

Bacillus coagulans の孢子に関する研究— II

耐熱性に及ぼすp Hと食塩の相合作用

池上 義昭・橋本 京子・大田 智子

Heat Resistance of *Bacillus coagulans* Spores— II Enhancing Effect of pH and Sodium chloride on the Heat Resistance of Spores

Yoshiaki Ikegami, Kyoko Hashimoto and Tomoko Ohota

The thermal resistance of bacterial spores is influenced by A_w (water activity) and pH of heating media and recovery media after the heat treatment.

The relation between the effects of pH value and of the concentration of sodium chloride on the heat resistance was investigated by using *Bacillus coagulans* spores.

As to the effect of the heating media on the heat resistance of spores, a slight increase in number of surviving spores occurred with the increase of the sodium chloride concentration at pH 6.5-7.0.

At pH below 6.0, however, the surviving spores decreased with increasing concentrations of NaCl in the heating media.

On the other hand, the results of the experiment on the relation between the effect of the concentration of NaCl and pH value upon the recovery of the heat-damaged spores show that an increase of the NaCl concentration causes a corresponding decrease in number of surviving spores.

In this case, however, the decreasing rate on DTA at pH 7.0 was higher than on PPAA at 5.0.

On the thermal death time (LD_{50}), the maximum effect on the increase of NaCl concentration was obtained at about pH 7.0.

At pH below 6.0, however, a marked reduction in the resistance did not occur with the increase of NaCl concentration.

孢子の耐熱性が加熱中の環境や加熱後の発芽、増殖における環境、栄養組成など多くの因子によって著しく左右される。

特にp Hの影響は大きく、一般に中性付近が最大の耐熱性を示すといわれている^{1,2)}。また、一般的な一致をみるには至っていないが、食塩も耐熱性に影響を与える^{3,4)}。

本報ではp Hと食塩が耐熱性にどのように影響するかを検討するため *Bacillus coagulans* の孢子を使って加熱中及び加熱後の後培養に対するp Hと食塩の相合作用を試験したのでここに報告する。

実験方法

1. 供試菌株

前報⁶⁾で示したBC-2を使用した。

2. 培地の調整

前報で示した培地に食塩（試薬特級）を3.0%まで0.5%間隔に加え、pHを5.0, 6.0, 7.0に調整した。

3. 孢子数測定

前報に準じ、平板希釈法で行った。

4. 耐熱性測定

pHと食塩濃度をそれぞれ調整したGTB培地に孢子を懸濁させ、TDT管（外径7.0mm，長さ120mm）に1mlずつ分注し、マイクロバーナーで熔封した。これらを一定温度に保持した恒温油槽中で所定時間加熱し、流水中で急冷後、そのまま35°Cで2ヶ月培養した。各時間ごとに4本ずつ測定し、増殖本数より次のようにしてLD₅₀を算出した⁵⁾。例えば、増殖本数が次表のような結果になったと仮定するとLD₅₀は

$$\frac{5(75-50)}{75} + 30 = 31.7 \text{分である。}$$

加熱時間	増殖本数	陽性	陰性	陽性割合
25分	4	7	0	100%
30分	3	3	1	75%
35分	0	0	5	0
40分	0	0	9	0

5. 孢子形成及び孢子懸濁液の調整

前報⁶⁾に準じて行った。

実験結果と考察

1. 加熱中におけるpHと食塩の影響

pH5.0, 6.0, 7.0のM/15 磷酸緩衝液中でのD値の比較を表1に示した。後培養の条件はSMA培地で35°Cで行った。pHの関係は一般の孢子の場合と同じようにpHの低下と共にD値は減少する。このBC-2の耐熱性はpH7.0のときD₁₂₀=2.6で非常に強い耐熱性を有することが認められた。

加熱中におけるpHと食塩の併用効果を調べるために、所定のpH，食塩濃度に調整したGTB培地に孢子を懸濁させ、TDT管で115°C20分加熱した後の残存孢子数を測定した結果、図1に示したように、pH6.5, 7.0の場合は食塩濃度の増加と共に残存孢子数は増加するので、食塩は保護的に働くものと考えられる。しかし、pH6.0以下では逆に食塩濃度の増加と共に残存孢子数は減少する。

