

包装食品の微生物変敗防止に関する研究(第31報)

小袋詰包装甘栗にみられる白色斑点の生成とその原因菌について

内藤 茂三

甘栗は一名支那栗ともいわれ、糖分が多く、小粒で鬼皮がむけやすいために焼栗に用いられている。わが国で甘栗として用いられている生栗は、中国の天津地方からの輸入品が多く、製品はつめを立てるとはじけて渋皮も一度にすぐとれる。国内産の栗では皮がむけにくいので、ほとんど中国からの輸入品を使用している。甘栗の製法は小石まじりの黒砂を加熱した中に栗を入れてかきまぜ、熱で皮がはじけないように、焼きながら水あめ等の糖類、ゴマ油を加える。このために皮につやがでるが、これが微生物の汚染の原因になっている。今回、流通過程で小袋詰甘栗に粉質の白斑の生成が認められ、酵母によるものであることを確認した。そこで、小袋詰甘栗の白斑の原因酵母の同定とその汚染経路について検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

愛知県内の甘栗製造工場で製造された半製品および製品について、白色斑点生成品および正常品を用いた。なお原材料は栗、水あめ、砂糖、ゴマ油であり、焼く工程において黒砂が用いられる。

2. 包装フィルムおよび包装方法

製品はKナイロン18 μ m/ポリエチレン40 μ m(以下KNY/PEという。)の小袋(縦20cm, 横15cm)に300gを入れた。酸素ガス透過度は7 cc/m²/24h., atm (25 $^{\circ}$ C, Dry), 透湿度は6 g/m²/24h. (40 $^{\circ}$ C, 90%RH)であった。

3. 使用培地および希釈水

(1) PDA 培地: 栄研化学製培地にクロラムフェニコール(100mgをエタノール5mlに溶解)を培地1l当たり2.5mlを添加したものである。

(2) YM 培地: ポリペプトン5g, 酵母エキス3g, 麦芽エキス3g, グルコース10g, 寒天15g, 脱イオン水1000ml, pH6.0

(3) 改良 Gorodkova 寒天培地: ポリペプトン10g, NaCl5g, グルコース1g, 寒天15g, 脱イオン水

1000ml, pH6.0

(4) 簡易合成培地: グルコース10g, KH₂PO₄1g, MgSO₄·7H₂O0.5g, CaCl₂0.1g, KNO₃0.78g, 酵母エキス0.2g, 脱イオン水1000ml, pH6.0

(5) 糖発酵試験用基礎培地: 酵母エキス4.5g, ポリペプトン7.5g, 脱イオン水960ml, BTB溶液(0.2%)40ml

(6) Wickerham 合成培地(炭素化合物同化試験用): Difco 製培地

(7) Wickerham ビタミン欠乏培地: Difco 製培地

(8) 希釈水: NaCl8.5gを脱イオン水1000mlに溶解

4. 微生物菌数の測定

試料甘栗25gを無菌的に採取し、これをホモゲナイザーカップ(500ml容)に希釈水225mlとともに入れ、ホモゲナイザーで10000rpm, 5分間磨砕し、そのホモジネート液を生菌数測定に用いた。生菌数測定にはPDA寒天培地を用いて、25 $^{\circ}$ C培養で行った。

5. 微生物の同定

酵母は飯塚ら¹⁾の方法に従って行った。

6. 落下菌および空中浮遊菌の測定

製造工場内に設定した10地点において、年間5回にわたって落下菌数および空中浮遊菌数を測定した。培地として細菌数には標準寒天培地(栄研), 酵母およびカビはPDA寒天培地(栄研)を用いた。落下菌はシャーレ(直径9.0cm)を細菌で5分間, 真菌で20分間開放して検査を行った。

空中浮遊菌の捕集はピンホールサンプラー(三基科学製)により、毎分26.5lの速度で2分間空気を吸引した。この際、サンプラーのターンテーブルの上には標準寒天培地(栄研), PDA寒天培地(栄研)を置き、この平板上に捕集した。平板に出現したコロニー数を空気53l当たりの菌数として示した。

