

アサマNEWS

パートナ

2004-11 NO.103

食品衛生講座

食品加工と微生物 その26 pH調整による微生物制御

酢漬けは優れた貯蔵法

「ままかりの酢漬け」は岡山の特産品で、瀬戸内海でとれたサツパという魚を酢漬けにしたものである。この製品はあまりに味がよいのでついまま（ご飯）を借りてまで食べるというところからの呼び名といわれる。高知のカツオ内臓の塩辛が酒盗と呼ばれるのと似たネーミングである。ままかりの酢漬けは一般の腐敗菌が低いpH（酸性）では増殖できないことを利用して、魚を貯蔵する目的で生まれたもので、酢の風味も魚に合うので重宝されてきたのであろう。

酢の殺菌効果は経験的にもよく知られているが、具体的な実験例を示すと、図1は学生実験で氷蔵や酢漬け、塩水漬け、真空包装の効果を調べたときのデータである。そのままあるいは真空包装して貯蔵した場合に比べ、とくに酢漬けでは殺菌効果が著しく、このpH（3.1）では腐敗細菌は増殖できないため長期の貯蔵が可能となる。

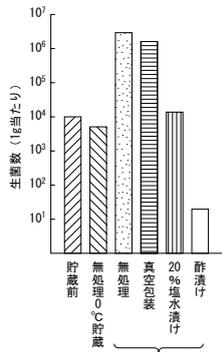


図1 イワシ肉をいくつかの方法で2日間貯蔵した際の生菌数の変化

食品のpH

食品や飲料などがどの程度酸性、アルカリ性かを表すために、pH（ペーハーまたはピーエッチと読む）という単位がよく使われる。pH7が中性で、数字が小さいほど酸性が強くなり、味はすっぱみを増す。

食品のpHはどれくらいであろうか。生きている魚のpHはほぼ中性であるが、死ぬと乳酸が蓄積するのでpHは6.2～6.6程度にまで低下する。魚のようなタンパク性の食品に微生物が増殖するとアンモニアやアミンのようなアルカリ性の物質が増えるので、腐敗するとpHが8近くまで上昇することが多い。逆にデンブンの多い食品に酵母や乳酸菌などが増殖すると、有機酸が増えpHが酸性となる。新鮮な牛乳のpHは中性であるが、これを乳酸菌で発酵させたヨーグルトでは乳酸ができるのでpHは4くらいになる。味噌、醤油の醸造にも乳酸菌が関係するのでpHは4.7～4.8になる。日本酒のpHは4.5、ワインのpHは3.0～3.7、酢は約2.7である。食品のpHは一般に酸性のものが多く、アルカリ性のものは少ない。

微生物の増殖pH範囲

微生物の中にはpHが1以下の硫黄泉や10以上の環境でも生えるものもいるが、食品に関係する微生物の増殖pH範囲はそれほど極端ではなく、図2のように、一般の細菌は中性からややアルカリ性でよく生え、pHが4～5以下になると生えないものが多い。一般に乳酸菌や酵母、かび

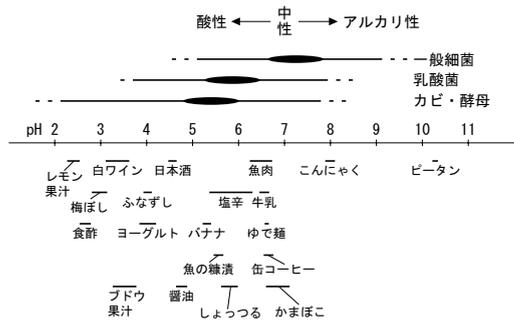


図2 食品pHと微生物の増殖pH域

は比較的酸に強く、乳酸菌ではpH3.3～4付近まで、酵母やカビではさらに低くpH2～3付近まで生えるので酸性食品の腐敗原因菌となりやすい。図2にはいくつかの食品のpHも一緒に示しておく。また食中毒細菌の増殖pH域を表1に示す。多くの食中毒細菌はpH4～5以下では増殖できないことがわかる。

