

果実飲料から分離された好酸性菌の諸性状について

池上 義昭, 遠田 昌人, 松井 智江, 中川 薫

Characteristics of Acid-thermophilic Bacteria Isolated from Fruit Drinks

Yoshiaki Ikegami, Atsuhito Enda,
Tomoe Matsui and Kaoru Nakagawa

Three strains of acid-thermophilic bacteria were isolated from fruit drinks and then their characteristics were investigated.

Because the growth of isolated organisms occurred between pH 3.5 and 4.5 and between 45°C and 50°C, they were identified as *Bacillus acidocaldarius*.

It was found that lactic, adipic, fumaric and acetic acids had inhibitory effect on the growth of the spores in TYG medium below pH 5.5. Especially, acetic acid was effective for inhibition. On the other hand citric and malic acids had no appreciable effect on the growth of the spores.

The median lethal time (LT_{50}) of strains AC-1, AC-2 and AC-3 spores at 95°C in TYG of pH 3.5-4.0 were 3.0, 1.8 and 3.5 minutes, respectively. The D value of strain AC-1 was 3.9 minutes with heating at 90°C and $150\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ with UV irradiation.

A sucrose ester of fatty acids (SE;P-1670) showed strong antibacterial activity against the spores of strain AC-1. The inhibition was affected with pH values of medium. While the addition of 4 ppm inhibited outgrowth of AC-1 spores at pH 5.0, that of 8 ppm was required at pH 3.5. These results showed that decrease in pH in TYG caused corresponding decrease of the antibacterial activity of SE.

Key words : acid-thermophilic bacteria, *Bacillus acidocaldarius*, fruit drink, identification, organic acid, pH, sucrose ester of fatty acid, heat resistance, UV resistance, D value

容器詰酸性飲料を変敗させる微生物として、カビ、酵母、そして細菌では乳酸菌や酪酸菌などが考えられる。これらの中で、耐熱性の微生物は、子のう胞子を形成する *Byssochlamys* や *Neosartorya* などのカビ、そして芽胞を形成する細菌として有芽胞乳酸菌である *Sporolactobacillus inulinus*, 酪酸菌である *Clostridium pasteurianum* や *Clostridium butyricum*, フラットサワー菌である *Bacillus coagulans* などが挙げられる。しかし、ここ数年前から pH の低い領域でよく増殖する *Bacillus* 属の細菌、即ち好酸性菌による酸性飲料の異臭や消毒臭を呈する変敗が報告され問題になっている¹⁻⁴⁾。

当研究室で容器結果実飲料から分離した3株の細菌は、芽胞を形成し、しかも pH が低い領域

でよく増殖する細菌であった。そこで、この細菌による容器結果実飲料の変敗を防止する目的で、その諸性状、特に増殖における温度、pHおよび有機酸などの影響や芽胞の耐熱性、耐UV性およびシヨ糖脂肪酸エステルの効果などについて試験したのでここに報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株

紙容器詰およびPETボトル詰酸性飲料から分離したAC-1, AC-2, AC-3の菌株を使用した。

2. 分離菌の生物学的性状

以下の試験では、純粋分離した菌株をTYG培地（バクトトリプトン1.0%、酵母エキス0.2%、ブドウ糖0.5%）中で45℃、2日間培養して、新鮮な培養液を種培養液として使用した。

1) 硝酸塩の還元 ポリペプトン2g、ブドウ糖0.1g、 K_2HPO_4 0.2g、硝酸カリウム0.1gを精製水100mlに溶解し、pH 5.0に調整した培地に菌を接種し、45℃で4日間培養後、常法に従って硝酸塩の還元能を試験した。

2) アセトインの産生 ポリペプトン2g、ブドウ糖0.5g、 K_2HPO_4 0.5gを精製水100mlに溶解し、pH 5.0に調整した培地に菌を接種し、45℃で4日間培養後、常法に従ってアセトインの産生能を試験した。

