

好熱性細菌に対する乳化剤の抗菌作用

池上 義昭・中尾 まり・村山寿美江・後藤 隆子

Inhibitory Effects of Sucrose Esters and Polyglycerin Ester on the Germination and/or Outgrowth of Thermophilic Bacteria Spores

Yoshiaki Ikegami, Mari Nakao, Sumie Murayama and Takako Goto

Inhibitory effects of the commercial emulsifiers such as sucrose esters and polyglycerin ester of fatty acids on the germination and/or outgrowth of *C. thermaceticum* and *B. stearothermophilus* spores were investigated.

The sucrose ester (P-1570) gave a strong antibacterial activity against the spores of *C. thermaceticum*. On the other hand, the activity of polyglycerin ester (Q-16U) was approximately one-tenth of that of the sucrose esters. Against the spores of *B. stearothermophilus* the activity of the latter was approximately one-fortieth of the sucrose esters.

The antibacterial activity of these commercial emulsifiers were influenced in the presence of starch. In lowering the antibacterial activity of the sucrose esters, the presence of corn starch gave the strongest effect, while the antibacterial activity of polyglycerin ester was considerably decreased in the presence of wheat starch.

The relative efficiency of four kinds of sucrose esters (P-1570, P-1670, S-1670 and PS-1660) on the germination and/or outgrowth of *C. thermaceticum* (24-1) spores was studied, and it was found that these sucrose esters in the mTGC medium inhibited the growth of the spores at concentrations higher than 15 ppm. However, in the mTGC with the addition of 1 per cent skim milk, the minimal inhibitory concentration (MIC) of the sucrose esters was 75 ppm. In the canned milk coffee, the highest MIC of the four sucrose esters against the growth of the spores was 300 ppm.

約10年以上前からコーヒー缶詰、しるこ缶詰等の嗜好飲料がホットベンダーで加温販売されるようになり、それに伴い耐熱性の好熱性細菌による変敗が重要視されるようになって来た。缶詰を変敗される主な好熱性細菌として *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *C. thermosaccharolyticum*, *C. thermaceticum* *D. nigrificans* などがある。

これらの好熱性細菌中でコーヒー缶詰やしるこ缶詰で最も重要な細菌は *C. thermaceticum* であり、この細菌は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第7版¹⁾ には *C. thermoaceticum* として記載されていたが、第8版²⁾ では削除された。しかし、今度新たに出版された Bergey's Manual of Systematic Bacteriology³⁾ ではこの細菌が *C. thermaceticum* として記載されるようになった。

この細菌芽胞の耐熱性は非常に強く、120°CのD値が20以上であるので、この芽胞が缶内に存在していた場合には殺菌においてF値を100以上にしないと死滅させることは出来ない^{4,5,6)}。従って、殺菌以外でこの細菌の増殖を阻止しなければならない。そこで考えられるのが食品添加物である。しかし、殺菌料とか保存料は缶詰には使用出来ない。缶詰への使用が認められている或る種の乳化剤が抗菌作用を示すことが知られている^{6~9)}。

本報では、コーヒー缶詰やしるこ缶詰のフラットサワー様変敗の原因菌である *C. thermaceticum*

と *B. stearothermophilus* に対するショ糖脂肪酸エステル (SE) 及びポリグリセリン脂肪酸エステル (PGE) の抗菌作用について報告する。また、これらの乳化剤の抗菌作用に食品成分であるデンプンやミルクが阻害作用を示すことが知られているので^{10, 11)}、これらの阻害作用についても併せて報告する。

実験方法

1. 供試菌株

C. thermacetivum では変敗したコーヒー、しるこ、クリームシチュー缶詰より分離した3株 (24-1、H-1、S-1)、*B. stearothermophilus* では12980と BSt-1 の2菌株を使用した。

2. 供試乳化剤

使用した乳化剤は三菱化成食品㈱より提供された SE の P-1570、P-1670、S-1670、P S-1660 と太陽化学㈱より提供された PGE の Q-16U を使用した。使用した SE の組成を Table 1 に、Q-16U の分子構造を Fig. 1 に示した。Q-16U はデカグリセリンでエステルはモノパミネートである。