Table 1 Effect of pH on the heat resistance of *B.coagulans* spores suspended in pH 7.0 phosphate buffer.

pH	D value			Z value
	110°C	115°C	120°C	
5.0	25.0	6.5	1.7	8.5°C
6.0	36.0	9.2	2.3	8.4°C
7.0	42.0	11.0	2.6	8.3°C

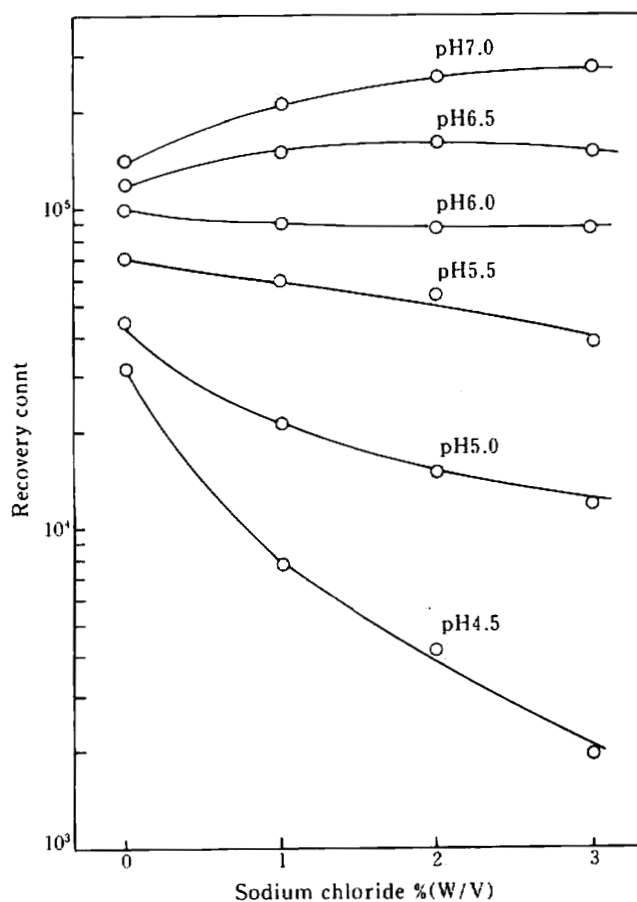


Fig.1 Recovery count of *B.coagulans* spores (BC-2) heated and suspended in heating medium containing sodium chloride.

2. 加熱損傷胞子の後培養における pH と食塩の影響

pH 5.0 の磷酸緩衝液中で 115 °C 15 分の加熱によって損傷を受けた胞子が後培地中の食塩によってどのように影響されるか検討した。

図 2 に後培地の条件として食塩を 2.0% まで 0.5% 間隔に加えた DTA 及び PPAA で残存胞子数を測定した結果を示した。pH 7.0 附近の DTA 培地では食塩濃度の増加と共にその減少が大きいが、pH 5.0 の PPAA 培地では、その減少が少なくなる。この現象は加熱中における食塩の影響と大きく異なると

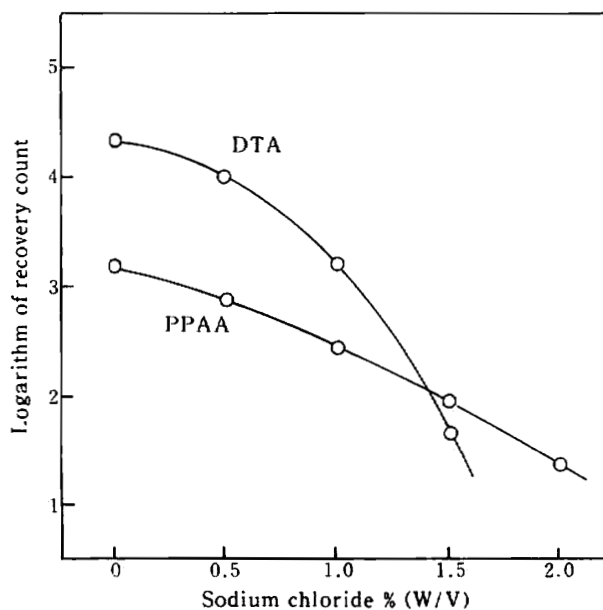


Fig.2 Recovery count of heat-damaged spores of *B.coagulans* (BC-2) in subculture media containing sodium chloride.

