

エタノールと加熱の併用による微生物の殺菌

南場 毅・戸谷精一・金田睦美*1・川口悦子*1・加藤 照*2

エタノールと加熱併用による微生物の殺菌については、提ら¹⁾の55℃前後の低温での結果や漬物に関連する微生物についての菊地ら²⁾の報告など一部の微生物について報告がみられる。また、めん類の殺菌への応用については、棚田ら³⁾から報告されている。また、著者らは水ようかんの変敗、離水の防止のため試験し、生あん、砂糖及び寒天の加熱混合の際にエタノール2%と氷酢酸を添加(混合液のpH5.5)すると生菌数の減少が認められ、保存性が高まることを報告した⁴⁻⁷⁾。

今回はこれらの殺菌効果を確認するため、エタノールと加熱による種々のカビ類、酵母及び細菌胞子の殺菌試験を行い、さらに *Candida persegrusei* (*C.persegrusei*と略す)における殺菌前後の菌体表層の走査型電子顕微鏡による観察や菌体アミノ酸組成の分析などを行なって、エタノールと加熱が菌体の損傷に及ぼす影響についても検討した。また、煮干し抽出液の殺菌に対して応用試験を実施した。

実験方法

1. 供試菌株と分離菌株の同定

(1) カビ 供試菌株として *Trichoderma viride* IFO 4847 (*T.viride* IFO 4847と略す), *Cladosporium cladosporioides de vries* IFO 6368 (*C.cladosporioides de vries* IFO 6368と略す), 当所保存菌株の *Aspergillus sojae* (*A.sojae*と略す), *Penicillium chrysogenum* (*P.chrysogenum*と略す), *Penicillium cyclopium* (*P.cyclopium*と略す) 及び *Mucor plumbeus* (*M.plumbeus*と略す) を用いた。

(2) 酵母 供試菌株として *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0510 (*Z.rouxii* IFO 0510と略す), 協会7号酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* K-7 (*S.cerevisiae* K-7と略す), 焼酎酵母 発酵研究所1号菌 (*Saccharomyces cerevisiae* H-1 (*S.cerevisiae* H-1と略す) の他に、東京農大から分譲を受けた *Debaryomyces hansenii* (*D.hanseni*と略す),

Hansenula anomala (*H.anomala*と略す) 及び *Rodotorula TA* を用いた。

(3) *Bacillus* 属細菌 供試菌株として *Bacillus subtilis* IAM 1028 (*B.subtilis* IMA 1028と略す), 東京農大から分譲された *Bacillus megaterium* SNC 1003 (*B.megaterium* SNC 1003と略す), *Bacillus curculans* (*B.curculans*と略す), 及び *Bacillus coagulans* (*B.coagulans*と略す) を使用した。煮干しから分離した細菌は長谷川⁸⁾の方法に従って形態学的性質を検討し、Bergey's manual 8th⁹⁾に従って同定した。

2. 殺菌方法

(1) カビ カビは第1図に示す方法で懸濁液を調製し殺菌試験を実施した。対照区は品温が60℃に到達後直ちに流水で冷却し、初発菌数を求めた。殺菌前後の生菌数は標準寒天培地を用いる希釈平板培養法で測定し、1g (ml) 中のCFU (Cell Forming Unit) で表示した。



