

好酸性菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の耐熱性について

松井 智江, 遠田 昌人, 中尾 浩, 吉本 周

Heat Resistance of Spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Tomoe Matsui, Atsuhito Enda, Hiroshi Nakao and Itaru Yoshimoto

Heat resistance of spores of five strains of *Alicyclobacillus acidoterrestris* isolated from spoiled acidic drinks was studied. Sporulation by culturing at 45°C on standard method agar added 100 ppm of MnSO_4 and 0.08% of citric acid brought good yields and sufficient heat resistance with all strains.

Using the spores obtained under the condition, heat resistance of the strains was compared in D_{90} in saline. The value of one strain was 20.1 minutes ($z=7.1^\circ\text{C}$), while the values of other four strains ranged from 1.3 to 2.2 minutes ($z=5.9-6.9^\circ\text{C}$).

It was suggested that *A. acidoterrestris* could have 10-fold higher heat resistance than that ever known.

Key words : heat resistance, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, acidic drinks, D value

好酸性有芽胞菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* が酸性飲料において変敗原因菌となることが見出されて以来, その迅速同定法および検査法などについては大いに進歩を遂げた¹⁻⁴⁾.

一方で, その耐熱性については, 酸性飲料の殺菌条件と比較して, 非常に高いことは知られていたが, 実際にはどの程度の範囲にあるものかについては情報が十分とは言えなかった.

そこで筆者らは, これまでに各種の酸性飲料において変敗原因菌として分離した *A. acidoterrestris* 5 菌株を用いて, その耐熱性評価を試みた. その結果, 重要と思われる知見を得たのでここに報告する.

実 験 方 法

1. 使用菌株

容器缶詰酸性飲料の変敗品から, 原因菌として分離した *Alicyclobacillus acidoterrestris* TIF1701 (AC-1⁵⁾), TIF1702 (AC-2⁵⁾), TIF1703 (AC-3⁵⁾), TIF1704, TIF1705 を使用した.

2. 芽胞懸濁液の調製

- 1) 種培養液の調製 各菌株をTYG培地 (バクトトリプトン10.0 g, 酵母エキス2.0 g, グルコース5.0 g, 蒸留水1,000ml; pH3.5) で45°Cにて3日間培養し, 種培養液とした.
- 2) 芽胞形成培地 芽胞形成は標準寒天培地 (以下SMA, 栄研) を基礎培地とし, MnSO_4 100ppm添加あるいは無添加, さらにクエン酸添加量0.04%あるいは0.08%とした4種類の培地を使用した. Table 1に示したように, 各培地をA, B, C, Dとした. なお, MnSO_4 は培地の殺菌前に, クエン酸は10%水溶液を殺菌後に添加した. A, B, C, D 4種の平板に,

各菌株の種培養液を0.1ml塗抹し、45℃で10日間培養した。

- 3) 芽胞の回収 培養後、顕微鏡観察にて芽胞の形成が確認できた平板については、菌苔を掻き取り、生理食塩水に懸濁した。殺菌前に入れておいたガラスビーズにて、試験管ミキサーで10分間攪拌した。冷却しながら超音波処理を20分間行った。遠心分離 ($4,800 \times g$, 15分間) により洗浄した。洗浄は生理食塩水で2回行った。生理食塩水に懸濁し、東洋濾紙5Aで無菌濾過後、70℃で10分間加熱し、流水にて冷却した。使用時まで5℃で保存した。

3. 芽胞数および生残菌数の測定

芽胞懸濁液の10倍希釈液1mlをTDT管(7mmφ×105mm)に入れ、ガスバーナーで熔封し、恒温槽中にて所定温度および時間加熱後、流水中で冷却した。芽胞収量の評価に際しては、70℃、10分間の加熱条件を採用した。

冷却後、TDT管を開封し、生理食塩水で適宜希釈した。100ppmのMnSO₄を加えたSMAに、あらかじめ殺菌しておいた10%クエン酸水溶液を最終濃度0.08%になるように加えた培地に混釈、平板とした。培養は45℃で行い、TIF1701～1704は7日間、TIF1705については増殖が遅いため14日間培養した。出現したコロニーを計数し、2枚の平板での結果を平均して菌数を求めた。

