

## メンブランフィルターを使用した亜硫酸による ワイン酵母の死滅経過の測定法

野村隆弘・兎東保之・田中健太郎・志村健一\*

### Method for the Determination of Sterilizing Process of Wine Yeasts by Sulfite with the use of Membrane Filter

TAKAHIRO NOMURA, YASUYUKI UZUKA, KENTARO TANAKA, and KEN-ICHI SHIMURA\*

*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,  
Yamanashi University, Takeda-4, Kofu, Yamanashi 400, Japan*

Considering the sterilizing effect of sulfite on wine yeasts as a chemical reaction, we did research to develop a method by which we could analyse the rate of the reaction.

In the developed method :

- 1) Wine yeast cells were inoculated into pH 3.1 buffer medium and the cells, when cell growth reached  $E_{660nm}^{1cm} = 0.1$ , were used for the sterilizing reaction.
- 2) The incubation mixture was diluted with a synthetic medium to a million times its volume in two steps of a thousand times dilution to eliminate the sterilizing effect.
- 3) To determine the progression of the reaction, the cells were caught by filtration through a membrane filter (MF) of 47 mm diameter and 0.45  $\mu$ m pore size, and then the MF was incubated at 30°C for two days on YM agar medium. The colonies grown on the MF were counted.
- 4) It was found that in the range of approximately 30 colonies on one MF the data obtained with the use of five MF per one sample was statistically significant.
- 5) The surviving cells after the addition of sulfite in differing concentration were counted. We found that the results obtained from all the sulfite concentrations did not follow the law of logarithmic order of death.

亜硫酸とその塩は安価でかつ酸性条件下で殺菌作用を発揮する性質があるので、古くからワインあるいはリンゴ酒等の果実酒醸造における原料果汁殺菌剤として使われてきた<sup>1,2)</sup>。これらの醸造では、天然果汁を汚染しやすい乳酸菌やカビなどは亜硫酸によって速やかに殺菌されるが、アルコール発酵の主役を果す *Saccharomyces* 属酵母は やや高濃度の亜硫酸がないと殺菌速度が低い事実を経験的に知って利用してきたのである<sup>1)</sup>。一方、出来上った果実酒が再発酵に見舞

われた場合には、*Saccharomyces bayanus*<sup>3)</sup>、*Zygosaccharomyces bailii*<sup>4)</sup> などのより高濃度の亜硫酸存在下でも生き残れる酵母に汚染されていることが多い。このように果実酒の醸造では亜硫酸の使用とそれが発酵に関与する微生物に対する殺菌速度の高低が、出来上った酒質を決定してしまうこともあり、果実酒産業に与える影響は無視できない。

\* 工学部計算機科学科, Department of Computer Science

ところが、殺菌の速度論に関する論文を調査してみると、亜硫酸を主たる研究対象にしたものは殆んど見当たらない。この理由の主要なものは、実験中に亜硫酸がカルボニル化合物と付加化合物を作ったり<sup>5,6)</sup>、酸化されて濃度が著しく低下しやすく<sup>7)</sup>、再現性のある実験結果が得にくいことにあると推測される。したがって亜硫酸による殺菌の速度論を研究するには、実験系に加えた亜硫酸の濃度が殆んど変動しない短い時間内に殺菌経過に関する正確なデータが得られる新しい実験手法を作り出す必要がある。

われわれは実験材料としてワイン酵母を使い、それが亜硫酸と接触して殺菌されてゆく過程を分単位の間隔で計測する方法を確立することを目指して、メンブランフィルター(MF)による濾過技術を導入した。本報では実験方法の基本原則を日常的な技法にとりまともてゆくのに必要な基礎的実験内容を主として報告する。

## 原 理

いま、亜硫酸がワイン酵母を殺菌する作用が化学反応によるものと考えて、殺菌反応と称することにする。この殺菌反応の進行経過が正確に測定出来るならば、ワイン酵母に対する亜硫酸の致死毒性発現の速度論的解明が可能になる。一般に対数増殖期の菌体は薬剤に対する感受性が強いから<sup>8,9)</sup>、この期にある菌体を実験に使用すれば、再現性の高い結果を得ると期待される。

