

好塩微生物の増殖抑制に関する研究 (第2報)

耐浸透圧性酵母の増殖抑制に対する糖濃度,
pH, 有機酸緩衝液, 天然系静菌剤の影響

井川房欣・加藤 充[※]

食塩やしょ糖は調味料の中では最も基本的なものであり、古くから食品の調味や加工に使用されている。これらはいずれも浸透圧による保存効果を有することから、食塩については野菜、肉、魚介類の塩蔵品として、またしょ糖については果実や野菜のシロップ漬けとして、さらに両者の成分を併用したものととしては、醤油や味噌、しょ糖などを用いた野菜、肉、魚介類の調味漬、佃煮、惣菜などがその一例である。

これらの食品のうち、包装後加熱殺菌が困難なものや、加熱処理により商品価値が著しく低下するものにおいては、保存中、特に耐浸透圧性の酵母により“膨れ”や“異臭の発生”などの変質を生じやすく、加熱殺菌しないで保存性を高めることが必要である。従来、このような食品には調味成分を濃厚にして浸透圧を高めたり、合成保存料の添加により品質を保持してしてきたが、これらの手法はいずれも消費者の健康志向にそわないために忌避される傾向にあり、食品業界においてはその対策に苦慮している。

そこで、これら加工食品の食塩、しょ糖などの濃度を低減化した場合の変敗防止法を確立するため、モデル系により検討した結果、若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株

漬物、佃煮、惣菜、半生菓子、珍味など、比較的糖濃度や食塩濃度が高い食品の膨れや異臭の発生などに関与する第1表の耐塩、耐糖性の酵母、14菌株を用いた。

2. 基礎培地および培養条件

酵母用完全培地のグルコースの代わりにしょ糖を用い、麦芽エキスを加えた変形処方(第2表)を基礎培地とした。各酵母は予め30℃、48時間静置培養により前培養したものを初発生菌数 10^5 /ml程度になるよう、各試験培地に培地液量の1/100量添加した。30℃において増殖状況により、7~30日程度振とう培養し、経日的に660nmの波長で濁度を測定した。

*愛知工業大学応用化学科

第1表 使用菌株

菌 株 名
<i>Saccharomyces ludwigii</i> IFO 0789
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> IFO 0485
<i>Saccharomycopsis capsularis</i> IFO 0672
<i>Saccharomyces bayanus</i> IFO 0539
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0251
<i>Pichia membranaefaciens</i> IFO 0129
<i>Hansenula anomala</i> IFO 0136
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> IFO 0014
<i>Candida lactis-condensi</i> IFO 1286
<i>Candida cantarellii</i> IFO 10269
<i>Candida etchellsii</i> IFO 10037
<i>Candida versatilis</i> IFO 10038
<i>Candida parapsilosis</i> IFO 0585
<i>Pichia farinosa</i> IFO 0602

第2表 基礎培地

成 分 名	%
ポリペプトン	1.0
酵母エキス	0.5
麦芽エキス	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄	0.2

3. 酵母の増殖に対するしょ糖濃度の影響

しょ糖を除いた基礎培地 (pH5.6) にしょ糖を 5, 30, 40, 50, 60% (‰) の各濃度になるよう添加し、増殖状態を検討した。

4. 増殖抑制に対する pH および緩衝液組成の影響

しょ糖を40%含む基礎培地 (培地成分10/9濃度) に、pH4.0, 5.0, 6.0の各0.1M緩衝液となるよう酢酸：酢酸ナトリウム (2M), 乳酸：乳酸ナトリウム (2M), アジピン酸：アジピン酸ナトリウム (0.2M), クエン酸：リン酸-2-ナトリウム (1M) をそれぞれ添加し、また、1N-HClによりpH調整したものを対照区としてpHを確認後、純水で所定の量とし、分注、殺菌して試験に供した。

5. 増殖抑制に対する糖濃度と緩衝液の pH, モル濃度の影響

基礎培地に糖としてしょ糖を20, 30, 40%, 緩衝液としてpH4.0, 5.0, 5.5の各0.1, 0.2, 0.4Mとなるよう調製し、各糖濃度で緩衝液の代わりに、1N-HClによりpH調製したものを対照区として試験培地を調製し試験に供した。

6. 増殖抑制に対するしょ糖, 食塩, 緩衝液濃度の影響

基礎培地にしょ糖を1, 5, 10, 30%, 各糖濃度について食塩を3, 5, 7%, また、各食塩濃度について緩衝液 (酢酸緩衝液 pH5.0) を0.1, 0.2M添加した系を作成し、緩衝液の代わりに1N-HClによりpH調整したものを対照区として試験培地を調製した。

