

## 解凍ケーキ中の細菌増殖抑制と迅速品質評価法の検討

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
巻/号	436
掲載ページ	p. 323-329
発行年月	2002年12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



## 報 文

## 解凍ケーキ中の細菌増殖抑制と迅速品質評価法の検討

(平成 14 年 3 月 28 日受理)

田中啓子\*<sup>1,†</sup> 竹谷光司\*<sup>1</sup> 工藤由起子\*<sup>2,3</sup>

## Inhibition of Bacterial Growth in Thawed Cake and Rapid Evaluation Methods for Microbiological Quality

Keiko TANAKA\*<sup>1,†</sup>, Kouji TAKEYA\*<sup>1</sup> and Yukiko HARA-KUDO\*<sup>2,3</sup>(\*<sup>1</sup>Nisshin Seifun Group Inc., Research Center for Basic Science: 5-3-1, Tsurugaoka, Oi-machi, Iruma-gun, Saitama 356-8511, Japan; \*<sup>2</sup>National Institute of Infectious Diseases, Department of Biomedical Food Research: 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan;\*<sup>3</sup>Present address, National Institute of Health Sciences, Division of Microbiology: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; † Corresponding author)

The inhibition of bacterial growth in thawed cake kept under refrigeration and rapid evaluation methods for microbiological quality of the cake were investigated. The effects of the freezing temperature and the addition of ethanol or emulsifier on bacterial numbers in a cake model after storage for 72 hr at 10°C following the thawing process were also studied. Bacterial growth in the cake model was inhibited by the additives under various freezing conditions. In addition, rapid evaluation methods for estimating bacterial numbers in the cake model after incubation for 72 hr at 10°C were studied. High correlations were found between bacterial numbers in the cake model incubated for 24 hr at 20°C and for 6 hr at 35°C with tryptic soy broth and that of the cake model incubated for 72 hr at 10°C. This result indicated that rapid evaluation by incubation for 24 hr at 20°C or for 6 hr at 35°C with tryptic soy broth can be used to predict the bacterial numbers in a cake model after incubation for 72 hr at 10°C. Furthermore, the ATP-bioluminescence method was applied to shorten the testing time, because culture on an agar medium was not necessary.

(Received March 28, 2002)

**Key words:** 冷凍食品 frozen food; 迅速品質評価法 rapid evaluation method; 冷凍保存 frozen storage; 添加物 additive; ATP 測定法 ATP method

## 緒 言

冷凍食品は凍結、冷凍保存、解凍の一連の過程を経て利用されるが、一部は解凍後冷蔵状態で保存・販売され、そのまま未加熱で喫食される。その微生物学的品質は、一定期間冷蔵保存後の一般生菌数などにより評価しなければならないため、品質検査には冷蔵保存期間と平板法での培養時間を合わせ数日間を要する。

仮に、微生物学的品質に問題のある食品が製造された場合、それが判明するまでの数日間、不適当な環境下で製造が続くことになり、損失が生じかねない。したがって、微生物学的品質の優れた冷凍食品を製造すること及びその冷

蔵保存後の品質を早い段階で把握することは、製造現場にとって重要である。

通常、製造後に加熱過程がない食品には、保存中の細菌増殖抑制のために抗菌作用のある添加物が用いられる。一方、0°C 以下の低温により細菌は損傷あるいは死滅し、特に細菌の生存・増殖に影響を与える物質の共存下では濃縮効果によりその作用が増大することが知られている<sup>1)~5)</sup>。

そこで、解凍後冷蔵保存して未加熱で喫食する冷凍食品としてクリーム主体のケーキをとりあげ、種々の冷凍条件と抗菌作用のある物質添加の併用が、冷蔵保存時の細菌増殖に影響を与えるか検証した。

また、微生物学的品質の迅速把握を目的として、一定の冷蔵保存条件と同等の細菌増殖量が得られる短時間の保存条件を設定し、それによる品質推定を試みた。更に、市販検査キットを用いた ATP 測定法による一般生菌数測定<sup>6)</sup>の適用可能性を併せて検証した。

† 連絡先

\*<sup>1</sup> (株)日清製粉グループ本社基礎研究所: 〒356-8511 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡 5-3-1\*<sup>2</sup> 国立感染症研究所: 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1\*<sup>3</sup> 現, 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

