Clostridium 属芽胞の耐熱性に及ぼす有機酸の影響†

山本 泰*・今泉 渉*・東 和男*・好井久雄*

Effects of Organic acids on Thermal Resistance of *Clostridium* Spores

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

Yasushi YAMAMOTO*, Wataru IMAIZUMI*, Kazuo HIGASHI* and Hisao YOSHII*

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

Effects of various organic acids on thermal resistance of spores of *Clostridium botulinum* 62 A and 213 B, *Clostridium sporogenes* PA 3679 and *Clostridium perfringens* JCM 01382 were investigated. Thermal resistance of all the tested *Clostridium* spores was maximum at pH 7.0 and it decreased with increasing acidity or alkalinity. In particular, it was remarkable in acidic side. The addition of 0.2~0.5% adipic acid at pH 5.5~9.0 decreased thermal resistance of spores with increasing concentration of adipic acid. Decreases of thermal resistance of *C. botulinum* and *C. perfringens* spores by addition of adipic acid were almost not affected by pH. However, that of *C. sporogenes* spores increased as pH dropped. The addition of 0.2% of acetic, adipic, lactic, malic, citric, fumaric, gluconic, tartaric, succinic, sorbic or propionic acid at pH 7.0 and 9.0 decreased thermal resistance of *C. botulinum* 62 A spore by 35~65%. At pH 5.5, the decreasing actions of most of the tested organic acids on thermal resistance of *C. botulinum* 62 A spores were significantly reduced or disappeared, although those of adipic and acetic acid were powerful.

(Received Aug. 8, 1989)

アジピン酸は各種の細菌に対して強い生育抑制作用を示す¹⁾²⁾。前報³⁾ではアジピン酸は比較的高い pH で *Clostridium* 属株の生育を阻止するとともに芽胞の耐熱性を低下させることを報告した。細菌や芽胞の耐熱性は培地等の加熱時に接触している媒体成分に影響されることから、食品に添加される各種の薬剤について微生物の加熱損傷に及ぼす影響が研究されている⁴⁾⁵⁾。食品に利用される酸味料としては、*Salmonella typhimurium* に対する酢酸⁶⁾⁷⁾及び乳酸⁶⁾、*Clostridium* 属芽胞に対するアスコルビン酸⁸⁾、*Bacillus* 属芽胞に対するクエン酸ナトリウム⁹⁾、リンゴ酸¹⁰⁾、酢酸¹⁰⁾、クエン酸¹⁰⁾及び乳酸¹⁰⁾についての報告がみられるものの、他の有機酸類の作用については殆ど知られていない。

本報では、*Clostridium* 属芽胞を対象として、アジ

ピン酸を中心に食品への添加が認められている各種の有機酸類の耐熱性低下作用を pH との関係で検討した。

実験方法

1. 供試菌株

前報³⁾と同一の菌株を使用した。

2. 嫌気培養

前報³⁾と同一の方法によった。

3. 有機酸

食品への添加が許可された酸味料としてアジピン酸、酢酸、乳酸、グルコン酸、DL-リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸及びクエン酸、保存料としてプロピオン酸とソルビン酸を用いた（いずれも市販の特級又は一級試薬）。

† 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9報）（前報、文献3）

* 東京農業大学農学部醸造学科（〒156 東京都世田谷区桜丘1-1-1）

Fig. 1 Effects of pH on decrease of TDT of *Clostridium* spores by adipic acid

Clostridium spores were suspended into 1/15 M-phosphate buffer solutions with various pH containing adipic acid. Concentration of spores was 10^5 /ml. Zero point five ml of the spore suspensions were pipetted into glass tubes with 5 mm inside diameter and it was sealed by flame under sterile conditions. Several glass tubes were heated for 1 min intervals at the prescribed temperatures. Zero point one ml of that spore suspensions were inoculated into GAM broth and cultivated in gaspak unaerobic jar (BBL) for 5 days at 30°C. TDT was determined by the minimum heating times (min) which growth was not recognizable.

* Decreasing rates (%) of TDT are shown in parenthesis.