7. 増殖抑制に対する天然系静菌剤と緩衝液の併用効果

しょ糖を10および40%添加した第3表の酵母用抗菌力検定培地へ、第4表に示した5種類の天然静菌剤と4. で最も効果の認められた緩衝液 (pH5.5) を用い、1N-HClで同じpHに調整したものを対照区として試料を調製した。なお、キチン・キトサンは予め酢酸緩衝液に添加し、また、エチルアルコールは加熱殺菌後、無菌的に培地中に所定量を添加し混合した。

第3表 天然静菌剤の試験用培地

培地成分	%
酵母エキス	0.3
麦芽エキス	0.3
しょ糖	10, 40

第4表 天然静菌剤の種類と添加量

種類	添加量(%)
ポリリジン (50%)	0.05, 0.1
プロタミン	0.5, 1.0
キチン・キトサン	0.5, 1.0
エチルアルコール (95%)	1, 3, 5
グリシン	0.5, 1.0

なお、これらの試験はいずれも18×180mmの試験管に全量10mlの規模で実施した。

8. 浸透圧の測定

試料を300~800 mOsm/kg程度の浸透圧になるよう純水で希釈後、2 mlを専用試験管に採取し、浸透圧計（ADVANCE 社製、D-II型）により測定した。

実験結果および考察

1. 酵母の増殖に対する糖濃度の影響

pH 5.5, 培養後7日における14種の酵母の増殖状態を第1図に示した。試験に供した菌株はしょ糖濃度1~50%の範囲においては、ワイン酵母の*Sacch. bayanus*や*Sacch. cerevisiae*なども含めていずれも増殖を示し、特に耐塩性酵母の*Zygosacch. rouzii*をはじめ、*Hansenula anomala*, *Candida lactis-condensi*, *Pichia farinosa*の耐糖性が大であった。耐糖性の酵母といえども、増殖速度は一般に糖濃度の低い領域において大きく、僅かに*Zygosacch. rouzii*と*Candida versatilis*の2菌株のみが、糖濃度30%付近に至適増殖条件を有していることが判明した。