Table 1. Compositions of fatty acids and esters of sucrose esters

Sucrose ester	Fatty acid moieties		Esters	
	Palmitic	Stearic	Mono	Di&tri
P-1570	70%	30%	70%	30%
P-1670	70	30	75	25
S-1670	30	70	75	25
P S-1660	60	40	75	25

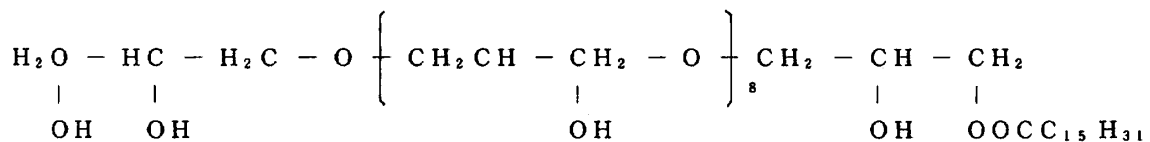


Fig. 1. Chemical structure of polyglycerin ester (Q-16U)

3. 使用したミルク、デンプン

乳化剤の抗菌作用に対する阻害物質として、ミルクは Bact Skim Milk (Difco) を使用した。

デンプンはトウモロコシデンプン、バレイショデンプン及び、小麦デンプンを使用した。これらは何れも和光純薬(株)の製品である。

また、化工デンプンは商品名マツノリン、ネオピス及び Purity 420A を使用した。

4. 抗菌作用力の測定法

C. thermacetivum の場合には乳化剤を所定量添加した変法 TGC 培地 (mTGC) を使用して MPN

法で芽胞数を測定した。*B. stearothermophilus* では乳化剤を所定量添加した PYG 培地を使用して MPN 法で芽胞数を測定した。尚、希釈液は寒天の入っていない同じ培地を使用した。

SE の種類による抗菌作用力の測定は SE を所定量添加した mTGC 培地に芽胞を 10^4 個接種し、 55°C で培養後、増殖の有無を観察した。いずれも芽胞接種後、流動パラフィン重層し 100°C で 10 分加熱した。

5. 抗菌性に及ぼす阻害作用力の測定法

乳化剤及びミルクやデンプンを所定量添加した培地に芽胞を 2×10^4 個接種し、 55°C で培養後、増殖可能な最大乳化剤量と増殖不可能な最小乳化剤量を測定した。

SE の種類による抗菌性に及ぼすミルクの阻害作用力の測定は SE 及びミルクを所定量添加した mTGC 培地に芽胞を 10^4 個接種し、 55°C で培養後、増殖の有無を観察した。いずれも芽胞接種後、流動パラフィン重層し 100°C 10 分加熱した。

6. ミルクコーヒー缶詰中における SE の抗菌性

下記に示す組成のもの 500kg をホモミキサーを使用して調合し、30kg を採取してその中に SE を 0、100、300、500ppm 添加し、さらにホモミキサーにかけた。そして $90^\circ\text{C} - 92^\circ\text{C}$ に加温後、缶 (J200AN₂P) に約 190g 充填し、1 缶当り *C. thermaceticum* (24-1) の芽胞を 10^5 個接種してから巻締した。冷却後レトルトで殺菌 ($F_0=30$) した。

チモトコーヒー	5 3 kg
砂糖	4 0 kg
ミルク (全脂、脱脂)	8 kg (各 4 kg)
重ソウ	0. 5 kg
フレーバー (I F F)	0. 5 kg
活性炭処理水	3 9 8 kg
(pH 6.8-6.9, Brix 8)	5 0 0 kg

55°C で 30 日貯蔵後、開缶、内容物の pH を測定し、pH が低下していたものは更に mTGC 培地に接種して変敗を確認した。

実験結果と考察

1. *C. thermaceticum* に対する SE の抗菌性

B. stearothermophilus や *C. thermosaccharolyticum* のような好熱性細菌に対して SE は強い抗菌作用を示すことが知られているが¹²⁾、*C. thermaceticum* に対してはどうか検討した結果を Fig. 2 に示した。縦軸に SE が 0ppm で測定したときの芽胞数 (N_0) に対するそれぞれの SE 濃度で測定したときの芽胞数 (N) の割合を対数で示し、横軸を SE 濃度 (ppm) とすると、2 株ともに 2、3 ppm 位から抗菌性を示した。この濃度以上になると、対数的に発芽及び増殖が抑制され、接種する芽胞数がたとえ多くても 10ppm 以下でほとんど増殖を阻止する。菌株による差は余りないようである。