## 実験方法

### 1. 試料

試料には、クリームが主体であるケーキのクリーム部分を模して調製したモデル食品を用いた。配合は生クリーム60%、牛乳22%、砂糖10%、卵黄5%及び小麦粉3%とした。

ATP測定法の検討には、ブルーベリー、ストロベリー、リンゴの各フレーバーのモデル食品を調製し、上記の試料とともに用いた。

### 2. 菌株

モデル食品の細菌接種試験には、製品から分離してアピマニュアルキット（日本ビオメリュー(株)）、エンテロチューブII及びオキシファームチューブII（日本ベクトン・ディッキンソン(株)）にて同定した *Klebsiella oxytoca* (Ko-1), *Leuconostoc mesenteroides* (Lm-1), *Pseudomonas putida* (Pp-1) の3株を使用した。Trypticase soy broth (TSB) (Difco) 培地で35°C、18時間培養した各菌株の培養液を滅菌リン酸緩衝液にて希釈し、実験に用いた。

### 3. 添加物

抗菌効果のある添加物としては、エタノール（試薬特級）及びグリセリンモノカプリン酸エステル製剤のサンソフト No. 760（純度約90%、太陽化学(株)、以下乳化剤）を用いた。

### 4. 冷蔵保存したモデル食品中の細菌増殖に対する添加物及び冷凍保存条件の影響の測定方法

モデル食品に各添加物を加えてよく混合した。なお、添加量は、予備実験にて増殖量が無添加の場合と比較して100分の1程度となる量を菌株ごとに求め、その前後の量とした。すなわち、エタノールは、*K. oxytoca* 及び *P. putida* 接種には0.5, 1.0% (w/w), *L. mesenteroides* 接種には1.0, 3.0% となるように添加した。また乳化剤は、*K. oxytoca* 及び *P. putida* 接種には0.5, 1.0%, *L. mesenteroides* 接種には0.25, 0.50% となるように添加した。上記の添加物加試料に菌を $10^2$  cfu/g になるように接種して十分に混和後、10g ずつ滅菌ポリ袋に封入した。これらを-20°C, -10°C, -7°C, -5°C 及び -2°C にて1, 2, 4週間保存した。又は-10°C, 24時間保存及び-30°C, 24時間保存を10日間反復した。これら冷凍保存後のモデル食品を10°C, 72時間保存した後に滅菌リン酸緩衝液にて適宜希釈し標準寒天培地（栄研化学(株)）に塗抹後、35°C にて24時間培養し出現したコロニー数を計測し、モデル食品中の細菌数を測定した。またモデル食品に替えてTSBにおいても同様の実験を行った。

### 5. 迅速品質評価法の設定とその評価

予備実験にて、モデル食品に存在する細菌の増殖量が10°C, 72時間保存（従来法）と同程度となるようなモデル食品培養条件を検討し、迅速法として冷凍モデル食品を20°C, 24時間培養する方法（迅速法1）と、冷凍モデル食品を40°Cの湯浴にて解凍後、あらかじめ35°Cに保温

した9倍量のTSBを加えてストマッカー処理後35°C, 6時間培養する方法（迅速法2）を設定した。

従来法と迅速法1の比較には68点、従来法と迅速法2の比較には70点のモデル食品（100g）をそれぞれ用いた。各方法で培養後に、モデル食品中の一般生菌数及びセレウス菌数をそれぞれ標準寒天培地、NGKG培地（日水製菓(株)）に塗抹して、また、大腸菌群数をデスオキソコレイト寒天培地（栄研化学(株)）で混釈を行い、35°C にて24時間培養して計測した。ただし、迅速法2においては、一般生菌数の測定の際に *Bacillus* spp. のコロニーが多数出現し他細菌の測定を妨げることが頻発した。そこで、従来法での一般生菌の主である乳酸菌やグラム陰性菌の計測を行うため、乳酸菌検出のためにMRS寒天培地（Merck社）及びグラム陰性菌検出のためにCVT寒天培地（栄研化学(株)）を併用し、標準寒天培地による一般生菌数の計測が困難な際には両培地による測定値を合算したものを一般生菌数とした。なお、今回のモデル食品において、標準寒天培地上にコロニーを形成する乳酸菌及びグラム陰性菌は、それぞれMRS寒天培地及びCVT寒天培地上にほぼ同数のコロニーを形成することを確認している。

