

平成 16 年 10 月 29 日

共同研究報告書

(財) 函館地域産業振興財団
北海道立工業技術センター
清水 健志、吉岡 武也、大坪 雅史

研究課題名 竹酢液に関する研究

研究実施期間 平成 16 年 7 月～平成 16 年 10 月

要 約

製造方法の異なる 2 種類の蒸留竹酢液（商品名「竹のひかり」のタイプ A およびタイプ B）について、品質分析（pH、比重、酸度、色調）と効菌性試験（最小発育阻止濃度測定試験法、生菌数測定試験法）を行い、以下の知見を得た。

1. 品質分析の結果、pH は、A、B とともに 2.7 であった。比重は、A が 1.003、B が 1.004 であった。酸度は、酢酸に換算すると A が 1.3%、B が 1.8% であった。色調は、A、B とともに、透明度が高く、また、目視観察での差と同様に、A は B に比べてわずかに黄色味が強いという結果であった。いずれの項目も、日本木酢液協会が作成している蒸留木酢液の品質規定に適することが確認された。
2. 生菌数測定試験法による抗菌性試験により、A、B とともに希釈するにつれて抗菌効果も弱くなっていくことが確認できた。試験液中の生菌数が 30 個/ml 以下となったのは、A では 10% および 1%、B では 10%、1% および 0.5% の濃度であった。また、同じ希釈率で比較してみると、A に比べ B の抗菌力は高いと考えられた。
3. 最小発育阻止濃度測定試験による抗菌試験により、20 時間後の大腸菌の発育を阻止したのは、A、B とともに 5% までの濃度であった。
4. 生菌数測定法と最小発育阻止濃度測定試験法において、効菌効果を示す濃度に違いが見られた。この結果から、大腸菌にとって栄養源の少ない環境で竹酢液を使用する場合には、A は 1%、B は 0.5% 程度に薄めても抗菌効果が期待でき、栄養源の豊富な環境においては、A、B とともに、5% 程度までの濃度で抗菌効果が期待できると考えられた。

1. 目的

竹酢液の品質と効菌効果を評価するため、品質分析と効菌性試験を行った。

2. 試料と方法

2.1 試料

製造方法の異なる 2 種類の蒸留竹酢液（商品名「竹のひかり」のタイプ A（以下 A）およびタイプ B（以下 B））を使用した。

2.2 品質分析

pH の測定は、(pH/ION METER F-23、(株)堀場製作所)を用いて測定した。比重の測定は、標準比重計を用いて、液温 15°Cにおいて測定した。酸度の測定は、0.1 規定水酸化ナトリウムで中和滴定を行い、酢酸に換算した。色調の測定は、分光測色計 (CM-3500d、ミノルタ (株))を用いて透過率を測定した。測定条件は、視野角 10°、測定径 30mm、光源 D65 とし、結果を L*a*b*表色系で示した。

2.3 抗菌性試験

抗菌性試験として生菌数測定試験法と最小発育阻止濃度測定試験法を以下の通り行った。

接種用菌液の調製

大腸菌 (*Escherichia coli* IAM12119T)を Mueller Hinton Broth (DIFCO 社、以下 MH 培地)に接種し、35°Cで 20 時間培養して菌懸濁液 (約 10⁹/ml)とした。生菌数測定試験法には、菌懸濁液を滅菌生理食塩水で約 10⁶/ml になるように希釈したものを、最小発育阻止濃度測定法には、菌懸濁液を MH 培地で約 10⁶/ml になるように希釈したものを接種用菌液として使用した。

竹酢試料液の調製

生菌数測定試験法には、A および B の原液とそれぞれを滅菌蒸留水で 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍に希釈したものを竹酢試料液として使用した。最小発育阻止濃度測定法には、A および B の原液とそれぞれを滅菌蒸留水で 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に希釈したものを竹酢試料液として使用した。

生菌数測定試験法

各竹酢試料液 1ml をそれぞれ滅菌生理食塩水 9ml に混合し、それぞれに接種用菌液 0.1ml を添加したものを試験溶液とした。35°Cで 24 時間保温した後の生菌数を、標準寒天培地 (日水製薬 (株)) および Chromocult COLIFORM Agar (MERK) を用いて測定し、抗菌効果を評価した。また、竹酢試料液の代わりに、滅菌生理食塩水を用いたものをブランク、滅菌蒸留水を用いたものをコントロールとした。

