[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.68, No.1, pp.41~46, 1994]

グルコース-グルコースオキシダーゼ混合系による細菌生育の抑制

飯 淵 貞 明

(和洋女子大学文家政学部)

平成5年7月9日受理

Inhibition of Bacterial Growth in Glucose-Glucose Oxidase Mixture

Sadaaki IIBUCHI

Wayo Women's University, 2-3-1 Konodai, Ichikawa, Chiba 272

Bacterial growth is inhibited in a glucose-glucose oxidase mixture due to hydrogen peroxide produced in the mixture. When the initial concentrations of glucose and the enzyme are chosen appropriately, the concentration of hydrogen peroxide will be kept low to inhibit bacterial growth, and can easily be reduced to zero whenever it must be removed. For investigation of the practicality of this method, *Escherichia coli* K12 was cultivated in a meat extract medium that contained glucose and the enzyme. The lag-time of growth of *E. coli* changed depending on the initial concentrations of glucose and the enzyme, but the growth rate in the logarithmic growth phase was not affected. The effect of lag-time elongation was expressed by a mathematical model. Lag-times computed with the model were in fair agreement with the results of cultivation experiments. By use of the model, suitable minimum initial concentrations of glucose and the enzyme to inhibit microbial growth for the desired period could be calculated. The method was effective when tested on pasty foods. (Received July 9, 1993)

緒 言

グルコースとグルコースオキシダーゼ（以下、たんに酵素とも）が共存する系では、発生する過酸化水素のために細菌の生育が抑制される。このときグルコースと酵素の初期濃度を適当に選べば、細菌の生育を抑制する最小限度の過酸化水素を持続的に発生させることができる。過酸化水素濃度を一定濃度以下にコントロールできれば、この系を食品材料の保存に応用することも可能である。上のような考えを検証するために、肉エキスを培地にグルコースと酵素を加え、大腸菌 *E. coli* K12 を培養したところ、菌生育の誘導期間がグルコースと酵素の初期濃度に応じて長くなった。誘導期間（以後、抑制時間とも）が終わって対数増殖期にはいった後は、生育速度、最終菌濃度とも、酵素量にかかわらず対照（酵素のみを除いた培地）と同じであった。グルコースと酵素の初期濃度による抑制時間の延長効果を推定するモデルを作って計算した結果と、実験によって得られた結果は良い一致を示し、モデルの有効性が確かめられた。このモ

デルを使えば、所要の生育抑制時間を得るための、グルコースと酵素の最低初期濃度を求めることができる。この方法をペースト状食品に応用した場合にも、菌生育の抑制効果が確認できた。

実験材料・方法

1. 大腸菌 *E. coli* K12 株をブイヨン寒天培地に植えついで用いた。培地組成は4. に述べるブイヨン培地に寒天2%を加えたものである。
2. グルコースオキシダーゼ オリエンタル酵母工業社製の精製酵素（微生物起源、和光純薬発売）を用いた。純度は400 unit/mg. ただし1 unitは十分量の基質存在下に、25°Cで1 μ mol/minの速度で生産物を作る酵素量である。 K_m 値は80 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）中で、飽和量の酸素濃度、0.001~1 Mのグルコース濃度で測定して、8.54 [mM]=1.52 [g of glucose/l]である⁽¹⁾。*P. notatum* (K_m =9.6 mM), *P. amagasakiensis* (11.5 mM), *A. niger* (11 mM) 起源の酵素もほぼ同じ程度の K_m 値である⁽²⁾。2000 unit（約5 mg）の精製酵

図 1 大腸菌 *E. coli* K12 の培養器

素粉末に増量剤として 2.00 g の乳糖を加えてよく混和し、1 unit/mg の粉末とする。これを所定濃度に応じて培地に溶解した。なお乳糖はグルコースオキシダーゼの基質にはならない⁽³⁾。

