

高温性細菌 *Bacillus stearothermophilus* の増殖適性を 指標とした混合茶飲料缶詰の層別

中尾 浩, 遠田 昌人, 松井 智江, 吉本 周

Grouping of Canned Blend Tea Drinks according to Growth Aspects of Thermophilic Bacteria *Bacillus stearothermophilus*

Hiroshi Nakao, Atsuhito Enda, Tomoe Matsui and Itaru Yoshimoto

In recent years, the consumption of canned blend tea drinks has been increasing in Japan. During cold seasons they are served with hot vending machines. Under this situation a target organism to be controlled is *Bacillus stearothermophilus*, an extremely heat-resistant thermophile. Meanwhile the tea drinks are made from various raw materials, which are crops and crude drugs derived from plants. Thus, microbiological circumstances have to vary with different tea drinks. Therefore, it was supposed that the tea drinks could be grouped according to growth aspects of *B. stearothermophilus* in them. Then, as an indicator, *B. stearothermophilus* BLT, which had been isolated from a canned blend tea drink stored at high temperature was used. The spore suspension of BLT was inoculated to eight kinds of commercial canned blend tea drinks and incubated, and the populations were measured at intervals. The results indicated that the eight kinds fell into three types according to the tendencies of growth curves: a growth curve of increasing tendency, observed in five kinds of tea drinks; a growth curve of invariable tendency, observed in one kind of them; and a growth curve of decreasing tendency, observed in two kinds of them. It was considered that each type of canned blend tea drink would incline to be spoiled by thermophilic bacteria in order noted above.

Key words : blend tea, canned drink, thermophilic bacteria, *Bacillus stearothermophilus*, spoilage, grouping, growth, hot vending

近年、混合茶飲料缶詰の販売数の増加が認められる。一般に、多くの混合茶飲料缶詰において、緑茶、ウーロン茶など、抗菌活性を有する原料¹⁻⁴⁾が用いられるが、原料の種類、抽出条件、および抽出液の濃度は、混合茶飲料缶詰の種類により異なる。そのため、混合茶飲料缶詰の種類により、内容物の抗菌成分の種類および濃度、栄養条件、およびpHなど、微生物学的な環境条件に差違があると思われる。しかし、現在のところ、混合茶飲料缶詰は、全て同一の範疇に概括されており、微生物学的な見地による層別は行われていない。

一方、混合茶飲料缶詰における微生物問題を考えると、殺菌条件を律する微生物は、加温販売時に想定される高温性細菌 *Bacillus stearothermophilus* である。そこで、本試験において、高温保存の混合茶飲料缶詰から分離された高温性細菌 *B. stearothermophilus* BLT を用い、混合茶飲

料缶詰に対する菌株 BLT の増殖適性の差違を指標とし、混合茶飲料缶詰を層別することを目的とした。

そのため、8種の市販混合茶飲料缶詰の内容物にそれぞれ分離菌 BLT を接種、培養し、経時的に菌数を測定し、得られた増殖曲線の傾向より、混合茶飲料缶詰種の層別を行ったので報告する。

実験方法

1. 使用菌株

予め調製した、高温性細菌 *Bacillus stearothermophilus* BLT の孢子懸濁液 4.6×10^7 CFU/ml を使用した。菌株 BLT は高温保存の混合茶飲料缶詰から分離された。

2. 試料

350ml 容量の 8 種の市販混合茶飲料缶詰 A～H の内容物を、 $0.80 \mu\text{m}$ 次いで $0.45 \mu\text{m}$ のメンブロンフィルタにて除菌し、試料とした。試料の pH および糖濃度を Table 1 に記した。

3. 増殖適性試験

予め調製し、 5°C にて保存した *B. stearothermophilus* BLT の孢子懸濁液 4.6×10^7 CFU/ml を無菌的に採取し、滅菌生理的食塩水にて 4.6×10^5 CFU/ml に希釈し、 100°C にて10分間加熱後、流水にて急冷した。得られた孢子懸濁液 1 ml を試料 99 ml に接種し、 55°C にて培養した。以下、孢子懸濁液を接種した試料を検体とした。培養期間は、製品の流通期間を考慮し、34～35日とした。検体の容器として、125ml または 100ml 容量の滅菌ねじ口瓶を用いた。ねじ口瓶の蓋は締めきらず、検体を好气的条件にて一定とした。

経時的に、検体を攪拌後、無菌的に適量採取した。孢子数の測定に、採取後 100°C にて10分間加熱し、流水にて急冷した検体を用いた。一方、孢子及び栄養細胞数の測定に、採取した検体を加熱処理せず用いた。滅菌生理的食塩水にて適当な濃度に希釈した検体を 1ml ずつ 2 枚のシャーレに接種し、標準寒天培地 (SMA; 栄研化学) にて混釈し、平板にした。 55°C にて後培養を行い、10日後までに検出された集落を計数した。

以上の操作を増殖適性試験 (growth curve assay) 法とした。

結果および考察

試料の状態および増殖適性試験の結果を Table 2, Fig. 1 および Fig. 2 に示した。

ここで、増殖適性試験において、分離菌の菌数が増加する傾向の増殖曲線を示す内容物を I 型、不変傾向の増殖曲線を示す内容物を II 型、また、減少する傾向の増殖曲線を示す内容物を III 型とした。

増殖適性試験の結果より、試験に用いた 8 種の混合茶飲料缶詰を I～III 型に層別した。その結果、5 種は I 型、1 種は II 型、また、2 種は III 型に層別された。それぞれの混合茶飲料缶詰の層別結果を Table 3 に記した。