その結果得られた測定値により、従来法と迅速法1の相関、及び従来法と迅速法2の相関を評価した。

### 6. ATP測定法

-20°Cに冷凍したモデル食品100gを10°Cにて72時間保存し、含まれる細菌を増殖させた後に9倍量のリン酸緩衝液を加えてストマッカー処理したものを試料液とした。ATP量はルシフェールHSセット（キッコマン(株)）を使用して発光反応により生じた発光量をルミノメーター（東亜電波工業(株)）で測定した。また試料液の一般生菌数を常法により測定して、試験液の発光量と一般生菌数との相関を評価した。更に、*L. mesenteroides* を $10^5$  cfu/g となるように添加した各フレーバーのモデル食品と菌液無添加のものについてもATP発光量と細菌数を測定した。

## 結果及び考察

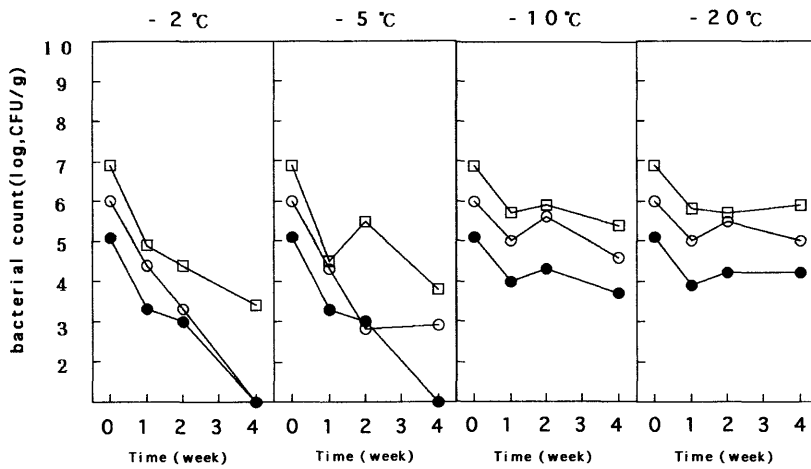
### 1. 添加物及び冷凍処理による細菌増殖抑制効果

各菌株を接種した冷凍モデル食品の解凍し冷蔵保存した後の細菌数をFig. 1とFig. 2に示した。

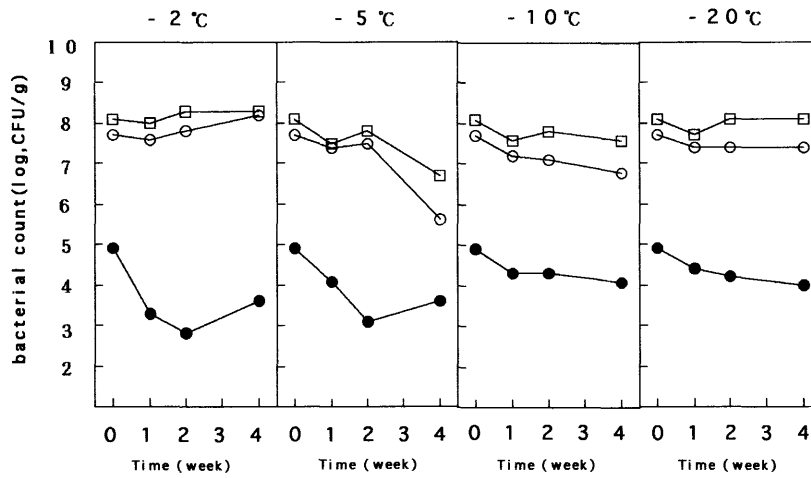
添加物を加えないモデル食品では、検討したすべての冷凍条件により *K. oxytoca* は10°C, 72時間保存中の増殖が抑制され、冷凍期間の延長に伴いその効果は増大する傾向にあり、また冷凍温度が高いほど顕著で、-2°Cでは増殖量が1,000分の1以下に減少した。一方、*L. mesenteroides* 及び *P. putida* では、いずれの冷凍条件でもその後の10°C保存中の増殖はほとんど抑制されず、特に *P. putida* は-2及び-5°C保存後、10°C保存での増殖量は増大した（Fig. 1, Fig. 2）。