ワイン酵母に対する亜硫酸の殺菌反応を正確な時間で停止させる手段として素早い希釈を採用する。対数増殖期にあるワイン酵母懸濁液に殺菌可能な濃度の亜硫酸を作用させ、所定の反応時間が経過した時点で、この懸濁液を速やかに、かつ充分(1,000倍以上)に希釈すれば亜硫酸濃度は有効殺菌濃度より低くなるから殺菌作用が失われる。また、この希釈で反応液中の酵母密度が低くなり、個々の細胞を十分に分散できるから、後述するMF上のコロニー形成数が殺菌反応後になお生き残っていた酵母数に等しいとみなせる利点がある。

殺菌反応が所定時間内にどれだけ進行したかを定量するには、生き残った菌数をコロニー形成数から求めればよい。殺菌反応を停止させた希釈菌懸濁液中に生存する酵母数を測定するには、ミルクなどの液体中の生菌数の検出<sup>10,11,12)</sup>に広く使われるメンブランフィル

ターを使用する。表面積ができるだけ大きくて、孔径が酵母の直径より十分に小さいMFで希釈菌懸濁液を濾過すれば、酵母菌は生菌、死菌の別なくMF上に捕捉される。希釈懸濁液10mlをこのMFで濾過すれば10秒前後しか要しない。したがって無菌室内で殺菌反応の速度論的解析に必要なデータを得るための操作が2, 3分おきに行える。濾過に使用したMFを菌体捕捉面を上にして固体培地の上に置いて保温すると、やがてMF上の生菌からはコロニーが形成される。これを計数して殺菌反応時間に対して整理すれば、殺菌の速度論的解析が可能になる。

## 方 法

本報の結果および考察の項で検討を重ねた技術的問題点を整理して、標準化した実験方法を以下に記した。

既報<sup>13)</sup>にしたがって  $E_{660nm}^{1cm} = 1.0$ まで対数増殖させた前培養菌 *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4274 (OC-2) をグルコース(5%)—無機塩類—ビタミン類(ピオチン, Ca-パントテン酸, イノシトール, チアミン塩酸)を主成分とする pH 3.1 の緩衝液培地(400 ml/500 ml 容三角フラスコ)に  $E_{660nm}^{1cm}$  で 0.01 になるように接種し、30°C で  $E_{660nm}^{1cm} = 0.1$  になるまで静置培養した。対数増殖で  $E_{660nm}^{1cm} = 0.1$  に達した菌の密度は  $6 \times 10^6$  cells/ml 程度であった。

殺菌反応に用いる酸性亜硫酸ナトリウム溶液は殺菌反応時の濃度の100倍になるように使用直前に調製した。対数増殖して菌体密度が  $E_{660nm}^{1cm} = 0.1$  に達した培地 400ml に対して、この100倍亜硫酸溶液 4.0ml を添加攪拌して殺菌反応の開始時点とした。殺菌反応は30°Cの水浴中で行った。所定の殺菌反応時間(通常2あるいは3分おき)に達する毎に、この菌懸濁液 0.1 ml を容量可変自動ピペット(ピペットマン:ギルソン社製,モデル p-100)でサンプリングして滅菌した100mlの培地で速やかに希釈した。その希釈液を0.1ml とって新しい滅菌培地 100ml に加えて攪拌して100倍希釈液とした。ここに使用した培地は Wickerham<sup>14)</sup> の組成に基づいて作製したグルコース—無機塩類—ビタミン類(ピオチン, Ca-パントテン酸, イノシトール, チアミン塩酸)培地である。

その希釈菌懸濁液 10 ml をグリッド入りMF(ゲルマンサイエンス社製,孔径0.45 $\mu$ m,直径47mm,GN-6滅菌シングルパック:No.66068)で濾過して酵母

と捕捉した。なお、濾過装置としてはステンレス製47 μm フィルターファンネル (ゲルマンサイエンス社製: No. 4221) を用いた。ガス滅菌シャーレ (栄研器材社製, 滅菌Sシャーレ) 中で固化させてあるYM寒天培地<sup>15)</sup> の表面にこのMFをのせ、30°Cで2日間培養後、出現したコロニー数を計測した。殺菌反応の開始から濾過の終わったMFをシャーレ中のYM寒天培地へ移すまでの全ての操作は無菌室内で行った。

