

*Bacillus coagulans*の孢子の発芽及び増殖に及ぼす pHと有機酸の影響

池上 義昭・後藤 隆子

Effects of pH Value and Organic Acids on Germination and/or Outgrowth of *Bacillus coagulans* Spores

Yoshiaki I KEGAMI and Takako GOTO

Experiments were carried out to determine the relative effects of pH values and various organic acids on the germination and / or outgrowth of *Bacillus coagulans* spores by using PYG medium adjusted pH value by HCl or NaOH solution after an addition of 0.2 per cent organic acid.

Citric acid had a significant inhibitory effect on the growth of the spores at pH values of all range examined. And also adipic and fumaric acids in the medium showed significant inhibitory effect on the growth of the spores at below pH 6.0. On the other hand, malic, lactic and gluconic acids in the medium showed no appreciable effect on the growth of the spores.

The optimum pH value for the germination and / or growth of the spores was approximately 6.0.

Effects of pH values and various organic acids on heat resistance of the spores were investigated.

The thermal death time (LD₅₀) of the spores in PYG medium added citric acid decreased at pH values of all range examined. It is owing to the effect of recovery media after heat treatment of the spores.

酸性食品缶詰や低酸性食品を酸の添加で pH を低下させた缶詰は一般に100°C以下の殺菌が行われているが、その殺菌条件の設定において殺菌の目標微生物に対する pH や有機酸の影響は重要である。

一般に pH が低下すると微生物の発育は抑制される。細菌は pH に対する感受性がカビや酵母より強く、ほとんどの細菌の至適 pH は中性付近で、pH4.5 以下になると増殖出来なくなる。

Bacillus 属の細菌の中で最も pH に対する感受性が弱いと思われる細菌は *Bacillus polymyxa* と *Bacillus coagulans* である。*B. polymyxa* について pH と増殖の関係を前報で報告した。¹⁾

本報では缶詰のフラットサワー様変敗として最も重要な *B. coagulans* について、その孢子の発芽及び増殖に及ぼす pH と有機酸の影響、また孢子の耐熱性に及ぼす pH 及び有機酸の影響について検討した。

実験方法

1. 供試菌株

しめじ缶詰より分離した *Bacillus coagulans* (BC-2) を使用した。

2. 孢子懸濁液の調製

普通寒天培地 (日水製薬、NA) にマンガンイオンを 10ppm 加えた斜面培地に45°Cで10日培養

し、胞子を形成させた後、生理食塩水に懸濁した。得られた懸濁液を東洋ろ紙 No. 5B で無菌ろ過後、100°C、10分加熱して栄養細胞を死滅させると同時に活性化させた。保管は通常 5°C であるが、一ヶ月以上の長期にわたる場合は -30°C とした。

3. 胞子数の測定

P Y G 培地 (ポリペプトン 2%、酵母エキス 0.2%、ブドウ糖 0.5%) にクエン酸、リンゴ酸、乳酸 (85%~92% であるが 90% として計算)、酢酸、アジピン酸、フマル酸、グルコン酸をそれぞれ 0.2% 加え、塩酸または苛性ソーダで所定の pH になるよう調整した培地を用いて MPN 法で胞子数を測定し、コントロール (有機酸を添加しない P Y G) の胞子数と比較した。

また、P Y G にクエン酸を 0.05%、0.1%、0.15%、0.2% 加え、pH を 5.0、6.0、7.0 に調整した培地を用いて MPN 法で胞子数を測定した。尚、この時使用した希釈液は同じ培地を用いた。

培養温度は pH が低いところでは 35°C 付近が最適温度であるので 35°C で行った。²⁾

4. 致死時間 (L D₅₀) の測定

P Y G に上記の 7 種類の有機酸を 0.2% 加えた培地と P Y G そのままの培地を pH 5.0、6.0、7.0 に調整し、この培地に胞子懸濁液を 1.0×10^8 / ml になるように加え、これを T D T 管 (外径 7 mm、長さ 120 mm) に 1 ml ずつ分注し、マイクロバーナーで熔封後、115°C 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、35°C で 1 カ月培養した。各時間ごとに 4 本ずつ測定し、増殖陽性本数より L D₅₀ (増殖陽性が 50% のときの加熱時間) を算出した。すなわち、4 本中 2 本が増殖した時の加熱時間を算出した。

