

## 包装食品の微生物変敗防止に関する研究(19)

誌名	愛知県食品工業試験所年報
ISSN	03887758
著者	内藤, 茂三
巻/号	27号
掲載ページ	p. 61-68
発行年月	1987年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## チョコレートケーキに生成する白斑点、酢酸エチル生成原因菌の分離・同定およびオゾン殺菌処理について\*

内藤茂三

数多い菓子類の中で、微生物汚染を受けて変敗しやすい製品の含水率は15%以上であり、5%以下のビスケット類、米菓類、乾パン、クラッカー類などの干菓子類は二、三の例<sup>1)</sup>を除いてほとんど心配はない。圧倒的に微生物変敗が多いのはパン類(水分36~44%)、および和洋菓子類(水分20~60%)である。菓子の水分含有量が40%を越えるものは、細菌類の汚染繁殖が特に早く、環境の温度、湿度がその生育に適切であればその繁殖は加速される。また、酵母は微酸性でもよく繁殖し、耐浸透性酵母は高濃度糖液中でも生育するので、水分の多い生菓子、半生菓子はもちろんのこと、干菓子でも吸湿すると被害を受けることがある。糸状菌類は、菓子類では最も普遍的に見られる汚染微生物で、生育を始めると肉眼でも見られるような集落を形成し、白色、灰色の菌糸や、色素を持つ胞子を形成し表面を黒色、緑色にすることがあり、細菌や酵母が生育しない貯蔵湿度以下で変敗させることがある。今回、包装したチョコレートケーキの表面に微生物に起因する白色円形斑点と酢酸エチル臭が生成し、変品が続出したのでその原因菌を分離・同定し、さらにその防止法について検討したので報告する。

### 実 験 方 法

1. 供試試料 白斑点の生成したチョコレートケーキ、正常なチョコレートケーキおよびその原材料を用いた。白斑点の生成した製品および正常品の一般成分を第1表に示した。また白斑点の生成した製品を写真1に示した。

2. 微生物の分離と同定 既報<sup>1)2)</sup>と同様に行った。

3. 香気成分の分析 既報<sup>4)5)</sup>と同様に酢酸エチル、エタノールおよびアセトアルデヒドを定量した。

4. オゾン処理 分離菌株のオゾン処理は既報<sup>6)</sup>と同様に水中で行い、チョコレートケーキに分離菌株を接種(凍結乾燥菌体100mg接種:菌数 $7.8 \times 10^6$ )後のオゾン処理は既報<sup>7)</sup>と同様にオゾン照射自動濃度調節器を用いて行った。また同時に *Hansenula anomala* IFO1760についても同様な実験を行った。

5. 空中浮遊菌の測定 シャーレ5分間オープン法およびピンホールサンプラー法により測定した。

\*包装食品の微生物変敗防止に関する研究(第19報)

第1表 チョコレートケーキの成分変化

	製造直後の 製 品	白斑点の生 成した製品
水 分(%)	29.85	33.57
灰 分(%)	0.65	0.71
たんばく質(%)	6.51	6.75
脂 質(%)	11.50	12.11
直 糖(%)	2.10	3.57
シ ョ 糖(%)	38.21	35.67
直糖・ショ糖以 外の糖質(%)	11.07	7.50
繊 維(%)	0.11	0.12
水 分 活 性	0.842	0.875
細 菌(/g)	$4.5 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$
酵 母(/g)	$1.6 \times 10^4$	$1.0 \times 10^6$
糸 状 菌(/g)	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
pH	5.70	5.28

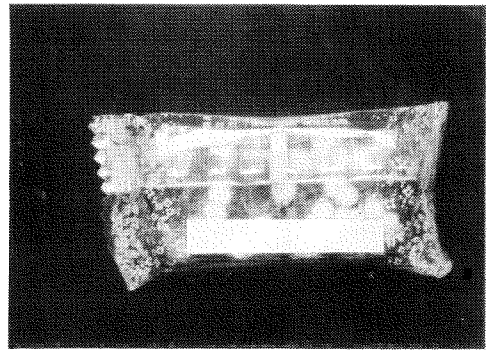


写真1 白斑点の生成したチョコレートケーキ

## 実験結果及び考察

1. 原材料および製造工程の菌数 原材料および製造工程の菌数を第2表に示した。菌数の多い原材料は液卵で次いでカカオバター、小麦粉、砂糖、全脂粉乳であった。今回分析した液卵の菌数は $5.2 \times 10^5$ /gと多く検出されたが、そのほとんどがグラム陰性菌であるため焼き上げ工程で大部分が死滅し、

