

[J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 2, p. 93~99, 1972]

微生物の加熱損傷に対する薬剤併用効果について

(第 1 報) *Candida utilis* の加熱損傷とその回復土戸 哲明^{a)}・中川 良勝^{b)}・岡崎 光雄^{c)}・芝崎 勲

(大阪大学工学部醸酵工学教室)

Synergistic Effect of Different Chemicals on the Thermal Injury of Microorganisms

(I) Thermal Injury and Repair of *Candida utilis*

Tetsuaki Tsuchido, Yoshikatsu Nakagawa, Mitsuo Okazaki, and Isao, Shibasaki

(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Osaka University, Suita, Osaka)

This study was undertaken to investigate the thermal injury and repair of *Candida utilis* in order to elucidate the mechanism of the effect of antimicrobial substances during thermal treatment of microorganisms. These substances increased the damaging effect of heat treatment. The leakage of 260 m μ absorbing substances and others from heated cells increased with increasing temperature.

These results suggested that the damage to the cell membrane and degradation of ribonucleic acid took place within the heat-treated cells, but the amount of leakage of 260 m μ absorbing substances was not proportional to the loss of viability of the cells.

After sub-lethal heat treatment at 45°C for 15 minutes, more than 90% of the viable cells were unable to reproduce on modified Czapek-Dox's medium with 7% sodium chloride added. When these heat-treated cells were placed in the culture medium, phosphate buffer or distilled water, they were observed to recover their salt tolerance within a short time.

The time course of macromolecular synthesis in the heated cells and the effect of 8-azaadenine and cycloheximide during the recovery of thermally injured cells were also investigated; the results obtained suggested that the resynthesis of ribonucleic acid and protein seemed to be essential for the repair of thermally injured cells.

緒 論

微生物の加熱殺菌において、薬剤の共存によって殺菌効果が向上する現象は数多く認められている。¹⁻³⁾

しかしその作用機構についての研究はほとんどなく、わずかに抗生物質であるサブチリン、ナイシンについての研究が見出されるにすぎない。^{4,5)}

著者の一人芝崎はすでに薬剤として食品防腐剤の内でも最も広範囲にわたって利用されているソルビン酸を取りあげ、これが酵母の加熱損傷に対する併用効果ならびにこれによぼす諸因子の影響について検討した結果を報告した。⁶⁾

薬剤の併用効果の検討にあたっては、微生物の加熱

- a) サントリー株式会社山崎工場 (大阪府三島郡島本町山崎)
- b) カルピス食品工業株式会社研究所 (東京都渋谷区恵比寿南)
- c) 大阪大学薬学部製薬化学科 (豊中市刀根山)

損傷と薬剤自体の作用機構の両面からの研究が必要であるが、前者について *C. utilis* を供試して検討したところ、*Staphylococcus aureus*,⁷⁾ *Streptococcus faecalis*,⁸⁾ *Salmonella typhimurium*^{9,10,11)} などと得られている知見と比較して興味ある結果を得たのでここにその概要を報告する。

実験方法

1. 供試菌株および薬剤 供試菌としては教室保存の *C. utilis* を用い、加熱損傷回復の阻害剤としては、シクロヘキシイミド (半井化学薬品)、8-アザアデニン、DL-5-フルオロトリプトファン (Sigma Chemicals)、クロラムフェニコール (三共)、5-メチルトリプトファン (半井化学薬品) を用いた。
2. 加熱処理条件 *C. utilis* の培養には Czapek-Dox 培地にポリペプトンおよび酵母エキスをそれぞれ0.25%添加した培地 (以下 CPY と略称する) を用いた。この寒天培地で30℃、2日間培養した細胞を前培養培地20 mlを含む100 ml容マイヤーフラスコに一白金耳接種し、30℃で16時間あるいは20時間振盪培養した。得られた細胞は3000 rpm、5分間遠心分離し、生理的食塩水で2回洗滌後、同食塩水に懸濁させた。pH 4.0のM/10リン酸緩衝液99 mlを含む300 ml容マイヤーフラスコをあらかじめ所定の温度に加熱し、これに上記のごとく調製した細胞浮游液を1 ml

