

## *Clostridium thermaceticum*の胞子の発芽および 増殖に及ぼすpHと有機酸の影響

池上 義昭, 遠田 昌人, 加瀬谷マリ, 小池寿美江

### Effects of pH and Organic Acids on Germination and/or Outgrowth of *Clostridium thermaceticum* Spores

Yoshiaki Ikegami, Atsuhito Enda, Mari Kasetani and Sumie Koike

Experiments were carried out to determine the relative effects of pH values and various organic acids on germination and/or outgrowth of *Clostridium thermaceticum* spores by MPN method with mTGC medium adjusted pH value after an addition of 0.2 and 0.4 per cent organic acids.

It was found that lactic, adipic, fumaric and gluconic acids had significant inhibitory effect on the growth of the spores in mTGC having a pH below 6.0. However, citric and acetic acids had no appreciable effect on the growth of the spores. The optimum pH for the growth of the spores was approximately 6.5.

The effects of pH values and the addition of lactic acid on the heat resistance of the spores were investigated.

The median lethal time ( $LT_{50}$ ) of the spores at 130°C in mTGC at pH 5.5, 6.0 and 7.0 were 10.0, 14.0 and 19.3 minutes, respectively. On the other hand, those of the spores in mTGC added 0.4% lactic acid were 9.0, 13.3 and 18.7 minutes, respectively. Therefore, the results showed that a decrease of pH in mTGC caused a corresponding decrease on the heat resistance of the spores and the spores in mTGC added lactic acid had slightly decrease of these resistance at pH of all range examined. However, lactic acid or pH value had no appreciable effect on the D value of the spores determined by MPN method with mTGC, the  $D_{130}$  value was 3 minutes.

**Key words:** *C.thermaceticum*, pH, organic acid, growth, heat resistance, spore.

コーヒーやしるこなどの低酸性飲料缶詰がホットベンダーで加温販売されたときに起こるフラットサワー様変敗の主な原因菌は硫化水素産生好熱性偏性嫌気性細菌の *Clostridium thermaceticum* であることが知られている<sup>1-4)</sup>。この細菌胞子は耐熱性が極めて強いため、この胞子に汚染されている原材料を使用して缶詰を製造する場合、加熱殺菌だけで本菌胞子を死滅させることは実用上不可能である。従って、加熱殺菌以外の方法でこの細菌の増殖を阻止しなければならない。この菌による変敗防止対策として、食品のpHや水分活性を低くしたり、抗菌性のある乳化剤、例えばショ糖脂肪酸エステル<sup>5-7)</sup>、あるいは紫外線殺菌<sup>8-10)</sup>した原材料を使用するなどが考えられる。

本報ではこの *C.thermaceticum* の胞子が発芽および増殖にpHや添加した有機酸がどのように影響されるかを試験した。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

ミルク入りコーヒー缶詰より分離した*C. thermaceticum* (24-1) を使用した。

### 2. 孢子懸濁液の調製

変法TGC培地（日水製薬，mTGCと呼ぶ）に寒天末を除いた組成の培地（mTGCB）にmTGCで24時間培養した培養液を移植し，55°Cで15日間培養して孢子を形成させた。この培養液を遠心分離（5000rpm，20分）し，滅菌精製水での洗浄を2回繰り返す，生理食塩水に懸濁させた。この孢子懸濁液を東洋ろ紙Na5Aで無菌ろ過して孢子塊を取り除いた後，100°C，10分間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，30日間以上の長期にわたる場合は-30°Cとした。

### 3. 孢子数の測定

mTGCにクエン酸，乳酸（85%～92%であるが90%として計算），酢酸，アジピン酸，フマル酸およびグルコン酸を0.2%および0.4%加え，塩酸または苛性ソーダで所定のpHになるように調整した培地に孢子懸濁液をmTGCで希釈して移植後，55°C，30日間培養して5本ずつのMPN法で孢子数を測定し，コントロール（有機酸を添加しないmTGC）と比較した。孢子を移植した後は流動パラフィンを重ねて100°C，10分間加熱，冷却後培養し，培地の濁りによってその増殖を判定した。なおpHは培地を殺菌した後の値をその時のpHとした。

