

保育所給食に関する研究

2. スキムミルクで調製したヨーグルトの細菌学的研究

研究第4部

土井 正子・長澤 伸江・武藤 静子

I 実験目的

第一報に述べたようにスキムミルクヨーグルトは保育所園児によく受け入れられた。しかしスキムミルクを用いてフロッピーヨーグルトを調製し、保育所給食として供与する事は衛生的にみて安全であろうか。また実験室においては安全なものも調製されても、果して給食現場においては、衛生的なヨーグルトを作ることが可能であろうか。もし可能だとすれば、調製過程においてどのような方法、注意等が必要であるのかということについて、細菌学的に検討してみたいと考えた。

実験Aは、実験室において、フロッピーカルチャーの特徴および、でき上がったフロッピーヨーグルトの性状を知るために、ヨーグルト調製中の乳酸菌数、一般生菌数およびpHの変化を経時的に測定した。また調製したヨーグルトについて、ガス発酵、味、臭い、ホエーの状態などについて観察した。

実験Bは、保育所給食の現場において、二通りの作り方でスキムミルクヨーグルトを作り、細菌面およびpH、一般性状について比較したので報告する。

II 実験方法

1) 使用器具および材料

(1) フロッピーヨーグルトメーカー (株式会社アドバンス製) :

電子制御装置により温度を43°Cに保持する本体 (最大径190mm×高さ273mm, 重さ1.6 kg, 最大容量2ℓ) と付属の耐熱性ガラス容器

(2) 温度計 :

100°C目盛, 水銀計

(3) その他の器具 :

鍋, 泡立器, 玉しゃもじ, ハサミ, 皿

(4) フロッピーカルチャー :

1包5 g, 使用番によると、ブルガリア菌, アシドフィルス菌, サーモフィラス菌の3種を混合し、凍結乾燥した粉末状のカルチャー。保存期間は室温半年、冷蔵一年、冷凍保存二年間と記載されている。

(6) スキムミルク : 日本児童福祉給食会の児童給食用スキムミルク

2) ヨーグルトの調製方法

(1) ヨーグルトメーカーの本体に、使用番の指示通り約40°Cの湯を定量まで加えたのち、通電して温度を調整しておく。

(2) ガラス容器, 温度計, 泡立器, 玉しゃもじ, 皿に熱湯をかけて殺菌する。

(3) 鍋に約60°Cの湯を1ℓ入れて、スキムミルクを240 g 加え、泡立器で攪拌してスキムミルクをよく溶かす。

(4) (3)を加熱して80°Cで火を止め、2分位放置してスキムミルクの殺菌をする。

(5) 殺菌済の溶解スキムミルクを、ヨーグルトメーカー備え付けのガラス容器に移し、1度煮沸して冷やした水1ℓを加え、蓋をしてから水道水で約40°Cに冷やす。

(6) カルチャーの袋を切り、10 gを上記スキムミルク2ℓに加え、泡立器で泡立つまでよく混ぜ合わせる。

(7) 表面の泡を玉しゃもじで取り除く。

(8) ガラス容器を(1)に収めて発酵させる。

3) 細菌学的検査方法

(1) 培養基 ① BCP加プレートカウント寒天培地 (日本製薬株式会社)

酵母エキス……………2.5 g

ペプトン……………5.0 g

ブドウ糖……………1.0 g

ツイーン80……………1.0 g

レーシスティン……………0.1 g

ブロムクレゾールパフブルー……………0.06 g

寒天……………15.0 g

pH 6.9±0.1

上記配合の粉末培地を、水1ℓに加えて加熱溶解し、121°Cで15分間高圧滅菌する。

② 標準寒天培地 (極東製薬工業株式会社)

酵母エキス……………2.5 g

ペプトン……………5.0 g

ブドウ糖..... 1.0g

寒天.....15.0g

pH 7.1±0.1

上記配合の粉末寒天培地を、水1ℓに加えて加熱溶解し、121℃で15分間高圧滅菌する。

③ デソキシコレート寒天培地(田辺製薬株式会社)