缶・瓶詰め（容器詰）食品では加熱殺菌が行われるが、この際必ずしもすべての微生物を殺す必要はなく、生き残っても増殖しなければよいわけであるので、殺菌条件は中に入れる食品のpHを考慮して決められている。一般的に、加熱食品では熱に弱い乳酸菌やカビはいち早く死滅してしまうので、変敗原因菌となるのは耐熱性の有孢子（芽胞）細菌ということになるが、強い加熱を行わない高酸性食品では乳酸菌やカビも生き残り問題となることがある。

表2は缶・瓶詰食品をpHによって分類し、そこでの主な変敗微生物と一般的な殺菌温度を示したものである。pH3.7未満の高酸性食品中では一般の有孢子細菌は生き残っても増殖できないので、比較的低い温度での殺菌が行

細菌	増殖pH域	
	A	B
腸炎ビブリオ	4.8~11	4.8~11
黄色ブドウ球菌	4.0~9.8	4~10
サルモネラ	4.5~8.0	3.7~9.5
カンピロバクター	5.5~8.0	4.9~9.5
病原大腸菌	4.4~9.0	4~9
ウェルシュ菌	5.0~9.0	5~9
ポツリス菌	4.6~8.5	4.6~9
タンパク分解菌	5.0~8.5	5~9
セラウス菌	4.9~9.3	4.3~9.3
リステリア	4.5~9.5	4.4~9.4

(A: 厚生省資料, B: FDA資料)

表1 主な食中毒細菌の増殖pH域

食品の種類 (pH)	低酸性食品 (>5.0)	中酸性食品 (4.5~5.0)	酸性食品 (3.7~4.5)	高酸性食品 (<3.7)
食品の例	食肉、魚介類、しるこ、ココア	ミートソース	フルーツみつ豆	ピクルス、果汁、ミカン、トマト製品
<i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌)	+	+	±	-
<i>B. licheniformis</i>	+	+	±	-
<i>B. stearothermophilus</i>	+	-	-	-
<i>Clostridium thermoaceticum</i>	+	-	-	-
<i>C. pasteurianum</i>	+	+	+	-
<i>C. botulinum</i> (ポツリスA, B型)	+	+	-	-
無孢子細菌	+	+	+	+
カビ・酵母	+	+	+	+
一般に採用される殺菌温度(°C)	>110	100~110	50~100	75~85

-: 増殖, +: 増殖せず。

表2 容器詰食品のpHによる分類と主な変敗原因菌

われており、このような食品では、加熱不足の場合には、乳酸菌などの無孢子細菌とカビ、酵母が主な変敗原因菌となる。これに対してpH3.7～4.5の食品中では有孢子細菌

菌も増殖するので、これを殺菌するためには比較的強い加熱処理が必要となる。pH 4.6以上ではボツリヌス菌も増殖しうるため厳重な殺菌が必要となる。

従来、缶詰のpHが3.7以下であれば有孢子細菌による変敗の心配はまずなかった。しかし最近では、輸入原料とともに新しい菌も持ち込まれるようで、野菜ジュース缶詰などの新しい変敗菌としてpH 2~4（最適pH 3付近）の範囲でよく増殖する耐熱性細菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)が報告されているので注意が必要である。

酸による腐敗防止

酸を用いた腐敗防止の例として、茹で麺とサラダ、しよつつの場合を挙げておきたい。

茹で麺のpHはふつう約6.5であり、そのままでは腐敗しやすいので流通期間を延ばすため、乳酸やリンゴ酸、クエン酸などの溶液（0.2%程度）に短時間浸漬してpHを5.0~5.5に下げることがとられている。

図3はサラダにマヨネーズを10~40%加えてpHを4.5~5.5に調整して、30℃に貯蔵した際の生菌数変化を調べた結果である。10%添加のpH 5.5ではあまり腐敗防止効果はないが、pH 5以下になると防腐効果の大きいことがよく分かる。海外のサラダ類は、10℃で3週間保存後も品質に変化が見られないようであるが、これには有機酸が加えられ、pHが5.0以下になっているものが多いという。