3. 溶存酸素の測定 下に述べるブイヨン培地に酸素電極を挿入して測定した。東亜電波工業 DO-20 A。

4. 培養方法と菌濃度測定方法 図1のように綿栓を通してサンプリング用のテフロンチューブをセットした 500 ml 容三角フラスコに、栄研化学(株)の普通ブイヨン(肉エキス 3 g, ペプトン 10 g, 塩化ナトリウム 5 g, 水 1 l, pH 7.0. 以下、たんにブイヨン培地) 300 ml を入れ、120°C で 10 分間殺菌する。殺菌終了後、室温まで冷えるのを待って所定量のグルコース、酵素、および種培養の大腸菌 1.0 ml を加える。30°C で静置培養し、適当な時間間隔をおいて、よく攪拌した後チューブを通じてサンプリングした。菌濃度は濁度で表した(濁度計コロナ電気社製 UT-11)。ここで濁度の 1 unit は精製カオリン 1 mg/l の水懸濁液の濁りである。種培養はブイヨン培地 10 ml (試験管) に 1 白金耳の大腸菌を接種し、30°C で 12 時間培養したものである。

5. ペースト状食品による培養と生菌数の計数 市販の晒し鰯、マッシュポテト(ともに乾燥粉末) 1 g に対してブイヨン培地(グルコース 1 g/l, 酵素 0.4 unit/ml, 種培養 3.3 ml/l を含む)を 4 ml 加えて柔らかく固まる程度の固さに練る。これを 1 g ずつラップ材で包んで 30°C で培養する。培養後、滅菌水 20 ml に分散し、2000 rpm で 10 分間遠心分離した上澄を、適宜滅菌水で希釈してデスオキシコレート寒天培地上(栄研化学)にまいた。30°C で 5~48 時間以上培養した後コロニーの数

を数えてペースト 1 g 中の生菌数を求めた。コントロールは酵素なしで、他はまったく同様にした。なお同一条件の試料は、少なくとも 5 試料として生菌を計数した。

生育抑制のモデル

培養液中の各成分の増減速度を次のように表した。

酵素 E の失活

$$dE/dt = -k_E E \quad (1)$$

グルコース G の消失と過酸化水素 H の生成

$$\begin{aligned} -dG/dt &= a(dH/dt)_{\text{生成}} \\ &= \frac{k_G E G (O_{\text{dislv}}/O_{\text{MAX}})}{K_m + G(O_{\text{dislv}}/O_{\text{MAX}})} \end{aligned} \quad (2)$$

過酸化水素 H の生成と消失

$$\begin{aligned} dH/dt &= (dH/dt)_{\text{生成}} - k_H H \\ &= -(dG/dt)/a - k_H H \end{aligned} \quad (3)$$

菌濃度 N の増減

$$dN/dt = kN - k_N H N \quad (4)$$

(1) 式について

酵素の失活は pH, 基質グルコースの有無に大きく左右され、高い pH (たとえば pH 8) では不安定、グルコースが共存すれば安定性が増す⁽²⁾という報告がある。また菌の増殖にも影響を受ける可能性がある。しかし、ここではそれらの影響をすべてひとまとめにして表した。ここで E は [unit/ml] で表した酵素濃度。k_E は失活速度定数 [h⁻¹]。A. niger 起源のグルコースオキシダーゼが pH 2.6 (コーラ飲料), pH 3.2 (グレープ飲料) で 100 時間後に 50% 以上の活性が残っていたという報告がある⁽²⁾。この場合 k_E は 0.007 [h⁻¹] 程度となる。本実験の場合、初発濃度 0.2, 0.4 [unit/ml] の酵素が前者は 25 時間、後者は 50 時間前後菌の育成を抑制していたデータがあるので、抑制効果がなくなった時点では有効酵素濃度が同じになっていたと仮定すると 0.2 exp(-25 k_E) = 0.4 exp(-50 k_E)、したがって k_E ~ 0.028 [h⁻¹] となる。初期条件は t=0 で E=E(0)。実験では酵素の初濃度は E(0)=0~2 [unit/ml] で変動させた。

(2) 式について

グルコースの減少速度 dG/dt [(g/l)/h] は過酸化水素の生成速度 (dH/dt)_{生成} [(g/l)/h] の符号を変えたものとする。ただし a はモル濃度を重量濃度に変換するための係数で a=180/34。

