

コーヒー,紅茶および緑茶飲料におけるBacillus属細菌の挙動

誌名	日本食品科学工学会誌
ISSN	1341027X
著者名	宮井,輝幸 秋山,正行 中川,稔 矢野,陽一郎 池田,三知男 市橋,信夫
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	59巻11号
掲載ページ	p. 591-594
発行年月	2012年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



コーヒー、紅茶および緑茶飲料 における *Bacillus* 属細菌の挙動

宮井輝幸^{1*}, 秋山正行¹, 中川 稔², 矢野陽一郎²,
池田三知男¹, 市橋信夫¹

¹ 森永乳業(株) 食品総合研究所

² 森永乳業(株) 分析センター

Behavior of *Bacillus* Bacteria in Coffee, Black Tea,
and Green Tea Drinks

Teruyuki Miyai^{1*}, Masayuki Akiyama¹, Minoru Nakagawa²,
Yoichiro Yano², Michio Ikeda¹ and Nobuo Ichihashi¹

¹ Food Research & Development Institute, Morinaga
Milk Industry Co., Ltd., 5-1-83, Higashihara,
Zama, Kanagawa 252-8583

² Analytical Research Center, Morinaga Milk Industry Co.,
Ltd., 5-1-83, Higashihara, Zama, Kanagawa 252-8583

The behavior of heat-resistant spore-forming bacteria (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, and *B. coagulans*) during storage in various coffee, black tea, and green tea drinks was investigated. Spores of each *Bacillus* species were inoculated into each drink. After heat pasteurization at the lowest condition under the Food Sanitation Act for soft drinks with \geq pH 4.6 (85°C, 30 min), viable bacterial counts under each optimum growth temperature were measured for two weeks. Viable counts of the three species of *Bacillus* inoculated into coffee, black tea, and green tea without milk decreased, whereas *B. cereus* and *B. subtilis* increased in coffee and black tea drink with milk. These results suggest that the commercial sterility of coffee, black tea, and green tea drinks without milk can be guaranteed with pasteurization of 85°C for 30 min, even if the *Bacillus* species is present.

(Received Mar. 30, 2012; Accepted Jul. 23, 2012)

Keywords : coffee, black tea, green tea, *Bacillus* bacteria, heat pasteurization

キーワード: コーヒー, 紅茶, 緑茶, *Bacillus* 属細菌, 加熱殺菌

長期保存可能なコーヒーや茶飲料 (pH 4.6 以上) の製造方法には, 無菌充填製法とレトルト製法がある。無菌充填製法では, UHT (Ultra High Temperature, 超高温短時間) 殺菌した飲料を, 過酸化水素などで殺菌した包材に無菌環境下で充填・包装する。そのため, 充填・密封後に飲料と包材の殺菌を同時に行うレトルト製法に比べて低温短時間の殺菌が可能であるが, 耐熱性芽胞の殺菌を考慮する必要がある。そのため, 一般的に 135~150°C 数秒間の殺菌条件

が適用されている¹⁾。しかし, コーヒーおよび茶飲料は加熱殺菌による香味の変化が大きいため^{2,3)}, より低温短時間での殺菌が望ましい。

食品衛生法において, コーヒーや茶飲料を含む pH 4.6 以上の清涼飲料水の殺菌基準は, 中心部を 85°C で 30 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で行うこと, と規定されている。この加熱殺菌条件は 115°C 1.8 秒間 ($z=10^\circ\text{C}$ として算出) に相当し, 法律上は 135~150°C で数秒間の殺菌は必ずしも必要とされない。ちなみに, pH 4.0 未満のオレンジジュースなどの飲料中ではほとんどの細菌は発育できないため, 発育可能なカビ, 酵母などを殺菌対象としている⁴⁾。その殺菌条件は, 中心部を 65°C で 10 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法となっている。一方で, コーヒーや茶飲料は pH 4.6 以上であるが, 抗菌性を有することが報告されており^{5)~13)}, それらの飲料中において耐熱性芽胞形成菌が増殖しない可能性がある。仮に, 135~150°C 数秒間より低温短時間の殺菌を行うことで耐熱性芽胞形成菌が生残しても, 賞味期限内に増殖しなければ製品の商業的無菌性を保証することができるため, 殺菌条件の変更が可能になると考えられる。