デソキシコール酸ナトリウム..... 1.0g

ペプトン.....10.0g

クエン酸鉄アンモニウム.....2.0g

塩化ナトリウム..... 5.0g

リン酸一水素カリウム.....2.0g

乳糖.....10.0g

ニュートラルレッド..... 0.033g

寒天.....15.0g

pH 7.4±0.1

上記配合の粉末培地を、水1ℓに加熱溶解し、滅菌せずに調製当日に使用する。

(2) 検体の採取及び検査試料の調製

① ヨーグルト調製処理開始直後、1、2、3、4、5時間の計6回につき、乳酸菌数、一般生菌数、大腸菌群検査を行った。

② 検体5gを無菌的に滅菌試料ビンに取り、滅菌生理食塩水45mlを加えて50mlとし、密封してよくふりまぜ、これを10倍希釈液とした。

(3) 乳酸菌数測定法

先に述べた希釈液(2)①-②を用いて10進希釈法によって順次10⁷倍まで希釈する。次にペトリ皿を必要な枚数用意し、それぞれに各希釈試料を1mlずつ注加し、あらかじめ加温溶解後50℃に保温しておいたB.C.P加プレートカウント寒天培地約15mlを無菌的に各ペトリ皿に流しこむ。この際試料液と寒天培地がよくまざり合うように十分に混攪し、培地が完全に凝固したらペトリ皿を倒置し、ふ卵器中で37℃、72±3時間培養する。一平板に30~300個範囲の集落数が得られた希釈段階の計測数に試料希釈倍数を乗じて、検体1g当りの乳酸菌数とした。

(4) 一般生菌数測定法

乳酸菌測定法の項と同様にして10⁷倍まで希釈し、各試料1mlずつをペトリ皿に注加し、あらかじめ加温溶解後50℃に保温しておいた標準寒天培地を約15ml、無菌的に各ペトリ皿に流しこみ平板を作る。37℃ふ卵器中で48±3時間培養し、乳酸菌数測定法の項と同様にして、検体1g当りの一般生菌数を測定した。

(6) 大腸菌群測定法

10倍希釈液をペトリ皿に1mlずつ注加し、あらかじめ

加温溶解後50℃に保温しておいたデソキシコレート寒天培地を約15ml、無菌的に各ペトリ皿に流しこみ平板を作る。37℃で15~18時間培養し、乳酸菌数測定と同様にして、検体1g当りの大腸菌群を測定した。

4) pH測定

pHの測定は、日立一畑製作所のM5形pHメーターで行った。

5) 一般性状の観察

味、臭い、ガス発酵、ホエーの状態の変化について経時的に観察した。味、臭いは官能検査により、ガス発酵とホエーの分離状態は肉眼観察によった。

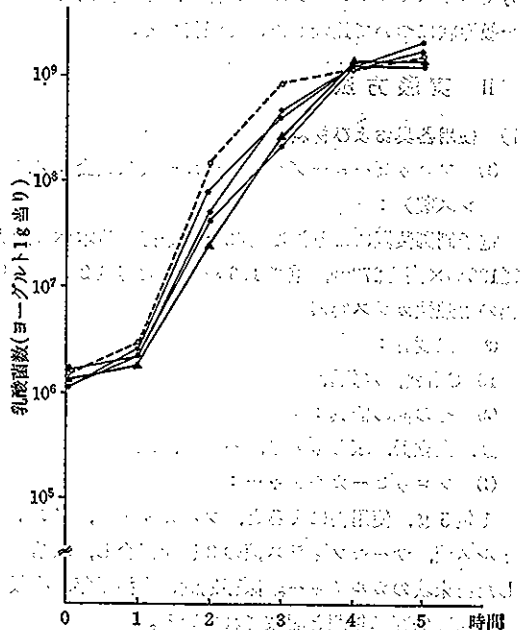
III 実験結果と考察

[実験A]

1) 乳酸菌数および一般生菌数

B.C.P加プレートカウント寒天培地を用いて測定した乳酸菌数は、ヨーグルト1g当り、0時間で10⁶個、2時間で10⁷個、4~5時間で10⁹個に増殖した(第1表および第1図参照)。使用説明書によると発酵時間は4.5時間で完了するとなっているが、本実験結果から、乳酸菌数は4時間目位から10⁸~10⁹個に増殖しており、発酵乳の規格基準である10⁷個を越えている。この点ではすぐれた品質であると考えることができる。なお市販のヨーグルトに関する報告では1g当り、2.4×10⁸~5.1×10⁸個であった。