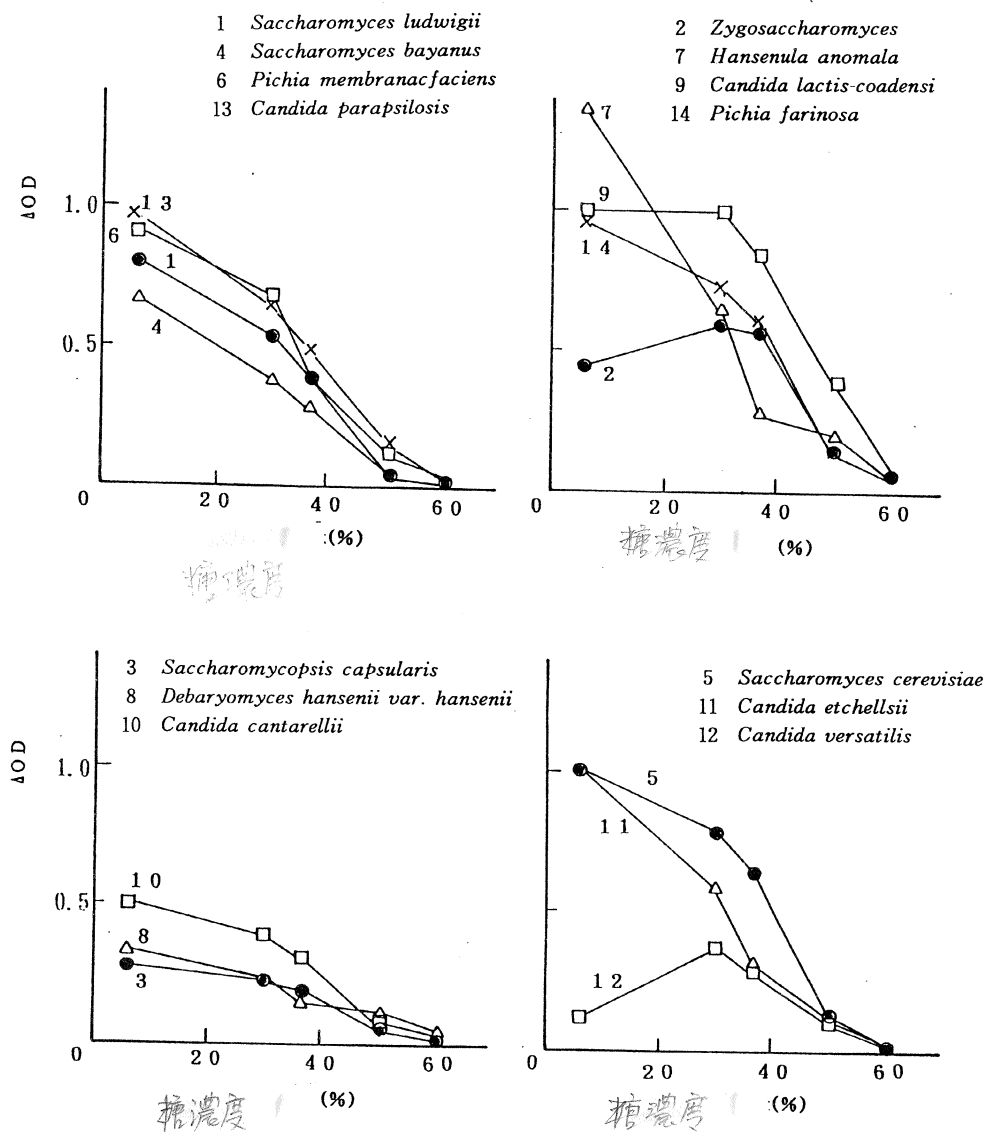
2. 増殖抑制に対する pH および緩衝液組成の影響

酵母の生育に対する最適 pH は一般に5~6であることが知られている。したがって食品の pH を香味、色調、食感などの余り影響しない範囲で増殖しにくい状態に調節することは、保存性のある程度高めるために効果的である。そこで、耐糖性が顕著であった4菌株に対する pH, 緩衝液組成の影響を検討し第2図に示した。

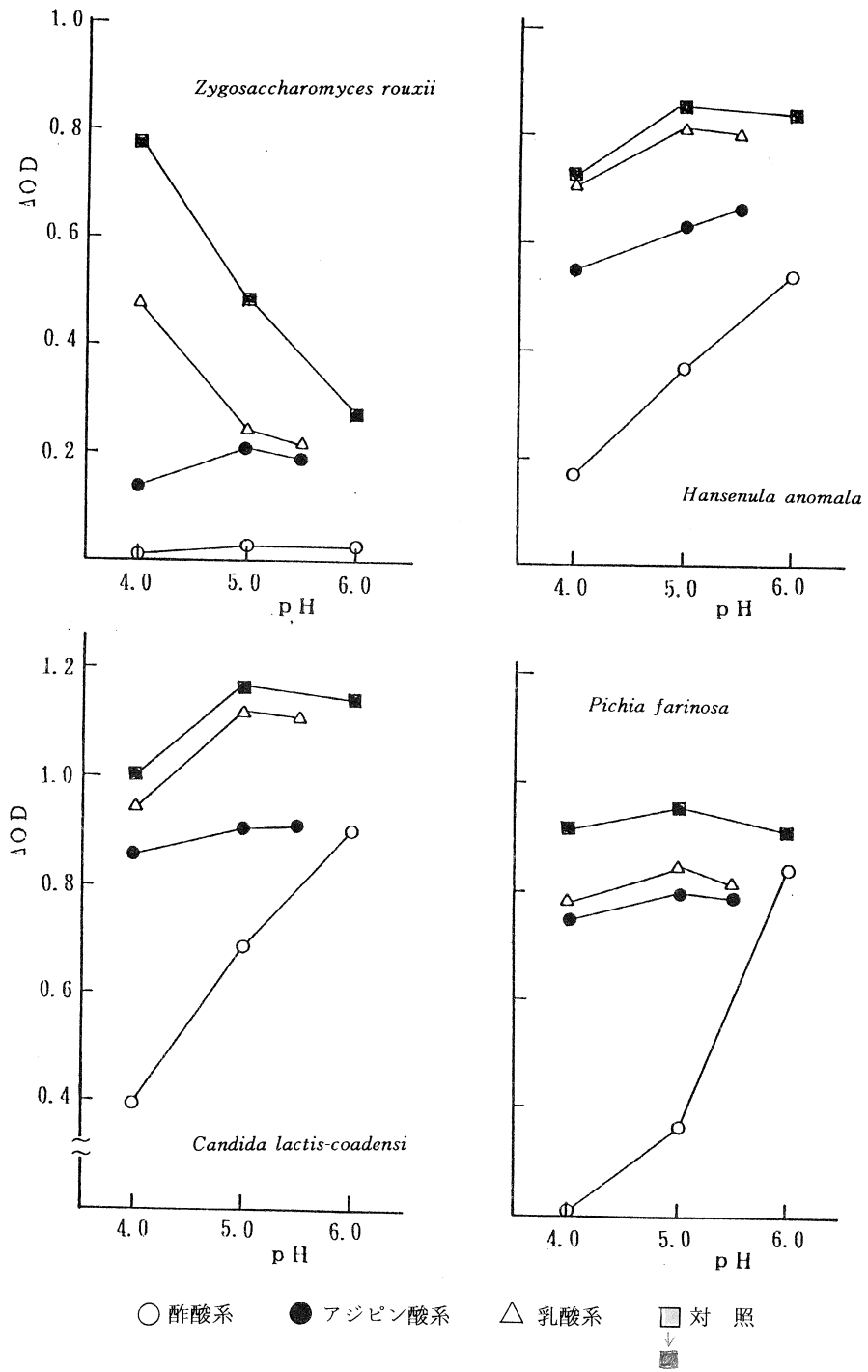
酵母の生育に対する pH の影響は、HClにより pH 調整した対照区で見ると、*Hansenula anomala*, *Candida lactis-condensi*, *Pichia farinosa*等は一般に pH 5 付近で最も増殖が認められたが、*Zygosacch. rouzii*は実験した pH 領域では pH 4 で最も生育が良好な傾向を示した。しかし、生育に対する pH の影響は僅かであるため、pH 調節により増殖抑制を図ることは困難であった。

