

Bacillus stearothermophilus に対する抗菌作用に及ぼす 混合茶の成分, pHおよび栄養条件の影響

中尾 浩, 遠田 昌人, 松井 智江, 吉本 周

Influences of Ingredients, pH and Nutrients of Canned Blend Tea Drink on Antibacterial Activity for *Bacillus stearothermophilus*

Hiroshi Nakao, Atsuhito Enda, Tomoe Matsui and Itaru Yoshimoto

In a previous paper, the authors reported that canned blend tea drink G had an antibacterial activity for *Bacillus stearothermophilus* BLT, which was isolated from a canned blend tea drink stored at high temperature. In this paper, several model experiments were carried out to analyze influences of the ingredients, pH and nutrients of canned blend tea drink G on the antibacterial activity for *B. stearothermophilus* BLT. Results were followed by: (1) the ingredients of canned blend tea drink G had antibacterial activity, presumably derived from an antibacterial substance (s), which had a feature of being adsorbed by polyvinylpolypyrrolidone; (2) low pH at 4.8 did not show antibacterial activity, although low pH suppressed growth of the bacteria in case of the growth curve of increasing tendency and promoted decreasing rate of the population in case of the growth curve of decreasing tendency; and (3) poor nutrients did not have antibacterial activity, only having the secondary effect on antibacterial activity. Consequently it was shown that the antibacterial activity of canned blend tea drink G for *B. stearothermophilus* BLT was more highly influenced by its ingredients than by pH and nutrients.

Key words : blend tea, canned drink, thermophilic bacteria, *Bacillus stearothermophilus* antibacterial activity, ingredients of blend tea, pH, nutrients, PVPP

既報¹⁾にて8種の混合茶飲料缶詰に、高温保存の混合茶飲料缶詰から分離された *Bacillus stearothermophilus* BLT を接種し、培養したところ、増殖曲線の傾向に差違が認められた。すなわち、分離菌の増殖曲線が増加する傾向を示すI型、不変傾向を示すII型、および減少傾向を示すIII型である。しかし、混合茶飲料缶詰種により増殖曲線の傾向に差違が生じる原因は不明であった。

一般に、微生物の増殖に関わる環境条件として、溶存酸素濃度、水分活性、温度、pH、栄養条件、生物膜担体、抗菌活性物質および増殖促進活性物質の作用が考えられる。一方、既報の試験方法において、溶存酸素濃度、水分活性、温度、生物膜担体の影響の条件は同様であるとみなせる。従って、混合茶飲料缶詰種間における分離菌の増殖の差違は、pH、栄養条件および混合茶成分に含まれる抗菌活性物質または増殖促進活性物質の条件に帰結される。

本報において、III型の混合茶飲料缶詰Gに着目し、混合茶飲料缶詰Gが、*B. stearo-*

thermophilus BLT に対し、抗菌作用を示す原因を追求することを目的とした。そのため、混合茶飲料缶詰Gの成分、pHおよび栄養条件が、抗菌作用に及ぼす影響を、数種のモデル実験を行い、解析したので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

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。予め調製し、5℃にて保存した孢子懸濁液を、適宜無菌的に採取し、滅菌生理的食塩水にて適当な濃度に希釈し、100℃にて10分間加熱後、水浴にて急冷し、使用した。

2. 試 料

混合茶飲料缶詰FおよびGを既報¹⁾と同様の方法により除菌し、それぞれ試料とした。

ハブ茶（焙焼、小谷穀粉）20gに水500mlを加え、昇温した。100℃にて90分間加熱後、抽出液を流水にて急冷し、グラスウールにて濾過した。濾液を0.80 μm、次いで0.45 μmのメンブランフィルタにて除菌し、試料とした。

試料G 340mlにpolyvinylpyrrolidone (PVPP) 6.8g (SIGMA)を加え、室温にて30分間攪拌後、PVPPを濾紙 (ADVANTEC N0. 2) にて濾別した。濾液を0.80 μm、次いで0.45 μmのメンブランフィルタにて除菌した。得られた濾液280mlを試料Gpvppとした。以上の操作をPVPP処理とした。

試料のpHおよび糖濃度を Table 1 に記した。

3. 培 地

試験に用いた培地および培地の調製方法を以下に記した。

- 標準寒天培地 (SMA 培地；栄研化学)
- 10/3 SM水溶液の調製方法を以下に記した。
酵母エキス1.67g、バクトトリプトン3.33g、およびブドウ糖0.67gを水200mlに溶解後、10% w/v 水酸化ナトリウム水溶液にてpH7.1に調整した。得られた水溶液を10/3 SM水溶液とした。

