



Title	中酸性域 pH における Clostridium sporogenes の胞子の耐熱性に関する研究
Author(s)	高尾, 彰一; TAKAO, Shoichi
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 6(1), 105-112
Issue Date	1966-10-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11758
Type	departmental bulletin paper
File Information	6(1)_p105-112.pdf



中酸性域 pH における *Clostridium sporogenes* の 胞子の耐熱性に関する研究

高尾 彰 一

(北海道大学農学部応用菌学教室)

Studies on the Heat Resistance of *Clostridium sporogenes* Spores within the Intermediate pH Range

SHOICHI TAKAO

(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 論

缶詰食品はその pH の程度から、一般に低酸性食品 (pH 5.3 以上)、中酸性食品 (pH 5.3~4.5)、酸性食品 (pH 4.5~3.7) 及び高酸性食品 (pH 3.7 以下) の 4 群に分けられ、殺菌に際しては常にその pH が重要な因子の 1 つとして考慮されている。これらの食品中、pH 5.3 以上の低酸性食品は、魚介類、肉類、乳、野菜など原料の種類が非常に多いため、それらの腐敗に関与する各種有害細菌の耐熱性についてはよく研究されており、一方、酸性及び高酸性食品はその酸度の効果の故に、適切な殺菌条件の設定が容易であるとされている。

しかるに、通常“intermediate pH range”と呼ばれている pH 5.3~4.5 の中酸性食品は、主としてスープ、ビュレ、スパゲッティなどの加工食品が包含され、比較的その種類が少なかったためもあって、従来これら食品に関与する腐敗細菌の耐熱性については、基礎的研究が極めて少ない。それ故この群に含まれる食品の殺菌条件の選定は、これまでの経験をもとに行なわれている場合が多い。しかしながら、強力な毒素 botulinus toxin を生産する食中毒菌、*Clostridium botulinum* の酸性域における生育限界が pH 4.5 である¹⁾ため、それ以上の pH を有するこれらの食品では、当然この菌の汚染も考慮せねばならず、従ってその殺菌に対する充分な基礎的研究が肝要と思われるのである。

一方、*Clostridium sporogenes* も中酸性食品の主要な嫌気性腐敗細菌の 1 つで、毒素の生成は見られぬがその他の生理学的諸性質が *Cl. botulinum* と類似しており、

しかも胞子の耐熱性がこの菌よりもはるかに大きい¹⁸⁾ので、*Cl. sporogenes* を死滅させ得る条件下では、*Cl. botulinum* も完全に殺菌できる。それ故、CAMERON (1927)⁹⁾が腐敗したトウモロコシの缶詰から分離した *Cl. sporogenes* の 1 菌株、PA (Putrefactive anaerobe) 3679 は、食品の殺菌条件を検討する場合の標準腐敗細菌の 1 つとして、アメリカ缶詰協会で採用されているのである。

しかしこの菌についても、前記の中酸性域を対象とした対熱性の研究は殆んど行なわれていない。すなわち、TOWNSEND ら (1938)²²⁾、STUMBO (1948)¹⁷⁾、STUMBO ら (1950)¹⁹⁾、REED ら (1951)¹²⁾、及び REYNOLDS ら (1952)¹³⁾ は、種々の植物性食品中における *Cl. sporogenes* PA 3679 の胞子の耐熱性を見ているが、それらの食品の pH は殆んどが 5.3 以上の低酸性に属するものであった。又、DESROSIER 及び ESSELEN (1951)⁸⁾は、熱処理を繰返して生き残ったこの菌の胞子の耐熱性増加を調べ、天羽 (1953)¹¹⁾、天羽及び坂口 (1954)⁴⁾ は胞子の濃度と耐熱性との関係、各種炭水化物、蛋白質物などがこの菌の耐熱性に及ぼす影響を試験しているが、胞子の加熱はいずれも pH 7.0 で行なわれている。又、SOGNEFEST ら (1948)¹⁵⁾は、各種の野菜や豆のビュレの pH を酸性域からアルカリ性域にまで調整し、それぞれの pH におけるこの菌の耐熱性を比較し、中酸性域 pH についても試験しているが、それらは広汎な実験の一部として取り上げられているに過ぎない。ただわずかに TSUJI (1959)²⁴⁾が中酸性食品殺菌の重要性に着目し、その基礎研究として、中酸性域の数段階の pH における胞子形成腐敗細菌数種の耐熱性を調べ、そのなかで *Cl. sporogenes* PA