3) カゼインの加水分解 2倍濃度の普通寒天培地（日水製薬；NAと呼ぶ）と10%脱脂乳溶液を殺菌後、等量混和し、10%クエン酸を0.02%になるように加え、ペトリ皿に分注し平板にした。これに菌を塗抹し、45℃で4日間培養後、常法に従ってカゼインの加水分解を試験した。

4) ゼラチンの加水分解 NA培地にゼラチンを0.4%添加し、殺菌後、10%クエン酸を0.02%になるように加え、ペトリ皿に分注し平板にした。これに菌を塗抹し、45℃で4日間培養後、塩化水銀を滴下してゼラチンの液化を試験した。

5) デンプンの加水分解 NA培地を殺菌後、可溶性デンプンを0.5%になるよう加え、さらに10%クエン酸を0.02%になるように加え、平板にした。これに菌を塗抹し、45℃で4日間培養後、ルゴール液を滴下してデンプンの液化を試験した。またTY培地（トリプトン1.0%、酵母エキス0.2%、pH 5.0）に可溶性デンプンを0.5%になるように加えた培地に菌を接種し、45℃で4日間培養後、ルゴール液を滴下してデンプンの液化を試験した。

6) グルコースからのガス産生 ダーラム管の入ったTYG培地（pH 5.0）に菌を接種し、45℃で10日間培養し、ガスの産生能を試験した。

7) 糖の利用 A液（リン酸アンモニウム0.2g、塩化カリウム0.04g、硫酸マグネシウム0.04g、精製水100ml、pH 5.0）、B液（寒天末4g、精製水100ml）を殺菌後、混合してビタミン溶液⁵⁾を1ml加え、約55℃まで冷却後、菌を接種して攪拌後、ペトリ皿に分注した。このときの接種には、培養液1mlを遠心分離し、上清を捨て、生理食塩水0.5mlを加えて攪拌して得られた懸濁液を用いた。表面を乾燥後、2%の糖液を滴下して45℃で培養した。6日間培養後、菌の増殖の有無を表面顕微鏡で観察し判定した。

8) 糖からの酸産生 TY培地（pH 4.0）に各種糖を0.5%になるように加えた培地に新鮮な培養液を接種して45℃で培養した。6日間培養後、pHを測定してコントロールとの比較から判定した。

3. 分離菌から生成する有機酸の分析

分離菌 (AC-1) を TY 培地 (pH 4.0) 及び TYG (pH 4.0) 培地に接種した試料について昭和電工製の有機酸分析器 (Shodex OA) を使用して有機酸組成を分析した。

4. バニリンおよびグアヤコールの分析法

バニリンを 50ppm 添加した TYG (pH 5.0) に AC-2 を接種し、35℃で 30 日培養した培養液について、島津製作所 GCMS-OP1000 を使用して、バニリンおよびグアヤコールの検出を行った。

5. 分離菌の増殖における pH および温度の影響

pH を 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 に調整した TYG 培地をマグネット回転子の入った小試験管 (15mmφ×150mm) に 8ml ずつ分注し、pH 4.5 以下の場合には 100℃で 10 分間の加熱殺菌、その他は 120℃, 15 分間の加熱殺菌を行った。これらの培地に分離菌を 10^4 個接種し、恒温水槽を用いて 25℃から 55℃まで 5℃間隔の温度で培養した。培養液は経時的に分光光度計 (島津製の Baosch & Lomb SPECTRONIC 70) を使用して吸光度 (660nm) を測定した。

6. 芽胞懸濁液の調整法

分離菌 3 株を標準寒天培地 (日水製薬; SMA と呼ぶ) 100ml に 10% クエン酸 0.4ml を無菌的に加えた培地 (mSMA と呼ぶ) に塗抹し、35℃で 7 日間培養して芽胞を形成させた。これを生理食塩水に懸濁し、東洋ろ紙 No. 5 A で無菌ろ過後、70℃で 10 分間加熱、冷却後 5℃で保管した。

