

*Clostridium thermohydrosulfuricum*に対する乳化剤の抗菌作用

遠田 昌人、池上 義昭、加瀬谷マリ、小池寿美江

Antibacterial Activity of Emulsifier on *Clostridium thermohydrosulfuricum*

Atsuhito Enda, Yoshiaki Ikegami, Mari Kasetani and Sumie Koike

Thermophilic strict anaerobic bacteria *Clostridium thermohydrosulfuricum* which has been isolated from carageenan, causes spoilage of canned low acid beverages. Thus we investigated effects of sucrose ester (SE) and polyglycerol ester (PGE) on this organism.

The addition of 150 ppm of sugar ester (P-1670) inhibited outgrowth of *C. thermohydrosulfuricum* (9.2×10^3 /ml) in m-TGC medium. The required concentration was ten times higher than the case of *C. thermaceticum*.

In addition to the resistance of this strain, the effectiveness of sucrose ester was reduced when some inhibitors of antibacterial activity, such as skim milk, milk and starch, were added.

In measuring thermal death time, 25 minutes were required for LT_{50} at 120°C in milk coffee added 300 ppm of sucrose ester.

Key words: *C. thermohydrosulfuricum*, sucrose fatty acid ester, polyglycerol fatty acid ester, emulsifier.

従来ホットベンダーで販売される低酸性飲料での変敗原因菌としては*Clostridium thermaceticum*が重要視されていた。ところが近年にいたり、添加物として用いられたカラギーナンに由来する好熱性嫌気性細菌*Clostridium thermohydrosulfuricum*により引き起こされた変敗が報告されている。

そこで*C. thermohydrosulfuricum*に関して、加温販売品で好熱性嫌気性細菌に対する抗菌剤として従前より使用されている乳化剤、すなわちショ糖脂肪酸エステル (SE) およびポリグリセリン脂肪酸エステル (PGE) の添加による変敗防止の有効性について検討したので報告する。

実験材料および方法

1. ショ糖脂肪酸エステル

(株)三菱化成製 P-1670, S-1670, LWA-1570, OWA-1570 を使用した。これらの組成についてはTable 1に示した。

2. ポリグリセリン脂肪酸エステル

(株)太陽化学製 Q-16U, Q-18U, Q-10S, Q-12S, Q-14S, Q-16S, Q-18S を使用した。これらの組成についてはTable 2に示した。

3. 使用菌株

当研究室でカラギーナンより分離、保存している*C. thermohydrosulfuricum* strain 1022²⁾を用

いた。

Table 1. Compositions of sucrose esters used in this study.

	P-1670	S-1670	LWA-1570a	OWA-1570 ^a
Fatty acid				
palmitate	70%	30%		
stearate	30	70		
oleate				70%
laurate			70%	
Esters				
mono	80	75	70	70
di & tri	20	25	30	30
HLB	16.0	16.0	15.0	15.0

^a Mixture of PGE (40%), ethanol (4%), and water (56%).**Table 2.** Compositions of polyglycerol esters used in this study.

	Polyglycerol esters		HLB	Properties ^a
	Polyglycerol	Ester		
Q-16U ^b	decaglycerol	monopalmitate	15.5	SS
Q-18U	decaglycerol	monostearate	13.0	SS
Q-10S	decaglycerol	monocaprylate	16.0	SS
Q-12S	decaglycerol	monolaurate	15.5	VL
Q-14S	decaglycerol	monomyristate	14.5	VL
Q-16S	decaglycerol	monopalmitate	14.2	SS
Q-18S	decaglycerol	monostearate	12.0	SS

^a SS: Semi-solid, VL: Viscous liquid.^b U- and S-series are different at the distribution of degree of polymerization.

