酵母の生育に及ぼすエタノール蒸気・低酸素併用の影響

徳岡敬子*・三原由美**・鴨田 淳***・石谷孝佑****

Effects of Ethanol Vapor-Low Oxygen Combination Method on the Growth of Yeasts

Keiko TOKUOKA*, Yumi MIHARA**, Jun KAMODA***
and Takasuke ISHITANI***** National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry
and Fisheries, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305** Kumamoto Food Processing Research Institute, 3-11 Higashi-machi,
Kumamoto 862

*** Marudai Foods Co., Ltd., 21-3, Midori-machi, Takatsuki, Osaka 569

**** National Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries, 3-1-1, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305

To examine effects of an ethanol vapor-low oxygen combination method on the growth of yeasts isolated from high-sugar foods, inhibitory effects by an oxygen absorption type-ethanol vapor generator in the range of Aw 0.97 to Aw 0.86 were compared with those by an ethanol vapor generator. Both ethanol vapor method and ethanol vapor-low oxygen combination method gave higher inhibitory effects on the growth of the tested yeast strains at lower Aw, and the combination method was more effective than the method using only ethanol vapor. The effects of the combination method were the highest against the growth of *Candida tropicalis* 118-40 A among five tested strains. No remarkable inhibitory effects of ethanol vapor were observed in comparison with those of ethanol in media.

(Received Jun. 14, 1991)

エタノールは、その抗菌力¹⁾と安全性から食品の保存に広く用いられている。近年、エタノールを包装系内に蒸散させる機能を持つ製剤（以下エタノール製剤）が出され、主に中間水分食品におけるカビの生育を防止し、保存性を高めるために広く用いられている。しかし、酵母は一般にアルコール耐性が高く、特に水分活性 (Aw) の高い食品では生育抑制に多量のエタノールを要するためエタノール臭により製品本来の風味が損われることが多い。一方、包装系内から遊離の酸素を除去する脱酸素剤は好気性のカビの生育を抑えることができるが、発酵

性のある酵母に対しては、低 Aw と併用してもかなり効果が小さいことを前報で報告した²⁾。エタノール蒸気と脱酸素剤やガス置換剤の併用効果についてはこれまで現象的に認められている^{3,4)}。今回、中間水分食品から分離した耐糖性酵母を中心にエタノール蒸気・低酸素の併用効果を Aw との関係で検討し、その効果を確認した。

実験方法

1. 供試菌株

糖濃度の高い種々の食品から分離された菌株^{5,6)}のう

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

** 熊本県食品加工研究所 (〒862 熊本県熊本市東町 3-11 工業技術センター内)

*** 丸大食品株式会社中央研究所 (〒569 大阪府高槻市緑町 21-3)

**** 農林水産省農業研究センター (〒305 茨城県つくば市観音台 3-1-1)

ち、発酵性の代表的菌種に属する 5 菌株, *Hansenula anomala* 150-140 A, *Saccharomyces cerevisiae* 89-25 A, *Torulaspora delbrueckii* 154-CA, *Zygosaccharomyces rouxii* 88-40 A, *Candida tropicalis* 118-40 A を供試した。いずれも農水省食品総合研究所保存菌株である。

2. エタノール製剤

エタノール蒸気を徐々に放散する機能を持つエタノール製剤として、単機能型のもの（以下エタノール製剤とする）及び鉄系の脱酸素剤を併用して脱酸素作用を持たせたもの（以下脱酸素型エタノール製剤とする）の 2 種類を用いた。いずれもフロイント産業（株）製、エタノール量 0.5 g のものである。

3. 培地の調製

Aw が 0.97~0.98 の 5 種類の寒天培地 (30×50 mm, 厚さ約 5 mm) を調製した。培地組成は 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone 及び Aw 調整剤としての glucose である。培地の glucose 濃度と Aw との関係を Table 1 に示した。Aw の測定は、Aw 測定装置 (Rotronic 社製, Hygrokop DT, Switzerland) を用いて 25℃ で行なった。