最小発育阻止濃度測定試験法

各竹酢試料液 0.3ml をそれぞれ MH 培地 2.7ml に混合したものを調製し、それぞれ

に接種用菌液を一白金耳摂取した後、35℃で保温した。20 時間後、菌数の増殖の有無により効菌効果を評価した。また、竹酢試料液の代わりに、滅菌生理食塩水を用いたものをブランク、滅菌蒸留水を用いたものをコントロールとした。

3. 結果および考察

3.1 竹酢液の品質

製造方法の違いによる品質の変化を調べるため、2 種類の蒸留竹酢液 (A および B) の pH、比重、酸度および色調について分析を行い、結果を日本木酢液協会が作成している木酢液の規格 (表 1) と比較した。

pH は、A、B ともに 2.7 であり、両者に差は認められなかった。比重は、A が 1.003、B が 1.004 であり、酸度は、酢酸に換算すると A が 1.3%、B が 1.8% となり、A、B 間で違いが確認された (表 2)。

色調は、多くの分野で最もポピュラーに使用されている L*a*b*表色系で示し、参考として蒸留水の測定結果も示した (表 3)。L*は明度を表しており、数値が 100 に近いほど透明度が高い。a*、b*は色度を表しており、a*は、数値がプラス側で赤、マイナス側で緑、b*は、数値がプラス側で黄、マイナス側で青を示している。分光測色計での測定の結果、明度に関しては、A、B 間での差は認められず、数値から A、B ともに透明度の高い溶液であると判断された。色度に関しては、a*値では明確な差は見られなかったが、b*値では、A が 7.99、B が 3.66 という結果であり、A は B に比べてわずかに黄色味が強いと判断された。分光測色計での色調測定の結果は、目視観察による色調の違いをよく表していた (図 1)。

今回、分析した 2 種類の蒸留竹酢液の品質は、日本木酢液協会が作成している蒸留木酢液の品質規格に適したものであることが確認された。

3.2 竹酢液の抗菌効果

生菌数測定試験法による抗菌性試験を行った結果を、表 4 および表 5 に示した。今回の試験では、標準寒天培地と Chromocult COLIFORM Agar を用いた生菌数の測定に差がなかったことから、目視で判断し易い Chromocult COLIFORM Agar のシャーレの様子について、図 2 および図 3 に示した。

ブランクおよびコントロールの 24 時間後の試験液の菌数は、いずれも約 10^4 個/ml であったのに対し、竹酢試験液を添加したものは、A、B ともに濃度が高くなるにつれて生菌数も減少する傾向が確認された。特に、試験液 1ml あたりの生菌数が 30 個以下となったのは、A では 10% および 1%、B では 10%、1% および 0.5% であった。

さらに、A、B について同じ希釈率での生菌数を比較してみると、すべての希釈率において、B を添加した試験区で低い値を示しており、この結果から、A に比べ B の方が抗菌力は高いと考えられた。

最小発育阻止濃度測定試験法による抗菌性試験を行った結果を、表 6、表 7、図 4 および

図 5 に示した。A、B ともに 5%までの濃度において、20 時間後の大腸菌の発育を阻止したことを確認したため、最小発育阻止濃度は 5%と考えられた。また、生菌数測定法と同様、どちらの竹酢液も希釈するにつれて抗菌効果が弱くなっていく傾向が確認された。

本研究で用いた効菌性試験の中で、生菌数測定法は、栄養源の少ない生理食塩水中での大腸菌の増殖抑制効果を評価し、最小発育阻止濃度測定試験法は、栄養源の豊富な培地中での大腸菌の増殖抑制効果を評価したものであり、試験法の違いにより効菌効果を示す濃度も異なる結果となった。この結果から、大腸菌にとって栄養源が少ない環境で使用する場合は、竹酢液の濃度を A では 1%、B では 0.5%程度に希釈しても抗菌効果が期待でき、栄養源の豊富な環境においては、A、B ともに、5%程度までの濃度で抗菌効果を期待できると考えられ、使用環境の違いによる竹酢液の抗菌効果についての基礎的な知見を得ることができた。

表 1. 木酢液の品質規格（日本木酢液協会）

項目	木酢液	蒸留木酢液
pH	1.5~3.7	
比重	1.005 以上	1.001 以上
酸度（%）	1~18	
色調・透明度	黄色～赤褐色 透明（浮遊物無）	無色～淡赤褐色 透明（浮遊物無）