4. 使用培地

1) 変法 TGC 培地

変法 TGC 培地 (日水製薬, 以下 m-TGC とする) 粉末30gを1ℓの脱イオン水に加え, 沸騰水中で加熱, 溶解後, 10mlを中試験管に分注した。

滅菌 (オートクレーブ, 121.1°C, 15分) 後, 流水中で冷却した。直ちに使用しない場合は室温で保存し, 使用時に沸騰水中で10分間加熱することで脱気してから用いた。

2) 孢子形成用培地 (TPY sulfite medium)

Bacto-Tryptone (DIFCO)	10 g
Phytone-Peptone (BBL)	5 g
Yeast extract (DIFCO)	2 g
Sodium thioglycolate	0.5 g

以上を脱イオン水1ℓに溶解し, 滅菌 (オートクレーブ, 121.1°C, 15分) 後, 流水中で冷却した。

3) 抗菌性判定培地

m-TGCに乳化剤を所定量添加し、沸騰水中で加熱して溶解後、滅菌（オートクレーブ、121.1°C、15分）後、流水中で冷却した。

以下に示した抗菌性阻害物質を添加した場合における抗菌性を測定する場合は、m-TGCに所定量の阻害物質を加えた後に乳化剤を添加し、同様に滅菌した。

Skim milk (Difco)

牛乳（市販品：乳脂肪分3.5%以上、無脂乳固形分8.1%以上、130°C、2秒間殺菌）

コーンスターチ（和光純薬工業）

5. 孢子懸濁液の調製

10mlのm-TGCで65°Cで4日間培養したものを種培養液とし、この2mlを培養ビンの中の250ml孢子形成用培地に接種した。これを65°Cの恒温器中で10日間、さらに55°Cで7日間、静置培養した。培養終了後、遠心分離により集菌した。得られた菌体は200mlの滅菌生理的食塩水に懸濁したのち、再び遠心分離により集菌することで洗浄を施した。最終的に菌体を100mlの滅菌生理的食塩水に懸濁し、沸騰水中で10分間加熱して栄養細胞を死滅させ、5°Cに保存した。以後の実験ではこれを孢子懸濁液として用いた。

6. 乳化剤の抗菌性の判定

所定量の乳化剤を含む抗菌性判定培地の各乳化剤濃度につき4本に孢子懸濁液を100 μ l接種し、攪拌後、乾熱滅菌した流動パラフィン3mlを無菌的に重層した。さらに脱気および孢子の活性化のため沸騰水中で10分間加熱した後、直ちに流水中で冷却した。培養は55°Cの恒温器中で40日間まで行い、肉眼により濁度を観察し、増殖を判定した。培養のうち4本中2本が増殖を示したときの加熱時間をMI₅₀とした。

7. ミルクコーヒー中での耐熱性

ブレンド・コーヒー（コロンビア、モカ）抽出液（Brix0.8）に以下のものを加えた。

グラニュー糖	10%
脱脂粉乳	1.8%
全脂粉乳	0.8%
重曹	0.04%
SE (P-1670)	0-300ppm

これに孢子懸濁液を加え、TDT管4本に1mlずつ分注、密封し、恒温油浴中で所定の加熱時間にlag timeとして30秒を加えた時間、加熱した。加熱処理終了後は直ちに流水中で冷却した。培養は55°Cで30日間行い、4本中2本が増殖を示したときの加熱時間をLT₅₀とした。

実験結果及び考察

1. *C. thermohydrosulfuricum*に対する乳化剤の抗菌性

*C. thermohydrosulfuricum*の増殖至適温度は、65°C付近であるが、乳化剤の抗菌作用に対する抵抗性は65°Cよりもむしろ55°Cでの培養においてより大きいという結果が予備実験より得られた。また飲料缶詰を加温して販売する場合、その温度は55°C前後が一般的であることも考慮し、本報では乳化剤を加えた培養は全て55°Cで行った。また、*C. thermohydrosulfuricum*孢子懸濁液の接種量は培養基の1/100量とし、以後の実験は全て最終的に 9.2×10^3 /mlの孢子濃度で行った。

m-TGC中においてはSE(P-1670)濃度150ppmで*C. thermohydrosulfuricum*の増殖を阻止した(Table 3)。しかしながらこの値は、*C. thermacetivum*において15ppm以下のSEで同等の効果が得られる³⁾のに比較すると、その約10倍の抵抗性を示していた。

Table 3. Efficiency of the sucrose esters (SE) on the outgrowth of *C. thermohydrosulfuricum* spores in the m-TGC medium.

