

# 和生菓子中の *Bacillus subtilis* 芽胞の加熱殺菌に及ぼす ドクダミ抽出物の効果

長谷川 撰<sup>\*1</sup>、鬼頭 幸男<sup>\*2</sup>、竹内 啓子<sup>\*3</sup>、丹羽 昭夫<sup>\*4</sup>、藤井 正人<sup>\*4</sup>

## Effects of Dokudami (*Houttuynia cordata*) Extract on Heat Pasteurization of *Bacillus subtilis* Spore in Japanese Sweets

Osamu HASEGAWA, Yukio KITO, Keiko TAKEUCHI, Akio NIWA and Masato FUJII

Owari Textile Research Center, AITEC<sup>\*1</sup> Principal Researcher<sup>\*2</sup>

Food Research Center, AITEC<sup>\*3\*4</sup>

ドクダミ (*Houttuynia cordata*) よりエタノール抽出物を調製し、リン酸緩衝液及びしるこ中の *Bacillus subtilis* 芽胞の加熱殺菌に与える影響を検討した。pH5.0 - 6.0 のリン酸緩衝液に *B. subtilis* 芽胞を懸濁して加熱殺菌を行うと、ドクダミ抽出物を添加したものは添加しなかったものに比べて加熱殺菌効果が促進された。しるこ中の *B. subtilis* 芽胞に対しては、ドクダミ抽出物とクエン酸と併用することで加熱殺菌効果が促進された。ドクダミ抽出物を添加した水ようかんを 30 で保存した場合、ドクダミ抽出物由来の成分は経時的に減少した。

### 1. はじめに

消費者の嗜好の変化により、水ようかんなどの和生菓子は甘さを控えたものが好まれるようになってきている。このことは微生物の増殖抑制のために糖を多く添加することを困難にしており、従来に比べて変取しやすい製品が増えていることを意味している。

前報<sup>1)</sup>において著者らは、ドクダミのエタノール抽出物が水ようかん中の *B. subtilis* の増殖を抑制するが、芽胞の加熱殺菌を促進する効果はほとんど認められないことを報告した。本研究では、ドクダミのエタノール抽出物の添加と pH 調整を組み合わせることで、しるこ水ようかん中の芽胞の加熱殺菌を効果的に行う方法を検討した。また、抽出物に存在するドクダミ特有の香気は和生菓子の風味に影響を与えることから、保存による水ようかん中のドクダミ由来の成分の残存量についても検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料

愛知県内で栽培されたドクダミの葉及び細枝の部分を使用した。ドクダミは水洗いし、表面に付着した余分な水分を乾燥させた後、すみやかに -80 で凍結保存した。

#### 2.2 ドクダミ抽出物の調製

凍結状態のドクダミを粉碎し、遠心分離管 4 本に 3g

ずつ秤量した。95%エタノールを 30mL ずつ添加して攪拌した後、遠心分離 (5,000rpm、10 分間、15 ) し、上清を脱脂綿を詰めた漏斗でろ過し、ナス型フラスコに集めた。さらに残渣に 95%エタノールを 30mL ずつ加えて抽出する作業を 2 回繰り返した。ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、最終容量 5mL とした。これを、ドクダミ抽出物とした。

#### 2.3 使用菌株

試験には *B. subtilis* ATCC6633 を用いた。

#### 2.4 *B. subtilis* 芽胞懸濁液の調製

NUTRIENT BROTH (Difco) を用いて 30 で一晩振とう培養した *B. subtilis* 菌液 0.1mL を Schaeffer's sporulation medium agar<sup>2)</sup> の表面に塗抹し 30 で 15 日間培養した。培養後、培地上に滅菌冷イオン交換水 10mL を加え、30 分間放置した。コンラージ棒で培地表面に形成されたコロニーを攪拌して懸濁し、遠心分離管に回収し、遠心分離 (12,000rpm、15 分間) により集菌した。滅菌冷イオン交換水で 3 回洗浄遠心分離 (12,000rpm、15 分間) し、滅菌冷イオン交換水を加えた後、ねじ付試験管に分注した。80 で 10 分間加熱した後すぐに冷却した。これを芽胞懸濁液とし、使用するまで冷蔵庫で保存した。この *B. subtilis* 芽胞懸濁液の菌数は  $2.3 \times 10^9$  cfu/mL であった。