エタノール存在下では、*K. oxytoca* は、エタノール1%

*Klebsiella oxytoca*



*Leuconostoc mesenteroides*



*Pseudomonas putida*

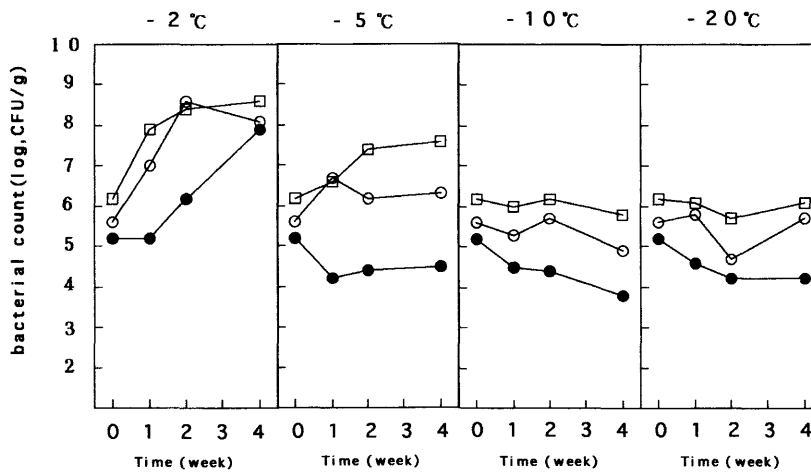


Fig. 1. Effects of freezing temperature and ethanol on bacterial growth in a cake model kept refrigerated after thawing

