

シュガーエステルの抗菌作用—I

有芽胞菌に対するシュガーエステルの効果

池上 義昭・大田 智子

Antibacterial Activity of Sucrose Ester — I

Inhibitory Effect of Sucrose Ester on the Growth of Spore-forming Bacteria

Yoshiaki Ikegami and Tomoko Ohta

It is known that sucrose esters which have been used as emulsifiers in foods have inhibitory effects on the growth of microorganisms. Recently, it is reported the addition of sucrose esters effectively prevents the flat sour spoilage of canned coffee containing milk kept hot in vending machines.

In the present paper, the inhibitory effects of sucrose ester (P1670) was investigated against the spores of *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.polymyxa*, *B.coagulans*, *B.stearothermophilus*, *C.sporogenes*, *C.thermosaccharolyticum* and *C.pasteurianum* isolated from spoiled canned foods.

It was found that the spores of *B.subtilis* and *B.licheniformis* gave strong resistance to the sucrose ester. However, the sucrose ester gave a strong bacteriostatic activity on the spores of *B.stearothermophilus*, *C.pasteurianum* and *C.thermosaccharolyticum*. The minimum concentration of inhibiting the growth, germination and/or outgrowth of these spores was approximately 10 ppm.

シュガーエステルは学名をショ糖脂肪酸エステルと言い、天然であるショ糖と脂肪酸とで構成された無味、無臭の可食性界面活性剤で、体内で消化されて、ショ糖、脂肪酸として吸収されるので、環境汚染問題、薬害問題に対して心配なく、食品に無制限に使用出来る。従って、食品、医薬、化粧品、洗剤、繊維など幅広く利用されている。

しかし、本来の目的の他に細菌に対して抗菌作用があることがわかり¹⁾²⁾³⁾特にコーヒー缶詰などのフラットサワー変敗原因菌に効果があることが認められた。⁴⁾

そこで、他の缶詰変敗原因菌 (*Bacillus* 属の細菌10株、*Clostridium* 属の細菌3株) に対して、シュガーエステルがどの程度、抗菌作用を示すか、またその作用機構などを検討したので以下その結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

主に変敗缶詰より分離した以下の菌株について行った。

B.subtilis

武田薬品磷より分与 FO3025 (BS-1)

カレー袋詰より分離 (BS-2)

ぜんざいカップ詰より分離 (BS-3)

筍の水晒中より分離した筍崩壊菌 (BS-4)

B.licheniformis

プリン缶詰より分離 (BL-1)

スライスドハム缶詰より分離 (BL-2)

B. polymyxa

トマトジュース缶詰より分離 (BP-1)

B. coagulans

しめじ缶詰より分離 (BC-1)

グリーンピース缶詰より分離 (BC-2)

B. stearothermophilus

ココアドリンク缶詰より分離 (BS t-1)

C. pasteurianum

みつ豆缶詰より分離 (CP-1)

C. sporogenes

プロイラー袋詰より分離 (CS-1)

C. thermosaccharolyticum

人参ジュースより分離 (CT-1)

2. 供試シュガーエステル

シュガーエステルは、ショ糖と脂肪酸との結合比、また結合脂肪酸の割合などによって多種類であるが、強い親水性を示す三菱化成㈱のP1670を使用した。

P1670の結合脂肪酸はステリアン酸約30%、パルミチン酸約70%、エステル組成はモノエステル約75%、ジ・トリエステル約25%である。

3. 孢子形成条件

培地、培養温度、培養時間の条件は Table 1 に示す通りである。

液体培地については、培養後、遠心分離 (5000rpm, 20分) し、上澄み液を捨て、滅菌水を加えて洗浄後ふたたび遠心分離した。これを3回繰返し行ない最後にM/15の磷酸緩衝液 (pH 7.0) に孢子を懸濁し、80°C、10分加熱後冷蔵保存した。