結 果

1. 芽胞形成条件の検討

1) 芽胞形成培地の芽胞収量による評価

耐熱性評価に際しては、十分な芽胞収量が必要とされる。そこで、A～D各培地による芽胞収量を、平板4枚分の菌苔を25mlの生理食塩水に懸濁したときの懸濁液の濃度として比較した。TIF1701～1705を用いて各条件で得られた芽胞濃度をTable 2に示した。

TIF1705をA培地で培養した場合は、顕微鏡観察において芽胞形成が認められず、懸濁液は調製しなかった。この組み合わせをのぞいては、すべての菌株、条件において 10^4 CFU/ml以上の芽胞濃度が得られた。中でも、D培地での芽胞収量がいずれの菌株においても最も多かった。

2) 芽胞形成培地の芽胞のD値による評価

芽胞形成条件は、芽胞収量だけでなく、耐熱性にも影響を与えることがあることが知られている。そこで、A～D各培地で得られた芽胞懸濁液を用いて生残曲線

Table 1. Sporulation media used in this study.

Tested medium	Concentration of additives to Standard method agar	
	Citric acid	MnSO ₄
A	0.04%	—
B	0.04%	100ppm
C	0.08%	—
D	0.08%	100ppm

Table 2. Spore yields with various sporulation media.

Strain	Medium	Spore density (CFU/ml)
TIF1701	A	1.0×10^6
	B	8.9×10^5
	C	2.5×10^6
	D	1.1×10^7
TIF1702	A	1.0×10^6
	B	2.4×10^6
	C	4.1×10^5
	D	2.1×10^7
TIF1703	A	3.3×10^4
	B	2.0×10^4
	C	1.6×10^5
	D	3.2×10^5
TIF1704	A	6.7×10^5
	B	5.7×10^6
	C	4.2×10^5
	D	9.1×10^6
TIF1705	A	—
	B	1.4×10^4
	C	8.7×10^5
	D	6.8×10^6

を求め、算出した D 値より耐熱性を比較した。結果を Table 3 に示した。

影響を最も強く受けたのはTIF1702で、D培地を用いた場合 D_{90} が11.5分だったのに対し、A培地では2.1分と5倍もの較差が見出された。比較的の影響の小さかったTIF1704および1705においても、培地により2倍の差が認められた。したがって、今回調査した*A. acidoterrestris* 5菌株に関しては、芽胞形成培地の違いが耐熱性に大きく影響することがわかった。

TIF1702～1705においては、D培地で得られた芽胞の耐熱性が最も高かった。一方、TIF1701ではB培地で得られた芽胞の D_{90} が9.2分と最高であったが、D培地においても D_{90} が8.8分とはほぼ同等の耐熱性を示した。したがって、芽胞の耐熱性という点からも、D培地での芽胞形成により、よい結果が得られた。

Table 3. D values of spores obtained by incubation on various sporulation media. Saline was used as menstruum.

Strain	Medium	D_{90} (min.)	D_{100} (min.)
TIF1701	A	6.1	
	B	9.2	
	C	3.2	
	D	8.8	
TIF1702	A	2.1	
	B	7.2	
	C	2.3	
	D	11.5	
TIF1703	A	3.5	
	B	10.5	
	C	4.2	
	D	11.8	
TIF1704	A	8.1	
	B	10.1	
	C	5.7	
	D	11.8	
TIF1705	A		—
	B		2.1
	C		1.6
	D		3.5

2. 供試菌株の耐熱性評価

芽胞形成培地として最も適当であったD培地を用い、TIF1701～1705の5菌株の芽胞の耐熱性について、より詳細に調査した。TIF1701～1704については90.0, 92.5, 95.0℃、TIF1705では95.0, 100.0, 105.0℃の各温度における D 値を測定した。これを死滅曲線として Fig. 1 に示した。また算出した z 値を Table 4 に示した。

