

耐浸透圧性微生物の増殖抑制に関する研究（第3報）

耐浸透圧性酵母の増殖抑制に対する糖類の影響

井川房欣

果実や野菜のシロップ漬，ぬれ納豆，くずきり，淡雪，もなかなど砂糖を多用した高浸透圧性の食品も，近年の低糖化指向の進展から以前に比較すれば糖濃度はかなり低下してきている。そのため包装後加熱殺菌しない製品で，製造工程における菌学的管理が不備な場合や，包装工程においてシールが不良であったり，ピンホールがある場合には*Hansenula anomala*など耐浸透圧性の酵母により変質し，しばしば“膨れ”や“異臭”などのクレームを生じ，関連業界ではその対策に苦慮している。

そこで，これらの微生物による変質を糖類の組成を変えることにより抑制するため，蔗糖を対照として各種糖アルコールおよびオリゴ糖の資化性，ならびに天然系静菌剤の効果について検討したところ，若干の知見が得られたので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株

前報¹⁾の実験結果より，第1表に示したような蔗糖濃度に対する抵抗性が大であった4菌株と，膨脹半生あん菓子より分離した*Klyuveromyces marxianus* 1菌株の計5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りに蔗糖をはじめとする各種糖類を用い，麦芽エキスと菌体分散剤（Tween 80）を加えた第2表の処方为基础培地とした。

第1表 供試菌株

菌 株	数
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IFO 0485
<i>Hansenula anomala</i>	IFO 0136
<i>Candida lactis-condensi</i>	IFO 0286
<i>Pichia farinosa</i>	IFO 0602
<i>Klyuveromyces marxianus</i>	—

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
Tween80	0.2

供試菌株は蔗糖20%を含む前培養基礎培地を用いて予め30℃, 48時間静置培養し, これを予め10mlづつ分注殺菌した目的の試験培地に初発生菌数 10^5 /ml程度になるように100 μ lづつ無菌的に添加した。30℃の恒温水槽により7日間程度振とう培養し, 経目的に波長660nmで吸光度を測定し, 増殖状態を検討した。

3. 酵母の増殖抑制に対する各種糖類の影響

試験培地は第2表の基礎培地(pH5.5)に, 蔗糖を対照として第3表と第4表に示した数種の糖アルコールとオリゴ糖を乾物換算して5, 20, 30, 40, 50% (W/W)それぞれ加えて調製した。尚, 溶解度の小さいエリスリトールやガラクトオリゴ糖は, それぞれ40%と30%を最高濃度とした。

また, 殺菌条件は加熱による糖類の変化を防ぐため, フラクトオリゴ糖を添加した試験区は100℃, 20分, その他の試験区は110℃, 15分の処理条件で実施した。

4. 糖類の併用による増殖抑制効果の検討

前項の実験結果, 酵母により資化されにくいことが判明した糖類を数種組合わせ, 糖濃度として40%添加した場合の蔗糖単用区に対する増殖抑制効果を, 変質常在菌の*Hansenula anomala*について検討した。

第3表 供試糖アルコールの種類と甘味度

種 類	製造会社	甘味度 (蔗糖100)
グリセリン	キンダ化学株	50
エリストール	日研化学株	80
ソルビトール	日研化学株	60~70
マルチトール	林 原株	80
SE-20	日研化学株	65
SE-30	日研化学株	30
SE-57	日研化学株	40
SE-500	日研化学株	50
キシリトール	東和化成工業株	60
還元乳糖	武田薬品工業株	40

第4表 供試オリゴ糖の種類と性質

種 類	製造会社	主 要 成 分	甘味度 (蔗糖 100)	生 理 機 能	商品名
ガラクトオリゴ糖	日新製糖株	4'-ガラクトシルラクトース他	25	ビフィズス因子, 血圧低下作用	カップオリゴP
フラクトオリゴ糖	明治製菓株	1-kestose, nystose他	30	ビフィズス因子, 難う蝕性	メイオリゴP
直鎖オリゴ糖	日研化学株	マルトトリオース, マルトース他	30	調湿性	オリゴトース
転移ガラクトオリゴ糖	ヤクルト株	6'-ガラクトシルラクトース, グルコース他	40	ビフィズス因子, 難う蝕性	メイオリゴ50
大豆オリゴ糖	カルピス食品株	スタキオース, ラフィノース他	70	ビフィズス因子, 血圧低下作用	マメオリゴ
イソマルトオリゴ糖	日研化学株	イソマルトース, パノース他	40	ビフィズス因子, 難う蝕性	イソマルト900

5. 増殖抑制に対する天然系静菌剤の効果

蔗糖を20%および40%添加した第5表の酵母用抗菌力検定培地に、第6表に示した天然静菌剤をそれぞれの濃度に加え、pH5.5および7.0に設定した。また、同じ培地で天然静菌剤を添加しない試験区を対照として試料を調製した。そして2、3と同様に分注・殺菌後、各菌株を接種し効果を検討した。尚、卵白リゾチームは無菌水に予め溶解したものを加熱殺菌することなく、無菌的に所定量を添加して試験に供した。

6. 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、デジタル式全自動D-II型）により測定した。

実験結果および考察

1. 酵母の増殖抑制に対する各種糖類の影響

食品加工用の糖類としては、一般に蔗糖が最も多く利用されているが、近年バイオテクノロジーの進歩と需要の多様化により種々の糖類が開発され活用されている。特に蔗糖の過剰摂取により肥満や糖

第5表 天然系静菌剤の試験用培地（pH5.5）

培地成分	%
酵母エキス	0.3
麦芽エキス	0.3
蔗糖	10,20,40
Tween80	0.2

注) 第2表の基礎培地では、プロタミン、ポリリジン、リゾチーム製剤により培地中のタンパク質が沈澱するため、第5表の培地を使用した。

第6表 天然系静菌剤の種類と添加量

種類	製造会社	添加量 (%)
プロタミン	T 社	0.5, 1.0
リゾチーム	E 社	0.05, 0.1
ポリリジン (50%)	T 社	0.02, 0.05
孟宗竹抽出エキス	N 社	0.2, 0.5
加熱ワサビ粉エキス	A 社	0.1, 0.2

尿病、心臓病などの成人病を招くとされていることから、蔗糖の一部を他の糖類に置き換えて低糖、低甘味化した場合の食品の保存性を確認するため、糖アルコール類10種類と、ビフィズス菌活性や血圧低下作用を有するとされるオリゴ糖6種類を用い、数種の酵母の資化性について検討した。第3、4表に示したように、これらの糖アルコールやオリゴ糖の甘味度は、蔗糖の30~80%であり、人体にも吸収されにくいことから食品の低カロリー化に、また還元でん粉加水分解物やオリゴ糖は、食品の保湿性や老化防止にも有効なものとされている。