図4はしよつつのpHを酢酸で4.5~7.5に調整して30℃に貯蔵した際の菌数をみたものである。pH 5以下で腐敗が顕著に抑制されることがわかる。

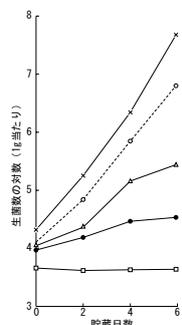


図3 マヨネーズを加えてpH調整をしたサラダの生菌数変化 (30℃)

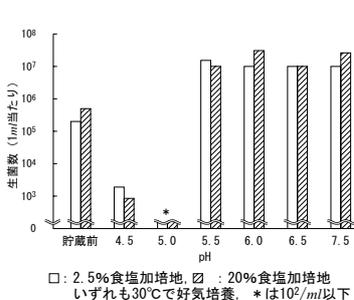


図4 しよつつの貯蔵中の細菌の増殖に及ぼすpHの影響 (30℃, 1ヶ月間)

酸の種類で異なる増殖pH域

pHの低い食品が腐りにくいことは古くから知られており、上の例のように有機酸を添加して食品のpHを下げて貯蔵性を向上することが行われている。この際注意しなければならないことは、用いる酸の種類によって、同じpHでも微生物の増殖に及ぼす効果が異なるということである。表3は種々の酸でpHを下げた培地に3種のサルモネラを接種して、増殖の下限pHを調べた結果であるが、塩酸やクエン酸を用いた場合と、酢酸やプロピオン酸を用いた場合とは、増殖の下限pHに1.4近くの違いがあり、酢酸やプロピオン酸ではpHを5.5付近まで下げればサルモネラの増殖は防げるのに対し、塩酸やクエン酸ではpH 4にまで下げなければならないことが分かる。

酸の種類	pH
塩酸	4.05
クエン酸	4.05
酒石酸	4.10
グルコン酸	4.20
フマル酸	4.30
リンゴ酸	4.40
乳酸	4.40
コハク酸	4.60
グルタル酸	4.70
アジピン酸	5.10
ピメリン酸	5.10
酢酸	5.40
プロピオン酸	5.50

試験菌株: *Salmonella anatum*, *S.tennessae*および *S.senfftenberg*. このうち1血清型またはそれ以上が増殖したpHを表に示した

表3 最適条件下でサルモネラが増殖を始めるための最低のpH

有機酸の抗菌力は、酢酸 > アジピン酸 > コハク酸 > 乳酸 > リンゴ酸 > クエン酸 > 酒石酸 > 塩酸の順で大きい。またいずれの有機酸もpHが低下するほど非解離型分子の割合が増えるので低pHほど抗菌力は強くなる。

(東京海洋大学海洋科学部 藤井建夫)

有害食品微生物制御のための最新動向

その5 バクテリオシン (2)

4. 真菌に作用するバクテリオシン

乳酸菌は広範囲の食材の発酵に利用されてその保存、健康効果のあることが知られているが、かびに対する影響については必ずしも十分の検討がなされてきたとはいえない。かびによって起る変敗、かびの生産する毒素の問題などに対して乳酸菌の影響が検討されねばならない。Gourama及びBullerman (1995)³⁷は乳酸菌の抗真菌性と抗真菌毒素作用についての総説を発表している。それによれば過去に検討された乳酸菌とかびの組み合わせは次のごとくである。即ち

A.parasiticus ~ *Lactococcus lactis subsp. lactis*; *A.parasiticus*, *A.flavus* ~ *Lactobacillus casei*; *A.parasiticus*, *A.fumigatus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus sp.* ~ *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*; *A.parasiticus*, *A.fumigatus* ~ *S.lactis subsp. lactis*; *A.fumigatus* ~ *Lactobacillus acidophilus*, *Candida albicans*, 其の他の変敗乃至病原性酵母 ~ *L.acidophilus* などがあげられる。