The limit of detection was 2 (log, CFU/g). □ Control, ○ Ethanol-1, ● Ethanol-2

*K. oxytoca* and *P. putida*: Ethanol-1; 0.5%, Ethanol-2; 1.0%

*L. mesenteroides*: Ethanol-1; 1.0%, Ethanol-2; 3.0%

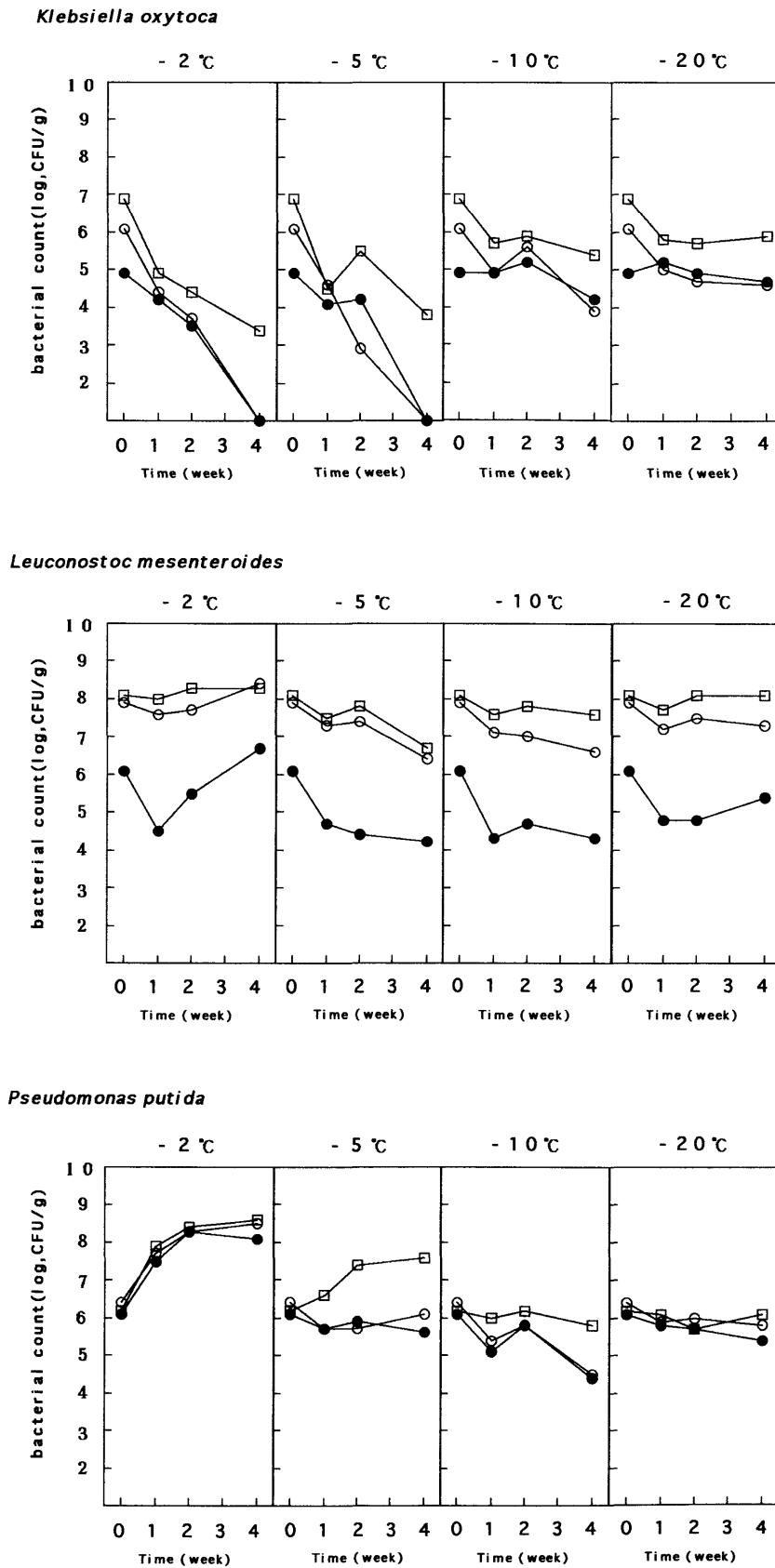


Fig. 2. Effects of freezing temperature and emulsifier on bacterial growth in a cake model kept refrigerated after thawing

The limit of detection was 2 (log, CFU/g). □—Control, ○—Emulsifier-1, ●—Emulsifier-2

*K. oxytoca* and *P. putida*: Emulsifier-1; 0.5%, Emulsifier-2; 1.0%

*L. mesenteroides*: Emulsifier-1; 0.25%, Emulsifier-2; 0.50%

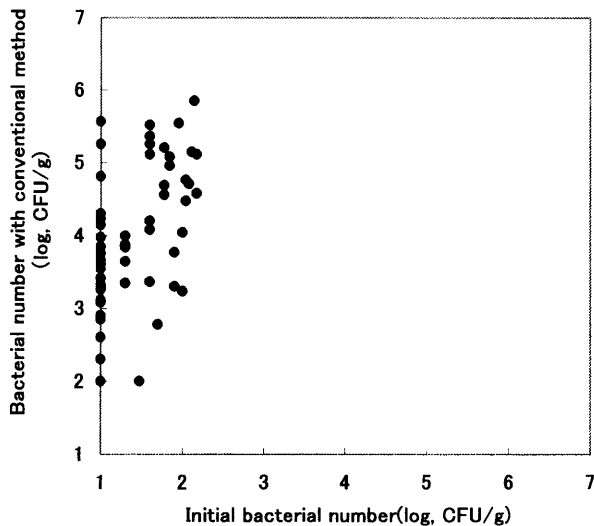


Fig. 3. Correlation between initial bacterial numbers in the cake model immediately after thawing and bacterial numbers in the cake model after incubation using the conventional method

の条件で  $-2^{\circ}\text{C}$  及び  $-5^{\circ}\text{C}$ , 4 週間保存後に,  $10^{\circ}\text{C}$  保存後の増殖量が検出限界以下となり, 冷凍とエタノールの併用効果が顕著に現れた. *L. mesenteroides* については, 他菌株よりエタノールに対する耐性が強かったため, その添加量を多くしたが, 特に 3% 添加したとき, 冷凍処理しない場合でも  $10^{\circ}\text{C}$  保存後の増殖量は大きく抑制された. 更に  $-2, -5, -7^{\circ}\text{C}$  保存及び温度変化の反復条件により増殖量は 100 分の 1 に減少したが, 保存温度が低温になるとその効果は小さくなり, 通常の冷凍条件の  $-20^{\circ}\text{C}$  では増殖量の減少は 10 分の 1 程度にとどまった. *P. putida* に対しては,  $-2^{\circ}\text{C}$  保存以外の条件でエタノールと冷凍処理の併用が増殖を抑制し, 増殖量は 10 分の 1 程度に減少した (Fig. 1).

