市乳の微生物に関する研究

第1報 低温保存市乳の菌数と菌叢

(昭和40年8月16日受理)

浜本典男* 広田哲二* 金内稔郎*

Microbiological Studies on Market Milk

1. Features of Deterioration and Psychrophilic Bacterial Flora in Market Milk, Stored at Low and Moderate Temperatures

Michio HAMAMOTO, Tetsuji HIROTA, and Toshiro KANAUCHI

(Research Laboratory, Snow Brand Milk Products Co. Ltd.:

3-27-1 Akabanekita, Kita-ku, Tokyo)

Composite samples of commercially bottled market milk were stored at 4, 8 and 21°C, and bacterial growth, declination of protein stability and development of undesirable flavor were examined during storage, and psychrophilic bacterial flora of each sample was analysed.

Each sample gave a positive reaction in dye reduction test when bacterial count reached 10^7 /ml, and thereafter, protein stability began to decline when the highest bacterial count ($10^8 \sim 10^9$ /ml) was obtained, then acids and undesirable flavors simultaneously developed.

The effects of lower temperature on the deterioration of milk were characterized by the delay of bacterial growth and the slower rate of enzymatic deterioration of milk components.

Psychrophilic strains isolated from stored milk samples were classified into 9 types, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes viscolactis*, 1 type of *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium solare*, 2 types of *Achromobacter* sp., *Brevibacterium ammoniagenes*, *Aerobacter aerogenes* and *Bacillus circulans*. The distribution of micro-organism, such as *Ps. fluorescens*, 1 type of *Achromobacter* sp. and *Br. ammoniagenes*, which grew well at 0°C were 98% in milk stored at 4°C, 44.9% at 8°C and 0% at 21°C.

Dye reduction test and the test that 2 ml of 70% ethanol is added to 1 ml of milk, are considered to be available for routine measurement of deterioration of the stored product.

(Received August 16, 1965)

緒言

近年、市乳の消費は、店頭売り数量が増加する傾向を示し、自動販売機による販売も実施される段階となっており、このような販売様式の変化には当然保存性の高い製品が要求される。

現在、市乳の殺菌法は比較的高い温度で処理する例が多く、超高温瞬間殺菌法では、従来行なわれていた高温短時間殺菌法などと比較すると著しく高い殺菌効率を得ている。一方包装形態も、ビン装製品以外に、一部はテ

* 雪印乳業株式会社技術研究所：東京都北区赤羽北3-27-1

トラパックなどの紙容器包装製品が利用されており、これらの方法は微生物学的品質改善のためには有効な手段と考えられている。

しかし、本邦では、これら製造方法、販売様式の変化に伴う市乳の衛生学、微生物学に関しては体系的な研究が少なく、したがって技術的な改良点の衛生学的効果が不明な場合も多く、今後検討しなければならない点が多々あるものとする。

本研究は、市乳の製造販売様式の変化に伴って種々考えられる問題のうち、製造工程保存過程で認められる微

生物群の実態を把握し、これら微生物が製品品質に及ぼす影響、ならびに食品衛生学的意義を解明するとともに製造方法およびそれ以後の取扱い保存方法について検討するのを目的とした。

著者らは、その第一段階として、現在、最も普遍的に消費されているビン装市乳をとり上げたが、この種の製品には、保存料、殺菌料などの添加は食品衛生法により禁止されており、変質を防ぐ方法としては低温に保蔵すること以外示されていない。

しかし近年、低温でもよく生育する一群の細菌が、各種冷蔵食品の品質に与える影響について検討されその実態がほぼ明らかになってきた。これら低温菌の衛生学的意義は低温に保つことを唯一の保存法とし、また場合によっては煮沸しないで飲用に供せられる市乳製品では他種食品よりはるかに重要であると考えられる。

本報では、H.T.S.T. 処理のビン装市乳を低温に保存した場合に、一般的に認められる微生物学的変化の様相、初期変化を比較的簡単な方法で察知する試験法、変質速度に及ぼす保存温度の影響、保存中に認められる細菌叢と分離低温菌株の性状などについて検討したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試料