Adipic acid (%): —○— 0, —●— 0.2, —△— 0.3, —▲— 0.4, —□— 0.5

4. 芽胞懸濁液の調製

前報³⁾と同一の方法によった。

5. 加熱処理及び加熱致死時間

前報³⁾と同一の方法によった。

実験結果及び考察

1. アジピン酸の耐熱性低下作用に及ぼす pH の影響

アジピン酸を含む pH 5.5~9.0 のリン酸緩衝液中に懸濁した *Clostridium* 属芽胞の TDT を Fig. 1 に示した。一般に細菌や芽胞は中性付近で最高の耐熱性を示すことが知られている¹¹⁾。本報においても供試菌芽胞の耐熱性は pH 7.0 で最高となり、酸性又はアルカリ性になるほど低下したが、特に酸性 pH での低下が著しかった。いずれの芽胞もアジピン酸濃度の増加に伴って耐熱性は低下したが、pH の影響は *Clostridium botulinum* 62 A について示したように 0.2~0.5% アジピン酸で同じ傾向が認められたので、他の株では 0.2% 添加についてののみ記載した。アジピン酸の添加に伴う TDT 低下率³⁾は、*C. botulinum* 62 A 及び 213 B では pH 5.5, *Clostridium perfringens* では pH 6.0 以下でわずかに減少したものの他の試験 pH 域では大差はなく、アジピン酸の耐熱性低下作用に及ぼす pH の影響は殆ど認められなかった。しかし、*Clostridium sporogenes* の TDT 低下率はアルカリ性 pH で減少し、酸性 pH ほど増加する傾向がみられた。pH 5.5 における 0.2% アジピン酸溶液の非解離型分子は 5.8 mg/100 ml で、これは本菌に対するアジピン酸の MIC でもあり、TDT の低下に非解離型分子が関与していることも考えられた。しかし、pH 6.0 における非解離型分子は 0.8 mg/100 ml で、pH 5.5 に比べて 14% しか存在しないが、TDT 低下率は 50% 以上を示していること、他の株では低下率が逆に酸性 pH で小さく、非解離型分子の存在しない中性~アルカリ性 pH で大きくなっていることなどから非解離型分子は芽胞の耐熱性低下に関与しないと判断された。*C. sporogenes* PA 3679 は *C. botulinum* よりも耐熱性が強く非病原性のため、加熱殺菌条件選定のための指標菌¹²⁾として使用されているが、本実験に用いた PA 3679 は *C. botulinum* に比べて耐熱性が弱く³⁾、低 pH ほど酸に対する感受性が高まることから TDT 低下率に影響したものと推察された。アジピン酸の *C. botulinum* 芽胞に対する耐熱性低下作用は前述のように pH 5.5 以上では殆ど pH の影響を受けないので、本菌芽胞の殺菌にアジピン酸を利用する場合は pH 7.0 に比べて耐熱性が

およそ 1/10 に低下する pH 5.5 で実施するのが最も効果的であるといえる。

2. 耐熱性に及ぼす各種有機酸の影響

上述のようにアジピン酸は pH 5.5~9.0 において芽胞の耐熱性を低下させるが、他の有機酸類においても同様の作用が認められるか否かを知るため、*C. botulinum* 62 A 芽胞を対象として、各種有機酸の耐熱性低下作用を検討した (Fig. 2, Table 1)。試験 pH は 5.5, 7.0 及び 9.0 とし、濃度はいずれも 0.2% とした。pH 7.0 と 9.0 における TDT の低下率は 35~65% の範囲で、全ての有機酸で TDT の低下が認められた。抗菌力を有する有機酸類の中でアジピン酸と酢酸は最も強い低下作用を示したものの、プロピオン酸やソルビン酸の作用は弱かった。pH 5.5 では全ての有機酸の耐熱性低下作用は明らかに弱まる傾向にあり、プロピオン酸、ソルビン酸、コハク酸及びクエン酸ではその作用は消失した。しかし、アジピン酸は酢酸とともになお 50% の TDT 低下率を示し、いずれの pH においても供試有機酸中では最も強い芽胞耐熱性低下作用を示すことが明らかとなった。

