13) 日本油化学協会: “基準油脂, 分析試験法” (1956) 理化書院.
14) 中沢君敏, 新谷 勲, 井室素子: 油化学 10 , 761 (1961).
15) 中沢君敏, 新谷 勲, 古川嘉寿子: 同上 11 , 195 (1962).
16) 大獄六郎: “栄養食品実験書” p. 118 (1962) 地球出版.
17) 大獄六郎: 同 上 p. 100 (1962) 地球出版.
18) E. B. Sandell: “Colorimetric Determination of Traces of Metals II” p. 363 (1950) Interscience Publisher, New York. | 19) E. B. Sandell: <i>ibid.</i> p. 300 (1950) Interscience Publisher, New York.
20) “Official Method of Analysis of the A.O.A.C.” 9 th Ed., p. 649, 39-001 (1960), A.O.A.C., Washington.
21) 兼松 弘, 新谷 勲, 他: 第17回日本ビタミン学会発表 (1965).
22) 新谷 勲, 山本昭雄: 食衛誌. 5 , 33 (1964).
23) 中沢君敏, 新谷 勲, 井室素子: 油化学 10 , 573 (1961).
24) 中沢君敏, 新谷 勲, 古川嘉寿子: 同 上 11 , 477 (1962). |
|---|--|

発酵乳および乳酸菌飲料の品質に関する検討

第1報 発酵乳の製造方法と乳酸菌数保持の関係

(昭和40年8月5日受理)

清 田 亮 夫* 高 尾 朔*
 外 村 佳 子* 安 川 章*

Studies on the Quality of Fermented Milk

I. Effect of Citric Acid on the Living *Lactobacilli*

Sukeo KIYOTA, Hajime TAKAO, Yoshiko TONOMURA, and Akira YASUKAWA

(The Osaka City Institute of Hygiene: 38, Kitaogi-machi, Kita-ku, Osaka)

When the fermented milk is diluted, as is done in the manufacturing process, citric acid is generally used to supplement the diluted sour taste. The amount of citric acid to be added increases in proportion to the magnitude of dilution.

The effect of citric acid on the maintenance of living *Lactobacilli* in the fermented milk was studied in detail. Addition of citric acid more than 0.5 per cent caused a great reduction in number of living bacilli, indicating the dilution up to five times preferable.

(Received August 5, 1965)

I 緒 言

昭和36年6月, 乳省令の一部改正で, 発酵乳(以下原液と略称)は乳酸菌生菌数 $10^7/\text{ml}$ 以上, それを希釈して作った乳酸菌飲料(以下希釈液と略称)は $10^6/\text{ml}$ 以上を含むよう規定されている。

しかしながら過去数年來行なった大阪市内の市販品についての収去検査では, これらの規格に満たないものが多数みられ, また原液, 希釈液の双方に全く生菌の証明されないものが多数みられた¹⁾。

この原因としてはカード製造から希釈液の市販に至る間の経過日数による生菌数の減少も考えられるが, 原液の製造工程において加えられる添加物の影響も無視できないようである^{2)~4)}。

この際の添加物は希釈による甘味, 酸味の不足を補うシロップ, クエン酸がおもなものである。

われわれは希釈液中の乳酸菌数保持の見地から, そのもとである原液について *Lact. bulgaricus* による製造試験を実施し, 培養時間の異なる工場カードをもとにして, 製造モデルに準じたシロップ, クエン酸の添加量と

* 大阪市立衛生研究所: 大阪市北区北扇町38

Lact. bulgaricus の生存数との関係を 5° 保存, 8 日間 にわたって調べた。

II 実験方法

a) 発酵乳の製造工程

i) シロップの添加

発酵乳の製造はつぎのような工程による。

まず *Lact. bulgaricus* を 10% 脱脂粉乳溶液に移植し, 37°, 20 時間培養で作られた seed カードの 17 ml を 15% 脱脂粉乳溶液 5 L に加えて, 37°, 16~61 時間培養後, カードが作られる。このカードに甘味を補うため, Table 1 に示したシロップ混合量によって 5 倍用, 7 倍用および 10 倍用の希釈用原液が調製され, 希釈業者はそれぞれの標示にしたがって希釈し, 販売飲用に供している。