95℃における D 値を比較すると、TIF1701, 1702, 1703, 1704で各々1.3, 1.9, 1.7, 2.2分とはほぼ同等であったのに比べ、TIF1705は20.1分と他の4菌株の約10倍も高かった。TIF1705は100℃および105℃での加熱においても D 値が各々3.5分および0.8分と非常に高い耐熱性を示した。 z 値は、5菌株とも5.9～7.1℃とほぼ同じ値を示した。

考 察

耐熱性菌による変敗を防止するためには、

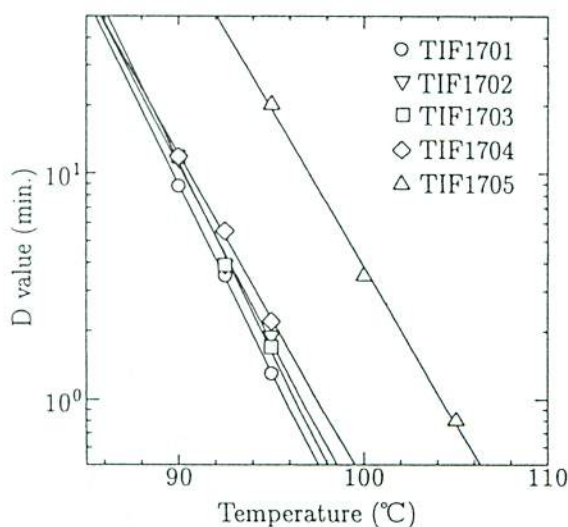


Fig. 1. Thermal death time curves of spores of used strains. The spores of all strains were obtained by incubation at 45℃ for 10 days on Sporulation medium D (See Table 1).

その耐熱性を適切に評価することが不可欠である。このとき、少なくとも過小評価を避けるために、十分な量の、できるだけ上限に近い耐熱性をもつ芽胞を用いることが必要となる。

そこで *A. acidoterrestris* の耐熱性評価のため芽胞形成条件を検討した。使用しやすい標準寒天培地を基礎培地とし、クエン酸および MnSO_4 の与える影響について調査した。検討した条件は、クエン酸は最終濃度0.04%および0.08%、 MnSO_4 については無添加および100 ppmとした。

芽胞収量に関しては、クエン酸および MnSO_4 の効果は菌株によって傾向が異なり、はっきりしなかったが、どの菌株でもD培地において最もよい収量が得られた。全体に収量の少なかったTIF1703においても、D培地では耐熱性評価に必要と考えられる $10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ 以上の濃度が得られた。D培地と他の培地とでは、最低でも1桁以上の差があり、中でもTIF1705では、2.7桁もの較差があり最も大きかった。またTIF1705は、A培地で芽胞形成が認められなかったこともあり、培地の影響を受けやすいと思われた。

耐熱性に関しては、試験した5菌株はいずれも芽胞形成培地の違いがD値に影響を与えた。芽胞形成培地における100ppm MnSO_4 の添加の効果は明瞭で、最も強く影響を受けた、TIF1702でのクエン酸0.08%添加時には、A培地で D_{90} が2.1分であったのに対し、D培地では11.5分と5倍以上耐熱性が増加した。その他の菌株についても、 MnSO_4 の添加により芽胞の耐熱性の増加が認められた。その幅は、クエン酸0.04%の場合1.3~3.0倍であったのに対し、クエン酸0.08%においては2.1~5.0倍とより大きい傾向にあった。

クエン酸濃度から見ると、耐熱性への影響は複雑で、 MnSO_4 の添加に依存し、また菌株によっても挙動が異なった。TIF1701およびTIF1704では、 MnSO_4 を添加しない場合には、クエン酸0.04%で耐熱性がより大きく、0.08%に対し各々2.0および1.4倍であった。TIF1702および1703ではクエン酸濃度の影響は認められなかった。これに対し、 MnSO_4 添加時には、TIF1701、1703および1704にはクエン酸濃度は影響しなかったが、TIF1702および1705は、クエン酸0.08%では0.04%よりもD値が1.6~1.7倍に増加した。