\*1 尾張繊維技術センター 加工技術室 \*2 統括研究員 \*3 食品工業技術センター 応用技術室

\*4 食品工業技術センター 加工技術室

## 2.5 市販水ようかんの pH 及び Brix の測定

10 種類の市販水ようかんについて pH 及び Brix を測定した。pH は水ようかんを同量の脱イオン水を加えて攪拌して測定した。Brix は水ようかんを乳鉢ですりつぶし、Brix 糖度計（アタゴ手持屈折計 500 型、（株）アタゴ）を用いて測定した。

## 2.6 しるこの調製

鍋に乾燥あん（膨軟性乾燥餡製菓用、谷尾食糧工業（株）製）100g をとり、水 200mL とよく混合した。グラニュー糖 120g を加え、弱火で加熱しこしあんを調製した。これに水 500mL、グラニュー糖 250g、塩化ナトリウム 1.0g を加え Brix が 40 になるまで煮詰めた。三角フラスコに分注した後、オートクレーブ（121、15 分間）で滅菌し、これをしることした。

## 2.7 水ようかんの調製

鍋に寒天 5.0g をとり、水 500mL を加え加熱溶解した。2.5 と同様に調製したこしあん全量、グラニュー糖 250g、塩化ナトリウム 1.0g を加え Brix が 40 になるまで煮詰めた。200mL 三角フラスコに 100g ずつ分注した後、オートクレーブ（121、15 分間）で滅菌し、これを水ようかんとした。

## 2.8 リン酸緩衝液中の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌

50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$  緩衝液（pH5.0 - 7.0）100mL に芽胞懸濁液を 0.1mL 添加し、滅菌済みのねじ付試験管に 10mL ずつ分注した後、ドクダミ抽出物または 95%エタノールを 0.1mL ずつ添加してよく混合した。97 の温浴中で 5 分間、加熱殺菌を行い、生菌数を測定した。生菌数の測定には標準寒天培地を用いた。なお、加熱殺菌前の菌数は約  $2 \times 10^6$  cfu/mL であった。

## 2.9 しるこ中の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌

しるこ 100g に芽胞懸濁液を 0.1mL 添加し、滅菌済みのねじ付試験管に 10g ずつ分注した後、ドクダミ抽出物または 95%エタノールを 0.1mL ずつ添加してよく混合した。97 の温浴中で 10 分間、加熱殺菌を行い、生菌数を測定した。また、しるこにクエン酸を 0.02% 添加したのものについても同様に生菌数を測定した。なお、加熱殺菌前の菌数は約  $2 \times 10^6$  cfu/mL であった。

## 2.10 ドクダミ抽出物のヘッドスペースガスの分析

ドクダミ抽出物を、10mL ねじ付き試験管に 0.2mL 採り、ポリ塩化ビニリデン製のフィルムで蓋をし、60 で 10 分間加温した。このヘッドスペースガス 1mL を（株）島津製作所製のガスクロマトグラフ GC-17AAFVVer.3 で分析した。

## 2.11 水ようかんの保存試験

加温溶解した水ようかんにドクダミ抽出物を生のドクダミに換算して 12mg/g となるように添加した。50g ず

つポリエチレン製の袋（厚さ 0.05mm）に分注し、4.8cm × 12cm の大きさになるように密封包装したものを、10 と 30 で 30 日間保存した。これらの水ようかんは一定期間経過後に恒温器から取り出し、Ny.EvOH.Ny:PE の袋で密封して冷蔵庫で保存し、すべての保存試験が終了した後に同時にガスクロマトグラフィーで分析を行った。

## 2.12 水ようかん中のドクダミ抽出物由来成分のガスクロマトグラフィーによる測定

保存した水ようかんを 2 本の遠心分離管に 20g 秤量した。これらにそれぞれイオン交換水 10mL、及び内部標準として trans 2 ドデセナールを添加した酢酸エチル 5mL を加え、15 分間よく振とうし、遠心分離（5,000rpm、10 分間、15 ）した。これらの上清を合わせ、ガスクロマトグラフィー用のサンプルとした。