*A.flavus*の菌糸やアフラトキシンの影響をうけて乳酸菌の細胞の膨張や長鎖の形成することが見出されているし、乳酸菌によってアフラトキシンの生産が阻害されたり、逆に生産が促進されたとする結果も得られている。このような乳酸菌の真菌に対する影響については、低pH、栄養素の欠乏、拮抗、代謝産物に起因する影響が考えられているが、未だ必ずしもその効果の本態は究明されていない。

著者は既に興味ある乳酸菌のかびに対する効果の研究を紹介している¹⁾。次に興味ある研究結果を紹介する。*Strept.lactis*と*A.flavus*との混合培養において、*A.flavus*の単独培養では通常5~7日でアフラトキシンの生産が最高となりその後急速に低下するのが通例であるが、乳酸菌との混合培養ではかびの増殖の阻害はなく、アフラトキシンは殆ど蓄積が認められなかった(図4参照)。図5では*Strept.lactis*の16h培養の細胞10⁷CFU/mlを*A.flavus*の3日又は4日培養液に添加すると1~2日後にアフラトキシンは著しく低下する結果となっている(図5)。この場合アフラ

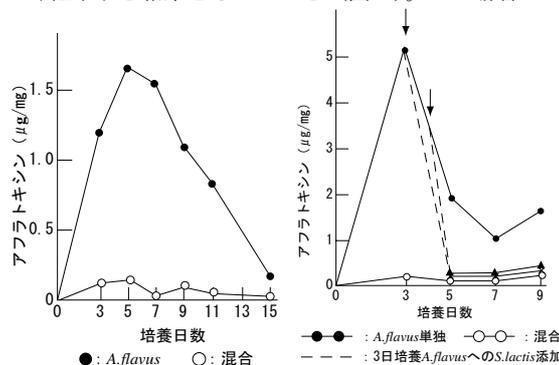


図4 *A.flavus*と*S.lactis*の混合培養におけるアフラトキシンの生産 (28℃)

図5 生成アフラトキシンに対する*S.lactis* (10⁷CFU/ml)添加の影響

トキシン生成を阻害したり分解する物質として熱耐性の低分子物質が推定されている。これに対して逆に*A.parasiticus*に対して乳酸がその増殖は阻害せずアフラトキシンB₁の生産の上昇、G₁の低下のあることが認められている。また*Lactococcus lactis*との混合培養でアフラトキシン生産が上昇するという結果も得られている。また*A.flavus subsp. parasiticus*に対する*L.acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L.plantarum*、市販のサイレージ添加剤の影響について、かびの発育も毒素生産も阻害されたという報告がある。*A.parasiticus*に対する*Pediococcus*, *Lactobacillus*の混合培養における毒素生産の阻害について、その原因は毒素生産阻害物質によるのではなく、栄養素に対する拮抗によると推論されている。

Lyon及びGlatz (1991)³⁸は*Propionibacterium thoenii*の生産するpropionin PLG-1について表6に示したように広い抗菌スペクトルを示し、グラム陽性、陰性細菌をはじめ、かび、酵母に対しても阻害作用を示す結果を得ている。このものは熱に弱く、数種の蛋白分解酵素に感受性であるが、pH 3~9では安定であった。固体培養よりこのバクテリオシンが分離され、硫酸沈澱、ゲル濾過により精製されて、2種類の蛋白会合体として存在することを

表6 Propionicin PLG-1の抗菌スペクトル

微生物	発育条件	阻止円径
Gram positive		
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> AR2	MRS, 37°C	+2
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IT6	MRS, 37°C	+1
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS, 37°C	+2
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	MRS, 32°C	+2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	APT, 37°C	+2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DRC-1	APT, 37°C	+2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> C2	APT, 37°C	+3
Gram negative		
<i>Campylobacter jejuni</i>	Thioglycolate, 37°C	+2
<i>Escherichia coli</i> JM109	TSB, ^b 37°C	+1
<i>Escherichia coli</i> V517	TSB, 37°C	+1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BHI, 37°C	+4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BHI, 37°C	+4
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BHI, 32°C	+3