- SM濃度を変化させたSMA (dcSM・A) 培地の調製方法を以下に記した。

寒天1.5gをそれぞれ加えた10/3 SM 水溶液30ml, 21ml, 15ml, 9 mlおよび2.7mlに、それぞれ水70ml, 79ml, 85ml, 91mlおよび97.3mlを加え滅菌し、100%, 70%, 50%, 30%および9%SM・A培地をそれぞれ得た。

Table 1. Conditions of samples

Sample	Brix (%)	pH
G	0.0	6.7
Gpvpp	0.0	7.3
F	0.0	4.8
Oriental senna extract ^a	0.4	4.8

^a“HABUCHA”

SM濃度 (%)

dcSM・A	100	70	50	30	9
寒天 (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
10/3 SM 水溶液 (ml)	30	21	15	9	2.7
水 (ml)	70	79	85	91	97.3

- 70%の試料Gを含むdcSM・A (70%G-dcSM・A) 培地の調製方法を以下に記した。
100%, 70%, 50%および30%SM・A培地30mlにそれぞれ試料G70mlを無菌的に加え混和し,
70%G-30%, 21%, 15%および9%SM・A培地をそれぞれ得た。

		SM濃度 (%)			
70%G-dcSM・A		30	21	15	9
dcSM・A	(%)	100	70	50	30
	(ml)	30	30	30	30
試料G	(ml)	70	70	70	70

- 異なる濃度の試料Gを含むSMA (dcG-SMA) および異なる濃度の試料Gpvppを含むSMA (dcGpvpp-SMA) 培地の調製方法を以下に記した。

SMAを2.35gずつ採取し、それぞれに水10ml, 30ml, 50ml, 70mlおよび100mlを加え滅菌し,
試料Gまたは試料Gpvpp90ml, 70ml, 50ml, 30mlおよび0mlをそれぞれ無菌的に加え混和し,
90%, 70%, 50%, 30%および0%G-SMAおよび90%, 70%, 50%, 30%および0%
Gpvpp-SMA培地をそれぞれ得た。

		G濃度 (%)				
dcG-SMA		90	70	50	30	0
SMA	(g)	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35
水	(ml)	10	30	50	70	100
試料G	(ml)	90	70	50	30	0

		Gpvpp濃度 (%)				
dcGpvpp-SMA		90	70	50	30	0
SMA	(g)	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35
水	(ml)	10	30	50	70	100
試料Gpvpp	(ml)	90	70	50	30	0

4. 分離菌への抗菌作用における混合茶成分の寄与

加熱処理後、滅菌生理的食塩水にて 1.2×10^2 , 1.2×10^3 または 1.2×10^4 CFU/mlに希釈した分離菌の孢子懸濁液を1mlずつ2枚のシャーレに接種し、dcG-SMAまたはdcGpvpp-SMA培地にて混和後、平板にした。55℃にて培養を行い、10日後まで検出された集落を計数した。以上の操作を静菌作用評価平板試験とする。

試料Gおよび試料Gpvppを増殖適性試験¹⁾に供した。

5. 分離菌への抗菌作用に対する栄養条件の影響

加熱処理後、滅菌生理的食塩水にて 1.2×10^3 CFU/mlとなるよう希釈した分離菌の孢子懸濁液を1mlずつ2枚のシャーレに接種し、30%または9%SM・A培地を24mlずつそれぞれ無菌的に加え混和し、平板にした。55℃にて培養を行い、10日後までに検出された集落を計数した。

加熱処理後、滅菌生理的食塩水にて 1.2×10^3 , 1.2×10^4 および 1.2×10^5 CFU/mlとなるよう希釈した分離菌の孢子懸濁液を1mlずつ2枚のシャーレに接種し、70%G-30%, 21%, 15%または9%SM・A培地を24mlずつそれぞれ無菌的に加え混和し、平板にした。55℃にて培養を行い、10日後までに検出された集落を計数した。

6. 分離菌への抗菌作用に対するpHの影響

pH 4.8の試料Fおよびハブ茶、また、pHを6.6または6.4に上昇させたそれぞれの試料を増殖適性試験¹⁾に供した。

pHを上昇させた試料は、10% w/v 水酸化ナトリウム水溶液により、それぞれの試料のpHを6.6に調整し、メンブランフィルタ (0.45 μ m, Acrodisc) にて除菌することにより得た。