固型培地の場合には、孢子塊を白金耳でかき取り、M/15の磷酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、80°C、10分加熱後、東洋口紙NO. 5 B で無菌口過し、これを冷蔵保存した。

Table 1. Sporulation of bacteria

表1

Bacteria	Media	Temp.	Days
<i>B. subtilis</i>	SMA + Mn	35° C	3
<i>B. licheniformis</i>	SMA + Mn	35° C	3
<i>B. polymyxa</i>	SMA + Mn	35° C	3
<i>B. coagulans</i>	SMA + Mn	55° C	6
<i>B. stearothermophilus</i>	TS + Mn	55° C	5
<i>C. pasteurianum</i>	NGT	30° C	12
<i>C. sporogenes</i>	PTG	35° C	12
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	TG	35° C	12

• SMA + Mn 培地

標準寒天培地 (日水製薬) に $MuSO_4$ を 0.005% 加えた。

- TS+Mn 培地
トリプトソーヤブイオン培地（日水製薬）に $MuSO_4$ を 0.005% 加えた。
- NGA 培地 (pH7.0)

ポリペプトン（大五栄養化学）	1 g
肉エキス（Difco）	0.5 g
グルコース	0.5 g
寒天末（Difco）	2 g
精製水	100ml
- PTG 培地 (pH7.8)

ポリペプトン（大五栄養化学）	5 g
トリプトン（Difco）	1 g
ゼラチン	1 g
グルコース	0.05 g
クエン酸ソーダ	0.3 g
チオグリコール酸ソーダ	0.05 g
精製水	100ml
- TPA_r 培地 (pH7.0)

トリプティケース（BBL）	1.7 g
フィトン（BBL）	0.3 g
食塩	0.25 g
L-シスチン	0.025 g
亜硫酸ソーダ	0.01 g
アラビノース	0.5 g
チオグリコール酸ソーダ	0.05 g
精製水	100ml

4. 抗菌作用力の測定

所定量のシュガーエステル（以下SEと呼ぶ）を含む培地を使用して、平板培養法及びMPN法で孢子数、菌数を測定した。

平板培養法は、BS-1、2、3、4、BL-1、2、BP-1、BC-2、BS_t-1についてSMA培地を使用し、BC-1はPPAA培地を使用し、SEの濃度と孢子数の関係を調べた。培養温度はBC-1、BC-2、BS_t-1は55°C、その他は35°Cで行った。CP-1、CT-1はYA培地を使用し、*Bacillus* 属の細菌と同様に行ない、嫌気培養によってSEの濃度と孢子数の関係を調べた。

MPN法では、所定量のSEを含むTG培地（BC-1、2、BS_t-1の場合）、TYG培地（CP-1、CS-1、CT-1の場合）に孢子を移植し、10段階希釈液の1mlをTDT管3本ずつ分注し、密封後、100°C10分（CP-1、CS-1は80°C、10分）加熱後、培養して増殖本数より孢子数を算出した。培養温度は平板培養法と同じである。

BC-1、2の栄養細胞に対するSEの抗菌力測定はTG培地に55°Cで6時間前後培養し、この培養液を生理食塩水で10段階希釈を行い、所定量のSEを含んだSMA培地で平板培養法で行った。また、上記培養液を所定量のSEを含んだTG培地で10段階希釈し、MPN法（1mlを小試験管に3本ずつ分注し、スクリュウキャップで乾燥を防止した）によって行った。また、殺菌作用力の測定はTG培地で55°Cで17時間前後培養した培養液1mlを所定量のSEを含んだTG培地、または生

理食塩水に懸濁し、所定温度で培養後の菌数をSMA培地で測定した。

- SMA培地
標準寒天培地（日水製薬）
- P P A A培地（pH5.0）

A：プロテオーゼ・ペプトン（D i f c o）	1 g
酵母エキス	1 g
グルコース	1 g
K H ₂ P O ₄	0.8 g
精製水	100ml

 pH5.0に調整

B：寒天末	4 g
精製水	100ml

 AとBを殺菌後混合する。
- Y A培地（pH7.0）

酵母エキス	1 g
K ₂ H P O ₄	0.2 g
可溶性デンプン	0.1 g
寒天末	2 g
精製水	100ml
- T Y G培地（pH7.0）

トリプトン（D i f c o）	2 g
酵母エキス	0.5 g
グルコース	0.5 g
B C P	0.002 g
精製水	100ml
- T G培地（pH7.0）

