測される。事実 *Enterobacter* spp. などの通性嫌気細菌を用いた実験では、好氣的培養気相にCO₂ガスを混入させると著しい阻害を受けるが、嫌氣的増殖下では好気下と比べるとその増殖阻害率は低いという実験結果も報告されている²²⁾。食品へのCO₂ガス応用におけるこれまでの報告では、好氣的条件、すなわち空気にCO₂を混入するケース

図3 微生物の細胞生理に及ぼすCO₂の影響。

- (1) CO₂の環境への溶解は微生物の発育環境のpHを低下させ、わずかに微生物の発育低下をもたらす。
- (2) 細胞内に流入したCO₂は、直接細胞膜の流動性に影響を与えたり、過剰のH⁺イオンをもたらし、細胞内への栄養物質の取り込み効率を低下させる。
- (3) CO₂は細胞内の脱炭酸反応のフィードバック阻害や、酵素タンパクの立体構造に影響を及ぼし酵素活性の低下をもたらす。

と、嫌氣的条件、すなわち、N₂ガスにCO₂を混入するケースの2通りがある。しかし、これまでの報告を見る限りでは、好気、嫌気条件を問わずほとんどの場合なんらかの増殖阻害が認められている^{5, 13)}。この増殖抑制メカニズムとしてつぎの可能性が考えられている。

(2) 生育環境のpH低下

CO₂は微生物増殖環境への溶解に伴ないpHの低下を引き起こす。このpH低下はHenderson-Hasselbalchの式に従い $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$ により決まる。食肉や魚肉などでは人工寒天培地などに比べると緩衝作用がありCO₂ガスによる顕著なpHの低下は起きない。CO₂のpK_a値は約6.1なので緩衝能の比較的弱い人工寒天培地などの系でも、たとえヘッドスペースにCO₂が十分量存在(例えばCO₂ 100%)していてもCO₂の溶解に伴うpH低下は最終的に5.8~6.0前後で落ちつくケースが多く、それ以下にはならない。一般にpH 6.0前後では微生物の増殖は顕著に抑制されることはないが、細菌の低温限界での増殖能力は、pHによって大きく作用される。例えば、*Salmonella Typhimurium*はpH 6~8では増殖許容最低温度は5~6℃であるが、pH 5.0にすると9℃以上でないと増殖しない³²⁾。このように一つのストレス下では二つ目のストレスに対する許容力が狭くなる現象は加熱や塩分濃度などいくつかのストレスの組み合わせにおいても認められている¹⁾。したがってCO₂ガスによる周辺環境のpH低下の影響は特に低温や塩分などその他の環境ストレスとの相乗作用を考慮すると無視できない。試料状態や部位などでpH緩衝能が異なり、pH 5.4~7.0の範囲で大きくpHが変動する魚肉や畜肉における食中毒菌のCO₂ガス置

換包装および低温下での増殖に関する報告に、これまで必ずしも一貫した結果が得られていない一因として以上の理由も考えられるのではないだろうか。

(3) 細胞内への CO₂ の侵入と解離

CO₂ ガスの微生物増殖抑制効果のもう一つのメカニズムとして、次のような可能性も考えられている。すなわち、たとえ微生物周辺の環境 pH の低下が食品中での緩衝作用によって抑制されたとしても、図 3 に示すように分子状 CO₂ は微生物の細胞膜を自由に通過し、細胞内で HCO₃⁻ と H⁺ に解離する。その結果、細胞内に蓄積される過剰の [H⁺] および [HCO₃⁻] を微生物は細胞外に排出しようとする。H⁺ の排出は ATP 消費を伴う H⁺ 排出機構によって行われるであろうし、また、HCO₃⁻ についても詳細は不明な点が多いが ATP 消費を伴うなんらかの排出機構が働いている可能性がある。いずれにせよ、微生物細胞は過剰の細胞内イオンのバランスをとるために、無駄なエネルギーを消費せざるを得ないわけで、その結果、増殖速度が低下する可能性が考えられている⁵⁾。また、細菌ではイオン勾配によって駆動される能動輸送の大半は H⁺ の細胞内外の勾配に依存している（ただし、海洋細菌の場合は Na⁺ 勾配が重要と考えられている）ので細胞内に余分な H⁺ が蓄積すると糖やアミノ酸など栄養分の取り込みにも影響がでてくる可能性がある。さらに細胞内の余分な H⁺ が H⁺/K⁺ アンチポート系によって細胞外に排泄される際に K⁺ の細胞内への流入を促し、過剰な K⁺ が細胞内の酵素活性に影響を与える可能性なども推測される⁴⁹⁾。