加え、一定時間ごとに試料を採取し、生菌数を測定した。生菌数測定には CPY 寒天培地を用い、30℃、2日培養後の生成コロニー数より生菌数を算出した。

3. 細胞内成分の漏えい 加熱による細胞内成分の漏えいは次の方法によって定量した。すなわち加熱処理試料を一定時間ごとに5 ml づつ遠心分離管に採取し、3000 rpm、10分間遠心分離し、その上澄液について、260 m μ 吸収物質、オルシノール法による RNA 様物質,¹²⁾ アンスロン法による全糖¹³⁾ を定量した。

4. 加熱損傷細胞の回復 加熱損傷細胞の回復実験には、30℃、16時間培養した細胞をただちに20 mlの新鮮培地に10%接種し、660 m μ での吸光度 (OD_{660m μ}) が2ないし3に到達した細胞を採り加熱処理した。そしてこれをM/10リン酸緩衝液またはCPY培地、SIC培地 (ショ糖5, KH₂PO₄ 0.1, KCl 0.05, MgSO₄ 0.05, カザアミノ酸1%, pH 5.5) に浮游させ、適温で静置あるいは振盪し、経時的に試料を採取し、CPY 寒天培地およびこれに食塩7%添加した寒天培地を用いて、30℃、4～5日後の生成コロニー数より生菌数を算出した。加熱損傷回復に対する阻害剤の影響は、濃厚な濾過除菌した阻害剤水溶液をつくっておき、所定濃度となるように回復用培地あるいは生菌数測定培地に添加した。

5. 細胞内高分子物質の合成とその分画 損傷細胞の回復期間中における細胞内高分子物質の合成経過

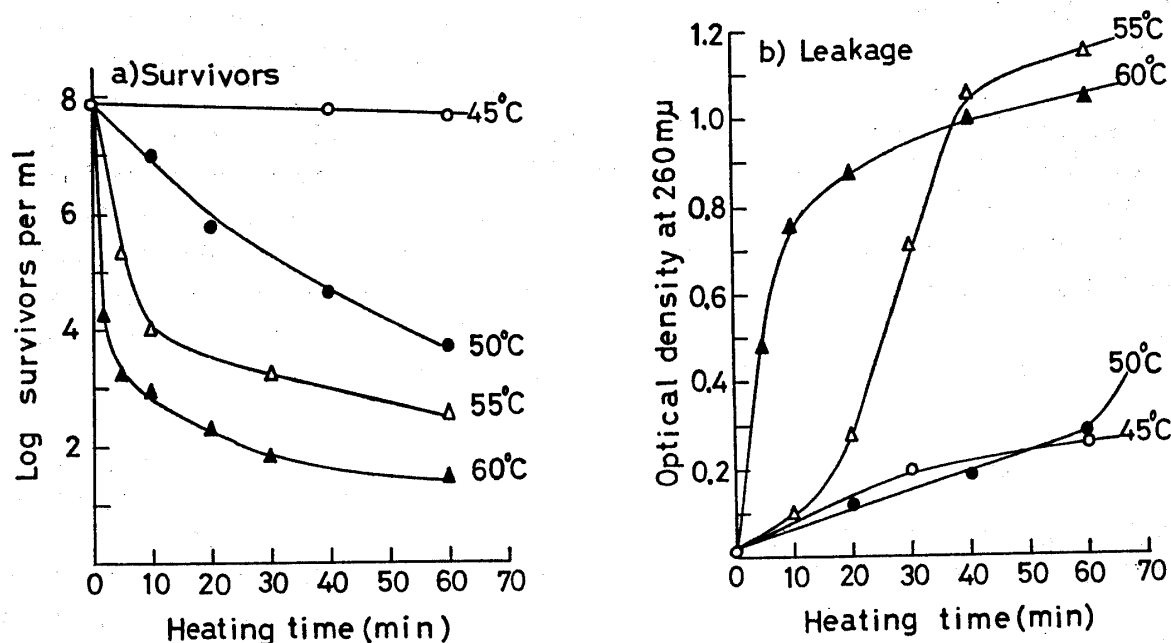


Fig. 1. Effect of temperature on the viability of and leakage of 260 m μ absorbing materials from *C. utilis* cells.

The cells were heated in M/10 phosphate buffer at pH 4.0, plate-counted on Czapek-Dox's medium + polypeptone 0.25% + yeast extract 0.25% (CPY).