そこで静菌作用を有する酢酸、アジピン酸、乳酸等の有機酸により、同じ pH 領域の緩衝液 (0.1M) を調製し、増殖抑制に対する効果を検討した。その結果、いずれの酵母に対しても酢酸・酢酸ナトリウム系緩衝液の静菌力がすぐれており、低 pH 領域ほどその作用は顕著であった。これは山本ら¹⁾が述べているように、pH 低下に伴う酢酸の非解離型分子の増加に起因するものと考えられる。

酢酸系に次いで効果の認められた緩衝液は、アジピン酸・アジピン酸ナトリウム系のものであったが、その効果は前者に比較すればかなり劣るものであり、また、乳酸系やここでは図示しなかったクエン酸系の効果は非常に少ないか、ほとんど認められなかった。



第1図 酵母の増殖に対する糖濃度の影響 (30℃, pH 5.5, 7日後)



第2図 増殖に対するpH, 緩衝液組成の影響 (0.1M, しょ糖20%, 30℃, 3日後)

3. 増殖抑制に対する糖濃度と酢酸緩衝液の pH, モル濃度の影響

加工食品のうち、果実、野菜などのシロップ漬、ジャム、マーマレード、あん、甘納豆、栗きんとん、金時豆、うずら豆など、主としてしょ糖を主な調味材料として加工した食品は、味をソフトにするため、糖濃度を低くした場合、発酵により膨れを生じたり、異臭などの変質を生じやすい。そこで、これら食品を低糖化した場合の変質を防止するため、前項で効果の認められた酢酸緩衝液の pH, モル濃度を変化させた場合の効果を検討した。

Zygosacch.

はじめに、*Zygosacch. rouxii* についてみると第3図に示したように、pH 4.0の場合、緩衝液濃度0.1Mにおいては糖濃度20%以上で増殖抑制が可能であり、pH 5.0では0.2Mであれば25%以上の糖濃度で抑制できた。しかし、pH 5.5の場合には、緩衝液濃度0.2M以下では抑制困難であり、緩衝液のみで抑制するためには、25%以上の糖濃度において0.4M程度が必要であった。

次に、*Hansenula anomala*においては、pH 4.0の場合、0.1M緩衝液では糖濃度30%以上、0.2Mでは20%以上で抑制できた。また、pH 5.0においては、0.1Mの場合には40%以下の糖濃度では抑制困難であったが、0.2Mでは糖濃度30%以上で、0.4Mであれば20%以上で抑制することができた。しかしながら pH 5.5では、今回実施したしょ糖濃度と緩衝液濃度範囲では、完全には抑制することが困難であった。

同様にして *Candida lactis-condensi* の場合には、pH 4.0においては緩衝液濃度0.1Mで糖濃度40%以上、0.2Mでは20%以上で増殖を抑制した。これが pH 5.0では、0.2Mで40%以上の糖濃度が必要であり、20%以上で抑制するためには0.4Mが要求された。

*Pichia farinosa*においてはpH 4.0の場合、*Zygosacch. rouxii*と同様、緩衝液濃度0.1M以上では20%程度の糖濃度でも抑制可能であるが、pH 5.0になると酵母の耐糖性は著しく大きくなり、0.4M以上、糖濃度25%以上が抑制するためには必要であった。しかしながら、pH 5.5においては *Hansenula anomala*と同様、今回の条件の範囲では増殖を阻止することは困難であった。