3679 についても、加熱条件を種々検討しているのが注目されるのみである。

そこで著者は、特に中酸性域 pH における *Cl. sporogenes* PA 3679 の胞子の耐熱性を対象とし、しかも従来この菌については殆んど研究されていない胞子形成の諸条件、胞子液貯蔵条件などが、胞子の耐熱性にいかに影響するかについて基礎的実験を行なったのでその結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, University of Massachusetts で保存の *Clostridium sporogenes* PA 3679。

2. 胞子形成用基本培地

TsUJI (1959)²⁴⁾ がこの菌の胞子形成に用いた Trypticase 10%, (NH₄)₂SO₄ 1%, sodium thioglycollate 0.1% からなる培地 (pH 7.2) で、Mn の効果を特に試験した時以外は、すべて MnSO₄·H₂O 10 ppm を培地に添加した。

3. 胞子形成並びに胞子液調製方法

Cl. sporogenes の胞子を得るには、Fig. 1 に示したように、試験管から瓶培養へと順次液量を増して 30°C で培養を続け、最後の培養は次に述べる各試験条件ごとに、それぞれ接種菌液を合わせて 200 ml の培地の入った 8 oz 容培養瓶 30 個で行ない、3~4 日間培養した後、栄養細胞が消失し殆んど胞子のみとなったところで取り出した。

ここに得られた各 6 l 分の胞子含有培養液は、先ず Servall type KSB-4 の連続遠心分離機で 15,000 r.p.m., 毎分 100 ml の流出速度で遠沈して胞子を集め、ついで 2,000 r.p.m. で 30 分ずつ 3 回水洗した。これら洗滌済みの胞子は、いずれもその濃度が ml あたり 10⁸ になるよう少量の滅菌水で懸濁した後、貯蔵温度試験の場合以外は 5°C で保存した。

4. 胞子の耐熱性に対する試験条件

- 1) 胞子形成培地中の Mn の影響。MnSO₄·H₂O を 0, 10 及び 50 ppm 添加。
- 2) 胞子形成培地中の磷酸塩の影響。K₂HPO₄ を 0, M/100 及び M/40 添加。
- 3) 胞子形成温度の影響。胞子形成適温 30°C 及び発育適温 37°C を比較。
- 4) 胞子水洗の影響。遠沈して集めた胞子を洗滌しないものと 3 回水洗したものを比較。

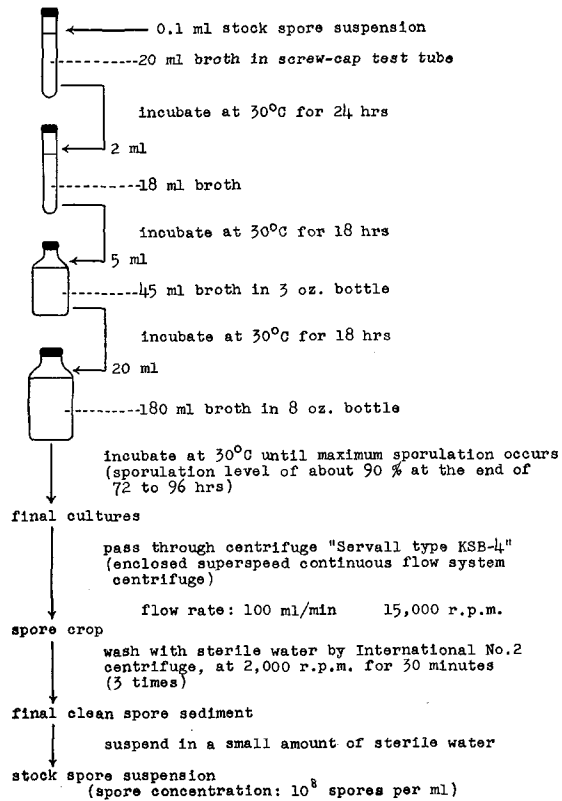


Fig. 1. Procedure for the preparation of spore crops of *Clostridium sporogenes*.