トリプトン（D i f c o）	1 g
グルコース	0.5 g
B C P	0.002 g
精製水	100ml

実験結果と考察

B.subtilis (BS-1、2、3、4)、*B.licheniformis* (BL-1、2)、*B.polymyxa* (BP-1)の胞子に対するSEの抗菌作用力をFig. 1に示した。この図より*B.subtilis*、*B.licheniformis*に対してはSE1000㎍でも効力がなく、*B.polymyxa*に対しては、強くはないが僅かに抗菌作用が認められた。

Fig. 2はフラットサワー菌である*B.coagulans* (BC-1、2)、*B.stearothermophilus* (BS-1)についてSMA培地、P P A A培地を使用して行った結果である。これらの細菌胞子に対しては、抗菌作用が認められた。SEが6㎍近くから抗菌作用を示し、胞子数を1/10に減ずるには、SEを約30%増加させる必要がある。この場合、BC-1についてはP P A A培地（pH5.0）を使用しているのでpHの影響も考えられる。

そこで、pH7.0のNG培地を使用してMPN法で行った結果をFig. 3に示した。BC-1に対

してはS Eの抗菌作用は弱いだが、他の2株に対してはやや強い抗菌作用が認められた。

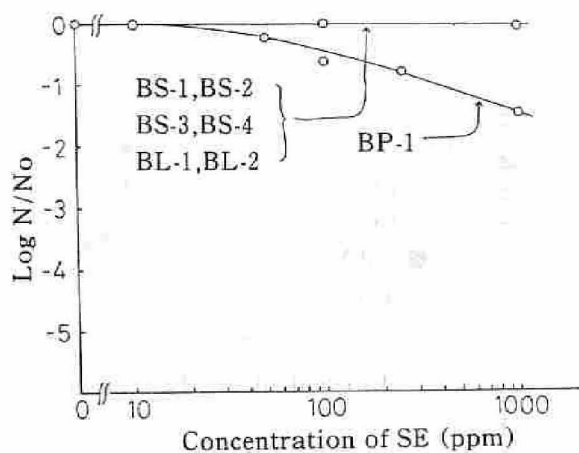


Fig.1 Inhibitory effect of sucrose ester (P1670) against *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. polymyxa* spores in SMA medium

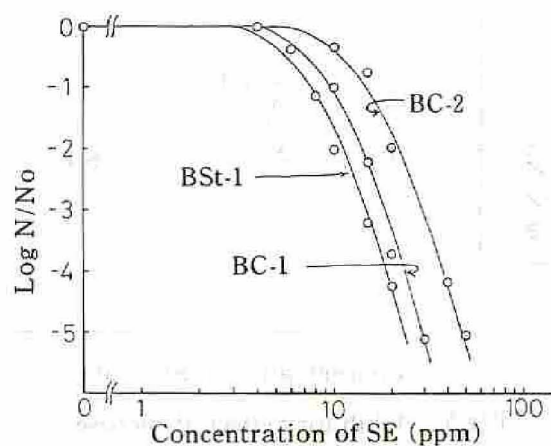


Fig.2 Inhibitory effect of sucrose ester (P1670) against *B. stearotherophilus* spores in SMA medium and *B. coagulans* spores in PPAA (pH 5.0) medium