また, 乳化剤の存在下では, *K. oxytoca* は, 0.5% 添加で, エタノールの場合と同様に冷凍との併用効果が顕著に現れた. *L. mesenteroides* は, 0.5% 添加で  $-2^{\circ}\text{C}$ ,  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-7^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ , 1 週間保存後の増殖量は 10~100 分の 1 に減少した. また *P. putida* に対しては  $-7, -10^{\circ}\text{C}$  保存及び温度変化反復条件において増殖量が 10~100 分の 1 に減少した (Fig. 2).

一方, TSB 中の細菌に対しては, モデル食品よりも冷凍処理効果, 添加物と冷凍の併用による効果は顕著に現れた. 特に *K. oxytoca* はすべての冷凍条件で  $10^{\circ}\text{C}$  保存後の増殖量が激減し, エタノール及び乳化剤との併用効果も観察された. *L. mesenteroides* 及び *P. putida* に対しても一部の冷凍条件, 又は乳化剤との併用によりそれらの増殖が大幅に抑制されたが, エタノールの併用効果については温度変化反復条件にのみ現れた.

以上, モデル食品及び TSB のいずれの場合も, 冷凍と添加物による細菌増殖抑制効果が一部の条件下で観察された. しかしながら, 特にモデル食品では, 細菌の損傷・死滅を防ぐ保護物質が多量に存在するため, モデル食品にお

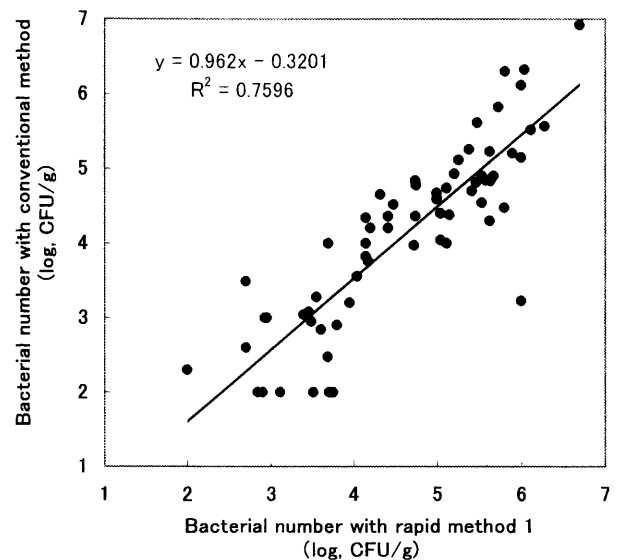


Fig. 4. Correlation between bacterial numbers in the cake model after incubation using rapid method 1 and those determined with the conventional method

ける細菌増殖抑制効果は, TSB と比較すると小さかった. 更に, 菌株によって  $-2\sim-10^{\circ}\text{C}$  の冷凍保存により受ける影響は異なり, 解凍後の増殖量が逆に増加する菌株もあったため, 多種の菌属が混在するような食品中の細菌増殖制御には応用できないものであった.

## 2. 迅速法 1 及び 2 の評価

まず, 解凍直後の一般生菌数と従来法による一般生菌数の関係を見ると, これらには相関が見られなかった. 解凍直後の一般生菌数が検出限界値以下のものが多かったため, 相関が認められなかったと考えられる (Fig. 3).

従来法と迅速法 1 により求めた一般生菌数の関係を Fig. 4 に示した. なお, ここでは, 菌数が検出限界以下の検体は検出限界の値をあてて表示し, 統計処理した. 従来法と迅速法 1 には相関係数  $r=0.87$  の高い相関性が認められた. また, 従来法と迅速法 2 の一般生菌数の関係を Fig. 5 に示したが, 従来法 1 と同様,  $r=0.83$  の高い相関関係にあった. 特に, 平板上に出現したコロニーのうち, モデル食品の微生物叢を優占するほぼ単独の *Leuconostoc* 属と思われる乳酸菌のみを計測した値において従来法と迅速法 2 には高い相関性 ( $r=0.89$ ) がみられた. ところが, 微生物叢を優占することが少なく, また複数の菌属が混在しているグラム陰性菌についてはそれらの相関性は低かった.