第1図 カビにおけるエタノール(加熱処理)の効果測定法

(2) 酵母 酵母では第2図に示す方法で懸濁液を調製した。試験区は70℃で10分間殺菌後、カビの場合と同様、希釈平板培養法で生菌数を測定した。

*1 名城大学

*2 中小企業振興公社

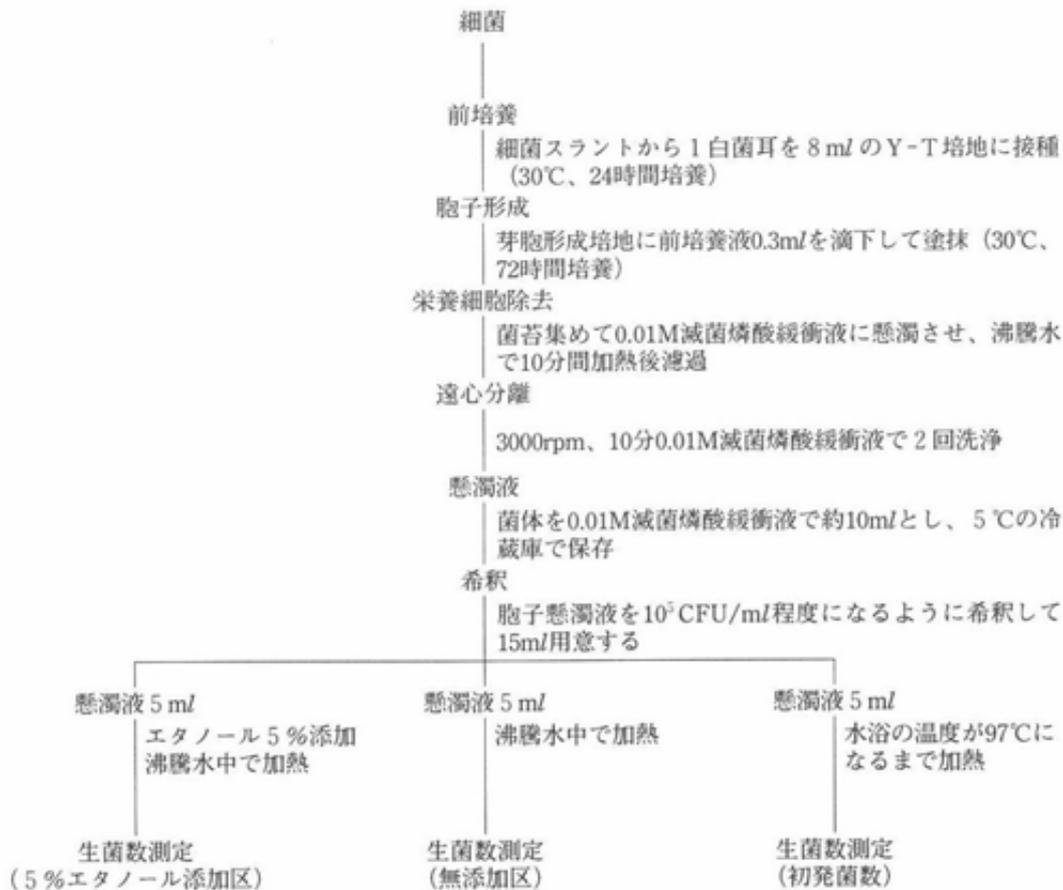


第2図 酵母におけるエタノール(加熱処理)の効果測定法

(3) *Bacillus* 属細菌胞子 冷蔵庫に保存した斜面培地の 8 ml の YT 培地 (ペプトン 5 g, 酵母エキス 2.5g, グルコース 1 g 及び Tween80 0.5g を脱イオン水 1 l に溶解し pH7.2 に調整後オートクレーブ殺菌) で 30°C, 24 時間前培養後, 胞子形成用培地 (肉エキス 10g, ペプトン 10g, 食塩 5 g, グルコース 10g, 硫酸マンガン 10mg を脱イオン水に溶解し, pH を 7.2~7.4 に調整後, オートクレーブ殺菌) に塗抹し, 30°C, 72 時間培養した後, 栄養細胞を除去して懸濁液を調製し, 以下, 第 3 図に従って殺菌試験を行った。

3. 煮干し抽出液における殺菌試験

煮干し 50g に対して, 200ml の滅菌水及び各種薬剤を添加した後, 80°C, 40 分間加熱抽出し, この抽出液中の生菌数を測定して殺菌効果を判定した。薬剤としては, エタノール, 酢酸, 酢酸ナトリウム, リゾチーム (エーザイ (株) 製), ショ糖脂肪酸エステル (三菱化成



第3図 *Bacillus* 胞子懸濁液の調製とエタノール添加加熱殺菌方法

食品(株)製P-1570)を組み合わせて使用した。リゾチームの場合は80℃、40分間加熱抽出後、品温を50℃に下げから添加した。

4. 紫外部吸収スペクトルによる菌体からの漏洩物質の測定

*C.persegrusei*は実験方法2. 殺菌方法における酵母と同様に殺菌した後、遠心分離(3,500rpm, 10分)し、その上澄液の紫外部吸収スペクトルを自記分光光度計((株)島津制作所製UV-240)により測定した。

5. 菌体アミノ酸の分析

*C.persegrusei*は4. 紫外部吸収スペクトルによる菌体からの漏洩物質の測定の殺菌条件と同様に殺菌した後、菌体を凍結乾燥後、6 N HClで110℃、16時間加水分解した後、アミノ酸アナライザー((株)日立製作所製L-8500)により分析した。