これらを総合すると、いずれの菌株においても培地への100ppmの MnSO_4 添加は、形成した芽胞の耐熱性増加に効果があり、このときクエン酸添加量を0.08%とすることが、より高い耐熱性を引き出す可能性があることを示している。

最も良好と評価された MnSO_4 100ppmおよびクエン酸0.08%添加の条件を採用し、*A. acidoterrestris* 5菌株の耐熱性を菌株間で比較した。TIF1701、1702、1703、1704の4菌株においては同程度の耐熱性が認められた。これら4菌株の耐熱性は D_{90} で1.3~2.2分、 z 値が5.9~6.9であった。これまでに好酸性菌の耐熱性については、鈴木⁶⁾、Yamazaki⁷⁾、山崎⁸⁾により報告されているが、いずれも今回調査したTIF1701、1702、1703、1704と同程度の値であった。おそらく、*A. acidoterrestris* の一般的な耐熱性は、これら4菌株程度のものと思われる。

しかし、TIF1705においては D_{90} が20.1分と約10倍の耐熱性を備えていた。TIF1705の耐熱性は、これまでに報告されている値に比べても遥かに高く、今までで最高の耐熱性を持つことがわかった。

好酸性菌による変敗は、本菌が産生するグアヤコールが、薬品臭として認められる場合がほと

Table 4. z values of spores of used strains. The values were calculated from TDT curves showed in Fig. 1.

Strain	z (°C)
TIF1701	6.0
TIF1702	6.4
TIF1703	5.9
TIF1704	6.9
TIF1705	7.1

んどである。異臭の程度と最終的な到達菌数との関わりについては不明であるが、変敗事例における筆者らの経験では通常、変敗品に認められる菌数はかなり少ない、仮にごくわずかな増殖によっても異臭が生ずるのであれば、製品のpHが至適に近いこともあり、酸性飲料において好酸性菌を制御の対象としなければならない場合、低酸性飲料の殺菌条件に準ずるような、高い菌数制御が要求される。また山崎ら⁸⁾の報告によると、*A. acidoterrestris*の芽胞は、*Bacillus*属の芽胞と異なり、低pHの加熱培地においても耐熱性の減衰が認められないという。

さらに本報で筆者らが指摘したように、好酸菌には非常に耐熱性の高い菌株も存在することを考慮すると、殺菌条件や原料管理を含めた製造条件の設定は非常に慎重に行う必要があると考えられる。

要 約

酸性飲料の変敗原因菌として分離された好酸性菌*A. acidoterrestris* 5株について、芽胞の耐熱性を調査した。5株すべてにおいて、100ppmのMnSO₄と0.08%のクエン酸を添加した標準寒天培地で形成させた芽胞が、収量、耐熱性ともに良好であった。

供試菌株5株の耐熱性分布は、4菌株が D_{95} が1.3~2.2分 ($z=5.9\sim6.9^{\circ}\text{C}$) の範囲であったが、1菌株は D_{95} が20.1分 ($z=7.1^{\circ}\text{C}$) と、他の4菌株の約10倍の耐熱性を示した。これまでの*A. acidoterrestris*の耐熱性に関する報告よりも、非常に耐熱性の高い菌株が存在することが明らかとなった。

文 献

- 1) Yamazaki, K., Inoue, N. and Shinano, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1016-1018 (1997).
- 2) Pettipher, G. L., Osmundson, M. E. and Murphy, J. M.: *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 185-189 (1997).
- 3) Yamazaki, K., Inoue, N. and Shinano, H.: *Lett. Appl. Microbiol.*, 23, 350-354 (1996).
- 4) Yamazaki, K., Teduka, H. and Shinano, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 543-545 (1996).
- 5) 池上義昭, 遠田昌人, 松井智江, 中川 薫: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, 21, 105-115 (1996).
- 6) 鈴木俊光: 食品と容器, 30, 503-506 (1989).
- 7) Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N. and Shinano, H.: *Lett. Appl. Microbiol.*, 25, 153-156 (1997).
- 8) 山崎浩司, 磯田千恵子, 手塚裕和, 信濃晴雄: 食料工, 44, 905-911 (1997).