第1図にpH5.5、培養7日間後の各酵母の増殖に対する糖濃度の影響の一例を示した。糖アルコールに対しては、半生菓子やシロップ漬などの変質原因微生物として知られている*Hansenula anomala*や、味噌、醤油を利用したタレや加工食品を変質させる*Pichia farinosa*、さらにはあんを用いた半生菓子類を汚染する*Kluyveromyces marxianus*などの増殖が顕著であった。

これらの菌株は耐浸透圧性の酵母とはいえ、糖濃度は稀薄な程増殖しやすく、糖濃度が増加するに従いほぼ直線的に増殖が低下し、エリストールでは40% (W/W)、その他の糖アルコールでは50%でいずれの菌株もほぼ増殖が抑制され、蔗糖の場合に比較して低濃度で有効であった。

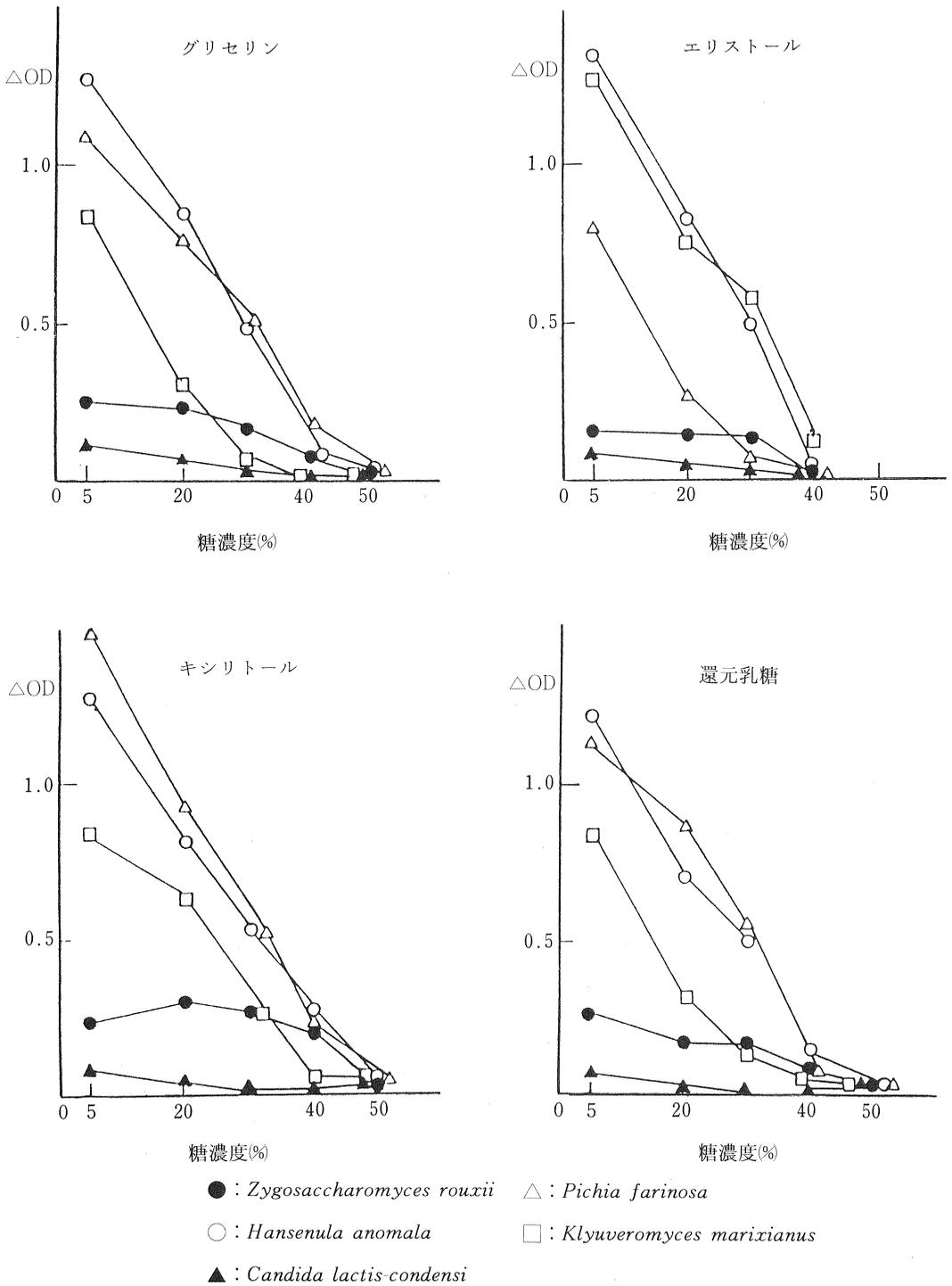
次にオリゴ糖に対する酵母の資化性の状態の一部を第2図に示した。一般にオリゴ糖は糖アルコール類より資化されやすく、試験に供した菌株では*Hansenula anomala*が糖アルコールの場合と同様、いずれのオリゴ糖に対しても著しい増殖が認められた。次いで生育の顕著なものは*Zygosaccharomyces rouxii*で、分岐あるいは直鎖のでん粉系のオリゴ糖は勿論のこと、大豆オリゴ糖、フラクトオリゴ糖などに対しても糖アルコール類では見られなかったような増殖傾向を示した。これは当該オリゴ糖が天然物を素材とし、経済性を考慮して製造されたものであるため、目的成分だけからなる純粋なものではなく、第3図に示した大豆オリゴ糖のように、グルコース、フラクトース、シュクロースなど通常の糖類を共存していることと、酵母自身にもオリゴ糖分解酵素系を有しているためではないかと考えられた。