6. 無機成分の分析

凍結乾燥菌体を灰化後、リンはモリブデンブルー法¹⁰⁾、その他の成分は原子吸光光度計(Nippon jarell ASH製FLA)により測定した。

7. 走査型電子顕微鏡による菌体の観察

*C.persegrusei*を第2図の方法で培養して対数増殖期に集菌し、滅菌磷酸緩衝液に溶解させて得た菌体懸濁液を殺菌し、遠沈させた菌体をポリリジン膜で調製したスライドガラスに滴下し、グルタルアルデヒドで2

～3時間、オスミウム酸で1時間固定し、エタノールで脱水、臨界点乾燥、金蒸着後、走査型電子顕微鏡(日本電子(株)製JSM820)で撮影した。*Bacillus strain N-1*の場合はグルタルアルデヒドで固定して*C.persegrusei*と同様に脱水、乾燥、蒸着後、撮影した。

実験結果及び考察

1. カビに対する殺菌効果

カビに対するエタノールと加熱との併用における殺菌効果を第1表に示した。各菌株とも加熱のみの処理により初発菌数が約1/100から1/1,000に減少した。エタノール添加と加熱を併用することにより、*A.sojae*以外の菌株で生菌数がさらに約1/10から1/1,000に減少した。*P.cyclopium*についてはエタノール濃度を変えて殺菌に及ぼす影響を検討した(第2表)。無加熱区は10分後でも対照とほとんど菌数に変化がなく室温下ではほとんど殺菌効果が認められなかった。エタノールを添加した加熱区ではエタノール2%添加区は1mlあたり 10^2 レベルの菌数が残存したが、5%添加区は10以下/mlであり強い殺菌効果が認められた。

2. 酵母に対する殺菌効果

酵母における殺菌効果を第3表に示した。各菌株とも1mlあたり 10^5 から 10^6 レベルの初発菌数が加熱のみ

第1表 エタノールと加熱の併用によるカビ類の殺菌効果

供試菌株	CFU/ml		
	初発	加熱区	エタノール添加加熱区
<i>P.chrysogenum</i>	3.2×10^6	3.7×10^2	1.0×10
<i>M.plumbens</i>	2.0×10^5	2.0×10^4	4.0×10^2
<i>T.viride</i> IFO 4847	1.0×10^6	1.9×10^4	5.0×10^2
<i>C.cladosporioides</i> de Vries IFO 6368	5.0×10^5	3.5×10^3	2.5×10
<i>A.sojae</i>	1.5×10^6	9.5×10^2	4.2×10^2

*菌懸濁液の加熱は60℃で10分加熱。エタノール濃度は5%(v/v)

第2表 エタノールと加熱の併用による*P.cyclopium*の殺菌効果

処理方法	CFU/ml
無添加、無加熱区	4.1×10^5
エタノール5%(v/v)添加、無加熱区	4.9×10^5
エタノール無添加、60℃、10分加熱区	5.0×10^2
エタノール1%(v/v)添加、60℃、10分加熱区	2.8×10^2
エタノール2%(v/v)添加、60℃、10分加熱区	2.7×10^2
エタノール5%(v/v)添加、60℃、10分加熱区	<10

第3表 エタノールと加熱の併用による酵母の殺菌効果

供試菌株	CFU/ml		
	初発	加熱区	エタノール添加加熱区
<i>Z.rouxii</i> IFO 0510	3.2×10^6	2.1×10^2	<10
<i>D.hansenni</i>	2.0×10^7	7.4×10^2	3.0×10
<i>C.persegrusei</i>	7.9×10^6	3.0×10	<10
<i>S.cerevisiae</i> H-1	5.5×10^7	3.5×10^3	<10
<i>S.cerevisiae</i> No.7	1.3×10^8	9.6×10^3	<10
<i>Rodotorula.TA</i>	9.8×10^7	1.6×10^5	<10

*菌懸濁液の加熱は70℃、10分。エタノール濃度は5%(v/v)

第4表 エタノールと加熱の併用による*H.anomala*の殺菌効果

処理方法	CFU/ml
無添加、無加熱区	1.1×10^8
エタノール5%(v/v)添加、無加熱区	8.3×10^7
エタノール無添加、70℃、10分加熱区	4.0×10
エタノール1%(v/v)添加、70℃、10分加熱区	<10
エタノール2%(v/v)添加、70℃、10分加熱区	<10
エタノール5%(v/v)添加、70℃、10分加熱区	<10

