アジピン酸の抗菌作用†

山本 泰*・軽部則夫*・東 和男*・好井久雄*

Inhibitory Activity of Adipic Acid on Food Spoilage Microorganisms

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

Yasushi YAMAMOTO*, Norio KARUBE*, 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 adipic acid on 10 strains of yeasts and 33 strains of food spoilage bacteria including 6 strains of lactic acid bacteria was investigated. The following results were obtained. (1) Adipic acid protracted the lag phase, extended the mean generation time and decreased the maximum number of cells of *Escherichia coli* at pH 5.0. (2) When the pH of liquid medium was adjusted by adipic acid, the growth of food spoilage bacteria was inhibited between pH 4.2 and 5.2. (3) No significant inhibitory effects of adipic acid on food spoilage bacteria were observed at pH 6.0. However, growth of the most tested bacteria was inhibited with the concentration below 0.2% at pH 5.0. (4) Minimum inhibitory concentration of adipic acid on the growth of lactic acid bacteria were 0.4~1.8%. Therefore, it seemed difficult practically to prevent the growth of lactic acid bacteria completely by the sole use of adipic acid. (5) Growth of yeasts was scarcely affected with the addition of adipic acid.

(Received Jun. 17, 1986)

アジピン酸は1983年8月に新たに食品添加物として指定された酸味料で、その諸性質や加工食品への応用例については土屋¹⁾の解説があり、現在、デザート食品や飲料、各種加工食品等に利用されている。著者ら²⁾は先に有機酸類の抗菌性について検討し、抗菌力は解離度の低い酸ほど強力であることを報告した。

有機酸類を食品の保存に利用する場合には呈味が問題となるため、出来るだけ酸味を感じない高いpH域で抗菌力を発揮する有機酸が理想的である。食品に使用される有機酸類の中でアジピン酸は酢酸に次いで解離度が低いため、他の有機酸に比べて同一濃度で高いpHを示し、かなり強い抗菌力を有すると考えられる。既に麵類³⁾や漬漬⁴⁾への応用も研究されているが、本報では食品の腐敗に関係する各種の微生物を対象としてアジピン酸の抗菌作用について検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株

食品の腐敗に関与する細菌27株、乳酸菌6株、酵母10株を用いた。

2. 試験培地

細菌はペプトン0.5%、酵母エキス0.25%、ブドウ糖0.1%、乳酸菌はペプトン1.0%、酵母エキス0.5%、ブドウ糖1.0%、酵母はブドウ糖5.0%、カザミノ酸0.4%、酵母エキス0.2%、KH₂PO₄0.5%からなる液体培地を基礎培地とした。これらの培地で皮膜を形成する菌株については Tween 80 0.05% を添加した。

3. 有機酸

アジピン酸は旭化成工業(株)製の食品添加用「アサピック」または和光純薬工業(株)製の特級試薬を、比

† 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6報)(前報、文献7))

* 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 Growth inhibitory action of adipic acid on *Escherichia coli** at pH 5.0

Adipic acid (%)	Lag time (min)	Mean generation time (min)	Maximum cell** (per ml)
0	360	28.4	8.3×10^7
0.2	660	63.2	1.5×10^7
0.4	840	81.6	5.5×10^6

* This strain is stock culture in the Laboratory of Fermented Food Chemistry, Tokyo University of Agriculture.

