

天然抗菌性物質を利用した耐熱性芽胞菌の制御技術の開発

長谷川 撰^{*1}、安田 庄子^{*2}、森川 豊^{*2}、戸谷 精一^{*3}

Inhibition of Heat Resistant Spore Forming Bacteria by Natural Antibacterial Substances

Osamu HASEGAWA, Shoko YASUDA, Yutaka MORIKAWA and Seiichi TOTANI

Owari Textile Research Center, AITEC^{*1} Food Research Center, AITEC^{*2*3}

シヨ糖脂肪酸エステルやサポニンの存在下における *Clostridium (Cl.) sporogenes* の増殖について検討した。液体培地中ではモノエステル-P を 50ppm 以上添加した場合に *Cl. sporogenes* の増殖が抑制された。大豆サポニンを 400ppm 添加した場合には増殖の抑制は認められなかった。糖の量を減らして調製した黒ういろう中ではモノエステル-P を 100ppm 添加したもの、及び大豆サポニンを 400ppm 添加したもののいずれにおいても *Cl. sporogenes* の増殖抑制は認められなかった。

1. はじめに

いろいろななどの密封容器包装生菓子には加熱殺菌や低温流通が困難なものが存在し、従来から耐熱性芽胞菌による変敗が問題となっていた。また、最近ではボツリヌス菌による食中毒リスクの低減が求められていることを受け、厚生労働省がボツリヌス菌による食中毒防止のための規格基準の検討を進めている。しかしながら、他の食品と同様の高温殺菌が義務づけされた場合、愛知県の特産品であるいろいろの物性や風味が劣化するため、土産物としての流通が著しく困難となる。

コーヒー飲料においては、シヨ糖脂肪酸エステルを使用することで *Cl. thermoaceticum* などによる変敗を抑制したり、加熱殺菌効果を促進することが知られている¹⁾。シヨ糖脂肪酸エステルは乳化作用を有する。そこで、植物に含まれ乳化作用を有するサポニンにも着目し、これらが和生菓子中の微生物の増殖に与える影響について検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

シヨ糖脂肪酸エステルはリョートーモノエステル-P (モノエステル-P、三菱化学フーズ (株)) を使用した。サポニンは大豆サポニン (和光純薬工業 (株)) を使用した。

2.2 使用菌株

試験にはボツリヌス中毒を引き起こす可能性のある I 群菌の代替菌である *Clostridium sporogenes* NBRC16411 の芽胞を使用した。

2.3 液体培地を用いた抗菌活性の検討

抗菌活性の検討に用いる培地は 1 % ポリペプトン、0.2 % 酵母エキス、0.1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH7.0 となるように調製し、モノエステル-P または大豆サポニンを所定量添加して試験管 (直径 18mm、長さ 165mm) に 10mL ずつ分注し、シリコ栓を用いて封をした後、121℃で 15 分間滅菌した。これに 80℃で 20 分間加熱処理して発芽を促進させた *Cl. sporogenes* 芽胞懸濁液を 0.1mL 添加した後、酸素吸収・炭酸ガス発生剤 (三菱ガス化学 (株) 製アネロパック・ケンキ) とともにクリーンガスバリア袋 (アズワン (株)) に入れて密封した。モノエステル-P を添加したものは 30℃で 35 日間、大豆サポニンを添加したものは 30℃で 30 日間保存した。保存後に GAM 寒天培地 (日水製薬 (株)) を用いて生菌数を測定した。試料の一部は 80℃で 20 分間加熱処理した後、同様に生菌数を測定し、加熱処理をしなかったものと生菌数を比較することで増殖の有無を判定した。なお、試料は同一条件のものを 3 本ずつ用意した。

2.4 黒ういろうを用いた抗菌活性試験

黒ういろうは一般的な組成で調製すると水分活性の

表 1 黒ういろうの組成

材料	配合
黒砂糖	17.5g
グラニュー糖	11.7g
水	99.3mL
上新粉	30g
小麦澱粉	8.3g

表2 *Cl. sporogenes* の増殖に与えるモノエステル-P と大豆サポニンの効果

モノエステル-P または大豆サポニンの添加量	増殖の確認された試料の割合
モノエステル-P 100ppm	0/3
モノエステル-P 50ppm	0/3
モノエステル-P 25ppm	1/3
モノエステル-P 12.5ppm	3/3
大豆サポニン 400ppm	3/3