5. D 値の算出

pH を 5.0、6.0、7.0 に調整した P Y G および 0.2% のクエン酸を添加した P Y G を使用して、L D₅₀ の測定と同様にして 115°C で所定時間加熱し、流水中で急冷後、T D T 管を開封し、生理食塩水で希釈、pH 5.0、6.0、7.0 に調整した P P A A 培地 (プロテオーゼ ペプトン 5 g、酵母エキス 5 g、ブドウ糖 5 g、リン酸 1 水素カリウム 4 g、精製水 500 ml を pH 5.0 に調整し殺菌、これを寒天末 20 g、精製水 500 ml の殺菌液と混ぜ合わせた培地) および P P A 培地 (P P A A と組成は同じであるが、殺菌前に pH 6.0、7.0 に調整し、寒天末を加えてから殺菌) を使用して 35°C で 10 日間平板培養した。平板上に形成したコロニーを測定し、生残曲線を描き、その勾配を求め、D 値を算出した。

実験結果及び考察

1. 胞子の発芽及び増殖における pH と有機酸の影響

0.2% のクエン酸を添加し、pH を調整した P Y G で胞子数を測定した結果、Fig. 1 に示すように pH に関係なくコントロールに比べて胞子数は 3 桁以上少なく、クエン酸の存在は発芽及び増殖を抑制する傾向があった。これは Murdock 氏³⁾ の報告と一致する。

リンゴ酸、乳酸、酢酸の場合は Fig. 2、3、4 に示すように pH が高いところではそれほど影響はなく、pH が低いところで少し影響し、胞子数が少なくなっている。一般の細菌に対して乳酸や酢酸は増殖阻害作用が強いことが知られているが、^{4) 5)} *B. coagulans* に対してはそれほど強くなかった。

アジピン酸、フマル酸の結果を Fig. 5、6 に示した。これらの有機酸は pH 6.0 以下から大きく影響し、pH 5.0 以下では胞子の発芽及び増殖はほとんど認められなかった。

グルコン酸の場合は Fig. 7 に示すように乳酸と同じ程度の影響で、それほど大きい影響はなかった。

有機酸を添加した場合でも添加しない場合でも最も増殖し易い pH すなわち至適 pH は 6.0 前後

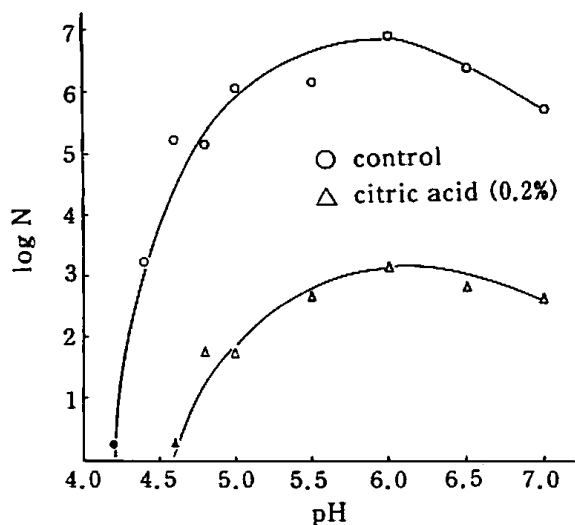


Fig. 1 Effects of pH and citric acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