この細菌に対する SE の抗菌作用に及ぼすデンプンの影響を Fig. 3、4 に示した。PS はバレイショデンプン、WS は小麦デンプン、CS はトウモロコシデンプンである。これらの図からデンプンが存在すると SE の抗菌作用を阻害することが分かる。これは他の菌種でも言えることである¹³⁾。

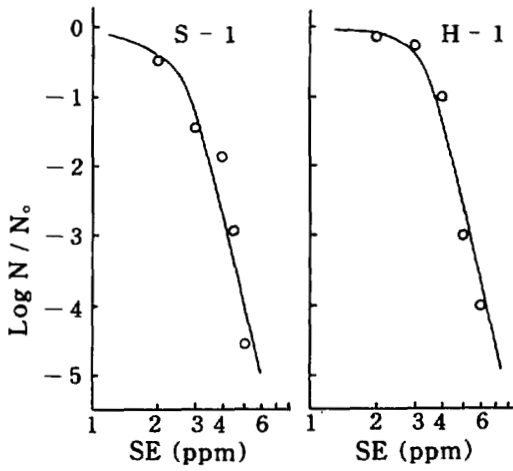


Fig. 2 Inhibitory effects of sucrose (P-1570) on the germination and/or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (H-1,S-1) in the mTGC medium

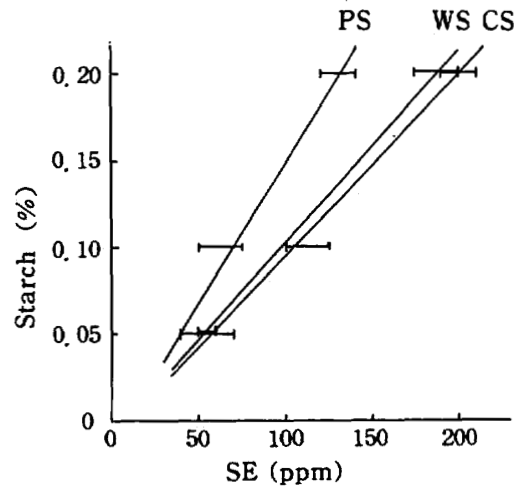


Fig. 3 The highest inhibitory concentration of sucrose ester (P-1570) on the germination and/or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (H-1) in the mTGC medium with the addition of starch
PS ; Potate starch CS : Corn starch
WS ; Wheat starch

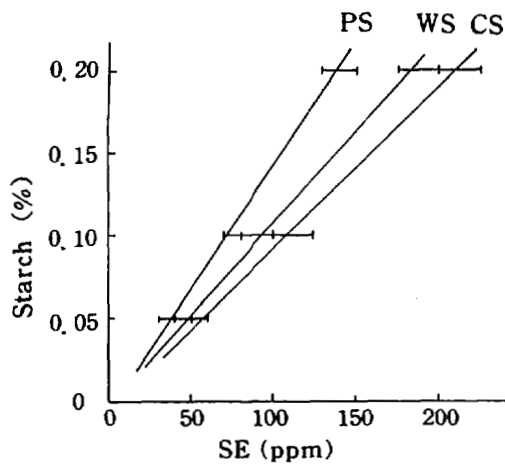


Fig. 4 The highest inhibitory concentration of sucrose ester (P-1570) on the germination and/or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (S-1) in the mTGC medium with the addition of starch

デンプンの量が多ければ多いほどその阻害作用は強く、トウモロコシデンプンではデンプンが0.1%存在すると SE を 100ppm 以上加えなくては抗菌作用を示さない。その阻害作用はデンプンの種類によって異なり、バレイショデンプン、小麦デンプン、トウモロコシデンプンの順に阻害作用は強くなる。