原らは, 紅茶, 煎茶およびウーロン茶飲料 (ストレートティー類, 牛乳無添加) にボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 芽胞を接種して一定期間保存し, 芽胞数の経時的増減を調べた。その結果, 煎茶以外は 1ヶ月以内に減少して死滅すること, 煎茶では 85°C 30 分間の加熱処理を加えると芽胞の死滅が促進されることを報告している⁹⁾。

一方, 無菌充填ロングライフ飲料製造においては, 病原性, 製造環境での常在性および耐熱性の観点から *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* は特に問題になると考えられる。しかし, 各種コーヒー, 紅茶, 緑茶飲料において, これら 3 菌種の生育挙動を調べた報告はない。

本研究の目的は, 各種コーヒー, 紅茶, 緑茶飲料に前述の *Bacillus* 属 3 菌種の芽胞を接種して, 85°C 30 分間の加熱処理を行い, 保存時の菌数の増減を検証することにより加熱殺菌条件の設定にとって有用な知見を得ることである。

1. 実験方法

(1) 各種試料の調製

コーヒーは, 浅, 中, 深煎り (それぞれの L 値は 23, 20, 17) のブラジル産アラビカ種 (*Coffea arabica*) No. 2-3 の焙煎豆 (東京アライドコーヒーロースターズ(株), 東京) 約 7.5 g から, Saeco Royal Professional コーヒーマシン (日本サエコ(株), 川崎) を用いてエスプレッソ (約 65 g, Brix 約 2.5°, 品温約 70°C) を抽出した。なお, 抽出には逆浸透膜処理水 (RO 水) を使用した。各抽出液は, 10°C に冷却後, RO 水を用いて飲用に適した Brix 1.5° に調整した。

紅茶は, スリランカ産茶葉 (ユニリーバ・ジャパン(株), 東京) を, 40, 70 および 100°C の RO 水 (茶葉の 20 倍量)

^{1,2} 〒252-8583 神奈川県座間市東原 5-1-83

* 連絡先 (Corresponding author), t-miyai@morinagamilk.co.jp

で3分間浸漬抽出した。なお、抽出中は各温度で保持した。各抽出液の特性値は、Brix約0.6°(40℃抽出)、約1.0°(70℃抽出)、約1.6°(100℃抽出)であった。各抽出液は10℃に冷却した後、RO水を用いて飲用に適したBrix0.35°に調整した。

緑茶は、国産茶葉((株)伊藤園、東京)を60℃のRO水(茶葉の50倍量)で6分間浸漬抽出し、緑茶抽出液(Brix約0.6°)を得た。なお、抽出中は60℃で保持した。抽出液は10℃に冷却した後、RO水を用いて飲用に適したBrix0.35°に調整した。

また、コーヒー(深煎り、pH5.6)、紅茶(100℃抽出、pH5.0)および緑茶(pH6.2)の各抽出液については、炭酸ナトリウムを添加してpHを7.0とした試料も調製した。なお、コーヒー、紅茶、緑茶由来の固形分(°Brix換算)は、pH調整していない試料と同じになるように調整した。

pH調整有無試料との比較対照として用いたオレンジジュース(pH3.8)は、ブラジル産濃縮冷凍オレンジ果汁(Brix64°、三井物産(株)、東京)をRO水にて果汁率100%相当(Brix11.0°)に希釈還元して調製した。