(4) その他

その他 CO₂ の微生物の細胞生理に及ぼす影響については、CO₂ が直接細胞膜に作用し、細胞膜の脂肪酸組成を変えたり、膜の流動性を高めるため、栄養物質の取り込みに関連する膜介在酵素の機能低下をもたらすのではないかと、あるいは細胞膜上のタンパクや酵素タンパクに直接作用しタンパク質の立体構造を変えてしまう可能性も提案されている⁵⁾。CO₂ は特にアミンとの高い反応性が知られており、カルバミン酸 (RNHCOOH) を形成するため、タンパク質中のアミノ酸と反応し、電気的チャージに変化をもたらす。結果としてタンパク質の構造変化をもたらす。タンパク質精製時に CO₂ ガスを用いるとタンパク質の可溶化が起きやすくなることも知られているが、これも上記のメカニズムと関連していると考えられている⁵⁾。いずれにせよ、タンパク質構造内の電気的チャージ変化に伴う構造の変化は、微生物代謝に関与する種々の酵素活性に直接的に影響を及ぼすことが推測される。

CO₂ による微生物の増殖抑制のメカニズムについては、まだ未解明な部分が多く、今後の研究の発展が待たれるところである。いずれにせよ、*P. fluorescens* を用いた実験で、CO₂ による増殖抑制パターンが用いる培地によって（すなわち栄養基質の種類によって）異なること

から、CO₂ による本菌の代謝抑制のメカニズムとして、タンパク合成系や代謝の中心系路の阻害ではなく、基質の取り込み系、あるいは、代謝の初期プロセスが阻害を受けていると考える方が自然であろうと考えられている⁵⁷⁾。また、CO₂ 下で静菌された細菌は CO₂ ガスから開放されると比較的速やかに増殖を開始することから¹²⁾、CO₂ の細菌に対する作用は致死的な作用ではなく、加熱、凍結などのような損傷メカニズムとは根本的に異なるメカニズムであると推定されている。