^a -、No inhibition; +1, ≤10 mm; +2, 11 to 14 mm; +3, 15 to 17 mm; +4, ≥18mm
^b TSB, Tryptic soy broth

微生物	発育条件	阻止円径
<i>Aspergillus wentii</i> ATCC 1778	Czapek Dox	+2
<i>Apiotrichum curvatum</i>	Czapek Dox	+1
<i>Candida utilis</i>	Czapek Dox	+3
<i>Candida lipolytica</i>	Czapek Dox	+1 ^a
<i>Fusarium tricinctum</i>	Czapek Dox	+1
<i>Phialophora gregata</i>	Czapek Dox	+3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24702	TSB ^b	+1 ^a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TSB	+1 ^a
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Czapek Dox	+3
<i>Scopulariopsis</i> sp.	Czapek Dox	+3
<i>Trichoderma reesei</i>	Czapek Dox	+3

^a すべての培地は32°Cに保つ

認め、夫々分子量は150,000以上、約10,000であった。更にこの試料をsodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel電気泳動によってこの2つの蛋白会合体を再溶解した結果、10,000の分子量をもつ蛋白質の存在を確認した。その後Hsiehら(1996)³⁹⁾はpropionicin PLG-1の検定法並びに生産条件を検討した。その結果、次に示す7種の培地について生産性を比較して、最高の生産はビート糖蜜：コーンステープリカー(3:1)で得られ、乳酸ナトリウムブローに比べて5倍の生産量が得られている。

併しながらこのバクテリオシンの生産性は、lactococcin 140~15400AU/ml、Pediocin AcH 36000AU/mlに比べて甚だ低い収量(14日培養で約3AU/ml)であった。

Lavermicocraら(2000)⁴⁰⁾は*Lactobacillus plantarum* 21Bを小麦粉加水分解液を用いて培養し、その濾液の10倍濃縮液を用いて、*Eurotium repens*, *E. rubrum*, *P. corylophilum*, *P. roqueforti*, *P. expansum*, *Endomyces*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Fusarium*に対する阻害活性を検討した。その結果をプロピオン酸カルシウム、安息香酸ナトリウム3mg/mlと比較して表7に示している。すべてのかびに対するMICは50mg/mlであったが、*P. roqueforti*, *P. corylophilum*に対しては166mg/mlであった。この濾液の活性本態はphenyl lactic acid, 4-hydroxy phenyl lactic acidと同定している。

表7 *Lactobacillus* sp*の抗かび活性

菌種	阻害%					
	1	2	Lact. plantarum 20B	Lact. lactis subsp. lactis 21B	L. citreum	
<i>A.niger</i>	6	100	69	98.5	31	97.5
<i>A.flavus</i>	15	100	55	86.5	18	35
<i>Eur.rubrum</i>	0	70	99.5	99.7	97	98
<i>E.repens</i>	22.6	75	100	100	15.9	25
<i>Endomyces fibriga</i>	13.2	37	100	100	26.8	60
<i>P.corylophilum</i>	15.6	68	100	100	20	15
<i>P.roqueforti</i>	0	99	80	86	0	0
<i>Monilia sitophils</i>	23.5	100	100	100	87	100

1: プロピオン酸カルシウム 3m / p

2: 安息香酸ナトリウム 3m / p

*培養濾液

Magnusson及びSchnurer(2001)⁴¹⁾は*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* S13が抗真菌性蛋白様物質を生産することを認めた。このものは表8に示したように*A.fumigatus*, *A.nidurans*, *P.roqueforti*, *Mucor hiemalis*, *Talaromyces flavus*, *Fusarium poae*, *F.graminearum*, *F.culmorum*, *F.sporotrichoides*に対して強く作用したが、*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Sacch. cerevisiae*に対しての作用は弱かった。液体培養では図6に示したように抗かび活性は増殖と併行して生成し、定常期で最高に達したが48h後には急速に低下した。しかし

