

発酵度合の異なる3種の茶葉間での抗菌作用の違い

班員 木下 結花 土島 咲愛 中田 湊 畠野 千怜
担当教諭 橋谷 広司

キーワード：抗菌作用 ディスク拡散法 茶 菌

It is generally known that tea has antibacterial effects. Therefore, in this study, we performed the disk diffusion method using three different extraction methods with the aim of investigating the differences in antibacterial activity among three types of tea leaves with different degrees of fermentation due to oxidation. The results suggested that in the conventional way of making tea, pure water does not exhibit antibacterial activity, and that tea with a low degree of fermentation due to oxidation has more antibacterial substances. By making the tea more concentrated and consuming tea with a lower degree of fermentation than the standard method of making tea, it will be possible to produce antibacterial effects within the body.

1 はじめに

一般的に茶には抗菌作用があることが知られている。例えば、茶に含まれるカテキンは黄色ブドウ球菌や白癬菌に対して抗菌作用を示すことが明らかにされている。茶葉には発酵度合の異なる様々な種類の茶がある。これらは酸化による発酵とそれ以外の発酵に分けられ、酸化による発酵のできる茶は4種類あり、不発酵茶、弱発酵茶、半発酵茶、発酵茶である。酸化以外による発酵茶は2種類あり、弱後発酵茶、後発酵茶である。本研究では酸化による発酵のできた茶を使用して実験を行った。不発酵茶である緑茶、半発酵茶である烏龍茶、発酵茶である紅茶である。これらの茶は全てチャノキの葉から作られ、茶葉に含まれる酸化酵素の働きによって成分が変化し、茶葉が変色する。こうした発酵度合の違いにも着目し、3種間での作用の違いを明らかにすることを目的とした。

2 方法

ディスク拡散法を用いて実験を行った。本研究ではディスク拡散法により阻止円を計測することで抗菌作用の有無と大小を調査した。ディスク拡散法では、ディスクに含まれる物質の作用により菌が生育できない範囲が阻止円と

して表れている。この阻止円が大きいほど、抗菌作用が強いことを示す。また今回の実験では緑茶は伊藤園のワンポットエコティーバッグ抹茶入り緑茶を使用、烏龍茶も同じく伊藤園のワンポットエコティーバッグ烏龍茶入りを使用した。

ディスク拡散法では試験対象菌を寒天培地に全面塗抹した。試験対象菌として細菌である乳酸菌と大腸菌、真菌類である酵母を使用した。乳酸菌はフジッコ手作りカスピ海ヨーグルトを、大腸菌はノートルダム女学院附属高等学校の田中先生から冷凍保存したものを提供していただいた。酵母は日清ドライイーストを用いた。細菌はLB培地で、真菌類はサブロー寒天培地で培養した。次に抽出した成分(茶)を染み込ませたペーパーディスクを培地に4枚、配置した。滅菌シャーレと同じ直径90mmの円形の紙に垂直に交わる直線2本をひき、その交点から22.5mmのところを打ち、その点の位置にペーパーディスクを配置した。ペーパーディスクはろ紙に穴あけパンチで穴をあけ、直径約6mmのものを作成した。2日後に阻止円の有無を確認し、生じた阻止円の大きさをデジタルノギスで計測した。

—菌の塗抹—

純水を用いて菌の濃度が1%の水溶液を作り、

寒天培地に全面塗抹した。

塗抹にはガラスビーズを使用した。濃度1%の水溶液にガラスビーズを入れ、ガラスビーズ全体に液が付くようにした。その後、寒天培地にガラスビーズを10個ずつ入れ、水平方向に培地を振り、培地全体に菌が塗抹した。

—抽出方法—

純水、水道水、エタノールを用いて抽出を行った。純水、水道水で抽出をする際は一般的な茶の淹れ方を参考に茶を抽出した。85℃の水150mLに四角形のティーパックに入れた茶葉2gを2分間浸して抽出した。エタノールで抽出する際は先行研究を参考に次のように抽出した。濃度20%のエタノール15mLに四角形のティーパックに入れた茶葉0.2gを24時間おき、25℃に設定したインキュベーターの中で抽出した。エタノールは揮発性物質であるため、純水や水道水と同様の方法で抽出を行うと気化してしまう。気化を防ぐためにスクリー管に入れて抽出する必要があった。サイズの小さいスクリー管を使ったため、溶液の量を1/10にした。