雪印乳業㈱T工場において、ビン装直後の180 ml 容均質化牛乳(83°, 15秒処理)50本を採取し試料とした。採取した試料は10 L 容滅菌フラスコに移し、よく混合したのち、3 L 容滅菌フラスコ3本にほぼ均等に分注した。

2. 試料の保存

3 L 容フラスコに分注した試料は、4, 8, 21°にそれぞれ1本ずつ、外観的に凝固が認められるまで保存した。

3. 試験項目

保存各時期の試料については下記の試験を行なった。

1) 一般細菌数：常法¹⁾により、乳製品用標準寒天平板法により、37°に2日間培養後、計数し、結果は1 ml 中の菌数として表わした。

2) 低温菌数：一般細菌の測定と同様の方法により平板を作成したが、平板の培養条件は7°, 7日間²⁾とし、生育した集落を計数して低温菌数とした。結果は1 ml 中の菌数として表わした。

3) 酸度およびpH：試料の酸度は常法¹⁾により実施し、結果は乳酸々度で表わした。

試料のpHは、日立-堀場M-4型pH計を用いて測定した。

4) アルコール2倍量試験：試料1 ml に70%エタノール2 ml を加え、混合し、微細カード、凝固物の生成を肉眼的に検し生成の認められたものを陽性と判定した。また常法¹⁾による通常のアルコール試験も実施した。

5) 加熱試験：沸騰水浴中で、10分間加熱して凝固物生成の認められたものを陽性と判定した。

6) 色素還元試験：和光純薬㈱製ラクテスターAを用い、常法¹⁾によるレサズリン試験を実施したが、結果は同社色調表により、呈色度に従って1~4を陽性と判定した。

7) ストルヒ反応：常法¹⁾によった。

8) 官能試験：異常風味、外観的な変化などを、官能的に試験した。

4. 低温菌株の分離

低温菌計数培地に生育した集落は一時点の試料から無作為に12株を鈎菌し、寒天平板塗抹法により純粋分離を行なって分離株を得た。

5. 低温菌分離株については、下記の試験を行なってその性状を検し、分類学的位置を定めた。なお、試験はとくに記載しない場合は21°において行なった。

1) 低温菌分離株の牛乳に対する作用

イ) リトマス牛乳の培養性状：リトマス牛乳で2週間培養後、リトマスの変色、還元、ガス発生、凝固、ペプトン化の有無などを肉眼的に観察するとともに、pH試験紙によりpH値を測定した。

ロ) カゼイン分解能：脱脂乳を5%量添加した乳製品用標準寒天平板に塗抹培養し、集落周辺の透明帯生成の有無を肉眼的に検し判定した。

ハ) 脂肪分解能：ナイルブルーバター脂寒天培地平板³⁾(基礎培地は乳製品用標準寒天培地)に塗抹培養し、培地変色の有無を肉眼的に検し、判定した。

ニ) 乳糖分解能：ダーラム管を入れたB.T.B. 乳糖ブイヨン培地に2週間培養したのち、培地の色調に黄変が認められたもの、またはダーラム管にガス留滞の認められたものを陽性と判定した。

2) 熱抵抗性、生育温度については下記の要領で試験を行なった。

イ) 熱抵抗性：分離株の新鮮な寒天斜面培養より、菌体1白金耳を採取し、リトマス牛乳培地に接種後、60°で30分間加熱したのち室温まで急冷して、21°で1週間増菌したのち、乳製品用標準寒天平板に塗抹培養を行ない、残存菌の有無を検し残存細菌を認めたものを熱抵抗性ありと判定した。

ロ) 生育温度：分離株培養を塗抹した乳製品用標準寒天培地平板を、0°に2週間、5°に10日間、37°に2日間培養し、平板上の生育の有無を肉眼的に判定した。

3) 低温菌分離株の分類同定：低温菌分離株の一般的、微生物学的性状は、Manual of Microbiological Methods⁴⁾の方法により検し、分類同定はBergey's Manual⁴⁾に従って実施した。