表 2. 竹酢液の品質分析の結果

試料	pH	比重	酸度（%）
「竹のひかり」 タイプ A	2.7	1.003	1.3
「竹のひかり」 タイプ B	2.7	1.004	1.8

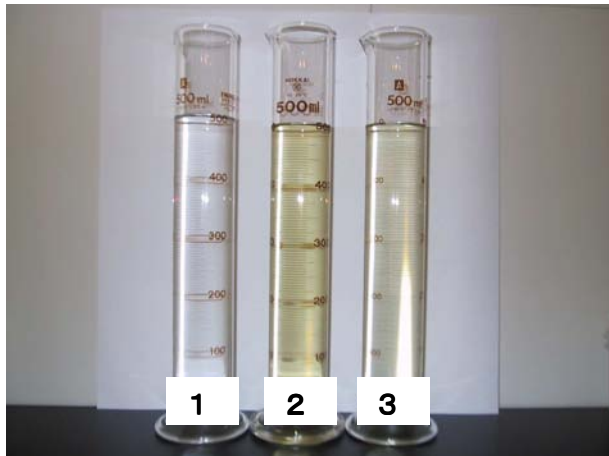


図 1. 2 種類の蒸留竹酢液の色調

- 1 : 蒸留水
- 2 : 「竹のひかり」タイプ A
- 3 : 「竹のひかり」タイプ B

表 3. 竹酢液の色調

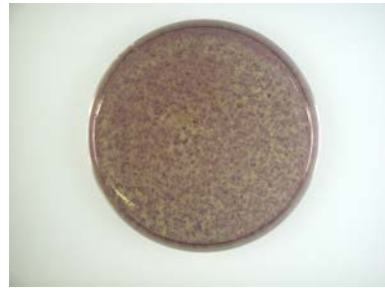
試料	色調		
	L*	a*	b*
蒸留水	100.01	-0.04	0.03
「竹のひかり」 タイプ A	98.18	-0.76	7.99
「竹のひかり」 タイプ B	99.35	-0.65	3.66

表 4. 「竹のひかり」タイプ A の抗菌性試験の結果（生菌数測定法）

添加試料液 (1ml)	試験液中の竹酢液の 濃度 (%)	試験液中の生菌数 (CFU/ml)	
		Chromocult	標準寒天
滅菌生理食塩水 (ブランク)	0	4.0×10^4	3.2×10^4
滅菌蒸留水 (コントロール)	0	4.5×10^4	5.2×10^4
タイプ A 80 倍希釈液	0.125	1.0×10^4	1.1×10^4
タイプ A 40 倍希釈液	0.25	1.5×10^3	1.9×10^3
タイプ A 20 倍希釈液	0.5	4.1×10^1	8.3×10^1
タイプ A 10 倍希釈液	1	30 以下	30 以下
タイプ A 原液	10	30 以下	30 以下

表 5. 「竹のひかり」タイプ B の抗菌性試験の結果（生菌数測定法）

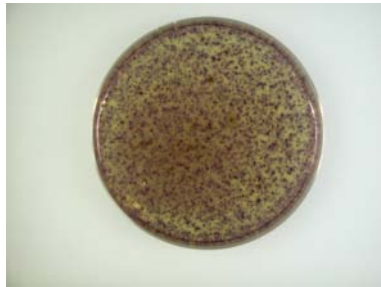
添加試料液 (1ml)	試験液中の竹酢液の 濃度 (%)	試験液中の生菌数 (CFU/ml)	
		Chromocult	標準寒天
滅菌生理食塩水 (ブランク)	0	4.0×10^4	3.2×10^4
滅菌蒸留水 (コントロール)	0	4.5×10^4	5.2×10^4
タイプ B 80 倍希釈液	0.125	3.5×10^3	3.8×10^3
タイプ B 40 倍希釈液	0.25	1.2×10^2	2.1×10^2
タイプ B 20 倍希釈液	0.5	30 以下	30 以下
タイプ B 10 倍希釈液	1	30 以下	30 以下
タイプ B 原液	10	30 以下	30 以下



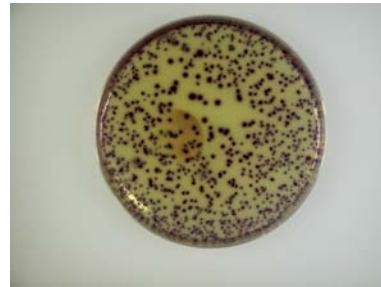
滅菌生理食塩水



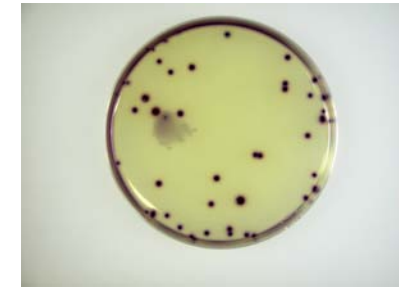
滅菌蒸留水 (最終濃度 0%)