なお、ここで試験に供した菌株の各糖類に対する資化性を明確にするため、20~50%濃度における増殖状態を濁度で対比したのが第4図~第8図である。

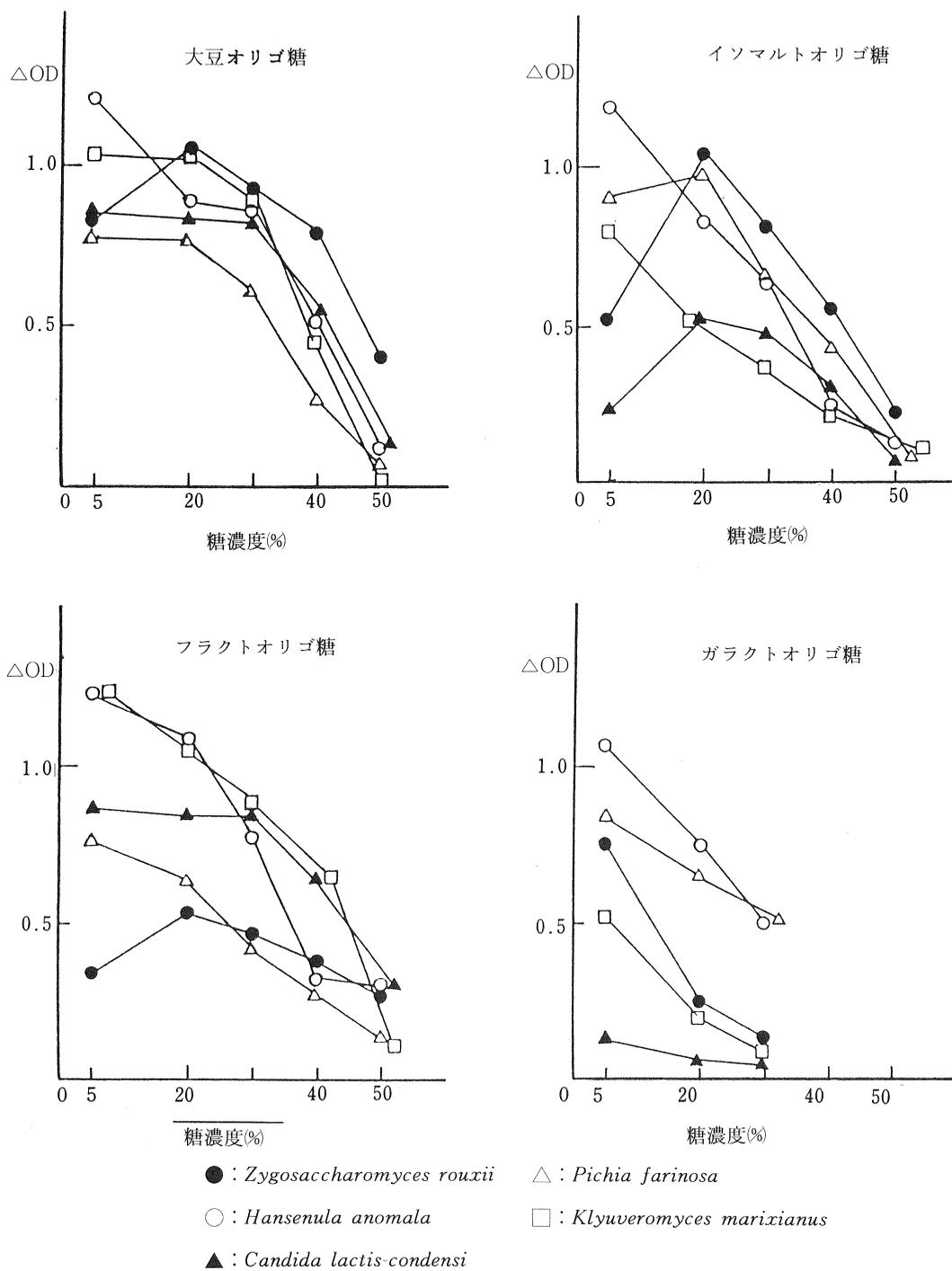
はじめに*Zygosaccharomyces rouxii*について見ると、蔗糖に比較して最も資化されにくい糖類はエリスリトールであり、次いでグルセリン、還元乳糖、マルチトール、キシリトール、ソルビトールなど糖アルコール類であった。

これに対してオリゴ糖では、4'-ガラクトシルラクトースを主成分とするガラクトオリゴ糖が最も資化されにくかったが、大豆オリゴ糖やイソマルトオリゴ糖などは、pH5.5においては蔗糖以上に増殖を促進した。

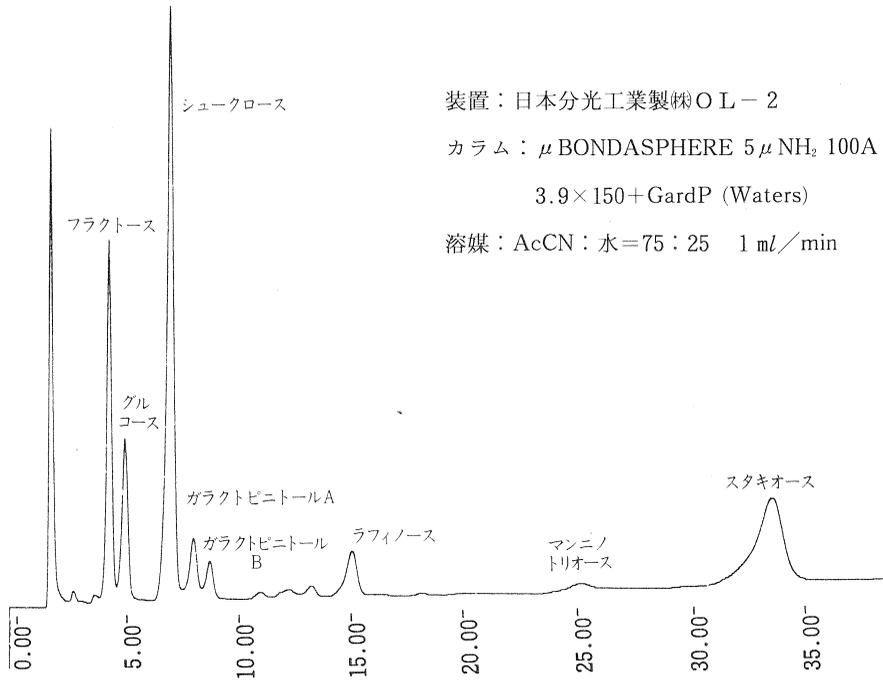
次に*Hansenula anomala*の各種糖類に対する資化性は、今回実験に供した菌株の中では最も大きく、*Zygosaccharomyces rouxii*に対しては増殖抑制効果の認められた糖類も可成りの資化性を示した。これは試験に供した総ての糖類に対して本菌株の適応性が大きいことを示しているが、蔗糖に比較すればフ