7. 芽胞数測定に培養条件設定

AC-1 の芽胞数を測定する場合の最適な培養条件を検討するため、滅菌後の SMA 100ml に対して 10% クエン酸および酒石酸を 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0ml 加えた培地で混積平板培養法によって芽胞数を測定した。培養温度は 30, 35, 45 および 55℃で行い、平板 2 枚の平均から芽胞数菌数を算定した。

8. 芽胞の発芽および増殖における pH の影響

AC-1 の芽胞を使用し、TYG にクエン酸、リンゴ酸、乳酸 (85% - 92% であるので 90% とし て計算した.)、フマル酸およびアジピン酸を 0.2% 加え、塩酸および水酸化ナトリウムで所定の pH に調整した培地を用いて希釈し、MPN 法で芽胞数を算出した。また酢酸は 0.24% 以下の温度で、pH 4.0 および pH 5.0 について同じように試験した。

9. 芽胞の耐熱性測定法

AC-1 の芽胞を TYG (pH 4.0) に、AC-2, 3 の芽胞は TYG (pH 3.5) に懸濁し、これを TDT 管に 1ml ずつ分注し、マイクロバーナーで熔封後、90℃, 92.5℃ および 95℃ に保持した恒温水槽中で所定時間加熱後、急冷し、35℃で培養した。各時間ごとに 2 本ずつ行い、増殖本数より LT_{50} (増殖本数が 2 本中 1 本の加熱時間) を測定した。

また AC-1 の芽胞を TGY (pH 3.5) に懸濁し、これを TDT 管に 1ml ずつ分注、マイクロバーナーで熔封後、90℃, 92.5℃ および 95℃ で加熱後、急冷し、これを mSMA 残存芽胞数を混積平板培養法によって 35℃ 培養で測定した。

10. 芽胞の耐紫外線性測定法

AC-1の芽胞を生理食塩水で希釈し、約10mlをガラスシャーレに入れ、殺菌ランプ (GL 15) を使用して200 μ W/cm²の照度で照射し、各時間ごとに残存菌数を mSMA を使用して混積培養法で測定し、D値を算出した。培養条件は35 $^{\circ}$ C, 7日間行った。なお照射線量は TOPCON の紫外線強度計 (UVR-254形) を使用して測定した。

11. 芽胞に対するショ糖脂肪酸エステルの抗菌性の測定

(株)三菱化成製のショ糖脂肪酸エステル (P-1670) を所定量添加した TGY を pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 に調整した培地に AC-1 の芽胞を 1.8×10^4 個接種し、35 $^{\circ}$ C, 20日間培養して菌の増殖の有無を観察した。

実験結果および考察

1. 分離菌の生物学的性状

Table 1 に分離した3株 (AC-1, AC-2, AC-3) の一般的生物学的性状を調べた結果を示した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁶⁾ 記載の *Bacillus acidocaldarius* に類似していると考えられるが、Bergey's manual に記載されている諸性状はほとんど ND (利用出来るデータがない) であるので、分離された3株がこれと完全に一致しているわけではない。特にデンプンの加水分解が異なる。また知られている他の好酸性菌^{2,7)} ともこの点が異なる。しかし3株の間には差がなく、同一の菌種と考えられる。AC-1の顕微鏡写真を Fig. 1 に示した。このように楕円形の芽胞を形成し、好気性、好酸性であり、しかも好熱性であるので、これらの点から分離菌は *B. acidocaldarius* に分類するのが妥当と考えられる。

Table 1. Characteristics of strains AC-1,2,3 and *Bacillus acidocaldarius*.

Item	AC-1, 2, 3	<i>B. acidocaldarius</i>
Reduction of nitrate	---	ND
Production of acetoin	---	-
Hydrolysis of casein	---	ND
geratin	---	ND
starch	---	+
Gas from glucose	---	-
Utilization of and	utili-	acid
Acid from	zation	ND
Arabinose	+++	ND
Xylose	+++	+
Rhamnose	+++	+
Glucose	+++	+
Mannose	+++	+
Fructose	+++	+
Galactose	+++	+
Lactose	---	-
Sucrose	- WW	W
Maltose	+++	-
Trehalose	+++	-
Cellobiose	+++	+
Melibiose	---	-
Raffinose	---	-
Inulin	---	-
Starch	---	-
Sorbitol	---	W
Mannitol	+++	+
Salicin	+++	-
		ND