表8 *L.coryniformis* subsp. *coryniformis* S13の抗菌スペクトル

菌 株	抗菌活性	
	25°C	30°C
Molds		
<i>Aspergillus fumigatus</i> J9	+++	+++
<i>Aspergillus nidulans</i> J10	+++	++
<i>Penicillium commune</i> J238	++	++
<i>Penicillium roqueforti</i> J229	+	+
<i>Mucor hiemalis</i> J42	-	++
<i>Talaromyces flavus</i> J37	+++	++
<i>Fusarium poae</i> J24	+++	+++
<i>Fusarium graminearum</i> J114	+++	+++
<i>Fusarium culmorum</i> J300	+++	+++
<i>Fusarium sporotrichoides</i> J319	+++	+++
Yeasts		
<i>Rhodotorula glutinis</i> J195	-	ND
<i>Sporobolomyces roseus</i> J104	-	ND
<i>Pichia anomala</i> J121	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> J136	++	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> J187	+	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> J107	-	-
<i>Saccharomyces cerevisias</i> J122	-	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> J186	+	+

ND: 未測定

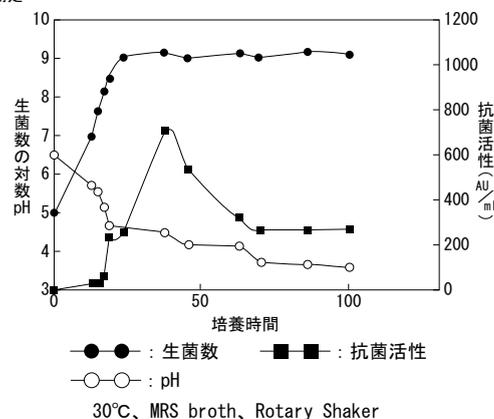


図6 *L.coryniformis*の培養経過

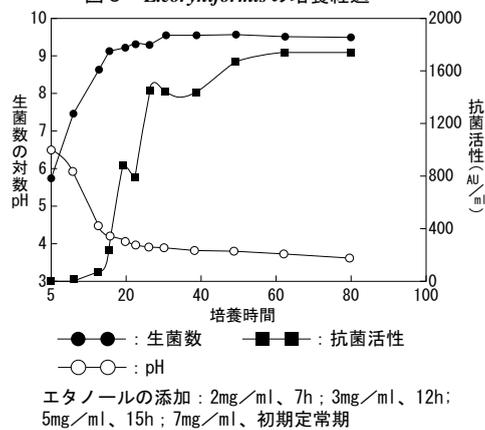


図7 エタノール添加効果

図7に示したようにエタノールの添加によりこの低下は抑制され更に活性は上昇した。この抗真菌活性は121°C、15分の加熱に耐え、最大活性はpH 3~4.5で認められたが、pH 4.5以上になると速やかに低下し、proteinase K, trypsin, pepsinにより不活性化された。培養液はイオン交換クロマトグラフィー、硫酸沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製された。活性物質の分子量は約3kDaであった。

Okkerら(1999)⁴²⁾は*Lactobacillus pentosus*より*Candida albicans*に活性を示すペプチドを分離している。

Stromら(2002)⁴³⁾は*Lactobacillus plantarum* M. LAB393が抗真菌性の2種のCyclopeptideと3-phenyl lactic acidを生産することを見出している。培養濾液の抗菌スペクトルを表9に示したが、*Aspergillum*, *Penicillium*, *Candida*などの酵母の発育を阻害した。*P.roqueforti*, *A.fumigatus*に対するMICは、Cyclo (L-Phe-L-Pro)で20mg/ml, phenyl lactic acidで7.5mg/mlであった。この二者の併用による相乗効果は少なかった。かびは*F.sporotrichoides*, *A.fumigatus*、酵