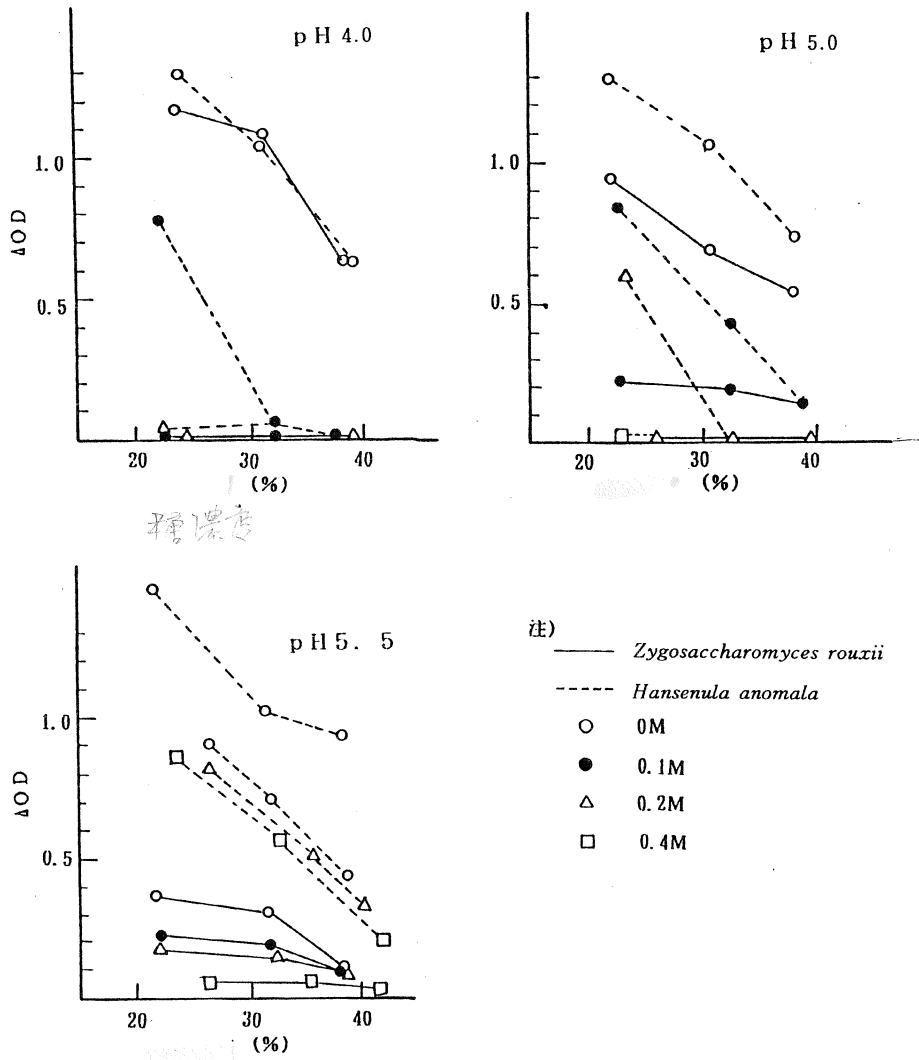
したがって、しょ糖のみを用いた調味液の変質を酢酸緩衝液の利用により防止しようとする場合には、pHを5.0以下に調節することが必要で、それ以上のpHで保存性を高めようとする場合には、天然系の静菌剤を用いたり、しょ糖の一部を非発酵性の糖などで置換することが必要と考えられた。

4. 増殖抑制に対するしょ糖、食塩、緩衝液濃度の影響

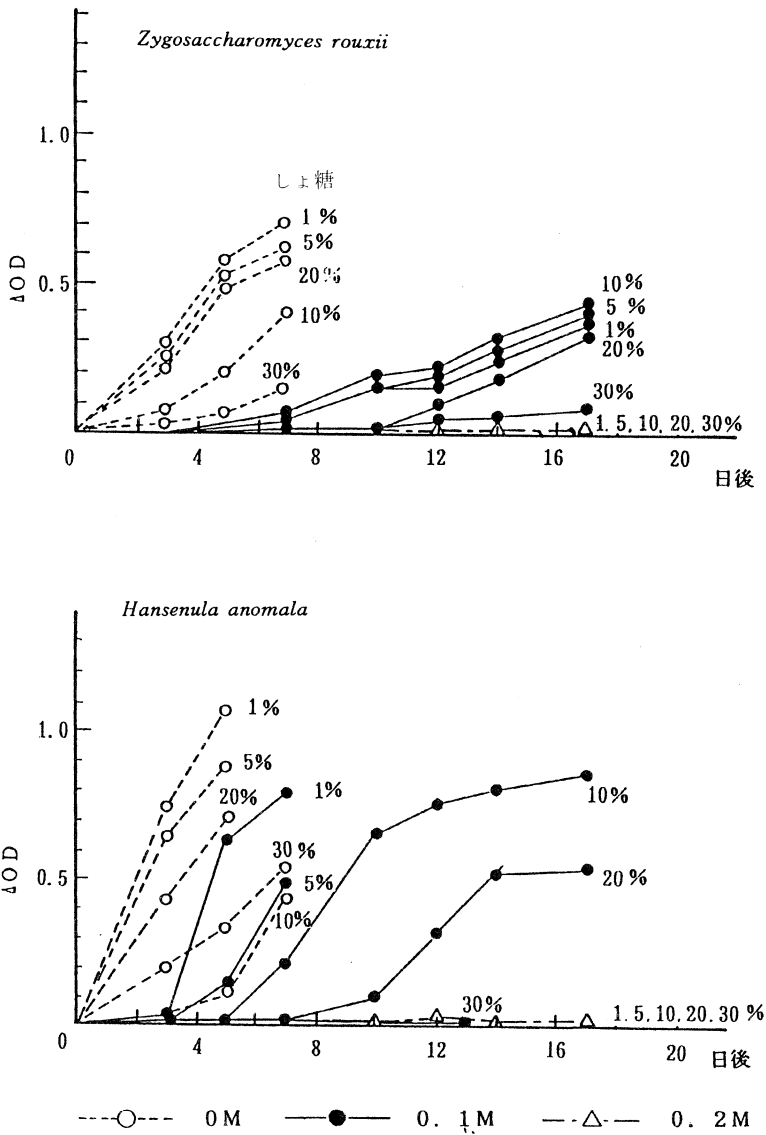
惣菜、佃煮、漬物などの加工食品は、一般に調味料としてしょ糖と共に食塩や食塩を含む醤油や味噌などを使用している。