第1図 ヨーグルト製造中の乳酸菌数の経時的変化



第1表 ヨーグルト製造中の乳酸菌数、一般生菌数、大腸菌群数、pH、

乳温の経時的変化および一般性状の観察

時 間		0	1	2	3	4	5
試 料 ①	乳酸菌数 (1g当り)	1.4×10^6	4.5×10^6	8.2×10^7	5.4×10^8	1.3×10^9	2.3×10^9
	一般生菌数 (1g当り)	1.5×10^6	4.7×10^6	8.5×10^7	5.4×10^8	1.4×10^9	2.5×10^9
	大腸菌群数 (1g当り)	0	0	0	0	0	0
	pH	6.70	6.56	6.43	5.45	4.88	4.54
	乳温 (°C)	41	43	43	43	43	43
	一般性状	ガス発酵なし、異常風味なし、ホエー分離なし					
	②	乳酸菌数 (1g当り)	1.4×10^6	3.1×10^6	4.6×10^7	3.3×10^8	1.3×10^9
一般生菌数 (1g当り)	1.8×10^6	3.5×10^6	6.7×10^7	4.0×10^8	1.1×10^9	1.7×10^9	
大腸菌群数 (1g当り)	0	0	0	0	0	0	
pH	6.71	6.66	6.59	6.01	5.10	4.70	
乳温 (°C)	40	43	43	43	43	43	
一般性状	ガス発酵なし、異常風味なし、ホエー分離なし						
試 料 ③	乳酸菌数 (1g当り)	1.8×10^6	3.2×10^6	7.2×10^7	6.8×10^8	1.1×10^9	1.2×10^9
	一般生菌数 (1g当り)	2.1×10^6	3.5×10^6	7.4×10^7	8.7×10^8	1.1×10^9	1.3×10^9
	大腸菌群数 (1g当り)	4	4	4	3	0	0
	pH	6.60	6.57	6.33	5.62	4.80	4.40
	乳温 (°C)	40	43	43	43	43	43
	一般性状	ガス発酵なし、異常風味なし、ホエー分離なし					
	試 料 ④	乳酸菌数 (1g当り)	1.2×10^6	2.4×10^6	4.0×10^7	4.3×10^8	1.5×10^9
一般生菌数 (1g当り)		1.3×10^6	2.6×10^6	5.0×10^7	6.6×10^8	1.3×10^9	1.4×10^9
大腸菌群数 (1g当り)		0	0	0	0	0	0
pH		6.65	6.60	6.42	5.86	5.02	4.54
乳温 (°C)		41	43	43	43	43	43
一般性状		ガス発酵なし、異常風味なし、ホエー分離なし					
試 料 ⑤		乳酸菌数 (1g当り)	1.5×10^6	4.5×10^6	1.7×10^8	9.4×10^8	1.2×10^9
	一般生菌数 (1g当り)	2.1×10^6	5.4×10^6	1.7×10^8	9.8×10^8	1.3×10^9	1.4×10^9
	大腸菌群数 (1g当り)	0	2	2	0	0	0
	pH	6.70	6.50	6.40	5.28	4.76	4.38
	乳温 (°C)	40	43	43	43	43	43
	一般性状	ガス発酵なし、異常風味なし、ホエー分離なし					
	平 均	乳酸菌数 (1g当り)	1.6×10^6	3.5×10^6	8.2×10^7	5.8×10^8	1.3×10^9
一般生菌数 (1g当り)		1.8×10^6	3.9×10^6	8.9×10^7	6.9×10^8	1.2×10^9	1.7×10^9
大腸菌群数 (1g当り)		1	2	2	1	0	0
pH		6.65	6.56	6.38	5.59	4.86	4.44
乳温 (°C)		40	43	43	43	43	43
一般性状		ガス発酵なし、異常風味なし、ホエー分離なし					

標準寒天培地を用いて測定した一般生菌数は、BCP
加プレートカウント寒天培地を用いて測定した乳酸菌数
とはほぼ同じ範囲であった。(第1表参照)したがってこの
標準寒天培地によって検出された一般生菌数は、大部分
が乳酸菌で他の菌が存在しているとは考えにくかった。

本カルチャーの中に含まれている乳酸菌の種類は、
ブルガリア菌、アシドフィルス菌、サーモフィラス菌の3
種類であるとなっているが、調製されたヨーグルトの中
で繁殖している菌の詳細については明らかではない。
ヨーグルトの人体に対する有益な点のひとつとして、