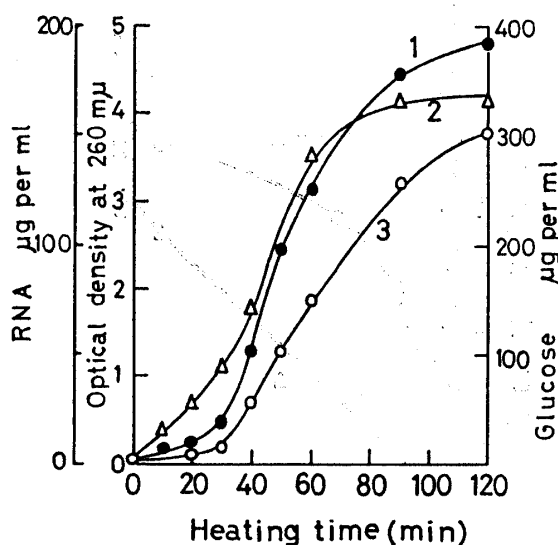


Fig. 2. Leakage of 260 m μ absorbing materials, orcinol reaction positive materials, and total carbohydrate from heated cells in M/10 phosphate buffer (pH 4.0) at 55°C.

- 1: RNA 2: carbohydrate (as glucose)
3: 260 m μ absorbing materials

を, ^{14}C -アデニン (2 μCi /培養) の核酸区分への取り込み, ^{14}C -クロレアラミノ酸 (4 μCi /培養) の蛋白区分への取り込みによって調べた。 ^{14}C -アデニンの場合は Czapek-Dox 培地+酵母エキス0.1%, ^{14}C -アミノ酸のときは Czapek-Dox 培地+添ザアミノ酸0.4%添加培地を用いた。RNA, DNA および蛋白区分の分画は Schmidt-Thanhauser-Schneider の方法¹⁴⁾に準じて行なった。そして分画した各区分の試料0.2 ml をエタノール3 ml と共にバイルに入れ, Nuclear-Chicago製の液体シンチレーションカウンターを用いて放射能を測定した。

実験結果

1. 加熱処理と細胞成分の漏えい 供試した *C. utilis* は50°C以上の加熱処理によって急激に生菌数の低下をきたすが, その死滅経過は Fig. 1a)のごとくであって, 加熱30分以降では著しく死滅速度が低下する傾向にあった。細胞の死滅と併行して処理細胞より漏えいしてくる物質量を検討した結果が Fig. 1b) および Fig. 2, 3 である。加熱温度が上昇するにつれて漏えいしてくる物質が増加してくるので, 加熱によって細胞膜損傷, RNA 分解のおこっていることが考えられるが, その経過は必ずしも死滅経過とは併行しているとはいえない。とくに50°Cにおいて生菌数は30分

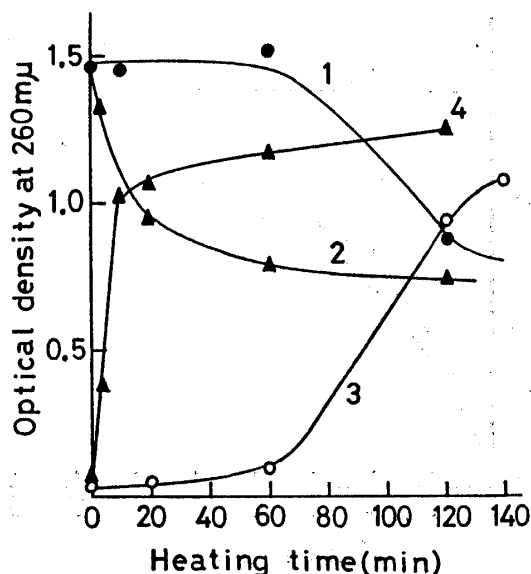


Fig. 3. Leakage and degradation of 260 m μ absorbing materials of the heated cells in M/10 phosphate buffer at pH 4.0.

- 1: remaining RNA in the heated cells at 50°C
2: remaining RNA in the heated cells at 60°C
3: RNA released from the heated cells at 50°C
4: RNA released from the heated cells at 60°C

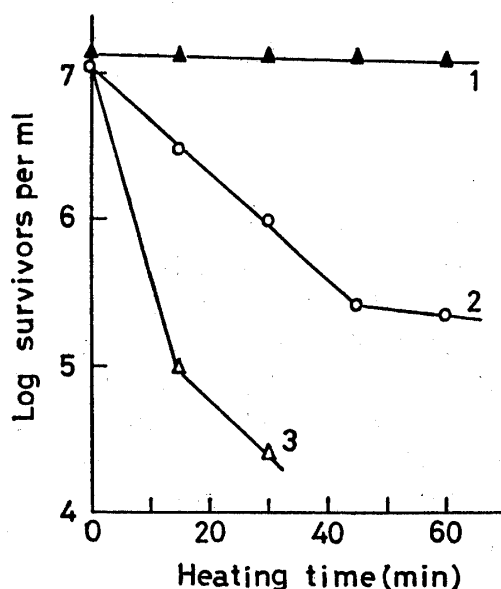


Fig. 4. Effect of sodium chloride on the survivors of *C. utilis* heated at 45°C in M/10 phosphate buffer at pH 4.0.