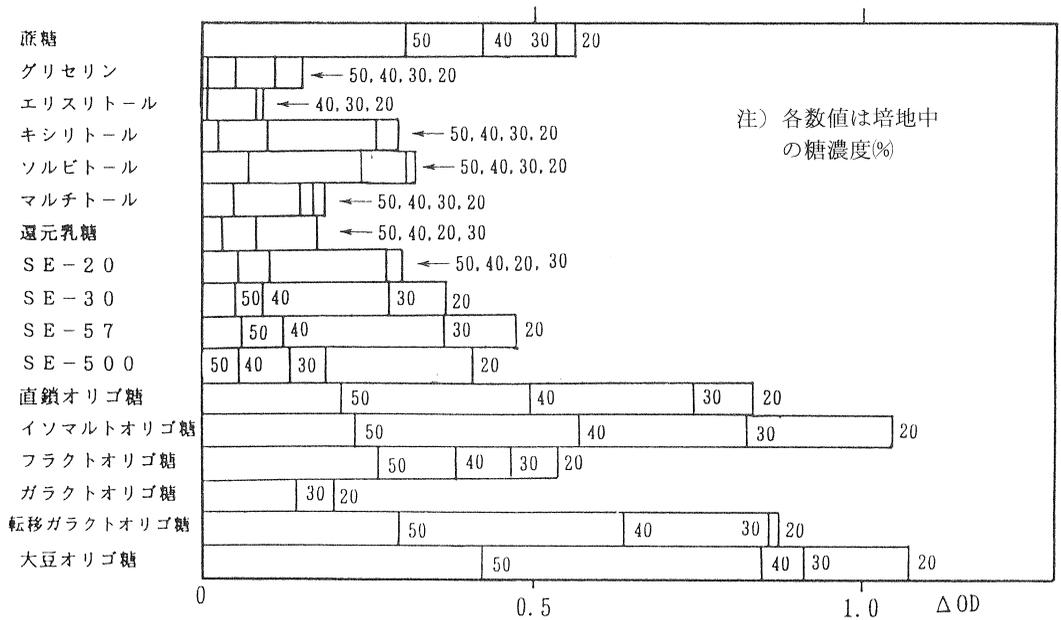
第1図 酵母の増殖抑制に対する糖アルコールの影響 (pH5.5, 30°C, 7日後)



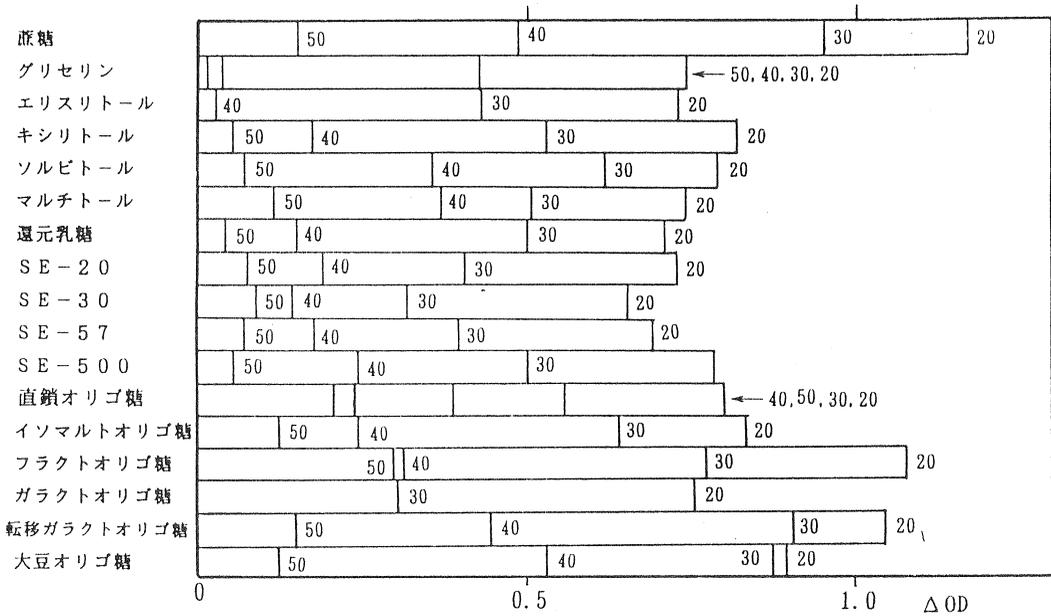
第2図 酵母の増殖抑制に対するオリゴ糖の影響 (pH5.5, 30℃, 7日後)