**結果および考察**

実験操作を合理的に標準化すること、実験結果が統計学的に信頼性のあるものにするために繰り返すべき実験回数を決定することを主たる目的として検討項目を定めた。

**MF上に出現するコロニー数に及ぼす希釈液の種類とシャーレ中の栄養供給源の影響** 亜硫酸による殺菌反応が進行している菌懸濁液を希釈するのに、蒸留水と前述の合成培地を用いて比較した。同時にシャーレに移したMFへ供給する栄養源の支持体としては不織布状の肉厚吸収パッド (ゲルマンサイエンス社製, No. 6625) を用いた場合と寒天を用いた場合に分けて検討した。肉厚パッドへ吸収させる液体培地は前述の合成培地あるいはYM培地とした。寒天を支持体にするときはYM培地だけを使用した。これらの条件を組合せて得た結果を Table 1 に示した。Table 1 では100万倍希釈液 100 ml から 10 ml ずつをとって1枚毎のMFで濾過する方法で、合計9枚のMFで濾過し、その9枚のMFから出現したコロニー数の平均値( $\bar{X}$ )と標準偏差(S. D.)を示した。パッドに合成培地を吸収させてMFへの栄養供給源とした場合には、コロニーは全く出現しなかった。パッドに液体YM培地を吸収

させるとコロニーは出現したが、YM寒天培地におけるコロニー出現数に比べ少なかった。YM寒天培地におけるコロニー数を希釈液の相違で比較すると合成培地を用いた方が標準偏差は小さかった。以上の結果から、希釈液は合成培地とし、コロニーの栄養源としてはYM寒天培地を用いるのが適当であることがわかった。

**希釈法の比較** 1枚のMF上に出現させるコロニー数はMFの大きさと、その上に形成されるコロニー同志の分離度や統計的誤差を配慮して、30~50が望ましい。この程度のコロニー数をMF上に出現させるには1回のMF濾過に10 mlの希釈液を使うとして、反応液を約100万倍に希釈する必要がある。100万倍に希釈する手順として、最初に殺菌反応液0.1 mlをとって希釈用培地 100 mlに入れて1,000倍とする操作を2回繰り返す二段階希釈法と、最初に殺菌反応液1.0 mlをとって希釈用培地 100 mlに入れて100倍とする操作を3回繰り返す三段階希釈法について検討した。それぞれの希釈法を3回づつ繰り返して、各最終希釈液毎に計測に使用した9つのシャーレから出現したコロニー数を箱ひげ図<sup>16)</sup>で Fig. 1 に示した。それぞれの箱ひげ図から両希釈法の間に差は見られず、F検定<sup>17)</sup>の結果からも有意の差がないことが確認された。この結果から、操作時間が短かくてすみ二段階希釈法が適切であると判断された。

**ひとつの測定値を得るのに使う最少のMF数** 菌体の100万倍希釈液 100 ml から、コロニー計測に用いるMFの数はこれまで9枚であった。しかし、MF上に出現するコロニー数が統計学的に信頼性が得られる範囲で、出来る限り少ない方が実験の経費や手間を削減

Table 1. Factors affecting colony formation.

Dilution medium	Nutrient supplier	Colony number	
		$\bar{X}$ *	S. D. **
Dist. water	Pad (Defined medium)	0	0
	Pad (Liquid YM medium)	26.1	6.06
	Agar (Solid YM medium)	36.4	8.74
Defined medium	Pad (Defined medium)	0	0
	Pad (Liquid YM medium)	28.9	5.06
	Agar (Solid YM medium)	37.6	3.03

\*  $\bar{X}$  : mean value, \*\* S. D. : standard deviation.

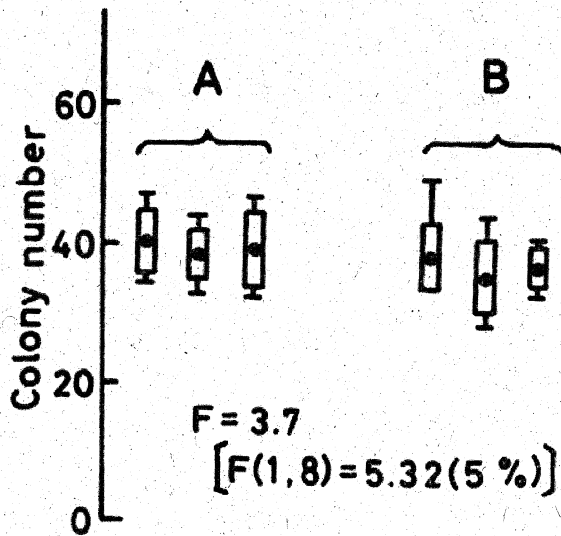


Fig. 1. Effect of dilution method on the scattering of colony number (by box and whisker chart).  
A: two dilution steps, B: three dilution steps.

