有機酸類の抗菌性[†]

山本 泰*・東 和男*・好井久雄*

Inhibitory Activity of Organic Acids on Food Spoilage Bacteria

(Studies on Growth Inhibition of Food Spoilage Microorganisms
for Low Salt Foods Part I)

Yasushi YAMAMOTO*, Kazuo HIGASHI* and Hisao YOSHII*

* Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156

The inhibitory activity of organic acids on food spoilage bacteria was investigated to obtain the following results: (1) All organic acids tested inhibited food spoilage bacteria at higher pH value than hydrochloric acid did. (2) Volatile low molecule fatty acid including propionic, acetic and formic acid showed strong inhibitory effect at even above pH 4.5. (3) As a food additive employed at pH 5.0, acetic acid was the most effective, being followed by succinic and lactic acid. Malic, tartaric and citric acid, however, were of weak inhibitory effect. The inhibitory activity of organic acids were in good agreement with the rate of undissociated molecule of the organic acids. (4) Acetic acid completely inhibited all the bacteria tested except lactic acid bacteria with the concentration of 0.5% at pH 5.0.

(Received Dec. 26, 1983)

最近、食塩の過剰摂取に対する消費者の関心の高まりとともに、加工食品の低食塩化が広汎に進行している。低食塩化は食品の加工、製造のみならず、製品の保存、貯蔵にも強い影響を及ぼし、特に腐敗防止対策が重要な課題となってきた。また、消費者の食品添加物に対する危機感から殺菌料や合成保存料の使用は敬遠される傾向がみられ、現在ではこれらにかわってエタノール¹⁾が各種の食品に効果的に利用されるようになってきている。果実や発酵食品中に含有される成分で、エタノールとともに微生物の生育阻止作用を有する物質としては各種の有機酸^{2)~4)}がある。本報ではこれらの有機酸を食品保存に利用するための基礎試験として、食品の腐敗細菌類に対する各種有機酸の抗菌力を試験するとともにその比較を行った。

実験方法

1. 培地

ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.25%, ブドウ糖 0.1%

(未調整時の pH は 6.2) からなる液体培地を基礎培地として使用した。

2. 試験菌株

主として食品の腐敗に関する細菌類に若干の腸内細菌を加えた 16 株 (Table 1) を用いた。

3. 有機酸

使用した有機酸は果実または発酵食品等に含まれる脂肪族カルボン酸を選び、比較のために無機酸として解離度の高い塩酸を用いた (Table 2)。

4. 生育阻止 pH

基礎培地 (pH 6.2) に pH 値が 0.2 間隔で低下するように各有機酸を添加してオートクレーブで殺菌した試験培地 10 ml に、pH 7.0 の基礎培地で 24 時間前培養した菌懸濁液を 1 ml 容メスピペットで 1 滴ずつ接種し、30°C で 5 日間培養した。同条件の無接種培地を対照として 660 nm における吸光度を測定して OD 0.01 以上を菌の生育がみられたものとし、これ未満は生育阻止と判定した。

[†] 低食塩化食品における腐敗微生物の抑制に関する研究 (第 1 報)

* 東京農業大学醸造学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

Table 1 List of tested bacteria

- *Pseudomonas fluorescens**
- *Escherichia coli* (IFO 3301)
- *Salmonella typhimurium**
- *Bacillus megaterium* (IFO 12108)
- Bac. subtilis**
- *Bac. cereus* (IFO 3131)
- Bac. natto* (TUA 344)
- Micrococcus varians**
- Mic. epidermidis**
- Mic. conglomeratus**
- *Mic. flavus**
- *Mic. freudenreichii**
- Mic. luteus**
- *Mic. roseus**
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- *Pediococcus hennebergii**

○ Marks were used in antibacterial comparative tests.

* Marks are keeping strains in Laboratory of Fermented Food Chemistry, Tokyo University of Agriculture.

Table 2 List of tested organic acids

- Formic acid
- Acetic acid
- Propionic acid
- Lactic acid
- Oxalic acid
- Maleic acid
- Succinic acid
- Tartaric acid
- Malic acid
- Citric acid
- Hydrochloric acid

○ Marks were used in antibacterial comparative tests.