5) 胞子洗滌前の lysozyme 処理の影響。Lysozyme による残存栄養細胞処理の効果を見るため、BROWN ら (1957)²⁵⁾ の方法を参照し、0.25% の lysozyme を含む N/10 KCl 液に未洗滌胞子を懸濁し、37°C で 2 時間処理した後水洗し、未処理のものと比較。

6) 胞子液保存温度の影響。水で洗滌した胞子液を 5, 10 及び 25°C で保存。

7) 胞子保存液の影響。集めた胞子を水に懸濁しておいたものと、胞子形成培養液中にそのまま保存したものと比較。

8) 胞子液保存期間の影響。水に懸濁した胞子を 10 及び 70 日間保存。

5. 胞子の耐熱性試験法

胞子の耐熱性は NCA Laboratory Manual (1956)²³⁾ の TDT (Thermal death time) tube method によって試験した。その概要は Fig. 2 に示す如くである。すなわち各条件下で保存した胞子液を intermediate pH である pH 4.7 の M/2 citrate buffer に、ml あたり 10⁶ の

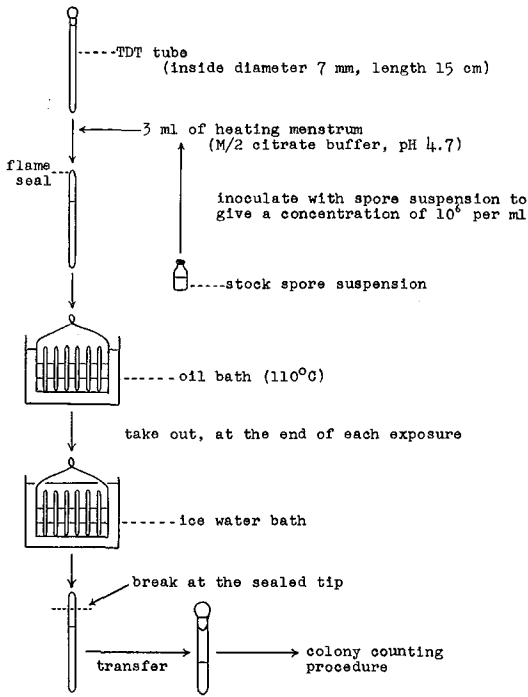


Fig. 2. Experimental procedure of thermal death rate.

TDT (thermal death time) tube method:
NCA Lab. Manual, 1956.

孢子濃度になるように接種し、その 3 ml ずつを殺菌ずみの TDT tube に注入した後、先端を熔封し、110°C の oil bath に浸漬加熱後、一定時間ごとに tube を取り出し、直ちに ice water bath 中で冷却してからその内容を滅菌試験管に移した。ここで生き残っている孢子数の算定は colony を形成させて行なったが、それには Fig. 3 の如く、予備実験で得た計数に好都合な 3 段階の濃度に前記加熱孢子液を稀釈し、その 1 ml ずつを、予め太い試験管内で溶かし、45°C に保ってある recovery medium (Table 1)²⁴ に接種した後 Spinning tube apparatus²⁴ (Photo. 1) にかかけ、ice water bath 中で急速に回転させると、培地は試験管の内壁に薄層となって固化する。その後、押し込めた綿栓上に、嫌気培養のためピロガロール粉末 1 g と 20% NaOH 1 ml を添加し、直ちにゴム栓で密封し、逆さに立て 37°C で 7 日間 colony が充分形成されるまで培養した。従来、嫌気菌の colony を簡便に且つ適確に形成させる方法は殆んどなかったが、この Spinning tube method は操作も簡単でしかも colony の出現も容易であり、培地が薄層となるためガス

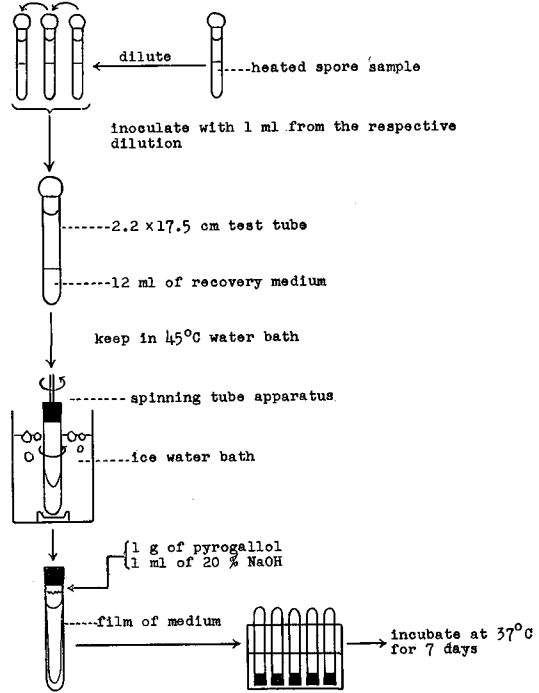


Fig. 3. Anaerobic colony counting method (Spinning method).