W; Weak ND; no data available *; AC-1

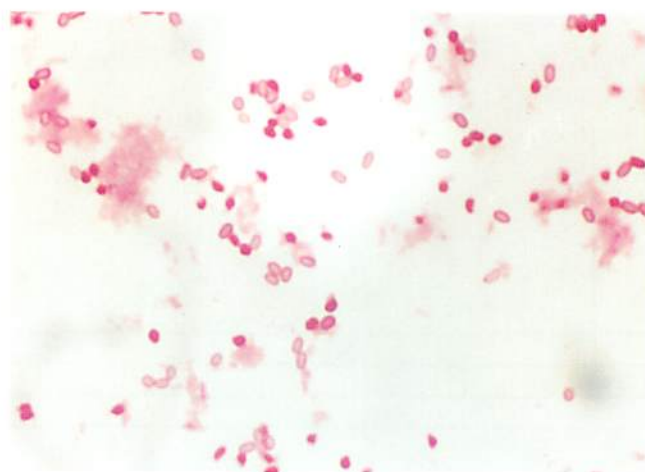


Fig. 1 Photomicrograph of strain AC-1 incubated for 5 days at 45 °C in mSMA medium. ($\times 1,800$)

2. 分離菌の生成物

AC-1が糖を分解して生成する有機酸を Table 2 に示した. 糖が含まれている TYG 培地においては乳酸が多く生成され, 僅かに酢酸を生成する. 糖分を含まない TY 培地では有機酸は生成せず, 菌の増殖によって pH が上昇したが, これはアンモニアの生成によると思われる. 糖分を含む培地での培養液においては, 有機酸を生成しているにもかかわらず, pH は上昇している.

Table 2. Analysis of organic acids produced by strain AC-1 in TY and TYG media. (mg/100g)

Product	TY (pH4.0)		TYG (pH4.0)	
	Inoculum	Control	Inoculum	Control
Citrate	1.1	1.4	1.4	1.2
Malate		1.0	1.8	1.1
Succinate	0.6	1.0	2.1	
Lactate	1.9	5.3	12.7	4.7
Acetate			3.2	
Pyro-glutamate	26.6	26.7	24.1	27.0
Propionate	0.7		1.0	
Total	30.8	35.4	46.2	34.0
pH	6.15	3.98	4.38	3.97

Incubated for 72 hrs at 45 °C.

3. バニリンおよびグアヤコールの分析法

この細菌はフレーバー成分であるバニリンの分解によるグアヤコールの生成や直鎖のアルデヒド (オクタナール, ノナナール, デカナール) からのアルコールへの変化などが報告されている⁸⁾.