化工デンプンの影響を Fig. 5、6 に示した。N はネオビス、M はマツノリン、P は Purity 420A である。ネオビスは阻害作用が殆ど無く、マツノリンと Purity は小麦デンプンやトウモロコシデンプンと同じ程度に阻害する。しかし、Purity は 0.1% 以下では直線にならず湾曲するが、その原因は分からない。ネオビスが阻害作用を殆ど示さないのは、非 α 化デンプンであると思われる。SE がアミロース鎖のラセン構造に入って複合体を形成するので、アミロースが外に溶出し易い α 化デンプンは SE の抗菌作用を阻害し易くする。これらの阻害作用も菌株による差は殆ど無かった。

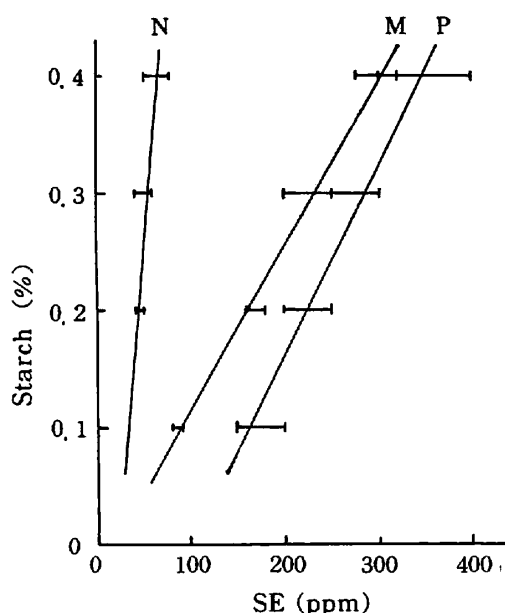


Fig. 5 The highest inhibitory concentration of sucrose ester (P-1570) on the germination and/or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (H-1) in the mTGC medium with the addition of modified Starch

N ; Neobis starch

M ; Matsunorin starch

P ; Purity starch 420A

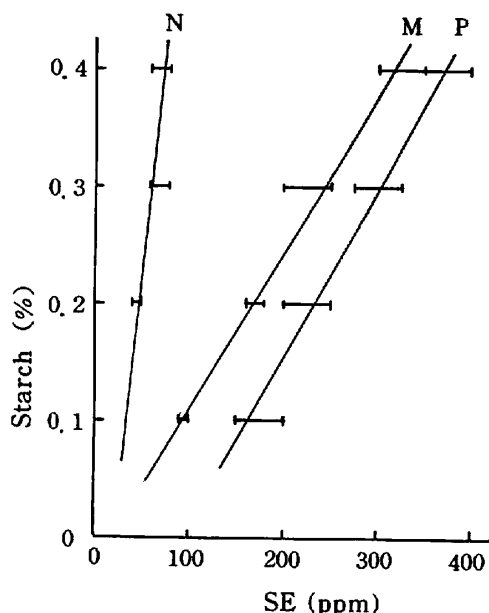


Fig. 6 The highest inhibitory concentration of sucrose ester (P-1570) on the germination and/or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (S-1) in the mTGC medium with the addition of modified starch

N ; Neobis starch

M ; Matsunorin starch

P ; Purity starch 420A

Fig. 7 はミルクの阻害作用を示した図である。ミルクもデンプンほどではないが阻害作用を示す。その阻害作用は菌株によって少し差があり、S-1 の株の方が少し阻害作用が強いようである。

4 種類の SE の抗菌作用を *C. thermacetikum* を用いて試験した結果を Table 2 に示した。菌株によって僅かに差があるが、15ppm 以上の SE では増殖を阻止し、SE の種類による抗菌作用力は P-1570、P S - 1660、S - 1670、P - 1670 の順に強くなる。しかし、それ程大きい差は無かった。尚、S - 570 のようにモノエステルが少ない SE の抗菌性について調べた結果、非常に弱い事が分かった。また、ショ糖ラウリン酸エステルである L - 1695 は P - 1670 や S - 1670 と同等の抗菌性を示した。