そこで、これらの食品のしょ糖、食塩含有量を基にして、しょ糖については1, 5, 10, 20, 30%, また食塩については3, 5, 7%に設定し、両者を併用した場合の酢酸緩衝液の効果を検討した。

第4図は一例として、食塩5.0%, pH 5.0における *Zygosacch. rouxii* と *Hansenula anomala* の増殖に対するしょ糖濃度と緩衝液の濃度別の影響を経日的に示したものである。



第3図 増殖抑制に対するしょ糖ならびに酢酸緩衝液濃度の影響 (30℃, 7日後)



第4図 増殖抑制に対するしよ糖，食塩，酢酸緩衝液濃度の影響（食塩5.0%，pH5.0）

Zygosaccharomyces rouxii の場合、緩衝液を使用しない試験区は1~30%までの糖濃度のものは、いずれも7日以内に酵母の増殖が認められた。しかし、緩衝液0.1Mを併用したものは、糖濃度20%であれば10日間程度、0.2Mを併用した場合には、糖濃度1%以上の全ての試験区で増殖を抑制することができた。

Hansenula anomala では、緩衝液併用の有無による増殖抑制効果の差がより顕著に現われ、無添加の場合には、いずれの糖濃度においても日数の経過と共に増殖が認められた。これに対して0.1Mを併用した場合には、糖濃度20%では7日間、30%では20日以上増殖を抑制した。さらに、0.2Mの場合には *Zygosaccharomyces rouxii* と同様、実験に供した全ての糖濃度の試験区で増殖が阻止できた。

ここで、以上の経日変化の結果を緩衝液のモル濃度別に、しょ糖、食塩濃度との関連性で検討し、一例を *Hansenula anomala* について示したのが第5図である。緩衝液を使用しない場合はしょ糖30%、食塩7%の条件においても増殖を抑制することは困難であるが、0.1Mの緩衝液併用区では食塩濃度3%、5%、7%においては、糖濃度をそれぞれ30%、20%、5%に設定することにより増殖が完全に抑制された。また、0.2Mの緩衝液併用区では、食塩3%の場合には糖濃度は5%以上を必要としたが、食塩5%では糖濃度は1%程度でも増殖抑制が可能となった。

