

スパークリングワイン中および乳酸水溶液中の酵母に対する 低温の影響

誌名	日本菌学会会報 = Transactions of the Mycological Society of Japan
ISSN	00290289
著者	富樫, 巖 永井, 一輝 亀田, 剛 土田, 義之
巻/号	52巻1号
掲載ページ	p. 43-46
発行年月	2011年5月

スパークリングワイン中および乳酸水溶液中の酵母に対する低温の影響

富樫 巖・永井 一輝・亀田 剛・土田 義之

旭川工業高等専門学校, 〒071-8142 旭川市春光台2条2丁目1-6

Influence of Low Temperature to Yeasts in Sparkling Wine and in Aqueous Solution of Lactic Acid

Iwao TOGASHI, Kazuki NAGAI, Tsuyoshi KAMEDA, Yoshiyuki TSUTIDA

Asahikawa National College of Technology, Syunkodai 2-2-1-6, Asahikawa city, Hokkaido, 071-8142, Japan

(Accepted for publication March 31 2011)

The sterilizing effect of a sparkling wine containing 5% (v/v) of ethanol on two types of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*) at -80 to 7°C was assessed. Consequently, the freezing treatment at -20°C had a sterilizing effect on the two yeasts, and their viability decreased to more than 10^3 for five days. Instead of the wine, when water, aqueous solution of 5% (v/v) ethanol, carbonated water, and carbonated water containing 5% of ethanol were used individually, there was no sterilizing effect at -20°C . On the other hand, aqueous solution of 0.05-0.1% (w/v) lactic acid, and carbonated water containing 5% ethanol and 0.05-0.1% lactic acid had the same sterilizing effect as the wine. Generally, lactic acid is one of minor components contained in alcoholic beverages, such as the wine.

(Japanese Journal of Mycology 52: 43-46, 2011)

Key Words—Freezing; Microorganism; Organic acid; Sterilization.

緒 言

ビン内二次発酵を利用して清酒ベースの発泡性酒類(リキュール類)の開発に取り組んでいる企業から、同発酵を終えた製品を温度約 -20°C の環境下にて5~10日間凍結状態にすることで、ビン内酵母の生菌数が激減するとの情報が寄せられた。同発泡性酒類中に含まれる二次発酵酵母を -20°C 前後の凍結処理で死滅させることが安定的に実行可能ならば、発酵の停止を狙った殺菌に活用できると考えた。

そこで著者らは、上述の現象の発現条件と発現要因の把握を目的とした検討に着手した。具体的には発泡性酒類のモデルとして市販のスパークリングワインを用いると共に、同酒類に含まれる主要成分(水、二酸化炭素、エタノール)や微量の有機酸(乳酸)に注目した各種水溶液を供試し、日本酒用アルコール発酵酵母の *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen に対する低温(-80 ~ 7°C)の影響を観察した。

また本殺菌方法の応用面を考慮し、日本薬局方の一般

試験法や民間企業が独自に行う各種抗菌試験に供試される酵母の *Candida albicans* (Robin) Berkhout に対する影響についても評価することとした。

1. スパークリングワイン中の酵母に対する凍結および冷蔵の影響

供試菌株としては、*S. cerevisiae* NBRC 0308 と *C. albicans* NBRC 1594 を用いた。両菌株はいずれも継代培養保存されていたもので、各試験に用いる場合にはポテト・デキストロース・寒天(PDA)平板培地にて温度 25°C で2日間したものを種菌とした。

1.5 ml 容エッペンドルフマイクロチューブに生理食塩水(0.9%)を1 ml 分注し、白金耳にて種菌の菌体を採取および接種することで供試菌株の懸濁液を作成した。接種量はトーマの血球計算盤と生物顕微鏡を用いた場合に、以下に示す出発試料の全菌数が原則 10^6 個/mlレベルになるように調整した。一方、15 ml 容サンプル管にスパークリングワイン(アルコール分5%, GV2.5)を

表1. 温度別スパークリングワイン中の *Saccharomyces cerevisiae* と *Candida albicans* の生存率 (5日経過後)

温度 (試料状態)	<i>S. cerevisiae</i> ^{a)}	<i>C. albicans</i> ^{b)}
-80℃ (凍結)	33%	10%
-20℃ (凍結)	< 0.006%	< 0.01%
7℃ (冷蔵)	5%	50%