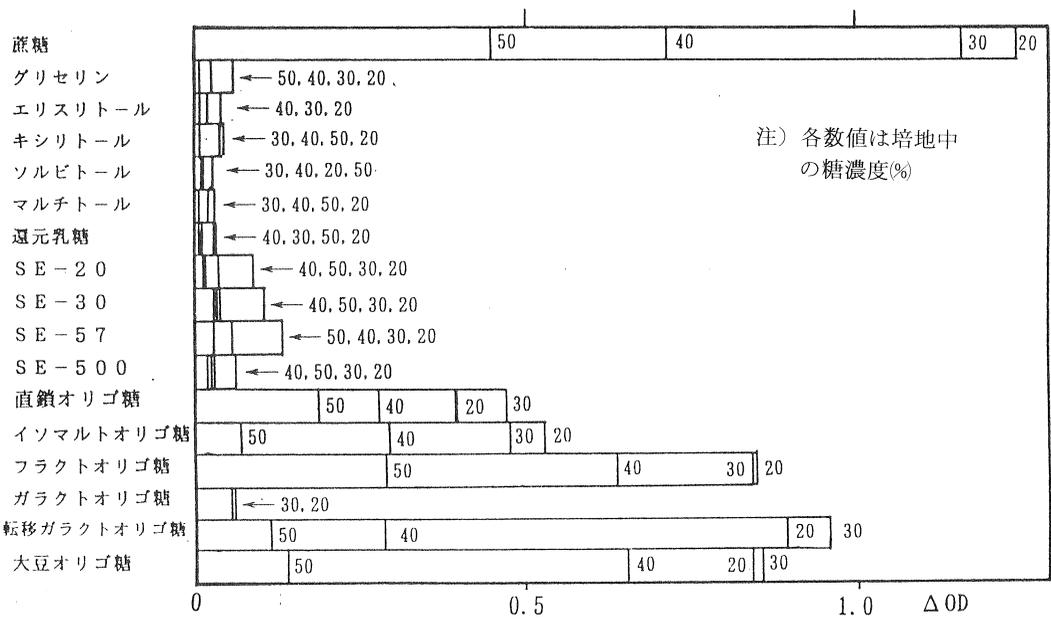
第3図 大豆オリゴ糖の糖組成



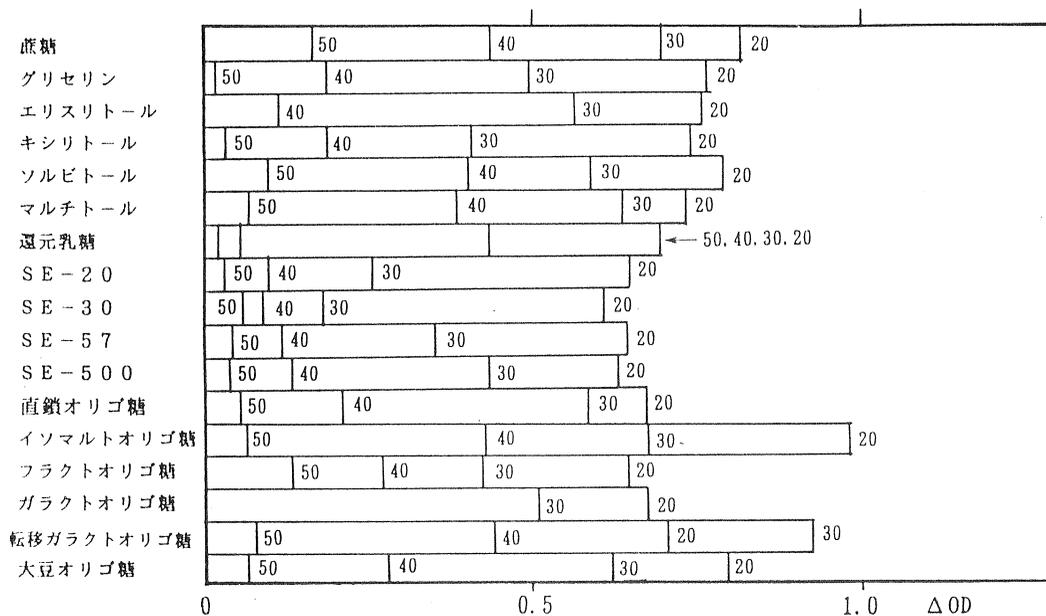
第4図 *Zygosaccharomyces rouxii*に対する各種糖類の影響 (pH5.5, 30°C, 7日後)



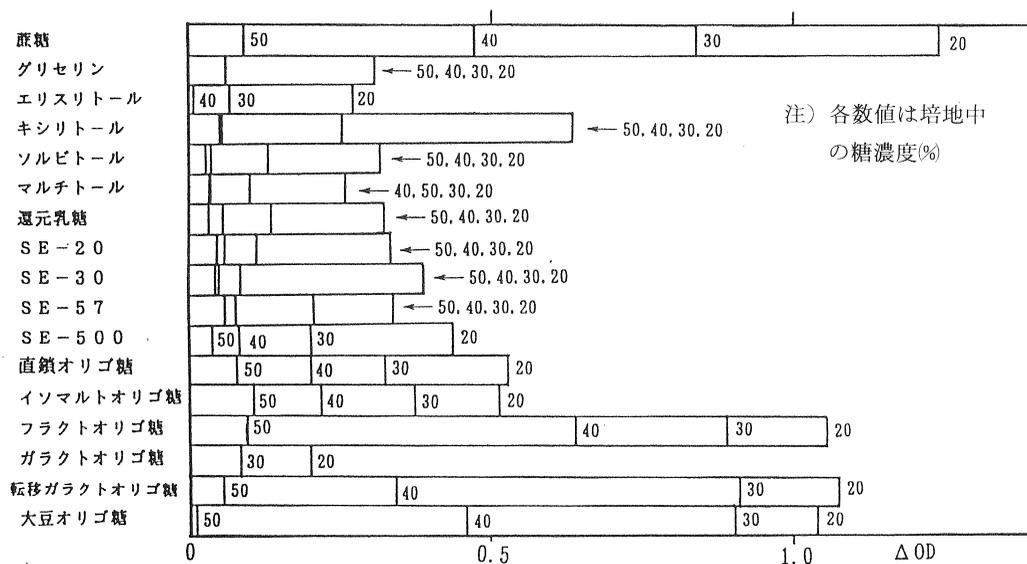
第5図 *Hansenula anomalar*に対する各種糖類の影響 (pH 5.5, 30°C, 7日後)



第6図 *Candida lactis-condensi*に対する各種糖類の影響 (pH 5.5, 30°C, 7日後)



第7図 *Pichia farinosa*に対する各種糖類の影響 (pH5.5, 30°C, 7日後)



第8図 *Klyveromyces marxianus*に対する各種糖類の影響 (pH5.5, 30°C, 7日後)

ラクトオリゴ糖や転移ガラクトオリゴ糖を除いて、いずれの糖類も増殖を抑制する傾向にあった。例えば30%濃度で比較すると、グリセリンが最も資化されにくく蔗糖の1/10程度、SE-30やガラクトオリゴ糖が1/3、エリスリトール、SE-20、SE-57などが1/2以下の資化性であった。

*Candida lactis-condensii*は、ソルビトール、マルチトール、還元乳糖、エリスリトール、キシリトール、グリセリン、SE類（還元でん粉加水分解物などの糖アルコール類）とガラクトオリゴ糖に対しては、試験に供した菌株のうちでは最も資化性が低く、例えば30%濃度ではいずれも蔗糖を炭素源とした場合の増殖度合いの1/10以下であった。

一方、ガラクトオリゴ糖を除いたオリゴ糖に対しては、直鎖オリゴ糖やイソマルトオリゴ糖などでん粉系のものでは蔗糖の40%程度、その他のオリゴ糖で70~80%の増殖度合いであった。

次に*Pichia farinosa*は各糖類に対する資化性が最も大であった。例えば30%濃度で見ると、蔗糖に比較して最も資化されにくいものはSE-30、20をはじめとする還元でん粉加水分解物であるが、その抑制効果は蔗糖の1/3程度に過ぎず、他の菌株が増殖抑制されたグリセリンやエリスリトール、還元乳糖などの糖アルコールやガラクトオリゴ糖は蔗糖の70~80%程度の資化性であった。

最後に*Klyuveromyces marxianus*の糖類に対す資化性は、*Candida lactis-condensii*や*Zygosaccharomyces rouxii*と同じく糖アルコール類に対しては小さく、増殖が抑制された。30%濃度で蔗糖と比較した場合、グリセリンやエリストールで1/10、ソルビトール、マルチトール、SE-30、20、還元乳糖などで1/7以下の増殖であった。

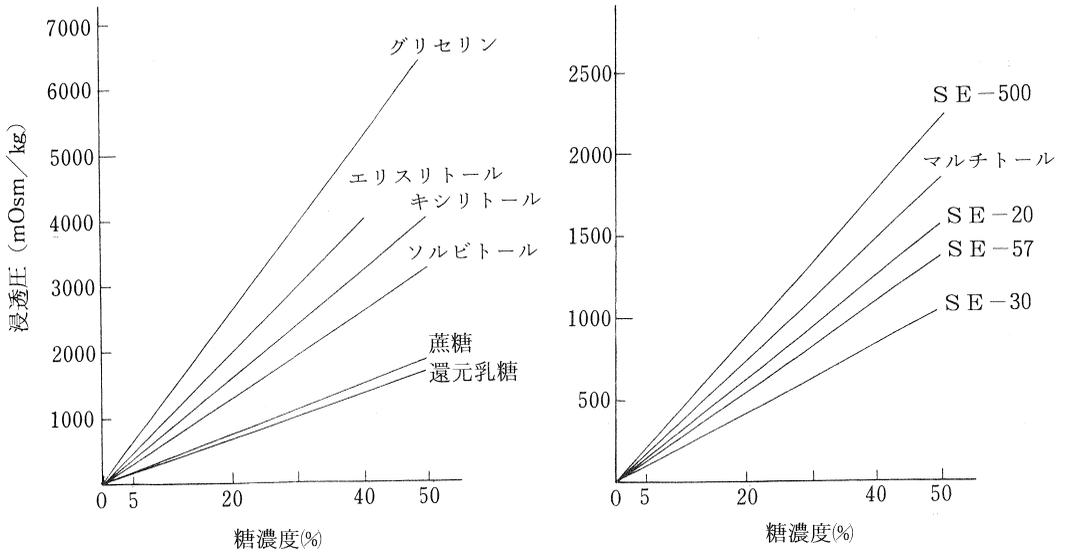
またオリゴ糖ではガラクトオリゴ糖が最も資化されにくく、蔗糖の1/10、次いで直鎖オリゴ糖およびイソマルトオリゴ糖が1/3程度で、その他のオリゴ糖は、蔗糖とほぼ同程度に資化された。