の処理により*C.perusegrusei*以外の菌株では 10^2 レベル以上残存していたが、エタノールを添加すると*D.hansenni*を除く6菌株の残存菌数が10以下/mlとなり強い殺菌効果が認められた。*H.anomala*についてエタノール濃度を変えて殺菌に及ぼす影響を検討した(第4表)。無添加加熱区(4.0×10 /ml)に比べてエタノール1%以上の添加により残存菌数を10以下/mlとすることができた。

3. *Bacillus* 属胞子に対する殺菌効果

*Bacillus*の胞子に対する殺菌効果を第5表に示した。初発菌数が1mlあたり 10^4 から 10^5 レベルが加熱処理により $10^4 \sim 10^2$ レベルとなった。しかし、エタノールと

加熱の併用により*B.megaterium* SNC 1003と*B.coagulans*は加熱区の 10^3 レベルから 10^2 レベルに減少した。*B.subtilis* strain N-1ではさほど大きな効果は認められなかった。これらの結果から、細菌胞子では高い殺菌効果を得るにはエタノール以外の薬剤の共存が必要と考えられた。

4. 煮干し抽出液における殺菌効果

エタノールと加熱併用の殺菌効果を煮干し抽出液の製造に応用した。まず煮干しの変敗に関係する微生物を分離した。標準寒天上でシワのある灰白色コロニーは*Bacillus*と考えられた。純粋分離(*Bacillus* strain N-1)した後、走査型電子顕微鏡で撮影した(写真1)。

第5表 エタノールと加熱の併用による*Bacillus*胞子の殺菌効果*

供試菌株	CFU/ml		
	初発	加熱区	エタノール添加加熱区
<i>Bacillus</i> strain N-1	1.4×10^5	6.2×10^3	2.6×10^3
<i>B.circulans</i>	5.4×10^5	2.3×10^3	9.4×10
<i>B.coagulans</i>	1.3×10^5	1.3×10^3	1.6×10^2
<i>B.subtilis</i> IAM 1028	7.0×10^4	5.2×10^2	1.3×10^2
<i>B.megaterium</i> SNC 1003	4.3×10^5	1.9×10^3	2.6×10^2

*胞子懸濁液の加熱は沸騰水中。エタノール濃度は5%(v/v)

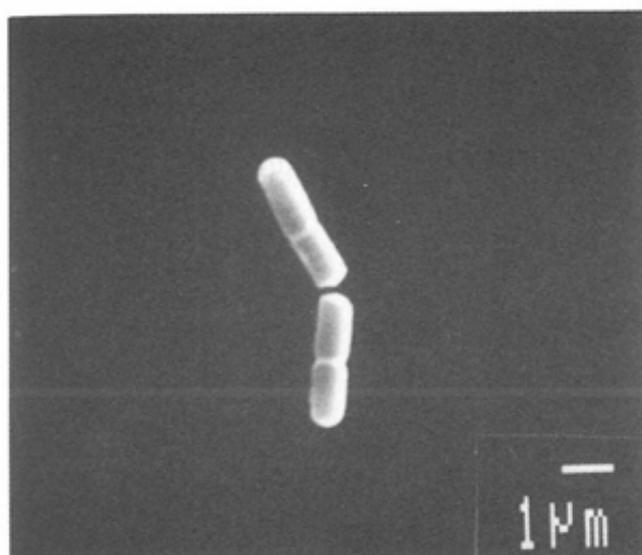


写真1 *Bacillus* strain N-1の走査型電子顕微鏡写真

さらに*B.subtilis* IAM 1028を対照として、形態学的、生理的試験⁸⁾を行った。その結果を第6表に示したが、大きさは $1.0 \times 2.5 \mu$ で、胞子を作り、V-P反応陽性その他の性質からBergey's manual 8th⁹⁾により*Bacillus* strain N-1を*Bacillus subtilis*と同定した。この結果、変敗に*Bacillus*が関係していると思われ、かつ第5表に示すように、エタノールと加熱の併用でも菌の残存が認められたので、加熱殺菌の際にエタノールのほかにリゾチムとしょ糖脂肪酸エステルを組み合わせる殺菌試験を行った(第7表)。その結果、無添加の対照区(pH6.02)が1gあたり 10^5 レベルに対して試験をした薬剤の単独使用区ではエタノール区は1gあたり 10^3 レベルと強い殺菌効果が認められた。酢酸0.5%区とリゾチム0.02%区は1gあたり 10^4 レベルになったが、しょ糖脂肪酸エステル0.1%区はほとんど減少がみられなかった。図示しなかったが、酢酸1.0%では $7.0 \times 10^2/g$ にまで減少したが、酢酸ナトリウム1.0%区では 10^4 レベルの残存菌数が認められた。