実験結果ならびに考察

試料の保存期間中における一般細菌数の変化をFig.1に、低温菌数の変化とレサズリン試験の結果をFig.2に

Fig. 1. Standard plate counts of market milk stored at 4, 8 and 21°C

⊙ : positive result of dye reduction test

Fig. 2. Psychrophilic plate counts of market milk stored at 4, 8 and 21°C

示す。

保存直後の試料中には、一般細菌が18/ml 存在し、これらは保存中に増加し、4°では保存後9日目の試料で、8°では5日目で、それぞれ 5×10^4 /ml 以上の菌数を示したが、21°保存試料では、保存1日後にすでに 10^6 /ml 程度の菌数に達するのを認めた。

この後4°に保存した試料では、10日目まで増加する傾向を認めたが、10日以後の試料ではほぼ一定の菌数 (10^6 /ml 程度) を示した。8°, 21°では、それぞれ保存後9日目、2日目までは増加し、それぞれ 10^8 /ml, 10^7 /ml の最高菌数に達した。

これに対し、低温菌は、ビン装直後の試料で計数されなかったものが、4°では7日後に、8°では5日後に、21°では1日後に、それぞれ一般細菌と同数程度計数、検出され、以後はいずれの試料でも、一般細菌よりも多数存在するのを認め、低温菌の最高菌数はいずれも $10^8 \sim 10^9$ /ml 程度であった。

この結果から、低温菌は、室温付近の温度に保持された牛乳中ではもちろん、10°以下の低温でもよく生育し、保存中に一般細菌よりも数多く存在するようになることから、中低温域における市乳の変質には重要な意義を有するものと考えられる。

レサズリン試験は、4°では保存10日以降の試料において、8°では保存6日以降、21°では保存2日目の試料について陽性化するのを認めたが、これは低温菌数が 10^7 /ml 以上に達したときであり、したがってこの試験は、一般細菌または低温菌、あるいはその両者が一定数以上の菌数に達したことを示すものと考えられた。

アルコール2倍量試験(2A)、アルコール試験(A)、100°加熱試験(H)、外観的カード生成(C)のそれぞれの陽性化に要した日数、ならびに酸度の変化を Fig. 3 に示す。

Fig. 3. Development of acid and declination of protein stability of market milk stored at 4, 8 and 21°C

2A, A, H, and C show the positive results of the test that 2 ml of 70% ethanol is added to 1 ml of sample, the ordinary alcohol test, coagulation test at 100°C, and external curd formation, respectively

4°保存試料では、保存13日目に2Aが、16日目にAが18日目にHが陽性となり、25日間保存したときCが陽性化するのを認めた。8°では、保存後8日目に、2A、9日目にA、Hがともに陽性となり、保存13日の試料にCを認めた。これに対し、21°保存試料では、保存1日では、2A、A、H、Cがともに陰性であったのが、保存2日後の試料は凝固しており、硬いカードの間隙には、ガス留滞が認められ、はなはだしいホエイ分離を伴っていた。

一方、試料の酸度は、保存直後の試料では0.150%であったが、いずれの試料でも2Aが陽性化するまで変化がなく、その後上昇するのを認めたが、保存温度が高いほど酸度上昇の速度は大きかった。

官能試験の結果では、いずれの試料でも、2Aが陽性化したとき、わずかな陳腐臭を、A陽性化時には、明らかな酸味、陳腐臭を認め、H陽性化時には、果実臭、ム

レ臭などがこれに伴っていた。

試料の pH は保存直後の試料で 6.70 程度であったものが、酸度上昇に伴って低下した。ストルヒ反応は全保存期間を通じて陰性であった。

なお、これらの現象については 2 回の繰返し実験を行ない、同様の傾向を認めた。

また著者らは、他の実験により 180 ml 容ビン装市乳を、30 本ずつ同一温度に保存して同様の実験を行なったが、1 本ごとの変化のばらつきが大きく、一般的な変化の経緯を知るには不適當と考えられた。さらに U.H.T. 処理ビン装市乳を、中低温域に保存した実験においても本報の結果と著しく相違する点は認めなかったことを付記しておく。