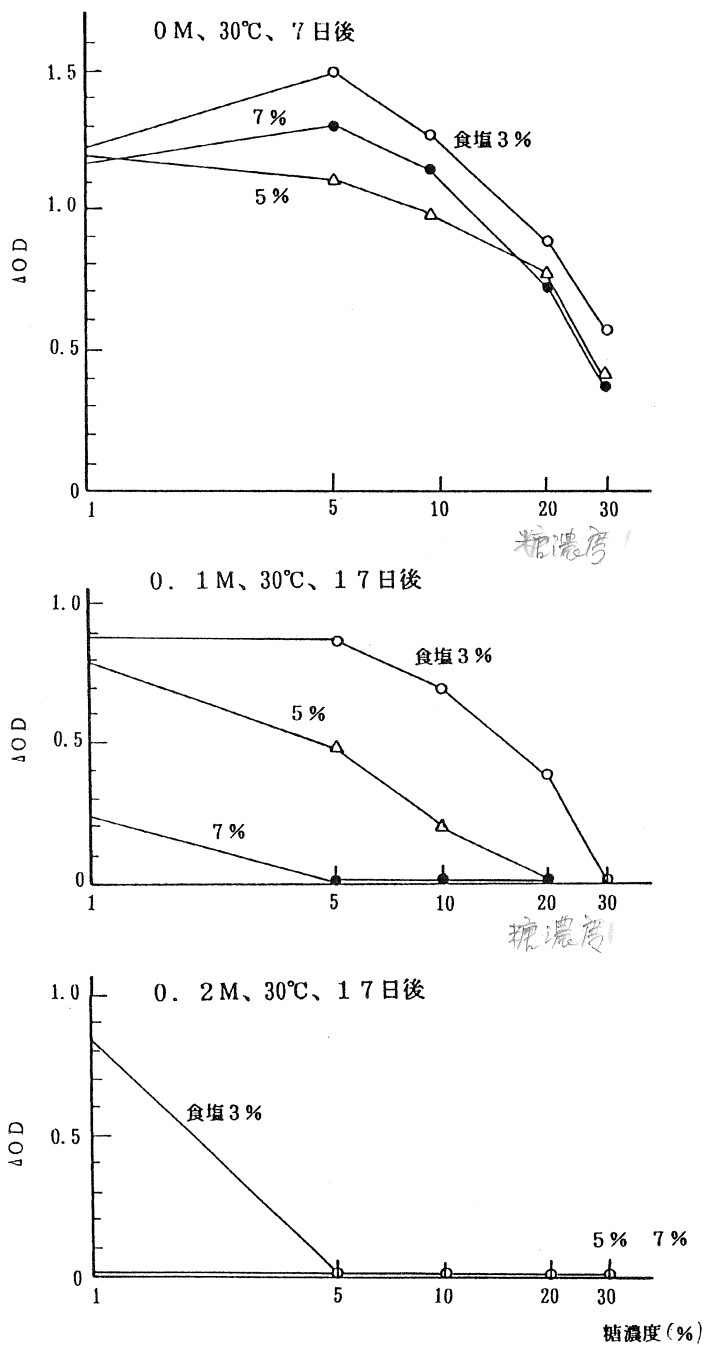
これらの結果より、しょ糖と食塩を併用する場合においても酢酸緩衝液の利用は低糖、低塩化を進めるうえで有効であり、緩衝液を使用しない場合、しょ糖30%に食塩7%を併用した濃厚な味の試験区(浸透圧4,300 mOsm/kg)でも抑制できないものが、緩衝液を利用することにより、0.1Mでは3,000 mOsm/kg、0.2Mでは1,700 mOsm/kg程度まで溶質濃度を大幅に低下させても品質保持できることが判明した。したがって、今後はpH 5以下の液性で調味が可能な惣菜、佃煮、珍味、肉、魚、野菜等の漬物などの加工食品はこの原理を応用すれば、味のソフトな製品を長期間保存させることが可能である。

5. 増殖抑制に対する天然系静菌剤と酢酸緩衝液の併用効果

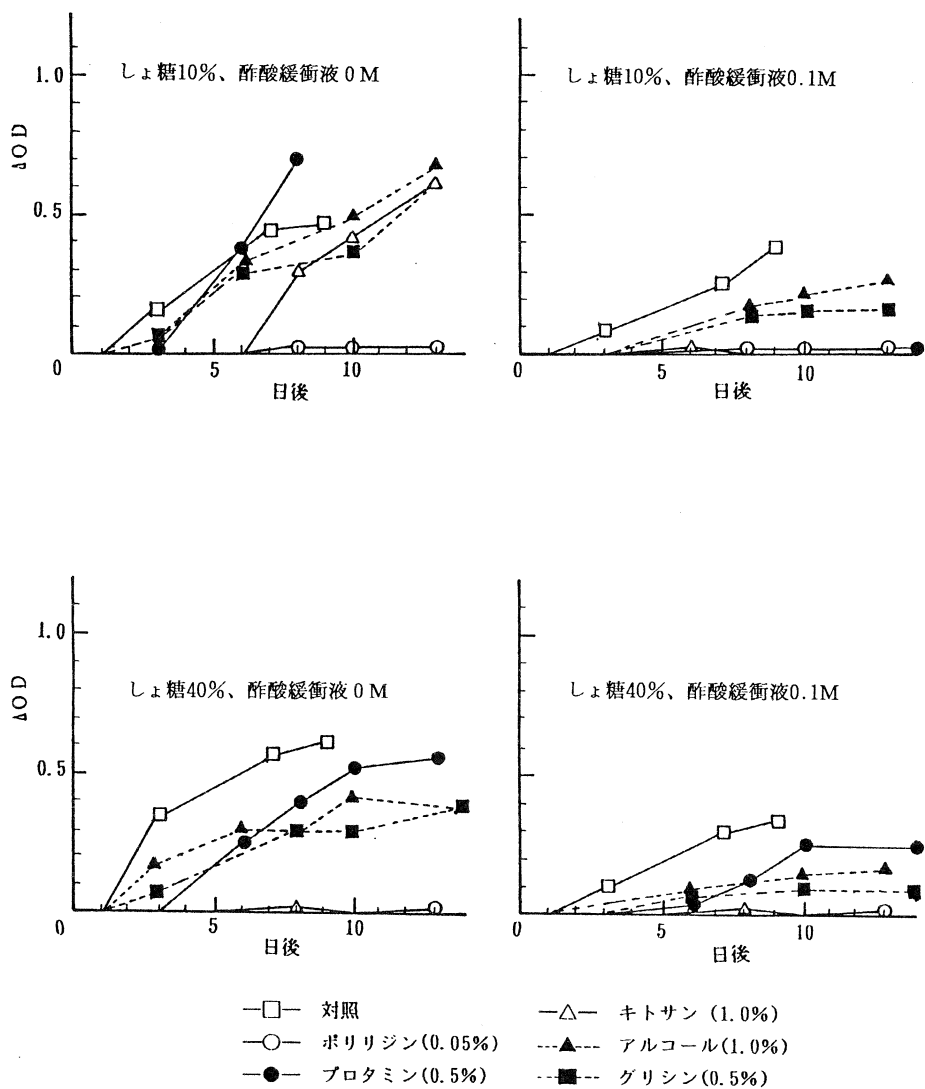
これまでの実験の結果、pH 5以下の液性においては酵母の増殖は酢酸緩衝液の併用で抑制できることが判明した。しかし、pH 5.5以上では、酢酸の非解離型分子が殆んど存在しなくなるためか抑制効果は小さくなり、低濃度のしょ糖や食塩においては保存性を向上させることが困難であった。そこでこれを解決するため、天然静菌剤による効果を検討した。