4. 偏性嫌気性 *Clostridium* 属細菌の増殖と CO₂

鮮魚のガスパックについては、特に鮮魚汚染の可能性が高い低温増殖性のボツリヌス E 型菌の挙動が最も心配される。アメリカで真空包装やガス置換包装のような空気を除去した形での生鮮魚介類の包装・流通があまり普及していない理由は、本菌の増殖の危険性が考えられるからである。E 型菌に限らず、CO₂ ガス置換包装とボツリヌス菌に関する研究が活発に行われている^{13, 41, 53, 56)}。ガス置換包装下でボツリヌス菌による毒化が認められる事例はいくつか報告されているが、そのほとんどで毒化の認められる時点ですでに消費に耐えられないほど鮮魚の腐敗が著しくなっている。現在、CO₂ ガス置換包装とボツリヌス菌による毒化については、種々の矛盾する報告があり決着が得られていない。Post *et al.*⁵²⁾ は 12°C に保存したタラフィレーでは、毒化の順序が N₂ 100%、含気、CO₂、真空包装の順であったと報告している。一方、カレイでは CO₂、含気、N₂、真空包装の順に毒化が認められたとしている。また、Genigeorgis のグループは魚肉を真空包装、100% もしくは 70% CO₂ (空気中) 包装し、ボツリヌス E 型菌の毒化を検討した結果、魚肉の毒化そのものには包装ガスの種類は影響を与えないと結論している²⁹⁾。しかし、同じ研究グループの仕事であっても、サケのフィレーを用いた実験結果では、ボツリヌスの毒化は、真空包装、100% CO₂、70% CO₂ の順であったとしている²⁰⁾。星野ら²⁷⁾は炭酸ガス発生型脱酸素剤と鉄系の脱炭素剤を用いてボツリヌス E 型菌の増殖を検討した結果、10°C では CO₂ ガスの増殖促進効果はあまり顕著ではないが、5°C では CO₂ ガスは本菌の増殖に必須であったと報告している。また、Lambert *et al.*⁴⁰⁾ は豚肉を含気包装と MA 包装を行い、ボツリヌス A, B 型菌の挙動を調べた結果、含気包装では 19 日、CO₂: O₂: N₂ (2: 2: 6) 包装で 21 日、CO₂: N₂ (2: 8) 包装で 35 日で、それぞれ毒化が認められたと報告している。一方、彼らの行ったその他の実験結果も考慮すると、結局、統計的には CO₂ ガス濃度とボツリヌス毒化までの時間との間に明確な結論を下すことは難しいとしている。

このようにボツリヌス毒化と包装ガス気相との関連について統一的な結果が得られていない理由として、CO₂ 濃度、貯蔵温度、ヘッドスペース容量、共存腐敗細菌の挙動などの影響に加えて、CO₂ ガスにより *Clostridium*

属胞子の発芽が促進されると同時に^{11, 15)}、逆に栄養細胞の増殖は抑制される可能性があること³⁹⁾、また、O₂を含んだ包装との比較では、好気性や通性嫌気性腐敗細菌によるO₂消費による酸化還元電位の低下や産生されたCO₂が*Clostridium*属の挙動に影響を及ぼし、比較的分析が複雑になることなどが考えられる^{26, 38)}。以下にこれらの原因と考えられるいくつかの点について整理してみる。

(1) CO₂ と *Clostridium* 属胞子の発芽

Enfors and Molin¹¹⁾ は好気性胞子形成菌 *B. cereus* の胞子発芽はCO₂ ガスによって抑制されるのに対し、嫌気性胞子形成菌 *Clostridium sporogens* および *C. perfringens* の胞子発芽は逆に促進される事実を報告した。*C. sporogens* の胞子は1 atm pCO₂ で発芽促進されるものの、4 atm では発芽抑制され、10 atm では完全に発芽阻害され、また、*C. perfringens* では4 atm CO₂ では若干の発芽促進が認められ、10 atm では促進も抑制もなく、25 atm では発芽は完全に阻害される。一方、*C. botulinum* に関しては、Foegeding and Busta¹⁵⁾ は液体培養中における胞子の発芽が100% CO₂ ないし90% CO₂ (残りはH₂) ガスの通気により著しく促進されることを報告している。

(2) CO₂ 濃度と *Clostridium* 属栄養細胞の増殖

CO₂ は *Clostridium* 属の増殖に必要なのか、抑制的に働くのか、あるいは無関係なのかについては、環境条件にも大きく左右され、これまでの実験結果が混乱しており、決着がついていない。例えば、培養温度についてみるとParekh and Solberg⁵⁰⁾ は、8株の*C. perfringens* をチオグリコレート液体培地の中に接種し、100% CO₂ と100% N₂ 下で培養した結果、両条件下で*C. perfringens* の増殖速度にほとんど差が認められていないことから、*C. perfringens* の増殖にCO₂ は影響を及ぼさないと結論している。しかし、この実験は43℃という*C. perfringens* の至適増殖温度でおこなわれたものであり、このような高温下ではCO₂ の培地への溶解があまり期待できないため、上記の実験結果を食品の保存温度である低温条件にそのままあてはめることはできない。著者らが鮮魚に*C. perfringens* を植菌した実験では15℃3日ではCO₂ 区、N₂ 区、含気区ともに増殖は認められず、30℃6時間貯蔵ではCO₂ ガス区での増殖が最も良好であった³⁶⁾。一方、ボツリヌス菌については、栄養細胞の増殖と平行して行われる毒素産生について、Doyle⁸⁾ は、1 atm N₂ 下と1 atm CO₂ 下で比較すると、CO₂ 下の方が毒素産生は遅れること、CO₂ 分圧をさらに上げていくと毒素産生はさらに遅れていくことを報告している。