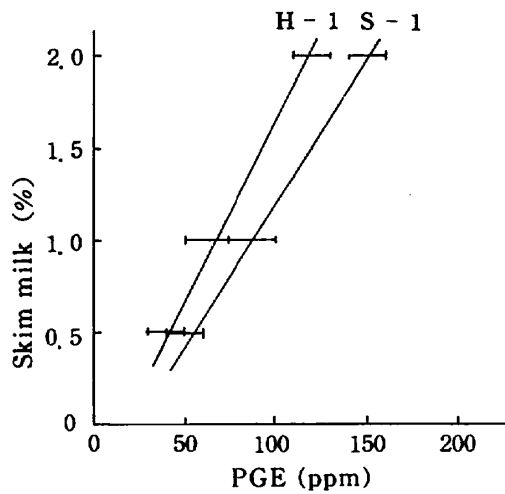


Fig. 7 The highest inhibitory concentration of sucrose ester (P-1570) on the germination and/or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (H-1, S-1) in the mTGC medium with the addition of skim milk

Table 2. Relation efficiency of the sucrose esters on the germination and / or outgrowth of *C. thermacetikum* spores in the mTGC medium

Sucrose ester	Concn. of sucrose ester	Strains		
		24-1	H-1	S-1
P-1560	7.5	++++	++++	++++
	10.0	++++	++++	++++
	12.5	+++-	----	++++
	15.0	----	----	----
P-1670	7.5	++++	++++	++++
	10.0	+---	----	++++
	12.5	----	----	----
	15.0	----	----	----
S-1670	7.5	++++	++++	++++
	10.0	+++-	----	++++
	12.5	----	----	----
	15.0	----	----	----
P S-1660	7.5	++++	++++	++++
	10.0	++++	+++-	++++
	12.5	----	----	----
	15.0	----	----	----

ミルクを1%加えた培地でのSEの抗菌性についての試験結果をTable 3に示した。菌株によって僅かに異なるが、75ppm以上のSEで増殖を阻止する。これはFig. 7からも言えることである。従って1%のミルクはSEの抗菌作用力を約1/5以下に減少させる。この場合のSEの種類による抗菌作用力の順位はP-1670> P S-1660> S-1670> P-1570であった。

Table 3. Relation efficiency of the sucrose esters on the germination and / or outgrowth of *C. thermacetium* spores in the mTGC medium with the addition of 1% skim milk

Sucrose ester	Concn. of sucrose ester	Strains		
		24-1	H-1	S-1
P-1570	25ppm	++++	++++	++++
	50	++++	++++	++++
	75	-----	-----	-----
P-1670	25	++++	++++	++++
	50	-----	-----	++++
	75	-----	-----	-----
S-1670	25	++++	++++	++++
	50	+---	++--	++++
	75	-----	-----	-----
P S-1660	25	++++	++++	++++
	50	+---	-----	++++
	75	-----	-----	-----

ミルクコーヒー缶詰中での4種類のSEの抗菌性についての試験結果をTable 4に示した。SE 300ppm以上添加した缶詰は変敗が認められなかった。100ppm添加した場合、P S-1660、P-1570、P-1670は60缶中3、4缶変敗があったが、S-1670は1缶も変敗しなかった。しかし、Table 2、3に示した結果から4種類のSEで大きな差があったとは思われない。尚、SEの添加がなく、芽胞を接種した区において変敗率が100%にならなかった。その原因を検討するため変敗しなかった缶詰の残存芽胞数を測定した。その結果、芽胞は生残っていたので、何らかの理由で増殖しなかったものと考えられる。

2. *B. stearothermophilus* に対する PGE の抗菌性

PGEもSEと同様で抗菌作用を示すことが報告されている¹⁴⁾。この細菌に対してのPGEの抗菌性をFig. 8に示した。どちらの菌株も100ppm以上から抗菌性を示す。この細菌に対するSEの抗菌性を前報¹²⁾で報告したが、SEでは数ppmから抗菌性を示すので、この細菌に対してはPGEの抗菌性はSEの40分の1以下で非常に弱かった。

Table 4. Inhibitory effects of the sucrose esters on the germination and / or outgrowth of *C. thermacet icum* (24-1) in canned milk coffee

Sucrose ester	Concn. of sucrose ester	Inoculation	Number of test cans	Number of spoiled cans
	0	-	58	0
	0	+	60	47
P-1570	100	+	60	3
	300	+	60	0
	500	+	60	0
P-1670	100	+	60	4
	300	+	60	0
	500	+	60	0
S-1670	100	+	60	0
	300	+	60	0
	500	+	60	0
P S-1660	100	+	60	4
	300	+	60	0
	500	+	60	0