** Standard plate count

Table 2 Inhibitory pH value of adipic acid on bacteria

Strain	Inhibitory** pH	Minimum pH*** of growth
<i>Bacillus alvei</i> NRIC 1002	4.7	4.3
<i>B. cereus</i> NRIC 1003	4.8	4.1
<i>B. circulans</i> NRIC 1004	4.7	3.9
<i>B. coagulans</i> NRIC 1005	4.7	4.2
<i>B. firmus</i> NRIC 1006	4.8	4.4
<i>B. licheniformis</i> NRIC 1007	4.8	4.6
<i>B. macerans</i> *	4.6	4.1
<i>B. megaterium</i> NRIC 1009	5.0	4.1
<i>B. natto</i> *	4.8	3.9
<i>B. pumilus</i> NRIC 1010	4.8	4.6
<i>B. sphaericus</i> NRIC 1013	5.2	4.5
<i>B. subtilis</i> NRIC 1015	4.6	4.1
<i>Micrococcus flavus</i> *	5.0	4.5
<i>M. conglomeratus</i> *	4.8	4.3
<i>M. epidermidis</i> *	4.8	4.5
<i>M. freudenreichii</i> *	4.8	4.5
<i>M. luteus</i> *	5.0	4.7
<i>M. roseus</i> *	4.2	3.9
<i>M. varians</i> *	4.8	4.6
<i>Staphylococcus aureus</i> NRIC 1136	4.7	4.3
<i>Achromobacter parvulus</i> *	4.7	4.6
<i>Alcaligenes faecalis</i> NRIC 1001	5.2	4.8
<i>Escherichia coli</i> *	4.4	4.0
<i>Flavobacterium esteraromaticum</i> *	5.2	4.8
<i>Proteus vulgaris</i> NRIC 1113	5.2	4.8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	4.8	4.3
<i>Salmonella typhimurium</i> *	4.4	3.5

* Marks indicate stock cultures in the Laboratory of Fermented Food Chemistry, Tokyo University of Agriculture.

** The relation between pH value and adipic acid concentration of media (mg/100 ml): pH 5.2 (26.2), pH 5.0 (36.8), pH 4.8 (53.7), pH 4.7 (65.3), pH 4.6 (80.5), pH 4.4 (125.2), pH 4.2 (201.5)

*** Media were adjusted by hydrochloric acid.

較のために使用した酢酸、乳酸、クエン酸及び塩酸は市販の特級試薬を用いた。

4. 生育阻止 pH

基礎培地に pH 値が 0.1 間隔で低下するようにアジピン酸を添加した培地を用いて既報²⁾と同様に試験した。

5. 最小生育阻止濃度

アジピン酸の水に対する溶解度は 30°C で 2.0% である。そこで、アジピン酸の添加量は 0~2.0% とし、既報²⁾の抗菌力の比較試験に準じて pH 5.0, 5.5 及び 6.0 における最小生育阻止濃度を求めた。

6. 生育の判定

生育の判定は 30°C で 5 日間培養後の吸光度 (660 nm) によった。また、生菌数は標準寒天平板法で求めた。

結果及び考察

1. 生育阻害

有機酸類の抗菌作用⁵⁾は非解離型分子が細胞内へ侵入することによって発揮されるので、解離度が高くなる中性 pH では殆ど抗菌作用は認められない。そこで、細菌類に対するアジピン酸の生育阻害作用を知るために *Escherichia coli* を用いて pH 5.0 での生育に及ぼす影響を調べた (Table 1)。pH 5.0 ではアジピン酸無添加でも最高菌数は 8.3×10^7 /ml と若干少ないものの、アジピン酸 0.2% の添加では誘導期及び平均世代時間が約 2 倍に延長され、最高菌数は無添加時の 1/5 であった。

更にアジピン酸 0.4% 添加では 5.5×10^8 /ml にとどまり、強力な阻害を受けた。この結果からアジピン酸は *E. coli* に対しかなり強い抗菌力を有し、誘導期の延長、対数期における世代時間の延長、定常期における最高菌数低下など生育相のいずれにも影響を及ぼすことが明らかとなった。

2. 細菌類の生育 pH に及ぼす影響

アジピン酸で培地の pH を調整したときの生育阻止 pH と塩酸で pH 調整したときの生育最低 pH を Table 2 に示した。アジピン酸は明らかに生育最低 pH より高い 4.2~5.2 の領域で細菌類の生育を完全に阻止した。アジピン酸、酢酸²⁾の生育阻止 pH を比較すると、生育最低 pH の高い *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Proteus* 株を除くグラム陰性の桿菌では後者が高かったが、*Bacillus* や *Micrococcus* 属等のグラム陽性菌では前者が高く、アジピン酸は酢酸と同様に高い pH で細菌類の生育を阻止することが明らかとなった。従ってアジピン酸は食品の呈味への影響が少ない比較的高い pH での利用が可能であることが示唆された。