Table 1. Recovery medium (Pea-pork trypticase medium).

Pork infusion	800 ml
Pea infusion	200 ml
Trypticase	1.5%
K ₂ HPO ₄	0.125%
Soluble starch	0.1%
Na-thioglycollate	0.05%
Agar	3%

の発生による寒天の亀裂も起らないなどの利点がある。

6. TDR curve の作製及び D value の算出

横軸に 110°C で孢子液を加熱した時間を分で表わし、縦軸に前記の colony 数から得た、各加熱時間に相当する生存孢子数の対数を取り、その回帰直線を求めた。この直線は TDR (Thermal destruction rate) curve と呼ばれ、その傾斜がゆるやかな程、耐熱性が大きいことを示している。又生存孢子数を 90% 減ずるに要する時間 (分) を次式により算出したが、これは D (Death rate) value と呼ばれ、この値が大きい程、耐熱性も大きいことを意味している。

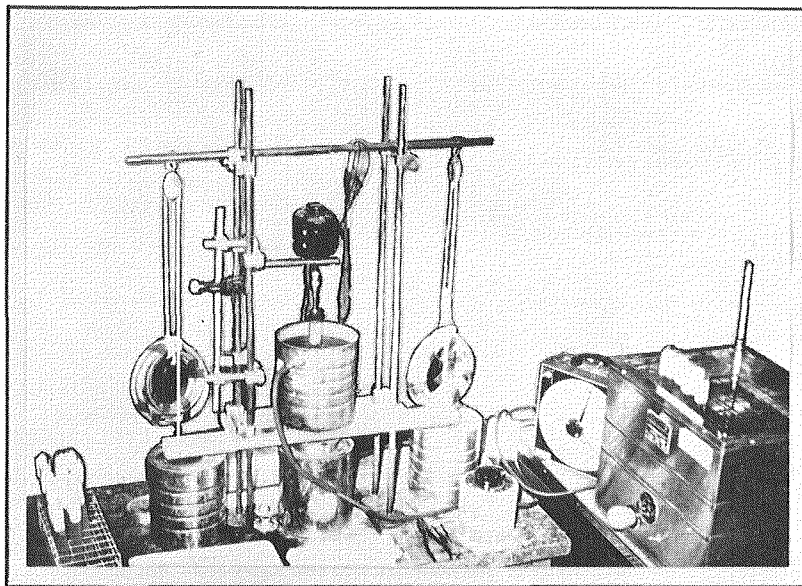


Photo. 1. Spinning tube apparatus.

$$D = \frac{U}{\log a - \log b}$$

ここで U : 加熱時間 (分)
 a : 始めの孢子数
 b : U 分加熱後の生存孢子数

結果及び考察

1. 孢子形成培地中の Mn の影響

Fig. 4 に, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を 10 及び 50 ppm 含む培地から得た各孢子液を 5°C で 10 日間保存した場合の結果を示したが, これら 2 種の Mn 濃度では, 孢子の耐熱性に対する影響に差が見られなかった。しかし Mn 無添加培地と 10 ppm 添加培地からの孢子を, 5°C で 70 日間保存した Fig. 5 の結果から, Mn を培地に少量添加することによって, 孢子の耐熱性は明らかに増大することが認められた。

従来, 好気性有孢子細菌の孢子形成には Mn が著しい促進効果を有し^{2,7)}, しかも孢子形成培地に Mn を加えることによって, 孢子の耐熱性が増大する例も見られている³⁾。

しかるに *Cl. sporogenes* などの嫌気菌では, 好気菌の場合よりも一般に栄養要求が複雑で, 純合成培地を調製することが困難なためもある。孢子形成に対する金属イオンの影響は今後の問題として残され¹⁰⁾, *Cl. sporogenes* の孢子形成培地にもこれまで Mn を特に添加するこ