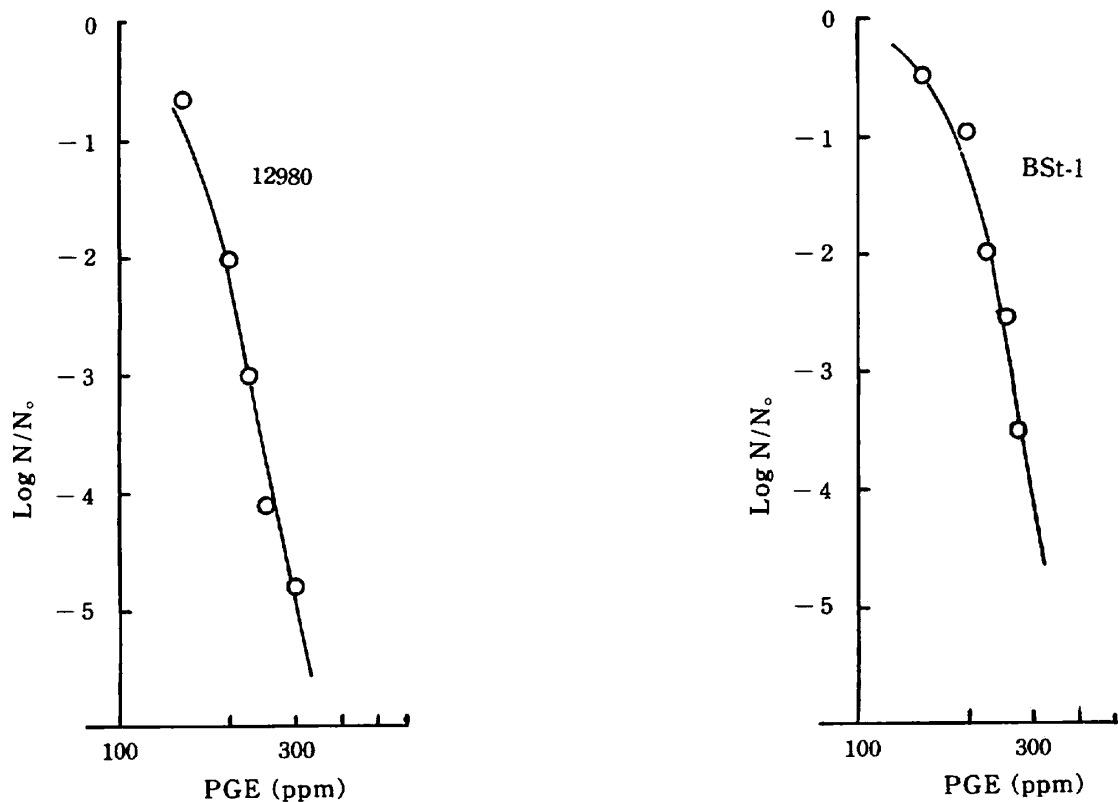


Fig. 8 Inhibitory effects of polyglycerin ester (Q-16U) on the germination and/or outgrowth of *B. stearothermophilus* spores (12980, BSt-1) in the mTGC medium

Fig. 9、10はPGEの抗菌作用にデンプンがどのように影響するかを示した図である。やはりデンプンはSEと同じようにPGEの抗菌作用に阻害することが分かる。この場合もデンプンの種類によって阻害作用力は異なり、パレイショデンプン、トウモロコシデンプン、小麦デンプンの順に阻害作用は強くなる。