ころである。

3. 耐熱性に及ぼす pH と食塩の影響

pH 5.0, 6.0, 及び 7.0 の G T B 培地に食塩を添加した培地に胞子を懸濁させ、この懸濁液中における 115 °C の LD₅₀ を測定した。この時の胞子濃度は 1.6×10^7 /ml である。図 3 にその結果を示した。いずれの pH でも食塩濃度の増加と共に LD₅₀ は減少したが、pH 7.0 のときはその減少が大である。この現象は図 2 で示した後培養だけの影響とはほぼ一致する傾向が認められる。

細菌胞子の耐熱性に及ぼす食塩の影響に関する研究は多いが、一般的な一致をみるにはいたっていない。これは、耐熱性の測定方法や食塩濃度の差、あるいは菌種の差などによって耐熱性を強くなったり弱くなったりするためと考えられる。

Anderson⁴⁾ 氏らは *B.coagulans* の胞子の耐熱性に及ぼす食塩の影響をトマトジュース中で調べ、食塩の増加と共に致死時間が順次減少すると報告しているが、本報の結果と同じ傾向である。

要 約

pH と食塩が *B.coagulans* の胞子の耐熱性にどのように影響するかを加熱中及び加熱後の後培養について検討した。

胞子の耐熱性に対する加熱中の食塩の影響は pH 6.5 から 7.0 では保護的に作用するが、pH 6.0 以下になると逆に耐熱性を減少させる方向に作用する。

後培養における食塩の影響は、食塩濃度の増加と共に胞子の耐熱性は減少するが、pH が高いとその減少の割合は大きく、pH が低くなるとその減少の割合は小さくなる。この結果は加熱中及び加熱後の後培養が同一培地で測定した結果と同じ傾向であった。

文 献

- 1) 天羽幹夫 坂口謹一郎：農化誌，25，140（1951）。
- 2) Sognefest, P., Hays, G. L., Wheaton, E., and Benjamin, H. A.: Food Res., 13, 400 (1948).
- 3) Roberts, T. A., Gilbert, R. J., and Ingram, M.: J. appl. Bact., 29, 549 (1966).
- 4) Anderson, E. E., Esselen, Jr., W. B., and Fellers, C. R.: Food Res., 14, 499 (1949).
- 5) 伝染病研究所学友会編：細菌学実習提要，p. 469, 丸善（1958）。
- 6) 池上義昭 橋本京子 大田智子：本誌，14，（1983）。

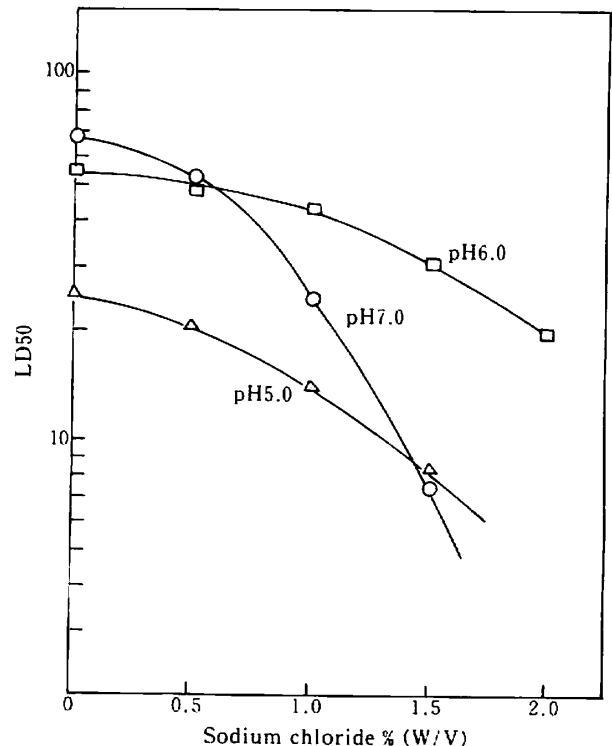


Fig.3 Relation between pH and sodium chloride on the heat resistance of *B.coagulans* spores at 115°C.