Conc. of SE (ppm)	Sucrose ester			
	P-1670	S-1670	LWA-1570	OWA-1570
60	++++			
80	++++	++++		
100	++--	++++	++++	
150	----	+++-	++++	++++
200		----	----	+++-
250			----	----
300				----

ココア飲料缶詰の変敗原因となった *C. thermohydrosulfuricum* において1000ppmのSE濃度でも増殖を抑制できない菌株の存在が報告されている⁴⁾が、本菌株はその他のSEでも200-250ppmで増殖を阻止した。PGEではラウリン酸エステル (Q-12S)、カプリン酸エステル (Q-10S)、ミリスチン酸エステル (Q-14S)、およびパルミチン酸エステル (Q-16S) が500-600ppmの濃度で有効な抗菌性を示した (Table 4)。

Table 4. Efficiency of the polyglycerol esters (PGE) on the outgrowth of *C. thermohydrosulfuricum* spores in the m-TGC medium.

Conc. of PGE (ppm)	Polyglycerol ester						
	10S	12S	14S	16S	18S	16U	18U
200		++++					
250	++++	++++					
300	++++	++++	++++				
400	++++	+-	+++-	++++			
500	----		++--	++++	++++		
600			----	----	++--		
800					++++		
1000					----	++++	
1200						+++-	++++
1400						++--	++++
1600						+---	+++-
1800							----

2. 抗菌性阻害物質存在下での乳化剤の抗菌性

乳化剤による抗菌作用はデンプン、乳成分などが存在する条件では阻害を受けることが知られている⁵⁾。そこでスキムミルク、牛乳、コーンスターチを添加したm-TGCを用いて、阻害物質存在下での乳化剤の *C. thermohydrosulfuricum* に対する抗菌性を調べた。乳化剤はSE P-1670を使用した。

スキムミルクを添加したときの結果をTable 5に示した。スキムミルク2.0%では増殖阻止に800ppmの濃度を必要とした。Table 6は牛乳を添加した場合であるが、スキムミルク0.5%では250ppmの濃度で増殖を阻止できたのに対し、これに相当する牛乳5.0%では500ppmの濃度を要している。これは牛乳に含まれている乳脂肪などの成分の抗菌性阻害作用によるのではないかとと思われる。もっとも強い阻害作用をもつコーンスターチの場合、0.4%の添加に対し600ppmの濃度では増殖を完全には阻止できなかった (Table 7)。

Table 5. Effect of skim milk on antibacterial activity of sucrose ester (P-1670) for *C. thermohydrosulfuricum* spores.

Sucrose ester (ppm)	Skim milk (%)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
100	++++			
150	++++			
200	+---			
250	----			
300		++++		
350		++++		
400		++--	++++	
500		----	++++	++++
600			----	++++
700			----	++++
800				----

Table 6. Effect of milk on antibacterial activity of sucrose ester (P-1670) for *C. thermohydrosulfuricum* spores.

Sucrose ester (ppm)	Milk (%)			
	2.5	5.0	7.5	10.0
200	++++			
250	++++			
300	+---	++++		
350	----	++++	++++	
400		++++	++++	
500		----	++--	++++
600			----	++++
700				++++
800				+---

Table 7. Effect of corn starch on antibacterial activity of sucrose ester (P-1670) for *C. thermohydrosulfuricum* spores.