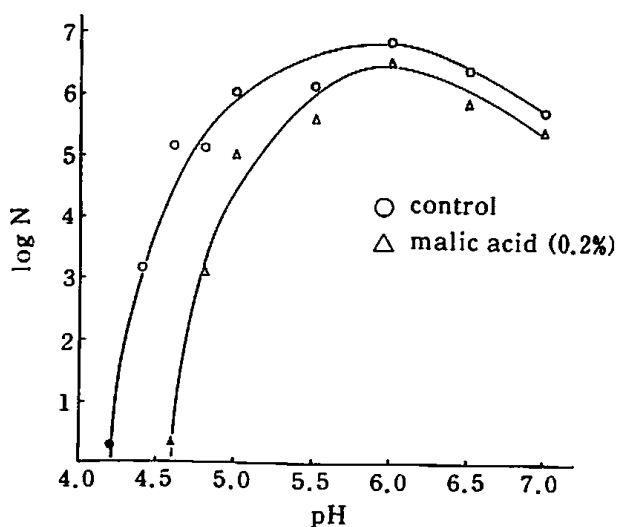


Fig. 2 Effects of pH and malic acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

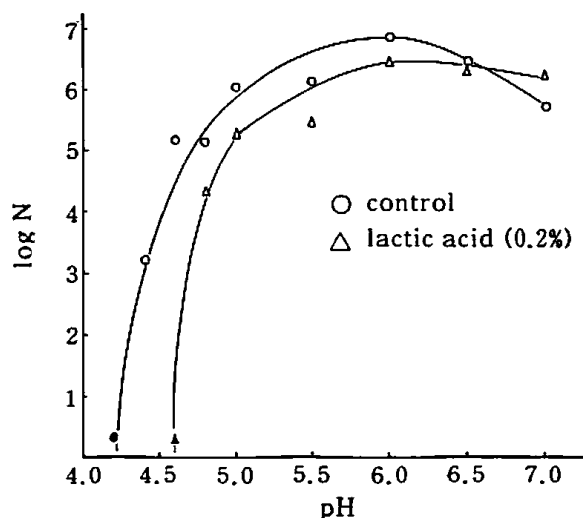


Fig. 3 Effects of pH and lactic acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

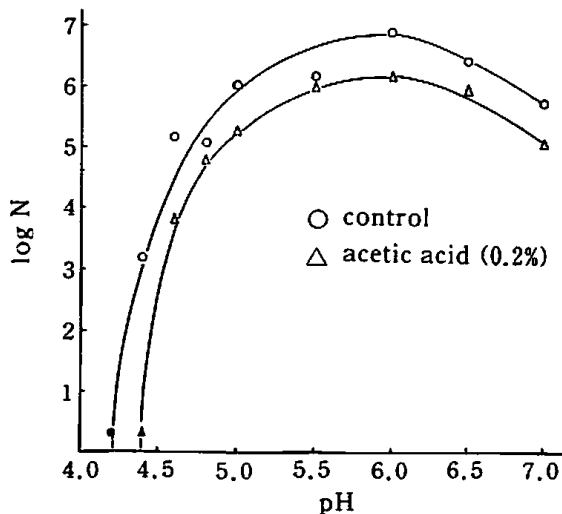


Fig. 4 Effects of pH and acetic acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

であった。

2. 発芽及び増殖におけるクエン酸量の影響

Fig. 1で示したように0.2%のクエン酸の添加でpHに関係なく孢子の発芽及び増殖の抑制が認められたのでその添加量の影響を試験した結果、Fig. 8に示すようにクエン酸の添加量が多くなるに従って増殖は抑制された。しかし、pHによる影響はそれほど大きくなかった。*B. polymyxa*の場合もpHが低くなるに従って孢子数の減少が大きくなり、¹⁾ 同じ傾向であった。

