

## 超音波分散機を使用した殺菌処理についての研究

材料技術室 山本貴之, 篠田清  
食品・化学技術室 海老原昇, 大久保紘子  
技術支援室 蓮見薫  
次長 宮崎浩子

### Research on Sterilization Using an Ultrasonic Disperser

Takayuki YAMAMOTO, Kiyoshi SHINODA, Noboru EBIHARA,  
Hiroko OKUBO, Kaoru HASUMI, and Hiroko MIYAZAKI

本研究では、超音波分散機(超音波ホモジナイザー)を使用してパン酵母、醤油酵母に超音波を照射し酵母の殺菌にホモジナイザーが適応できるか検討するため、ホモジナイズ時の試料液を入れた容器底面とホモジナイザーの先端治具との距離(Gap), 照射出力, 及び照射時間の条件検討を行った。その結果、パン酵母ではGap 3 mm, 照射出力70 %, 照射時間120秒が、醤油酵母ではGap 3 mm, 照射出力65 %, 照射時間5分とすることでそれぞれ酵母の死滅率が90 %となった。ホモジナイズ前後で酵素の種類により変化の差があるが、酵母中の酵素が失活し、酵母の形状損傷が観察された。

#### 1. はじめに

超音波分散機(超音波ホモジナイザー)は試料のホモジナイズの他に、液の脱泡や、液中の微生物細胞破壊等様々な分野で利用されている。千葉県産業支援技術研究所では、三井電気精機株式会社との共同研究により、傾斜機能材料を用いた超音波ホモジナイザーの先端治具を開発した。この治具は、先端部が非常に硬く強固なため従来品よりも摩耗しづらく、また治具の大口径化により一度に処理できる量を増やすこともできた。先端治具が摩耗しづらいということは、試料に治具の成分が混入しにくい、つまり試料に対する汚染(コンタミネーション)が少ないということであり、ホモジナイザーを食品等への殺菌工程に適応できるのではないかと考えた。

本研究では食品の発酵や製品の品質変化に関与するパン酵母、醤油酵母を試料として超音波ホモジナイザーUX-600による最適な殺菌条件を検討した。また、ホモジナイズにより試料にどのような変化が起こったのか調べるために、走査型電子顕微鏡(SEM)による酵母の形態観察、酵素活性測定キットによる酵母中の酵素活性検出、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によるタンパク質の分子量測定を行った。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 パン酵母、醤油酵母試料液の調製

試料として用いるパン酵母、醤油酵母の培養液を調製した。

パン酵母は、市販されているドライイースト1.2 g, D(+)-グルコース0.6 gを水道水200 mLに溶かして復水し、30 °C, 120 rpmで30分間振とう培養した。

醤油酵母は、スラントから一白金耳を分取し、試験管に植菌して前培養した。前培養液の一部を本培養の培地に植菌し、二日間本培養した。

なお前培養及び本培養の培地は、食塩50 g, D(+)-グルコース5 g, リン酸水素二カリウム0.5 gと市販の本醸造こいくちしょうゆ(特級)30 mLを混合し、純水で500 mLに定容し調製した。

##### 2.2 メチレンブルー染色試験における酵母死滅率の測定、及び条件の検討

ホモジナイズ前後における各試料液中の酵母死滅率を、メチレンブルー(MB)染色試験により計測した。

0.1 mol/Lグリシン50 mLに0.1 mol/L水酸化ナトリウムを加えpH10に調整後、純水で100 mLに希釈しグリシン緩衝液を調製した。また、MB 0.25 gをエタノール15 mLに溶かしてから純水で50 mL

に定容し、0.5 %MB溶液を調製した。グリシン緩衝液と0.5 %MB溶液を任意の割合で混合し、アルカリMB染色液とした<sup>1)</sup>。

MB染色試験時のMB染色液の濃度、及び染色時間を変えて生物顕微鏡 (BX53SA/DP73, オリンパス株式会社) を用いて観察し、酵母の死滅率を測定するのに最適な条件をパン酵母試料液で検討した。

### 2. 3 超音波ホモジナイザーによる酵母殺菌時のホモジナイズ条件検討

パン酵母試料液を入れた容器底面とホモジナイザーの先端治具との距離(Gap)、ホモジナイザーの照射出力、累積照射時間の3条件を変えてホモジナイズした。ホモジナイズ後の酵母死滅率をMB染色試験で計測し、ホモジナイズ条件と死滅率の関係を調べた。照射時間について、連続で超音波を照射すると試料の液温が上昇してしまうため、熱電対で液温をモニタリングしながらホモジナイズし、40 °Cを超えないところで一度照射を止め冷却してから再度照射を行った。

