

卵白リゾチーム添加牛乳における細菌の抑制について

片岡 啓・中江 利孝

Inhibitory Effect by Egg White Lysozyme on Growth of Some Bacteria in Milk

Kei KATAOKA and Toshitaka NAKAE

Experiments were made on growth inhibition of *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis*, psychrotrophic bacteria and microflora in milk with egg white lysozyme in the concentrations of 0~0.1%.

Growth of *Bacillus subtilis* was inhibited during incubation for 24 h at 45°C in skim milk with 0.025~0.1% lysozyme. *Streptococcus lactis* was also inhibited in the concentrations of 0.05~0.1% lysozyme after incubation for 24 h at 35°C. The inhibitory effect increased with addition of lysozyme up to 0.1% concentration, and decreased with prolongation of incubation period to 72 h.

No appreciable inhibitory effect was observed in psychrotrophic bacteria and also in microflora in raw milk samples.

1922年 FLEMING によって発見されたリゾチームは広く天然物中に分布し、人および動物の組織、体液、分泌液などに存在している。特に鶏卵白中には多量(0.15~0.25%)に含有され、容易に結晶化されることから、その生理的、生化学的面から多数の研究が行なわれている¹⁾。鶏卵白リゾチームは分子量 14,388、等電点 10.5~11.0 の塩基性の酵素蛋白質であり、塩基性高分子物質としての特性の他に、その溶菌作用は一部のグラム陽性菌の細胞壁を構成するムコペプチドを解重合する作用にもとづくことが知られている。一方、リゾチームの利用は広範な分野にわたり¹⁾、特に畜産食品の領域ではその溶菌作用などにもとづく保存性の改良²⁾³⁾、さらにリゾチーム含量における人乳と牛乳の間にみられる大きな差⁴⁾に基因すると考えられる生理的効果の改善を目的とした乳児栄養への応用¹⁾⁵⁾⁶⁾など、すでに一部実用化の段階に至っている。さらに牛乳への余剰副産物としての鶏卵白の添加利用の研究⁷⁾もなされている。

このような背景から本報ではとりあえず、牛乳細菌に対してリゾチームがどの程度抑制作用を示すかを目的とし、*B. subtilis*, *S. lactis* および低温菌の3菌株、ならびに生乳を供試し実験を行なったのでその結果を報告する。

I. 実験方法

1. 供試菌株と菌液

高温菌として *Bacillus subtilis* 3026、中温菌として *Streptococcus lactis* No. 527 および低温菌として当研究室で集乳缶より 5°C で培養分離したグラム陰性桿菌 GN-51 (発育適温 29.4°C) を実験に供した。各菌株は加糖ブイヨン培地に 18 時間 (*B. subtilis* と *S. lactis* は

35°C, 低温菌は25°C) 接種培養し, 滅菌生理食塩水で10倍に希釈し供試菌液とした。

2. リゾチームによる細菌増殖の抑制試験

卵白リゾチーム (Sigma Chemical Co.) を滅菌脱脂乳に無菌的に0~0.1%量添加し, 上記菌液を1%量接種した。培養は各供試菌の発育適温を考慮して *B. subtilis* は45°C, *S. lactis* は35°C, 低温菌は25°Cとした。*S. lactis* と低温菌については通常の冷蔵温度である5°Cでの培養試験も行なった。また同時に, 本学附属農場で搾乳した生乳を試料として同様な実験を行なった。培養開始時から経時的に生菌数を測定しその抑制効果を判定した。

3. 生菌数の測定

標準平板培養法⁸⁾により, *B. subtilis*, *S. lactis* および生乳試料は35°C, 48時間, 低温菌は25°C, 72時間培養後発生集落を測定し, 試料1ml中の生菌数を求め対数値として図示した。なお培地はDifcoの標準寒天培地を使用した。

II. 実験結果

リゾチーム濃度, 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 および0.1%を含有する脱脂乳中の各供試菌ならびに生乳中の細菌の経時的な生菌数の推移はFig. 1~4に図示した。

1. *B. subtilis* での実験成績

Fig. 1に45°Cで培養した結果を示す。培養開始時にすでにリゾチーム無添加の対照区に比較し, 0.05%以上のリゾチーム濃度区分で生菌数の減少が認められた。これは菌数測定時にすでにペトリ皿中で受けたリゾチームの抑制作用によるものと考えられ, 0.025%以下の濃度区分では差が認められなかった。これに対し培養24時間後では, リゾチーム濃度0.025%以上の区分でいずれも培養開始時に比較して生菌数の減少が観察された。培養48時間以後では, 0.1%区分のみは更に生菌数の減少を示したが, 他の区分ではすべて対照区のそれに接近した菌数に回復した。