第2表 原材料および製造工程での菌数

原 材 料	菌 数 (/g)		
	細 菌	酵 母 菌	糸 状 菌
液 卵	$5.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下
砂 糖	$2.1 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
小 麦 粉	$3.5 \times 10^3$	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
植 物 性 油 脂	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
全 脂 粉 乳	$2.0 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
カカオバター	$6.5 \times 10^3$	$1.5 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下
ラ ム 酒	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
膨 張 剤	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
食 塩	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
香 料	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
原材料混合	$5.7 \times 10^5$	$3.7 \times 10^3$	$1.2 \times 10^2$
焼き上げ	$3.5 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下	$3.0 \times 10$ 以下
包装製品	$4.5 \times 10^4$	$1.6 \times 10^2$	$3.0 \times 10$ 以下

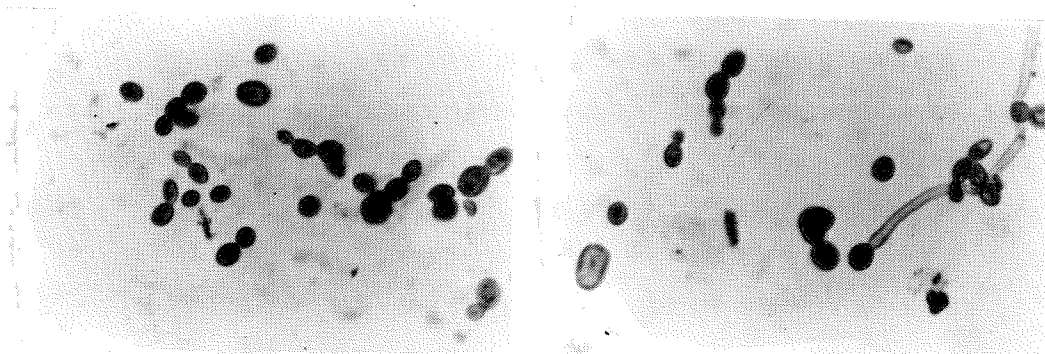
また酵母菌も同様に焼き上げ後ほとんど死滅した。カカオバターについては $6.5 \times 10^3$  / g の細菌,  $1.5 \times 10^2$  / g の酵母菌を検出した。これらの菌類は二次汚染に由来するグラム陽性菌が中心であった。さらに小麦粉, 砂糖および全脂粉乳から検出された菌は大部分がグラム陽性菌であった。焼き上げ工程で上記の細菌は著しく減少し,  $3.5 \times 10^2$  / g となったが, 冷却後包装するまでの工程で二次汚染を受け,  $4.5 \times 10^4$  / g の酵母菌をそれぞれ検出した。今回の変敗の原因となった白斑点生成および酢酸エチル生成に關与する微生物はこの焼き上げ工程から冷却, 包装工程で汚染された可能性が強い。

2. 白斑点生成および酢酸エチル生成に關与する微生物の分離・同定 白斑点の生成したチョコレートケーキの白斑点部分より酵母菌 1 株を分離した。また本菌は酵母 Y M 培地で酢酸エチルを生成することを認めた。その形態的特性を第 3 表に示した。栄養細胞の形状は楕円形, 卵形, 長楕円形を呈し,