Table 1. Proportions of Syrup Added to the Mother Solutions

Stock solution for dilution	Mixing proportion		Concentration of the curd
	Curd	Syrup	
1 : 4	63	36	63.7
1 : 6	50	41	54.9
1 : 9	50	50	50.0

Table 2. Viable Counts of *Lactobacilli* in the Milk Incubated

Incubation time (hr)	Viable counts per ml	Kinds of stock solution (prescription for dilution)	Percentage of dilution of milk with syrup	Viable counts after dilution with syrup
16	1.6×10^9	1 : 6	55	7.5×10^8
24	1.4×10^9	1 : 6	55	4.3×10^8
		1 : 9	50	2.9×10^8
37	1.4×10^9	1 : 4	64	7.4×10^8
		1 : 6	55	3.3×10^8

すなわち, 調べた希釈用原液は, すべて生菌数 10^8 /ml 以上を示したが, その生菌数は, 16 時間培養のカードを使用したものが最高値を示し, その後は使用カードの培養時間の経過とともに生菌数の減少していることが知られた。

2) カードの培養時間と産生酸度

培養時間を異にするカードに希釈用原液の標示の希釈倍率に応じてシロップを添加したあとで酸度を測定し, それぞれの酸度を乳酸として示せば Table 3 のとおりである。

すなわち希釈用原液の産生酸度をシロップの同一希釈率ごとに比較すると, カードの培養時間の経過とともに進んでいることが知られる。

ii) クエン酸の添加

カードの生産酸度は, 培養時間によって異なるが 2.0~3.1% (乳酸として) である。

こうして希釈液として賞味される嗜好酸度は 0.3% 程度であるため, 希釈用原液としての酸度は 1.5~3.0% を保有せしめる必要がある。そのためカードとシロップを混合したのち, 酸度測定を行ない, 標示の希釈倍率によって希釈したその酸度が 0.3% 程度になるように不足酸度を 50% クエン酸溶液で補う。

b) 試験方法

大阪市内の希釈用原液製造工場のうち, 2 工場を選んで 16, 24, 37, 61 時間の各培養カードについて 5 倍用, 7 倍用, 10 倍用のそれぞれ希釈用原液を作り, その酸度測定を行ない, 計算量のクエン酸補正を行なう。つぎに 5° の冷蔵庫に保存し, 乳酸菌生菌数の経時的変化をクエン酸無添加の希釈用原液と比較した。

Lact. bulgaricus の生菌数算定は改変 BCP plate count agar⁵⁾ により, 酸度測定は乳酸表示法⁶⁾ によった。

III 実験成績

1) カードの培養時間と生菌数

カードの培養時間と乳酸菌生菌数との関係をシロップ混合直後の希釈用原液について調べた成績は Table 2 に示した。

つぎにこれらの希釈用原液が標示の希釈率に従って最終製品の希釈液にされたとき, その酸度が嗜好酸度の 0.3% になるように, 補正のために添加したクエン酸量も Table 3 に示している。

すなわちクエン酸添加量は希釈倍率の高い原液ほど多く, また同倍率においてはカードの培養時間が短いものほど多く添加しなければならないことが知られる。

3) クエン酸の添加量と乳酸菌の残存生菌数

培養時間の異なる各種のカードに, Table 1 に示した割合にシロップを加えて作った希釈用原液を 5° に保存して, 乳酸菌の生菌数を経時的に調べた。その成績は Table 4 のとおりである。

シロップの添加は乳酸菌の生存にあまり不利な影響を

Table 3. Final Acidities Produced in the Milk and Supplies of Citric Acid
Corresponding to Dilution