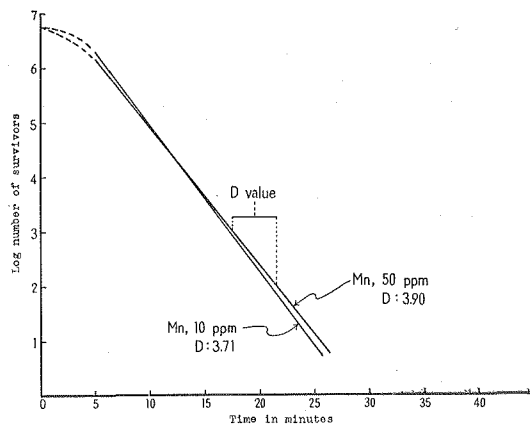


Fig. 4. Effect of Mn in medium on heat resistance of *Cl. sporogenes* spores (storage at 5°C for 10 days).

とはなく, むしろ主として培地の有機成分が検討されて来た^{11, 24, 28)}。

しかし今回の実験から, 孢子形成培地に対する少量の Mn の添加は, 先の好気菌の場合と同様, *Cl. sporogenes* の孢子の耐熱性増加にも効果のあることが立証された訳である。

2. 孢子形成培地中の磷酸塩の影響

孢子液を 5°C で 10 日間保存した場合の結果を Fig. 6 に示したが, K_2HPO_4 無添加培地から得た孢子の D

value が 3.71 であるのに比べ、M/100 添加で 4.01, M/40 では 4.57 と上昇し、培地に対する磷酸塩の添加が胞子の耐熱性を幾分増進することが認められた。

ちなみに *Bacillus subtilis*²⁶⁾, *Bac. coagulans* var. *thermoacidurans*³⁾, *Cl. botulinum*¹⁶⁾ などでは、培地に磷酸塩類を添加することによって胞子の耐熱性の増すことが知られているが、*Cl. sporogenes* については、従来このような磷酸塩の効果は報告されていなかったのである。

3. 胞子形成温度の影響

Fig. 7 から明らかなように、この菌の発育適温 37°C よりも胞子形成適温 30°C で培養して得た胞子の方が、はるかに耐熱性が大きかった。この結果は、発育可能な

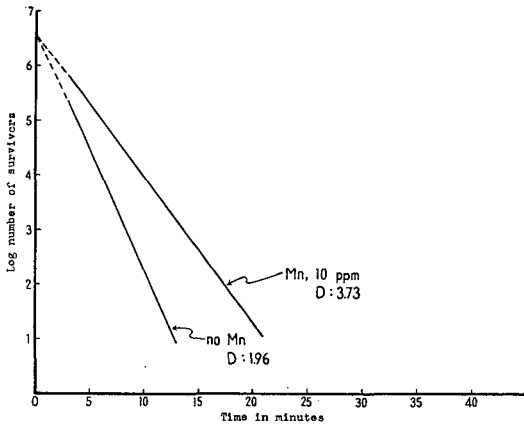


Fig. 5. Effect of Mn in medium on heat resistance of *Cl. sporogenes* spores (storage in cultured medium at 5°C for 70 days).

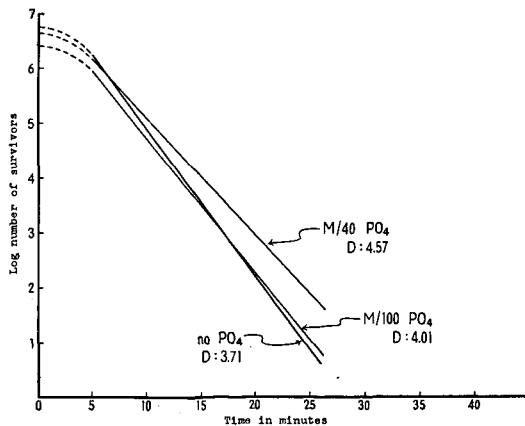


Fig. 6. Effect of PO₄ in medium on heat resistance of *Cl. sporogenes* spores (storage at 5°C for 10 days).