Table 1. Conditions of samples

| Canned blend tea drink | Brix (%) | pH |
|------------------------|----------|-----|
| A | 0.2 | 7.1 |
| B | 0.5 | 6.3 |
| C | 0.1 | 6.4 |
| D | 0.2 | 6.6 |
| E | 0.4 | 6.5 |
| F | 0.0 | 4.8 |
| G | 0.0 | 6.7 |
| H | 0.2 | 6.4 |

Table 2. Results of *growth curve assay*^a

| Canned blend tea drink | Incubation time(days) | Cell density (CFU/ml) | |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| | | initial | final |
| A | 34 | 1.4×10^4 | 2.7×10^7 (2.2×10^7) |
| B | 34 | 1.6×10^4 | 1.7×10^7 (1.1×10^7) |
| C | 35 | 5.0×10^3 | 1.3×10^7 (1.1×10^7) |
| D | 34 | 1.5×10^4 | 8.3×10^6 (6.4×10^6) |
| E | 34 | 1.5×10^4 | 3.6×10^6 (1.5×10^6) |
| F | 35 | 5.3×10^3 | 2.6×10^3 (9.8×10^2) |
| G | 34 | 2.5×10^3 | ND (ND) |
| H | 20 | 6.1×10^3 | ND (ND) ^b |

^aSymbols: ND, Not detected; (), Samples heat-treated at 100°C for 10 minutes before inoculation to count spore numbers.

^bNot detected on the 15th day.

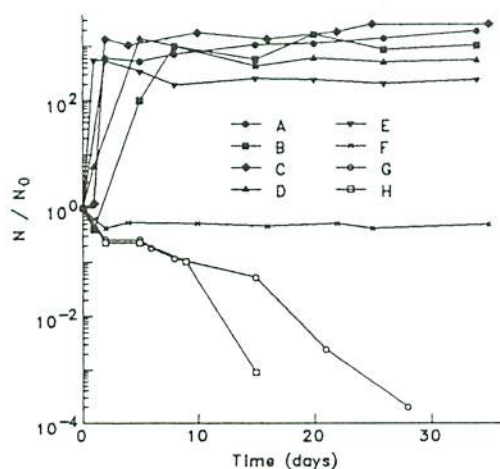


Fig. 1 Inhibitory effects of canned blend tea drinks against *B. stearothermophilus* BLT spores and vegetative cells

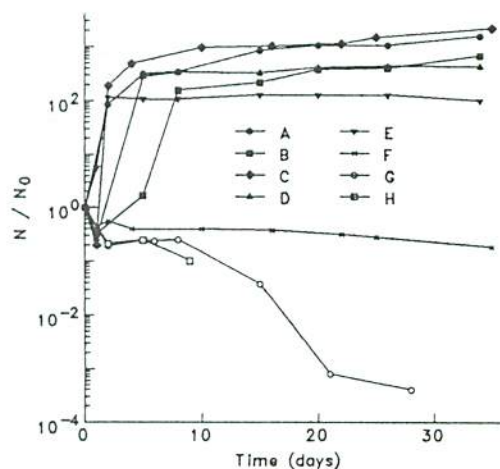


Fig. 2 Inhibitory effects of canned blend tea drinks against *B. stearothermophilus* BLT spores

I～III型に対する分離菌BLTの増殖適性はI型>II型>III型の順であり、各型に対応する混合茶飲料缶詰の内容物は、高温性細菌により、その順に変敗する可能性が高いと推定される。

一方、緑茶に含まれるポリフェノールに*B. stearothermophilus*に対する抗菌活性が認められている³⁾。しかし、本試験において、緑茶などの特定の原料を使用した混合茶に一定の抗菌性は認められなかった。この原因とし、抗菌活性を有する同一の原料を使用した混合茶飲料缶詰であっても、処方の違いにより、抗菌活性を有する原料抽出液の濃度が変化し、抗菌活性の発現に差違が生じた可能性が考えられる。

Table 3. Grouping of canned blend tea drinks

| Type | Canned blend tea drinks |
|------|-------------------------|
| I | A, B, C, D, E |
| II | F |
| III | G, H |

また、各型の混合茶飲料缶詰における培養終了時の分離菌 BLT の最終到達菌数は、I 型において、 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml であり、I 型内にて差違が認められず、II 型において、 10^3 CFU/ml 前後であり、初期菌数と同等であった。また、III 型において、分離菌 BLT は培養開始より 16 日目以降に検出されなくなり、死滅したと思われた。

要 約

高温保存の混合茶飲料缶詰から分離した *B. stearothermophilus* BLT を 8 種の市販混合茶飲料缶詰の内容物に接種、培養し、菌数を経時的に測定した。

その結果、混合茶飲料缶詰の 5 種は分離菌 BLT の菌数が増加する傾向の増殖曲線を示す I 型、1 種は菌数が不変傾向の増殖曲線を示す II 型、2 種は菌数が減少する傾向の増殖曲線を示す III 型に層別された。

各型の混合茶飲料缶詰の内容物は I 型 > II 型 > III 型の順に、高温性細菌により変敗する可能性が高いと考えられる。

文 献

- 1) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 生貝 初, 島村忠勝: 日細菌誌, 45, 561-565 (1990).
- 2) 原 征彦, 石上 正: 日食工誌, 36, 996-999 (1989).
- 3) 原 征彦, 渡辺真由美: 日食工誌, 36, 951-955 (1989).
- 4) 吉田衛市, 植松英治, 西山重幸: 缶詰時報, 74, 1000-1006 (1995).