## 3 . 実験結果及び考察

### 3.1 市販水ようかんの pH 及び Brix

図 1 に市販の水ようかんの pH と Brix を測定した結果を示した。10 種類の水ようかんのうち、原材料に pH 調整剤を使用している商品は 1 種類であった。Brix は製品により異なり、Brix 35 - 55 とばらつきがあった。pH は、pH 調整剤を使用している商品は 5.8 と低かったが、その他は 6.2 - 6.8 であった。賞味期限の長さや pH や Brix との間に特に関連は見られなかった。

### 3.2 ドクダミ抽出物によるリン酸緩衝液中の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌促進効果

図 2 にリン酸緩衝液中の *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌に対するドクダミ抽出物の効果を示した。

抽出物を添加しない場合、加熱殺菌後の生菌数は pH 7.0 では  $3.4 \times 10^5$  cfu/mL、pH 6.0 では  $9.2 \times 10^4$  cfu/mL、pH 5.0 では  $2.6 \times 10^3$  cfu/mL となり、pH が低いほど加熱殺菌効果は高くなった。ドクダミ抽出物を添

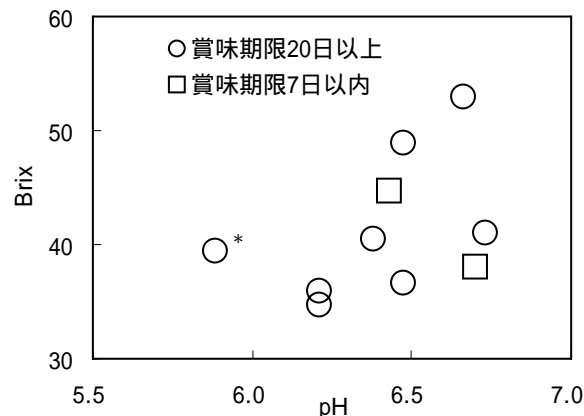


図 1 市販水ようかんの性状  
\* pH 調整剤添加

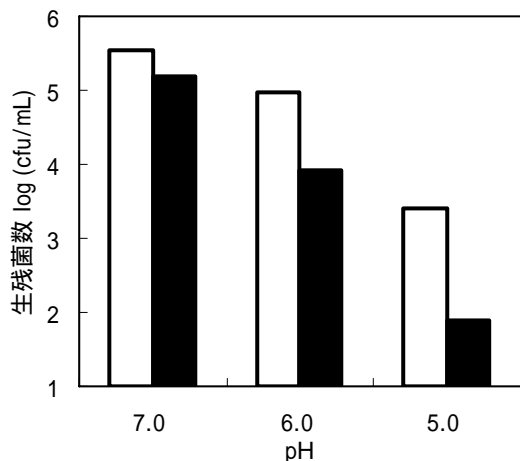


図2 ドクダミ抽出物添加によるリン酸緩衝液中の*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌促進効果

□ 抽出物無添加 ■ 抽出物添加  
抽出物は冷凍ドクダミ換算で24mg/mLとなるように添加した。

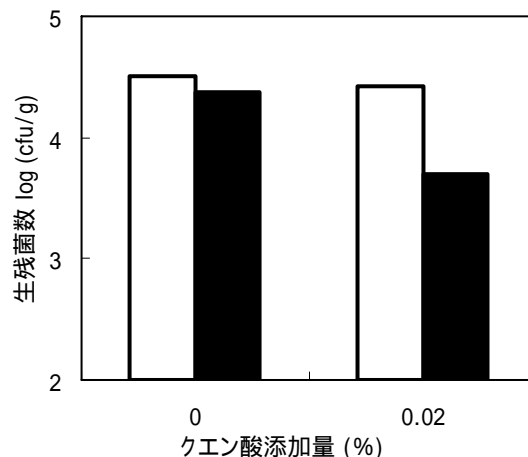


図3 ドクダミ抽出物添加によるしるこ中の*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌促進効果

□ 抽出物無添加 ■ 抽出物添加  
抽出物は冷凍ドクダミ換算で24mg/gとなるように添加した。

加したときの生菌数はpH7.0では $1.5 \times 10^5$  cfu/mLであり、抽出物を添加しても加熱殺菌はほとんど促進されなかった。一方、pH6.0では $8.2 \times 10^3$  cfu/mL、pH5.0では77cfu/mLとなり、ドクダミ抽出物を添加することで*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌が促進され、pHが低いほど殺菌効果が高くなることが分かった。