乳酸菌のうちのアシドフィルス菌は、胃酸および胆汁酸に対する耐性があるので、腸管に達して乳酸発酵を行うため、産生した乳酸が、大腸菌その他の腐敗菌の生育を抑制するということが言われている。また、その他の乳酸菌も大腸管内で繁殖することはできないが、ヨーグルト中に含まれていた乳酸が腸内の細菌叢に有益な影響を与えたり、含まれている抗生物質が殺菌的な働きをするという報告もある。さらにヨーグルト中の蛋白質は乳酸菌の分泌する酵素により半ば消化されているから消化吸収がよくなっていると言われている。

2) 大腸菌群について

第1表に示したように、調製した5試料のうち、2試料のデゾキシコレート寒天培地上に桃色白濁した円形平板状の集落が2~4個観察された。いずれも調製開始後、0~3時間目まで出現したが、その後は観察されず、その観察されなくなったヨーグルトをさらに1日冷蔵した後も、このような集落は検出されなかった。これらの形状は、真正大腸菌が示す集落の形状とは全く異っていたが、今回の試験では、これら桃色集落が如何なる菌であるか確認しえなかった。

大腸菌群の中には、エロバクターやクレブシエラなどのように腸内細菌ではあるが、糞便のみならず自然界にも広く分布している菌も含まれているので、大腸菌群が陽性であることが必ずしも糞便汚染を示すとは言えない。しかし一般に食品衛生上では、生の食品中の大腸菌の存在を直ちに糞便汚染と結びつけては考えないが、加熱処理済みの食品から大腸菌群を検出することは、食品の不適當な加工処理や製品の取り扱いの悪さを示す指標とされ、大腸菌群陽性すなわち、糞便汚染があったと判定することになっている。

そこで本集落も典型的な大腸菌とは考え難いが、大腸菌群測定用の培地上に得られた集落であるから、ヨーグルト調製をより衛生的に実施する上で、作業管理を衛生

的に行うことの重要性に対する警告と考えるべきであろう。なお、2~3時間目までは出現していた集落が、4時間以後には認められなくなった理由として、多量の乳酸菌類の急激な増殖に伴って生じた乳酸によるpHの低下が考えられる。すなわち、桃色集落を示す菌群が、そのような条件下では生育が阻害されたのではなかろうか。

3) pH

スキムミルク溶解時のpHは6.6~6.7にあったが、調製処理開始から5時間後の測定ではpH 4.38~4.70(第1表参照)となった。この間、液状であったスキムミルクは、3時間目に粘液状となり、4時間目に凝固していた。スキムミルク中の乳糖は乳酸菌によって乳酸発酵を受け、乳酸が産生するにつれpHは酸性になっていく。スキムミルク蛋白質の約78%を占めるカゼインは、等電点がpH 4.6にあるため、調製したスキムミルクのpHが4.6に近い4時間目に凝固が観察されている。

このヨーグルトを冷蔵し、24~48時間経過したものを測定するとpHは4.36~4.50となったが、市販のヨーグルトに関する報告にみられるpH 3.54~4.20に比較して少し高かった。これはフロッピーカルチャーを構成する各乳酸菌の配合割合によるものと思われる。

先に報告したように、乳児の果実に対する嗜好には酸味の影響が大きいと考えられるが、このスキムミルクヨーグルトの酸味は、果実のpH 2.7~6.4のほぼ中間を示し、乳・幼児にも好んで受け入れられることが伺われた。

4) ヨーグルトの性状

調製したヨーグルトの一般性状の観察は第1表に示す通りである。乳白色でなめらかな形状をもち、香りは新鮮な酸臭をおび、味は市販品と比較すると、酸味がおたやかだった。

ヨーグルトの風味は、乳酸菌がつくる乳酸、酢酸、エ

第2表 現場で調製したスキムミルクヨーグルトの調査

試料	(i) 殺菌せずに調製した場合				(ii) 殺菌して調製した場合			
	乳酸菌数	一般生菌数	大腸菌群	pH	乳酸菌数	一般生菌数	大腸菌群	pH
1	1.4×10 ⁹	1.4×10 ⁹	(-)	4.20	1.7×10 ⁹	1.7×10 ⁹	(-)	4.25
2	1.0×10 ⁹	1.1×10 ⁹	(-)	4.32	1.8×10 ⁹	1.8×10 ⁹	(-)	4.16
3	1.5×10 ⁹	1.6×10 ⁹	(+)	4.18	7.5×10 ⁸	1.0×10 ⁹	(-)	4.01
4	1.5×10 ⁹	1.7×10 ⁹	(+)	4.18	1.3×10 ⁹	1.3×10 ⁹	(-)	4.18
5	1.1×10 ⁹	1.0×10 ⁹	(+)	4.28	7.2×10 ⁸	7.2×10 ⁸	(-)	4.10
6	1.7×10 ⁹	1.9×10 ⁹	(+)	4.28	7.2×10 ⁸	1.7×10 ⁹	(+)	4.24
平均	1.4×10 ⁹	1.5×10 ⁹	(+)	4.24	1.2×10 ⁹	1.4×10 ⁹	(-)	4.16