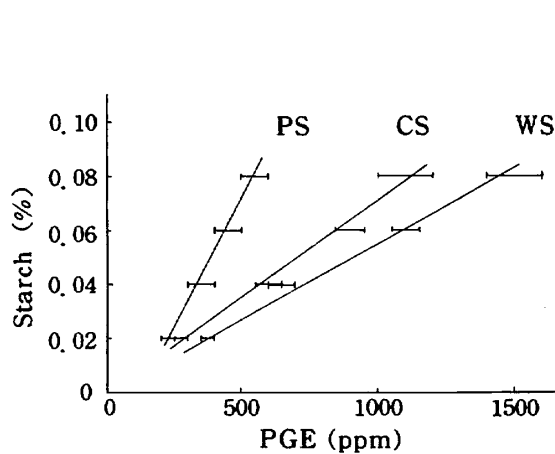


Fig. 9 The highest inhibitory concentration of polyglycerin ester (Q-16U) on the germination and / or outgrowth of *B. stearothermophilus* spores (12980) in the mTGC medium with the addition of starch
PS; Potate starch CS; Corn starch
WS; Wheat starch

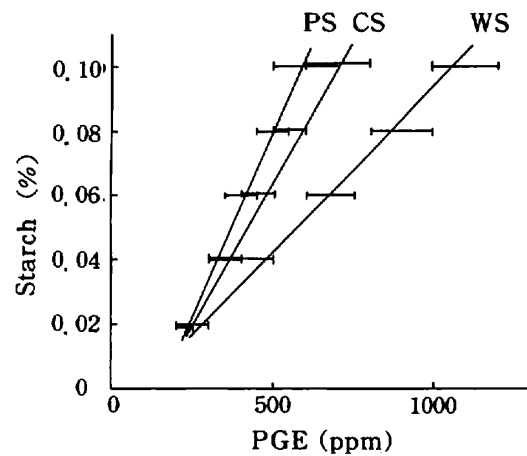


Fig. 10 The highest inhibitory concentration of polyglycerin ester (Q-16U) on the germination and / or outgrowth of *B. stearothermophilus* spores (BSt-1) in the mTGC medium with the addition of starch
PS; Potate starch CS; Corn starch
WS; Wheat starch

3. *C. thermaceticum* に対する PGE の抗菌性

Fig. 11はこの細菌に対するPGEの抗菌性を示した。どちらの菌株も20ppm以上から抗菌性を示す。SEの抗菌性はFig. 2に示したが、2、3 ppmから抗菌性を示すので、この細菌に対してはPGEの抗菌性はSEの10分の1であった。

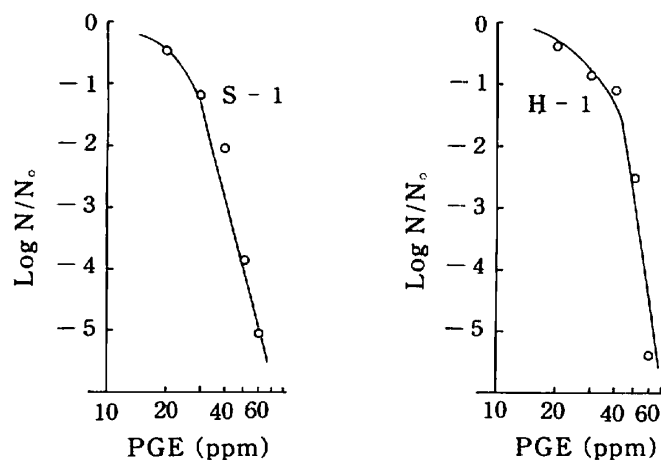


Fig. 11 Inhibitory effects of polyglycerin ester (Q-16U) on the germination and / or outgrowth of *C. thermaceticum* spores (S-1, H-1) in the mTGC medium

この細菌に対する PGE の抗菌性に及ぼすデンプンの影響を Fig. 12、13 に示した。どちらの菌株もデンプンは阻害作用を示し、菌株による差は無かった。デンプンの種類によって阻害作用力は異なり、バレイショデンプンは弱いがトウモロコシデンプンと小麦デンプンは同じ程度に強い阻害作用を示した。

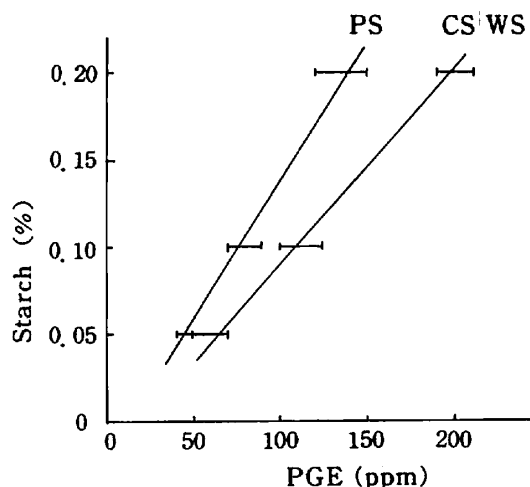


Fig. 12 The highest inhibitory concentration of polyglycerin ester (Q-16U) on the germination and / or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (H-1) in the mTGC medium with the addition of starch
PS ; Potate starch CS ; Corn starch
WS ; Wheat starch