### 4. 致死時間（LT<sub>50</sub>）の測定

pHを5.5，6.0および7.0に調整したmTGCおよび0.4%の乳酸を添加したmTGCに孢子懸濁液を孢子数が $1.0 \times 10^5$ /mlになるように移植し，TDT管（外径7mm，長さ120mm）に1mlずつ分注後，マイクロバーナーで熔封した。これを125，130および135°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，そのまま55°Cで30日間培養した。各時間ごとに4本ずつ測定し，増殖陽性本数よりLT<sub>50</sub>（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致死時間（LT<sub>50</sub>）として算出した<sup>11)</sup>。

### 5. D値の算出

生理食塩水中に懸濁液した孢子をTDT管に1mlずつ分注し，マイクロバーナーで熔封後，130°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，pHを5.5および6.5に調整したmTGCおよび0.4%の乳酸を添加したmTGCを使用して，55°C，30日間培養して5本ずつのMPN法で孢子数を測定し，生残曲線を描き，その勾配によりD値を求めた。

## 実験結果及び考察

### 1. 発芽及び増殖に対するpHと有機酸の影響

*C. thermaceticum*の孢子が発芽および増殖するとき，pHやクエン酸，酢酸，乳酸，アジピン酸，フマル酸およびグルコン酸の6種類の有機酸がどのように影響するか調べた。

クエン酸および酢酸の存在はFig. 1および2に示すように発芽および増殖にはほとんど影響せず，コントロールの場合と同じ程度であったので，これらの有機酸はこの濃度（0.2%および0.4%）ではあまり影響しないと考えられる。

乳酸，アジピン酸，フマル酸およびグルコン酸の存在はFig. 3, 4, 5および6に示すようにpH 6以下より添加された有機酸の濃度によって細菌の増殖を抑制した。特にフマル酸が最も強く抑制し，アジピン酸，グルコン酸，乳酸の順であった。

これらの結果から，pHが6.0以下になると増殖可能な孢子数は急激に減少し，pHが5.0以下では実際の初期孢子数より4桁以下になる。またいずれの場合も至適pHは6.5前後であった。

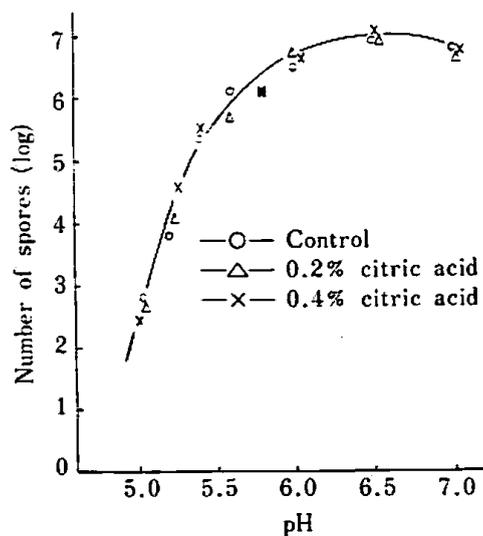


Fig.1. Effects of pH and addition of citric acid on germination and/or outgrowth of *C.thermaceticum* spores in mTGC.

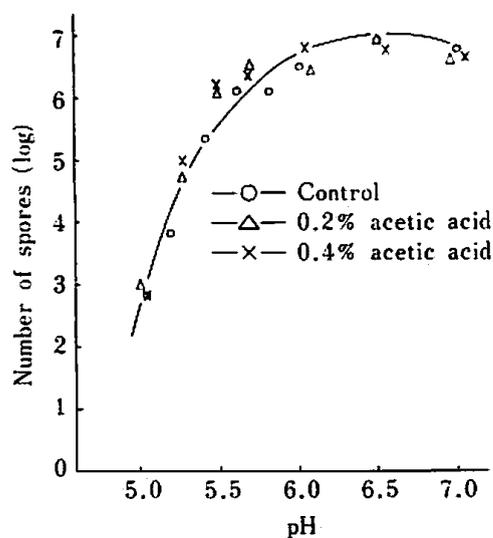


Fig.2. Effects of pH and addition of acetic acid on germination and/or outgrowth of *C.thermaceticum* spores in mTGC.