### 3.3 ドクダミ抽出物によるしるこ中の*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌促進効果

図3にしるこ中の*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌に対するドクダミ抽出物の効果を示した。

クエン酸とドクダミ抽出物を添加しなかったものの生菌数は $3.2 \times 10^4$  cfu/gであったのに対し、ドクダミ抽出物を添加したものの生菌数は $2.4 \times 10^4$  cfu/gであり、ドクダミ抽出物を添加しても*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌は促進されなかった。

クエン酸を添加しドクダミ抽出物を添加しなかったしるこの生菌数は $2.6 \times 10^4$  cfu/gであった。一方、ドクダミ抽出物を添加したものの生菌数は $5.0 \times 10^3$  cfu/gであり、ドクダミ抽出物を添加することで*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌が促進された。

クエン酸を添加しなかったしるこに添加したしるこのpHはそれぞれ6.5、5.8であった。これらはそれぞれpH調整剤を使用していない市販水ようかんとpH調整剤を使用した水ようかんのpHに近い値であった。水ようかんに0.02%のクエン酸の添加してもほとんど酸味が感じられなかった。したがって、水ようかん中の*B. subtilis*芽胞の加熱殺菌を促進するためには、ドクダミ抽出物とク

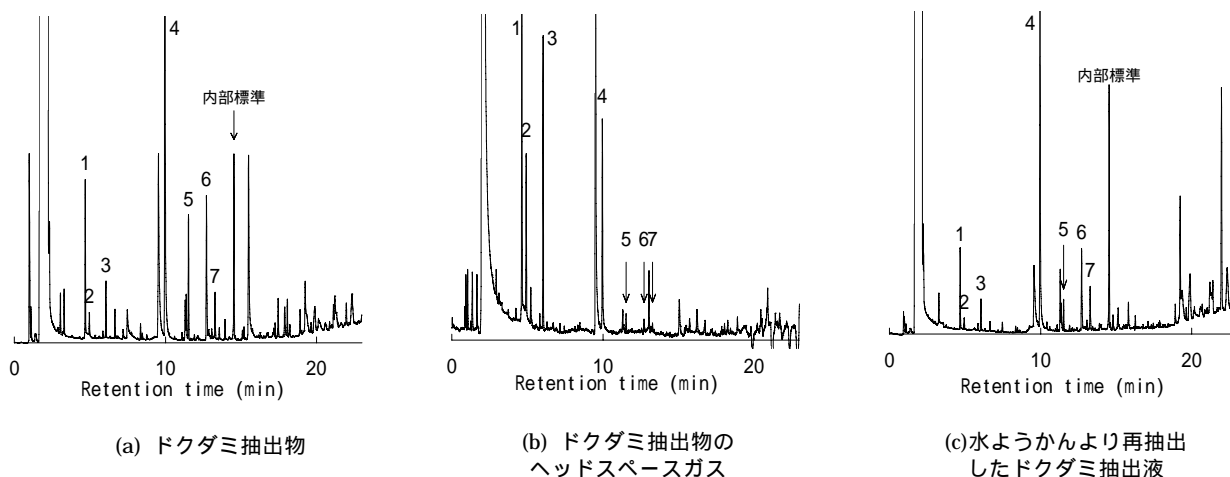
エン酸との併用が有効であると考えられた。

### 3.4 水ようかん保存中のドクダミ抽出物由来成分の残存量の変化

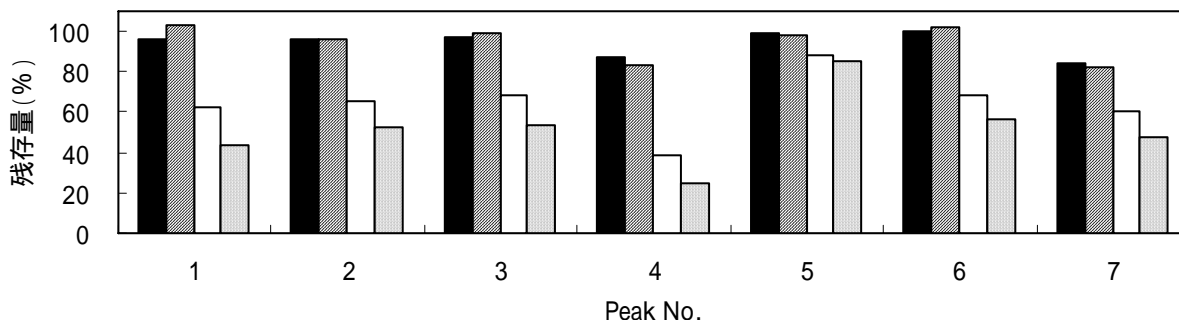
ドクダミには独特の香りがあり、ドクダミ抽出物を添加することによって食品の風味に好ましくない影響を与える可能性がある。また、ドクダミの香り成分には抗菌活性のあることが知られている<sup>3)4)</sup>。そこで、水ようかん保存中のドクダミ抽出物由来の成分の残存量を分析した。

図4(a)にドクダミ抽出物を、(b)にドクダミ抽出物のヘッドスペースガスを、(c)にドクダミ抽出物を添加した水ようかんの酢酸エチル抽出液のクロマトグラムを示した。ピーク1-7はいずれのクロマトグラムにも認められ、かつ水ようかんから定量的に再抽出できることが確認された。また、これらのピークはドクダミ抽出物のヘッドスペースガスにも含まれることから揮発性を有しており、ドクダミ由来の香り成分と関連があると考えられた。そこで、ピーク1-7成分について水ようかん保存中の残存量を調べた。