さらに、コーヒーおよび紅茶では、砂糖または牛乳を添加した試料も調製した。深煎りコーヒー抽出液および紅茶100℃抽出液を10℃に冷却し、砂糖(大日本明治製糖(株)、東京)2.5、5.0%を配合した。また、牛乳を配合する場合には、冷却した抽出液を炭酸ナトリウムによりpH7.0に調整した後、牛乳(森永乳業(株)、東京)15、30%を配合した。なお、コーヒーおよび紅茶由来の固形分(°Brix換算)は、砂糖や牛乳を添加していない試料と同じ(コーヒー:1.5%; 紅茶:0.35%)になるように調整した。

(2) 供試菌

耐熱性芽胞形成菌として、*B. cereus* JCM2152、*B. subtilis* ATCC6633 および *B. coagulans* NIAH-OSG-4 を用いた。

(3) 芽胞液の調製

B. cereus および *B. subtilis* は、普通寒天培地(栄研化学(株)、東京)の平板に塗抹し、35℃で培養した。*B. coagulans* は、Thermoacidurans 寒天培地¹⁴⁾(酵母エキス5g、プロテオースペプトン5g、デキストロース5g、K₂HPO₄4g、MnSO₄10mg、寒天20g、蒸留水1000gにて調製)の平板に塗抹し、45℃で培養した。芽胞の形成状態はグラム染色により確認し、約8割以上が芽胞となった時点で培養を終了した。各菌種の菌苔をループで採取し、それぞれ滅菌生理食塩水に浮遊させて十分攪拌したものを各菌種の芽胞液とした。

(4) 加熱処理

各実験区内において、各菌種と同じ芽胞液から1%量を各種試料に添加して、その添加試料液10mlを滅菌ガラス試験管に採取した。その後、85℃で30分間加熱処理し、室温まで水冷した。これを芽胞液添加試料とした。

(5) 保存後の菌数測定

芽胞液添加試料を各菌種の増殖至適温度付近(*B. cereus* および *B. subtilis* は35℃、*B. coagulans* は45℃とした)で14日間保存した。加熱直後、および3、5、7、14日間保存後の芽胞液添加試料を10段階希釈し、各段階希釈液を標準寒天培地(栄研化学(株))で混釈した。*B. cereus* および *B. subtilis* は35℃、*B. coagulans* は45℃で2日間培養し、菌数を算出した。なお、菌数測定は3回試行し、その測定平均値を図1、2に用いた。

2. 実験結果および考察

(1) pHの異なるコーヒー、紅茶および緑茶試料への接種実験

コーヒーや茶飲料での製品化において、風味特性や嗜好性の付与、または製造時や保存時の安定性付与のために、砂糖や牛乳あるいはpH調整剤を添加することがある。これにより、製品のpHは、コーヒーや茶抽出液本来のpH5~6からpH7付近まで幅広く存在することになる。そこで、pHの異なるコーヒー、紅茶および緑茶試料中における*Bacillus*属3菌種の挙動を調べた。その結果、*B. cereus*、*B. subtilis* および *B. coagulans* を添加した場合、いずれの試料でもpH調整の有無に関わらず菌数が減少し、14日後にはすべての菌種で検出限界以下(<5CFU/mL)となった。一方、対照のオレンジジュース試料(pH3.8)では菌数はほとんど変化しなかった。また、*B. coagulans* は、pH調整無しの試料では14日後に検出限界以下となったが、pH調整有り(pH7.0)では菌数が大きく減少し、3日後または5日後には検出限界以下となった(データ未掲載)。このことは、コーヒーや茶飲料がオレンジジュースとは異なり、pHの影響¹⁵⁾よりも強い菌の発育抑制効果を有することを示している。