第 3 表 分離酵母の形態的特性

形	態	楕円形、卵形、長楕円形混在
大	き	$3.0 \sim 4.0 \mu \times 3.0 \sim 7.0 \mu$
偽	菌	形成良好 (Candida 型)
胞	子	形成せず
皮	膜	弱い皮膜形成
栄	養・体	芽出胞子は偽菌糸の末端に連結する。
生	殖	
グルコース・酵母エキス・ペプトン水での生育		[25℃、3日間培養後、細胞は楕円形、卵形であり一部連鎖する。薄い、乾燥した皮膜を形成する。培養期間の延長に伴い沈澱する。]
グルコース・酵母エキス・ペプトン寒天平板での生育		[25℃、30日間培養後、黒色粒状となる。]
麦芽エキス培地での生育		[25℃、6日間培養で菌体は白色であり薄い皮膜を形成するか培養期間の延長に伴い沈澱する。]
酵母 Y M 培地での生育		[25℃、6日間培養で菌体は黄白色から白であり薄い皮膜を形成する]が培養時間の延長に伴い沈澱する。]
酵母 Y M 寒天斜面培地での生育		[25℃、6日間培養で菌体は黒色粒状となった。]
スライドカルチャ		偽菌糸の形成良好であり 25℃、2日間培養で典型的な "Candida" 型偽菌糸形成。

連鎖する。その形態を写真 2 に示す。偽菌糸は形成良好で、伸長形細胞の連鎖を呈し、芽出胞子は偽菌糸の末端に連結し、典型的な *Candida* 型を呈した。その形態を写真 3, 4 に示した。胞子は形成せず、液体培養で弱い乾燥した被膜を形成した。酵母 Y M 寒天平板培地および斜面培地では特徴のある黒色粒状の菌体を形成した。また斜面培地では黒色粒状菌体が重なり盛り上がった。生理的特性を検討した結果を第 4 表に示す。アルブチン分解, エタノール資化性は陽性でありビタミンフリーの培地での生育は良好であった。なお本菌は 10~37℃ の温度範囲で生育可能であり最適生育温度は 25℃ であった。またショ糖濃度 0~60% の範囲で生育が可能で、最適生育濃度は 10~15% であった。食塩濃度は 0~15% の範囲で生育し、その最適生育濃度は 5% であった。以上のことより本菌は好浸透圧性の酵母であると考



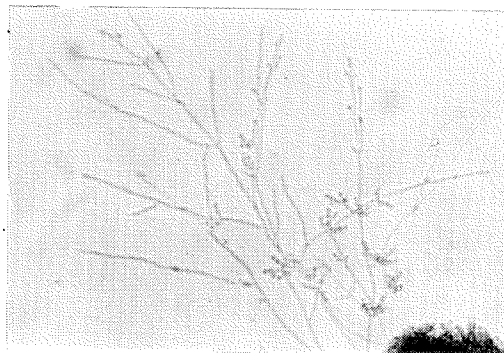
(a)

(b)

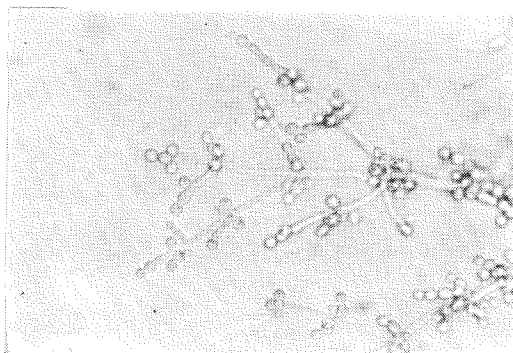
写真2. チョコレートケーキより分離した酵母の栄養細胞

(a) 栄養細胞(×300)

(b) 発芽細胞(×300)



(a)

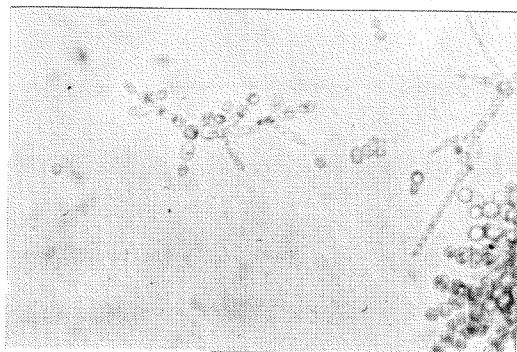


(b)