Clostridium 属細菌の増殖とCO₂ ガスとの関係については、Gladstone²³⁾ が、1935年に*C. sporogens* の増殖にはCO₂ が不可欠であるとのレポートを書いて以来、また、日本においても、北海道衛研の中村らが1952年に日本最初のボツリヌス菌に関する研究レポート⁴⁵⁾を書

いて以来、*C. sporogens* や *C. botulinum* の平板培養にはCO₂ が習慣的に用いられてきた。確かに微生物の種類によっては培養中に炭酸を完全に除去してしまうと増殖できないものもあることが知られている⁵⁹⁾。従属栄養的な炭酸同化は、TCA 回路におけるオキザロ酢酸の補給の他にもTCA回路の中間産物を中心として多くのCO₂ 固定に関する反応が明らかにされている。また、従属栄養微生物を培養する際に¹⁴C O₂ を与えると、タンパク質や核酸その他の細胞成分が¹⁴C ラベルされるので、従属栄養増殖している場合にも炭酸が同化され核酸塩基の合成過程や脂肪酸代謝の関連のある反応に関与しているものと考えられている⁵⁹⁾。ただし、この場合、量的に見れば炭酸の同化は全生合成量の僅か一部に過ぎず、ほとんどの微生物の従属栄養増殖に要求されるCO₂ 量は微量であり、基本的には空気中の濃度(0.03%)程度で充分と考えられている。このように、微生物の増殖に炭酸は欠かせないものであることは事実である。しかし、一方で、ボツリヌス菌に関してはCrとH₂SO₄によりH₂を発生させ、O₂を吸収する嫌気培養システム中でもコロニーを作る経験も多くの研究者によって認められており(阪口:私信)、果たしてCO₂ がボツリヌスの増殖に要求されるものなのか否か(すなわち不可欠なのか否か)については、明確な結論が出されていないように思える。この点に関して、1987年にDixonらのグループが興味深いレポートを書いている^{6, 7)}。彼らは、ボツリヌス菌と生物学的に極めて類似した*Clostridium* 属細菌の*C. sporogens* の増殖生理を詳細に明らかにすることを目的として、20種類のアミノ酸およびビタミン混液からなる完全合成培地を開発した。上述したように*Clostridium* などの嫌気菌の培養には習慣的にCO₂ ガスが用いられているので、本合成培地中で*C. sporogens* の増殖における最適CO₂ 濃度を検討した結果、興味深い事実を発見した。それは、ある培地ではCO₂ ガスの分圧を減らしていてもほとんど本菌の増殖に影響はなく、CO₂ ガスは全く存在しなくなっても本菌は良好な増殖をする事実であった⁶⁾。そこで、CO₂ が本菌の増殖代謝にどのような関連があるのかを詳細に検討した結果、*C. sporogens* の増殖にとってCO₂ が不可欠であるのか、あるいは抑制的に作用するのかという問題は、*C. sporogens* の培養培地組成によって大きく影響を受けるということを見出した。彼らは、バリン、イソロイシン、プロリンなどの分岐アミノ酸欠損合成培地で*C. sporogens* を培養すると、その増殖にCO₂ ガスが不可欠であることを見出した⁷⁾。彼らの行った研究結果を整理すると、次のようになる。