エタノールと他の薬剤を組み合わせた場合では、エタノール10%としょ糖脂肪酸エステル0.1%の組み合わせでは $8.5 \times 10^2/g$ まで減少し、エタノール20%としょ糖脂肪酸エステル0.1%の試験区では $5.0 \times 10/g$ の残存菌数となり強い殺菌効果が認められた。

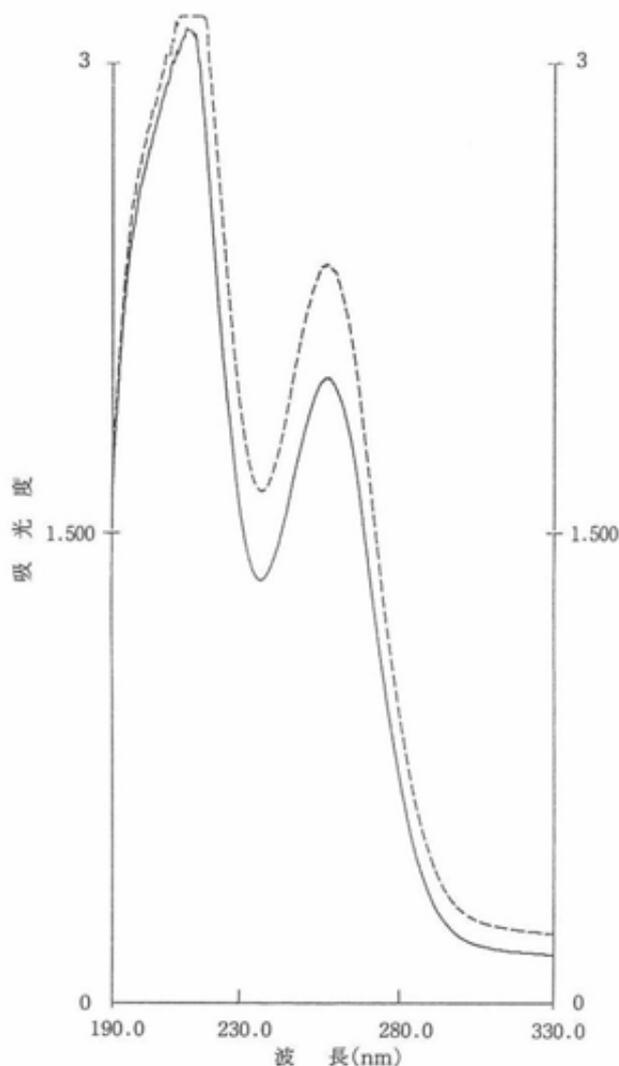
5. エタノールと加熱による殺菌作用が *C.persegrusei*の菌体損傷に及ぼす影響

(1) 殺菌による菌体からの漏洩 *C.persegrusei*菌体の殺菌処理した結果におけるUVスペクトルでは、第4図のように、エタノール添加により280nm付近の吸収

がやや増大した。エタノール添加と加熱により、菌体内容物質がわずかであるが漏洩していると考えられた。しかし、堤ら¹⁾はエタノールと加熱併用試験を55℃前後で行い、260nmにおける吸収の増大はほとんどみられないと報告している。この差異は本実験とは供試菌株や作用条件が異なっているためと考えられるが、詳細については今後検討を要する。

(2) 菌体アミノ酸と無機成分の変化 菌体の殺菌前後におけるアミノ酸組成の分析結果を第8表に示した。無処理区に対して加熱処理区のアミノ酸の総量はかなり減少した。

個々のアミノ酸では特にアルギニン、リジンが大き



第4図 *C.persegrusei*からの紫外外部吸収物質の漏洩結果

————— : 無添加加熱区
 - - - - - : エタノール添加加熱区

第6表 分離菌株の形態学的及び生理学的性質

測定項目	strain N-1	<i>B.subtilis</i> IAM 1028
大きさ	1.0×2.5	0.8×2.0
胞子	楕円形	楕円形
グラム染色	+	+
運動性	+	+
カタラーゼ	+	+
メチルレッド試験	-	-
V-P反応	+	+
NaCl (7%) での生育	+	+
Acid from :		
グルコース	+	+
マルトース	+	+
ラクトース	-	-
サッカロース	+	+
マンニトール	+	+
ガラクトース	-	+
グリセリン	+	+
アラビノース	-	-
フラクトース	-	+
キシロース	-	-
ソルビットール	-	-
デンプンの分解	+	+
クエン酸利用 (クリステンセン)	+	+
硝酸塩還元	+	+
インドールの生成	-	-
アセトインの生成	+	+
カゼインの分解	+	+
OF試験 (グルコース)	+	+
(マルトース)	+	+