温度の範囲内では菌の培養温度を高めるに従い、形成された胞子の耐熱性も高まるという *Bac. anthracis*²⁵⁾, *Bac. subtilis*²⁶⁾, *Bac. stearothermophilus*²⁷⁾, *Bac. coagulans* var. *thermoacidurans*⁹⁾ などの様相とは著しく異なるものである。従ってこの *Cl. sporogenes* の場合はむしろ、練乳から分離された *Bacillus* sp.²¹⁾ や *Cl. botulinum*²⁰⁾ の胞子で認められている現象、すなわち最大の耐熱性を示す胞子形成温度があって、その前後の培養温度では、いずれも胞子の耐熱性が減ずるという結果に類似しているものと思われる。

4. 胞子水洗の影響

耐熱性に対する胞子水洗の効果を見た結果は Fig. 8 の如くで、胞子の水洗いかんはその耐熱性に殆んど影響のないことが分った。

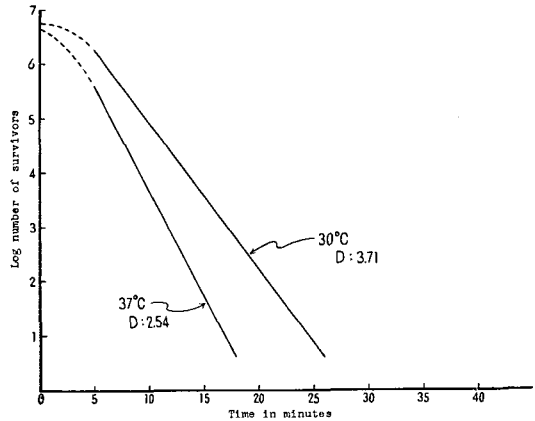


Fig. 7. Effect of incubation temperature on heat resistance of *Cl. sporogenes* spores (storage at 5°C for 10 days).

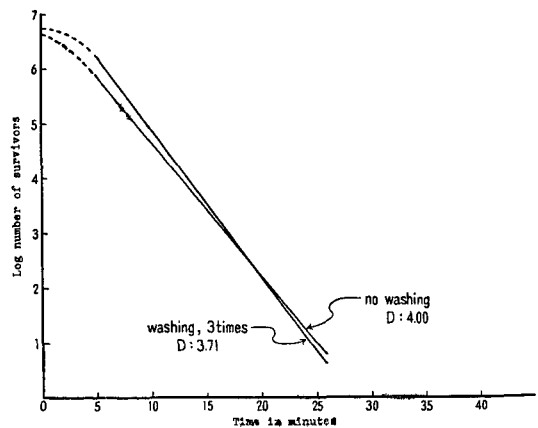


Fig. 8. Effect of washing spore crops on heat resistance of *Cl. sporogenes* spores (storage at 5°C for 10 days).

5. 孢子洗滌前の lysozyme 処理の影響

Fig. 9 に比較したように、培養液から集めた孢子を lysozyme で処理したものと未処理のものとは、耐熱性に差異が認められなかった。

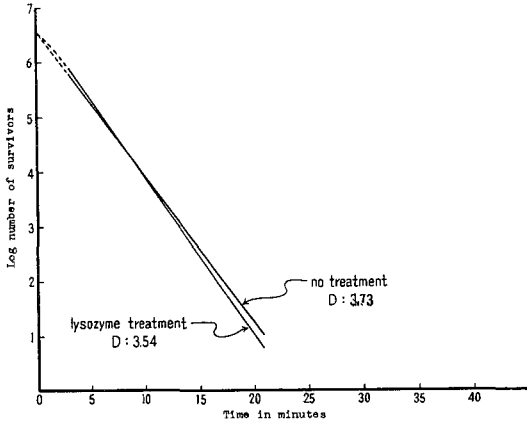


Fig. 9. Effect of lysozyme treatment in washing spore crops on heat resistance of *Cl. sporogenes* spores (storage in cultured medium at 5°C for 70 days).

6. 孢子液保存温度の影響

孢子液を 5, 10 及び 25°C に 10 日間保存した場合の結果を Fig. 10 に示したが、図から明らかな如く、5 ないし 10°C の低温に保存したよりも 25°C に保存した方が著しく耐熱性が大きかった。この傾向は Table 2 の 70 日間保存の場合の D value を比較しても全く同じである。従来このような、耐熱性に及ぼす孢子液の保存温度の影響を試験した報告は見当らず、従ってこの点については今後更に詳細な検討が必要と考えられる。

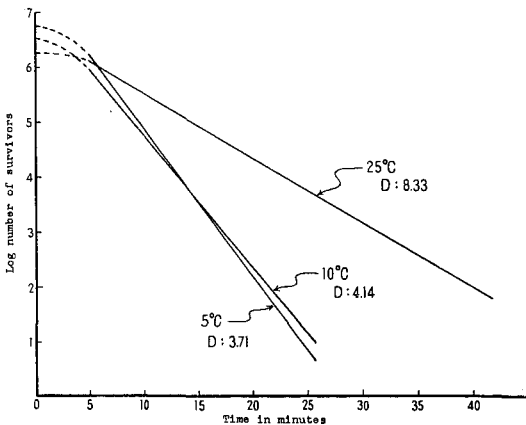


Fig. 10. Effect of storage temperature of spore crops on heat resistance of *Cl. sporogenes* spores (storage for 10 days).