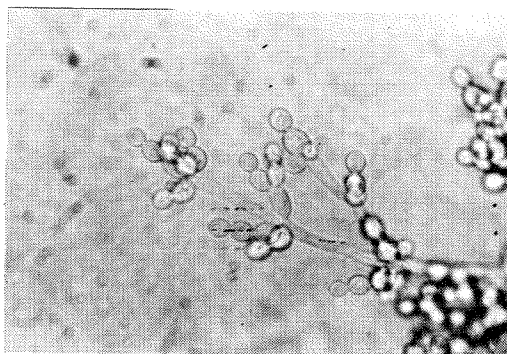
写真3. チョコレートケーキより分離した酵母の偽菌糸

(a) ×75

(b) ×150



(c)



(d)

写真3. チョコレートケーキより分離した酵母の偽菌糸

(c) ×150

(d) ×300

第4表 分離酵母の生理的特性

アルブチン分解	+
硝酸塩資化性	-
エタノール資化性	+
リトマスミルク	凝固せず、青に変化
ビタミンフリーの培地の生育	+
生育温度	
40℃	+
37℃	+
30℃	+
25℃	+
20℃	+
15℃	+
10℃	+
ショ糖濃度(生育)	
0%	+
10%	+
20%	+
30%	+
40%	+
50%	+
60%	+
食塩濃度(生育)	
0%	+
5%	+
15%	+
20%	-

+ : 陽性、 - : 陰性

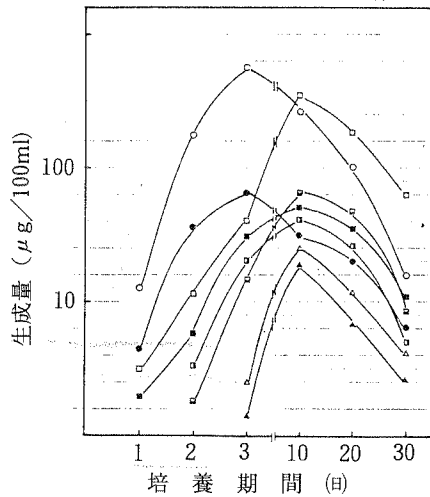
第5表 分離酵母の糖の発酵性と炭素化合物の資化性

糖の発酵性			
グルコース	+		
ガラクトース	-		
シュクロース	-		
マルトース	-		
ラクトース	-		
トレハロース	+		
炭素化合物の資化性			
ガラクトース	+	D-リボース	+
L-ソルボース	-	L-ラムロース	-
シュクロース	-	グリセロール	+
マルトース	+	D-マンニトール	+
セロビオース	+	DL-乳酸	-
トレハロース	+	コハク酸	+
ラクトース	-	クエン酸	-
メリビオース	-	イノシトール	-
ラフィノース	+		
可溶性澱粉	-		
D-キシロース	+		
L-アラビノース	+		
D-アラビノース	-		

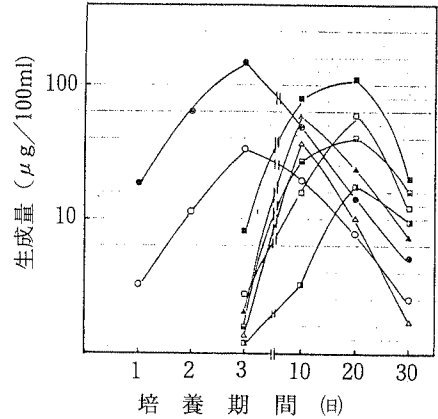
+ : 陽性、 - : 陰性

えられる。糖の発酵性と炭素化合物の資化性を検討した結果を第5表に示した。発酵性はグルコース及びトレハロースのみに認められ、炭素化合物の資化性はガラクトース、マルトース、セロビオース、トレハロース、ラフィノース、D-キシロース、L-アラビノース、D-リボース、グリセロール、D-マンニトール、コハク酸に認められた。これらの結果より本菌はカカオ豆の発酵工程でよく検出されることが知られている<sup>8)</sup>。 *Candida cacaoi* と同定した。また本菌は原材料として使用されているカカオバターより検出するとともに製造工場の空中浮遊菌からも検出した。