Fig. 1 Effect of adipic acid on growth of *Bacillus cereus* NRIC 1003

pH: —○— 6.0, —●— 5.5, —○— 5.0

3. 細菌類に対する最小生育阻止濃度

次に生育阻止に必要なアジピン酸の濃度について検討した。Fig. 1は *Bacillus cereus* の生育に対するアジピン酸の濃度の影響を調べたものである。pH 6.0では最高溶解濃度の 2.0% でも生育に及ぼす影響は少ないが、pH 5.5では 0.4%, pH 5.0では 0.1% で完全に生育を阻止し、pH の低下に伴って強力な抗菌作用を示した。細菌類に対するアジピン酸の生育阻止濃度を Table 3 に示した。pH 6.0では *Bacillus sphaericus* を除くすべての株がアジピン酸 2.0% でも阻止されなかった。しかし、pH の低下とともに最小生育阻止濃度は低下し、pH 5.0では比較的酸に対する抵抗力の強い *Bacillus circulans*, *Micrococcus freudenreichii*, *M. roseus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* が 0.3~0.7% を示した他はすべて 0.2% 以下であった。

アジピン酸は特に多くの *Bacillus* や *Micrococcus* 属等好気性のグラム陽性菌に対して強い阻止作用を示していることから、主としてこれらが変敗の原因となり得る麺類³⁾などの澱粉性食品や蛋白質を多含する加工食品などへの利用が考えられる。アジピン酸の抗菌力を既報²⁾の結果と比較すれば、酢酸>アジピン酸>コハク酸>乳酸>リンゴ酸>クエン酸の順となり、非解離型分子の割合 (Fig. 2) の高いことから推定されたようにアジピン酸は酢酸に次いで強い抗菌力を示すことが確認された。

4. 乳酸菌に対する生育阻害

乳酸菌は酸に対して比較的強い抵抗力を示す。そこで、これらに対する作用を知るために酢酸、乳酸及びクエン酸と対比しながらアジピン酸の生育阻止 pH 及び生育阻止濃度を求めた。その結果、生育阻止 pH (Table 4)

Table 3 Minimum growth inhibitory concentration of adipic acid for bacteria (%)

Strain	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
<i>Bacillus alvei</i>	0.14 (22.6)*	0.9 (62.6)*	
<i>B. cereus</i>	0.12 (22.8)	0.4 (27.8)	> 2.0 (>40.0)*
<i>B. circulans</i>	0.30 (57.0)	2.0 (139.0)	
<i>B. coagulans</i>	0.18 (34.2)	1.2 (83.4)	
<i>B. firmus</i>	0.14 (22.6)	0.9 (62.6)	
<i>B. licheniformis</i>	0.04 (7.6)	0.4 (27.8)	> 2.0 (>40.0)
<i>B. macerans</i>	0.16 (30.4)	1.2 (83.4)	
<i>B. megaterium</i>	0.06 (11.4)	0.6 (41.7)	
<i>B. natto</i>	0.10 (19.0)	0.7 (48.7)	
<i>B. pumilus</i>	0.10 (19.0)	0.6 (41.7)	
<i>B. sphaericus</i>	0.02 (3.8)	0.1 (7.0)	1.4 (28.0)
<i>B. subtilis</i>	0.18 (34.2)	1.2 (83.4)	
<i>Micrococcus flavus</i>	0.02 (3.8)	0.2 (13.9)	> 2.0 (>40.0)
<i>M. conglomeratus</i>	0.06 (11.4)	0.4 (27.8)	> 2.0 (>40.0)
<i>M. epidermidis</i>	0.06 (11.4)	0.5 (34.8)	> 2.0 (>40.0)
<i>M. freudenreichii</i>	0.40 (76.0)	2.0 (139.0)	
<i>M. luteus</i>	0.04 (7.6)	0.5 (34.8)	> 2.0 (>40.0)
<i>M. roseus</i>	0.70 (113.0)	> 2.0 (>139.0)	
<i>M. varians</i>	0.08 (15.2)	1.2 (83.4)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.20 (38.0)	1.2 (83.4)	
<i>Achromobacter parvulus</i>	0.15 (28.5)	0.5 (34.8)	> 2.0 (>40.0)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<0.01 (<1.9)	0.4 (27.8)	> 2.0 (>40.0)
<i>Escherichia coli</i>	0.40 (76.0)	2.0 (139.0)	
<i>Flavobacterium esteraromaticum</i>	<0.01 (<1.9)	—	> 2.0 (>40.0)
<i>Proteus vulgaris</i>	<0.01 (<1.9)	0.4 (27.8)	> 2.0 (>40.0)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.20 (38.0)	1.2 (83.4)	
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.50 (95.0)	> 2.0 (>139.0)	