第6図は一例として *Zygosaccharomyces rouxii* に対する効果を示したもので、しょ糖10%で緩衝液を併用しない場合に有効な静菌剤は、5日間程度の短期間であればキトサン(1%)にも効果が認められたが、それ以上の期間ではポリリジン(0.05%)のみであった。

これに対して0.1M緩衝液を併用した試験区は、ポリリジン以外にキトサン(1%)、プロタミン(0.5%)を添加したのも有効であり、またアルコールやグリニンにも、ある程度の効果が認められた。



第5図 *Hansenula anomala* の増殖抑制に対するしょ糖，食塩，酢酸緩衝液濃度の影響 (pH 5.0)



第6図 *Zygosaccharomyces rouxii* に対する天然静菌剤の効果 (30°C, pH 5.5)

次に糖濃度40%においては、浸透圧が大きいいためか緩衝液を用いない場合でも、効果のやや小さかったキトサンにも抑制効果がみられた。緩衝液を併用した場合には、ポリリジンとキトサン添加区に安定した抑制効果が認められ、グリシン、エチルアルコール添加区もしょ糖10%の場合以上の抑制効果を示した。

同様にして*Hansenula anomala*についても検討したが、一般に増殖力が*Zygosacch. rouxii*よりも旺盛であるため、抑制可能な静菌剤は限られ、酢酸緩衝液を使用しない場合にはポリリジン(0.05%)のみが、また併用した場合にはポリリジンとキトサン(1.0%)が糖濃度に関係なく有効であった。

したがって、pH5.5程度の液性の食品において天然静菌剤により耐浸透圧性の酵母の増殖を抑制しようとする場合には、香味・食感等に影響がなければ、酢酸緩衝液を併用することがより確実であることが判明した。

要 約

Zygosacch.

果実、豆類のシロップ漬、惣菜、佃煮、漬物、肉、魚介類の調味漬、珍味、タレなどの加工食品の低糖、低食塩化を図るため、耐浸透圧性酵母の増殖抑制方法を検討した。

1. 試験に供した14種の酵母で耐糖性の大きな菌株は、*Hansenula anomala*, *Zygosacch. rouxii*, *Candida lactis-condensi*, *Pichia farinosa*などで蔗糖60%においても増殖した。

2. 増殖抑制に対するpHの影響は、4.0~6.0の範囲では余り認められなかった。また、有機酸ならびに同ナトリウム塩類より構成した緩衝液の増殖抑制作用は、一般に酢酸系が最も大きく、アジピン酸系がこれに次ぎ、乳酸系には殆ど効果が認められなかった。

3. 増殖抑制に対するしょ糖と酢酸緩衝液濃度の効果は、pH4.0では*Zygosacch. rouxii*は0.1M、20%以上で、*Hansenula anomala*は0.1M・30%以上か0.2M・20%以上で抑制された。pH5.0では前者の菌株は0.2M・25%以上、後者は0.2M・35%以上でそれぞれ増殖が阻止された。

4. しょ糖、食塩併用時における酢酸緩衝液(pH5.0, 0.1M)の効果は、*Zygosacch. rouxii*では食塩が7%存在すればしょ糖1%以上で、*Hansenula anomala*ではしょ糖5%以上で、それぞれ増殖を完全に抑制した。そしてpH5.0, 0.2Mの場合には前者の菌株はしょ糖1%以上・食塩3%で、後者はしょ糖1%・食塩5%以上か、しょ糖5%・食塩3%以上で増殖を完全に阻止した。

5. 試験に供した天然系静菌剤ではポリリジンが最も有効で、pH5.5, 糖濃度10%以上では0.05%の添加により、耐浸透圧性酵母の増殖を完全に抑制した。

文 献

- 1) 山本ら：日食工試，31，8，525(1984)