- 1: survivor curve plate-counted on CPY agar medium.
2: survivor curve plate-counted on CPY agar medium plus NaCl, 7% stationary phase cells used.
3: survivor curve plate-counted on CPY agar medium plus NaCl 7%, logarithmic phase cells used.

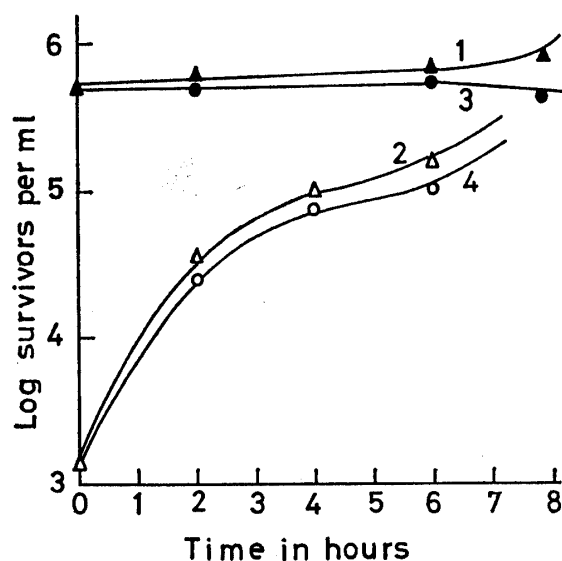


Fig. 5. Recovery of heat-injured cells incubated in CPY medium or M/10 phosphate buffer.

No.	Medium	
	for incubation	for plate-counts
1	CPY	CPY agar
2	CPY	CPY plus NaCl 7% agar
3	Phosphate buffer	CPY agar
4	Phosphate buffer	CPY plus NaCl 7% agar

程度の加熱で 10^{-3} 低下しているにもかかわらず、漏えい物質量はほとんど 45°C の場合とかわらない。Fig. 2の 55°C 処理での例をみても生菌数の低下の激しい時期(10~20分)にくらべてそれ以降の漏えい速度が著しく増加しているし、細胞内のRNAの漏えいの状態もFig. 3のようであって全く同じような傾向にある。

以上の実験結果より、加熱による細胞の損傷部位を決めることは困難であるが、加熱処理によって細胞膜の損傷およびRNAの分解の起きていることは明らかである。

2. 加熱処理による食塩耐性の低下 微生物細胞の加熱損傷を知る方法としては通常最少培地や選択培地を利用するが、無孢子細菌で利用されてきた食塩添加培地を試みた。その結果 *C. utilis* においても、Fig. 4に示したように加熱処理による食塩耐性の低下が認められ、 45°C の加熱処理によって、7%食塩添加CPY寒天培地上での生菌数は、15~30分で 10^{-1} ~ 10^{-2} あるいはそれ以下に低下することを認めた。すなわちこのような温和な加熱処理によっても、90%以上の細

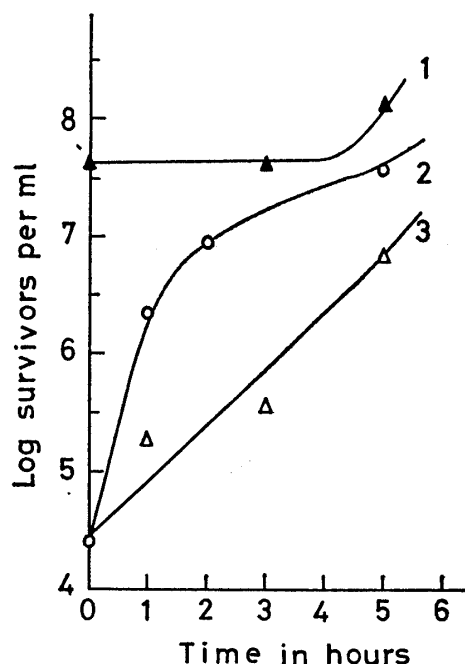


Fig. 6. Recovery of heat-injured cells incubated in CPY medium.