2. *S. lactis* での実験成績

Fig. 2に示すごとく35°Cに培養した場合, 培養24時間後には, リゾチーム濃度0.05%区分で対照区に比較し若干増殖速度に遅延が観察され, 0.075%以上で明らかに生菌数の減少をきたした。しかし, 0.025%以下の濃度ではほとんど影響が認められなかった。培養48時間後には, 0.075%以上の濃度区分の菌数は増加したが対照区のそれには至らなかった。

一方, 5°Cに培養した場合は, リゾチームの添加の有無にかかわらず, 生菌数の増加はほとんど認められなかった。培養開始時における菌数の差は, 菌数測定時の影響と考えられるが, リゾチーム含量0.1%区分では培養開始時に比較して, 培養の経過に伴って菌数の減少が観察された。

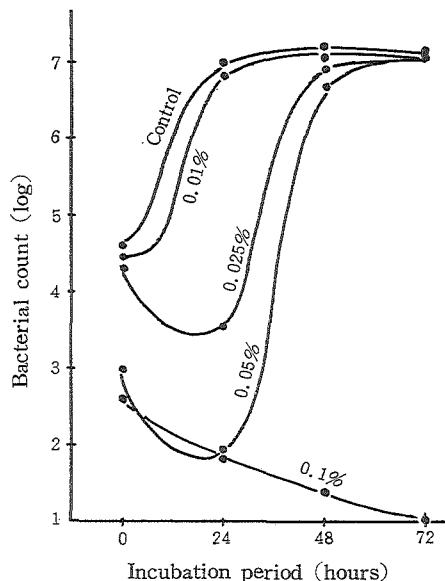


Fig. 1. Effect of Lysozyme on Growth of *B. subtilis* at 45°C in Skim Milk

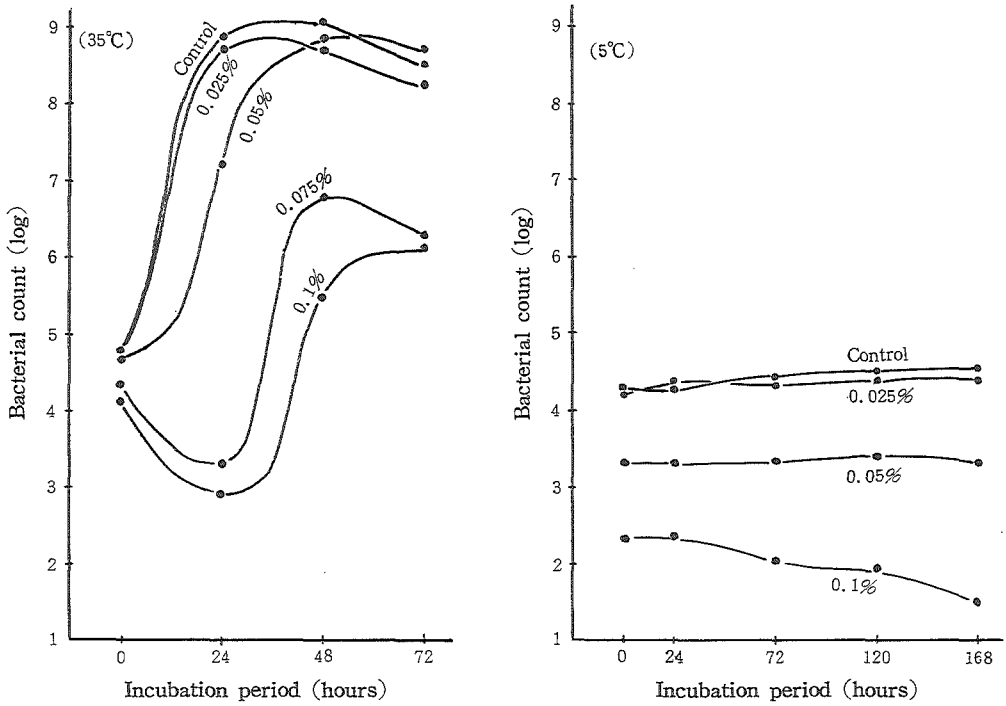


Fig. 2. Effect of Lysozyme on Growth of *S. lactis* at 35°C and 5°C in Skim Milk

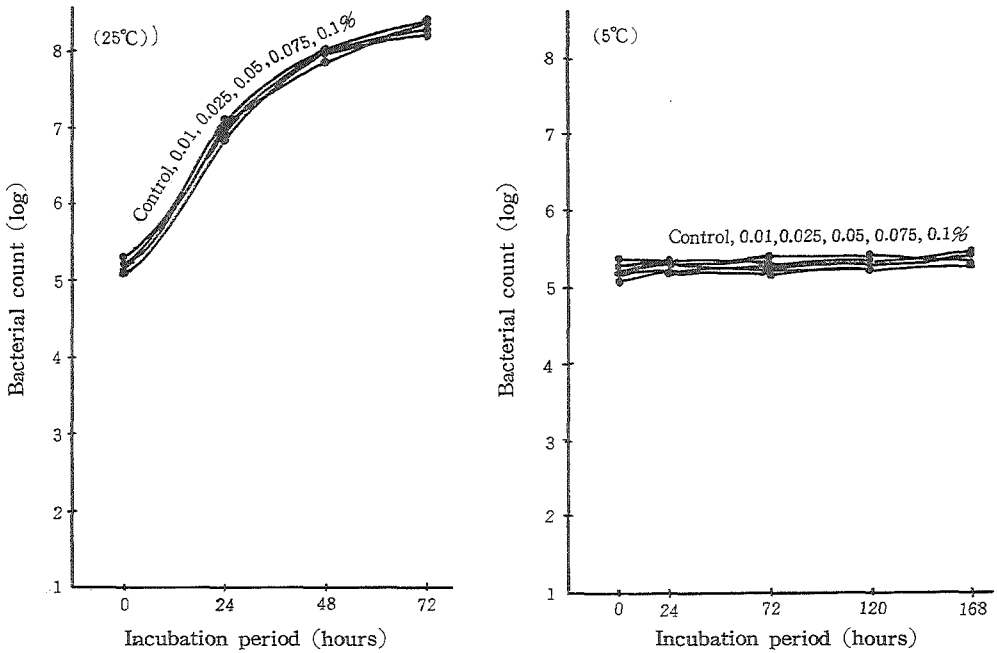


Fig. 3. Effect of Lysozyme on Growth of Psychrotrophic bacteria at 25°C and 5°C in Skim Milk

3. 低温菌での実験成績

低温菌の場合は上記の2菌株と異なり、Fig. 3に示すごとく、25°C培養において各リゾチーム区分とも対照区との間に生菌数の相違はまったく認められず、ほぼ一定した増殖曲線を示した。さらに5°C培養の場合においても同様にリゾチームの影響は認められなかった。

4. 生乳での実験成績

35°Cでの培養の結果はFig. 4に示すごとく、リゾチーム濃度0.075%以下の区分ではほとんど生菌数に対する影響は認められず、対照区に近似した増殖曲線を示した。

III. 考 察