Incubation time and percentage of acidity produced	Kinds of stock solution	Percentage of dilution with syrup	Percentage of acidity after dilution with syrup	Percentage of citric acid supplemented
16 hr 1.99%	1 : 4	64	1.09	0.26
	1 : 6	55	1.03	0.83
	1 : 9	50	1.60	1.50
24 hr 2.71%	1 : 6	55	1.48	0.53
	1 : 9	50	1.71	1.41
37 hr 3.03%	1 : 4	64	1.47	0.08
	1 : 6	55	1.59	0.39
	1 : 9	50	1.80	1.35
61 hr 3.11%	1 : 4	64	1.50	0.08

Acidity: expressed as lactic acid

与えないようで、培養時間の若いカードを用いた希釈用原液では、保存8日後においても 10^7 /ml以上の生菌数を保持していた。

つぎにシロップ添加後に、酸味の補正のために加えられたクエン酸量と生菌数保持との関係を調べた。この成績もTable 4に示しているが、クエン酸の生菌数保持に及ぼす影響は著明で、クエン酸量が1%を越えたものでは添加後30分ですでに添加前の生菌数 10^8 /mlから 10^5 /mlに低下し、その後の減少も著明である。一方クエン酸添加量の少ない5倍希釈用原液では、培養時間の若いカードを用いたものは8日間の保存後も生菌数は 10^7 /ml以上保持されていた。

IV 考察ならびに結論

カードの製造直後の乳酸菌数はカードの培養時間によって異なるが、普通工場で用いられる培養時間の範囲では、16時間培養が最高で 10^9 /mlを示し、その後時間の経過とともに菌数はわずかながら低下し、61時間培養カードが 10^7 /mlで最低であった。しかしながら37時間培養までのカードは 10^9 /mlの菌数を示した。

そこでこれらのカードから原液の調製を経て希釈液が作られ、飲用に供する場合、カードから希釈液になるまでの希釈倍数がたとえ100倍希釈になっても、その生菌数は規格内にとどまる計算となる。

生産コストの上から希釈用原液は高希釈倍率のものが望ましい。

一方乳酸菌飲料に特有な酸度の面から考えると、発酵酸度はカードの培養時間とともに高まり、培養時間の古い61時間培養のカードでも3.11%（乳酸として）程度である。このようなカードから作られたシロップ添加による原液の酸度は希釈倍率によって異なるが1.5～1.8%

である。このため希釈後の酸度を乳酸菌飲料の嗜好酸度約0.3%に保つためには5倍以上の希釈は許されない。これ以上の高希釈倍率が要求されると、それに応じて酸度の不足を補わなければならないことになる。

実際には甘味はシロップによって、また酸味はクエン酸で補って5倍用、7倍用、10倍用などの希釈用原液が市販されている。

そこでわれわれは2工場で作られた培養時間の異なる種々のカードに所定量のシロップを添加して調製した5倍用、7倍用、10倍用の各希釈用原液の酸度を測定し、これらが所定どおり希釈された場合、酸度が0.3%となるようにクエン酸で酸度補正をしたものを5%に保存し、それぞれの希釈用原液について、乳酸菌生菌数を日を追って測定した。

これによると工場常用のシロップ添加のみでは乳酸菌の生存に不利な影響を与えることは少ないようで、クエン酸の生菌に対する減少作用は著明であった。

希釈原液のうち5%、8日経過後において 10^7 /ml保持していたものは、クエン酸添加量のきわめて少ない5倍希釈用原液のみであって、それよりも高希釈倍率の原液では菌数の減少は急速であった。

以上の成績から乳酸菌飲料の乳酸菌数を規定の 10^8 /ml以上に保持させるためには、カードの培養は37時間以上にわたらないこと、希釈用原液の希釈倍率は5倍を限度とし、その原液の保存、取扱いは5%においても1週間以内が安全と思われた。