有機酸類の抗菌力は非解離型分子の濃度によって規定されるため、解離定数の小さな酸ほど強力であるが、芽胞の耐熱性低下作用は解離定数の小さなプロピオン酸や

Fig. 2 Effects of organic acids on TDT of *C. botulinum* 62 A spores

Initial spores: 10^4 , Heating temperature: 100°C , Organic acids concentration: 0.2%, pH: 7.0, 9.0, 5.5

Table 1 Decreasing rates (%) of TDT of *C. botulinum* 62 A spores by the addition of 0.2% organic acids

Organic acids	pH		
	5.5	7.0	9.0
Propionic	0	35.9	44.2
Sorbic	0	42.3	44.2
Succinic	0	45.7	44.2
Tartaric	20.0	47.8	48.8
Gluconic	20.0	48.9	47.7
Fumaric	20.0	51.1	50.0
Citric	0	52.2	57.0
Malic	20.0	54.3	51.2
Lactic	40.0	57.6	54.7
Adipic	50.0	59.8	65.1
Acetic	50.0	63.0	59.3

ソルビン酸で弱いなど、必ずしも解離度との関係は認められなかった。また、その作用は酸性 pH よりも中性～アルカリ性 pH の方が強く、この点からも非解離型分子の関与は否定される結果となった。加熱による細胞や芽胞の死滅は細胞壁や細胞膜（又は孢子膜）等の表層構造の損傷及びリボソーム、RNA、DNA、酵素等の内部成分の変性等に起因すると考えられるが、有機酸の種類による耐熱性低下作用の差は、これらの損傷や変性等の促進作用が個々の有機酸によって異なるためと推測されるので、この点については現在引き続き検討中である。

要 約

Clostridium 属芽胞を対象として、アジピン酸を中心に各種有機酸類の耐熱性低下作用を pH との関係で検討した。

(1) いずれの供試芽胞も耐熱性は pH 7.0 で最高となり、酸性又はアルカリ性になるほど低下したが、特に酸性での低下が著しかった。

(2) アジピン酸の芽胞耐熱性低下作用は pH 5.5～

9.0 のいずれにおいても濃度の増加に伴って増強された。

(3) アジピン酸の芽胞耐熱性低下作用は *C. botulinum* と *C. perfringens* ではそれぞれ pH 5.5 と 6.0 以下で若干減少したものの殆ど pH の影響は受けなかった。しかし、*C. sporogenes* では低 pH ほどその作用は増強された。

(4) 供試有機酸はいずれも pH 7.0 及び 9.0 において *C. botulinum* 62 A 芽胞の耐熱性を 35～65% 低下させた。pH 5.5 では大部分の有機酸の耐熱性低下作用は減少し、プロピオン酸、ソルビン酸、コハク酸及びクエン酸ではその作用は消失した。しかし、アジピン酸と酢酸はなお強力な耐熱性低下作用を示した。

文 献

- 1) 山本 泰・軽部則夫・東 和男・好井久雄：日食工誌, 34, 88 (1987).
- 2) 山本 泰・三澤泰彦・東 和男・好井久雄：日食工誌, 36, 62 (1989).
- 3) 山本 泰・小野尚之・東 和男・好井久雄：日食工誌, 36, 551 (1989).
- 4) 土戸哲郎：醗酵工学, 55, 144 (1977).
- 5) 芝崎 勲：新・食品殺菌工学（光琳・東京），p. 390 (1983).
- 6) LATEGAN, P.M. and VAUGHN, R.H.: *J. Food Sci.*, 29, 339 (1964).
- 7) GARIBALDI, J.A.: *Food Technol.*, 22, 1013 (1968).
- 8) ELLER, C., EDWARDS, F.F. and WYNNE, E.S.: *Appl. Microbiol.*, 16, 349 (1968).
- 9) 犬飼 進・菊池順子・渡辺忠雄：食衛誌, 25, 125 (1984).
- 10) LYNCH, D.J. and POTTER, N.N.: *J. Food Prot.*, 51, 475 (1988).
- 11) 芝崎 勲：新・食品殺菌工学，（光琳・東京）p. 26 (1983).
- 12) 芝崎 勲：新・食品殺菌工学，（光琳・東京）p. 36 (1983).

（平成元年 8 月 8 日受理）