モデルを簡単にするために、酵素 E がグルコース G,

溶存酸素 O_{dislv} と、逐次反応ではなく一段の反応で酵素-基質複合体を作ると仮定し、かつ dG/dt はミハエリス・メンテン式に従うとすれば(2)式が得られる。 K_m は溶存酸素 O_{dislv} [g/l] が十分に存在する条件で測定されたものであるから、酸素濃度は最大溶存酸素濃度 O_{MAX} との比で表した。 $O_{\text{dislv}}=O_{\text{MAX}}$ のとき dG/dt を左右する基質濃度は G のみとなる。

培養液に酵素と種培養を加え静置すると数分後には $O_{\text{dislv}}/O_{\text{MAX}}$ は 0~0.02 ($O_{\text{MAX}} \sim 8$ ppm として) となる。培養中は測定記録できなかったが静置培養であるから、酵素と菌が働いている限り O_{dislv} が大きくなるとは考えられない。菌をサンプリングするときには培地を攪拌したが、静置後 1 分以内に O_{dislv} は元の値まで減少するので、培養期間を通して $O_{\text{dislv}}/O_{\text{MAX}}=0.01$ とした。

$k_G E$ はグルコースの酸化速度の最大値であるから、

$$k_G E = E [\mu\text{mol of glucose}/(\text{ml min})]$$

$$= 10.8 E [\text{g}/(\text{l h})]$$

ただし E は [unit/ml] で表した酵素濃度。 K_m は前述の通り 1.52 [g/l]。 $t=0$ で $G=G(0)$ 。実験ではグルコースの初濃度は $G(0)=0 \sim 2$ [g/l] で変動させた。

結局(2)式は次のように書ける。

$$\begin{aligned} dG/dt &= -(180/34) (dH/dt)_{\text{生成}} \\ &= -\frac{10.8 EG}{152+G} \end{aligned} \quad (5)$$

(3) 式について

過酸化水素 1 mol はグルコース 1 mol の酸化によって生じ((3)式右辺第一項)、菌を含む被酸化物に酸素を与えて水となる(第二項)。被酸化物は培地中に十分存在するから(肉エキス、ペプトン、菌体)、過酸化水素の減少速度は過酸化水素濃度のみによるとした。 k_H [h^{-1}] は過酸化水素の減少速度定数であるが、本実験ではその値を推定する手掛かりがないので、実験値と計算値が合うように適当に定めた。 $t=0$ では過酸化水素は発生していないから $H=H(0)=0$ 。

(4) 式について

菌濃度 N [unit of turbidity] の変化速度は、 N 自身に比例して増加する項と、 $H \times N$ に比例して減少する項の和と考える。培養終期には、基質(肉エキス、ペプトン、グルコース)の減少によって増殖速度が下がるのであるが、本実験の興味の対象は誘導期間の延長であって、菌濃度の低いときを扱うのであるから、 N が最大値

に近づいた時期については考慮しないこととした。 k は増殖速度定数 [h^{-1}] で、後述するように 0.17 [h^{-1}] 程度の大きさである。 k_N は過酸化水素による菌の死滅速度定数 [turbidity $\cdot$ (g of hydrogen peroxide/l) $^{-1} \text{h}^{-1}$]。食品衛生法によると昭和 55 年 9 月までは過酸化水素は殺菌料として広く用いられ、その使用基準はうどん、かまぼこ、ちくわで 100 ppm、その他の食品で 30 ppm であった(現在は「最終食品完成前に分解または除去しなければならない」)。いま 30 ppm = 0.03 [g/l] で菌の生育抑制効果があると解釈すると、(4)式で $k_N \times 0.03 N > 0.17 N$ 。したがって $k_N > 5.7$ となる。ここでは $k_N = 6$ として計算した。初期条件は $t=0$ で $N=N(0)$ 。実際には種菌の接種直後 $N(0)=1 \sim 3$ であったが、多くの場合 1 に近い値であったから、計算する場合は $N(0)=1$ とした。 $N(t) > 10$ になった後に生育を停止した例はなかったところから、 $N(t) > 10$ になった時点で生育抑制効果がなくなったものとして、 $t=0$ からそれまでの時間を生育抑制時間とした。また上のモデルでは菌濃度が 0 になることはないから、長時間培養を想定して計算すれば H がきわめて小さくなり、 N は必ず大きくなる。しかし実際にはある条件では菌は死滅して、以後の増殖はみられない。今回は $N(t) < 0.1$ (初期濃度の 1/10) になった時点で菌は全部死滅したとして、以後の増殖はないものとした。