バニリンを添加した TYG (pH5.0) での AC-2 の培養液は薬品臭を呈した. これを分析した

結果を Fig. 2 に示した。コントロールに存在しているバニリンが培養後、ほとんどグアヤコールになっていることが分かる。

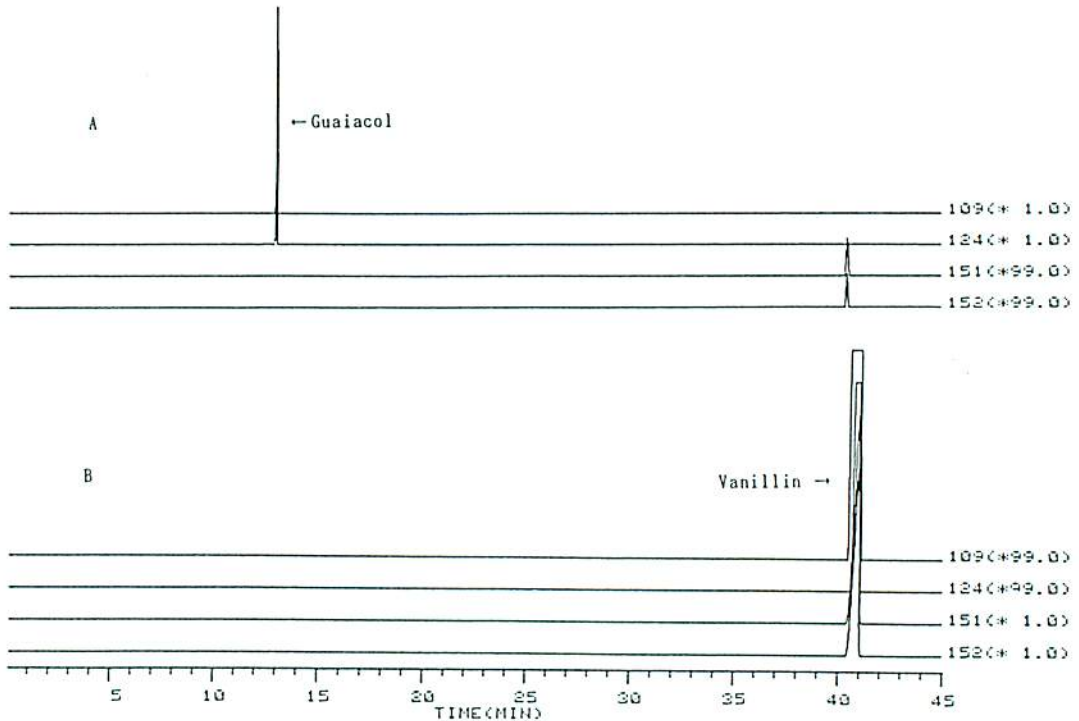


Fig. 2 Mass chromatograms of vanillin and guaiacol in TYG (pH 5.0) media added 50ppm vanillin after incubation for 40 days at 35°C.

A; Inoculation (AC-2)
B; Control

4. 分離菌の増殖における pH および温度の影響

AC-1 の増殖における培養温度と pH の関係を Fig. 3 に示した。至適温度は pH が 4.0-4.5 では 50°C であるが、この pH 範囲外では 45°C 付近の方が増殖し易い。至適 pH はどの温度でも pH 4.0-4.5 付近であった。また pH 6.0 以上あるいは 55°C 以上では増殖が遅く、4 日間の培養では増殖しなかった。これらの結果は AC-1 が好酸性であり、しかも好熱性であることを示している。*Bacillus* 属の中で好酸性で好熱性の細菌は *B. acidocaldarius* のみであり、分離菌がこの細菌であることを裏付けた。

5. 芽胞数測定のための培養条件

AC-1 の芽胞数算出における培養条件を SMA で行う場合、有機酸の種類および添加量と培養温度の影響を Table 3 に示した。クエン酸の場合は、添加量は 0.1% まではそれほど大きい差はないが、0.02% から 0.06%、pH では 5 から 6 の範囲で、35°C から 45°C 培養がよいと考えられる。しかし酒石酸の場合は pH 4.5 以下になるとコロニー数は減少した。従って、混積平板培養法によって芽胞数を測定する場合、pH が 5 から 6 の範囲であれば、クエン酸、酒石酸どちらでもよく、培養温度を 35°C-45°C で培養すればほとんどの芽胞が発芽、増殖し、コロニーを形成すると