Sucrose ester (ppm)	Corn starch (%)			
	0.1	0.2	0.3	0.4
100	++++			
150	++--	++++		
200	----	++++		
250	----	++++		
300		+---	++++	
350			++++	++++
400			++++	++++
500			----	++++
600				++--

3. ミルクコーヒー中での耐熱性

上述の実験結果から *C. thermohydrosulfuricum* の乳化剤に対する強い抵抗性が示された。そこで、乳化剤の抗菌性を阻害する物質が存在する条件、および加熱による殺菌との相互作用などを総合的に評価するために、SEを添加したミルクコーヒー飲料中での *C. thermohydrosulfuricum* の耐熱性を調べた。

SEを0-300ppmの濃度で添加したミルクコーヒー中で120℃、125℃および130℃で加熱したときのLT₅₀値による致死時間曲線をFig. 1に示した。SE無添加ではZ=8.3℃、SE濃度300ppmではZ=9.1℃となった。

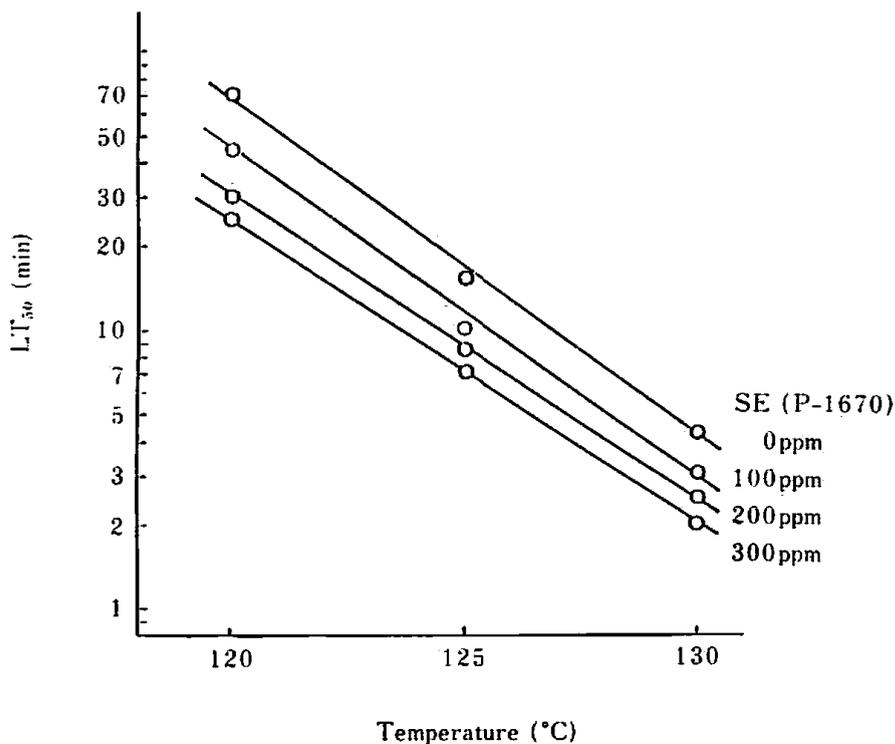


Fig.1. Effect of sucrose ester (P-1670) on thermal death time of *C. thermohydrosulfuricum* spores in milk coffee.

SE無添加では120℃でLT₅₀に70分必要であったのに対し、SE 300ppmでは25分と、明らかに必要な加熱時間を短縮してはいるものの、高濃度でSEを加えた場合でも相当の加熱を与えなければならないことが示された。

カラギーナンから分離した *C. thermohydrosulfuricum* は耐熱性が強い上にSE、PGEなどの乳化剤に対しても非常に高い抵抗性を有していることが明らかになった。そのため特にこれら乳化剤の抗菌性に対する阻害作用をもつ乳成分やデンプンを多く含み、加温販売される可能性のある飲料に関しては、抗菌剤の実効濃度、および殺菌条件には十分な検討が必要であることが示された。

文 献

- 1) 烏野幹啓, 池田史郎: 日本缶詰協会, 第38回技術大会研究発表論文要旨, 8 (1989).
- 2) 遠田昌人, 池上義昭, 中尾マリ, 村山寿美江: 缶詰時報, 68, 677-683 (1989).
- 3) 池上義昭, 中尾マリ, 村山寿美江, 後藤隆子: 東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書, 17, 65-75 (1989).
- 4) 高木祐子, 松岡正明, 田中光幸: 日本缶詰協会, 第38回技術大会研究発表論文要旨, 8-9 (1989).
- 5) 池上義昭, 大田智子: 東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書, 16, 101-105 (1985).