出発試料の生菌数は a) : 2.3×10^6 cfu/ml, b) : 1.2×10^6 cfu/ml である。繰り返し数は2とした。

9 ml 分注し、それに供試菌株の懸濁液を全量接種したものを出発試料とした。次にそれらをマイクロチューブに1 ml ずつ分注し、-80, -20, 7℃の環境下 (それぞれ日本フリーザ製小型超低温槽, トミー精工製アルミブロック超低温槽, 日立製冷凍冷蔵庫) に5日間投入した。なおGVはガス容量を意味し、1気圧下で炭酸飲料の容量に対して何倍量の二酸化炭素が含まれているかを示す。一般的にGVの値が1.5~2.0程度で微炭酸飲料に該当すると言われている。

出発試料 (低温環境下への投入なし)、室温で融解させた-80と-20℃の凍結試料および7℃の冷蔵試料各1 mlを生理食塩水9 mlに投入して順次10~10000倍の希釈液を調製した。各希釈液0.2 mlを直径9 cmのPDA平板培地に接種し、25℃で2日間培養することで発現したコロニー数から生菌数 (cfu/ml) を算出した。各平板培地の繰り返し数は2枚とした。

表1には、各温度に5日間投入したスパークリングワイン中の *S. cerevisiae* と *C. albicans* について出発試料の各生菌数 (cfu/ml) を100として算出した生存率 (%) を示した。いずれの温度でも値の減少傾向がみられるが、-20℃で両酵母の生菌数低下が大きく、10倍希釈液のPDA平板培地1枚あたりのコロニー発現数が信頼限界値の30個未満 (保田, 2005) となった。表中には得られた生存率の数値未満となる可能性を示した。-80℃と7℃の両酵母の生存率が5~50%であるのに対して-20℃では0.01%を下回ったことになる。

図1には、-20℃におけるスパークリングワイン中の *S. cerevisiae* 生存率について5日間の経時変化を示した。凍結時間の経過と共に生存率が徐々に減少して最終的に0.8%となった。従って、-20℃の凍結状態が維持されることで何らかの殺菌作用が生菌細胞に継続的に加わり、一定時間経過後に生存率の減少が顕著になると考察される。

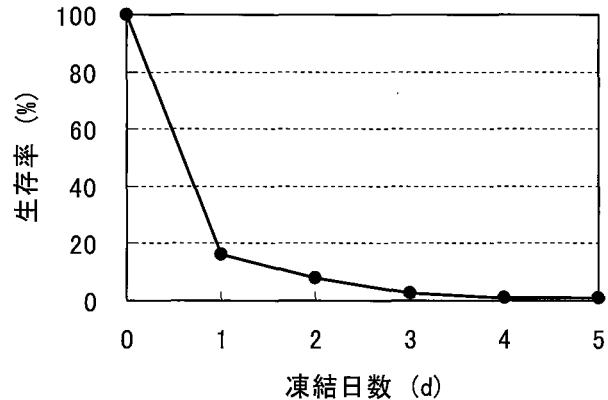


図1. -20℃の凍結処理におけるスパークリングワイン中の *Saccharomyces cerevisiae* 生存率の経時変化
出発試料の生菌数は 3.5×10^6 cfu/ml である。繰り返し数は2とした。

2. -20℃凍結での酵母に対するスパークリングワインの主要成分の影響

温度-20℃で生じるスパークリングワインの殺菌能の物質的要因を把握する試みとして、同ワインの主要成分である水、二酸化炭素、エタノールに注目し、それぞれ純水、市販の炭酸水 (GV3.6)、5% (v/v) エタノール水溶液 (99.5% (v/v) エタノールと純水で調製)、5% (v/v) エタノールを含む炭酸水を供試して同様の試験を行った。

得られた結果を表2に示したが、5日経過後の純水では両酵母の生存率が2割程度の減少、炭酸水とエタノール水溶液では純水よりも生存率低下が大きい傾向が観察されたものの、表1に示される減少レベルには至らなかった。以上から純水、炭酸水またはエタノール水溶液については、各単独で顕著な殺菌能を発揮するものではないと考察した。また、水、二酸化炭素およびエタノールの3者を組み合わせた条件となる5% (v/v) エタノール

表2. -20℃で5日間凍結した各供試溶液中の酵母生存率

供試溶液	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
純水	86% ^{a)}	79% ^{d)}
炭酸水	70% ^{a)}	20% ^{e)}
5% (v/v) エタノール水溶液	70% ^{b)}	- ^{g)}
5% (v/v) エタノール炭酸水	13% ^{c)}	27% ^{f)}