表3 モノエステル-P または大豆サポニンが黒うしろ中の *Cl. sporogenes* の増殖に与える効果

モノエステル-P または大豆サポニンの添加量	増殖の確認された試料の割合
モノエステル-P 100ppm	2/2
大豆サポニン 400ppm	2/2

低下で *Cl. sporogenes* が増殖しない可能性があるため、**表1**に示した糖の少ない組成のものにモノエステル-P または大豆サポニンを添加して混合した。次に、1M NaOHを用いて pH7.0 に調整した後、加温して一次糊化させ、ガラスシャーレ（内径約 60mm、深さ約 15mm）に 20g ずつ分注し、蒸し器で 1 時間蒸し上げて黒うしろとした後、オートクレーブで 121°C、15 分間滅菌した。表面に *Cl. sporogenes* 芽胞懸濁液を 0.1mL 塗抹した後、酸素吸収・炭酸ガス発生剤とともにクリーンガスバリア袋に入れて密封し、30°C で 14 日間保存した。保存後に GAM 寒天培地を使用して生菌数を測定した。試料の一部は滅菌水で 10 倍に希釈したものを 80°C で 20 分間加熱処理した後、同様に生菌数を測定し、加熱処理をしなかったものと生菌数を比較することで増殖の有無を判定した。なお、試料は同一条件のものを 2 枚ずつ用意した。

3. 実験結果及び考察

3.1 液体培地における *Cl. sporogenes* の増殖

液体培地における *Cl. sporogenes* の増殖の有無を**表2**に示した。初発菌数は 1×10^3 /mL であったが、保存後にはモノエステル-P を 50ppm 以上添加したものは加熱の有無に拘わらずすべての試料について菌数が検出限界以下

(30 以下/mL) となった。加熱後の菌数が初発菌数よりも少なく、また培地に濁りも確認できなかったことから、芽胞は発芽した後、生育できずに死滅したと考えられた。

モノエステル-P を 12.5ppm 添加したものや大豆サポニンを添加したものは、加熱処理をしなかったものの菌数が 3×10^3 /mL を超えており、菌が発芽増殖したと考えられた。

3.2 黒うしろにおける *Cl. sporogenes* の増殖

黒うしろにおける *Cl. sporogenes* の増殖の有無を**表3**に示した。初発菌数は 5×10^2 /g であったが、保存後にはいずれの試料も加熱処理前の菌数が 3×10^4 /g を超えており、菌が発芽増殖したと考えられた。

表2の液体培地においてはモノエステル-P を 50ppm 以上添加した場合には、菌の増殖が認められなかったが、黒うしろ中では 100ppm 添加した場合でも菌の増殖が認められた。このことは、黒うしろ中の成分がモノエステル-P が有する *Cl. sporogenes* に対する増殖抑制効果を阻害したか、あるいは栄養状態の違いによって *Cl. sporogenes* のモノエステル-P に対する耐性が高くなったためと推定された。

4. 結び

本研究にて使用した黒うしろは、通常の黒うしろより糖が少なくなるように調製し、*Cl. sporogenes* が増殖しやすいようにしたものである。シヨ糖脂肪酸エステルやサポニンを用いても、本実験のような条件下のうしろにおいては *Cl. sporogenes* の増殖抑制は認められなかった。密封後に加熱殺菌されるうしろのボツリヌス菌汚染は当然、加熱殺菌前に起きていると考えられる。今回の試験では、シヨ糖脂肪酸エステルやサポニンが *Cl. sporogenes* の増殖に与える影響を検討するために、黒うしろに *Cl. sporogenes* を接種した後の加熱処理を行っていない。すなわち、シヨ糖脂肪酸エステルやサポニンの存在下での *Cl. sporogenes* に対する加熱殺菌効果やその後の増殖への影響の評価がなされていない。今後は *Cl. sporogenes* の接種後にうしろを加熱処理することで、より実際の汚染に近い条件下で試験を行う必要がある。

文献

- 1) 諏訪伸行ほか：日食工誌，33，44（1986）