なお, 大腸菌群数及びセレウス菌数については, これらが検出された検体数が少数であったため, 統計的な考察を行うことはできなかった.

得られた回帰直線より, 迅速法 1 及び 2 のいずれにおいても一般生菌数が  $10^5$  cfu/g 程度以上の検体は従来法で  $10^5$  cfu/g 以上になると推定できることから, これら迅速法によって製品の微生物学的品質を迅速に把握することが可能であることが示された. ただし, 製品における一

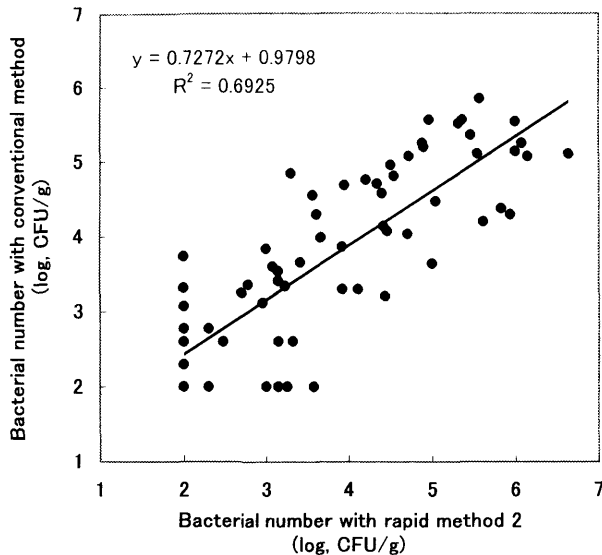


Fig. 5. Correlation between bacterial numbers in the cake model after incubation using rapid method 2 and those determined with the conventional method

般生菌数の規格基準は  $10^5$  cfu/g 以下であることから、実用上は、迅速法での一般生菌数が  $10^5$  cfu/g 付近かそれ以上である検体はその品質に問題が生じていると判断する、すなわち規格に対する適合・非適合のスクリーニングとして用いるのが適当と思われた。

更に、このモデル食品において  $10^\circ\text{C}$  と  $35^\circ\text{C}$  での増殖量に対応がみられたのは、その微生物叢の主要菌属が  $10^\circ\text{C}$  及び  $35^\circ\text{C}$  のいずれでも増殖するいわゆる低温細菌であったためと思われる。製品によって微生物叢やそれらの挙動は大きく異なるので、製品ごとに適した迅速法を検討する必要があると考えられる。

### 3. ATP 測定法の利用

細菌が増殖したモデル食品の ATP 発光量と一般生菌数との関係を Fig. 6 に示した。モデル食品中の一般生菌数が  $10^5 \sim 10^6$  cfu/g 以上であればその値を ATP 測定により推定することが可能であった。更に、プレーン以外の他フレーバーでは、プレーンとは若干の配合の違いがあるためバックグラウンドの発光量がプレーンの 10 分の 1 と少なく、 $10^4$  cfu/g 以上の一般生菌数を推定することが可能であった (Fig. 7)。このように、 $10^5$  cfu/g 付近の一般生菌数を平板法での培養時間を短縮して迅速に推定できるこの方法は有用であると思われた。

以上、今回検討した迅速法で、従来の低温培養法と平板培地の培養を合わせ製品の品質評価に 4 日間を要していたものを短縮可能であることが示された。すなわち、迅速法 1 では検査期間が 2 日間に短縮され、更に、迅速法 2 では *Bacillus* spp. の細菌が妨げとなるため ATP 測定法の適用は不適であるが、ATP 測定法をとり入れた迅速法 1、あるいは迅速法 2 により、製造翌日には製品の品質が把握できることになる。こうした製品の品質の迅速把握は、製品の細菌制御手段の実践と同様、品質の一層の向上