* Undissociated molecule concentration (mg/100 ml)

Undissociated molecule concentration was calculated from the following numerical: Adipic acid concentration × proportion of undissociated molecule at pH of media.

はアジピン酸>酢酸>乳酸>クエン酸の順となり、アジピン酸は酢酸よりも高いpHで乳酸菌の生育を阻止した。

この傾向は腐敗細菌の場合と同じであり、高いpHでの生育阻止作用がアジピン酸の特徴と思われる。pH 5.0における最小生育阻止濃度 (Table 5) は酢酸<アジピン酸<乳酸<クエン酸の順で、抗菌力は腐敗細菌の場合と同様に解離度の低い順と一致し、アジピン酸は酢酸に次いで強い抗菌力を示した。しかし、pH 5.0ですべての乳酸菌の生育を完全に阻止するためには0.4~1.8%のアジピン酸を必要とするため、この酸の単独添加で生育を阻止することは実際上困難であり、乳酸菌の完全阻止にはpHの低下や他の抗菌性を有する物質との併用な

どの手段を講ずる必要がある。

5. 酵母の生育に及ぼす影響

酵母の至適pH域は4.0~6.0で、酸性pHで旺盛な生育を示すので、pH 5.0, 4.0及び3.0におけるアジピン酸の影響を調べた (Fig. 3)。Debaryomyces hansenii (当学科醸造食品化学研究室保存株) は試験したpHの範囲内ではほとんど生育に差がなく、いずれのpHにおいてもアジピン酸添加の影響は認められなかった。また、Hansenula anomala NRIC 1311, Saccharomyces cerevisiae Kyokai No. 7, 研究室保存の Endomycopsis fibuliger, Candida parakrusei 及び Trichosporon cutaneum の5株も同様の結果を示した。

これに対し、Pichia membranaefaciens IFO 0115,

Fig. 2 Relationship between pH and proportion of undissociated molecule of adipic acid

Proportion of undissociated molecule (α) was calculated from the following numerical formula⁶⁾.

$$\frac{1}{\alpha} = 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}$$

$$K_1 = 3.90 \times 10^{-5}, K_2 = 5.29 \times 10^{-6}$$

Torulopsis famata IFO 1084, *Cryptococcus neoformans* NRIC 1302 及び研究室保存の *Rhodotorula glutinis* の4株は培地の pH によって生育差がみられ、アジピン酸の添加に伴って生育阻害を受けた。しかし、酵母に対するアジピン酸の生育阻害作用は弱く、アジピン酸の添加によって酵母の生育を阻止することは不可能と判断された。

以上、アジピン酸はグラム陽性の好気性細菌に対してかなり強い抗菌力を発揮することから、呈味特性や緩衝効果などの化学特性¹⁾とともに食品への利用が有効であると判断された。