リゾチームによって溶解される細菌は *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus subtilis*, *B. megatherium*, *Sarcina lutea*, *Sar. flava*, *Achromobacter fisheri*, Thermophilic bacterium 2184株などのグラム陽性菌の一部が知られている⁹⁾。しかし、最近では *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandi*などのグラム陰性菌も EDTA の存在下あるいは微アルカリ性下において溶菌されることが知られている¹¹⁾¹⁰⁾。また各種乳酸菌における報告¹¹⁾もみられる。

本実験は脱脂乳中における各供試菌および生乳中の細菌群の増殖に対するリゾチームの抑制効果を調べたが、その結果、*B. subtilis* と *S. lactis* に対して抑制効果を示すことが認められた。その効果はリゾチームの濃度が大きくなるにつれて大きくなった。すなわち *B. subtilis* においてはリゾチーム濃度0.025%以上、*S. lactis* においては0.05%以上で抑制効果が認められた。しかし両菌株に対する感受性の差は培養温度が異なるため明らかにできなかった。

B. subtilis については、上記のごとく典型的なリゾチーム感受性菌であることが知られており、赤司の研究報告¹²⁾にもみられる。しかし本報の結果は彼等のそれと若干異なり、その抑制効果はより高い濃度区分(0.025%以上)において観察され、0.01%以下の濃度ではほとんど影響が認められなかった。これは試験に供したリゾチーム標品あるいは接種菌量の相違も考えられるが、特に培地の相違とその代謝産物の蓄積等に関連する要因によることが推察された。また同時に経時的な生菌数の減少とその後の回復現象の観察されることも相違点であった。*S. lactis* の場合においても抑制効果が認められると同時に、同様な現象が観察された。これは一般にリゾチームの至適 pH が6~7であること¹³⁾から推察して、菌の増殖に伴う酸の生成により当然その pH は酸性側に移行し、酵素活性の減退することが考えられる。したがって、特定の条件のもとでは抑制効果と増殖作用のバランスの転換により、ある時点から急激に