タノール、ジアセチル、アセトイン等の微量な代謝産物に関係するといわれているが、調製したヨーグルトに異常風味は感じられなかった。これは雑菌繁殖がなく、カルチャーも良質であることを示している。また酵母や大腸菌の汚染時に観察されるガス発酵はみられなかった。その他、乳固形分が不足した場合や、均質化が不完全な場合にみられるホエーの分離もなかった。

(実験B) 現場で調製したスキムミルクヨーグルトについての調査成績を示した。スキムミルクヨーグルトの材料の配合割合は、実験室で調製したもの(実験A)と等しく、240gのスキムミルクを2ℓの湯に溶解し、10gのカルチャーを加えたものであるが、異なる点として、5%の砂糖が加えてある。

作り方は、スキムミルク、溶解するための水、泡立器、温度計、ガラス容器等を殺菌せずにヨーグルトを調製した場合(イ)と、実験室で行った実験Aと同様に加熱殺菌を留意して行った場合(ロ)の二通りの方法について、両者の細菌学的品質を比較した。

1) 乳酸菌数、一般生菌数、pH及び一般性状
乳酸菌数及び一般生菌数は、(イ)と(ロ)の両者とも、実験室で調製したヨーグルトとほぼ等しかった。pHは実験室でのものと比較するとわずかに低値を示した。これは砂糖が加わっているので、同時間であっても発酵が進んだことによるためかあるいは実験の都合上、でき上り直後のpHを測定することができなかったため、密封して24時間冷蔵庫に放置後測定したものが含まれているためと考えられた。一般性状については、いずれの試料においても、異常風味、ガス発酵、ホエーの分離は観察されなかった。

2) 大腸菌群

大腸菌群は、スキムミルク、水、容器等を殺菌せずに調製した(イ)の場合に、でき上ったヨーグルト6試料中4試料に1~10ヶ検出された。実験室同様に殺菌して調製した(ロ)の場合には、6試料中1試料から、1ヶであるが大腸菌群が検出された。しかし前述したように、いずれの試料も一般性状に変化はみられなかった。このように集団調理においては、たとえ殺菌を行って調製してもいずれかの過程で大腸菌群が混入する可能性が示唆された。八木等は、ヨーグルトにコレラ菌や大腸菌を接種すると、乳酸の作用により大体30分で死滅するが、原料乳中に大腸菌が共棲する場合には、乳酸發酵により同一酸度に達しても死滅せず、死滅に著しく長時間を要するので公衆衛生上注意が必要であると報告している。

以上の実験結果を総括すると、フロッピーヨーグルト

は、説明書通りのカルチャーの分量を使用すれば、スキムミルク溶液中に乳酸菌を加えた直後においても、乳酸菌数は 10^6 個と多量に存在して雑菌の繁殖しにくい条件を備えており、そして本実験Aで実施したフロッピーヨーグルトメーカーの説明書の「標準的な作り方」通りに作れば、雑菌の混入は殆んど認められず、乳酸菌数 $10^8 \sim 10^9$ 個、pH4.38~4.70のスキムミルクヨーグルトができ上った。しかしそのためには、ヨーグルトを調製する時に使用する器具の消毒、スキムミルクの殺菌、カルチャーを加える際の温度は 43°C 以下であること、でき上ったヨーグルトは 20°C 位に冷まして冷蔵庫に保存する等の点を守る必要がある。このことは、衛生管理を十分に行って実施した実験Aにおいても、ヨーグルト調製過程のみで、でき上りのヨーグルトにはみられなかったが、大腸菌群測定用の培地上に集落が検出されたことから明らかである。そして保育所給食の現場においては実験Bの結果からもわかるように、スキムミルクや使用器具などの殺菌消毒を行っても、大腸菌群の混入する可能性が考えられるので、その他にも、調製する人の手指の清潔、調製したヨーグルトは翌日に使いきる等の点に留意する必要がある。