3 結果

—純水で抽出した場合—

どの菌に対しても阻止円は見られなかった(N=4、表1)。

表1 純水での各菌に対する各茶の抗菌作用の有無

	純水		
	乳酸菌	大腸菌	酵母
緑茶	×	×	×
烏龍茶	×	×	×
紅茶	×	×	×

○…阻止円あり ×…阻止円なし

—水道水で抽出した場合—

乳酸菌、大腸菌を全面塗抹した培地で阻止円は確認出来なかった(N=4)。

酵母を全面塗抹した培地では緑茶、紅茶の場合で阻止円を確認出来た。緑茶でできた阻

止円の直径は7.11±0.3、紅茶の場合は7.45±0.66であった(N=4、図3)。これらに有意差は見られなかった(p>0.05、T検定)。酵母を全面塗抹した培地で阻止円ができたものはこのように全面に菌が生育しているものの、ディスクの周りには阻止円ができており、菌が生育していない状態であった(図1、図2)。

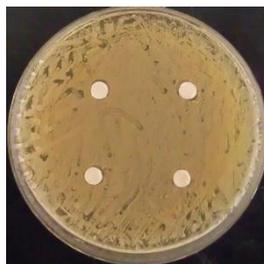


図1 酵母×緑茶



図2 酵母×紅茶

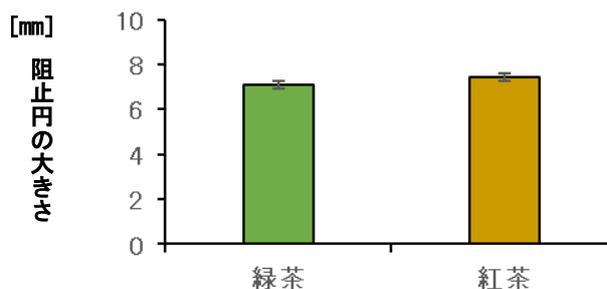


図3 阻止円の大きさの比較

表2 水道水での各菌に対する各茶の抗菌作用の有無

	水道水		
	乳酸菌	大腸菌	酵母
緑茶	×	×	○
烏龍茶	×	×	×
紅茶	×	×	○

○…阻止円あり ×…阻止円なし

—エタノールで抽出した場合—

酵母では阻止円は確認出来なかった(N=4)。

乳酸菌では阻止円は確認出来なかった(N=4)。しかし、部分的に菌が集まった(図4)。

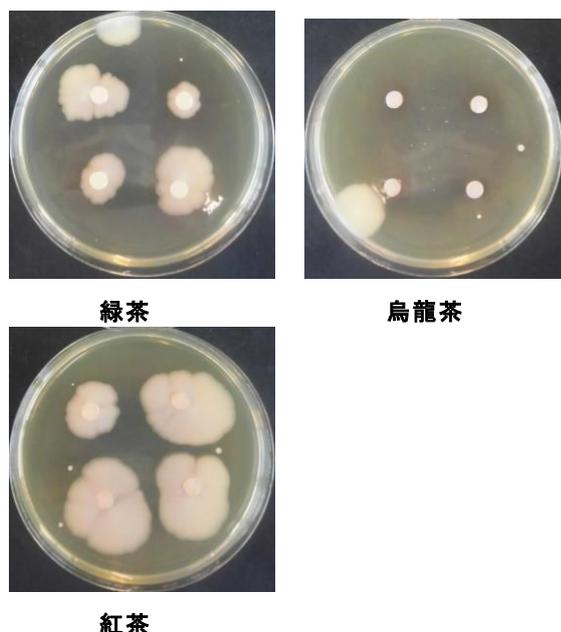


図4 シャーレ内の乳酸菌の様子

大腸菌では緑茶、烏龍茶で阻止円を確認できた。緑茶の阻止円は 8.66 ± 0.32 、烏龍茶は 7.25 ± 0.13 であり、緑茶の方が有意に大きかった ($p < 0.01$, T検定)。大腸菌を全面塗抹した培地で阻止円ができたものはこのように全面に菌が生育しているものの、ディスクの周りには菌が生育せず、阻止円ができていた様子であった (図5、図6)。