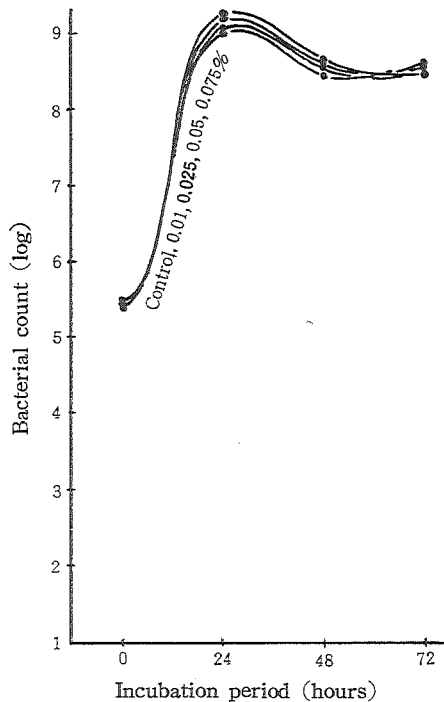


Fig. 4. Effect of Lysozyme on Growth of Bacteria at 35°C in Raw Milk Sample

増殖が起るための現象であろうと考えられる。この点、*B. subtilis* におけるアルカリの生成の場合にも同様な現象の現われることが推察される。このことは、Fig. 1 および Fig. 2 にみられる培養開始時の生菌数の相違が、リゾチーム濃度10分の1における至適 pH 範囲内、すなわち代謝産物を含有しない脱脂乳の pH での抑制効果に相当するものと考えられ、その濃度は赤司らの結果¹²⁾ と近似し非常に低いこと (*B. subtilis* の場合 0.005~0.01%) からいえる。

S. lactis は通常の冷蔵温度である 5°C に培養した場合、菌の増殖はほとんどみられなかったが、リゾチーム濃度 0.1% 区分では経時的にリゾチームの抑制作用にもとずくと考えられる菌数の減少が観察された。しかし 0.075% 以下の濃度区分では、35°C に培養した場合とは異なりほとんどその影響は認められなかった。これはリゾチームの至適温度範囲¹³⁾ (26~52°C) から推察して当然の結果であろうと考えられる。

低温菌に関しては、明らかにリゾチームの活性を示すと考えられる培養温度 25°C においても、リゾチームの抑制効果はまったく認められなかった。これは一般にリゾチーム感受性菌がグラム陽性菌に多く、グラム陰性菌に少ないといわれる¹⁴⁾ ことから、本菌が上記の *B. subtilis* および *S. lactis* と異なりグラム陰性桿菌であったことから納得できる結果であった。5°C に培養した場合も同様な結果が得られた。

これらに対し、*S. lactis* と同様 35°C に培養した生乳における実験においては、ほとんどリゾチームによる抑制効果が認められなかった。しかし、生乳に分布すると考えられる細菌の性状から推察して、菌種によってはその増殖が抑制されることも考えられ今後検討を進める問題である。

要 約

牛乳の代表的な高、中および低温菌とみられる *B. subtilis*, *S. lactis* およびグラム陰性の低温性桿菌の3菌株を供試し、脱脂乳中における卵白リゾチームの抑制効果を検討した。

B. subtilis は 45°C, *S. lactis* は 35°C で 24 時間培養後、それぞれリゾチーム濃度 0.025% および 0.05% 以上で抑制効果が認められた。そしてリゾチーム濃度 (0~0.1%) の高いほどその効果は大きかったが、培養の経過に伴なって抑制効果は減退した。

低温菌は 25°C に培養した場合、リゾチーム濃度 0.1% でもまったく抑制効果は認められなかった。また自然汚染状態の生乳について別に行なった実験においても、抑制効果が認められなかった。

文 献

- 1) 松岡芳隆 (1971): 栄養と食糧, 24 (6), 311—316.
- 2) 赤司 景 (1969): 日畜会報, 40 (6), 243—248.
- 3) 赤司 景 (1970): 日畜会報, 41 (3), 143—150.
- 4) CHANDAN, R. C., PARRY, R. M. Jr. and SHANI, K. M. (1968): J. Dairy Sci., 51 (4), 606—607.
- 5) 祐川金次郎, 山田尚達, 他 (1967): 栄養と食糧, 20 (1), 45—51, 52—61, 62—68.
- 6) 鈴木裕克, [北原稔也, 山岸三千男, 岬 哲夫, 沢田二郎 (1966): 日児誌, 70 (4), 368—372, (9), 861—866.
- 7) 佐藤 泰, 中村 良 (1961): 日畜会報, 32 (5), 279—285.
- 8) 中西武雄 (1967): 牛乳と乳製品の微生物, 地球出版, 229—236.
- 9) 植村定治郎, 福見秀雄, 柳田友道 (1960): 微生物生理学, 846—848, 朝倉書店・東京.

- 10) MOUSTAFA, HASSAN H. and COLLINS, E. B. (1969) : *J. Dairy Sci.* 52 (3), 335—340.
- 11) BROWN, W. C., SANDINE, W. E. and ELLIKER, P. R. (1962) : *J. Bacteriol.* 83 (3), 697—698.
- 12) 赤司 景 (1968) : 食衛誌, 9 (2), 97—104.
- 13) 赤堀四郎 (1956) : 酵素研究法, II, 153—161, 朝倉書店・東京.
- 14) 松島祥夫 (1967) : 化学と生物, 5 (5), 258—263.