The cells were heated in CPY medium at 45°C for 15 min, incubated at 30°C in CPY medium.

- 1: plate-counted on CPY agar medium.
- 2: incubated with shaking, plate-counted on CPY agar medium plus NaCl 7%.
- 3: incubated without shaking, plate-counted on CPY agar medium plus NaCl 7%.

胞が加熱損傷を受け、食塩耐性が低下したことになる。

3. 加熱損傷の回復 上記のような加熱処理細胞の食塩耐性の低下は細胞齢によって大きく変動するが、以下の実験ではより低下率の大きい対数期の細胞を用いた。Fig. 5には、 45°C 、15分加熱処理することによって99%以上の細胞が7%食塩の存在によってコロニー形成能を失ったが、これをCPY培地あるいはM/10リン酸緩衝液に浮游させるとき、数時間で全く細胞の増殖なしに食塩耐性の回復する結果を示した。この回復は 0°C では全く起こらず、 30°C 付近の温度が最適であることを認め、さらにFig. 6に示したように静置するより振盪した方が速かに回復の起こることが明らかとなった。*Staph. aureus*, *Strept. faecalis* などでも同様に食塩耐性の回復することが報告されているが、⁷⁻¹¹⁾ *C. utilis* の場合にはCPY培地ばかりではなく、リン酸緩衝液だけでもほぼ同じ速度で回復が起きていることは注目すべき現象である。さらにまた別の実験では蒸留水だけでも同じように回復することも認めた。これは損傷細胞が細胞内プールよりの素材を