図5 大腸菌×緑茶



図6 大腸菌×烏龍茶

グラフで表すとこのようになった (図7)。

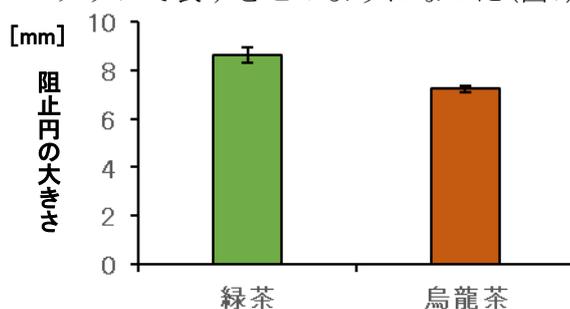


図7 阻止円の大きさの比較

表3 エタノールでの各菌に対する各茶の抗菌作用の有無

	エタノール		
	乳酸菌	大腸菌	酵母
緑茶	×	○	×
烏龍茶	×	○	×
紅茶	×	×	×

○…阻止円あり ×…阻止円なし

4 考察

—発酵度合と抗菌作用の関係—

エタノール抽出の大腸菌の結果では、発酵度合の低い緑茶の方が阻止円が大きかった。これより、茶の発酵度合が低い方が抗菌性物質が多く抽出されたと考えられる。

—抗菌作用に影響した成分—

エタノール抽出ではカテキンやタンニン、サポニンなどが影響を及ぼしたと示唆された。ペーパーディスクを抽出した茶に浸してから2日間乾燥させている間にエタノールは完全に気化するため、ペーパーディスクには茶の成分のみが含まれているからである。

水道水抽出ではミネラルが抗菌作用に影響を及ぼした可能性があった。純水で抽出した場合と水道水で抽出した場合の実験方法は、抽出液のみを変えた対照実験となっている。これより、水道水で抽出した場合のみ結果が表れたのは純水には含まれておらず、水道水には含まれている物質が影響していると考えられる。

5 今後の課題

メタボローム解析をし、抽出液の成分分析を行う。これにより抽出液間で抽出された成分にどのような違いがあるのか、抗菌作用に影響した成分は何かを特定したい。

水道水に含まれている成分を特定する。本研究では水道水に含まれている成分が抗菌作用に影響を及ぼしたと考えている。しかし、その分量は地域や天候、どの場所から水道水を入

手するかによって変化する。そこで、本研究で用いた水道水の成分名と成分量を特定し、それと異なる成分量の水道水でも同じ結果に至るのか実験したい。また、含有成分量の異なる水道水どうしで抽出した場合を比べることで、どの成分が強く抗菌作用に関係を示すのか特定したい。

塩素が含まれていない水道水を用いて水道水で抽出した場合と同じ実験を行う。水道水に含まれている塩素は殺菌作用がある。そこで、本研究の水道水で抽出した場合の結果が塩素の殺菌作用によるものか確認したい。

本研究の抽出方法とは異なる、一般的な家庭でもできる茶の抽出方法で実験を行う。例えば水出しや煮だすといった方法だ。抽出方法によって抽出時間や温度が変化する。これによる抗菌作用の大きさの変化を比べたい。

本研究で使用した茶と別のメーカーの茶を使用して実験を行う。メーカーによって原材料が異なる。今回用いた茶の原材料は、緑茶が茶・抹茶、烏龍茶が茶、紅茶が茶であった。緑茶は抹茶の影響がでているかもしれない。さらに、添加物が含まれているものとそうでないものを用いて実験を行うと異なる結果が得られるかもしれない。そこで、複数のメーカーの茶を使うことで添加物による抗菌作用の違いも見していきたい。

無極性溶媒である抽出液を用いて実験を行う。極性溶媒では極性分子が溶けやすく、無極性溶媒では無極性分子が溶けやすい。また、本研究で用いた抽出液は全て極性溶媒であった。このことから、抗菌作用をもつ無極性分子の物質はペーパーディスクにさほど含まれていない。そこで、無極性溶媒の抽出液を用いた場合、抗菌作用にどう影響するか調べたい。また、無極性溶媒の抽出液を複数用いて実験を行い、本研究と調べることで、抗菌作用をもつ物質は極性分子か無極性分子のどちらが多いかも調べていきたい。

エタノール以外の揮発性物質の抽出液を用

いて実験を行うことで茶の成分のみでの抗菌作用の結果を確認し、茶の発酵度合と抗菌作用の関係を確立していく。エタノール抽出での大腸菌の結果からでしか茶の発酵度合と抗菌作用の関係を考えられていない。そのため、別の揮発性物質の抽出液を用いて茶の成分のみ含まれているペーパーディスクを作る。

エタノールで抽出した場合の乳酸菌の結果の原因を探る。阻止円ができなかった培地はどれも全面に菌が生育し、阻止円ができた場合はディスクの周りだけ菌が生育していない状態だった。しかし、乳酸菌だけ、部分的に菌が生育していたり、逆にディスクの周りに菌が集まっていたりした。そこで、理由を解明することで、この現象を利用して効率よく乳酸菌を吸収する方法などに有効活用していきたい。

6 参考文献

山田茉莉衣、茶殻からのカテキン類抽出と活用法の検討、2021