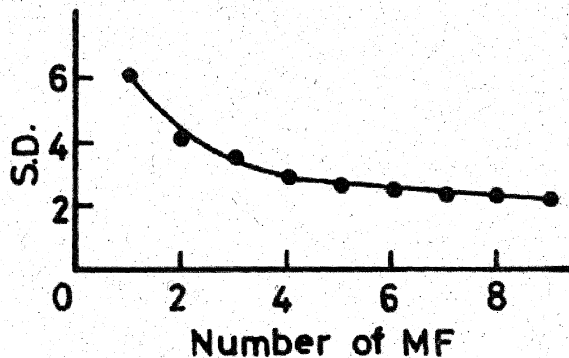


Fig. 2. Relation between the number of MF used and standard deviation (S.D.) of colony number.

する意味で望ましい。そこで、使用するMF数を1枚から9枚へと順次増しながら、1枚のMF上に出現するコロニー数の標準偏差(S.D.)を調べてFig. 2に示した。MF枚数が増すにつれて標準偏差は小さくなり4枚以上になるとS.D. 値の減少割合はわずかとなった。以上のことから、操作時間の短縮と経済性を配慮して、ひとつの実験値を得るにはMFを5枚使うことがのぞましいと判断した。

**MF上に出現したコロニー数と血球計数板で求めた菌数との比較** 殺菌反応に使用する  $E_{660Dm}^{1cm} = 0.1$  の菌懸濁液の全菌数を血球計数板で測定したところ、 $6.31$

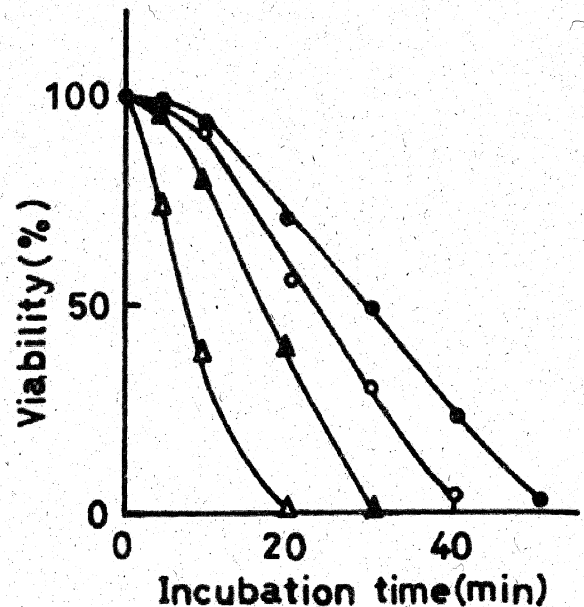


Fig. 3. Effect of sulfite concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4274.  
Concentrations of sodium bisulfite were 0.16 mM (●), 0.20 mM (○), 0.25 mM (▲), 2.0 mM (△).

$\times 10^6$  cells/ml, その時の生菌率<sup>18)</sup>は98.79%で、ほぼ全てが生菌と考えてよい。これに対して同じ菌懸濁液を用いてMF上にコロニーを出現させたところ、その個数は $3.76 \times 10^6$ /mlで、そこへ生菌率の逆数を乗じて得た全菌数は $3.80 \times 10^6$  cells/mlとなった。これら2つの方法で求めた値の間に大きな差があった。ところで、供試菌懸濁液を顕微鏡下で観察した菌体の平均集合個数は $1.67^{19)}$ で、この集合の1つから1個のコロニーが形成されると考えて全菌数を補正すると、 $6.37 \times 10^6$  cells/mlとなった。この値は血球計数板で求めた値に非常に近かった。従って、MF上に出現するコロニー数は高い信頼度を持って、全菌数を反映していることが確認された。

**殺菌反応の進行におよぼす亜硫酸濃度の影響** 所定の生育度に達した酵母培養液に酸性亜硫酸ナトリウム溶液を終濃度で0.16mMから2.0mMになるように四段階に変化させて、素早く添加して攪拌した。その後殺菌反応液を経時的にサンプリングして、これまでの実験をもとに決定したMF法で残存した生菌数を測定してFig. 3に示した。いずれの亜硫酸濃度においても殺菌反応時間60分以内に生菌数は亜硫酸添加直後の