図5に水ようかん保存中におけるドクダミ抽出物由来の成分の残存量の変化を示した。水ようかんを10で保存した場合には、ピーク4、7は保存前の80-85%に減少したが、その他のピークにはほとんど変化はなかった。30で保存した場合、ピーク5は30日間で約85%に減少し、ピーク4は、15日間で約40%、30日間で約25%に減少した。このように、30では、ピークにより減少の程度は異なるものの、どのピークも時間の経過と



**図4** ドクダミ抽出物及び水ようかんから再抽出したドクダミ抽出物のガスクロマトグラフィーによる分析  
 分析条件  
 カラム: CBP-20 ((株)島津製作所、I.D. 0.32mm×25m) 検出器:FID、線速度:44cm/sec、  
 注入口温度:250、検出器温度:250、分析温度:50 (2min) 10 /min 240 (2min)



**図5** 水ようかん保存中のドクダミ抽出物由来の成分の変化

■ 10、15日間保存後    ▨ 10、30日間保存後  
 □ 30、15日間保存後    □ 30、30日間保存後

ともに減少していくことがわかった。これらのピーク成分の減少は保存中に他の物質に変化したことによるものなのか、包材を透して揮散したことによるものかは不明である。30 で保存した水ようかんは官能的にもドクダミ由来の香りが弱くなっていることが認められたことから、水ようかんの風味に対してはよい影響を与えようと思えることができる。したがって、ガスバリア性が低い包材を選択することで、ドクダミ由来の成分を減少させて風味に対する影響を軽減できることが期待された。

#### 4. 結び

ドクダミ抽出物には独特の香りがあるため、過剰に添加することは困難であった。一方、ドクダミ抽出物が *B. subtilis* 芽胞の加熱殺菌を促進する効果は、リン酸緩衝液、するこのいずれにおいてもpHが低い程高かった。このこ

とから、適切なpH調整剤との併用で加熱殺菌効果を高めつつ、ドクダミ抽出物の添加量を減少させることが可能であると考えられた。また、適切なガスバリア性を有する包材と組み合わせれば、保存中にさらにドクダミ抽出物由来の好ましくない香りを弱めることが可能になると考えられた。

#### 文献

- 1) 長谷川撰、車谷佳恵、坂口絵美、藤井正人：愛知県産業技術研究所研究報告，1，124 (2002)
- 2) 近藤雅臣・渡部一仁：スポア実験マニュアル，技報堂出版，(1995)
- 3) 小菅卓夫：薬誌，72，1227(1952)
- 4) 小菅卓夫・磯谷遙：薬誌，73，435(1953)