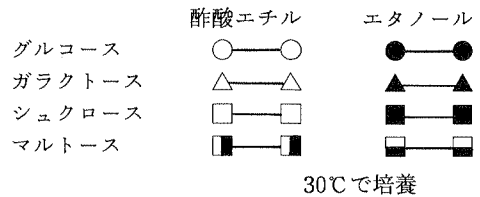
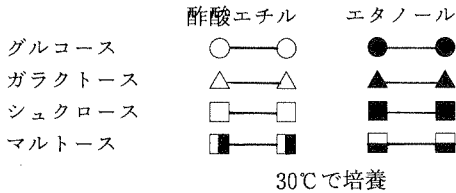
3. 酢酸エチル生成に及ぼす糖類の影響 分離した *Candida cacaoi* の洗浄菌体のみを既報<sup>4,5)</sup>に準じて30日間培養しても、ヘッドスペースガス中には揮発性成分は検出されなかったが、糖の添加により酢酸エチル、アセトアルデヒド、エタノールが検出され、その3成分間の量と比は糖の種類、培養時間により異なるが、酢酸エチルとエタノールの結果を第1図に示した。グルコース、シュクロース、ラ



第1図 分離した*Candida cacaoi*による糖からの酢酸エチルおよびエタノールの生成



第2図 *Hansenula anomala*, IFO 1760による糖からの酢酸エチルおよびエタノールの生成



フィノース、マルトース、ガラクトース、ラクトース、ソルビトール、マルチトールについて検討を行ったが、酢酸エチルが検出されたのはグルコース、シュクロース、ガラクトース、マルトースであった。グルコースは培養3日、シュクロースは20日、ガラクトースは10日、マルトースは20日で最大の生成を認めた。その際の生成量はそれぞれグルコース： $1.7 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、シュクロース： $7.8 \times 10 \mu\text{g}$ 、ガラクトース： $6.0 \times 10 \mu\text{g}$ 、マルトース： $2.5 \times 10 \mu\text{g}/100\text{g}$ であった。

糖から酢酸エチルを生成する酵母は主として *Hansenula* 属であることが知られている。既報<sup>4)5)</sup>において包装着色生パン粉より分離した *Hansenula anomala* 5菌株について糖からの酢酸エチル生成について報告した。今回、標準菌株の *Hansenula anomala* IFO 1760の上記糖類からの酢酸エチルの生成を検討した結果を第2図に示した。本菌はグルコース、シュクロース、ラフィノース、マルトースからは酢酸エチルを生成し、ガラクトースからは生成しない点で *Candida cacaoi* とは異なっていた。各種糖類についてみるとグルコースからは培養3日、シュクロース、マルトースからは10日で最大の生成を示し、その際の生成量はそれぞれグルコース： $7.9 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、シュクロース： $5.7 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、ラフィノース： $4.0 \times 10 \mu\text{g}$ 、マルトース： $6.2 \times 10 \mu\text{g}/100\text{ml}$ であった。酢酸エチルの生成量については、今回分離した *Candida cacaoi* は *Hansenula anomala* IFO 1760より少ないことを認め、エタノールの生成が

酢酸エチルよりも多く、*Hansenula anomala* IFO 1760とは全く逆の関係にあった。これは *Candida cacaoi* はエタノール資化性が *Hansenula anomala* IFO 1760より弱いためであると考えられる。

4. オゾン処理 分離菌株の *Candida cacaoi* と標準菌株の *Hansenula anomala* IFO 1760の水中のオゾン殺菌を検討した結果を第6表に示す。*Candida cacaoi* は5分間処理で $5.1 \times 10^4$ /mlとなり、15分間処理で $3.5 \times 10^2$ /mlと著しく減少し、さらに30分間処理で完全に死滅した。また *Hansenula anomala* IFO 1760は5分間処理で $3.1 \times 10^3$ /mlとなり、さらに15分間処理で $3.1 \times 10$ /mlと減少し、20分間処理で完全に死滅した。今回分離した *Candida cacaoi* は *Hansenula anomala* IFO 1760よりもオゾンに対する抵抗力が強いことを認めた。

