

# 大麦糠ポリフェノール製剤の抗菌性試験†

恩田 匠・玉川 浩司\*・辻 政雄・木村 英生・長沼 慶太\*・荻野 敏

## Antibacterial Activity Test of Polyphenol Agent from Barley Bran

Takumi ONDA, Koji TAMAGAWA\*, Masao TSUJI, Hideo KIMURA, Keita NAGANUMA\* and Satoshi OGINO

### 要 約

大麦糠由来ポリフェノール製剤の抗菌性について、各種市販のポリフェノール製剤との比較検討を行った。大腸菌、病原性大腸菌、サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌を対象菌として、各ポリフェノール製剤の抗菌作用を調べた。その結果、大麦糠ポリフェノール製剤は黄色ブドウ球菌とサルモネラ菌に対して抗菌活性を示した。また、各ポリフェノール製剤の中では、緑茶ポリフェノールが比較的強い抗菌活性を示すことが分かった。

### Summary

Evaluation of antibacterial activity of four polyphenol agents was performed. Antibacterial activity of various polyphenol agents against *Escherichia coli*, pathogenic *E. coli* O-157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* were examined. As a result, polyphenol agent from green tea inhibited the growth of three tested strains except pathogenic *E. coli*. And, polyphenol agent from barley bran inhibited the growth of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*.

### 1. 緒 言

近年、赤ワインをはじめとして各種の農産物に由来するポリフェノール（以下、PPと略記）のもつ機能性<sup>1)</sup>が注目され、その食品への利用が積極的に進展している。特に、赤ワイン由来のPPはその健康保健上の機能<sup>2)</sup>が注目され、最近菓子類などにPPを添加した新製品が好調な売れ行きを示している。現在、赤ワイン以外に、緑茶、リンゴ、ブドウなどの農産物由来のPPにおいても、その製剤化が進み、各種の食品において、新製品開発などの観点からその利用が検討されている。

PPの機能性についてはいくつか挙げられるが、いわゆる有害な微生物に対する抗菌性についても注目が集められている。大麦糠由来PPは、搗精後の糠からエタノールにより抽出・精製されたものであり、既にその抗酸化性<sup>3)</sup>や抗変異原性<sup>4)</sup>については調べられているが、その抗菌性については検討されていない。一方、各種市販PP製剤の中では、緑茶由来のPPについては抗菌性を調べた報告<sup>5)</sup>があるが、その他のPPについての報告はみられなかった。

そこで、大麦糠PP製剤を主として各種市販PP製剤の抗菌性について比較試験を行った結果を報告する。

### 2. 実験材料と方法

#### 2-1 供試ポリフェノール

大麦糠由来PP（はくばく社製）、リンゴ由来PP（ポッカ社製）、緑茶由来PP（三井農林社製）、ブドウ由来PP（キッコーマン社製）を供試した。これらを50mMリン酸緩衝液（pH5.5）に各種の濃度に調製し、滅菌済みメンブランフィルター（0.45  $\mu$ m, 東洋ろ紙社製）でろ過滅菌して実験に用いた。なお、全ての製剤は、蒸留水に溶かしたとき、中性付近のpHを呈した。

#### 2-2 供試微生物と培養法

抗菌試験の指示菌として、大腸菌（*Escherichia coli*）、病原性大腸菌O-157（*E. coli* O-157:H7）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、サルモネラ菌（*Salmonella enteritidis*）を供試した。全ての指示菌の培養は、ニュートリエント培地（以下、N培地）を用い、好気的な条件下で培養した。一部の病原性菌は、山梨県衛生公害研究所から分与を受けた。

#### 2-3 抗菌性試験

抗菌試験<sup>6)</sup>は、液体培地での生育阻害を調べる方法と、寒天平板培地での生育阻害を調べる方法により行った。

##### 2-3-1 液体培地を用いる方法

N培地に等量の滅菌した各種濃度のPP溶液を添加した試

† 本研究は、平成10年度インキュベーター事業として実施された共同研究である。

\* (株)はくばく研究センター

Table 1 Effect of addition of four polyphenolagens on growth of tested bacterial strains in N-broth

Strains a)	Absorbance (660nm)			
	Barley PP <sup>b)</sup>	Apple PP <sup>c)</sup>	Cha PP <sup>d)</sup>	control <sup>e)</sup>
<i>E.coli</i>	0.30	0.40	0.19	0.39
<i>E.coli</i> O157	0.20	0.36	0.20	0.19
<i>Sal. enteritidis</i>	0.21	0.34	0.18	0.36
<i>Staphyl. aureus</i>	0.10	0.28	0.06	0.27
blank <sup>f)</sup>	0.04	0.07	0.05	0.08

a) *Sal*; *Salmonella*, *Staphyl*; *Staphylococcus*, b) Barley PP; polyphenol agent (PP) from barley bran, c) Apple PP; PP from apple, d) Cha PP; PP from green tea. e) control; no addition of PP. f) blank; no inoculation of bacterial strains.