+: 陽性 -: 陰性

第7表 エタノールと加熱併用による煮干し抽出液の殺菌効果*

薬剤名	CFU/g
対象区	1.2×10 ⁵
+酢酸0.5%(v/v)	1.2×10 ⁴
+エタノール10%(v/v)	7.0×10 ³
+リゾチーム0.02%(w/v)	2.0×10 ⁴
+しよ糖脂肪酸エステル0.1%(w/v)	3.2×10 ⁵
+エタノール3%(v/v) +リゾチーム0.02%(w/v)	5.1×10 ⁴
+エタノール10%(v/v) +しよ糖脂肪酸エステル0.1%(w/v)	8.5×10 ²
+エタノール20%(v/v) +しよ糖脂肪酸エステル0.1%(w/v)	5.0×10

*煮干しは水 (pH6.0) に溶解後に各種薬剤を添加、80℃で40分加熱処理した。
リゾチームは加熱して50℃に冷却後添加した。

第8表 *C.persegrusei*の菌体アミノ酸組成*

アミノ酸名	(mg/g)		
	無処理区	加熱処理区	EtOH添加加熱処理区
アスパラギン酸	39.3	34.1	33.6
スレオニン	17.5	15.7	12.3
セリン	18.2	16.1	9.1
グルタミン酸	23.6	18.6	18.2
プロリン	17.8	14.6	14.9
グリシン	24.6	18.3	18.2
アラニン	28.4	21.0	21.4
システイン	3.0	—	—
メチオニン	8.6	4.4	6.1
イソロイシン	22.0	20.2	19.9
ロイシン	32.6	29.1	30.2
チロシン	16.3	12.8	14.2
フェニルアラニン	17.7	15.0	16.3
ヒスチジン	11.6	8.6	10.7
リジン	42.8	31.7	32.9
アルギニン	39.2	17.4	17.5
計	363.2	277.6	275.5

*凍結乾燥菌体を6N HCl濃度、110°C、15時間加水分解後、Hitachi L-8500アミノ酸分析計で測定。

く減少する傾向がみられた。無添加加熱区とエタノール添加加熱区を比較すると、総量では大きな差はみられなかったが、エタノール添加区の場合、セリンの減少が著しかった。

無機成分では、第5図に示すように加熱により各成分とも減少したが、エタノールと加熱の併用は無添加加熱区に比べて、カルシウム、マグネシウム及び鉄の減少傾向が認められた。

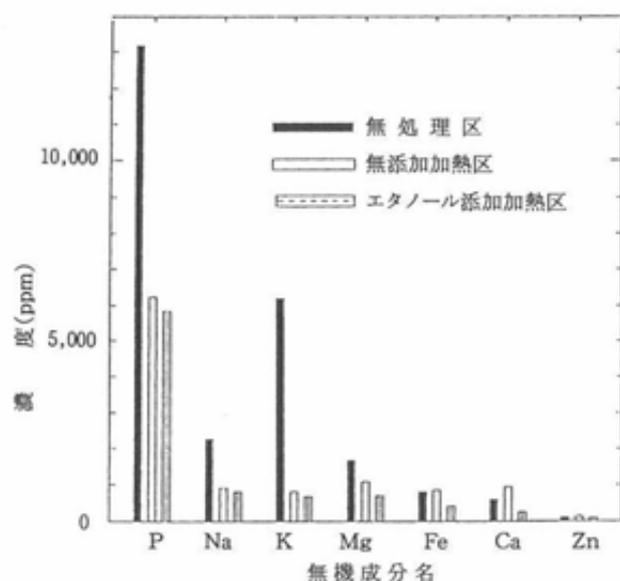
(3) 走査型電子顕微鏡による菌体の損傷の観察
*C.persegrusei*の走査型電子顕微鏡写真を2～5に示し

た。菌体を5%エタノールで室温下、40分作用させた場合、無処理に比べて菌体の表面がややくずれているようにみえた。無添加加熱区では60%、10分加熱しても、菌体表面は損傷を受けてなかったが、エタノール添加区は菌体の表面だけでなく内部まで破損、損傷が激しく、かつ凝集も認められ、熱エタノールが菌体破壊に強く作用していることが確認された。エタノールと遠赤外線加熱による殺菌後の*D.hansenii*の走査型電子顕微鏡による観察でも同様な菌体破壊が観察されている。¹¹⁾