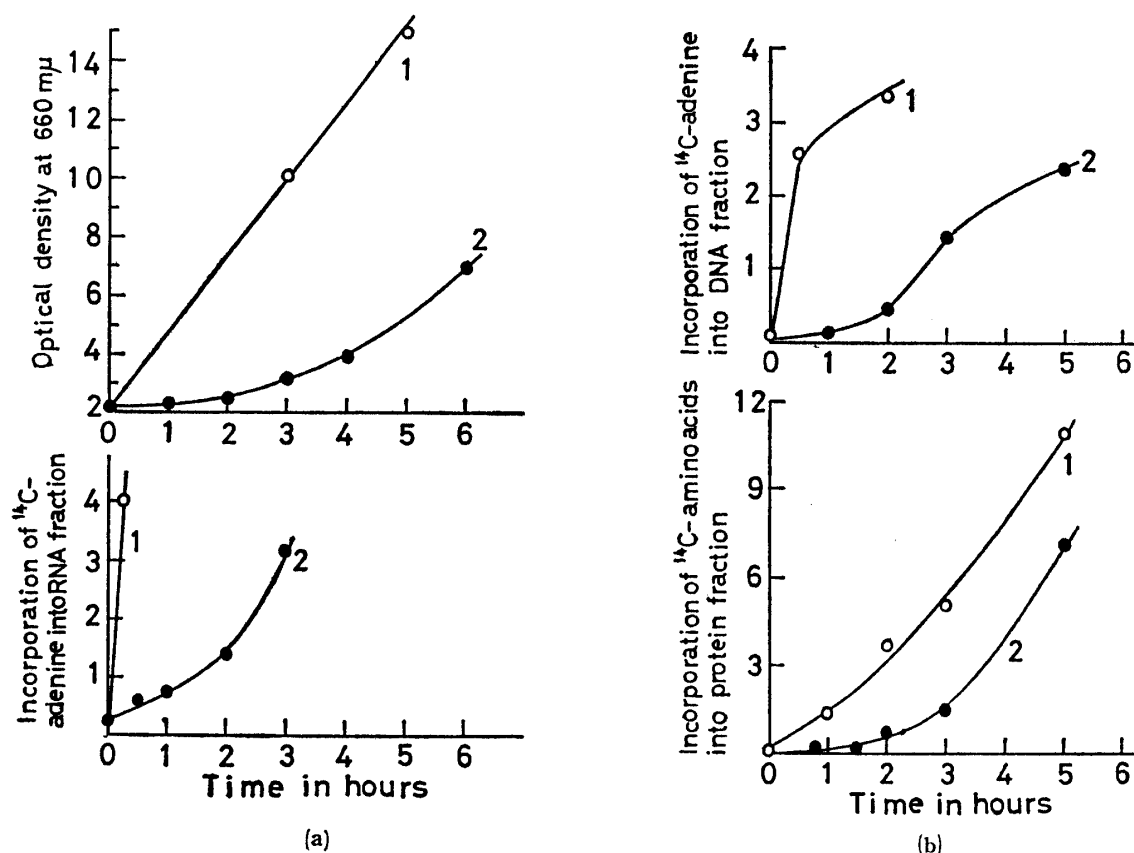


Fig. 7. The cells were heated in the following medium at 45°C for 15 min.

a) CPY medium

b, c) Czapek-Dox's medium+yeast extract 0.25%

d) Czapek-Dox's medium+yeast extract 0.25%+casamino acid 0.4%

The heat-treated cells in above medium were added ¹⁴C-adenine (2 μ Ci/culture) (b, c), or ¹⁴C-amino acid (4 μ Ci/culture) (d) and incubated at 30°C under shake condition.

1: unheated cells

2: heat-treated cells

用いて損傷部位を修復しているものと考えられ、このことは細胞を加熱前に3時間飢餓培養することによって回復の抑制されることから確認された。

4. 加熱損傷の回復機構 加熱損傷の回復機構を解明する目的をもってまづ、回復経過中の細胞内高分子

物質の合成経過について検討した。その結果が Fig. 7 であって、この実験条件のもとでは、RNA 合成が回復初期の段階で起こり、少しおくれて DNA 合成が開始せられ、蛋白合成は約3時間の誘導期の後に始まっており、OD_{660 mμ} で測定した増殖経過とはほぼ一致して

Table 1. Effect of 8-azaadenine and cycloheximide on the recovery of heat-injured cells.

Medium		Plate counts per ml after incubation for			
for incubation	for plate-counts	0	1	3	5 hr
CPY	SIC	1.5×10 ⁷	1.6×10 ⁷	—	1.7×10 ⁷
CPY	SIC+8 AA 0.3 mg/ml	—	1.3×10 ⁵	9×10 ⁵	8.5×10 ⁶
CPY	SIC+8 AA 0.2 mg/ml	—	8.0×10 ⁵	1.35×10 ⁶	1.1×10 ⁷
CPY	CPY	1.2×10 ⁷	1.2×10 ⁷	—	2.0×10 ⁷
CPY	CPY+CH 5 μg/ml	—	1.2×10 ⁶	7×10 ⁵	7.5×10 ⁵

SIC: sucrose, 5%; KH₂PO₄, 0.1%; KCl, 0.05%; MgSO₄, 0.05%; casamino acid, 1%; pH 5.5.

8AA: 8-azaadenine

CH: cycloheximide

いた。

加熱処理により細胞膜の損傷が予想されるので、クロラムフェニコール、5-メチルトリプトファン、5-フルオロトリプトアン（これらの薬剤は加熱処理しない *C. utilis* 細胞の増殖は阻害しない）を回復培地に 300 $\mu\text{g/ml}$ 添加したが、食塩耐性の回復には顕著な影響はなかった。8-アザアデニン (300 $\mu\text{g/ml}$) およびシクロヘキシミド (5 $\mu\text{g/ml}$) の添加実験では、後者によってかなり食塩耐性の回復が阻害されることを認めた。

一般に加熱処理によって薬剤感受性が大きくなるといわれているが、*C. utilis* の場合には、生菌数測定培地に8-アザアデニンやシクロヘキシミドを加えると、Table 1 に示したように、形成するコロニー数は 10^{-1} ないし 10^{-2} 低下したが、回復培地中での時間経過と共にその数は増加する傾向が認められた。しかし回復培地に8-アザアデニンが存在する場合 (200, 300 $\mu\text{g/ml}$)、生菌数測定培地にシクロヘキシミドを添加するとき、その濃度が 3 $\mu\text{g/ml}$ では生菌数の増加を示したが、5 $\mu\text{g/ml}$ では数時間処理後でも全く生菌数の増加は認められなかった (Fig. 8 参照)。