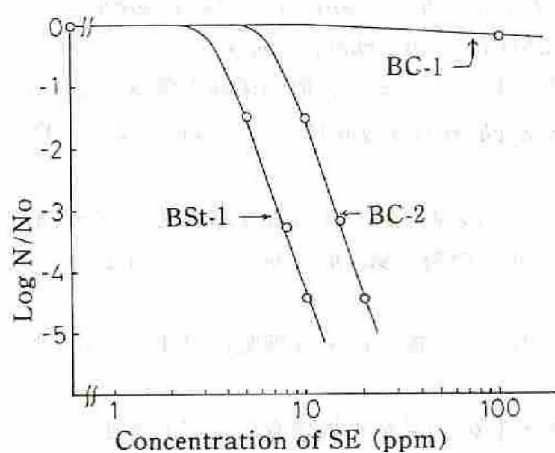


Fig.3 Inhibitory effect of sucrose ester (P1670) against *B. stearotherophilus* and *B. coagulans* spores in TG medium

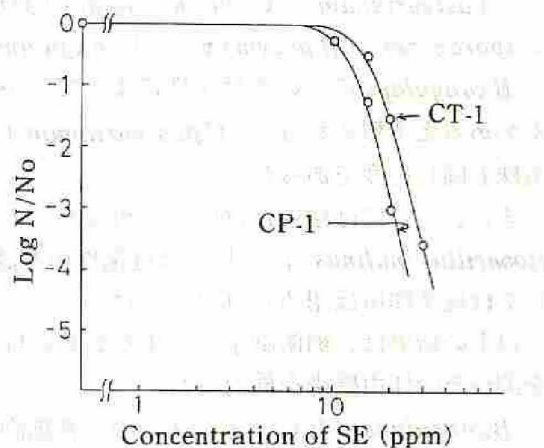


Fig.4 Inhibitory effect of sucrose ester (P1670) against *C. pasteurianum* and *C. thermosaccharolyticum* spores in YA medium

Fig. 4は *C. pasteurianum*, *C. thermosaccharolyticum* の胞子についてYA培地を使用して行った結果であるが、これらの菌種に対しては、SE約10ppmから抗菌作用を示すことが認められた。この場合も胞子を1/10に減ずるにはSEを約20%増加させる必要がある。

前記2菌種に *C. sporogenes* を加えた3菌種についてTYG培地でMPN法で行った結果を Fig. 5に示した。前記2菌種は効果が認められたが、*C. sporogenes* に対してはSEの抗菌作用力は弱いことが認められた。

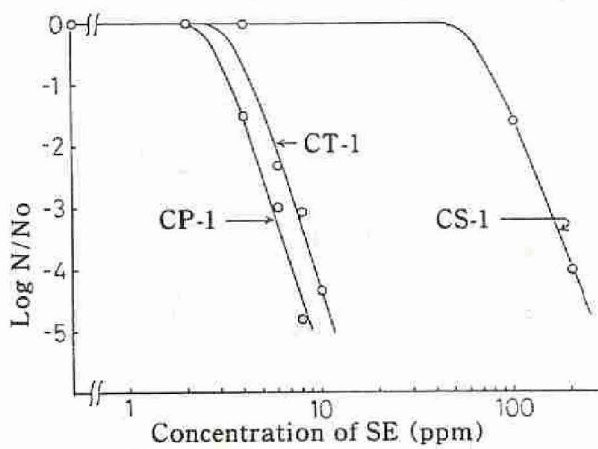


Fig.5 Inhibitory effect of sucrose ester (P1670) against *C.pasteurianum*, *C.sporogenes* and *C.thermosaccharolyticum* spores in TYG medium

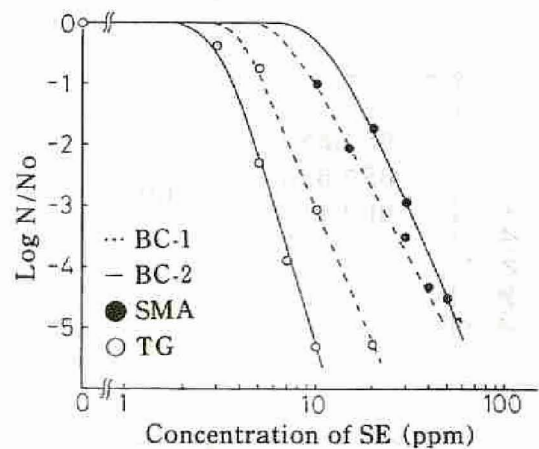


Fig.6 Inhibitory effect of sucrose ester (P1670) against vegetative cells of *B.coagulans* in SMA medium and TG medium