7. 孢子保存液の影響

Fig. 11 に、これまでの実験条件通り孢子を洗滌後、水に懸濁して保存したものと、孢子形成後そのまま培養液中に保存したものについて耐熱性を比較した結果を示したが、これら両保存液の間には大差は見られなかった。

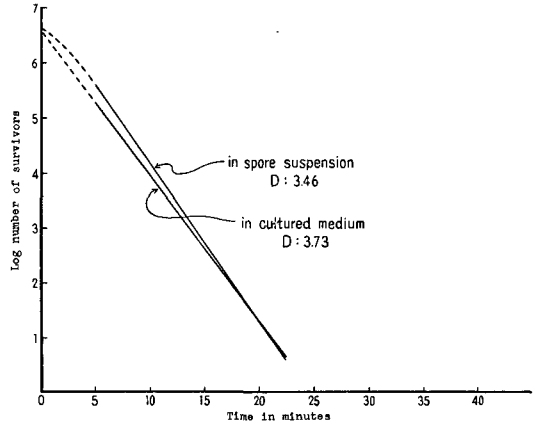


Fig. 11. Storage in spore suspension and in cultured medium for 70 days at 5°C.

8. 孢子液保存期間の影響

Table 2 に、各種の条件で得られた孢子液を、10 及び 70 日間保存した場合の D value を対比して示したが、70 日間保存のものは、孢子形成条件などのいかにかわらず、いずれも 10 日間保存に比べ耐熱性が多少減じていることが認められた。

Table 2. D values of *Cl. sporogenes* spores stored for 10 and 70 days.

Conditions				D values	
Mn	PO ₄	Incubation temp.	Storage temp.	10 days	70 days
10 ppm	0	30°C	5°C	3.71	3.46
50 ppm	0	"	"	3.90	3.38
10 ppm	M/100	"	"	4.01	3.34
"	M/40	"	"	4.57	3.63
"	0	"	10°C	4.14	3.53
"	0	"	25°C	8.33	5.32
"	0	37°C	5°C	2.54	2.38

本研究は 1961 年、Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, University of Massachusetts, U.S.A. において行なったものであり、研究に当って有益な御助言と御鞭撻を賜わった Dr. H. M. EL-BISI に厚く御礼申し上げると共に、終始実験に御協

力をいただいた Mrs. K. L. O'DONNELL に感謝する。更に本報文の御校閲を賜った北大農学部応用菌学教室佐々木西二教授に深謝の意を表する。

要 括

胞子形成条件、胞子液保存条件が、中酸性域 pH における *Clostridium sporogenes* PA 3679 の胞子の耐熱性に、いかに影響を及ぼすかについて実験した結果、

1. 胞子形成培地に少量の Mn や磷酸塩を添加すると、無添加の場合に比べて胞子の耐熱性が増大した。

2. 胞子形成の温度は耐熱性と深い関係があり、胞子形成適温 30°C で得た胞子は、発育適温 37°C で得たものより、はるかに耐熱性が大きかった。

3. 胞子の水洗、lysozyme 処理のいかんは耐熱性に影響なく、又胞子を水に懸濁して保存しても胞子形成培養液中にそのまま保存しても、耐熱性に差異は見られなかった。