要 約

エタノール添加と加熱による微生物の殺菌効果を検討した。

- 1) 6種類のかびの標準菌株の加熱殺菌試験を行ったところ、エタノール添加区は*T.viride* IFO 4847など5菌株において無添加区に比べて約1/10～1/100に菌数を減少させることができた。7種類の酵母についても、エタノール添加区は*Rodotorula* TAはじめ6菌株で残存菌数を1 mlあたり10以下とすることができた。しかし、*Bacillus*の胞子ではエタノールと加熱を併用しても残存菌数を大きく減少させることはできなかった。
- 2) 煮干しから変敗に関係する細菌を分離してそれを*Bacillus subtilis*と同定した。煮干しの抽出の際に

第5図 *C.persegrusei*の菌体無機成分*

*試料1g中の濃度(ppm)で表示。

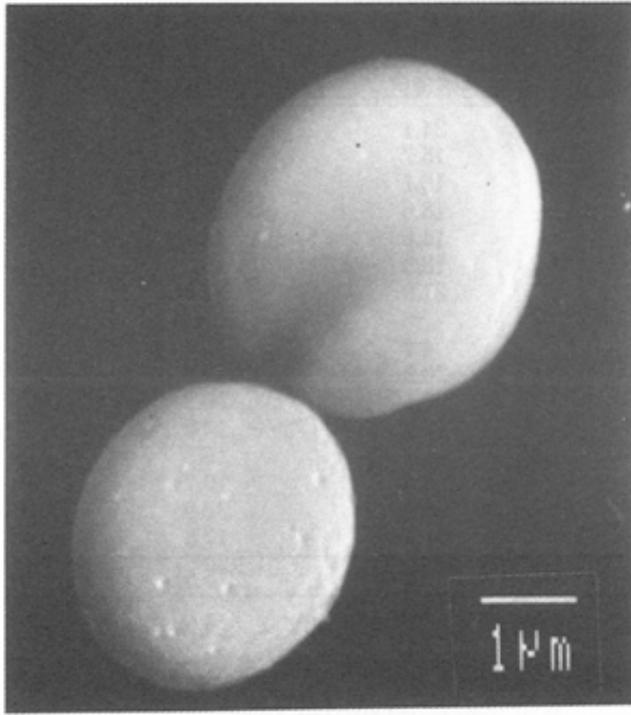


写真2 *C.persegrusei*の走査型電子顕微鏡写真(無処理)

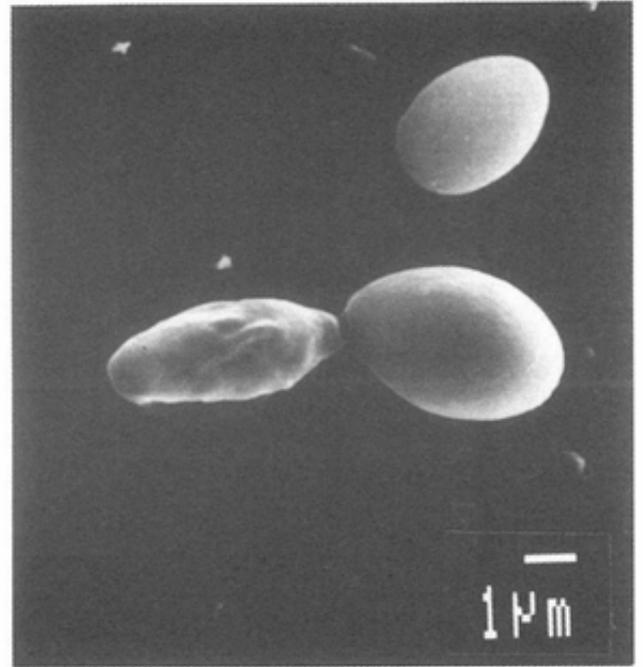


写真3 *C.persegrusei*の走査型電子顕微鏡写真
(5%エタノール、室温、40min作用後)