以上いまだ予備試験の域を出ないが、*C. utilis* の

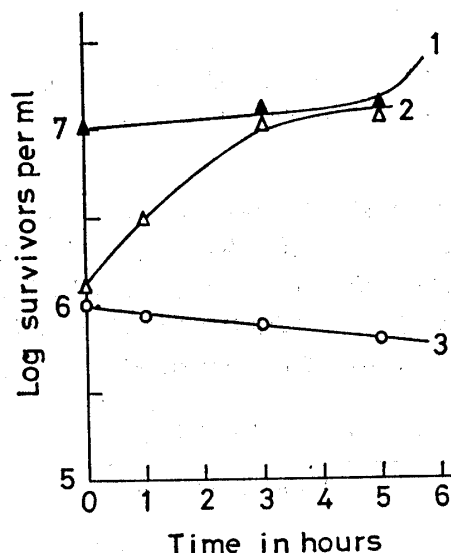


Fig. 8. Effect of cycloheximide and 8-azaadenine on the recovery of heat-injured cells.

The cells were heated in M/10 phosphate buffer at 45°C for 15 min and incubated in SIC medium plus 0.3 mg/ml of 8-azaadenine.

- 1: plate-counted on CPY agar medium.
- 2: plate-counted on CPY agar medium plus cycloheximide, 3 $\mu\text{g/ml}$.
- 3: plate-counted on CPY agar medium plus cycloheximide, 5 $\mu\text{g/ml}$.

加熱損傷すなわち食塩耐性および薬剤耐性の低下の回復には、蛋白合成が直接関与していることは確かであろうし、さらに RNA の分解、漏えい、8-アザアデニンの影響より核酸合成も何らかの形で関与していることが示唆される。

考 察

加熱殺菌における殺菌効果の増進のため、あるいはまた薬剤殺菌の効果を向上させる目的でより高温で、薬剤の利用が行われてきた。とくに前者の問題については、細菌孢子、無孢子細菌、かび、酵母を対象として、殺菌剤、防腐剤、抗生物質、その他種々の化学薬剤の共存のもとでの加熱殺菌効果が検討され、多くのものに併用効果のあることが確かめられた。¹⁻³⁾ しかしそれらの併用効果についての機構について検討された例はほとんど見出すことができない。この併用効果の詳細な研究は加熱殺菌の機構解明に役立つと共に、実用面においても多くの有用な知見が得られるものと考えられる。

本研究を進めるためにはまず微生物の加熱による損傷について検討しなければならない。無孢子細菌については1966年以来多くの知見が蓄積されてきたが、酵母についてはほとんどみるべきものはない。

加熱処理によって細胞より生理的に重要な成分が漏えいしてくることについては、*Staph. aureus*⁷⁾ の他に、*Escherichia coli*¹⁵⁾、低温性 *Vibrio*¹⁶⁾ 低温性 *C. nivalis*¹⁷⁾ について検討されていて、生菌数の低下と漏えいとがかなり併行的な例もあるが、死滅が先行して漏えいがはなはだしく遅れる例も多い。Fig. 1, 2, 3 より明らかなように *C. utilis* においては死滅速度の大きい加熱初期において、漏えいが比較的少ない結果がえられた。これらの点より加熱処理によって細胞膜の損傷はあるが、漏えいが直接死滅の原因と断定することはできない。むしろ漏えいが起こる以前に致命的な損傷をうけているものとするのが妥当であろう。

C. utilis の場合においても、45°C、15分というような温和な加熱処理により多数の細胞が損傷をうけていることが、生菌数測定培地に食塩を添加することによって明らかとなったが (Fig. 4)、これは *Staph. aureus*⁷⁾、*Strept. faecalis*^{8,9)}、*Sal. typhimurium*^{10,11)}、*E. coli** で認められている現象であって、少なくとも栄養細胞での加熱損傷の1つの共通的な現象であるといえる。この食塩耐性の回復については、

* 芝崎, 富永, 神田: 昭和46年度日本醸酵工学会大会講演

細菌の場合とは相異して, CPY 培地はもちろん, リン酸緩衝液あるいは蒸留水だけでの処理でも短時間に回復することを認めた. この事実は細胞内プールよりの素材が修復に貢献していることを示している. この回復は 0°C では行なわれないで, 30°C 付近が最適であり, 好気的な条件の方がより有効なことより, ある種の好気的な代謝によって損傷部位の修復が行なわれているものと考えられる. しかし *Penicillium expansum* の胞子で示されている事実とはことなり, リン酸緩衝液, CPY 培地でもかわりなく高率に回復する点は特異的である (かびの場合は栄養素の存在するときは回復は起こらないし, 全体としての回復率が少なく, 回復に要する時間も著しく長い).¹⁸⁾ 加熱損傷回復における細菌, 酵母, かびの相違点の詳細については今後さらに検討を要する課題である.