考えられるが、35℃培養だとコロニー形成に時間がかかり過ぎるので45℃培養がよいと考えられる。

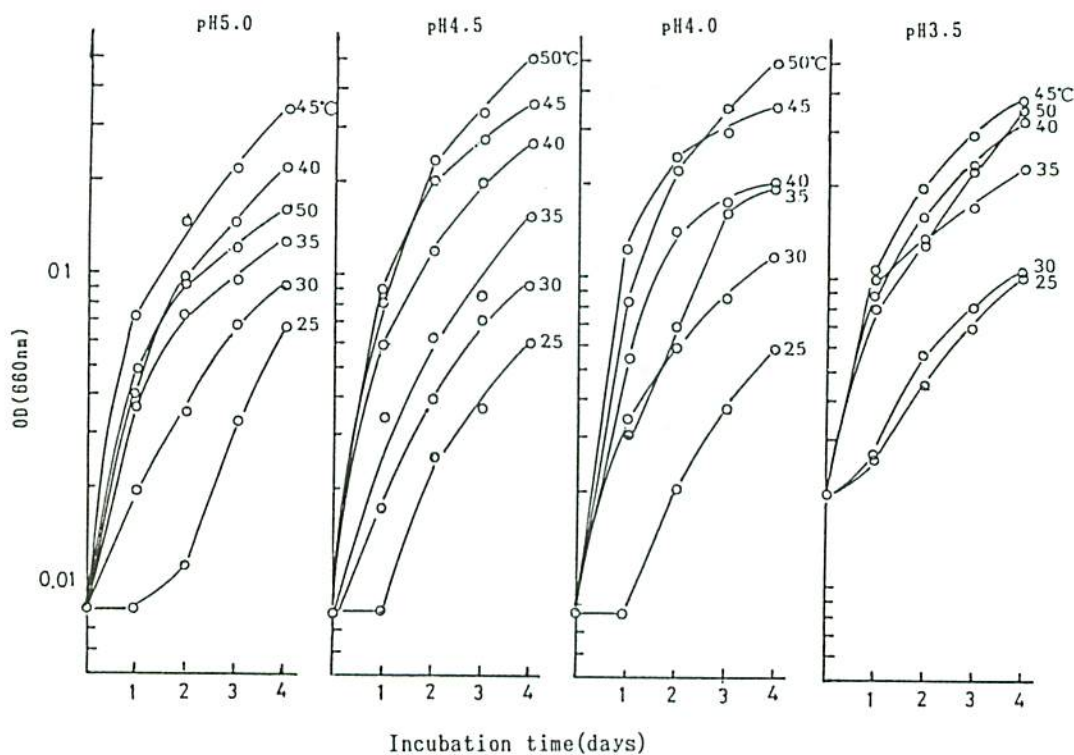


Fig. 3 Effects of pH and incubation temperature on the growth rates of strain AC-1.

Table 3. Influence of recovery count of strain AC-1 spores on the incubation temperature and addition of organic acids in mSMA medium.

Organic acid	(%)	pH	Colony counts*			
			30℃	35℃	45℃	55℃
Citrate	0.02	6.08	98	184	160	139
	0.04	5.41	124	168	153	149
	0.06	5.01	153	160	160	147
	0.08	4.77	120	143	147	107
	0.10	4.59	120	150	131	115
Tartarate	0.02	5.87	102	160	174	170
	0.04	4.98	118	182	176	118
	0.06	4.53	91	147	136	110
	0.08	4.25	94	88	117	69
	0.10	4.05	50	58	83	56

*; Mean count of 2 plates

6. 芽胞の発芽および増殖における pH の影響

AC-1の芽胞の発芽および増殖に及ぼす pH と有機酸の影響について試験した結果, Fig. 4, 5 に示すように, クエン酸とリンゴ酸はほとんどコントロールと同じ傾向であるが, その他の有機酸を添加した場合, 低い pH では発芽および増殖が抑制され, その抑制効果は酢酸, アジピン酸, 乳酸, フマル酸の順である. 特に酢酸は Fig. 6 に示したように増殖抑制効果が強く, 添加量が少なくても pH が低いと発芽および増殖し難くなった.

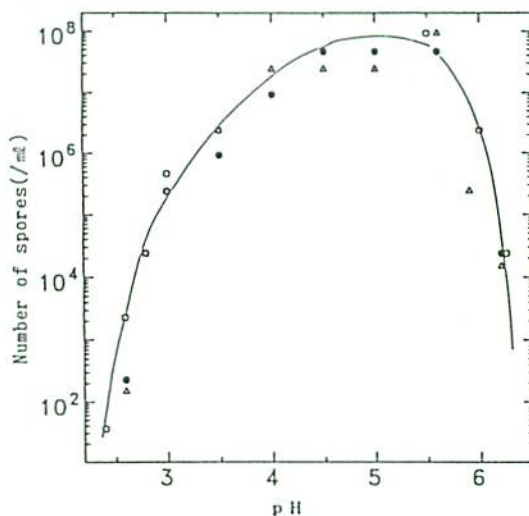


Fig. 4 Effects of pH and addition of citric and malic acids on the growth and/or germination of spores of strain AC-1.
 -○-; Control -△-; Citric acid (0.2%)
 -●-; Malic acid (0.2%)