C. sporogens はCO₂ 固定によって分枝アミノ酸合成を行っている。したがってこれらのアミノ酸の欠損した培地ではCO₂ が増殖に必須となる。CO₂ が必須であるのは分枝アミノ酸の欠損した合成培地中で本菌を培養した時だけである。完全アミノ酸配合人工培地中に本菌を

培養すると、CO₂ は増殖に必須ではなくなる。しかし、本菌は分枝アミノ酸を CO₂ 固定回路により合成するので完全合成培地中では CO₂ ガスにより本菌の増殖は促進される。ただし、アミノ酸が豊富に存在し、合成する必要のないトリプトン培地などでは、CO₂ が存在しなくても増殖は行われ、また、CO₂ が存在するために増殖が促進されることもない。むしろ CO₂ ガスの分圧が 0.6 atm 以上では増殖が抑制的に作用していることを見出した。

すなわち、CO₂ が *C. sporogenes* の増殖に促進的に作用するのか抑制的に作用するのかという前述の問題に対しては、CO₂ による増殖促進と CO₂ の増殖抑制は培養条件の種々の組み合わせで作用するもので、培養条件により異なるという結論が下せそうである。

5. おわりに

以上、CO₂ の微生物の増殖生理に及ぼす影響について整理してみた。特に、本稿では、食品の MA 包装において最もその挙動が危惧される偏性嫌気性菌 *Clostridium* 属の増殖と CO₂ との関係に関する最近の知見について重点的に紙面をさいた。以上の知見と食品のガス置換包装という人間生活への応用との接点を整理してみるとどうなるであろうか。Dixon らの用いた液体での連続培養といった生物工学的手法は CO₂ ガスの微生物生理に及ぼすメカニズムの解析には有益ではあるが、固体表面に特有の niche を形成している細菌群を気相コントロールによって制御しようとする食品のガス制御といった応用研究として CO₂ の影響をみる場合には、その知見は必ずしも適合しない可能性も考慮しておく必要がある。また、CO₂ ガス置換包装食品中におけるボツリヌス菌の挙動を *C. sporogenes* の CO₂ ガス通気液体培養における増殖に関する知見から推測することは必ずしも妥当ではないであろう。しかし、以上を考慮したうえでも、アミノ酸が豊富に存在する食肉や鮮魚などのタンパク質食品では、CO₂ がボツリヌス菌の栄養細胞の増殖に促進的に作用する可能性よりも、むしろ CO₂ による代謝抑制の影響が他の好気性や通性嫌気性細菌の場合と同じメカニズムにより支配するケースの方が多くなるのではないかと推論する方が論理的であろう。

CO₂ ガス包装下における *Clostridium* 属細菌の増殖を予測する場合、CO₂ ガスの濃度も考慮する必要がある。先に述べた *Clostridium* 属の孢子発芽促進についても CO₂ ガスによりボツリヌス孢子の発芽は促進されるのであろうが、食品のガス置換包装に用いるような高濃度 CO₂ (通常 40% 以上) 条件が果たして、発芽後の栄養細胞増殖にとっても好適であるかという点は全く別の問題である。これらの点については、さらに今後の研究により、この分野での情報の混乱を整理する必要があるであろう。