以上の結果、SEの抗菌作用力の強い順に菌種を並べると次のようになる。

C.pasteurianum > *C.thermosaccharolyticum* > *B.stearothermophilus* > *B.coagulans* > *C.sporogenes* > *B.polymyxa* > *B.coagulans* > *B.subtilis*, *B.licheniformis*

*B.coagulans*については菌株によって差があることがわかる。また、他の菌種も菌株によって差があると予想されるが、*C.pasteurianum*, *C.thermosaccharolyticum*については他の2、3株の菌株も同じ程度であった。

また、ここでは結果だけにとどめるが、みかん缶詰の変敗原因菌である有芽胞乳酸菌(*Sporolactobacillus inulinus*)に対しては抗菌作用が認められたが、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)に対しては抗菌作用は認められなかった。

以上の結果は、細菌胞子に対するSEの抗菌作用であるが、細菌の栄養細胞に対するSEの影響を調べその作用機構を検討した。

B.coagulans (BC-1、2)の栄養細胞に対するSEの効果を平板培養法とMPN法で行った結果をFig. 6に示した。MPN法で行った結果の方がSEの抗菌作用はやや強いことが認められた。BC-2に対しては胞子の場合と同じ程度の抗菌作用を示すが、BC-1では栄養細胞に対しての方が強い。

所定量のSEを含むTG培地にBC-1、2の栄養細胞を移植し、培養時間と生菌との関係をFig. 7、8に示した。2株ともに初期の段階で殺菌作用が認められ、時間の経過とともにその殺菌作用は弱くなる。しかし、SEが5ppm以下ではいったん減少した菌数はふたたび増加する。これは増殖可能な培地であるので、増殖不可能な生理食塩水で行った結果ではFig. 9に示すように、初期の段階で殺菌作用が速やかであるが、時間の経過とともに、その感受性は低下する。鏡検によっても1時間後より溶菌現象が観察された。また、ここでは結果だけにとどめるが、細菌胞子に対して抗菌作用を示さなかった*B.subtilis*の栄養細胞に対しても1000ppmで殺菌作用を示さなかった。

B.coagulans (BC-2)の胞子に対する殺菌作用を検討した結果、Fig. 10に示すように初期の段階でやや減少しているが、100ppmのSEであるにもかかわらず、その減少は少なく、その後はほ

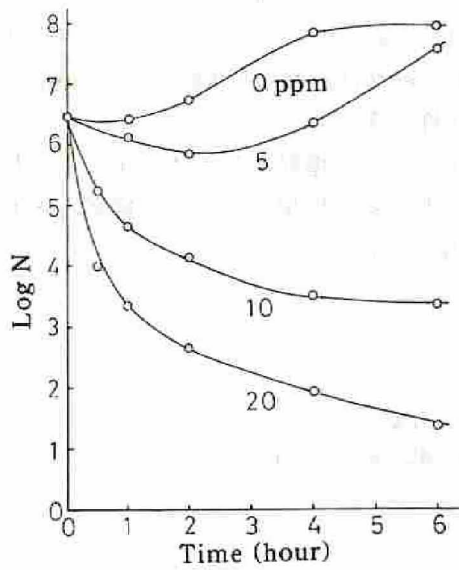


Fig. 7 Relationship between sucrose ester (P1670) and growth of *B.coagulans* (BC-1) in TG medium