同様の操作を醤油酵母でも行い、各酵母における適切な殺菌条件を検討した。

### 2. 4 醤油酵母中の酵素の活性変化

酵素活性測定キットapiZYM(シスメックス・バイオメリュー株式会社)にかけ、ホモジナイズ前後における酵素活性の変化を調べた。

醤油酵母試料液をホモジナイズしたもの、未処理及び熱湯で火入れ処理をした各液を3000 rpmで5分間遠心分離機にかけ集菌し、滅菌生理食塩水で菌を洗浄した。洗浄前と同体積の滅菌生理食塩水で酵母を懸濁させ、その2 mLをサスペンションメディアウム2 mL(シスメックス・バイオメリュー株式会社)に混合し、マクファーランド濁度5~6になるように希釈して測定液とした。

### 2. 5 ホモジナイズ前後における醤油酵母の形態観察

2. 4で集菌した醤油酵母の一部を2 %グルタルアルデヒドを含む0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.2)で固定後、t-ブチルアルコールに置換して冷凍、凍結乾燥し、金コーティングを行い走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM5310LV, 日本電子)で形態観察した。

### 2. 6 電気泳動による醤油酵母中タンパク質の分子量測定

醤油酵母中の酵素等のタンパク質の分子量を、SDS-PAGEにより測定した。

分離ゲルとして、純水7.32 mLに30 %アクリルアミド溶液6 mL, 1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)4.5 mL, 10 %SDS 180 µL, 10 %過硫酸アンモニウム70 µL, TEMED(N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)20 µLを混合し、重合させた。

集菌した醤油酵母に酵母破砕用の緩衝液(0.33 mol/Lスクロース, 0.3 mol/L Tris(pH 8.0), 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT)とガラスビーズを加え4分処理し酵母を破砕した。14,000×g, 30分で遠心分離機を行い、上澄みを上澄みサンプル、沈殿を超純水に懸濁したものを沈殿サンプルとしてSDSサンプル調製した。上記ゲルで電気泳動を行い、タンパク質の分子量を分子量マーカーと比較することで測定した。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 メチレンブルー染色試験の条件

MB染色試験は、生細胞がMBで青く染色された後でも白色に戻り、死細胞が青く着色したままであることを利用し死滅率を計測する方法である。MB染色液中のMB濃度が高すぎる、かつ染色してから観察までの時間が短いと生細胞も青く見えるため正確な生菌率が測定できない。

そのため、MB染色液の濃度と観察までの染色時間を変えて条件を検討した結果、MB染色液は0.05 %(グリシン緩衝液:0.5 %MB溶液を体積比で9:1)、染色時間は10分が適切であった。

### 3. 2 パン酵母と醤油酵母のホモジナイズ条件

復水したパン酵母の試料液30 mLをガラス容器(Φ60×45hシャーレ)に分取し、照射出力を70 %で固定し、Gapを1, 3, 7 mmと変化させたときの累積照射時間と酵母の死滅率の関係を図1に示す。

Gapが大きいほど一度に処理できる量が増えるが、大きすぎると殺菌の効果が弱まる。図1より、Gap1 mmと3 mmでは大きな違いはないが、7 mmにすると死滅率が下がったため、Gapは3 mmが処理量も多く適切であった。また照射時間は120秒が適していた。

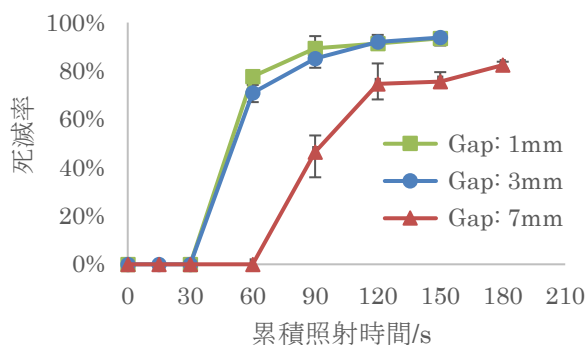


図 1 パン酵母試料液を、照射出力70 %でホモジナイズした時の照射時間と死滅率の関係

醤油酵母ではGapを3 mmで固定し、照射出力と照射時間を変えたときの死滅率変化を調べた。照射出力を50 %で固定し、照射時間を変えたときの死滅率変化を図2に示す。照射時間を長くするほど死滅率は高まるが、5分で死滅率が76 %と飽和し、10分照射しても死滅率80 %と大きな向上はなかった。そのため照射時間は5分が適当と分かった。