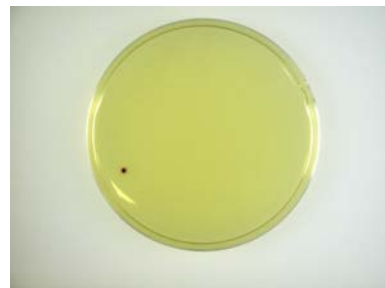
タイプ A 80 倍希釈液 (最終濃度 0.125%)



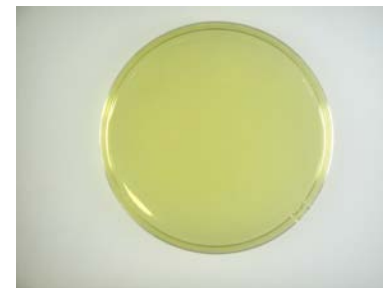
タイプ A 40 倍希釈液 (最終濃度 0.25%)



タイプ A 20 倍希釈液 (最終濃度 0.5%)



タイプ A 10 倍希釈液 (最終濃度 1%)



タイプ A 原液 (最終濃度 10%)

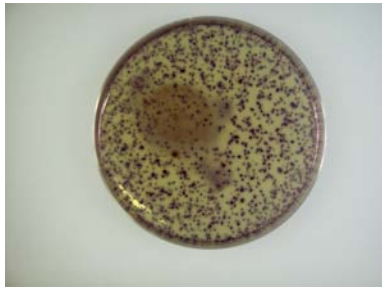
図 2. 「竹のひかり」タイプ A の生菌数測定の様子 (Chromocult COLIFORM Agar)



滅菌生理食塩水



滅菌蒸留水 (最終濃度 0%)



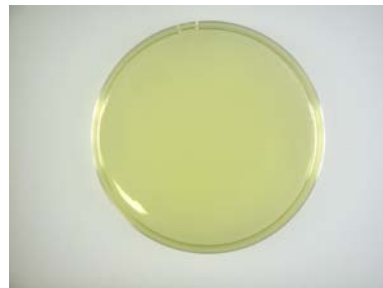
タイプ B 80 倍希釈液 (最終濃度 0.125%)



タイプ B 40 倍希釈液 (最終濃度 0.25%)



タイプ B 20 倍希釈液 (最終濃度 0.5%)



タイプ B 10 倍希釈液 (最終濃度 1%)



タイプ B 原液 (最終濃度 10%)

図 3. 「竹のひかり」タイプ B の生菌数測定の様子 (Chromocult COLIFORM Agar)

表 6. 「竹のひかり」タイプ A の抗菌性試験結果（最小発育阻止濃度測定試験法）

添加試料液 (1ml)	試験液中の竹酢液の濃度 (%)	菌の発育
滅菌生理食塩水 (ブランク)	0	+
滅菌蒸留水 (コントロール)	0	+
タイプ A 原液	10	-
タイプ A 2 倍希釈液	5	-
タイプ A 4 倍希釈液	2.5	+
タイプ A 8 倍希釈液	1.25	+
タイプ A 16 倍希釈液	0.625	+

表 7. 「竹のひかり」タイプ B の抗菌性試験結果（最小発育阻止濃度測定試験法）

添加試料液 (1ml)	試験液中の竹酢液の濃度 (%)	菌の発育
滅菌生理食塩水 (ブランク)	0	+
滅菌蒸留水 (コントロール)	0	+
タイプ B 原液	10	-
タイプ B 2 倍希釈液	5	-
タイプ B 4 倍希釈液	2.5	+
タイプ B 8 倍希釈液	1.25	+
タイプ B 16 倍希釈液	0.625	+