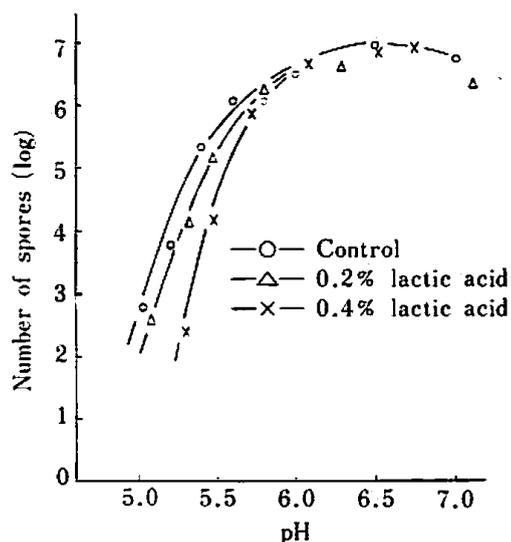


Fig.3. Effects of pH and addition of lactic acid on germination and/or outgrowth of *C.thermaceticum* spores in mTGC.

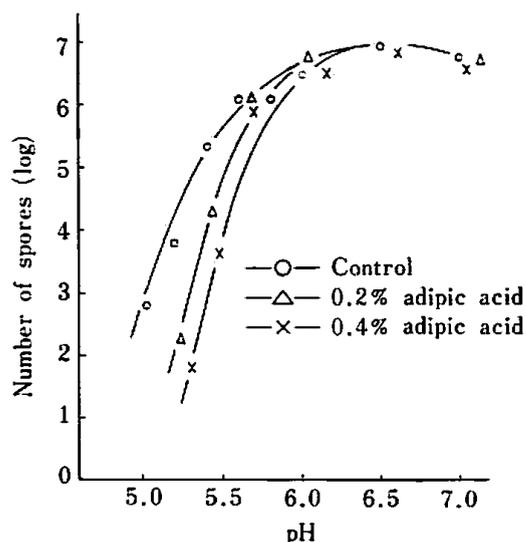


Fig.4. Effects of pH and addition of adipic acid on germination and/or outgrowth of *C.thermaceticum* spores in mTGC.

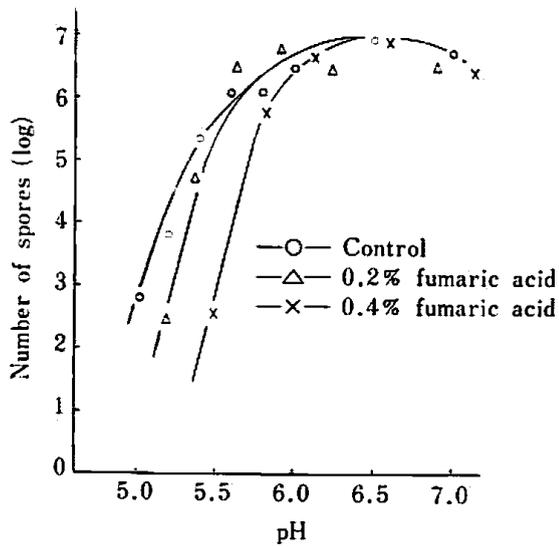


Fig. 5. Effects of pH and addition of fumaric acid on germination and/or outgrowth of *C. thermaceticum* spores in mTGC.