4. 培養試験

YM 寒天培地上で 2 日間前培養した 5 菌株の酵母を滅菌生理食塩水に約 10^5 個/ml の濃度に懸濁し、上記の 5 種類の寒天培地各 18 個に 0.1 ml ずつ塗布した。それらを 7 層減菌したポリ塩化ビニリデンコート延伸ポリプロピレン (KOP) / ポリエチレン (PE) の袋 (150×220 mm) に入れ、含気包装、エタノール製剤封入包装、及び脱酸素型エタノール製剤封入包装を行ない、各試験区 6 個の試料を調製した。包装した試料を 25℃ で 6 週間貯蔵し、経時的に袋の体積、包装系内のエタノール濃度及びガス組成、酵母の菌数を測定した。袋の体積は、1 リッターのメスシリンダー中の一定量の水に袋を

浸漬することにより測定した。エタノール濃度は Porapak Q カラムを装着したガスクロマトグラフを用い、またガス組成はモレキュラーシーブと活性炭の並列カラムを装着したガスクロマトグラフを用いて測定した。菌数測定は、寒天培地の入った袋に 50 ml の滅菌生理食塩水を入れ、ストマッカー (グンゼ産業(株)製, Lab-blender 400) で 1 分間処理した後、適当な濃度まで希釈して YM 寒天培地で培養することにより行なった。

5. エタノール製剤とエタノール添加の効果の比較

100 ml 三角フラスコに Aw 0.91 及び 0.97 の寒天培地を 25 g ずつ入れて滅菌した後、無菌的にエタノール製剤 (Aw 0.91 ではエタノール量 1 g, Aw 0.97 ではエタノール量 1.5 g のもの) を封入したものと培地にエタノール (Aw 0.91 では 3%, Aw 0.97 では 5%) を添加したものを 6 個ずつ調製した。エタノール製剤は三角フラスコの口の部分にチープで止め、培地にエタノールを添加したものにもエタノール製剤からエタノールを完全にとばしたものを同様に貼り付けた。いずれの試料も KOP/PE のフィルムで密封して 25℃ で貯蔵し、経時的に培地中及びヘッドスペース中のエタノール濃度を測定した。培地中のエタノールは、三角フラスコに 50 ml の純水を加え、80℃ で 10 分間加熱することにより抽出した。次に Aw 0.91 のエタノール製剤封入区、エタノール添加区、及び対照区の培地に約 10^5 個の *H. anomala* 150-40 A 及び *Z. rouxii* 88-40 A を接種したものを各 3 試料調製し、同様に貯蔵して経時的に菌数を測定した。

結果及び考察

1. 包装系内のエタノール濃度及びガス組成

エタノール製剤封入区及び脱酸素型エタノール製剤封入区のヘッドスペース中のエタノール濃度は、24 時間後に 1.0~1.5% (v/v) で安定し、酵母の生育が認められない試験区ではその後もほぼ一定であった。酵母が生育した試験区では菌数の増加に伴ってエタノール濃度及び二酸化炭素濃度が増加した。脱酸素型エタノール製剤封入区の酸素濃度は、包装後 3 時間以内に検出限界 (0.01%) 以下に達した。

2. 袋の体積

酵母の生育が見られた試験区では菌数が増加するにつれて袋が膨張した。

3. 菌数の変化

含気包装区、エタノール製剤封入包装区、及び脱酸素

Table 1 Relationship between glucose concentration and water activity of media

Glucose concentration (%, w/w)	Water activity of media
12	0.97
32	0.94
44	0.91
49	0.89
53	0.86

型エタノール製剤封入包装区における貯蔵中の菌数変化を Fig. 1~Fig. 5 に示した。

H. anomala 150-40 A 株の場合 (Fig. 1), 含気区では A_w 0.86 まで生育可能であったのに対し, エタノール製剤封入区及び脱酸素型エタノール製剤封入区では A_w 0.91 以下で生育が阻止された。 A_w 0.97 及び 0.94 での生育を比較すると含気区, エタノール製剤封入区, 脱酸素型エタノール製剤封入区の順に生育速度が速く, 特に A_w 0.94 では脱酸素型エタノール製剤により生育が著しく抑えられた。