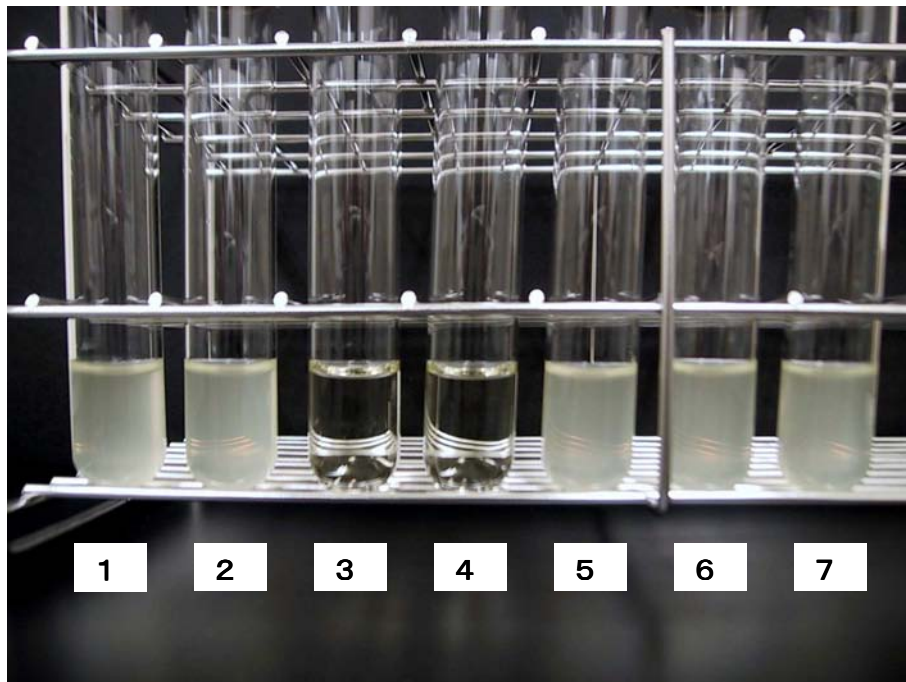


図 4. 「竹のひかり」タイプ A の最小発育阻止濃度測定試験の結果

1 : 滅菌生理食塩水

2 : 滅菌蒸留水

3 : タイプ A 原液 (最終濃度 10%)

4 : タイプ A 2 倍希釈液 (最終濃度 5%)

5 : タイプ A 4 倍希釈液 (最終濃度 2.5%)

6 : タイプ A 8 倍希釈液 (最終濃度 1.25%)

7 : タイプ A 16 倍希釈液 (最終濃度 0.625%)

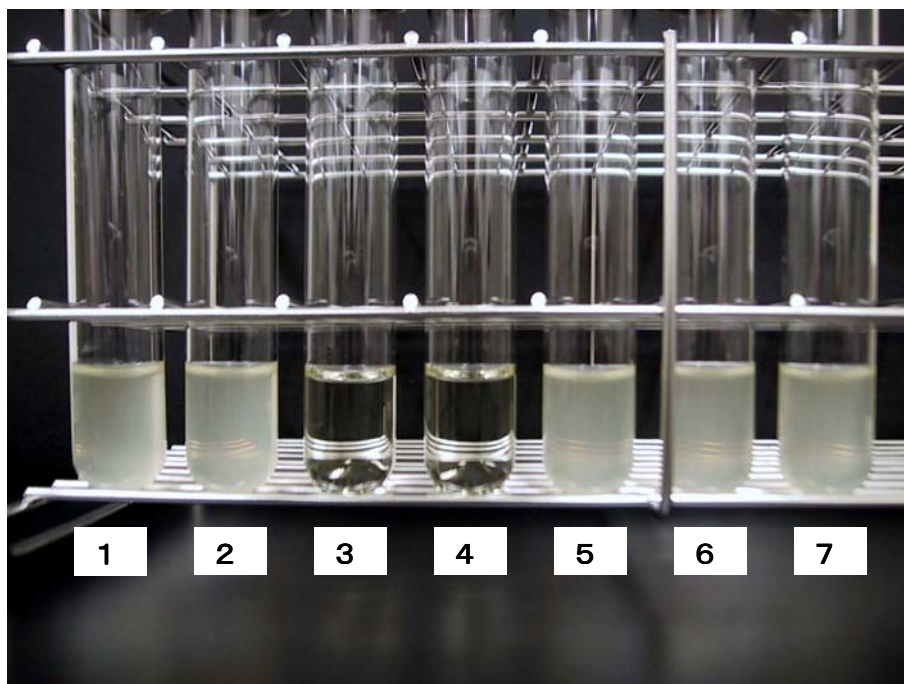


図 5. 「竹のひかり」タイプ B の最小発育阻止濃度測定試験の結果

- 1 : 滅菌生理食塩水
- 2 : 滅菌蒸留水
- 3 : タイプ B 原液 (最終濃度 10%)
- 4 : タイプ B 2 倍希釈液 (最終濃度 5%)
- 5 : タイプ B 4 倍希釈液 (最終濃度 2.5%)
- 6 : タイプ B 8 倍希釈液 (最終濃度 1.25%)
- 7 : タイプ B 16 倍希釈液 (最終濃度 0.625%)