(1)~(4) 式を次のようにして解く。(1) から

$$E(t) = E(0) \exp(-0.028 t) \quad (6)$$

ただし $E(t)$ は $t=t$ のときの E の値。(5) から

$$(152/G+1)dG = -10.8 E dt$$

$$\therefore 152 \times \ln[G(t)/G(0)] + [G(t) - G(0)]$$

$$= -10.8 \int E dt$$

$$= (10.8/k_E) \int dE$$

$$= 386[E(t) - E(0)] \quad (7)$$

ただし $G(t)$ は $t=t$ のときの G 。(6) 式の $E(t)$ を(7)式に代入して、(7)を成り立たせる $G(t)$ を求める。こうして求めた $E(t)$ 、 $G(t)$ を(5)に代入して、

$$dG(t)/dt = G'(t) \text{ を求める。}$$

$$dG(t)/dt = G'(t)$$

$$= -(180/34)(dH/dt)_{\text{生成}}$$

$$= -\frac{10.8 E(t) G(t)}{152+G(t)}$$

上の式で時間 $t-1$ と t における $G'(t)$ を求め、時間

$t-1$ から t までは $G'(t)$ は一定値 (対数平均値) G' だと仮定すれば,

$$G'(t) = \text{一定} = G' = \frac{G'(t-1) - G'(t)}{\ln[G'(t-1)/G'(t)]}$$

上の G' を (3) 式に代入して H について解けば,

$$H(t) = [H(t-1) + G'/ak_H] \exp(-k_H t) - G'/ak_H$$

上の式で時間 $t-1$ から t までは $H(t)$ は一定値 (算術平均値) H_0 だと仮定すれば,

$$H(t) = \text{一定} = H_0 \\ = [H(t) + H(t-1)]/2$$

上の H_0 を (4) 式に代入して N について解けば,

$$N(t) = N(t-1) \exp[0.17 - 6H_0] \quad (8)$$

上の手順を $t=1$ から繰返せば ($t=0$ のときは初期条件) 各成分濃度の時間変化がわかる. このとき未知の定数は k_H だけであるから, 計算値が実験値に合うように定めた.

実験結果と考察

1. 酵素の菌生育抑制効果

ブイヨン培地 ($G(0)=2.0$) にいくつかの酵素初濃度で菌を植えた場合の増殖曲線を図 2 に示す. 図 2 の左端, $E(0)=0$ [unit/ml], $G(0)=2$ [g/l] の線上には, $E(0)=0$ で $G(0)=0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0$ の実験点, $G(0)=0$ で

図 2 大腸菌 *E. coli* K12 の増殖曲線. —○—, グルコース初期濃度 $G(0)=2$ [g/l], グルコースオキシダーゼ初期濃度 $E(0)=0$ [unit/ml]; —□—, $G(0)=2$ [g/l], $E(0)=0.2$ [unit/ml]; —△—, $G(0)=2$ [g/l], $E(0)=0.4$ [unit/ml]; —◇—, $G(0)=2$ [g/l], $E(0)=0.8$ [unit/ml].

$E(0)=0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0$ の実験点も乗るのであるが, 繁雑を避けるため上述 ($E(0)=0, G(0)=2$) の組合わせの実験点のみを示した. このとき最大菌濃度は酵素量では変わらなかったが, グルコース濃度には影響され, グルコース 1 [g/l] について濁度にして約 50 大きくなる. 図 2 から ①グルコースあるいは酵素がない場合は誘導時間は 0 時間である, ②グルコース濃度は増殖速度に影響しない, ③酵素はグルコースと共存すれば誘導期間を延長する効果があるが, 増殖速度, 最大菌濃度には影響しない, ④増殖速度定数は $k=0.17$ [h^{-1}] である, 等のことがわかる.

仮に誘導期間の終わった時点で酵素の菌抑制効果がなくなったものとする $0.2, 0.4$ [unit/ml] の初期濃度が, 25, 50 時間で有効濃度以下になったのであるから $k_E=0.028$ [h^{-1}]. ただし, 誘導期間の終了は酵素活性のみで決まるわけではないから, この k_E の値は計算を行うための仮のものである.