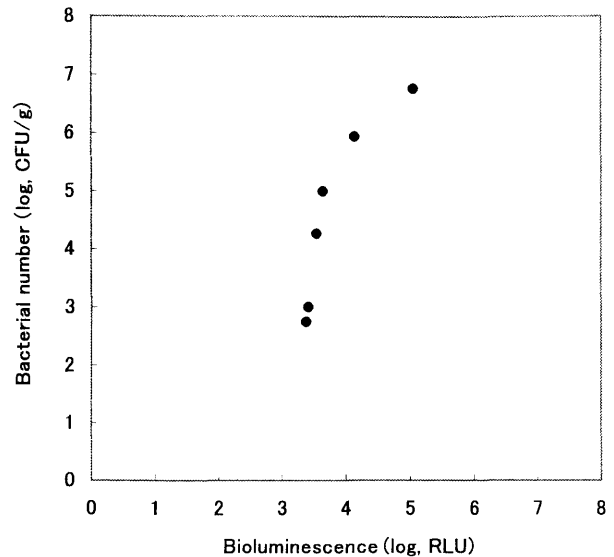


Fig. 6. Correlation between bioluminescence value found by ATP assay and bacterial numbers in the cake model

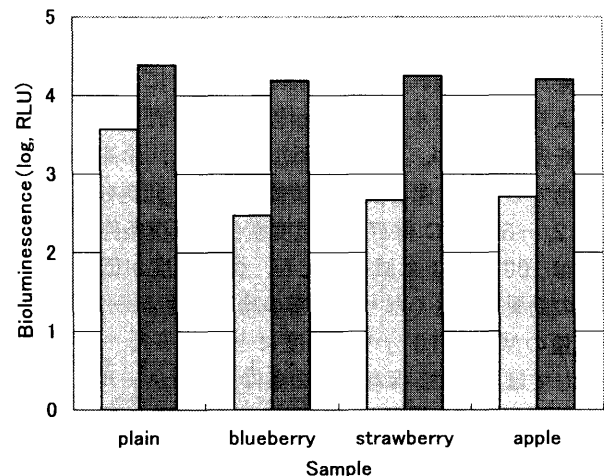


Fig. 7. Bioluminescence value determined by ATP assay in the cake model  
 □ Sample without *L. mesenteroides*; ■ Sample with *L. mesenteroides*

に当たっての選択肢の 1 つとして検討に値するものと考えられる。

### まとめ

冷凍して流通・販売され解凍後に冷蔵保存して喫食されるケーキの衛生管理を目的とし、ケーキ中の細菌増殖抑制と迅速品質評価法を検討した。モデル食品を冷凍保存した後に  $10^\circ\text{C}$ 、72 時間冷蔵保存した際の細菌数の変化について、冷凍温度及びエタノール又は乳化剤の添加の有無の影響を検証した。その結果、一部の冷凍温度において添加物使用による細菌増殖抑制が認められた。また、 $10^\circ\text{C}$ 、72 時間後の一般生菌数を予測する迅速測定法を検討した。その結果、 $20^\circ\text{C}$ 、24 時間又は TSB 中  $35^\circ\text{C}$ 、6 時間培養の 2 方法いずれとも  $10^\circ\text{C}$ 、72 時間後の一般生菌数と高い相関があり (相関係数 0.87, 0.83)、この方法により冷蔵保存

後の微生物学的品質の迅速推定が可能であった。更に、ATP-バイオルミネッセンス法を利用した一層の検査時間の短縮が可能であった。

#### 文 献

- 1) Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. eds., "The microbiological safety and quality of food, Volume I", Maryland, Aspen Publishers, Inc., 2000, p. 128-145. (ISBN 0-8342-1323-0)
- 2) Thammavongs, B., Corroler, D., Panoff, J.-M., Auffray, Y., Boutibonnes, P., Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. Lett. Appl. Microbiol., **23**, 398-402 (1996).
- 3) Takano, M., Tanihara, N., Shibasaki, I., Bacterial effect of freezing with alcohol. Reitou Oyobi Kansou Kenkyukai Kaishi, **26**, 169-175 (1980).
- 4) Veasha, M., Olson, B., Swaminathan, B., Stadelman, J., Reduction of numbers of *Salmonella typhimurium* on poultry parts by repeated freeze-thaw treatments. J. Food Sci., **46**, 1,323-1,326 (1981).
- 5) Kano, H., Yamanaka, S., Japan Tokkyo Kokoku Koho, 91018466B (Mar. 12, 1991).
- 6) Honma, S., ATP Sokuteiryougijutsu No Genjo-Fukitorikensa Kara Syokuchudokukin Kenshutsu Made (Recent trend of the method using ATP assay from a method of swabbing for sanitation control to detection of food poisoning bacteria). Japan Food Science **4**, 67-75 (2001).