結果および考察

1. 分離菌への抗菌作用における混合茶成分の寄与

抗菌作用における混合茶飲料缶詰G成分の寄与を評価するため、dcG-SMA培地およびdcGpvpp-SMA培地に分離菌BLTを接種し、試料濃度と静菌作用の関係を調査した。結果を Fig. 1 に示した。

dcG-SMA培地において、静菌作用は、培地に含まれる試料Gの濃度の上昇と共に増加した。このことより、示された静菌作用は混合茶飲料缶詰G成分によることが判明した。一方、dcGpvpp-SMA培地において、試料Gpvpp濃度に関わらず、静菌作用は認められなかった。このことより、静菌作用を示す成分はPVPPに吸着される物質であることを推定した。

ところで、dcG-SMA培地における静菌作用は、試料Gの濃度が50%以下のとき、殆ど認められないが、試料Gの濃度が70~90%において急激に上昇した。既報¹⁾において、筆者らは特定の原料を使用した混合茶飲料缶詰に、分離菌に対する一定の抗菌性が認められない原因を、抗菌活性物質を含む原料抽出液の濃度の差違によると推定した。前記の結果はその推定を裏付ける。

更に、混合茶飲料缶詰Gの抗菌作用における、PVPPに吸着される成分による静菌作用の寄与を評価するため、試料Gpvppを増殖適性試験に供し、試料Gの抗菌作用と比較した。試料Gは既報¹⁾の試験結果を用いた。結果を Fig. 2 および Table 2 に記した。試料Gpvppは分離菌の菌数が増加する傾向の増殖曲線を示すI型に層別された。一方、試料Gは分離菌の菌数が減少する傾向の増殖曲線を示すIII型である。このことより、混合茶飲料缶詰Gの抗菌作用は、PVPPに

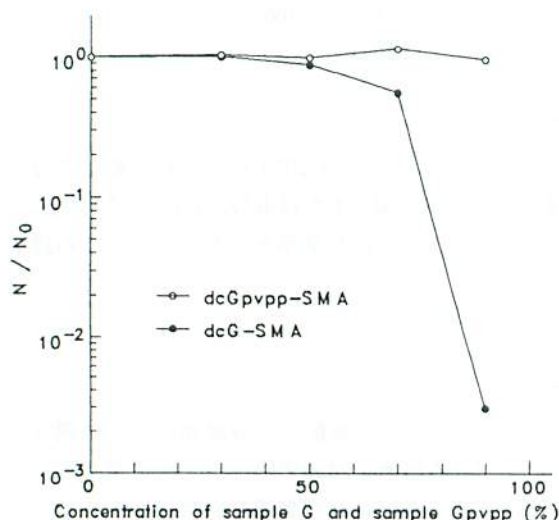


Fig. 1 Inhibitory effects of sample G and sample Gpvpp against *B. stearothermophilus* BLT in dcG-SMA medium and dcGpvpp-SMA medium

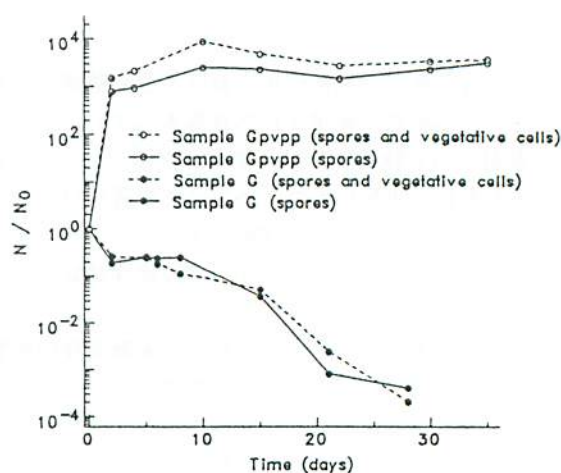


Fig. 2 Inhibitory effects of sample G and sample Gpvpp against *B. stearothermophilus* BLT