以上の結果から、ビン装後の市乳を、 10° 以下の低温あるいは 21° 程度の中温に保存した場合には、一般的に下記のごとき変化が認められるものと考えられる。

すなわち、直後には少数しか存在しない低温菌が保存中に増殖し 10^7 /ml 以上の菌数に達するとレサズリン試験が陽性化する。さらに細菌数が増加し、最高菌数 (10^9 /ml 程度) に達する前後において、乳タンパクの安定度が低下し、アルコール 2 倍量試験が陽性となるが、これと同時に、酸度上昇、pH 低下の兆候も認められ、風味にやや新鮮度を欠くようになる。これ以後は、細菌数の増加は認められないがタンパク安定性はさらに低下してアルコール試験が陽性化する時点においてはかなりの酸度上昇、pH 低下が認められ、風味にも明らかな変化をきたす。さらに保存を続けると、 100° 加熱試験で凝固するようになり、ついには外観的なカード生成が認められるようになる。

保存温度の相違が、この一連の変化に及ぼす影響は、市乳製品の取扱い、製造後の保存条件と関連して重要な問題と考えられるが、保存温度が低温菌の増殖に及ぼす影響は、発育の初期静止期の長さ、対数増殖期の増殖速度に表われている。すなわち、 21° では初期静止期がほとんど認められず、対数増殖の速度も早いのに対し、 10° 以下の低温では初期静止期が認められ、保存温度が低いほどその時間が長く、対数増殖の速度も温度が低いほどおそい。レサズリン試験の陽性化に要する日数の差が、この効果を表わしている。また低温保存の効果は、これら細菌の発育に抑制的に働くばかりでなく、最高菌数に達したあとの乳タンパクの変質、変性をも遅滞させるが、この場合、牛乳の変敗は本質的には酵素反応であり、 10° 以下の低温で保存された乳でもなお、保存温度が低いほど長期の保存に耐えるのは当然である。

また実験に用いた試料は、市乳製品としては、とくに劣悪な細菌学的品質を有するものではないにもかかわらず、 21° 程度の中温においては、2 日保存で著しい外観的变化を認めたこと、 10° 以下の低温でもなお一部細菌の発育が認められることなどから、一般の市乳製品では

その流通機構のなかで、取扱い保存条件の適切を欠く場合、細菌学的品質の劣ったものが飲用に供せられる可能性があるものとする。製造直後の細菌学的品質が、この一連の変化にどのように影響するか などについては今後検討しなければならない点であろう。

以上の結果から市販市乳製品の細菌学的品質を検する場合、(1)低温菌数の測定、(2)色素還元試験、(3)アルコール 2 倍量試験、などの方法が考えられるが、低温菌数の測定は、細菌学的保存状態を直接表わすものではあるが低温恒温器などの設備を必要とし、培養には長時間を要することなどから、特別な目的以外には適用困難と考えられる。

また低温菌数測定の簡便法としては、常法による乳製品用標準寒天平板を、 25° に培養する方法⁹⁾ なども考えられるが、H.T.S.T. 処理市乳では、一部の中温菌による誤差が生じ、今後の検討が必要である。これに対し、色素還元試験は、細菌数がある程度の数に達したことを示すのであるが、実施判定法は比較的簡単に日常検査に十分応用でき、またアルコール 2 倍量試験は初期変敗の検出法として有用な応用手段と考えられる。

Table 1 に、低温菌として各保存試料から得た分離株 91 株の分布状態を、Table 2 に分離株各タイプの一般的、微生物学的性状と、乳成分に対する作用、温度関係などを示す。