(2) 焙煎度、砂糖および牛乳添加量の異なる各種コーヒー試料への接種実験

焙煎度、砂糖添加量または牛乳添加量が異なるコーヒー試料へ*Bacillus*属3菌種を接種した実験の結果を、図1で菌種別に示す。*B. cereus*の菌数は、浅煎り、中煎り、深煎り、砂糖添加および牛乳15%添加のコーヒー試料では経時に伴い減少したが、牛乳30%添加試料では増加した。また、焙煎度の異なるコーヒー試料を比べると、浅煎りでは14日後に、中煎りと深煎りでは7日後に検出限界以下となった。*B. subtilis*の菌数は、浅煎り、中煎り、深煎りおよび砂糖添加のコーヒー試料では経時に伴い減少したが、牛乳15、30%添加試料では増加した。また、焙煎度の異なるコーヒー試料を比べると、浅煎りでは14日後に、中煎りと深煎りでは7日後に検出限界以下となった。*B. coagulans*の菌数は、経時に伴いすべてのコーヒー試料において減少した。牛乳添加試料では5日後に、砂糖添加試料では7日後に、また、焙煎度の異なる各試料では14日後に検出限界以下となったが、深煎りは浅煎りや中煎りよりも速く減少する傾向がみられた。砂糖を添加したコーヒー

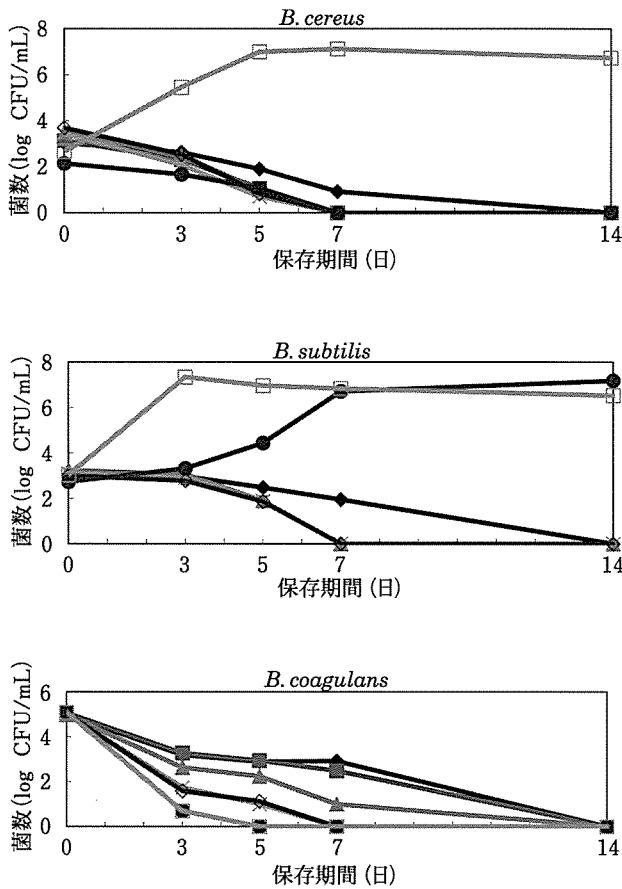


図 1 焙煎度，砂糖および牛乳添加量の異なるコーヒー試料中の *Bacillus* 属 3 菌種の菌数変化

◆, 浅煎り (pH5.0) ; ■, 中煎り (pH5.2) ; ▲, 深煎り (pH5.6) ; ×, 深煎り+砂糖 2.5% (pH5.6) ; ◇, 深煎り+砂糖 5.0% (pH5.6) ; ●, 深煎り+牛乳 15% (pH6.9) ; □, 深煎り+牛乳 30% (pH7.0).