チョコレートケーキに上記の菌を接種し、気中で30分間オゾン殺菌を行った結果を第7表に示した。*Candida cacaoi* を接種した場合は、0.5ppm 処理で $7.2 \times 10^3$ /gとなり、1.0ppm 処理で $5.6 \times 10^2$ /gと著しく減少し、さらに2.0ppm 処理で完全に死滅した。また *Hansenula anomala* IFO 1760を接種した場合は0.2ppm 処理で $1.2 \times 10^3$ /gとなり、0.5ppm 処理で $3.5 \times 10$ /gと著しく減少し、1.0ppm 処理で完全に死滅した。

第6表 分離菌株の水中でのオゾン殺菌

処理時間(分)	菌 数 (/ml)	
	<i>Candida cacaoi</i>	<i>Hansenula anomala</i> IFO 1760
0	$8.2 \times 10^7$	$6.7 \times 10^7$
5	$5.1 \times 10^4$	$3.1 \times 10^3$
10	$2.1 \times 10^3$	$4.3 \times 10^2$
15	$3.5 \times 10^2$	$3.1 \times 10$
20	$1.2 \times 10^2$	0
25	$3.7 \times 10$	0
30	0	0

水温 5℃、pH6.0、オゾン濃度0.5mg/ℓ

第7表 チョコレートケーキに接種した菌の気中でのオゾン殺菌

オゾン濃度(ppm)	菌 数 (/g)	
	<i>Candida cacaoi</i>	<i>Hansenula anomala</i> IFO 1760
0	$5.1 \times 10^4$	$7.5 \times 10^4$
0.2	$4.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^3$
0.5	$7.2 \times 10^3$	$3.5 \times 10$
1.0	$5.6 \times 10^2$	0
1.5	$3.1 \times 10$	0
2.0	0	0
5.0	0	0

処理温度 5℃、オゾン照射自動濃度調節器を使用  
処理時間30分

## 要 約

チョコレートケーキに白斑点を生成すると共に、酢酸エチルを生成する原因菌の分離・同定およびオゾン殺菌処理効果について検討を行い、次の結果を得た。

1. チョコレートケーキの製造工程で菌数が増加するのは焼き上げ工程から冷却工程中であり、細菌は $3.5 \times 10^2$ /gから $4.5 \times 10^4$ /g、また酵母菌は $3.0 \times 10$ /g以下から $1.6 \times 10^2$ /gへと増加した。

2. チョコレートケーキの白斑点の部分より酵母菌1菌株を分離し、*Candida cacaoi* と同定した。ま



た本菌は酵母YM培地で酢酸エチルを生成することを認めた。

3. 分離した *Candida cacaoi* はグルコース、シュクロース、ガラクトース、マルトースより酢酸エチルを生成した。既に本菌はガラクトースから酢酸エチルを生成し、ラフィノースから生成しない点で *Hansenula anomala* IFO 1760とは異なった。

4. 分離した *Candida cacaoi* を水中でオゾン処理（水温 5℃, pH 6.0）を行った結果、オゾン0.5mg/ℓの濃度で30分間で完全に死滅した。またチョコレートケーキに上記の菌体を  $5.3 \times 10^5$  /g 接種し、気中でオゾン処理を30分間行った結果、0.2ppm で  $4.5 \times 10^4$  /g, 0.5ppm で  $7.2 \times 10^3$  /g となり、2.0 ppm では完全に死滅した。

## 文 献

- 1) 内藤・工藤：愛知食品工試年報，24，85（1983）
- 2) 内藤：愛知食品工試年報，24，50（1983）
- 3) 内藤：愛知食品工試年報，24，76（1983）
- 4) 内藤：愛知食品工試年報，23，36（1982）
- 5) 内藤：愛知食品工試年報，23，46（1982）
- 6) 内藤・志賀：日食工誌，29，1（1982）
- 7) 内藤・三野宮：愛知食品工試年報，26，104（1985）
- 8) N.J.W.Kreger—Van Rij Groningen：The Yeast, a taxonomic study, Elsevier Science Publishers B.V. — Amsterdam（1984）