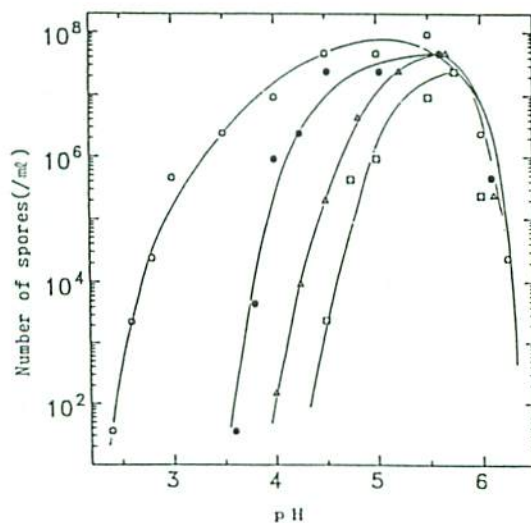


Fig. 5 Effects of pH and addition of lactic, fumaric and adipic acids on the growth and/or germination of spores of strain AC-1.
 -○-; Control -△-; Lactic acid (0.2%)
 -●-; Fumaric acid (0.2%) -□-; Adipic acid (0.2%)

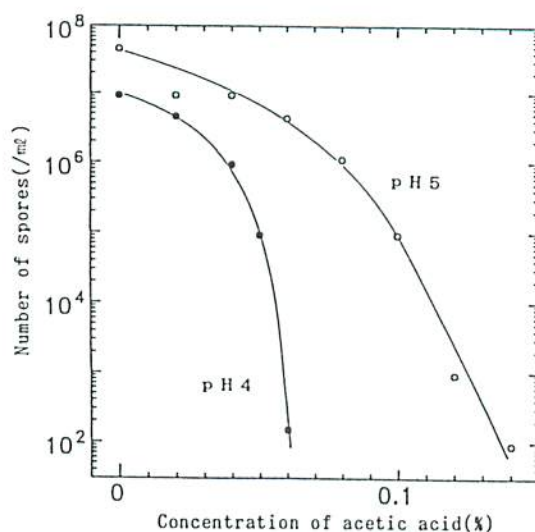


Fig. 6 Effects of pH and addition of acetic acid on the growth and/or germination of spores of strain AC-1.

7. 芽胞の耐熱性

AC-1, AC-2, AC-3の芽胞の耐熱性は Table 4 に示すように、95℃における LT_{50} が、それぞれ3.0, 1.8および3.5分であった。加熱媒体の pH が少し異なるが、3株の耐熱性にはそれほど大きな差はなかった。Z値は一般の芽胞より小さく6℃前後であった。また AC-1の芽胞のD値は Table 5 に示すように、90, 92.5および95℃におけるD値は、それぞれ3.9, 1.9および0.7分であった。この時のZ値は7.4℃であった。

このようにこの細菌の耐熱性は非常に強いので、果実飲料の製造基準の殺菌条件として定められている、pH 4.0未満の場合の65℃、10分同等および pH 4.0以上4.6未満の場合の85℃、30分同等の殺菌では死滅しない。

Table 4. Median lethal time (LT_{50}) of strains AC-1, 2, 3 spores in TYG medium.

Strain	Heat medium	Temp. (°C)	LT_{50} (min)	Z (°C)
AC-1	TYG (pH4.0) (6.5×10^5 /ml)	90.0	21.0	5.7
		92.5	8.0	
		95.0	3.0	
AC-2	TYG (pH3.5) (1.5×10^5 /ml)	90.0	10.0	6.5
		92.5	4.0	
		95.0	1.8	
AC-3	TYG (pH3.5) (3.8×10^5 /ml)	90.0	20.0	6.5
		92.5	8.5	
		95.0	3.5	

Incubated for 30 days at 35 °C.