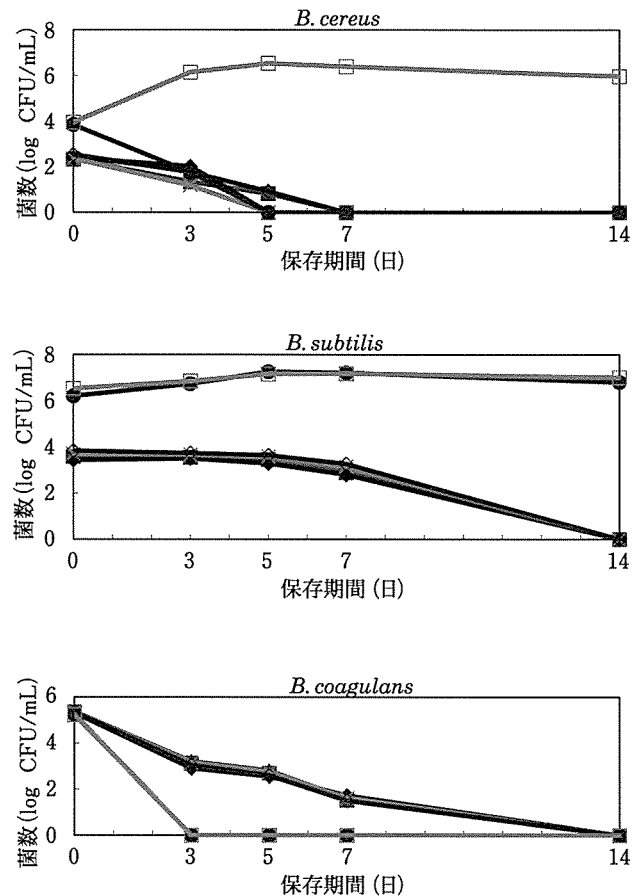


図 2 抽出温度，砂糖および牛乳添加量の異なる紅茶試料中の *Bacillus* 属 3 菌種の菌数変化

◆, 40℃抽出 (pH5.1) ; ■, 70℃抽出 (pH5.0) ; ▲, 100℃抽出 (pH4.9) ; ×, 100℃抽出+砂糖 2.5% (pH4.9) ; ◇, 100℃抽出+砂糖 5.0% (pH4.9) ; ●, 100℃抽出+牛乳 15% (pH7.0) ; □, 100℃抽出+牛乳 30% (pH6.9).

試料では *Bacillus* 属 3 菌種とも菌数が減少したが，牛乳を添加した試料では *B. cereus* および *B. subtilis* は増加し，*B. coagulans* は減少した。また，焙煎度の異なる試料では，*Bacillus* 属 3 菌種において菌数の減少がみられたが，その減少の程度は焙煎度によって異なる傾向がみられた。これは，Daglia ら⁶⁾ が *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* について報告していたように，焙煎をより深くすることによって抗菌性が高まることを示唆していた。

(3) 抽出温度，砂糖および牛乳添加量の異なる各種紅茶試料への接種実験

抽出温度，砂糖添加量または牛乳添加量の異なる紅茶試料へ *Bacillus* 属 3 菌種を接種した実験の結果を，図 2 で菌種別に示す。*B. cereus* の菌数は，100, 70, 40℃抽出，砂糖添加，牛乳 15% 添加の紅茶試料では経時に伴い減少し，7 日後にはすべて検出限界以下となったが，牛乳 30% 添加試料では増加した。*B. subtilis* の菌数は，100, 70, 40℃抽

出，砂糖添加の紅茶試料では経時に伴い減少し，14 日後にはすべて検出限界以下となったが，牛乳添加試料では増加する傾向を示した。*B. coagulans* の菌数は，すべての紅茶試料において経時に伴い減少し，牛乳添加試料では 3 日後に，その他の試料では 14 日後に検出限界以下となった。砂糖を添加した紅茶試料では *Bacillus* 属 3 菌種とも菌数が減少したが，牛乳を添加した試料では *B. cereus*, *B. subtilis* は増加し，*B. coagulans* は減少した。抗菌活性を有するカテキン類は，抽出温度が高いほど紅茶抽出液中の含量が高くなることが知られている¹⁶⁾。しかし，本実験では，抽出温度による菌数への影響はみられなかった。これは，各温度で抽出した異なる濃度の抽出液を，飲用に適した濃度に希釈調整して使用したことによるのかもしれない。