3. 孢子の耐熱性に及ぼすpHと有機酸の影響

PYG中での115°CにおけるLD₅₀をTable 1に示した。増殖における至適pHは6.0前後であっ

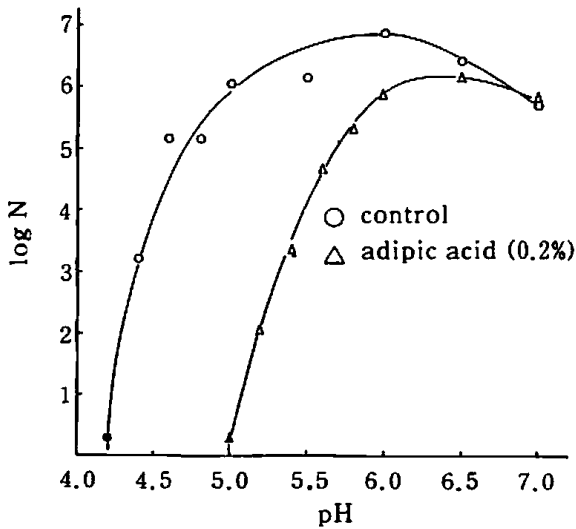


Fig. 5 Effects of pH and adipic acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

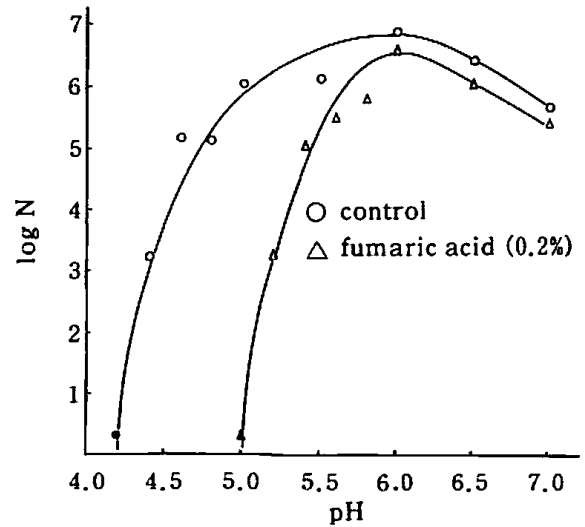


Fig. 6 Effects of pH and fumaric acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

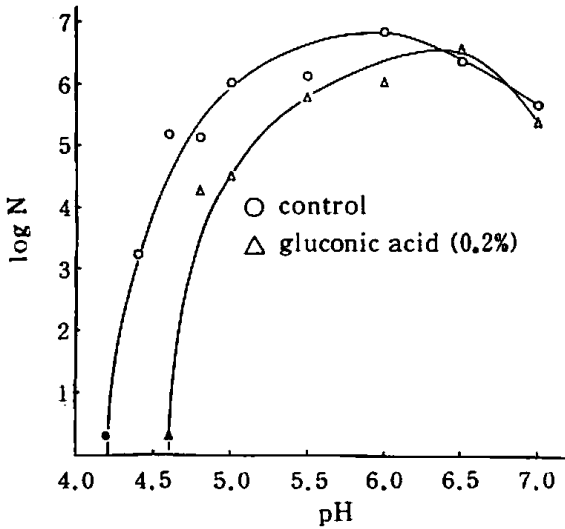


Fig. 7 Effects of pH and gluconic acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

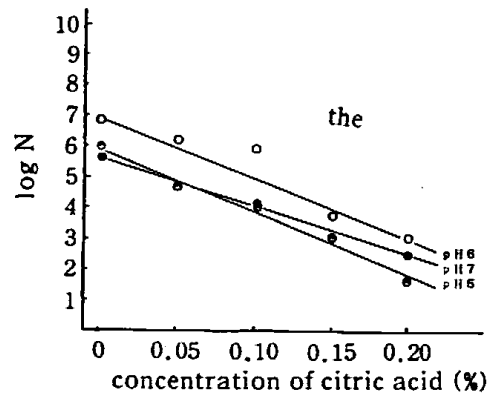


Fig. 8 Effects of concentration of citric acid added on germination and/or *B. coagulans* spores