4. 胞子液は 5° や 10°C の低温においたものよりも、25°C に保存した方が耐熱性は大であった。

5. 胞子の形成条件、保存方法のいかにかわかわらず胞子液を 70 日間保存すると、10 日間保存した場合に比べいずれも耐熱性が多少減少した。

文 献

- 1) 天羽幹夫, 1953. 農化誌. 27: 456-462.
- 2) AMAHA, M., Z. J. ORDAL and A. TOUBA. 1956. *J. Bacteriol.* 72: 34-41.
- 3) AMAHA, M. and Z. J. ORDAL. 1957. *J. Bacteriol.* 74: 596-604.
- 4) AMAHA, M. and K. SAKAGUCHI. 1954. *J. Bacteriol.* 68: 338-345.
- 5) BROWN, W. L., Z. J. ORDAL and H. O. HALVORSON. 1957. *Appl. Microbiol.* 5: 156-159.
- 6) CAMERON, E. J. 1927. *Canner* 64, No. 10: 146; 天羽幹夫, 1953. 農化誌. 27: 456-462.
- 7) CHARNEY, J., W. P. FISHER and C. P. HEGARTY. 1951. *J. Bacteriol.* 62: 145-148.
- 8) DESROSIER, N. W. and W. B. ESSELEN. 1951. *J. Bacteriol.* 61: 541-547.
- 9) EL-BISI, H. M. and Z. J. ORDAL. 1956. *J. Bacteriol.* 71: 10-16.
- 10) HALVORSON, H. O. 1957. "Spores", American Institute of Biological Sciences (Washington, D. C.), p. 8.
- 11) LUND, A. J., F. W. JANSSEN and L. E. ANDERSON. 1957. *J. Bacteriol.* 74: 577-583.

- 12) REED, J. M., C. W. BOHRER and E. J. CAMERON. 1951. *Food Research* 16: 383-408.
- 13) REYNOLDS, H., A. M. KAPLAN, F. B. SPENCER and H. LICHTENSTEIN. 1952. *Food Research* 17: 153-167.
- 14) SCHOENHOLZ, P., J. R. ESTY and K. F. MEYER. 1923. *J. Infectious Diseases* 33: 289-327.
- 15) SOGNEFEST, P., G. L. HAYS, E. WHEATON and H. A. BENJAMIN. 1948. *Food Research* 13: 400-416.
- 16) SOMMER, E. W. 1930. *J. Infectious Diseases* 46: 85-114.
- 17) STUMBO, C. R. 1948. *Food Technol.* 2: 228-240.
- 18) STUMBO, C. R. 1949. *Advances in Food Research* 2: 47-115.
- 19) STUMBO, C. R., J. R. MURPHY and J. COCHRAN. 1950. *Food Technol.* 4: 321-326.
- 20) SUGIYAMA, H. 1951. *J. Bacteriol.* 62: 81-96.
- 21) THEOPHILUS, D. R. and B. W. HAMMER. 1938. *Agr. Exp. Sta., Iowa State College, Research Bull.* No. 244.
- 22) TOWNSEND, C. T., J. R. ESTY and F. C. BASELT. 1938. *Food Research* 3: 323-346.
- 23) TOWNSEND, C. T., I. I. SOMERS, F. C. LAMB and N. A. OLSON. 1956. "A Laboratory Manual for the Canning Industry (2nd edition)", National Canners Association, Research Laboratories (Washington, D. C.), Chapt. 10.
- 24) TSUJI, K. 1959. Thesis for the Ph. D. degree, Univ. of Massachusetts, Amherst, U.S.A.
- 25) WEIL, R. 1899. *Arch. Hyg.* 35: 355-408; WILLIAMS, O. B. and W. J. ROBERTSON. 1954. *J. Bacteriol.* 67: 377-378.
- 26) WILLIAMS, O. B. 1929. *J. Infectious Diseases* 44: 421-465.
- 27) WILLIAMS, O. B. and W. J. ROBERTSON. 1954. *J. Bacteriol.* 67: 377-378.
- 28) Zoha, S. M. S. and H. L. SADOFF. 1958. *J. Bacteriol.* 76: 203-206.

Summary

Effects of the sporulation condition for *Clostridium sporogenes* PA 3679 and the storage condition of spore crops on the heat resistance of these spores within the intermediate pH range were investigated to establish a scientific basis for the thermal process of semi-acid foods. The results obtained are as follows:

1. The addition of small amounts of manganese

or phosphate to the sporulation medium, caused an increased heat resistance of spores.

2. The spores produced at an optimum sporulation temperature, 30°C, had a greater heat resistance than those obtained at an optimum growth temperature, 37°C.

3. Washing or lysozyme treatment of spore crops had no effect on the heat resistance. No difference was found between the resistance of both spore crops

kept in water and in the culture solution in which the spores were produced.

4. The spores stored at 25°C were much more resistant to heat than those kept at lower temperatures, 5 and 10°C.

5. With every kind of spore crop produced under various conditions, the storage for 70 days reduced the heat resistance to some extent compared with the results of 10 days' storage.