5. 抗菌力の比較

多くの食品の pH は 4.0~6.0 の範囲にあり, pH 4.0 付近まで低下するとかなり酸味を感じるようになる。一方, 有機酸は同一濃度でも pH が低下するほど非解離型分子の比率が高くなるために抗菌力は増加し, 逆に中性に近づくほど減少する。そこで酸類の添加量は 0~0.5% とし, 試験時の pH は 5.0 に設定した。すなわち, 基礎培地に各酸を 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3,

0.4, 0.5% となるように添加し, 塩酸または水酸化ナトリウムで pH を 5.0 に調整し, 殺菌後試験培地とした。以後の操作は 4. と同様である。

結果及び考察

1. 有機酸類の生育阻止 pH

使用したすべての酸が添加量に伴って供試菌の生育を抑制した。また, すべての有機酸が塩酸を用いた場合よりも高い pH で細菌類の生育を阻止しており, 有機酸類がかなり強い抗菌力を持つことが確認された。供試菌を次のようにグループ別けし, 各酸の生育阻止 pH を Fig. 1~5, 生育阻止 pH における酸濃度を Table 3 に示した。

Fig. 1 Complete inhibitory pH** value of gram-negative, aerobic rod bacteria *Ps. fluorescens*

* Not tested

** Inhibitory pH: The pH at which no visible growth occurred yet the microorganisms remained viable.

Fig. 2 Complete inhibitory pH value of gram-negative, facultative anaerobic rod bacteria *E. coli*

Sal. typhimurium

* Figures are shown number of strain

Fig. 3 Complete inhibitory pH value of *Bacillus* group

Bac. megaterium

Bac. subtilis

Bac. cereus

Bac. natto

* Figures are shown number of strain.

Fig. 4 Complete inhibitory pH value of gram-positive coccus group

Mic. varians

Mic. epidermidis

Mic. conglomeratus

Mic. flavus

Mic. freudenreichii

Mic. luteus

* Figures are shown number of strain.

① グラム陰性好気性桿菌として *Pseudomonas fluorescens*, ② グラム陰性通性嫌気性桿菌として *Escherichia coli* と *Salmonella typhimurium*, ③ グラム陽性好気性有孢子桿菌として *Bacillus* 属の3種4株, ④ グラム陽性好気性球菌として *Micrococcus* 属の6種, ⑤ グラム陽性球菌のうち, 便宜上乳酸菌 *Pediococcus hennebergii*, 耐酸性の強い *Mc. roseus* 及び *Staphylococcus aureus* の3株を耐酸性グループとして一括した。グループ別みると①は好冷菌として知られており, 30°C という培

Fig. 5 Complete inhibitory pH value of acid-tolerant bacteria group

Mic. roseus

Pc. hennebergii

Staphy. aureus

* Figures are shown number of strain.

養条件の影響を受けているとも考えられるが, いずれの酸を添加した場合にも最も高い pH で生育が阻止された。生育阻止 pH は酢酸>酒石酸>プロピオン酸>蟻酸・コハク酸・クエン酸・シュウ酸>乳酸>塩酸の順であった。②ではプロピオン酸・酢酸・蟻酸>酒石酸・リンゴ酸・シュウ酸・マレイン酸>乳酸・クエン酸>コハク酸>塩酸であり, 特に前3種の有機酸の生育阻止 pH は 4.8 以上と非常に高い反面, 他の酸は pH 4.3 以下とかなり低かった。③の *Bacillus* 株はプロピオン酸>乳酸>酢酸・蟻酸・クエン酸>酒石酸・マレイン酸>シュウ酸・コハク酸>リンゴ酸>塩酸であった。④の *Micrococcus* はプロピオン酸>酢酸>シュウ酸>蟻酸>クエン酸>酒石酸・リンゴ酸>コハク酸・マレイン酸・乳酸>塩酸であった。⑤の耐酸菌はプロピオン酸>シュウ酸・酒石酸・乳酸・酢酸>蟻酸・マレイン酸・リンゴ酸・クエン酸>コハク酸>塩酸の順で, 生育阻止 pH が最も高いプロピオン酸でも 4.28 で, 全般的に低い pH であった。

等量の酸を添加しても有機酸の種類によって pH が異なるので, 単純比較はできないが, 一般的には高い pH で生育を阻止した酸は抗菌力が強く, 換言すれば高い pH で生育が阻止された菌株は酸に対する抵抗力が弱いといえる。この点から一価の揮発性低級脂肪酸であるプロピオン酸, 酢酸, 蟻酸は⑤の耐酸性菌を除くいずれのグループに対しても生育阻止 pH が 4.5 以上であり, 通常の加工食品など比較的高い pH 域でも抗菌作用を示すものと推察された。特に食品の製造や保存に広汎に利用可能な食酢の主成分である酢酸の抗菌力が期待できる。