Fig. 1 Changes in microbial counts of *Hansenula anomala* 150-40 A during storage

—: Control, ----: Ethanol vapor generator,: Oxygen absorption type-ethanol vapor generator
●, ○: A_w 0.97, ■, □: A_w 0.94, ▲, △: A_w 0.91, ◆, ◇: A_w 0.89, ▼, ▽: A_w 0.86

Fig. 2 Changes in microbial counts of *Saccharomyces cerevisiae* 89-25 A during storage

—: Control, ----: Ethanol vapor generator,: Oxygen absorption type-ethanol vapor generator
●, ○: A_w 0.97, ■, □: A_w 0.94, ▲, △: A_w 0.91, ◆, ◇: A_w 0.89, ▼, ▽: A_w 0.86

S. cerevisiae 89-25 A 株 (Fig. 2) は, 含気区では A_w 0.89 まで生育したのに対し, エタノール製剤封入区及び脱酸素型エタノール製剤封入区では A_w 0.91 以下で生育が阻止された。 *H. anomala* 150-40 A 株と同じく, エタノール製剤封入区より脱酸素型エタノール製剤封入区で生育が強く抑制され, この菌株の場合, 定常期の菌数の減少が見られた。

T. delbrueckii 154-CA 株 (Fig. 3) は, *H. anomala* 150-40 A 株と同様の生育パターンを示した。 A_w 0.94 での脱酸素型エタノール製剤による生育抑制

Fig. 3 Changes in microbial counts of *Torulaspora delbrueckii* 154-CA during storage

—: Control, ----: Ethanol vapor generator,: Oxygen absorption type-ethanol vapor generator
●, ○: A_w 0.97, ■, □: A_w 0.94, ▲, △: A_w 0.91, ◆, ◇: A_w 0.89, ▼, ▽: A_w 0.86

Fig. 4 Changes in microbial counts of *Zygosaccharomyces rouxii* 88-40 A during storage

—: Control, ----: Ethanol vapor generator,: Oxygen absorption type-ethanol vapor generator
●, ○: A_w 0.97, ■, □: A_w 0.94, ◆, ◇: A_w 0.89, ▼, ▽: A_w 0.86

Fig. 5 Changes in microbial counts of *Candida tropicalis* 118-40 A during storage

—: Control, ---: Ethanol vapor generator,: Oxygen absorption type-ethanol vapor generator
 ●, ○: Aw 0.97, ■, □: Aw 0.94, ▲, △: Aw 0.91, ◆, ◇: Aw 0.89, ▼, ▽: Aw 0.86

は *H. anomala* 150-40 A 株よりも強かった。

好浸透性酵母である *Z. rouxii* 88-40 A 株の場合 (Fig. 4), 含気区では Aw 0.86 でもよく生育したのに対し, エタノール製剤封入区及び脱酸素型エタノール製剤封入区では Aw 0.89 で生育が阻止された。Aw 0.97 及び 0.94 では, 脱酸素型エタノール製剤封入区で誘導期が最も長くなり, また定常期の菌数も含気区に比べて少なかった。

C. tropicalis 118-40 A 株の場合 (Fig. 5), *S. cerevisiae* 89-25 A 株と同じく含気区では Aw 0.89 まで生育が認められたが, エタノール製剤封入区及び脱酸素型エタノール製剤封入区では Aw 0.94 までしか生育しなかった。この菌株ではエタノール製剤封入区と脱酸素型エタノール製剤封入区における生育速度の差がかなり大きく, エタノール蒸気と低酸素の併用効果がはっきり認められた。