生菌数の100分の1以下になる傾向を示した。しかし添加亜硫酸濃度の高低には無関係に、殺菌反応の時間が短い範囲では生菌数はゆるやかに減少し、その後急激に減少した。すなわち、この殺菌反応では死滅の対数法則<sup>20)</sup>に従わなかった。この減少型式は細胞がある程度の数だけ集合して存在している状態で殺菌反応が進行する場合にみられる現象である<sup>20)</sup>。先にも述べたように実験に用いた菌懸濁液は平均1.67個程度の菌体集合体であるから、ここで得られた結果は正当のものと考えられた。

### 要 約

亜硫酸がワイン酵母に対して示す殺菌作用を化学反応とみなして、その反応速度を解析する方法を開発する目的で本研究を行った。

開発した方法では：

- 1) pH3.1の緩衝液培地にワイン酵母を接種し、生育度が $E_{660nm}^{1cm} = 0.1$ になった時点の菌体を亜硫酸による殺菌反応に供した。
- 2) 短時間の反応を停止させるには反応液を合成培地で1,000倍つづつ二段階にわけて100万倍に希釈した。
- 3) 反応の進行度を測定するには、100万倍希釈液10mlを直径47mm、孔径0.45 $\mu$ mのメンブランフィルター(MF)で濾過して菌を捕捉してから、これをYM寒天培地上において、30°C、2日間保温して、MF上に形成されるコロニーの計数を行った。
- 4) MF上に出現するコロニー数が30個前後の範囲では、ひとつの試料につき5枚のMFを使用すれば統計学的に有意な結果が得られることがわかった。
- 5) 亜硫酸添加後の残存生菌数を亜硫酸濃度を変えて測定したところ、いずれの亜硫酸濃度においても死滅の対数法則に従わないことがわかった。

最後に、本研究を行うに当り、統計処理上の御助言を頂きました本学計算機科学科の吉澤 正教授に深謝します。

### 文 献

- 1) 小原：醸協，58，1061 (1963)。
- 2) Amerine, M. A., Berg, H. W., Cruess, W. V. : *Technology of Wine Making*, p. 530, The AVI Publ. Co. Inc., Westport and Co-

nneticut (1972).

- 3) 大塚, 飯村, 戸塚, 木崎, 袖山：醸工，56，265 (1978)。
- 4) Lodder, J. : *The Yeasts*, 2 ed., p. 580, North-Holland Pub., Co-Amsterdam-London (1970)。
- 5) 乙黒, 渡辺, 加々美：醸協，73，221 (1978)。
- 6) Uzuka, Y., Nomura, T., Tanaka, K., Komatsu, T., Shimada, M. : *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.*, 19, 13 (1984)。
- 7) 野村, 兎東, 田中：醸協，80，362 (1985)。
- 8) 柳田：微生物科学2，p. 443, 学会出版センター (1981)。
- 9) 天沼, 安楽：別冊 蛋白質核酸酵素 生体膜実験法 下, p. 108, 共立出版 (1974)。
- 10) Pettipher, G. L. : *The Direct Epifluorescent Filter Technique for the rapid enumeration of micro-organism*, p. 51, Reserch studies Press Ltd., Letchworth (1983)。
- 11) Michael, J., Pelcgar, J. R., Roger, D. R. : *Microbiology*, p. 70, Magraw-Hill Book Co., New York (1958)。
- 12) 大矢：醸協，79，148 (1984)。
- 13) Uzuka, Y., Tanaka, R., Nomura, T., Tanaka, K. : *J. Ferment. Technol.*, 63, 107 (1985)。
- 14) Wickerhan, L. J. : *Taxonomy of Yeasts, U. S. Dept. Agric. Tech. Bull.*, No. 1029, p. 1-17 (1951)。
- 15) Lodder, J. : *The Yeasts*, 2 ed, p. 39, North-Holland Pub., Co-Amsterdam-London (1970)。
- 16) 脇本：統計学一見方・考え方, p. 19, 日本評論社 (1984)。
- 17) 石川, 藤森, 久米：化学者および化学技術者のための統計的方法, p. 133, 東京化学同人 (1967)。
- 18) Hutter, K. J., Eipel, H. E. : *J. Gen. Microbiol.*, 107, 165 (1978)。
- 19) 兎東, 野村, 田中：醸工, 投稿中。
- 20) 柳田：微生物科学2，p. 406, 学会出版センター (1981)。

(1986. 10. 1 受理)