このように耐浸透圧性酵母の糖類による増殖制作用は、菌株により差が認められたが、一般的には糖アルコールではグリセリン>エリスリトール>キシリトール>還元乳糖などが、またオリゴ糖ではガラクトオリゴ糖が増殖抑制にすぐれていた。これらの糖類は蔗糖に比較して濃度の増加とともに増殖度合いが低下したが、特に40~50%程度において顕著であった。

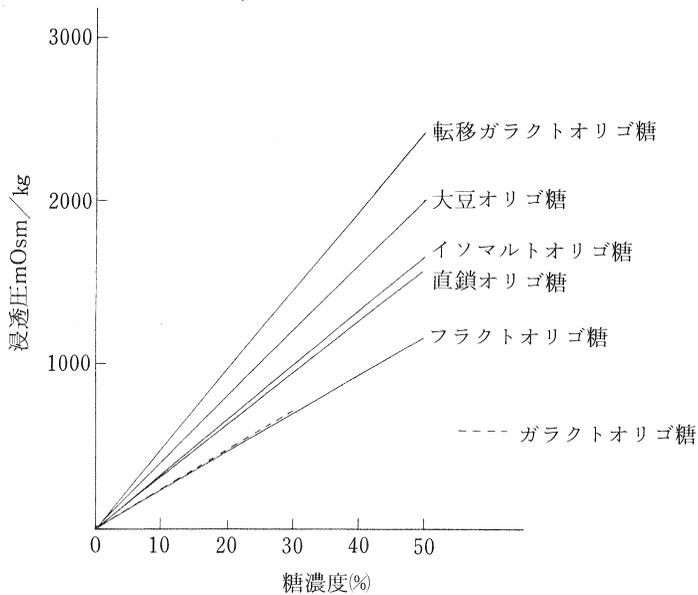
そこで各糖類の5~50%濃度範囲の浸透圧を測定し、結果を第9図~第10図に示した。

試験に供した糖類ではグリセリンが最も大きく、次いでエリスリトール、キシリトール、ソルビトールの順であった。また還元でん粉分解物では、SE-500、マルチトール、SE-20、57、30の順であり、さらにオリゴ糖では転移ガラクトオリゴ糖が最も大きく、大豆オリゴ糖がこれにつぎ、フラクトオリゴ糖が最も小さかった。これらの糖類の単位濃度当りの浸透圧を第7表に示した。表のようにグリセリンは蔗糖の浸透圧の3.6倍、エリスリトールは2.7倍、キシリトールは2.2倍、ソルビトールは1.8倍の値を示した。

一般に溶液の浸透圧は、Van't-Hoffの式より $\Pi_0 = 1/M \cdot R \cdot T \cdot C$ (M:分子量, R:気体定数, T:絶対温度, C:溶質の濃度) で示される。従って同一濃度においては、分子量の小さい物質ほど浸



第9図 糖アルコール類の濃度と浸透圧の関係



第10図 オリゴ糖類の濃度と浸透圧の関係

第7表 各種糖類の1% (W/W) 相当の浸透圧

種 類	浸透圧 (mOsm/kg)	蔗糖の浸透圧に対する比率
蔗 糖	36.9	1.0
グリセリン	131.3	3.6
エリスリトール	98.7	2.7
キシリトール	80.6	2.2
ソルビトール	65.2	1.8
マルチトール	37.6	1.0
還元乳糖	35.0	1.0
SE-20	31.6	0.8
SE-30	21.0	0.6
SE-57	27.8	0.7
SE-500	47.1	1.3
直鎖オリゴ糖	30.3	0.8
イソマルトオリゴ糖	29.9	0.8
フラクトオリゴ糖	22.6	0.6
ガラクトオリゴ糖	22.1	0.6
転移ガラクトオリゴ糖	46.1	1.2
大豆オリゴ糖	40.4	1.1

透圧の上昇効果は大きい。そのためグリセリンやエリスリトール、キシリトールなど単糖類の高濃度領域における増殖抑制効果は、浸透圧の上昇に起因することと、高浸透圧下でグルコーやキシロースを炭素源として耐浸透圧性の酵母を好気培養した場合、グリセリンやソルビトールを生成する²⁾ことから、異常代謝産物であるこれらの糖アルコールを多量に共存させることによりエネルギー代謝が阻害され、そのため増殖が抑制されるものと考えられる。これに対して還元乳糖やガラクトオリゴ糖は、浸透圧では蔗糖と大差がないため、増殖抑制効果はこれらの成分の代謝に関与する酵素系の状況に影響されるものと推察される。

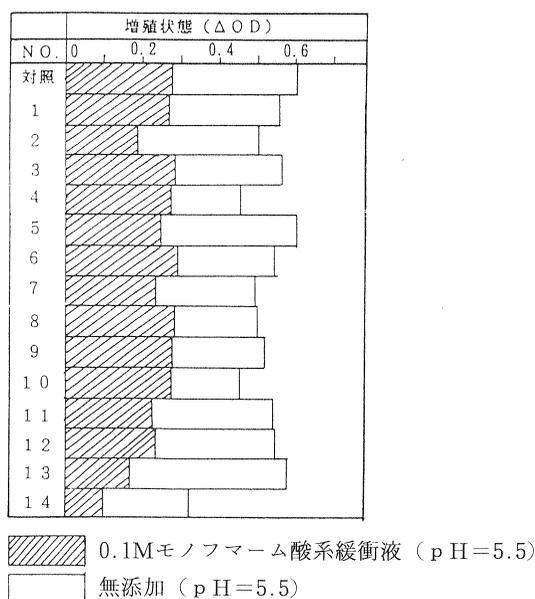
2. 糖類の併用による増殖抑制効果の検討

菓子、シロップ漬、佃煮、漬物などの低甘味化と保存性の向上および生理活性機能の付与等を考慮する場合、甘くてしかも微生物により資化されやすい蔗糖を低甘味で資化されにくい糖類に置き換えることも一つの方法である。そこで先の実験結果、比較的味がよく酵母に資化されにくかった還元乳糖、SE-30、SE-500、ガラクトオリゴ糖などを第8表のように組み合わせ、蔗糖単独使用の場合に対する抑制結果を検討した。