3. 要約

コーヒー，紅茶および緑茶の各種試料に，*Bacillus* 属細菌 (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*) 芽胞を接種し，85℃ 30 分間 (食品衛生法における pH4.6 以上の清涼飲料水の殺菌基準) 加熱処理した後，その試料の保存中における生

育挙動を調べた。コーヒー、紅茶試料では、牛乳を添加した場合、*B. cereus* と *B. subtilis* の菌数の増加がみられたが、牛乳を添加していないコーヒー、紅茶および緑茶の各種試料 (pH調整の有無；コーヒーの焙煎度；紅茶の抽出温度；コーヒー、紅茶への砂糖添加) では、*Bacillus* 属3菌種の菌数の減少がみられた。これらのことより、85℃ 30分間の加熱殺菌条件で製造した牛乳無添加の各種飲料中に *Bacillus* 属3菌種が生残していたとしても、コーヒー、紅茶および緑茶の抗菌性により商業的な無菌性が保証される可能性が示唆された。

文 献

- 1) 岩附慧二, 飲用乳, 「ミルクの事典」, 第1版, 上野川修一他編, (朝倉書店, 東京), pp.74-80 (2009).
- 2) Murakami, K., Akiyama, M., Sumi, M., Ikeda, M., Iwatsuki, K., Nishimura, O. and Kumazawa, K., Differences in flavor characteristics of coffee drinks originating from thermal sterilization process. *Food Sci. Technol. Res.*, **16**, 99-110 (2010).
- 3) Kumazawa, K. and Masuda, H., Change in the flavor of black tea drink during heat processing. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3304-3309 (2001).
- 4) 中嶋 茂, 清涼飲料水の規格基準の改正について, 食品衛生研究, **32**, 321-349 (1982).
- 5) Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R. and Shimamura, T., The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol.*, **8**, 123-125 (1989).
- 6) Daglia, M., Cuzzoni, M.T. and Dacarro, C., Antibacterial activity of coffee. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2270-2272 (1994).
- 7) Okabe, Y., Yamamoto, Y., Yasuda, K., Hochito, K. and Ishii, N., The antibacterial effects of coffee on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **34**, 85-87 (2003).
- 8) Almeida, A.A., Farah, A., Silva, D.A., Nunan, E.A. and Gloria, M.B., Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8738-8743 (2006).
- 9) 原 征彦, 渡辺真由美, 阪口玄二, 茶飲料類に接種されたA型, B型ボツリヌス菌芽胞の動向, 日本食品工業学会誌, **36**, 375-379 (1989).
- 10) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 大西玲子, 島村忠勝, 日本茶の抗菌作用および殺菌作用について, 日本細菌学会誌, **44**, 669-672 (1989).
- 11) Bandyopadhyay, D., Chatterjee, T.K., Dasgupta, A., Lourduraja, J. and Dastidar, S.G., *In vitro* and *in vivo* antimicrobial action of tea: the commonest beverage of Asia. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2125-2127 (2005).
- 12) Mendel, F., Philip, R.H., Carol, E.L., Robert, E.M., Kozukue, N., Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, **69**, 354-361 (2006).
- 13) 西川武志, 小林菜津美, 岡安多香子, 山田玲子, 磯貝恵美子, 磯貝 浩, 山下利春, 茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する増殖抑制効果の検討, 腸内細菌学雑誌, **20**, 321-327 (2006).
- 14) 芝崎 勲, 加熱殺菌, 「改訂新版・新・食品殺菌工学」(光琳, 東京), pp.63-80 (1998).
- 15) 清水 潮, 加熱による微生物の殺菌, 「食品微生物 I—基礎編 食品微生物の科学」(幸書房, 東京), pp.154-160 (2001).
- 16) Khokhar, S. and Magnusdottir, S.G.M., Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 565-570 (2002).

(平成24年3月30日受付, 平成24年7月23日受理)