Table 5. D values of strain AC-1 spores in TYG (pH3.5).

Tem. (°C)	D (min)	Z (°C)
90	3.9	
92.5	1.9	7.4
95	0.7	

Incubated for 7 days at 35 °C on mSMA.

8. 芽胞の耐UV性測定法

AC-1の芽胞に対する紫外線の影響は、それほど強いものではなく、芽胞数を90%死滅させるに必要な線量はTable 6に示すように $150 \mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ で、他の芽胞とそれほど大きい差は無かった。

Table 6. D values irradiated with UV for spores of strain AC-1 and other species.

Bacteria	D value*
AC-1	150
S. inulinus	58
B. subtilis	185
C. botulinum (Type A, B)	250

*; $\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$

9. 芽胞に対するシヨ糖脂脂肪酸エステル抗菌性の測定

AC-1の芽胞に対するシヨ糖脂脂肪酸エステル (P-1670) の影響は、Table 7に示すようにpHによってその効果は異なり、pH 3.5では8 ppm以上、pH 5.0では4 ppm以上で発芽、増殖を阻止し、pHが低いほど抗菌作用を弱める傾向が認められた。これはこの細菌が好酸性菌であるためと考えられる。

Table 7. Effect of pH value in TYG on antibacterial activity of SE for strain AC-1 spores.

P-1670	pH 3.5	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0
2 ppm				++
3			++	+-
4		++	+-	--
5	++	++	--	--
6	++	++	--	
7	++	--		
8	--	--		

Inoculum; $1.8 \times 10^4 / 10\text{ml}$

Incubated in TYG for 20 days at 35 °C.

要 約

容器詰の果実飲料を変敗させる細菌として *B. acidocaldarius* の類似菌を分離した。この細菌の増殖における至適 pH が 4 付近であり、しかも至適温度が 45℃ から 50℃ であることから、好酸性の好熱性菌である。この細菌によって変敗した果実飲料は異臭を呈し、特にバニリンを分解してグアヤコールを産生するので薬品臭を呈する。

この細菌の芽胞に対する pH と有機酸の影響は、酢酸、アジピン酸、乳酸、フマル酸などが pH 5.5 以下で増殖を抑制する。特に酢酸は増殖に対して非常に抑制効果がある。

pH 3.5 から 4.0 の TYG 培地中における耐熱性は 90℃ で 10 分から 20 分程度であるので、果実飲料の通常の殺菌条件では死滅しない場合がある。

耐 UV 性については、D 値が $150 \mu\text{W} \cdot \text{min}/\text{cm}^2$ であるので、他の細菌と比較して同等程度である。

シヨ糖脂肪酸エステルの影響は、pH によりその効果は異なり、pH が低いほど抗菌作用を弱める傾向があり、pH 3.5 では 8 ppm 以上、pH 5.0 では 4 ppm 以上で発芽、増殖を阻止する。

謝 辞

GC-MS 測定をしていただいた達家清明教授、および有機酸分析をしていただいた農酸加工研究室の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) 鈴木俊光：日本缶詰協会，第38回技術大会講演要旨集（1989）。
- 2) 鈴木俊光：食品と容器，30，503-506（1989）。
- 3) 鈴木俊光，増田俊介：日本缶詰協会，第39回技術大会講演要旨集（1990）。
- 4) 丹羽源廣，廣田裕子，白須由治：果汁協会報，No.9，31-42（1991）。
- 5) 飯塚 廣，後藤昭二：酵母の分類同定法，pp.44，東京大学出版会，東京（1969）。
- 6) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; volume 2, (1986).
- 7) Uchino, F., and Doi, S.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, (7), 817-822 (1967).
- 8) 加藤寛之，川合康史，手塚裕和，松長正見：日本缶詰協会，第42回技術大会講演要旨集（1993）。