Fig. 6 は含気区で生育が最高に達した時点での各試験区の菌数を比較したものである。*H. anomala* 150-40 A, *S. cerevisiae* 89-25 A, *T. delbrueckii* 154-CA はよく似たパターンを示した。Aw 0.97 ではエタノール製剤の効果はほとんどなく, 脱酸素型エタノール製剤の効果はやや見られた。Aw 0.94 ではエタノール製剤封入区でも生育抑制が認められ, 3 試験区の差が最も大きかった。Aw 0.91 以下では, エタノール製剤封入区と脱酸素型エタノール製剤封入区における菌数はいずれも初発菌数以下で, エタノール蒸気のみで生育が抑えられた。*Z. rouxii* 88-40 A の場合も Aw が低下するにつ

Fig. 6 Comparison of inhibitory effects of two types of ethanol vapor generator on the growth of yeasts at different water activities

Microbial counts at the time when microbial count in control at each water activity reached the maximum level were compared. (A) *Hansenula anomala* 150-40 A, (B) *Saccharomyces cerevisiae* 89-25 A, (C) *Torulaspora delbrueckii* 154-CA, (D) *Zygosaccharomyces rouxii* 88-40 A, (E) *Candida tropicalis* 118-40 A

□: Control, ▨: Ethanol vapor generator, ▩: Oxygen absorption type-ethanol vapor generator

つてエタノール製剤や脱酸素型エタノール製剤の生育抑制効果が増大し, 特に後者の効果が顕著であり, Aw 0.89 で 3 試験区の菌数の差が最も大きかった。*C. tropicalis* 118-40 A の場合, エタノール製剤の効果は Aw 0.91 で大きく現われたのに対し, 脱酸素型エタノール製剤の効果は Aw 0.97 という最も高い Aw でも見られ, 供試した 5 菌株のうちでエタノール蒸気と低酸素の併用効果が最も大きいことが認められた。

以上のように, Aw が低下するにつれて生育抑制に必要なエタノール量は少なくなるため, 今回用いたエタノール製剤のエタノール量が本研究の目的に適切でない試験区もあったが, いずれの菌株でもエタノール製剤封入区よりも脱酸素型エタノール製剤封入区で大きな生育抑制効果が見られ, エタノール蒸気と低酸素の併用がエ

タノール蒸気単独よりも酵母の生育抑制に有効であることが明らかになった。従って、この併用法を用いることにより従来よりも少ないエタノール量で食品の酵母による腐敗を防止することができるものと考えられる。しかし、菌種によって抑制効果のレベルが異なることから、食品中の汚染菌種及びそれらの特性把握も重要であることが示唆された。

4 エタノール製剤とエタノール添加の効果の比較

Aw 0.91 及び 0.97 におけるエタノール製剤封入区及びエタノール添加区の培地中及びヘッドスペース中のエタノール濃度を Fig. 7 に示した。培地中のエタノール濃度は、エタノール製剤封入区でもエタノール添加区でも 2~4 日後にはほぼ平衡状態に達し、エタノール添加区ではエタノール製剤封入区に比べて Aw 0.91 で 0.3%, Aw 0.97 で 0.8% 高かった。Aw 0.91 でのヘッドスペース中のエタノール濃度は、2 日後まではエタノール製剤封入区の方が高かったが、その後逆転し、平衡に達したときの濃度はエタノール添加区の方がわずかに高かった。Aw 0.97 でのヘッドスペース中のエタノール濃度は、2 日後に平衡に達し、エタノール添加区ではエタノール製剤封入区より 0.15~0.2% 高かった。そこで、2 試験区の生育抑制効果の比較は Aw 0.91 で行なった。

Fig. 7 Changes in the concentration of ethanol in media and headspace during storage

(A) Media, (B) Headspace, —●—: Ethanol vapor generator, Aw 0.91, —▲—: Ethanol vapor generator, Aw 0.97, ---○---: Ethanol-added media, Aw 0.91, -△-: Ethanol-added media, Aw 0.97