2. グルコース, 酵素の初濃度と抑制時間

図 2 で対数増殖期と誘導期間をそれぞれ半対数グラフ上で直線で表し, 交点までの時間を抑制時間とする. 初期グルコース濃度と酵素濃度のさまざまな組合わせで抑制時間がどう変化するかを示したのが図 3 である. 図中の数字は培養実験における抑制時間 [h]. 点線はモデル (1)~(4) 式において, $k_H=0.18$ としたとき (他の定数の値はすべて上に述べたものを使う), $N>10$ にな

図 3 グルコースと酵素の初期濃度による生育抑制時間延長効果. 数字は培養実験による生育抑制時間 [h], 点線は計算による抑制時間 (丸囲み数字) が同じになる点をつないだもの, × は計算上菌が死滅する条件.

るまでの時間が同じになる点をつないだものである。各点線が表している時間は点線の端に丸囲み数字 [h] で示してある。図中の×印は $N > 10$ になる前に $N < 0.1$ になった組み合わせ、つまり菌が死滅する組み合わせを示している。モデルによれば長時間培養を続ければいつかは $N > 10$ になるのであるが、その前に $N < 0.1$ になれば、以後は菌の生育はないものとした。

図3を見ると実験値とモデルによる計算値はかなりよくあっていることがわかる。このことはモデル(1)~(4)式が実際によく表していることを示している。計算上菌が死滅する組み合わせでは(図の×印)、実際の培養でも常に100時間以上の生育抑制がみられた。大部分のサンプルは100時間で培養を打ち切ったので、菌が完全に死滅したかどうかは不明であるが、培養を続けたいくつかのサンプルはすべて300時間を越えても生育はみられなかった。酵素、またはグルコースがないもの(図2の両軸上の組み合わせ)は実験でも計算でも抑制時間は0時間であった。計算によればグルコースが1[g/l]以上あるときは、酵素濃度がきわめて小さくても(たとえば 1×10^{-9} unit/ml) 10数時間の抑制効果があることになっている。このとき過酸化水素濃度は0.1~1 ppmである。過酸化水素濃度が低いことは後処理に要するコストが低くなることを意味するし、酵素濃度が低ければ酵素費が少なくなることになるので、実用上の観点からすれば、このような条件が興味のあるところとなる。

3. 各速度定数の値と生育抑制のパターン

K_m , k_G , O_{dislv}/O_{MAX} , k および抑制時間の終わるときの N の値 ($N > 10$) は多少とも実験的な根拠がある値であるから変動しないものとする。 k_E , k_H , k_N , $N(0)$, および菌の死滅するときの N の値 ($N < 0.1$) は計算にあたって仮定した値である。これらを変動したとき、図3のパターンがどう変わるかを調べた。

k_E が大きくなることは酵素が急速に失活することを意味している。したがって k_E が大きくなるにつれて抑制時間が短くなり、×印は現れにくくなる。図3に即していえば、図中の点線や数値はそのまま、横軸のスケールだけが縮小されたような図になる。 k_E が小さくなれば逆の傾向が現れる。

k_H と k_N は N に対して逆の効果がある。 k_H が大きいことは発生した過酸化水素が速やかに消失することを意味するし、 k_N が大きいことは低濃度の過酸化水素でも菌の死滅に有効であることを意味している。したがって

k_H が大きい、あるいは k_N が小さいときは抑制時間が短くなり、逆の場合は長くなる。両者の比 k_H/k_N が同じときは類似したパターンが得られる。たとえば図3の点線は $k_H/k_N = 0.18/6$ の場合の計算線であるが、 $k_H/k_N = 1.8/60$ としてもよく似たパターンが得られる。 $k_H/k_N = 0.018/0.6$ とすると菌の死滅速度定数 k_N が小さいことが効いてくるので、抑制時間が短くなって×印が出なくなるが、このままの比率で k_N をやや大きくすれば図3に類似したパターンが得られる。