出発試料の生菌数は a) : 1.1×10^6 cfu/ml, b) : 3.0×10^6 cfu/ml, c) : 3.7×10^6 cfu/ml, d) : 2.4×10^6 cfu/ml, e) : 2.2×10^6 cfu/ml, f) : 2.3×10^6 cfu/ml である。g) は未測定を示す。繰り返し数は2とした。

ル炭酸水中においても両酵母の顕著な生存率低下はみられず、*S. cerevisiae* が1/8程度の減少、*C. albicans* が1/4程度の減少であった。

スパークリングワインが-20℃の凍結状態で両酵母に及ぼす殺菌能は、水、二酸化炭素、エタノール以外の可能性が高いと判断して以下の検討を行った。

3. 酵母に対する0.01~0.1%乳酸水溶液等の影響

清涼飲料水や清酒やワインなどの醸造酒には乳酸を中心とした有機酸が含まれ、有機酸濃度は清酒で0.2%程度、ワインで0.5~0.7%が一般的とされる(大場, 2010)。乳酸のみに注目すると、清涼飲料水で0.05~0.2% (松浦, 2008)、清酒で0.1%程度(浅野, 2007)である。そこで濃度を0.01, 0.05, 0.1% (w/v)とした乳酸水溶液、および同濃度の乳酸を含む5% (v/v) エタノール炭酸水を用いて両酵母に対する殺菌能の発現を観察した。

各濃度の乳酸水溶液を供試し、温度-80~7℃に投入した*S. cerevisiae* と-20℃に投入した*C. albicans* の5日経過後の各生存率を表3に示した。その結果、スパークリングワインを用いた表1の数値とほぼ同様の殺菌能が再現された。-20℃で両酵母の生存率低下が大きく、特に乳酸濃度が0.05% (w/v) 以上でその効果が顕著で、10倍希釈液のPDA平板培地1枚あたりのコロニー発現数が30個未満(生存率0.02%未満)となった。

次に、乳酸を含む5% (w/v) エタノール炭酸水中の酵母を-20℃で5日間凍結した場合の生存率を観察して

表3. 温度別および濃度別乳酸水溶液中の酵母生存率(5日経過後)

温度	乳酸濃度	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
-80℃	0.01% (w/v)	38% ^{a)}	- ⁱ⁾
	0.05% (w/v)	29% ^{b)}	- ⁱ⁾
	0.1% (w/v)	20% ^{c)}	- ⁱ⁾
-20℃	0.01% (w/v)	0.6% ^{d)}	5% ^{g)}
	0.05% (w/v)	< 0.02% ^{e)}	< 0.02% ^{h)}
	0.1% (w/v)	< 0.007% ^{f)}	< 0.02% ^{h)}
7℃	0.01% (w/v)	3% ^{a)}	- ⁱ⁾
	0.05% (w/v)	2% ^{b)}	- ⁱ⁾
	0.1% (w/v)	2% ^{c)}	- ⁱ⁾

出発試料の生菌数は a) : 2.9×10^6 cfu/ml, b) : 1.5×10^6 cfu/ml, c) : 3.0×10^6 cfu/ml, d) : 1.6×10^6 cfu/ml, e) : 1.0×10^6 cfu/ml, f) : 1.4×10^6 cfu/ml, g) : 1.7×10^6 cfu/ml, h) : 1.6×10^6 cfu/ml である。i) は未測定を示す。繰り返し数は2とした。

表4に結果を示した。乳酸単独の水溶液と同様に乳酸濃度が0.05% (w/v) 以上で両酵母の生存率が激減し、0.1%未満となった。しかし、表3と比較すると0.01% (w/v) において両酵母共に生存率低下が小さい傾向がみられ、同値は60~70%程度となった。

以上から、スパークリングワインが-20℃の凍結状態で*S. cerevisiae* と*C. albicans* に及ぼす殺菌能は、僅かに含まれる乳酸を中心とした有機酸が大きな役割を果たしている可能性が高いこと、一定濃度以上の乳酸水溶液は-20℃において両酵母に対して顕著な殺菌能を示すことが明らかになった。各種有機酸には微生物に対する殺菌作用が存在することが一般的に知られており、pH低下作用、有機酸自体(非解離の分子)が菌体に透過することに基づく作用、個々の有機酸の固有の作用によって殺菌能が発現すると考えられている(美野, 2005; 松田, 2009; 高島・宮澤, 2010)。しかし、この性能は常温での特性として把握されているものである。凍結状態での殺菌能に関しては、酢酸を中心とした有機酸水溶液の*S. cerevisiae* に対する報告(早川・佐藤, 1982)が見受けられる程度で、殺菌メカニズムについても明確な理論が確立されているとは言えない。