Table 3 Concentration of organic acids at complete inhibitory pH (mg/100 ml)

Strain	Hydrochloric	Formic	Acetic	Propionic	Lactic	Oxalic	Maleic	Succinic	Tartaric	Malic	Citric
<i>Ps. fluorescens</i>	26	24	20	53	55	20	—	42	26	—	46
<i>E. coli</i>	33	28	42	60	109	50	99	226	68	69	146
<i>Sal. typhimurium</i>	40	22	42	60	92	50	99	226	56	92	180
<i>Bac. megaterium</i>	28	28	53	60	51	40	60	100	46	92	79
<i>Bac. subtilis</i>	28	28	84	97	51	32	85	100	46	92	79
<i>Bac. cereus</i>	28	36	84	60	51	40	72	100	46	69	53
<i>Bac. natto</i>	28	28	49	60	51	40	60	100	46	69	53
<i>Mic. varians</i>	33	36	42	39	80	25	85	100	46	53	53
<i>Mic. epidermidis</i>	28	28	42	60	80	25	85	100	46	53	53
<i>Mic. conglomeratus</i>	28	28	42	39	80	25	85	100	46	53	53
<i>Mic. flavus</i>	28	36	74	97	80	25	85	100	46	69	53
<i>Mic. freudenreichii</i>	28	28	42	97	80	25	85	100	46	53	53
<i>Mic. luteus</i>	28	28	42	60	80	25	85	68	56	53	79
<i>Mic. roseus</i>	35	87	465	254	92	40	120	330	68	122	146
<i>Pc. hennebergi</i>	33	63	255	509	92	50	120	226	68	122	180
<i>Staphy. aureus</i>	33	87	255	254	92	50	99	226	68	92	146

ソルビン酸などの酸型保存料や有機酸類の抗菌力は pH 低下のみに起因するのではなく、酸そのものの有する抗菌力も関与し、酸自身の抗菌力は細胞膜透過性を有する非解離型分子の濃度⁵⁾ によることが知られている。このことから低級脂肪酸類が他の有機酸類に比べて高い pH で抗菌力を発揮しているのは非解離型分子の比率が高いことによるものと考えられる。

有機酸の添加によって培地の pH を一定の値まで低下させる場合には、解離度の高い酸ほど非解離型分子の比率が小さくなるので抗菌力は弱くなる。この実験では pH 低下による生育抑制と pH 低下に伴う非解離型分子の増加による生育抑制とが混在しているので、生育阻止 pH における有機酸類の濃度で抗菌力を比較することはできない。

2. 有機酸類の抗菌力の比較

各種の有機酸について酸分子自身の持つ抗菌力を比較する場合には、同一 pH で試験するのが望ましい。そこで有機酸類を食品の製造や保存に利用することを前提として pH は 5.0 に設定した。供試菌は Table 1 の○印 10 種、有機酸は Table 2 の○印 7 種を使用した。同一 pH で試験した場合には低い濃度で生育を阻止している酸は抗菌力が強く、逆に低い濃度で生育が阻止された菌は酸に対する抵抗力が弱いことになり、有機酸類の抗菌力を簡単に比較することができる。Fig. 6 に *Bac. megaterium*

Fig. 6 Effect of organic acids on the growth of *Bac. megaterium*

—○— Acetic acid ▲—▲ Tartaric acid
 ○—○ Lactic acid □—□ Citric acid
 ●—● Succinic acid ■—■ Hydrochloric acid
 △—△ Malic acid

um に対する有機酸類の生育抑制を例示した。抗菌力は酢酸>コハク酸・乳酸>リンゴ酸>酒石酸・クエン酸>塩酸の順で、酢酸が著しく強いのにに対してリンゴ酸以下の抗菌力は微弱であった。この抗菌力の強さは Fig. 7 に

