

B. polymyxa の孢子の発芽及び増殖に及ぼす pH と有機酸組成の影響

池上 義昭・村山寿美江

Effect of pH Value and Organic Acids on Germination and/or Outgrowth of *Bacillus polymyxa* Spores

Yoshiaki Ikegami and Sumie Murayama

The relative effects of pH values and organic acids on the germination and/or outgrowth of *Bacillus polymyxa* spores were investigated by using the PYG medium adjusted at a variety of pH values with HCl or NaOH after the addition of 0.4 per cent organic acids.

It was found that citric and malic acids had no appreciable effects on the growth of the spores. On the other hand, lactic and acetic acids had efficacious preventing effects on the growth at pH 6.5 or lower, the efficiency increasing corresponding with the increasing concentrations of the acids.

Marked decreases on the thermal death time (LD₅₀) of the spores in the medium with lactic and acetic acids added were observed at pH 5.5 and lower. However, no difference among the organic acids tested was observed in the D values determined with the same recovery medium.

酸性食品缶詰は一般に低温で殺菌される。これは加熱で生き残った微生物が pH の影響で増殖出来ないからである。しかし、その pH の調整を失敗すると時々変敗を起こす。従って、これらの缶詰を変敗させる微生物の pH と増殖の関係は重要である。また、同じ pH でもその食品に含まれている有機酸や pH 調整で添加する有機酸の種類によってその増殖は影響される。

微生物の増殖における酸の影響は、水素イオン濃度、あるいは非解離分子または陰イオンの毒性などが考えられる。食品の保存には、主に乳酸及び酢酸が用いられ、酸の種類によってその効果は異なることが報告されている。^{1,2)}

細菌孢子の耐熱性においても pH の影響を受け、pH の低い程、あるいはアルカリ側に傾く程その耐熱性は減少することが認められている。^{3,4,5)} pH が同じでも孢子の加熱媒体（加熱中における孢子の環境状態）によっても耐熱性は影響される。^{6,7,8,9,10)}

本報では酸性食品缶詰の膨脹原因菌の一つである *B. polymyxa* の孢子の発芽及び増殖において pH あるいは有機酸がどのように影響するかを検討したので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

トマトジュース缶詰より分離し、常法に従って *B. polymyxa* と同定した。

2. 孢子形成条件

普通寒天培地（日水製薬）に硫酸マンガンをも 10 ppm 加え 121°C、15 分滅菌後、平板に固化した培地に pE-2 培地（2% ポリペプトンにピースを加えた培地）に 24 時間培養した培養液を約 0.1 ml 滴下してコンラジ棒で全面に塗抹し 35°C で 1 週間培養した。

3. 孢子懸濁液の調整

平板上に形成した孢子塊を滅菌生理食塩水に懸濁した。得られた懸濁液を東洋口紙 No. 5 B で無菌

口過後、80°C、10分加熱して、栄養細胞を死滅させ5°Cに冷蔵保管した。長期に保管する場合は-30°Cで保管した。

4. 孢子数測定

PYG培地（ポリペプトン20g、酵母エキス2g、グルコース5g、精製水1000ml）にリンゴ酸、クエン酸、乳酸（85%~92%であるが90%として計算）、酢酸を0.4%加え、塩酸または苛性ソーダで所定のpHに調整した培地を用いてMPN法で孢子数を測定した。この時使用した希釈液は同じ培地を用いた。

5. 耐熱性におけるLD₅₀の測定

所定のpHに調整したPYG培地に孢子を懸濁させ、TDT管（外径7mm、長さ120mm）に1mlずつ分注し、マイクロバーナーで熔封後、これ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。

このときの孢子濃度は 7.0×10^5 / mlである。各時間ごとに4本ずつ測定し、増殖本数よりLD₅₀を算出した。¹¹⁾

6. D値の測定

LD₅₀の測定と同じようにして加熱したTDT管を開封後、生理食塩水で希釈し標準寒天培地（日水製薬）を使用して35°Cで平板培養した。平板上に形成したコロニーを測定してD値を算出した。

実験結果と考察

1. 発芽及び増殖におけるpHと有機酸の影響

発芽及び増殖において有機酸の種類の影響を検討する場合に、その濃度を一定にして比較する方法、モル濃度を一定にして比較する方法、また濃度に関係なく同じpHになるように酸を加えて比較する方法などが考えられる。

今回使用した有機酸の分子量をTable 1に示したが、0.4%の有機酸のモル濃度は約2倍から3倍の差がある。このように有機酸の種類による孢子の発芽及び増殖の影響を比較する場合に何を基準にして比較すべきか難しい。今回は濃度を一定にして比較検討した。

Table 1. Organic acids used for experiments

Organic acids	Molecular weight
Malic acid	134.1
Citric acid	192.1
Lactic acid	90.1
Acetic acid	60.1