表3に示すように乳酸濃度によって殺菌能が変化していること、7℃でも1/50程度の*S. cerevisiae* の生菌数低下が生じていることから、-20℃では凍結時に水溶液中の乳酸濃度が上昇し、-80℃レベルの休眠状態に至っていない酵母の細胞に影響を与えた可能性が推察される。本検討で用いた各溶液のpHを表5に示したが、-20℃で顕著な殺菌能を発揮するスパークリングワインの値は4.0、同様の性能を示す0.05% (w/v) 以上の乳酸水溶液等の値は3.4以下である。同ワインには種々の成分が含まれており乳酸の特性と単純比較できないが、乳酸の効果はpHに関係していると考えられることから、その詳細については今後の検討課題としたい。

-20℃程度の凍結処理とスパークリングワイン、同凍

表4. -20℃で5日間凍結した5%エタノール炭酸水中の乳酸濃度と酵母生存率の関係

乳酸濃度	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
0.01% (w/v)	60% ^{a)}	69% ^{d)}
0.05% (w/v)	< 0.1% ^{b)}	< 0.03% ^{e)}
0.1% (w/v)	< 0.06% ^{c)}	< 0.003% ^{f)}

出発試料の生菌数は a) : 2.0×10^6 cfu/ml, b) : 5.8×10^5 cfu/ml, c) : 6.9×10^5 cfu/ml, d) : 1.0×10^6 cfu/ml, e) : 1.2×10^6 cfu/ml, f) : 7.9×10^5 cfu/ml である。繰り返し数は2とした。

表 5. 各供試溶液の pH (20℃)

供 試 溶 液	pH
スパークリングワイン	4.0
純 水	5.2
炭 酸 水	4.4
5%エタノール水溶液	5.0
5%エタノール炭酸水	4.5
乳酸水溶液	0.01% = 3.3 ^{a)} / 0.05% = 2.9 / 0.1% = 2.8
乳酸+5%エタノール 炭酸水	0.01% = 4.4 ^{a)} / 0.05% = 3.4 / 0.1% = 3.0

a) は各乳酸濃度% (w/v) に対する pH の値を示す。

結処理と 0.05~0.1% (w/v) 程度の希薄な乳酸水溶液の組み合わせには、発泡性酒類の二次発酵酵母の殺菌や寒冷地における微生物制御技術としての利用可能性がある。一方、後者においては北海道の冬季間であっても -20℃前後の気温が連続して5日程度以上続くことは現実的に考え難い。今後においては殺菌能を発揮する凍結温度帯の精査、さらには酵母以外の微生物(細菌類, カビ類)に対する効果に興味を持たれる。

摘 要

温度 -80~7℃の環境下で、*S. cerevisiae* または *C. albicans* に対するスパークリングワインの殺菌能を観察した。その結果、-20℃・5日間の凍結処理において両酵

母の生菌数は激減し、10⁶ cfu/ml レベルの初発細胞濃度が3桁以上低下した。同ワインに替えて純水、炭酸水、エタノール水溶液等を用いた場合の生菌数低下は僅かであったが、0.05~0.1% (w/v) の乳酸水溶液では同様の殺菌能が発現した。乳酸はアルコール飲料に同濃度程度含まれる主要な有機酸である。

引用文献

- 浅野忠男 (2007) 清酒酵母の有機酸生成に関する研究. 生物工学会誌 85: 63-68
- 早川潔・佐藤光弘 (1982) 有機酸水溶液中における *Saccharomyces cerevisiae* の凍結障害. 醸酵工学会誌 60: 191-196
- 松田敏生 (2009) 2. 化学的な微生物制御に関する各種の条件・3. 有機酸の抗菌作用. 食品危害微生物のターゲット制御. 幸書房, 東京, pp 17-41
- 松浦寿喜 (2008) 第2章 2-6 酸味料. 最新食品添加物の基本と仕組み. 秀和システム, 東京, pp 64-66
- 美野勉 (2005) 第16章 3 化学的合成品の食品添加物. 抗菌・抗カビ技術(内堀毅監修). シーエムシー出版, 東京, pp 204-205
- 大場孝宏 (2010) 酸味を生かした清酒. 生物工学会誌 88: 534
- 高島明・宮澤三雄 (2010) 食品の化学的保存技術 14. 各論 4), その3 有機酸, 防菌防黴 38: 351-359
- 保田仁資 (2005) 6・2 生菌数の測定. 食品衛生学実験. 東京化学同人, 東京, pp 125-128