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

Sample	Incubation time(days)	pH final	Cell density (CFU／ml)			Type ^b
			initial	final		
G	34	NA	2.5×10 ³	ND	(ND)	III
Gpvpp	35	7.8	3.6×10 ³	1.3×10 ⁷	(1.1×10 ⁷)	I
F pH 4.8	35	NA	5.3×10 ³	2.6×10 ³	(9.8×10 ²)	II
pH 6.6	35	5.2	4.9×10 ³	1.8×10 ⁵	(6.6×10 ⁴)	I
Oriental senna pH 4.8	26	4.6	6.2×10 ³	ND	(ND)	III
extract pH 6.4	30	4.9	4.7×10 ³	ND	(ND)	III

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

^bSamples were grouped into three types described previous paper.¹⁾

吸着される成分に依存することが判明した。

以上より, Fig. 1 にて推定された静菌活性物質は, 分離菌の増殖曲線の傾向を, 増加から減少に変化させる抗菌活性物質であることが推定された。また, その抗菌活性物質は, 混合茶飲料缶詰 G の抗菌作用に一次的に影響していることが推定された。

2. 分離菌への抗菌作用に対する栄養条件の影響

栄養条件はPVPP処理により良好しないが, 一方, 前節の Fig. 2 に示された増殖適性試験において, III型の試料 G は, PVPP処理により I 型に変化した。従って, 示された抗菌作用における混合茶飲料缶詰 G の栄養条件の寄与が低いことは明白である。しかし, 栄養条件の低下と混合茶成分の交互作用が抗菌作用に影響する可能性が考えられる。

そこで, 抗菌活性を有する混合茶成分として試料 G を一定量含有し, 栄養条件をSM濃度により変化させた70%G-dcSM・A培地を用い, 混合茶成分の抗菌作用に対する栄養条件の寄与を調査した。対照とし, 試料 G を含有せず, 栄養条件を変化させたdcSM・A培地を用いた。

培地のSM濃度と検出された分離菌BLTの集落数の関係を Fig. 3 に示した。dcSM・A培地において, SM濃度に関わらず, 検出された分離菌の集落数は一定であった。一方, 70%G-dcSM・A培地において, 培地に含まれるSM濃度が減少すると共に, 検出された分離菌の集落数は減少した。

以上より, 混合茶飲料缶詰 G において, 本試験範囲内の栄養条件の低下は, 分離菌の抗菌作用に対し, 寄与し得るが, 混合茶成分との交互作用による寄与であり, 副次的であることが推定された。

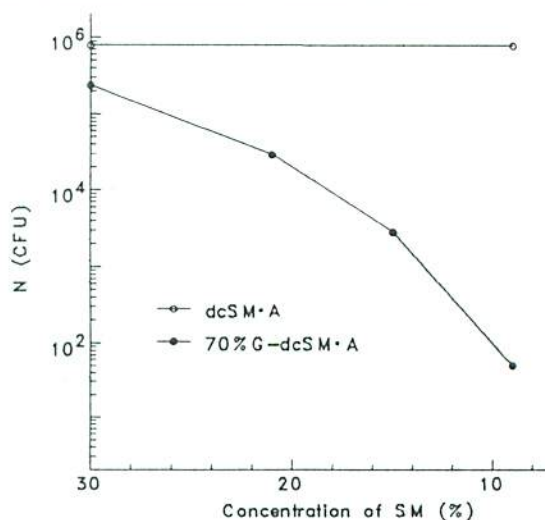


Fig. 3 Inhibitory effects of dcSM・A medium and 70%G-dcSM・A medium against *B. stearothermophilus* BLT

3. 分離菌への抗菌作用に対するpHの影響

既報¹⁾の増殖適性試験において、分離菌BLTの増殖曲線が不変傾向を示すII型に層別された混合茶飲料缶詰Fのみであった。その原因として、混合茶飲料缶詰Fの低いpHによる静菌作用が考えられる。そこで、II型の静菌作用に対する低いpHの影響を検討するため、pHを6.6に上昇させた試料Fを用い、同様の試験を行った。

増殖適性試験の結果をFig. 4およびTable 2に示した。pH4.8の試料Fは既報¹⁾の試験結果を用いた。増殖適性試験の結果、pHの4.8から6.6への上昇により、試料Fの増殖曲線は不変傾向から増加傾向に変化した。

このことより、混合茶飲料缶詰Fの増殖曲線が示す不変傾向は、低いpHによることが判明した。以上より、低いpHは、I型をII型に変化させる静菌作用を有すると考えられる。