Aw 0.91 の 2 試験区における *H. anomala* 150-40 A 及び *Z. rouxii* 88-40 A の菌数変化を Fig. 8 に示した。いずれの菌株もエタノール添加区では菌数を測定した期間 (5 日間) 中に生育が認められなかったのに対し、エタノール製剤封入区では生育が認められ、5 日後には $10^5 \sim 10^6$ 個に達した。

エタノール製剤封入区とエタノール添加区のうち、培地中のエタノール濃度がより低いエタノール製剤封入区でのみ酵母の生育が見られたことから、エタノール蒸気の特別な静菌効果はなく、主に培地中に溶け込んだエタノールにより酵母の生育が抑えられるものと考えられる。

要 約

エタノール蒸気と低酸素の併用が酵母の生育に対してどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、糖濃度の高い食品から分離された 5 菌種 5 菌株の発酵性酵母を用い、Aw 0.97~0.86 における脱酸素型エタノール製剤の生育抑制効果をエタノール製剤と比較した。

(1) エタノール製剤と脱酸素型エタノール製剤のいずれも Aw の低下に伴って供試酵母に対する生育抑制効果が増大したが、後者の方が効果が大きく、菌種により抑制効果の程度は異なるものの、エタノール蒸気と低酸素の併用効果がはっきり認められた。

(2) *C. tropicalis* 118-40 株は、高 Aw 域でも脱酸

Fig. 8 Changes in microbial counts of two strains of yeasts in the presence of ethanol vapor generator and on ethanol-added media

Microbial counts at Aw 0.91 were compared.

—●—: Ethanol vapor generator, ---○---: Ethanol-added media, ---: Control, ●: *Haneenula anomala* 150-40 A, ▲: *Zygosaccharomyces rouxii* 88-40 A

素型エタノール製剤による生育抑制を強く受け、供試した5菌株のうちでエタノール蒸気と低酸素の併用効果が最も大きかった。

(3) エタノール製剤から発生するエタノール蒸気には特別な静菌効果が認められず、主に増殖中に溶解したエタノールにより酵母の生育が抑えられることが示唆された。

終わりに、本研究を行なうにあたり、エタノール製剤を提供していただいたフロイント産業(株)の関係各位に感謝する。

なお、本研究の要旨は日本食品工業学会昭和64年度大会で発表した。

文 献

- 1) SHAPERO, M.: *J. Food Sci.*, 43, 1467 (1978).
- 2) 徳岡敬子・石谷孝佑: 包装研究, 11 (3), 12 (1991).
- 3) 湯田定利・高橋順子・柳沢 洋: 包装研究, 5 (1), 29 (1984).
- 4) 川村雄二: 包装技術, 20 (6), 28 (1982).
- 5) TOKUOKA, K., ISHITANI, T., GOTO, S. and KOMAGATA, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 31, 411 (1985).
- 6) TOKUOKA, K., ISHITANI, T., GOTO, S. and KOMAGATA, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 33, 1 (1987).

(平成3年6月14日受領)

新 刊 紹 介

Bioinstrumentation and Biosensors

Donald L. Wise 編

最新のマイクロエレクトロニクスとバイオ技術の結合による新しい分野 Bioinstrumentation と Biosensor は最近著しい進展を見せ、研究室の分析やプロセスの制御、あるいは人体や環境の計測・診断としての機器の開発が行われている。本書は、この分野において研究開発に現在活躍中の51の専門家により、微生物センサー、固定化酵素での反応、魚の鮮度評価、筋肉、義歯、脳の機能測定や頭脳内圧の測定、血液中のガスや尿毒の分析、生体内のグルコースのセンシングなど、25の章より構成されている。

本書は医学や生理学の分野が主であるが、このような生体の計測技術やバイオセンサー技術は、今後の食品の計測分野の進展に参考になろう。(N)

18.5 × 26 cm, 324頁, 169.75ドル, 1991年刊
Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue,
New York, NY 10016, USA