0.4%のリンゴ酸、クエン酸、乳酸、酢酸を添加し、pHを調整したPYG培地で孢子数を測定した結果、Fig. 1、2、3、4に示すようにリンゴ酸、クエン酸はほとんどコントロールと同じでpH 5.5位からpHの低下とともに急激に発芽及び増殖が阻止される。乳酸ではpH 7から徐々に阻止され、酢酸ではpH 6.5位から急激に発芽、増殖が阻止される。このようにpHの低いところでは乳酸、酢酸はリンゴ酸、クエン酸より発芽、増殖し難いことが分かる。この場合、Fig. 5に示すように酸の濃度によって対数的に孢子数は減少している。

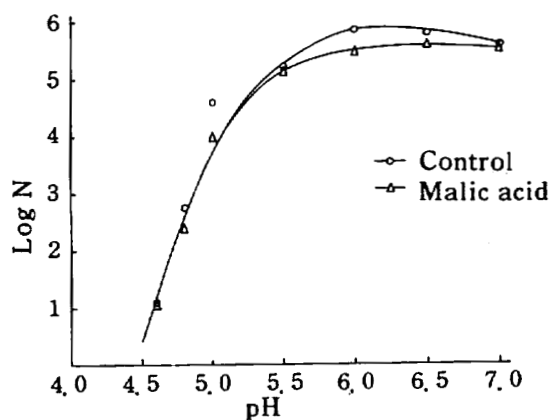


Fig. 1 Effects of pH and the addition of malic acid on the germination and/or outgrowth of *B. polymyxa* spores

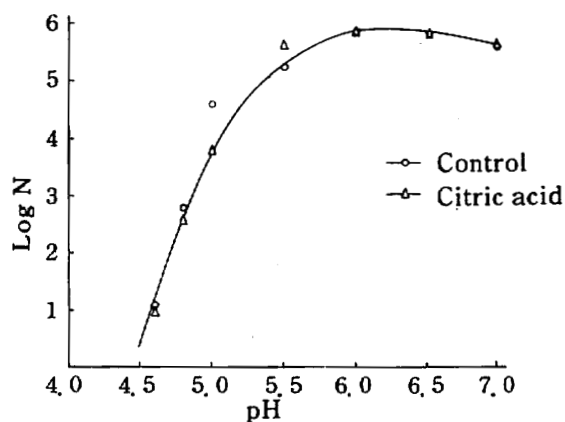


Fig. 2 Effects of pH and the addition of citric acid on the germination and/or outgrowth of *B. polymyxa* spores

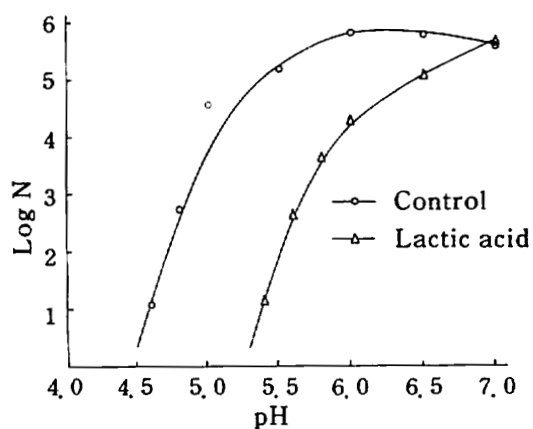


Fig. 3 Effects of pH and the addition of lactic acid on the germination and/or outgrowth of *B. polymyxa* spores

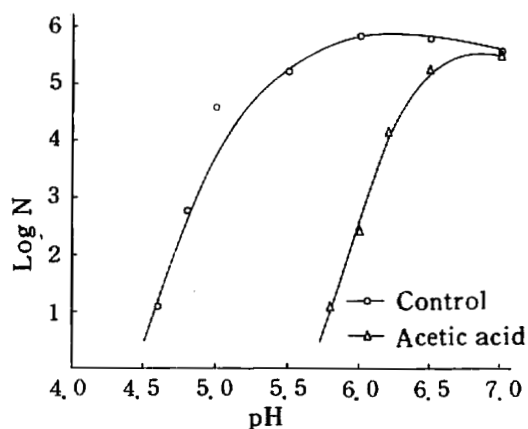


Fig. 4 Effects of pH and the addition of acetic acid on the germination and/or outgrowth of *B. polymyxa* spores