第11図に最も顕著な増殖を示した*Hansenula anomala*に対する糖組成の影響と、緩衝液の併用効果を示した。いずれの試験区も緩衝液添加区が無添加区に比較して抑制力が大であった。糖組成よりはNa14の蔗糖を含まない還元乳糖(10%)・SE-30(10%)・SE-500(10%)・ガラクトオリゴ糖(10%)の系が最も増殖しにくく、次いでNa13の蔗糖、還元乳糖、SE-30、SE-500の各10%の試験区

第8表 増殖抑制に対する糖類の併用効果組合せ

糖類/試験区	対照	(糖濃度 %)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
蔗糖	40	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	30	20	10	0
還元乳糖	0	20	0	0	0	10	10	10	0	0	0	10	10	10	10
SE-30	0	0	20	0	0	10	0	0	10	10	0	0	10	10	10
SE-500	0	0	0	20	0	0	10	0	10	0	10	0	0	10	10
ガラクトオリゴ糖	0	0	0	0	20	0	0	10	0	10	10	0	0	0	10

第11図 *Hansenula anomala*の増殖抑制に対する糖類の併用効果 (30℃, 7日後)

であった。

これに対して全糖量40% (浸透圧2,000mOsm/kg) 程度の状態で, 蔗糖が50%を占めている試験区においては, 資化困難な糖類を共存させても酵母の増殖抑制に対しては顕著な効果が認められなかった。これは*Hansenula anomala*の増殖抑制に必要な浸透圧 (5,000mOsm/kg以上) に達していないことと, 生育するために必要な蔗糖が多量に共存するためと考えられた。

3. 増殖抑制に対する天然系静菌剤の効果

酵母の増殖抑制はpH5.5以下の液性においては, 酢酸ナトリウムを含む有機酸緩衝液の利用により可能となることは既に報告した¹⁾。しかしながら, 中性付近では抑制効果が余り認められないため, 第

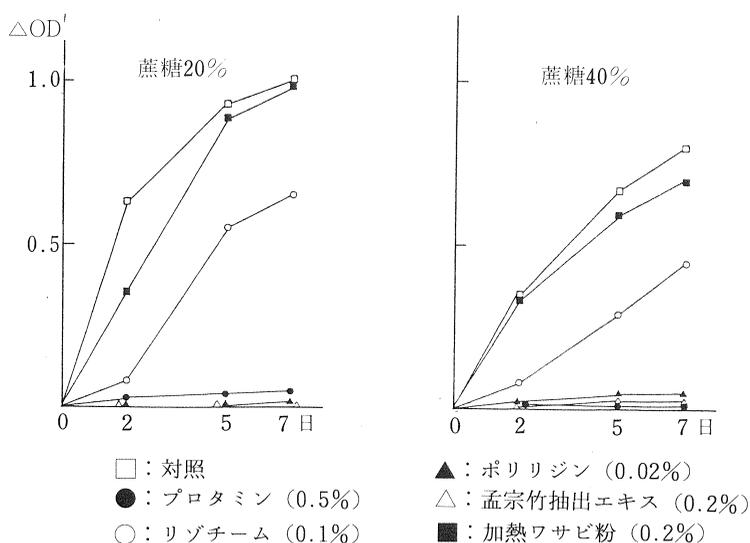
6表に示した5種類の天然系静菌剤を用いて30℃、7日間振盪培養し、静菌効果に及ぼす濃度の影響を検討した。

Zygosaccharomyces rouxii, *Hansenula anomala*, *Klyuveromyces marxianus*の3菌株について実施したが、一例として*Hansenula anomala*に対するpH5.5、蔗糖20、40%における経日的な変化を第12図に示した。試験に供した静菌剤では孟宗竹抽出エキス、ポリリジン、プロタミンなどを添加したものが有効であった。これに対してリゾチームや加熱ワサビ粉エキスなどには、今回の添加量の範囲においては余り効果が認められなかった。なお、効果の認められた静菌剤のうち、プロタミンは苦味があり蛋白質が共存すると沈澱物を生じやすいため、以後の実験では除外した。

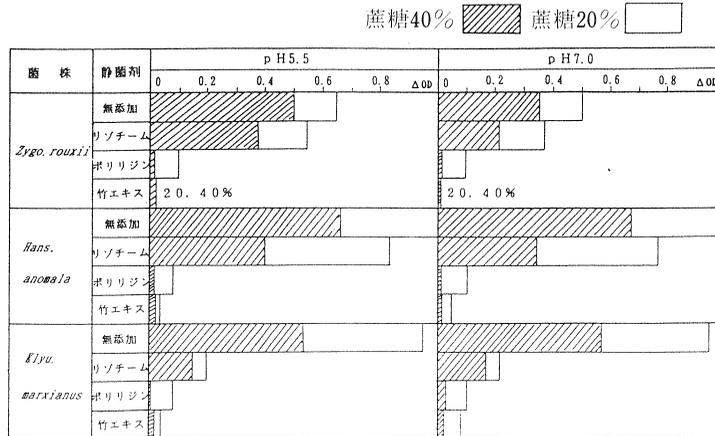
そこで孟宗竹抽出エキス、ポリリジン、およびこれらに比べて抑制効果はやや劣るが、香味の点では問題のなかったリゾチームの3種類の静菌剤を用いて、各菌株に対しpH5.5と7.0、蔗糖濃度20%と40%における効果を検討し、30℃、7日後の状態を第13図に示した。

いずれの静菌剤も糖濃度の高い程有効であるが、各菌株に対して増殖抑制効果の大きいものは孟宗竹エキスとポリリジンであった。また、pH5.5では*Hansenula anomala*に対して余り効果の見られなかったリゾチームも中性付近においては3菌株に対してかなりの抑制効果が認められ、特に*Klyuveromyces marxianus*に有効であった。従って中性付近で蔗糖を主原料とし食塩を殆んど添加しない食品、例えば野菜や果物のシロップ漬、金時豆、甘納豆、スポンジケーキ、各種あん類、コーヒーゼリー、水ようかん、プリンなどの加工食品の保存に適していることが判明した。

しかし加工食品には惣菜、佃煮、漬物、珍味類など蔗糖とともに醤油、味噌、食塩などを併用した加工食品も多い。そこでこれらの食品のシェルフライフの延長を目的として、増殖抑制効果が顕著であっ