終りに本研究の実施に当ってご指導、ご鞭撻いただいた中山所長および大森微生物課長ならびに岡原前所長に深謝します。またご協力いただいた大阪市衛生局食品衛生課、谷課長初め関係各位ならびに関係会社に厚く謝意

Table 4. Effect of Citric Acid Added on Survivals of *Lactobacilli* in the Stock Solution

Incuba- tion time (hr)	Kinds of stock solution	Percen- tage of syrup	Percen- tage of citric acid	Viable counts of <i>Lactobacilli</i> during storage from 0 to 8 days								
				0	1	2	3	4	5	6	7	8
16	1 : 6	45.1	0	7.5 × 10 ⁸	7.5 × 10 ⁸	4.7 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	4.8 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸	1.7 × 10 ⁸	7.1 × 10 ⁷
24	1 : 6	45.1	0	4.3 × 10 ⁸	4.2 × 10 ⁸	3.2 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	1.2 × 10 ⁸	8.0 × 10 ⁷	3.9 × 10 ⁷
	1 : 9	50.0	0	2.9 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁷	2.1 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁷
37	1 : 4	36.3	0	7.4 × 10 ⁸	3.9 × 10 ⁷	3.9 × 10 ⁷	3.1 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁷	1.2 × 10 ⁷	1.2 × 10 ⁷
	1 : 6	45.1	0	3.3 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁸	1.5 × 10 ⁸	1.9 × 10 ⁷	9.5 × 10 ⁶	9.7 × 10 ⁶	7.7 × 10 ⁶	6.4 × 10 ⁶	4.9 × 10 ⁵
16	1 : 4	36.3	0.26	7.3 × 10 ⁸	9.6 × 10 ⁸	6.7 × 10 ⁸	7.0 × 10 ⁸	1.6 × 10 ⁸	4.3 × 10 ⁷	3.1 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁷
	1 : 6	45.1	0.83	9.9 × 10 ⁸	8.7 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁸	8.7 × 10 ⁷	5.3 × 10 ⁶	8.0 × 10 ⁵	2.0 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁴
	1 : 9	50.0	1.50	3.0 × 10 ⁵	< 10 ⁵	< 10 ⁵	< 10 ³					
24	1 : 6	45.1	0.53	9.2 × 10 ⁸	5.5 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	1.9 × 10 ⁸	4.6 × 10 ⁷	6.2 × 10 ⁶	6.1 × 10 ⁶	9.0 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁴
	1 : 9	50.0	1.41	1.0 × 10 ⁵	3.1 × 10 ⁴	8.0 × 10 ³	< 10 ³					
37	1 : 4	36.3	0.08	8.7 × 10 ⁸	4.8 × 10 ⁷	2.6 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷	1.5 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷
	1 : 6	45.1	0.39	4.1 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁶	9.5 × 10 ⁵	1.2 × 10 ⁵	< 10 ⁴	< 10 ⁴	< 10 ³		
	1 : 9	50.0	1.35	1.0 × 10 ⁵	< 10 ⁵	< 10 ⁴	< 10 ³					
61	1 : 4	36.3	0.08	1.8 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁶	1.4 × 10 ⁶	4.9 × 10 ⁴	4.7 × 10 ⁴	5.0 × 10 ⁴	2.5 × 10 ⁴	2.4 × 10 ⁴	2.4 × 10 ⁴

を表します。

本論文の要旨は日本食品衛生学会第9回学術講演会(昭和40年5月, 大阪)で発表。

文 献

- 1) 清田亮夫, 他: 阪市大医誌. 12, 5-6, 191 (1963).
- 2) 清田亮夫, 他: 食品衛生研究 15(2), 25(1965).

- 3) 春田三佐夫: モダンメディヤ 57, 12 (1953).
- 4) 入江良三郎, 他: 日細菌. 17, 779 (1962).
- 5) 清田亮夫, 他: 阪市大医誌. 12, 5-6, 197 (1963).
- 6) 厚生省編: “食品衛生検査指針” (I), III, 16 (1960) 共同医書出版.