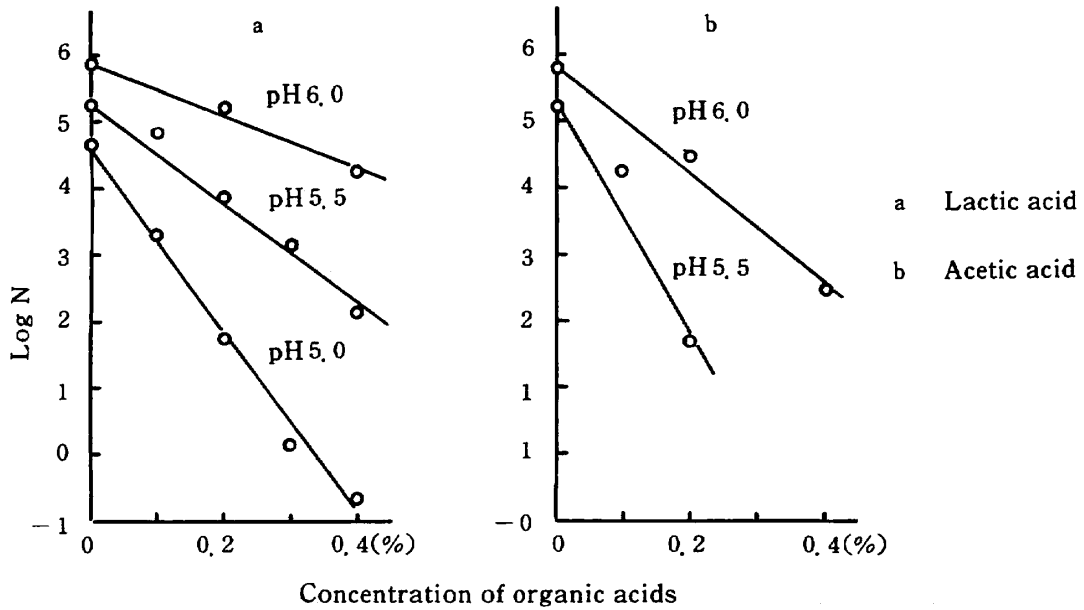


Fig. 5 Effects of the concentration and the addition of lactic and acetic acids on the germination and/or outgrowth of *B. polymyxa* spores

2. 耐熱性に及ぼす pH と有機酸の影響

胞子の加熱中における pH と有機酸の影響を調べるために100°C加熱の生残曲線を作製した結果、加熱初期部分では直線的にならないが、直線部分よりD値を算出すると Table 2 に示すように pH の低下とともにD値は減少するが、有機酸の種類によってはそれほど差は認められない。

Table 2. Effects of pH and the addition of organic acids on D value of *B. polymyxa* spores

Organic acids	D value (100°C)		
	pH 5.0	6.0	7.0
Control	0.68	0.85	1.26
Malic acid	0.82	0.92	1.21
Citric acid	0.74	0.90	1.10
Lactic acid	0.58	0.76	1.06
Acetic acid	0.76	0.90	1.18

加熱中及び加熱後の損傷胞子の発芽、増殖の影響を含めた耐熱性を Table 3 に示した。どの有機酸も pH の低下とともに耐熱性は減少させることは加熱中の影響と同じである。しかし、pH の低

いところでは有機酸の種類によって差が認められ、乳酸、酢酸は Fig. 3、4 で示した孢子の発芽及び増殖における有機酸の影響と同じように耐熱性を減少させる。従って、有機酸の種類による耐熱性への影響は加熱後の損傷孢子の発芽、増殖に関係することが分かる。

Table 3. Effects of pH and the addition of organic acids on LD₅₀ of *B. polymyxa* spores

Organic acids	LD ₅₀ (100°C)				
	pH 5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
Control	1.8	4.0	5.5	7.5	8.0
Malic acid	2.0	4.5	6.0	6.5	7.0
Citric acid	1.3	3.5	5.0	5.5	6.0
Lactic acid		1>	2.5	4.5	6.5
Acetic acid		1>	4.0	5.5	7.0

要 約

*B. polymyxa*の孢子が発芽、増殖するとき、pHや有機酸がどのように影響するか検討した。

1. リンゴ酸、クエン酸はコントロールとほとんど同じで発芽、増殖に余り影響しなかった。
2. 乳酸、酢酸は pH が低くなると孢子の発芽、増殖を抑制する。
3. 孢子の加熱中における pH と有機酸の影響は、pH の低下とともに D 値を減少させるが、有機酸の種類による影響はない。
4. 孢子の加熱後の発芽、増殖においては、リンゴ酸、クエン酸はほとんどコントロールと同じであった。しかし、乳酸、酢酸は pH が低くなると発芽、増殖を抑制し、耐熱性も低下させる。

文 献

- 1) Fabian, F. W., and Wadsworth, C. K. : Food Res., 4, 511 (1939).
- 2) Levine, A. S., and Fellers, C. R. : J. Bact., 39, 499 (1940).
- 3) 坂口謹一郎, 天羽幹夫 : 農化誌, 25, 104 (1951).
- 4) 坂口謹一郎, 天羽幹夫 : 農化誌, 27, 456 (1953).
- 5) Xezones, H., and Hotchings, I. J. : Food Technol., 19, (6), 113 (1965).
- 6) Lowik, J. A. M., and Anema, P. J. : J. Appl. Bact., 35, 119 (1972).
- 7) Anderson, E. E. Esselen, W. B., and Fellers, C. R. : Food Res., 14, 499 (1949).
- 8) Levin, M. : Bacteriol. Rev., 16, 177 (1952).
- 9) Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. : J. Bact., 80, 441 (1960).
- 10) Walker, H. W. : J. Food Sci., 29, 390 (1964).
- 11) 池上義昭, 橋本京子, 大田智子 : 本誌, 15, 133 (1983).