初発菌濃度 $N(0)$ は1として計算したが0.1~10まで図3のパターンにはほとんど影響しない。

菌の死滅の臨界値の仮定 ($N < 0.1$) を、さらに小さい値、たとえば $N < 0.001$ にすると×印の点に100時間、200時間という数値が現れるのであるが、実験によれば100時間(約4日)以上生育しなかったサンプルのうち、さらに培養を続けたすべてのサンプルで、その後生育が始まったものはないから、あまり長い誘導期間を計算値として示すのは現実的ではない。そういう意味では臨界値として $N < 0.1$ ではなく、誘導期間100時間以上という値を採用してもよい。

4. 培地成分の時間変化

初発濃度がグルコース 2[g/l], 酵素 0.4[unit/ml] のときのグルコースG, 酵素E, 過酸化水素H, 菌Nの時間変化の計算値を図4に示す。

図4の菌濃度 N の変化速度は実験(図2)に比べてか

図4 培地内成分濃度の時間変化の計算値。G, グルコース濃度[g/l]; E, 酵素濃度[unit/ml]; H, 過酸化水素濃度[g/l]; N, 菌濃度[濁度]。

なり小さい。このことは次のように説明することができる。菌濃度がある程度大きくなると、グルコース G と酸素 O_{dislv} の菌による消費が起こり、ともに(3)式の (dG/dt) を小さくする。前者の場合は (dG/dt) に酵素活性のみではなく、菌濃度 N とグルコース濃度 G に比例して減少する項 $-k_{\text{NG}}NG$ を加える必要があるし、後者の場合は O_{dislv} を N に逆比例させて $k_{\text{ON}}O_{\text{dislv}}/N$ としなければならない。ただし k_{NG} 、 k_{ON} は速度定数。また菌の生産するカタラーゼによる過酸化水素 H の消費も起きる。この場合は(3)式の $-k_{\text{H}}H$ を菌濃度にも比例させて $-k_{\text{NH}}NH$ とする必要がある(k_{NH} は速度定数)。いずれの場合も菌の濃度 N がある程度大きくなると、過酸化水素濃度 H を急速に小さくする効果があり、(4)式の $-k_{\text{N}}HN$ が0に近づくので、生育速度は実験値に近くなる。モデルとしてはどれを採用しても、速度定数に適当な値を与えれば計算値と実験値を近づけることができるが、ここではどれが最も実際にあっているかを判断する根拠がないこと、興味を中心に菌濃度の小さいとき、つまり上述の効果がまだ現れていない時期(抑制時間)の長さであることを考えて、上の要因はモデルには組み込まず、ここで示唆するに止めた。

5. ペースト状食品における細菌生育の抑制

晒し鰯、マッシュポテトにブイヨン培地、グルコース、菌を加えたときの酵素の効果を表1に示す。コントロール、酵素入りともサンプル数はシャーレ5枚である。表1によれば生菌数にばらつきはあるものの、酵素

表 1 ペースト状食品における菌生育抑制効果

培養 時間	晒 し 鰯		マッシュポテト	
	コントロール	酵素入り	コントロール	酵素入り
0 時間	$10^2 \sim 10^3$	$10^2 \sim 10^3$	$10^2 \sim 10^3$	$10^2 \sim 10^3$
12	$10^4 \sim 15^5$	0~10	$10^4 \sim 10^5$	0~10
24	$10^4 \sim 10^5$	0~10	$10^4 \sim 10^5$	0~10

数字は 1g のサンプル中の生菌数。

を添加したペーストは明らかに菌の生育が押さえられている。したがって液体培地だけでなく、ペースト状の培地(食品)にも本方法は有効であることがわかる。

要 約

- (1) グルコース-グルコースオキシダーゼ混合系では大腸菌の生育が抑制される。
- (2) 抑制効果は誘導期間の延長として現れ、増殖速度、最大菌濃度は影響されない。
- (3) 抑制のメカニズムを表す数式モデルを作り実験と比較した結果、良い一致がみられた。
- (4) 生育の抑制はペースト状食品でも認められた。

- (1) オリエンタル酵母工業添付資料。
- (2) D.Scott: in "Enzymes in Food Processing," 2nd ed., ed. by G.Reed, Academic Press Inc., New York, 1975, p.225.
- (3) M.Dixon and E.C.Webb: in "Enzymes," Longmans, Green & Co., Ltd., London, 1964, p.210.