文 献

- 1) Andrew, M. H. E. and Russell, A. D. (eds): The revival of injured microbes. Academic Press, London (1984).
- 2) Beuchat, L. R.: Efficacy of media and methods for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* in refrigerated chicken meat. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 934-939 (1985).
- 3) Church, I. J. and Parsons, A. I.: Modified atmosphere packaging technology: a review, J. Sci. Food Agric., **143**-152 (1995).
- 4) Daniels, J. A., Krishnamurthi, R. and Rizvi, S. H.: A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality J. Food Prot., **48**, 532-537 (1985).
- 5) Dixon, N. M. and Kell, D. B.: The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. J. Appl. Bacteriol., **67**, 109-136 (1989).
- 6) Dixon, N. M., Lovitt, R. W., Kell, D. B. and Morris, J. G.: Effect of p CO₂ on the growth and metabolism of *Clostridium sporogenes* NCIB 8053 in defined media. J. Appl. Bacteriol., **63**, 171-182 (1987).
- 7) Dixon, N. M., Lovitt, R. W., Morris, J. G. and Kell, D. B.: Growth energetics of *Clostridium sporogenes* NCIB 8053: modulation by CO₂. J. Appl. Bacteriol., **65**, 119-133 (1988).
- 8) Doyle, M. P.: Effect of carbon dioxide on toxin production by *Clostridium botulinum*. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **17**, 53-56 (1983).
- 9) Eklund, T.: The effect of CO₂ on bacterial growth and on uptake processes in bacterial vesicles. Int. J. Food Microbiol., **1**, 179-185 (1984).
- 10) Enfors, S. O. and Molin, G.: The influence of temperature on the growth inhibitory effects of carbon dioxide on *Pseudomonas fragi* and *Bacillus cereus*. Can. J. Microbiol., **27**, 15-19 (1981).
- 11) Enfors, S.-O. and Molin, G.: The influence of high concentrations of CO₂ on the germination of bacterial spores. J. Appl. Bacteriol., **45**, 279-285 (1978).
- 12) Eyles, M. J., Moir, C. J. and Davey, J. A.: The effects of modified atmospheres on the growth of psychrotrophic pseudomonads on a surface in a model system. Int. J. Food Microbiol., **20**, 97-107 (1993).
- 13) Farber, J. M.: Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology—a review. J. Food Prot., **54**, 58-70 (1991).
- 14) Farber, J. M. and Daley, E.: Fate of *Listeria monocytogenes* on modified-atmosphere packaged turkey roll slices, J. Food Prot., **57**, 1098-1100 (1994).
- 15) Foegeding, P. M. and Busta, E. F.: Effect of CO₂, N₂ and hydrogen gas on germination of *Clostridium botulinum* spores. J. Food Prot., **46**, 987-989 (1983).
- 16) 藤井建夫: 水産物の鮮度とガス置換包装. 食品工業, **38**, 16-23 (1995).
- 17) Fujii, T., Hirayama, M., Okuzumi, M., Yasuda, M., Nishio, H. and Yokoyama, M.: The Effect of storage in carbon dioxide-nitrogen gas mixture on the microbial flora of sardine. Nippon Suisan Gakkaishi, **56**,