IV 要 約

現場で調製したスキムミルクヨーグルトと実験室で調製したスキムミルクを用いてフロッピーヨーグルトを調製し、保育所給食として供与する事は衛生的にみて安全なことであろうか。また保育所給食の現場において、どのような点に留意して調製すればよいのかを知る目的で実験Aと実験Bを行った。

実験Aは実験室において、フロッピーカルチャーの特徴およびでき上ったフロッピーヨーグルトの性状を知る目的で、ヨーグルト調製処理開始直後、1, 2, 3, 4, 5時間目の計6回につき、乳酸菌数、一般生菌数、大腸菌群検査、pHを経時的に測定した。また調製したヨーグルトについて、ガス発酵、味、臭い、ホエーの状態等について観察した。実験Bは保育所給食の現場において、二通りの作り方でスキムミルクヨーグルトを作り、両者の細菌学的品質を比較した。その結果

- 1) ヨーグルトは調製処理開始後、3時間目に粘液状となり、4時間目に凝固していた。でき上ったヨーグルトの一般性状は、異常風味なく、ガス発酵およびホエーの分離もなかった。
- 2) BCP加プレートカウント寒天培地を用いて測定した乳酸菌数は、調製処理開始直後でヨーグルト1g当り 10^6 個と多量に存在して雑菌の繁殖しにくい条件を備えており、2時間で 10^7 個、4~5時間で 10^9 個に

増殖し発酵乳の規格基準である 10^7 個を越えていた。この点ではすぐれた品質であると考えることができよう。

3) 標準寒天培地を用いて測定した一般生菌数は、乳酸菌数とはほぼ同じ範囲にあった。すなわち一般生菌数の大部分は乳酸菌によって占められており、雑菌の繁殖は考えられなかった。

4) 大腸菌群に関しては、実験Aにおいては、調製した5試料のうち2試料のデソキシコレート寒天培地上に2~4個の集落を観察した。いずれも調製開始後、30~3時間目まで出現したが、その後は観察されず、その観察されなくなったヨーグルトをさらに1日冷蔵した後も、集落は検出されなかった。これは多量の乳酸菌類の急激な増殖に伴って生じた乳酸によるpHの低下により、このような条件下では生育が阻害されたと考えられた。しかし本集落の形状は、真正大腸菌が示す集落の形状とは全く異っていたが、(今回の試験ではこれらの集落が如何なる菌であるか確認しえなかった)大腸菌群測定用の培地上に得られた集落であるから、ヨーグルト調製をより衛生的に実施する上で、作業管理を衛生的に行うことの重要性に対する警告と考えられた。

5) 実験Bにおいては、大腸菌群は、スキムミルク・木製容器等を殺菌せずに調製したでき上りヨーグルト6試料中4試料に、1~10ヶ検出された。実験A同様に、この集落の形状は、真正大腸菌が示す集落の形状とは全く異っていたが、(今回の試験ではこれらの集落が如何なる菌であるか確認しえなかった)大腸菌群測定用の培地上に得られた集落であるから、ヨーグルト調製をより衛生的に実施する上で、作業管理を衛生的に行うことの重要性に対する警告と考えられた。

殺菌して調製した場合には、でき上りのヨーグルト6試料中1試料から、1ヶであるが大腸菌群が検出された。このように保育所給食の現場で調製した場合に大腸菌が混入する可能性が示唆された。そして、ヨーグルトを調製する時に使用する器具の消毒、スキムミルクの殺菌、カルチキを加える際の温度は43℃以下であること、でき上ったヨーグルトは20℃位に冷ましてから冷蔵庫に保存する事、調製する人の手指の清潔等に留意するとともに、調製したヨーグルトは翌日には使いきる方が安全であろう。なお本実験をするに当り、国立予防衛生研究所食品衛生部栗飯原景昭部長に御指導頂いたことを感謝する。

参考文献

- 1) 牛乳・乳製品ハンドブック 296頁 佐々木林治郎 朝倉書店
- 2) 八木他：日畜会報, 28, 2, 116~119, (1957)
- 3) 土井・武藤：「果実粥に関する研究」小児保健研究, 35, 6, 360~365, (1977)
- 4) 中西武雄他：「ヨーグルト製造法の改善に関する研究」1954年6月 日本農芸化学会東北支部大会講演
- 5) 山内邦男：「乳の栄養価値(I)」乳技協資料, 29, 2, 2~10, (1980)
- 6) 山内邦男：「乳の栄養価値(II)」乳技協資料, 29, 2, 2~10, (1980)