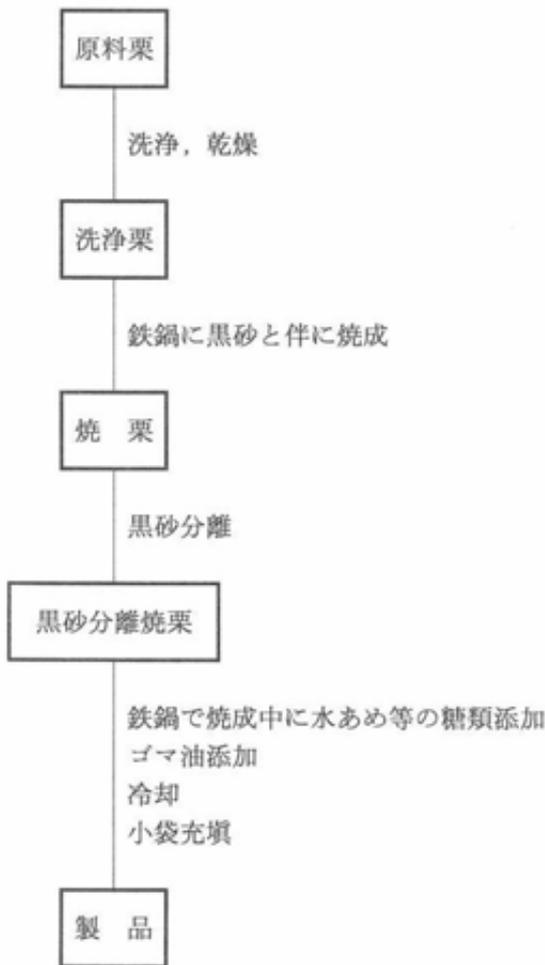
7. 甘栗の白色斑点生成の再現試験

供試菌株として、製品, 半製品, 原材料および落下菌より分離した微生物を直接甘栗に接種し、それらをKNY/PEの小袋に入れて、包装後25 $^{\circ}$ C, 7日間培養し白色斑点の出現状況を観察した。

実験結果

1. 甘栗の原料および製造工程中の微生物の変化

甘栗の製造工程を第1図に示した。また供試した原材料の微生物菌数を測定した結果を第1表に示した。細菌数は原料栗で 3.5×10^3 CFU/g (以下CFU/gを略す)と比較的少なく、鉄鍋で原料栗と焼くのに用いられる黒砂で 5.1×10^5 であった。その他水あめ、砂



第1図 甘栗の製造工程

糖, ゴマ油等の原材料からはほとんど検出されなかった。

甘栗製造工程中の微生物の変化を第2表に示した。原料栗が 3.5×10^3 であったが、洗浄することによりやや増加し、焼き工程後では $3.9 \sim 5.1 \times 10^2$ と著しく減少した。冷却から小袋に充填する工程において二次汚染菌が多いことが認められた。

2. 製造工程の落下菌および空中浮遊菌

甘栗の白色斑点生成原因菌は製造工場の落下菌および空中浮遊菌に起因すると推定されたので工場の落下菌および空中浮遊菌について測定した。その結果を第3表に示した。

甘栗の焼き工程で原料栗に付着する真菌はほぼ完全に死滅するが、焼き工程以降の冷却、充填工程において真菌の二次汚染によって変敗する例が時々見られる。今回の甘栗の白色斑点生成現象も、焼き工程以降において酵母の二次汚染を受けて変敗したものである。落下菌はいずれの工程においても細菌が多く、特に焼き、冷却、充填工程において $21 \sim 31$ CFU/5分間の落下細菌を認めた。酵母、カビについても同様にこれらの工程において多く認められた。空中浮遊菌はいずれの工程においても同数程度の細菌数(35~48 CFU/53l空気, 以下CFU/53l空気を略す)を認め、また酵母菌数もいずれの工程においても同数程度(11~21)を検出した。

これは本工場内は工程別に仕切られておらず、原料栗の置場から焼き、包装工程に至るまですべて同一空間内で行われているため、空中浮遊微生物はいずれの工程においても大きな差異は認められなかった。しかし落下菌について差異が認められたのは従業員の移動や温度の差異により空気の流れが生じ落下菌数が増加したものであると考えられる。

3. 甘栗貯蔵中における微生物菌数の変化

包装甘栗を10℃, 20℃, 30℃の温度でそれぞれ

第1表 甘栗の製造原材料の微生物

原材料	細菌	酵母	カビ
原料栗	3.5×10^3	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
黒砂	5.1×10^5	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
黒砂(加熱後)	8.2×10^3	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
水あめ	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
砂糖	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
ゴマ油	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下

菌数はCFU/g

第2表 甘栗の製造工程中での細菌および菌叢の変化

製造工程	細菌	酵母	カビ
原料栗	3.5×10^3	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
洗浄栗	6.2×10^4	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
焼栗(黒砂中)	3.9×10^2	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
黒砂分離後の焼栗	5.1×10^2	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
冷却後の焼栗	8.1×10^2	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
包装後の焼栗	1.5×10^4	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下

菌数はCFU/g

第3表 甘栗の製造工場の空中浮遊および落下微生物

製造工程	落下法			ビンホールサンプラー法		
	細菌	酵母	カビ	細菌	酵母	カビ
原料栗置場	10	2	2	35	11	3
栗洗浄工程周辺	15	3	1	38	15	3
焼き工程周辺	21	5	3	39	20	6
冷却工程周辺	31	8	5	48	21	3
充填工程周辺	25	5	2	45	15	2
包装工程周辺	20	5	1	36	10	2