- 837 (1990).
- 18) 藤井建夫, 西 忠嗣, 奥積昌世, 安田松夫, 西野 甫, 横山理雄: ガス置換包装したマイワシフィレ貯蔵中および開封後の化学成分・微生物相の変化. 日本食品工業学会誌, **3**, 1124-1133 (1991).
 - 19) 藤井建夫, 杉本和弘, 奥積昌世: ガス置換包装における食品関連細菌の挙動. 日本包装学会誌, **2**, 167-172 (1993).
 - 20) Garcia, G. W. and Genigeorgis, C.: Quantitative evaluation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B, E and F growth risk in fresh salmon tissue homogenates stored under modified atmospheres. J. Food Prot., **50**, 390-397 (1987).
 - 21) Gill, C. O. and Reichel, M. P.: Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. Food Microbiol., **6**, 223-230 (1989).
 - 22) Gill, C. O. and Tan, K. H.: Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 317-319 (1980).
 - 23) Gladstone, G. P., Fildes, P. and Richardson, G. M.: CO₂ as essential factor in the growth of bacteria. Brit. J. Exp. Pathol., **16**, 335-348 (1935).
 - 24) Hanninen, M. L., Korkeala, H. and Pakkala, P.: Effect of various gas atmospheres on the growth and survival of *Campylobacter jejuni* on beef. J. Appl. Bacteriol., **57**, 89-94 (1984).
 - 25) Hintlian, C. B. and Hotchkiss, J.: Comparative growth of spoilage and pathogenic organisms on modified atmosphere-packaged cooked beef. J. Food Prot., **50**, 218-223 (1987).
 - 26) 星野 純, 上野一恵: 脱酸素剤嫌気下での微生物の挙動に関する研究, 第3報, 嫌気包装下での酸化還元電位の変化と *Clostridium* の生育. 食品と微生物, **4**, 115-121 (1987).
 - 27) 星野 純, 上野一恵: 脱酸素剤嫌気下での微生物の挙動に関する研究, 第4報, 低温下での *Clostridium botulinum* Type E の増殖. 食品と微生物, **9**, 151-157 (1992).
 - 28) 星野 純: 包装による微生物制御. 日食微誌, **12**, 97-104 (1995).
 - 29) Ikawa, J. Y. and Genigeorgis, C.: Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish fillets stored under modified atmospheres. Int. J. Food Microbiol., **4**, 167-181 (1987).
 - 30) 石谷孝佑: プラスチック包装食品の品質変化とその防止. 日本食品工業学会誌, **28**, 221-234 (1981).
 - 31) 伊藤 武, 高野伊知朗, 高橋正樹, 富岡芳彦, 高橋栄一: 真空包装およびガス充填包装による生鮮食肉中の *Campylobacter jejuni* の生存について. 食品と微生物, **2**, 97-101 (1985).
 - 32) 伊藤 武: 食品と細菌汚染—食品中における病原細菌の動態. 食品と微生物, **8**, 85-94 (1991).
 - 33) 木村 凡: 水産食品のガス置換包装による品質保持. ジャパンフードサイエンス, **32**, 61-71 (1993).
 - 34) Kimura, B. and Murakami, M.: Microbial flora of jack mackerel *Trachurus japonicus* stored in retail packages containing different gas atmospheres at 5°C. Nippon Suisan Gakkaishi, **57**, 573 (1991).
 - 35) Kimura, B. and Murakami, M.: Fate of food pathogens in gas-packaged jack mackerel fillets. Nippon Suisan Gakkaishi, **59**, 1163-1169 (1993).
 - 36) Kimura, B., Murakami, M. and Fujii, T.: Growth of *Clostridium perfringens* in fish fillets packaged with carbon dioxide controlled atmosphere at abusive temperatures. J. Food Prot. (1996) 印刷中
 - 37) 木村 凡・村上正忠・藤沢浩明: ガス充填包装した海産魚フィレの細菌数. 水大校研究報告, **37**, 129-136 (1989).
 - 38) Lambert, A. D., Smith, J. P. and Dodds, K. L.: Combined effect of modified atmosphere packaging and low-dose irradiation on toxin production by *Clostridium botulinum* in fresh pork. J. Food Prot., **54**, 94-101 (1991).
 - 39) Lambert, A. D., Smith, J. P. and Dodds, K. L.: Effect of headspace CO₂ concentration of toxin production by *Clostridium botulinum* in MAP, irradiated fresh pork. J. Food Prot., **54**, 588-592 (1991).
 - 40) Lambert, A. D., Smith, J. P. and Dodds, K. L.: Effect of initial O₂ and CO₂ and low-dose irradiation on toxin production by *Clostridium botulinum* in MAP fresh pork. J. Food Prot., **54**, 939-944 (1991).
 - 41) Lampila, L. E.: Modified atmosphere packaging. in: Microbiology of marine food products. Ward D. R. and Hackney C. R. (eds.), p. 373-393, van Nostrand Reinhold, New York (1991).
 - 42) Luiten, L. S., Marchello, J. A. and Dryden, F. D.: Growth of *Salmonella typhimurium* and mesophilic organisms on beef steaks as influenced by type of packaging. J. Food Prot., **45**, 263-267 (1982).
 - 43) Menabrito, A. P. and Regenstein, J. M.: Shelf-life extension of fresh fish—a review part II—preservation of fish. J. Food Quality, **13**, 129-146 (1990).
 - 44) Molin, G.: Combined carbon dioxide inhibition and oxygen limitation of the growth of *Pseudomonas fragi* 72 in batch and continuous culture. J. Gen. Microbiol., **129**, 2885-2891 (1983).
 - 45) 中村 豊, 飯田広夫, 佐伯 潔: 岩内郡島野村に起こったボツリヌス中毒について. 北海道衛生研究所報 (特報1), 1-18 (1952).
 - 46) Nipkow, A., Sonnleitner, B. and Fiechter, A.: Effect of carbon dioxide on growth of *Zymomonas mobilis* in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., **21**, 287-291 (1985).
 - 47) 荻原博和, 蟹江 誠, 矢野信禮, 春田三佐夫: ガス置換包装における二酸化炭素, 酸素および混合ガスが食品媒介病原細菌・腐敗細菌の発育に及ぼす影響. 食衛誌, **34**, 283-288 (1993).
 - 48) 荻原博和, 蟹江 誠, 矢野信禮, 春田三佐夫: ガス置換包装における二酸化炭素, 酸素およびその混合ガスが豚挽き肉の微生物ならびに品質に及ぼす影響. 食衛誌, **36**, 252-262 (1994).
 - 49) Parkin, K. L. and Brown, W. D.: Preservation of seafood with modified atmospheres, Chemistry Bio-