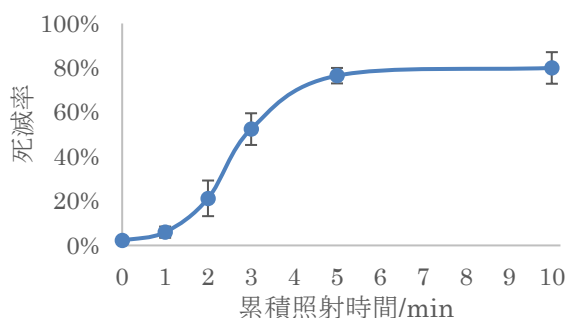


図 2 醤油酵母試料液を照射出力 50 %でホモジナイズした時の照射時間を死滅率の関係

次に、照射時間を5分で固定し、照射出力を変えたときの死滅率変化を図3に示す。

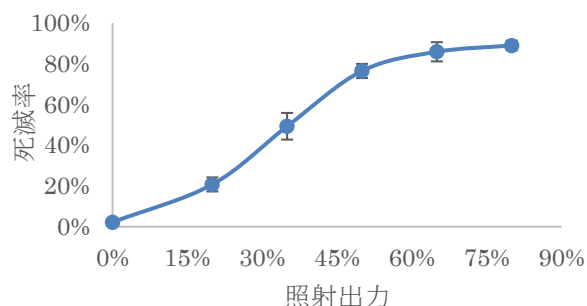


図 3 醤油酵母試料液を照射時間5分でホモジナイズした時の照射出力と死滅率の関係

照射時間と同様、出力を上げると死滅率が高まるのが分かった。しかし出力が高いと治具にかかる負荷が大きくなるため、負荷は極力抑えたほうが望ましい。今回の実験では、出力65 %のときの死滅率が86 %、出力80 %では死滅率89 %と同程度の効果が得られたため、出力は65 %が適していた。

### 3. 3 醤油酵母中の酵素の活性変化

apiZYMで活性を調べることができる19種類の酵素のうち、未処理の醤油酵母で活性を示した7種類の酵素の、ホモジナイズによる活性変化を表1に示す。

酵素の種類により変化に差はあるが、いずれの酵素でも、高出力、長時間ホモジナイズすることで活性が弱まり、照射出力80 %、照射時間5分で処理することで、ほぼ失活することが分かった。ナフト

表 1 ホモジナイズによる各酵素の活性変化

| 酵素                          | 未処理 | 20 %, 5分 | 50 %, 5分 | 80 %, 5分 | 80 %, 10分 | 火入れ |
|-----------------------------|-----|----------|----------|----------|-----------|-----|
| エステラーゼ (C4)                 | 3   | 2        | 1        | 0        | 0         | 0   |
| エステラーゼリパーゼ (C8)             | 2   | 2        | 1        | 0        | 0         | 0   |
| ロイシンアシルアミダーゼ                | 5   | 5        | 3        | 0        | 0         | 0   |
| 酸性フォスファターゼ                  | 2   | 2        | 1        | 0        | 0         | 0   |
| ナフトール-AS-BI-<br>フォスフォヒドロラーゼ | 2   | 2        | 2        | 2        | 2         | 2   |
| α-グルコシダーゼ                   | 5   | 5        | 5        | 3        | 2         | 0   |
| α-マンノシダーゼ                   | 1   | 1        | 1        | 0        | 0         | 0   |

apZYMで呈色したものが活性のある酵素で、色の濃さを目視により0(呈色無し)から5(強く呈色)までの6段階で評価した。なお試料名は照射出力(%)と照射時間(分)を表す。

ール-AS-BI-フォスホヒドロラーゼだけは、火入れを含めどの操作でも活性は変化しなかったが、ビール酵母を用いた他の研究<sup>2)</sup>においても同様の結果となっているため、非常に活性変化しにくい酵素であると考えられる。

### 3. 4 醤油酵母の形態観察

未処理、照射出力 50 %で照射時間 5分、照射出力 80 %で照射時間 5分、及び火入れ処理を施した酵母の SEM 像を図 4 に示す。未処理のときは球形であった酵母が、出力を高めホモジナイズすると損傷し、表面が荒れ酵母内部のものが噴出している様子が見られた。一方で火入れ処理した酵母には、外的損傷はほぼ見られず、未処理のときと大きく変化していなかった。このことから衝撃により死滅した酵母と熱により死滅した酵母の形態には明らかな差があることも確認できた。

### 3. 5 醤油酵母中タンパク質の分子量

各ホモジナイズ条件で処理した醤油酵母の沈殿サンプルの SDS-PAGE の結果を図 5 に示す。上澄み

サンプルではほとんどバンドが見られなかったが、沈殿サンプルではバンドを確認できた。しかし、各ホモジナイズ条件と未処理の酵母のバンドには顕著な違いは見られなかった。一方で、火入れした酵母では分子量の大きなタンパク質のバンドがほぼ確認できないほど薄くなっていた。