落下法：細菌，CFU/シャーレ5分間開放，酵母およびカビ，CFU/シャーレ20分間開放

ビンホールサンプラー法：CFU/空気53l

80% RHで30日間貯蔵し、一定期間ごとに細菌数、酵母菌数、カビ数を測定した結果を第4表に示した。

包装直後の細菌数、酵母菌数、カビ数はそれぞれ 3.2×10^2 、 3.0×10^2 以下、 3.0×10^2 以下であった。貯蔵5日後では細菌数、酵母菌数、カビ数は10℃、20℃、30℃貯蔵では包装直後とほとんど変化しなかったが、貯蔵10日後では20℃、30℃貯蔵で細菌数がそれぞれ 1.4×10^3 、 7.4×10^3 となり、やや増加した。

また貯蔵30日後では細菌数、酵母菌数、カビ数は10℃貯蔵ではそれぞれ 5.4×10^3 、 8.2×10^4 、 3.0×10^2 以下となり、20℃貯蔵ではそれぞれ 3.1×10^3 、 4.1×10^5 、 3.0×10^2 以下となり、30℃貯蔵ではそれぞれ 1.4×10^4 、 1.2×10^3 、 3.0×10^2 以下となった。

10℃および20℃貯蔵では細菌の増殖は遅く、酵母の増殖が早い。また30℃貯蔵においては細菌の増殖は早い、酵母の増殖は遅いことを認めた。特に10℃およ

第4表 甘栗貯蔵中の微生物の変化

貯蔵期間(日)	白色斑点生成温度(℃)	膨張度(℃)	細菌			酵母			カビ		
			10℃	20℃	30℃	10℃	20℃	30℃	10℃	20℃	30℃
5	無	無	3.5×10^2	4.6×10^2	5.2×10^2	3.0×10^2 以下					
10	無	無	3.7×10^2	1.4×10^3	7.4×10^2	3.5×10^2	5.1×10^2	3.0×10^2 以下			
15	無	無	5.2×10^2	1.7×10^3	8.1×10^2	8.0×10^2	4.1×10^2	3.3×10^2	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
20	20	20	8.1×10^2	2.1×10^3	9.5×10^2	2.0×10^3	1.2×10^4	5.7×10^2	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
25	10, 20	10, 20	2.8×10^3	2.9×10^3	1.2×10^4	6.0×10^4	2.1×10^5	8.0×10^2	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下
30	10, 20	10, 20	5.4×10^3	3.1×10^3	1.4×10^4	8.2×10^4	4.1×10^5	1.2×10^3	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下	3.0×10^2 以下

包装直後の菌数：細菌， 3.2×10^2 CFU/g，酵母， 3.0×10^2 以下 CFU/g，カビ， 3.0×10^2 以下 CFU/g

貯蔵湿度：80% RH

び20℃貯蔵では貯蔵期間の延長とともに酵母の増殖が著しいことを認めた。カビは全く検出されなかった。

なお白色斑点の生成はいずれの温度で貯蔵しても15日までは認められず、20℃の貯蔵で20日後に、10℃の貯蔵で25日後に認められた。

また膨張現象も同様にいずれの温度で貯蔵しても15日までは認められず、20℃の貯蔵で20日後に、10℃の貯蔵で25日後に認められた。

4. 包装甘栗の白色斑点生成

4.1 白色斑点生成状況

先に述べたとおり包装後20℃、20～30日貯蔵で白色斑点生成がみられた。その生成状況を写真1に示した。白色斑点は表面にのみ生成し、腐敗臭はなくエステル臭の生成が認められた。一般に酵母による食品汚染は、細菌による場合ほど顕著な変質を引き起こすことは少ないが、食品中での増殖に伴いその品質や風味の低下を引き起こすことがある。酵母による食品汚染の中でも、主に問題となるのが *Hansenula* 属の酵母に



写真1 白斑が生成した甘栗

よって引き起こされる酢酸エチル臭（シンナー臭）^{23)~25)}、*Debaryomyces*属や*Candida*属の酵母によって引き起こされるスチレン臭^{26)~28)}等の異常臭の発生である。また、製品に白粉状又は粘液状の酵母が付着し、外観を損なったり、炭酸ガスやエチルアルコールの発生によって包装容器が膨張する場合もあるが、これらはいずれもその製品の商品価値を下げるものであり、製品上の問題点となっている。これらはいずれも酵母の二次汚染によるものと考えられた。

4.2 微生物の分離・同定

白色斑点が生成した甘栗より3菌株の細菌 (No.1～3, 細菌数 2.7×10^3)、2菌株の酵母 (No.4～5, 酵母数 4.1×10^5) が検出された。また正常品より3菌株の細菌 (No.1～3, 細菌数 1.2×10^3) が検出された。