- chemistry of Marine Products, Martin, R. E. *et al* (eds.) p. 453-465. AVI Publishing Co., Westport (1982).
- 50) Parekh, K. G. and Solberg, M.: Comparative growth of *Clostridium perfringens* in carbon dioxide and nitrogen atmospheres. J. Food Sci., **35**, 156-159 (1970).
- 51) Phebus, R. K., Draughon, F. A. and Mount, J. R.: Survival of *Campylobacter jejuni* in modified atmosphere packaged turkey roll. J. Food Prot., **54**, 194-199 (1991).
- 52) Post, L. S., Lee, D. A., Solberg, M., Furgang, D., Specchio, J. and Graham C.: Development of botulinum toxin and sensory deterioration during storage of vacuum and modified atmosphere packaged fish fillets. J. Food Sci., **50**, 990-996 (1985).
- 53) Reddy, N. R., Armstrong, D. J., Rhodehamel, E. J. and Kautted, D. A.: Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review. J. Food Safety, **12**, 87-118 (1991).
- 54) Rhodehamel, E. J. and Kautter, D. A.: Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review. J. Food Safety, **12**, 87-118 (1991).
- 55) Silliker, J. H. and Wolfe, S. K.: Microbiological safety considerations in controlled-atmosphere storage of meats. Food Technol., **34**, 59-63 (1980).
- 56) Stammen, K., Gerdes, D. and Caporaso, F.: Modified atmosphere packaging of seafood. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **29**, 301-331 (1990).
- 57) Tan, K. H. and Gill, C. O.: Physiological basis of CO₂ inhibition of a meat spoilage bacterium, *Pseudomonas fluorescens*. Meat Science, **7**, 9-17 (1982).
- 58) Teixeira de Mattos, M. J., Plomp, P. J. A. M., Neijssel, O. M. and Tempest, D. W.: Influence of metabolic end products on the growth efficiency of *Klebsiella aerogenes* in anaerobic chemostat culture. Antonie van Leeuwenhoek, **50**, 461-472 (1984).
- 59) 柳田友道: 微生物化学第1巻, 分類・代謝・細胞生理, 学会出版センター, p. 183-188 (1980).
- 60) 柳田友道: 微生物科学第3巻, 形態形成, 学会出版センター, p. 28-30 (1982).
- 61) 安田松夫, 西野 甫, 田中幹雄, 千葉時子, 中野久子, 横山理雄, 小川信二: 養殖ニジマスの二酸化炭素混合ガス置換包装による鮮度保持. 包装研究, **9**, 25-29 (1989).