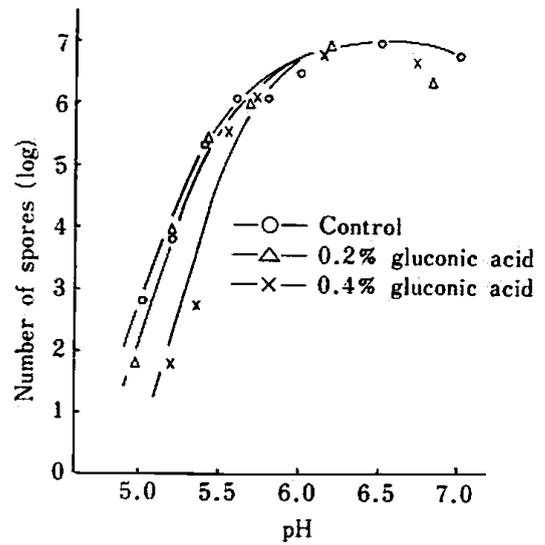


Fig. 6. Effects of pH and addition of gluconic acid on germination and/or outgrowth of *C. thermaceticum* spores in mTGC.

著者ら<sup>12,13)</sup>は先に *Bacillus* 属の細菌胞子でその増殖に及ぼす有機酸の影響について、*B. polymyxa*は乳酸と酢酸、*B. coagulans*はフマル酸、酢酸およびクエン酸がpHの低いところで増殖を抑制することを報告したが、本菌胞子ではクエン酸と酢酸はほとんど効果なく、その他の有機酸が僅かに有効であっただけであった。また山本ら<sup>14)</sup>は *Clostridium* 属の細菌に対してアジピン酸が生育を阻止することを報告している。これらのことから胞子の増殖に及ぼす有機酸の影響は菌種によって異なると考えられる。

## 2. $LT_{50}$ に及ぼすpHと乳酸の影響

mTGC中および乳酸を0.4%添加したmTGC中での本菌胞子の $LT_{50}$ をTable 1に示した。pHが5.5、6.0および7.0のmTGC中では130°Cの $LT_{50}$ がそれぞれ10.0、14.0、19.3分であり、

Table 1. Effects of pH and addition of lactic acid on median lethal time ( $LT_{50}$ ) of *C. thermaceticum* spores.

pH	Heating temp.(°C)	$LT_{50}$ (min)	
		Control	Lactic acid (0.4%)
5.5	125	41.2	40.0
	130	10.0	9.0
	135	2.8	2.7
6.0	125	51.7	50.0
	130	14.0	13.3
	135	3.7	3.5
7.0	125	65.0	62.5
	130	19.3	18.7
	135	4.5	4.0

0.4%の乳酸を添加したmTGC中ではそれぞれ9.0、13.3、18.7分であった。胞子の増殖における至適pHは6.5前後であったが、耐熱性はpH 7で最も強く、pHが低下するに従って耐熱性は弱くなった。一般に耐熱性におけるpHの影響は大きく、中性付近で最も強く酸性またはアルカリ性になるほど弱くなると言われているが<sup>12,13,15,16)</sup>、本報での結果も同じであった。耐熱性に対する乳酸の影響はほとんど無く、0.4%の添加で僅かに耐熱性を弱めただけであった。有機酸類の細菌増殖抑制作用はその酸の非解離分子が大きく影響すると報告されているが<sup>17)</sup>、これは胞子の耐熱性にも言えると考えられる。乳酸の存在はz値においてあまり影響せず8.5°Cから8.7°C位であった。

### 3. D値に及ぼすpHと乳酸の影響

乳酸の存在は耐熱性におけるLT<sub>50</sub>を僅かに減少させるだけであったが、加熱損傷を受けた胞子が発芽および増殖するときpHや乳酸がどのように影響するかを試験した。

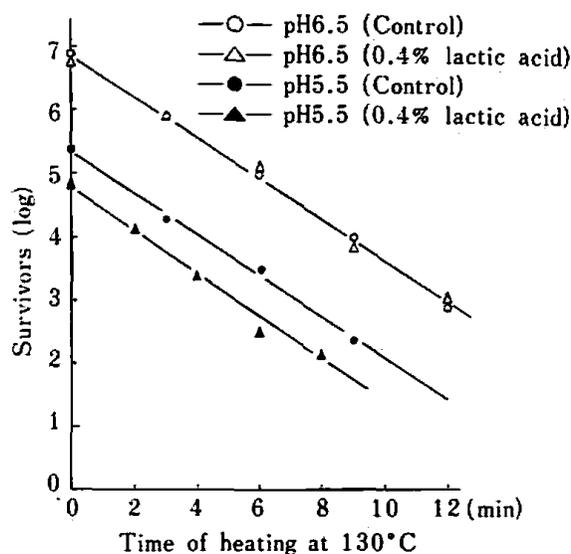


Fig.7. Effects of pH and addition of lactic acid on heat resistance of *C. thermacetikum* spores in mTGC.