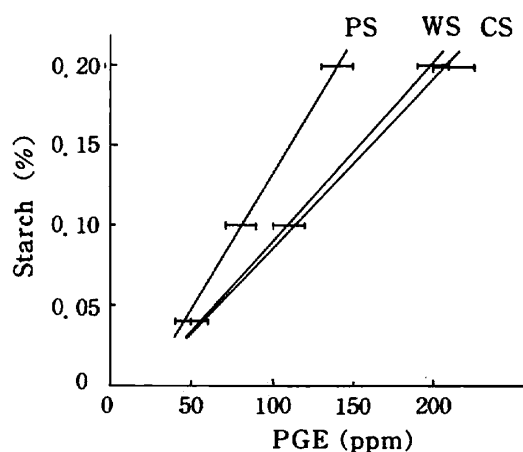


Fig. 13 The highest inhibitory concentration of polyglycerin ester (Q-16U) on the germination and / or outgrowth of *C. thermacetikum* spores (S-1) in the mTGC medium with the addition of starch
PS ; Potate starch CS ; Corn starch
WS ; Wheat starch

終わりに望み、試験缶詰製造を担当された東洋製罐株式会社技術部研究部の諸氏並びに試験材料として化工デンプンを提供されたキッコー食品株式会社に厚く感謝致します。

要 約

1. *C. thermacetikum* に対して SE は約 15ppm 以下で効果がある。
2. デンプンによってその抗菌作用は阻害され、SE ではバレイショデンプン、小麦デンプン、トウモロコシデンプンの順に阻害作用力は強く、PGE では小麦デンプンが最も強い阻害作用を示した。
3. 化工デンプンではネオピススターチは阻害力が弱い、その他は小麦デンプンやトウモロコシデンプンと同じように阻害される。
4. ミルクもデンプンよりは弱い阻害される。
5. 好熱性細菌に対する PGE の効果は SE に比べて10分の1以下である。
6. PGE もデンプンによってその抗菌作用を阻害される。
7. P - 1570、P - 1670、S - 1670、P S - 1660 の 4 種類の SE の抗菌作用にそれ程大きな差は無い。

文 献

- 1) Breed, R. S., Murray, E. G. D and Smith, N. R.: *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 7th Ed. The Williams and Wilkins, Baltimore (1957).
- 2) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. The Williams and Wilkins, Baltimore (1974).
- 3) Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G.: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Volum 2. The Williams and Wilkins, Baltimore (1986).
- 4) Nakayama, A. and Samo, S. : *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 46, 1117 (1980).
- 5) 松田典彦, 増田寛行, 駒木勝, 松本直起: *食衛誌*, 23, 480 (1982).
- 6) Donnelly, L. S. Busta, F. F. : *Appl. and Environ. Microbiol.* 40, 721 (1980).
- 7) 谷喜雄, 柳玄太, 石田守良, 福井三郎: *醸酵工学誌*, 39, 92 (1961).
- 8) Kato, A., Arima, K. : *Biochem. Biophys. Res. Commum.*, 42, 596 (1971).
- 9) 加藤信行, 芝崎勲: *醸酵工学誌*, 53, 793 (1975).
- 10) 中山昭彦, 園部順子, 新屋理恵子: *食衛誌*, 23, 25 (1982).
- 11) 諏訪信行, 久保山春美, 高橋和子, 町田肇: *食工誌*, 33 (1), 44 (1986).
- 12) 池上義昭, 大田智子: *本誌*, 16, 93 (1985).
- 13) 池上義昭, 大田智子: *本誌*, 16, 101 (1985).
- 14) 戸田義郎: *食品加工技術*, 6 (2), 59 (1986).