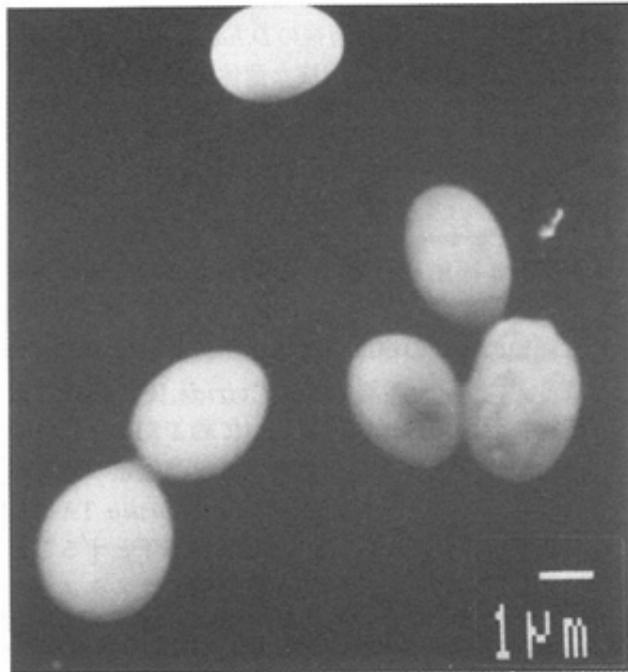


写真4 *C.persegrusei*の走査型電子顕微鏡写真
(エタノール無添加、60℃、10min作用後)

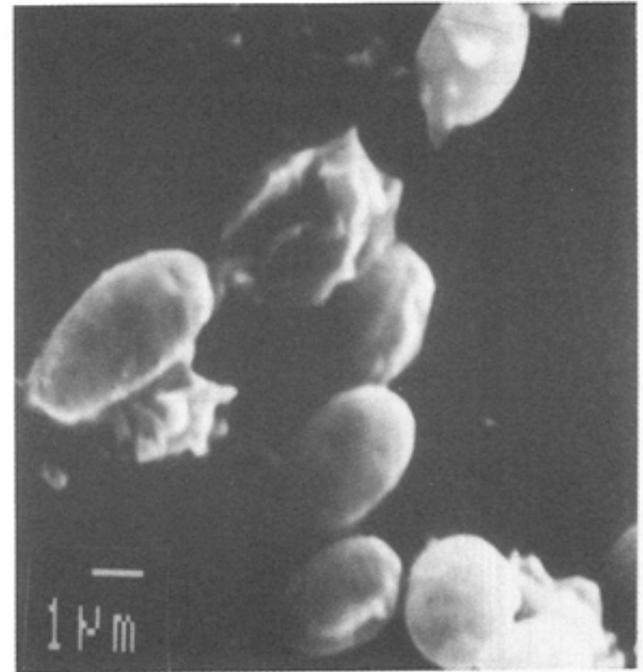


写真5 *C.persegrusei*の走査型電子顕微鏡写真
(5%エタノール、60℃、10min作用後)

20%エタノールと0.1%しょ糖脂肪酸エステルを添加することにより無添加区に比べ1/10,000に生菌数を減少させることができた。

- 3) *C.persegrusei*の菌体懸濁液にエタノールを添加して加熱殺菌した菌体からの漏洩物質の紫外部吸収スペクトルの測定の結果、無添加加熱区にくらべてやや260nm付近の吸収の増大がみられた。走査型電子顕微鏡で観察したところ、エタノールに曝された*C.persegrusei*の菌体表層に損傷がみられた。さらに、加熱を併用した場合、菌体表面ばかりでなく内部にまで激しい損傷が認められた。

終わりに臨み、試験菌株を恵与頂き、御指導賜った元東京農業大学教授好井久雄先生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 堤 將和・李 在根：日食工誌, 35, 545 (1988)
- 2) 菊地久寿郎・若林 昭：新潟食品研報, 20, 7 (1985)
- 3) 棚田益夫・内田晴彦：日食工誌, 21, 345 (1974)
- 4) 南場 毅・長谷川雅則：愛知食品工技年報, 28, 48 (1987)
- 5) 南場 毅・加藤和人・芦刈重人：愛知食品工技年報, 30, 37 (1989)
- 6) 南場 毅・井上靖也・鈴木峰夫：愛知食品工技年報, 31, 19 (1990)
- 7) 南場 毅・鈴木峰夫：愛知食品工技年報, 32, 9 (1991)
- 8) 長谷川武治編：微生物の分類と同定, 東京大学出版会
- 9) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., by R.E.Buchanan and M.E.Gibbons, The Williams & Wilkins, co.,Baltimore (1974)
- 10) 永原太郎・岩尾裕之：食品分析法, 柴田書店 (1980)
- 11) 南場 毅・菊川浩史・大島克己：愛知食品工技年報, 34, 7 (1993)