第12図 *Hansenula anomala*に対する天然系静菌剤の効果 (pH5.5, 30℃)



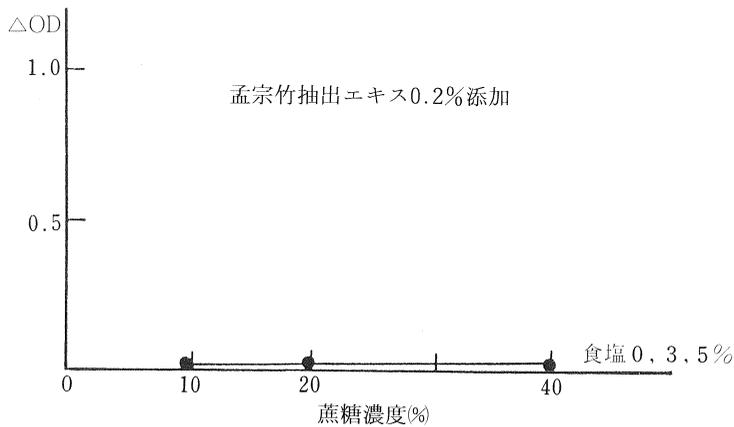
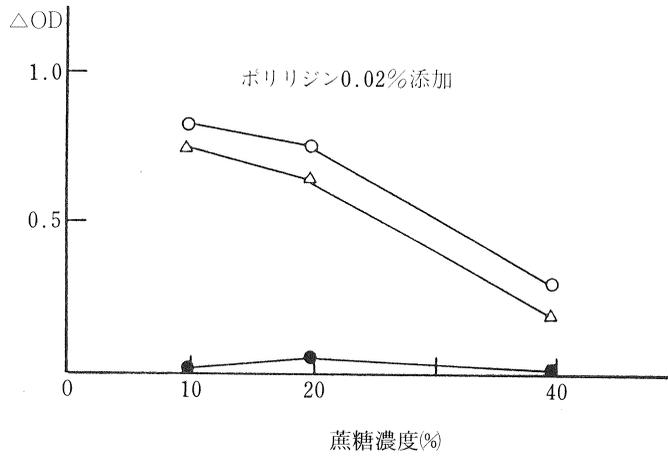
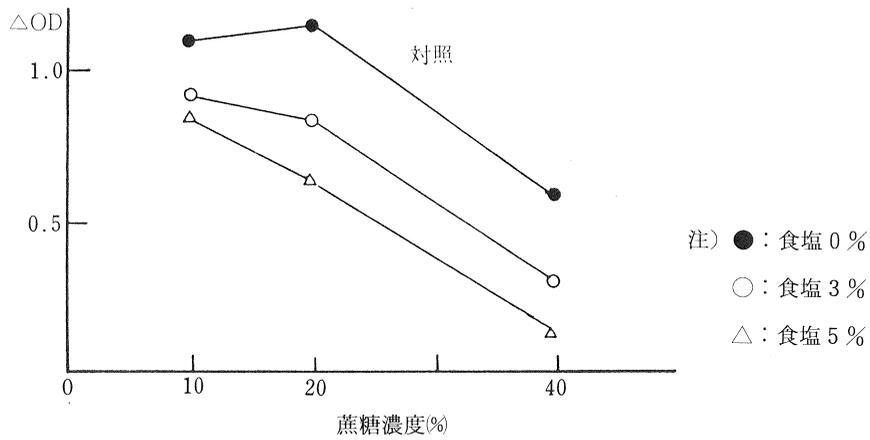
第13図 天然系静菌剤の効果に対する pH と糖濃度 (30℃, 7日後)

たポリリジンと孟宗竹エキスの両者を用いて蔗糖, 食塩共存下における効果を検討した。

第14図は *Hansenula anomala* の増殖抑制に及ぼす蔗糖, 食塩および天然系静菌剤の影響を示したものである。ポリリジンを添加した試験区は, 食塩を併用しない場合はいずれの糖濃度においても増殖が抑制されたが, 食塩を併用した場合には静菌剤の効果が全く認められなくなり, 対照区と差違がなかった。データは省略したが, 食塩の代わりに有機酸ナトリウム塩を併用した緩衝液を用いた場合も同様の現象が認められることから, ナトリウムイオンがポリリジンの静菌作用に対して抑制的に働くものと考えられた。

これに対して孟宗竹抽出エキスを添加した試験区では, いずれの蔗糖濃度においても, また食塩の併用の有無にかかわらず酵母の増殖が著しく抑制された。ポリリジンや孟宗竹抽出エキスのこのような現象は, 今回試験に供した他の菌株に対してもほぼ同様であった。

以上の結果より, これらの天然系静菌剤を有効に利用すれば, 加工食品の大幅な低食塩, 低糖化が可能となることが判明した。



第14図 *Hansenula anomala*の増殖抑制に対する蔗糖，食塩，天然系静菌剤の影響
(pH6.0, 30℃, 7日後)

要 約

果実や野菜のシロップ漬，ぬれ納豆，くずきり，淡雪，もなかなど砂糖を多用した食品の低糖化を図るため，耐浸透圧性酵母の増殖抑制方法を検討した。

1. 供試糖類のうち，増殖抑制に効果的な糖類は一般に糖アルコールではエリスリトール，キシリトール，グリセリン，還元乳糖などであり，またオリゴ糖ではガラクトオリゴ糖であった。

2. 各糖類の単位濃度当たりの浸透圧は，糖アルコール類ではグリセリン>エリスリトール>キシリトール>ソルビトール>還元乳糖の順であり，またオリゴ糖では転移ガラクトオリゴ糖>大豆オリゴ糖>イソマルトオリゴ糖>直鎖オリゴ糖>ガラクトオリゴ糖>フラクトオリゴ糖の順であった。

3. これらの糖類による酵母の増殖抑制作用は，糖の有する浸透圧と各糖類の代謝に関与する酵素系の状態により影響されるものと考えられた。

4. 酵母に資化されにくい糖類を数種併用して増殖抑制効果を検討したところ，全糖量40%程度の浸透圧下においては，蔗糖が共存しない場合には効果が認められたが，蔗糖が全糖量の25%程度共存すると抑制効果は失われた。

5. 蔗糖を用いた食品の低糖化を図るため，天然系静菌剤による保存効果を検討したところ，ポリリジンと孟宗竹抽出エキスを添加したものが中性付近においても有効であった。しかし，ポリリジンの効果は食塩や有機酸塩などナトリウムイオンが共存すると喪失した。

文 献

- 1) 井川房欣，加藤 充：愛食工技年報，31，121-133(1990)
- 2) 増井正幹，大西 博，畝本力編：好塩微生物，p125，医歯薬出版(1979)