加熱損傷の回復機構に関する研究において, 食塩耐性の外, 化学薬剤の影響を検討することは興味深いことであるが, 本報告では予備的な研究として 2, 3 の阻害剤について検討した結果を示した. その結果, シクロヘキシミドによって食塩耐性の回復の阻害が起こることがわかり, 細胞内での蛋白合成がこの回復に関与していることを示唆している. 一方 Fig. 7 に示した結果より, RNA の合成が先行した後, DNA, 蛋白合成へと連結して増殖を開始していることより, RNA 合成も加熱損傷回復において重要な役割を演じていることが明らかである. さらに薬剤耐性の回復からも, すなわち 8-アザアデニンおよびシクロヘキシミドとの組み合わせ効果を示す結果からも, 蛋白合成および RNA 合成の関与についての推定をより確実にするものといえよう.

さらに加熱損傷としての食塩耐性と薬剤耐性の低下の機構を比較検討することも今後に残された興味ある問題と考えられる.

総 括

微生物の加熱損傷に対する薬剤の併用効果の機構を研究する目的で, まず *C. utilis* を供試してそれ自体の加熱損傷について検討を加えた.

1. 種々の温度条件のもとで処理するとき, 温度上昇と共に細胞内よりの 260 m μ 吸収物質などの漏えい量が増加し, 細胞膜損傷, RNA の分解の起きていることが認められた. しかし漏えい量とコロニー形成能の消失とは必ずしも併行的ではなかった.

2. 生菌数の低下のほとんどない温和な加熱条件 (例

えば 45°C, 15 分) によって, 食塩耐性の低下, 阻害剤の感受性の増大が認められた. この損傷細胞を発育培地, リン酸緩衝液あるいは水中に放置するとき短時間のうちに全生菌数の増加なしに回復することを示した.

3. この加熱損傷回復経過中での細胞内高分子物質の合成経過, 8-アザアデニンやシクロヘキシミドの影響を総合することによって, この回復には RNA 合成および蛋白合成が関与しているものと考えられる.

文 献

- 1) 芝崎: 食品殺菌工学, 22, 光琳書院 (1967).
- 2) 芝崎: 味噌の科学と技術, No. 193, 2 (1970).
- 3) 芝崎: 加工食品と食品衛生 (河端, 菅野編), 153, 新思潮社 (1970).
- 4) Campbell, L.L., Sniff, E.E.: *J. Bacteriol.*, **77**, 766 (1959).
- 5) Heinemann, B., Voris, L., Stumbo, C. R.: *Food Technol.*, **19**, 160 (1965).
- 6) 芝崎, 飯田: 食品工誌, **15**, 447 (1968).
- 7) Iandolo, J. J., Ordal, Z. J.: *J. Bacteriol.*, **91**, 134 (1966).
- 8) Clark, C. W., Witter, L. D., Ordal, Z. J.: *Applied Microbiol.*, **16**, 1764 (1968).
- 9) Clark, C. W., Ordal, Z. J.: *Applied Microbiol.*, **18**, 332 (1969).
- 10) Tomlins, R. I., Ordal, Z. J.: *J. Bacteriol.*, **105**, 512 (1971).
- 11) Pierson, M. D., Tomlins, R. I., Ordal, Z. J.: *J. Bacteriol.*, **105**, 1234 (1971).
- 12) Brown, A. H.: *Arch. Biochem.*, **11**, 269 (1946).
- 13) 阿武, 瀬野: 実験化学講座 (赤堀, 舟橋編), **23**, 371 (1957).
- 14) 渡辺, 三浦: 実験化学講座 (赤堀, 舟橋編), **23**, 283 (1957).
- 15) Russell, A. D., Harris, D.: *Applied Microbiol.*, **15**, 407 (1967).
- 16) Kenis, P. R., Morita, R. Y.: *Can. J. Microbiol.*, **14**, 1239 (1968).
- 17) Nash, C. H., Sinclair, N. A.: *Can. J. Microbiol.*, **14**, 691 (1968).
- 18) Baldy, R.W., Sommer, N. F., Buckley, P. M.: *J. Bacteriol.*, **102**, 514 (1970).

(昭46:12. 8 受付)