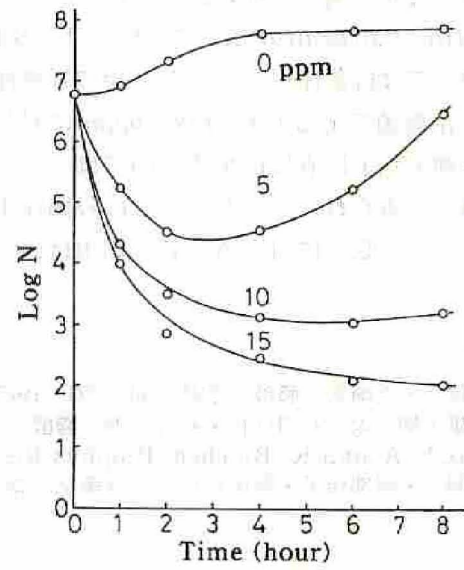


Fig. 8 Relationship between sucrose ester (P1670) and growth of *B.coagulans* (BC-2) in TG medium

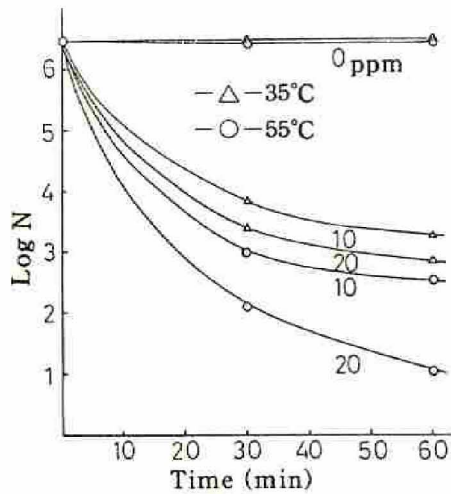


Fig. 9 Relationship between sucrose ester (P1670) and survivors of *B.coagulans* (BC-2) in physiological salt solution

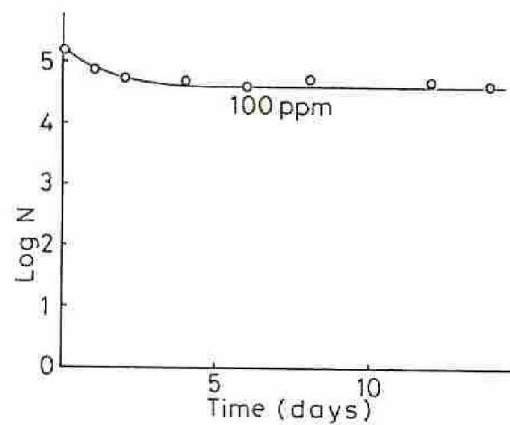


Fig. 10 Relationship between sucrose ester (1670) and survivors of *B.coagulans* (BC-2) spores in physiological salt solution

とんど一定であった。従って、SEは細菌胞子には直接作用せず、胞子の発芽後に作用するものと推定される。

要 約

缶詰の変敗原因菌、8種類、13株についてSEの抗菌作用及び作用機構を検討した。

B.subtilis, *B.licheniformis* に対しては、SE1000 μ では抗菌作用を示さなかったが、その他の菌種に対しては抗菌作用を示した。特に好熱性菌である *B.stearothermophilus*, *C.thermosaccharolyticum*, 酪酸菌である *C.pasteurianum* に対して強い抗菌作用を示した。

SEは細菌胞子に直接作用するのではなく、栄養細胞に作用し、増殖を阻止するよりも、むしろ殺菌作用が認められた。しかし、この殺菌作用も初期の段階で強く作用し、時間の経過とともに弱まる。従って、胞子に対するSEの作用は、発芽後に作用するものと思われる。

文 献

- 1) 加藤信行・芝崎勲：醸酵工学誌, 53, 793 (1975)
- 2) 谷喜雄・柳玄太・右田守良・福井三郎：醸酵工学誌, 39, 92 (1961)
- 3) Kato, A., Arima, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 596 (1971)
- 4) 中山昭彦・園部順子・新屋理恵子：食衛誌, 23, 25 (1982)