Fig. 7 Proportion of undissociated molecule of organic acids

1 Acetic acid	4 Malic acid
2 Succinic acid	5 Citric acid
3 Lactic acid	6 Tartaric acid

示した非解離型分子の濃度比率⁶⁾の高い順序とよく一致しており、非解離型分子の量が多い酢酸の抗菌力が顕著であった。生育阻止に必要な酸の濃度は Table 4 のとおりで、抗菌力の強い酸ほど低濃度で阻止することが明らかである。酢酸は 0.5% で *Pc. hennebergii* 以外のすべての供試菌の生育を阻止した。Table 5 には生育阻止 pH とその際の非解離型分子濃度を示した。*Staphy. aureus* や *Mic. roseus* など耐酸菌の生育を阻止するためには 150~200 mg/100 ml の非解離型酢酸分子を必要としたが、他の多くの細菌類は 40 mg/100 ml 以下で阻止できることがわかった。酸の添加による pH の低下は培地となる食品に含まれる緩衝物質の量によって異なる。したがってあらかじめ生育阻止に必要な非解離型分子の濃度を求めておき、これをその食品の pH の非解離型分子の濃度比率で割れば、必要な酸の濃度が求められる。

以上の結果、有機酸中で最も高い pH で強い抗菌力を発揮する酢酸を有効に利用することにより、加工食品の

Table 4 Complete inhibitory concentration of organic acids at pH 5.0 (%)

Strain	Acetic	Succinic	Lactic	Malic	Citric	Tartaric	Hydrochloric
<i>Ps. fluorescens</i>	0.04	0.30	0.30	0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>E. coli</i>	0.04	0.30	0.30	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>Sal. typhimurium</i>	0.04	0.20	0.20	0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>Bac. megaterium</i>	0.04	0.20	0.30	0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>Bac. cereus</i>	0.08	0.40	0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>Mic. flavus</i>	0.02	0.10	0.20	0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>Mic. freudenreichii</i>	0.10	0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>Mic. roseus</i>	0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50
<i>Staphy. aureus</i>	0.40	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50	>0.50

Table 5 Complete inhibitory concentration and undissociated molecule concentration of acetic acid

Strain	Inhibitory pH	Inhibitory concentration (mg/100 ml)	Proportion of undissociated molecule	Undissociated molecule concentration (mg/100 ml)
<i>Mic. flavus</i>	5.09	20	0.317	6.34
<i>Bac. megaterium</i>	5.00	40	0.364	14.56
<i>Ps. fluorescens</i>	5.00	40	0.364	14.56
<i>E. coli</i>	5.00	40	0.364	14.56
<i>Sal. typhimurium</i>	5.00	40	0.364	14.56
<i>Bac. cereus</i>	5.07	80	0.327	26.20
<i>Mic. freudenreichii</i>	5.00	100	0.364	36.40
<i>Staphy. aureus</i>	5.00	400	0.364	145.60
<i>Mic. roseus</i>	5.00	500	0.364	182.00
<i>Pc. hennebergii</i>	5.00	>500	0.364	>182.00

低食塩化に伴う抗菌力の低下をカバーすることが可能と考えられる。

要 約

食品の低食塩化に伴う腐敗を防止する目的で、有機酸類の抗菌力について検討した。

(1) 供試したすべての有機酸は塩酸を用いた場合よりも高い pH で細菌類の生育を阻止しており、pH 以外の有機酸の持つ抗菌性が強く作用していることが明白であった。

(2) 特に、揮発性低級脂肪酸であるプロピオン酸、酢酸、蟻酸は耐酸菌を除く他のすべての菌の生育を pH 4.5 以上で阻止し、比較的 pH の高い条件下での抗菌作用が期待される。

(3) 食品への利用を考慮した pH 5.0 での抗菌力の比較試験では酢酸が最も強く、次にコハク酸と乳酸が強かったが、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸は弱かった。この

抗菌力の強さは非解離型分子の濃度比率とよく一致していた。

(4) 酢酸は pH 5.0 では 0.5% の濃度で乳酸菌以外のすべての供試菌の生育を阻止した。

文 献

- 1) 川名清子・中岡正吉・池田陽男：食衛誌，**22**, 326 (1981)。
 - 2) LEVINE, A. S. and FELLERS, C. R.: *J. Bacteriol.*, **39**, 499 (1940)。
 - 3) GOEPFERT, J. M. and HICKS, R.: *J. Bacteriol.*, **97**, 956 (1969)。
 - 4) CHUNG, K. C. and GOEPFERT, J. M.: *J. Food Sci.*, **35**, 326 (1970)。
 - 5) 野本正雄・奈良橋快子・新川保太郎：農化，**29**, 805 (1955)。
 - 6) 霜 三雄・福住栄一：食品防腐剤の知識と使い方，(信貴書院)，p. 96 (1965)。
- (昭和 58 年 12 月 26 日受理)