たが、耐熱性は pH7.0 が最も強かった。有機酸の影響は pH7.0 ではクエン酸以外は少なく、pH が低くなるに従って耐熱性は弱くなる。クエン酸の存在は、発芽及び増殖に及ぼす影響と同じように pH に関係なく耐熱性を弱める。Fabian 氏ら⁶⁾ が pH5.5 における酸の殺菌作用の順序はクエン酸、酢酸、乳酸の順であったと報告しているが、それと同じ結果であった。また、pH5.0 ではアジピン酸の添加が最も耐熱性を弱めた。

クエン酸の存在は pH に関係なく耐熱性を弱めることが分かったので、加熱時におけるクエン酸の影響と加熱後の後培養における pH の影響を試験した。115°C における D 値を測定した結果を

Table 1. Effects of pH and various organic acids added on LD₅₀ of *B. coagulans* spores

Organic acids	LD ₅₀		
	pH5.0	pH6.0	pH7.0
Control	4.5	14.3	19.3
Citric acid	0.9	3.4	5.7
Malic acid	4.5	12.4	17.0
Lactic acid	3.3	9.5	16.3
Acetic acid	2.7	11.7	19.6
Adipic acid	0.3	11.3	17.3
Fumaric acid	4.3	10.0	19.0
Gluconic acid	2.5	6.3	14.0

Table 2 に示した。加熱時における影響は、クエン酸の存在は pH が高いところではそれほど大きな差はなく、低いところでも僅かに影響を及ぼす程度で、全般的に pH の低下とともに D 値は減少する。しかし加熱後の後培養の影響は、胞子の発芽及び増殖における影響と同じように pH6.0 付近で最も D 値が大きくなっている。従って、加熱によって損傷を受けた胞子の発芽及び増殖においても至適 pH は 6.0 前後であった。

Table 1 で示したように、クエン酸の存在は LD₅₀ を大きく減少させるが、D 値ではそれほど大きな差がないのは、Fig. 1 で示したように初期胞子数が 3 から 4 桁程度少なくなるとともに D 値は同じでも LD₅₀ に差が出たと思われる。

Table 2. Effects of pH and citric acid added on D values of *B. coagulans* spores at 115 °C

Heating media	D value			
	pH	Recovery media		
		PPAA (pH5.0)	PPA (pH6.0)	PPA (pH7.0)
PYG	5.0	1.88	2.69	2.54
	6.0	2.46	3.25	2.75
	7.0	2.65	3.65	3.35
PYG added	5.0	1.68	2.47	2.24
0.2% citric acid	6.0	2.23	3.00	2.72
	7.0	2.75	3.60	3.35

要 約

B. coagulans の胞子の発芽及び増殖、並びに胞子の耐熱性に対して pH や有機酸がどのように影響するかを検討した。

クエン酸の存在は pH に関係なく孢子の増殖を抑制し、コントロールと比較して孢子数として3から4桁少なくなっている。リンゴ酸、乳酸、酢酸、グルコン酸は pH が低いところでは僅かに増殖を抑制したが、あまり効果は無かった。アジピン酸、フマル酸は pH6.0 以下から増殖を抑制した。増殖至適 pH は6.0前後であった。

孢子の耐熱性は pH7.0 で最も強く、有機酸の影響のうちクエン酸の存在は pH に関係なく孢子の耐熱性を弱めた。しかし、D値はコントロールとそれほど差がないので、初期孢子数がコントロールに比べて3桁以上少ないため耐熱性に差が出たと思われる。

文 献

- 1) 池上義昭, 中尾マリ, 村山寿美江, 後藤隆子: 本誌, 17, 65 (1987).
- 2) 池上義昭, 橋本京子, 大田智子: 本誌, 15, 128 (1983).
- 3) Murdock, D. I. : *Food Res.*, 15, 107 (1949).
- 4) Fabian, F. W. and Wadsworth, C. K. : *Food Res.*, 4, 511 (1939).
- 5) Levine, A. S. and Fellers, C. R. : *J. Bact.*, 39, 499 (1940).
- 6) Fabian, F. W. and Graham, H. T. : *Food Tech.*, 7, 212 (1953).