今回の実験ではタンパク質の分子量測定だけで酵素の同定までは行っておらず、SDS-PAGE の結果からはホモジナイズによる酵母中のタンパク質の変化も確認できなかった。

### 4. まとめ

超音波ホモジナイザーによりパン酵母、及び醤油酵母を殺菌する条件とその効果を検証した結果、パン酵母ではGap 3 mm, 照射出力70 %, 照射時間は120秒で死滅率が90 %となり、醤油酵母ではGap 3 mm, 照射出力65 %, 照射時間 5分で死滅率が89 %となった。また高出力、長時間ホモジナイズすることで、酵素の種類により違いはあるが、酵母中の酵素活性も低下することが分かり、酵母の形状変化も観察することができた。

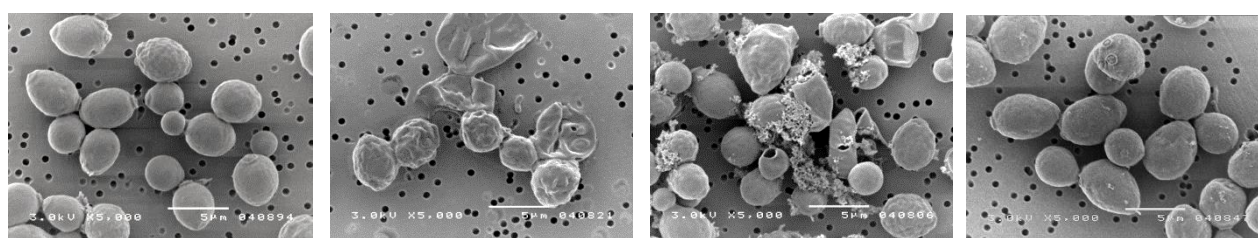


図 4 未処理、ホモジナイズ処理、及び火入れ処理をした酵母の形状変化

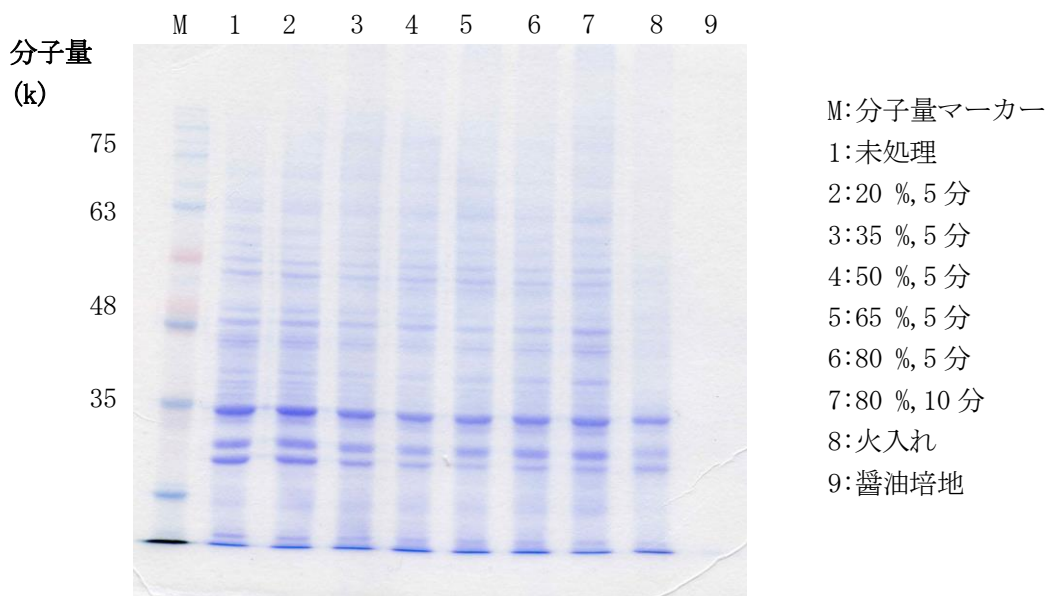


図 5 醤油酵母の SDS-PAGE 結果

適応する酵母によりホモジナイズ条件は検討する必要があるが、今回使用したパン酵母、醤油酵母以外の試料でも、超音波ホモジナイザーにより酵母を死滅させ、酵素活性を低下できる可能性が示唆された。

実験に際し、様々な場面で快く御協力いただきました三井電気精機株式会社の皆様に深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 所 悠, 河嶋 優美, 松本 啓嗣, 赤崎 哲也, 様々な乾燥酵母の生菌率と活性の程度の調査, 関税中央分析所報 第 52 号
- 2) 情報機構, マイクロバブル (ファインバブル) のメカニズム・特性制御と実際応用のポイント, 314-315, 2015