4° 保存試料から得た分離株 51 株は、*Pseudomonas fluorescens* (23 株)、*Achromobacter* sp. (27 株)、*Flavobacterium solare* (1 株) の 3 タイプに分けられ、そのほとんどが 0° でもよく発育する菌株であった。 8° 保存試料では、*Pseudomonas fluorescens* (11 株)、*Brevibacterium ammoniagenes* (2 株) など 0° で発育するものの他に、*Alcaligenes viscolactis* (11 株)、*Achromobacter* sp. (2 株)、*Pseudomonas* sp. (2 株) のごとく 0° では発育しない低温菌も認められ、これらに中温菌と考えられる *Aerobacter aerogenes* 1 株が随伴するのを認めた。これに対し、 21° 保存では、 0° で発育する菌株は認められず、*Achromobacter* sp. (4 株)、*Al. viscolactis* (3 株)、*Pseudomonas* sp. (2 株) の 3 タイプの低温菌とともに、中温菌と考えられる *Bacillus circulans* 2 株が分離された。

各温度に保存した試料において、 0° でもよく発育する低温菌の出現頻度は、今回の実験では、 4° 保存試料で 98%、 8° では 44.9%、 21° では 0% とかなりの差を認め、同一の細菌学的品質を有する試料を各温度に保存した場合、保存温度の選択効果をうけ、異なった細菌叢を形成するのが明らかであった。

小川ら⁶⁾ は、市乳製品を室温に放置して、各種細菌の出現頻度を調査し、タンパク分解菌は、夏期よりも春期の保存乳に多かったとしている。今回の実験では、室温以下の温度範囲において、比較的低い温度に保存した場

Table 1. Distribution of Psychrophilic Strains Isolated from Market Milk Stored at 4, 8 and 21°C

Storage temperature Organisms	4°C		8°C		21°C	
	no. of isolated strains	distribution (%)	no. of isolated strains	distribution (%)	no. of isolated strains	distribution (%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23	45	11	38		
<i>Achromobacter</i> sp. -1	27	53				
<i>Flavobacterium solare</i>	1	2				
<i>Alcaligenes viscolactis</i>			11	38	3	27
<i>Pseudomonas</i> sp.			2	7	2	18
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>			2	7		
<i>Achromobacter</i> sp. -2			2	7	4	36
<i>Aerobacter aerogenes</i>			1	4		
<i>Bacillus circulans</i>					2	18
	51		29		11	

Table 2. Characters of Psychrophilic Strains Isolated from Market Milk Stored at 4, 8 and 21°C

	Form	Size of cell (μ)	Gram stain	Flagella	Spore	Aerotaxis	Catalase	Gelatin liquefaction
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	rod	0.4~0.6×0.8~1.8	-	polar	-	aerobic	+	+
<i>Achromobacter</i> sp. -1	rod	0.6~0.8×2.0~5.0	-	peritrichous	-	facultative aerobic	-	-
<i>Flavobacterium solare</i>	rod	0.4~0.6×1.5~4.0	-	-	-	aerobic	+	-
<i>Alcaligenes viscolactis</i>	rod	0.6~0.8×1.0~2.0	-	-	-	aerobic	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	rod	0.4~0.8×1.0~2.0	-	polar	-	aerobic	+	-
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	rod	0.8~1.0×1.0~1.5	+	-	-	aerobic	+	-
<i>Achromobacter</i> sp. -2	rod	0.6~0.8×1.0~2.0	-	-	-	facultative aerobic	-	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	rod	0.6~0.8×1.0~2.0	-	-	-	aerobic	+	-
<i>Bacillus circulans</i>	rod	0.8~1.0×2.0~7.0	+	-	+	aerobic	+	-

	Production of				Assimilation of citrate	Hae-molysis	Acid or gas from		Digestion of casein	Splitting of fat	Litmus-milk	Growth at			Resistance to heat
	NO ₂	in-dol	H ₂ S	acetoin			Glu-cose	Lac-tose				0°C	5°C	37°C	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	-	+	+ or -	+	-	+	+	R, P	+	+	-	-
<i>Achromobacter</i> sp. -1	+	-	-	+	-	+ or -	+	-	-	-	no change	+	+	-	-
<i>Flavobacterium solare</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	no change	±	+	-	-
<i>Alcaligenes viscolactis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	Al	-	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	A	-	+	-	-
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	no change	+	+	-	-
<i>Achromobacter</i> sp. -2	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	A, C, R	-	±	-	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	A, C	-	±	+	-
<i>Bacillus circulans</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	A	-	±	+	+