130°Cにおける生残曲線をFig. 7に示した。加熱後の後培地によってD値には影響されず、D<sub>130</sub>値はどの条件も約3分であった。これは著者ら<sup>12,13)</sup>が先に報告した*B. polymyxa*や*B. coagulans*の胞子の耐熱性においてpHが低くなるに従ってD値が減少した結果と異なっていた。この理由は*C. thermacetikum*はFig. 1, 2, 3, 4, 5および6に示したように有機酸の添加によって胞子の発芽および増殖にそれほど影響されないためと考えられる。LT<sub>50</sub>はpHによって差があるがD値では差がなかったのはそのpHで増殖可能な胞子数の差がそのまま耐熱性に差を生じたためであると考えられる。

### 要 約

*C. thermacetikum*の胞子が発芽および増殖するとき、また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。

乳酸、アジピン酸、フマル酸およびグルコン酸の存在はpHが6以下では僅かに増殖が抑制

されたが、クエン酸と酢酸の存在ではほとんど抑制されなかった。増殖至適pHは6.5前後であった。

pH5.5, 6.0および7.0のm T G Cに懸濁した孢子の130°CにおけるL T<sub>50</sub>はそれぞれ10.0, 14.0, 19.3分であった。一方0.4%の乳酸を添加した孢子では9.0, 13.3, 18.7分であった。従って孢子の耐熱性はpH 7が最も強く、pHが低くなるにつれて弱くなり、乳酸の存在は耐熱性にそれほど影響を与えなかった。D値はpHや乳酸によってほとんど影響されず、D<sub>130</sub>値は3分であった。

#### 文 献

- 1) 松田典彦, 増田寛行, 駒木 勝, 松本直紀: 食衛誌, 23, 480-486 (1982).
- 2) Nakayama, A., Kadota, H., Sonobe, J.: *J. Food Hyg. Soc., Japan*, 25, 297-309 (1984).
- 3) 山本和則, 神谷隆久, 小室道彦, 掛札しげ子, 村上りつ子, 高井勝美: 食衛誌, 25, 233-240 (1984).
- 4) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正: 缶詰時報, 67, 1168-1174 (1988).
- 5) Nakayama, A., Sonobe, J., Shinya, R.: *J. Food Hyg. Soc., Japan*, 23, 25-32 (1982).
- 6) 諏訪信行, 久保田春美, 高橋和子, 町田 肇: 日食工誌, 33, 44-51 (1986).
- 7) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正: 缶詰時報, 68, 86-90 (1989).
- 8) 田中光幸, 松岡正明, 幸形 正: 缶詰時報, 68, 91-95 (1989).
- 9) Nakayama, A., Shinya, R.: *J. Food Hyg. Soc., Japan*, 22, 415-420 (1981).
- 10) Nakayama, A., Shinya, R.: *J. Food Hyg. Soc., Japan*, 22, 421-424 (1981).
- 11) 池上義昭, 橋本京子, 大田智子: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, 15, 133-136 (1983).
- 12) 池上義昭, 村山寿美江: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, 17, 59-63 (1987).
- 13) 池上義昭, 後藤隆子: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, 18, 93-98 (1990).
- 14) 山本 泰, 小野尚之, 東 和男, 好井久雄: 日食工誌, 36, 551-556 (1989).
- 15) 坂口謹一郎, 天羽幹夫: 農化, 25, 104-108 (1951).
- 16) Xezones, H and Hotchings, I. J.: *Food Technol.*, 19, 1003-1005 (1965).
- 17) 野本正雄, 奈良橋快子, 新川保太郎: 農化, 29, 805-809 (1955).