験培地に、十分に生育した指示菌の前培養液を一白金耳量接種した。37℃で約18時間静置培養後、培養液の濁度(O.D.)を分光光度計で計測した。

### 2-3-2 平板培地を用いる方法

N培地にフィルター除菌した各種PP溶液を添加し、1.5%寒天を加えて寒天平板培地を作成した。この試験培地に、十分に生育した指示菌の前培養液をストリークカルチャーし、37℃約18時間培養後の生育の様子を肉眼で観察した。

## 3. 実験結果と考察

N液体培地を用いて、各PP製剤を1.0mg/ml濃度に調製した条件での抗菌試験の結果をTable 1に、N寒天平板培地を用いた同濃度での結果をTable 2に示した。

供試したPP製剤の中で、液体培地を用いる方法では、緑茶PP製剤が最も強い活性を示し、供試した大腸菌、サルモネラ菌およびブドウ球菌の生育を阻害した。特にグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に対して顕著な抗菌性を示すことが分かった。平板培地での抗菌試験でも、液体培地とはほぼ同様な結果が得られた。今回、平板培地を用いた抗菌試験では、緑茶PP製剤が唯一抗菌作用を示した。この緑茶PP製剤は、他の製剤と比較してPP含有量が高いことが推察され、そのため強い抗菌活性を示したことも考えられた。本緑茶PP製剤は、水に易溶であり、水溶液の清澄度も最も高く、食品への応用面で優れたPP製剤といえることが分かった。

大麦糠PP製剤は、黄色ブドウ球菌とサルモネラ菌に対して抗菌活性を示した。しかしながら、平板培地を用いた試験では、抗菌活性が認められなかった。

リンゴPP製剤は、液体培地と平板培地とも抗菌作用は全く認められなかった。本製剤は、原因は不明であるが、病原性大腸菌に対しては、むしろ生育促進効果を示した。

ブドウPP製剤は、液体培地中で沈殿物を形成したので

Table 2 Effect of addition of four polyphenolagens on growth of tested bacterial strains in N-agar

Strains	Growth condition a)			
	Barley PP	Apple PP	Cha PP	Grape PP <sup>b)</sup>
<i>E.coli</i>	++	+	+	++
<i>E.coli</i> O157	++	++	++	++
<i>Sal. enteritidis</i>	+	++	+	++
<i>Staphyl. aureus</i>	+	+	-	+

a) ++; good growth, +; weak growth, -; no growth b) PP from grape.

Other explanations were the same as Table 1.

液体培地での濁度計測は出来なかった。

ブドウ球菌は、各製剤で生育阻害が認められたことから、PPがグラム陽性菌の方により効力を有する可能性が考えられた。病原性大腸菌は、非病原性の大腸菌と比較して、各PP製剤に比較的耐性を持つことが分かった。

今回の抗菌性試験では静置培養を行ったが、液体培地を振盪培養すると全てのPP製剤で抗菌作用が認められず、各指示菌は良好に増殖した。また、ペーパーディスク法をはじめとする寒天平板拡散法<sup>9)</sup>では、抗菌作用が見いだせなかった。抗菌性試験は、指示菌の至適培養条件に近い環境で行うのが一般的な手法であるが、今回は希釈した液体培地であつ静置培養する、限定された特殊な条件下でのみ抗菌活性を検出するにとどまった。そのため実験の再現性も若干乏しい結果となった。また、各PP製剤とも、そのPP含有量が高くないため、抗菌作用が認められなかった可能性も考えられた。また、製剤中にPPと共存する物質との相互作用についても不明であった。

## 4. 結 言

大麦糠PP製剤は、大腸菌に対しては抗菌作用を示さなかったが、黄色ブドウ球菌とサルモネラ菌に対しては抗菌活性を示した。また、各製剤とも、液体培地での静置培養においてのみ、抗菌活性を確認した。今後は、PPの抗菌作用機構の解明と、抗菌活性の検出方法の確立を行う必要があると考えられた。

供試菌株を分与いただき、また病原菌の取り扱いについて技術的ご指導いただきました山梨県衛生公害研究所の金子通治博士に御礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) 津志田藤二郎：(株)日本食品科学工学会関東支部平成9年度大会講演要旨集, p.5 (1997)
- 2) 佐藤充克：醸協, 92, 96 (1997)

- 3) 玉川浩司・他：日食科工誌, **44**, 512 (1997)
- 4) Tamagawa, K. *et al.* : Biosci.Biotechnol. Biochem., **62**, 1483 (1998)
- 5) 原 征彦・渡辺真由美：日食工誌, **36**, 951-955 (1989)
- 6) (社)日本生物工学会編：生物工程基本操作：バイオアッセイ, 生物工学実験書, p.32, 培風館 (東京) (1995)