A : acid, Al : alkaline, C : coagulation, P : peptonize, R : reduction of litmus

合に強度のタンパク分解性を有する菌種の占める割合が、菌叢中に多くなるのを認めた。また前述のごとく、保存市乳の低温菌叢中に占める、0°でもよく発育する低温菌の割合は、保存条件の前歴を示すものとして、興味ある現象と考えられ、保存温度の相違がもたらす細菌叢の相違は、市乳の変質になんらかの質的な相違をもたらすものとして興味ある問題である。

低温菌分離株の性状からは、大部分のものが37°において生育せず、一般細菌計数の際には、生育温度の相違により計数されないものと考えられ、製品試験法の上から重要である。

一方、これら低温菌は、60°、30分間の加熱処理により死滅し、また保存直後の試料で1 ml中に検出されない程度の数しか存在しないことから、殺菌処理後の工程で二次的に汚染したものと考えられ、Thomasら⁷⁾の結果と一致する。しかし低温菌のなかには、0°においても発育が認められる菌種が存在し、ビン装市乳においては、たとえ保存限界温度と考えられる0°に保存した場合でも、低温菌の増殖が不可避の現象と思われ、衛生学上重要な問題と考えられる。

またこれら低温菌のなかには、乳成分に対し、なんらの作用も示さないと考えられる菌種が存在したが、この点については、さらに衛生学的な検討を要すると思われる。

また低温保存試料において、保存中に一般細菌数の増加を認めたが、これは37°で生育する低温菌、あるいは10°以下でも発育する中温菌に原因するものと思われる。

要 約

市乳製品における変質の様相を調査する目的で、ビン装直後のH.T.S.T.処理市乳を、4、8、21°の各温度に保存し、一般的な変化の経緯、取扱い保存条件の因子として保存温度の効果、初期変化の検出法、保存試料の低温菌叢などについて検討した。

中低温域に保存した市乳では、細菌増殖が認められ、保存中に一般細菌数よりも低温菌数の方が多くなる。細菌数が 10^7 /ml以上に達すると色素還元試験が最高菌数($10^8 \sim 10^9$ /ml程度)に達する前後において、タンパク

安定性の低下が認められ、さらに酸度、風味などの変化が認められた。

保存温度の相違は、この変化の速度に、著しく大きな影響を及ぼすが、この原因は細菌増殖とともに、乳成分変質の速度に影響するためと考えられる。

低温菌分離株91株は、*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp. 1型, *Achromobacter* sp. 2型, *Alcaligenes viscolactis*, *Flavobacterium solare*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus circulans*の9タイプに型別したが、各保存試料において、0°でもよく発育する菌種の出現頻度は、4°で98%, 8°で44.9%, 21°で0%であり、保存温度が低いほど、低温でもよく生育する菌種の割合が多い菌叢を形成する。

また低温菌中には0°でもよく発育する菌種が存在することから、ビン装市乳の保存限界温度と考えられる0°でもなお、低温菌の増殖は避けられない現象と考えられる。

保存試料の変化の経緯から、市販市乳製品の細菌学的保存状態を、日常検査的に検する場合には、色素還元試験またはアルコール2倍量試験の応用が適当と考えられる。

本報の要旨は、第51回畜産学会大会(1965年)において発表。

文 献

- 1) 厚生省編纂: “衛生検査指針”(1963).
- 2) American Public Health Assoc. Inc.: “Standard Methods for the Examination of Dairy Products” 11th Ed. (1960).
- 3) M. J. Pelczar Jr. et al.: “Manual of Microbiological Methods” (1957).
- 4) R. S. Breed et al.: “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology” 7th Ed. (1957).
- 5) P. R. Elliker et al.: J. Milk & Food Technol. 27, 69 (1964).
- 6) 小川益男, 他: お茶の水医誌. 10, 13 (1962).
- 7) S. B. Thomas et al.: Dairy Eng. 77, 438 (1960).