要 約

腐敗細菌27株、乳酸菌6株、酵母10株を対象としてアジピン酸の抗菌作用について検討した。

(1) アジピン酸は誘導期及び世代時間の延長、最高菌数低下のいずれの生育相にも影響を及ぼすことが分かった。

(2) 細菌類に対する生育阻止 pH は4.2~5.2の範囲にあり、*Bacillus* や *Micrococcus* 属などグラム陽性菌に対しては酢酸の生育阻止 pH よりも高い値を示した。

Table 4 Complete inhibitory pH of organic acid for lactic acid bacteria

Strain	Adipic	Acetic	Lactic	Citric
<i>Lactobacillus sake</i> NRIC 1070	4.2	3.8	3.6	3.6
<i>Lactobacillus plantarum</i> *	4.2	4.0	3.8	3.6
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8042	4.6	4.4	4.2	3.8
<i>S. lactis</i> *	4.6	4.2	4.2	3.8
<i>Pediococcus hennebergii</i> *	4.0	4.0	3.6	3.6
<i>Leuconostoc citrovorum</i> *	4.2	4.0	4.0	3.8

* Marks are stock cultures in the Laboratory of Fermented Food Chemistry, Tokyo University of Agriculture

Table 5 Minimum growth inhibitory concentration of organic acid for lactic acid bacteria at pH 5.0 (%)

Strain	Adipic	Acetic	Lactic	Citric
<i>Lactobacillus sake</i>	1.6 (304)*	1.4 (504)*	> 2.0 (> 140)*	> 2.0 (> 20)*
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.0 (190)	1.2 (432)	1.9 (133)	> 2.0 (> 20)
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.4 (76)	0.3 (108)	0.7 (49)	> 2.0 (> 20)
<i>S. lactis</i>	0.6 (114)	0.5 (180)	1.1 (77)	> 2.0 (> 20)
<i>Pediococcus hennebergii</i>	1.8 (342)	1.4 (504)	> 2.0 (> 140)	> 2.0 (> 20)
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	1.4 (266)	1.1 (396)	> 2.0 (> 140)	> 2.0 (> 20)

* Undissociated molecule concentration (mg/100 ml)

Fig. 3 Effect of adipic acid on growth of yeasts

pH: ○ 5.0, ● 4.0, ◎ 3.0

* Mark indicates a stock culture in the Laboratory of Fermented Food Chemistry, Tokyo University of Agriculture.

(3) 細菌類に対する生育阻止作用は pH 6.0 では殆んど認められないが、pH の低下に伴って阻止濃度が低下し、pH 5.0 では 0.2% 以下で大半の供試菌の生育を阻止した。

(4) 乳酸菌に対する生育阻止濃度 (pH 5.0) は 0.4~1.8% の間にあり、實際上アジピン酸の単独使用によって乳酸菌の生育を完全に阻止することは困難と判断された。

(5) 酵母の生育に及ぼすアジピン酸の作用は弱く、アジピン酸の添加によって酵母の生育を阻止することは不可能であった。

本研究にあたり食品添加用アジピン酸「アサビック」を提供下さいました旭化成工業株式会社化学品販売第四部の安川嘉紀氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 土谷博道: *New Food Industry*, 26, (8), 27 (1984).
- 2) 山本 泰・東 和男・好井久雄: 日食工誌, 31, 525 (1984).
- 3) 成瀬治己: 食品と科学, 増刊号②, 88 (1985).
- 4) 三好英男: 月刊食品, 328 号, 17 (1985).
- 5) 野本正雄・奈良橋快子・新川保太郎: 農化, 29, 805 (1955).
- 6) 藤永太郎・関戸栄一共訳: イオン平衡 (化学同人, 京都), p. 76 (1979).
- 7) 山本 泰・東 和男・好井久雄: 日本醸造協会雑誌, 80, 411 (1985).

(昭和 61 年 6 月 17 日受理)