更に、III型が示す抗菌作用に対する低いpHの影響を検討するため、以下の実験を行った。予め行った増殖適性試験により、III型に層別されることが確認されたハブ茶は、混合茶飲料缶詰Fと同様の低いpH4.8を示す。そこで、ハブ茶のpHを6.4に上昇させ、同様の増殖適性試験を行った。

結果をFig. 5およびTable 2に示した。増殖適性試験の結果、ハブ茶のpHを上昇させても、増殖曲線の傾向に変化は認められず、III型に層別された。しかし、pHを上昇させたハブ茶において、培養開始より15日目以降に菌数減少速度の低下が認められた。

このことより、ハブ茶の増殖曲線が示す減少傾向は、低いpHによらないことが判明した。また、ハブ茶の菌数減少速度は、低いpHにより増加することが判明した。以上より、pHの低下は、III型の抗菌作用に対し、菌数の減少速度を増加させる副次的な影響を及ぼし得るが、IおよびII型をIII型に変化させる抗菌作用は有していないと考えられる。

従って、pH低下は、分離菌の増殖を抑制する静菌作用および分離菌の菌数減少を促進する副次的な抗菌作用を有するが、菌数を減少させる抗菌作用を有さないことが判明した。

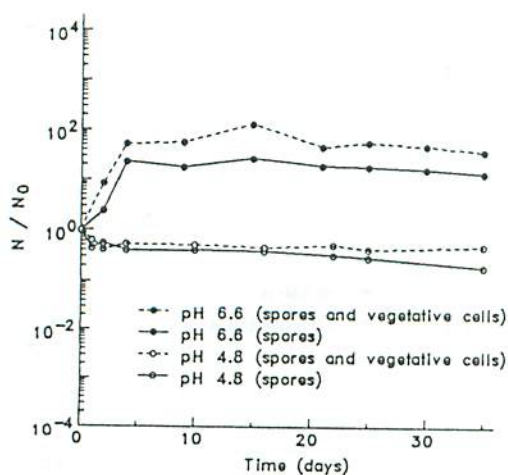


Fig. 4 Inhibitory effects of sample F against *B. stearothermophilus* BLT

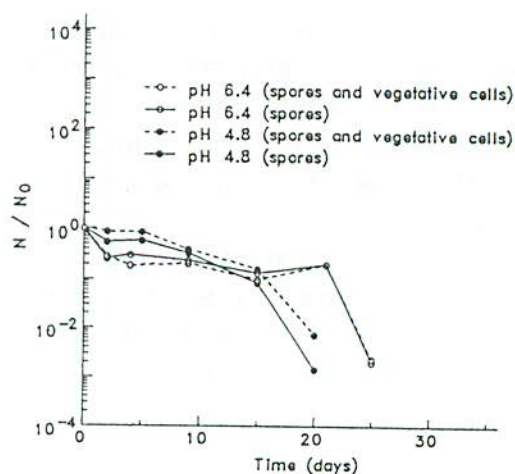


Fig. 5 Inhibitory effects of oriental senna extract against *B. stearothermophilus* BLT

要 約

高温保存の混合茶飲料缶詰から分離した *B. stearothermophilus* BLT に対する混合茶飲料缶詰 G の抗菌作用を解析するため、混合茶成分、pH および栄養条件が抗菌作用に及ぼす影響を検討した。

混合茶飲料缶詰 G の濃度が上昇すると、分離菌に対する抗菌作用が増加することが示された。このことより、混合茶飲料缶詰 G に、分離菌に対する抗菌作用を有する成分が含まれることが推定された。また、抗菌作用は、PVPP 処理することにより消失することが示された。このことより、混合茶飲料缶詰 G に PVPP に吸着される抗菌活性物質が存在することが示唆された。また、その抗菌作用は、分離菌の増殖曲線の傾向を、増加から減少に変化させることを確認した。

pH の 6.6～6.4 から 4.8 への低下は、分離菌の増殖を抑制する静菌作用および菌数の減少を促進する副次的な抗菌作用を有するが、菌数を減少させる抗菌作用は有さないことが判明した。

栄養条件の低下が分離菌に及ぼす影響は、副次的な抗菌作用のみ検出し得た。

以上より、混合茶飲料缶詰 G の抗菌作用は、混合茶成分、pH および栄養条件において、混合茶成分に強く依存することを推定した。

文 献

- 1) 中尾 浩, 遠田昌人, 松井智江, 吉本 周: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, 22, 129～132 (1998).