これら白色斑点生成品および正常品から分離した微生物の結果を第5表に示した。

白色斑点生成品および正常品より3菌株の細菌を分離したが、そのうち *Micrococcus* 2菌株 (No.1～2)、*Bacillus* 1菌株 (No.3) であった。これらの細菌は、いずれも白色斑点生成部分からはほとんど検出されず、またこれらの菌を甘栗に接種して貯蔵しても白色斑点の生成はみられなかった。このことから直接的な変敗原因菌ではないと考えられる。

白色斑点の生成がみられた甘栗より2菌株の酵母を分離したが、これらの菌を甘栗に接種して、それらをKNY/PEの小袋に入れて、包装後25℃、7日間培養し白色斑点の出現状況を観察した結果、いずれの菌においても白色斑点が生成した。また、甘栗工場より分離した落下酵母 (3菌株, No.6～8) についても、同様に白色斑点の生成が認められた。

これら5菌株の酵母をPDA寒天培地で培養して顕

第5表 白色斑点生成および正常品からの微生物の分離

分離菌No.	標準寒天平板での形態	菌数 (CFU/g)		菌種
		白色斑点生成品	正常品	
1	白色粘ちょう	1.2×10^3	4.5×10^2	細菌 細菌 細菌
2	灰白色広がる	7.0×10^2	3.5×10^2	
3	白色広がる	8.0×10^2	4.0×10^2	
4	白色盛り上がる	3.5×10^5	—	酵母 酵母
5	白色円錐形	6.0×10^4	—	
総菌数		4.1×10^5	1.2×10^3	

—: 検出せず

顕鏡により観察した結果、いずれも *Candida* 型の偽菌糸を形成した。No 4 と No 6 の菌株の偽菌糸を写真 2 ～ 3 に示した。なお甘栗工場より分離した落下酵母 (3 菌株, No 6 ～ 8) は形態的にはほぼ同じであった。

分離した酵母の形態的特性を検討した結果を第 6 表に示した。YM 寒天培地および PDA 寒天培地での生育

はいずれも菌株 (No 4 ～ No 8) も良好であり、白色で円形の集落を形成した。またいずれの菌株においても皮膜を形成した。No 4 ～ No 6 の菌株を PDA 寒天培地を用いて 20℃ で 7 日間培養した後の顕鏡写真を写真 4 ～ 6 に示した。

分離した酵母の生理的特性を検討した結果を第 7 表

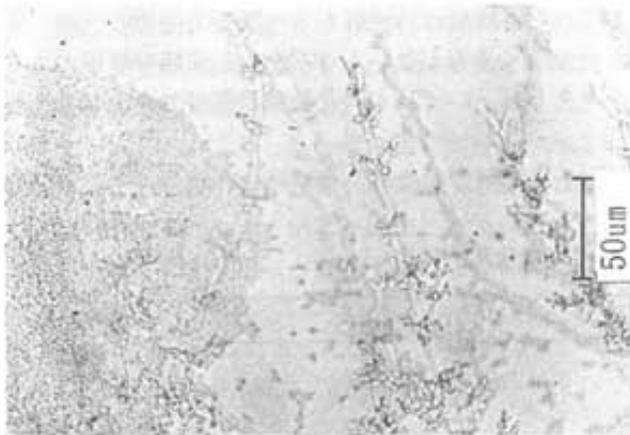


写真 2 甘栗より分離した酵母の偽菌糸 (No 4)

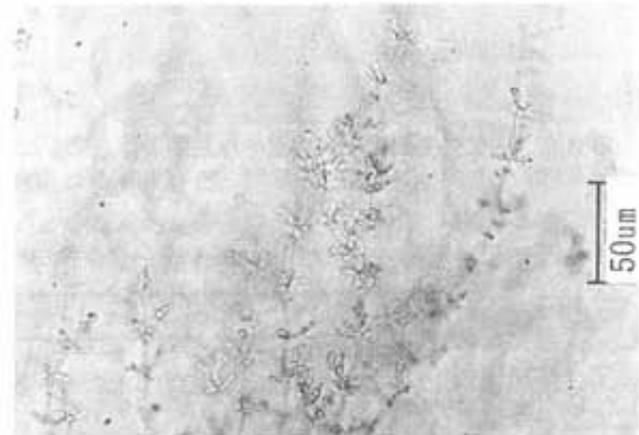


写真 3 包装甘栗製造工場の空中浮遊菌より分離した酵母の偽菌糸 (No 6)

第 6 表 甘栗の白色斑点生成菌の形態的性質

	No 4	No 5	No 6	No 7	No 8
YM 寒天培地での形態	白色, 円形 平滑, 乾燥				
PDA 寒天培地での形態	白色, 円形 粒状, 乾燥				
偽菌糸	<i>Candida</i> 型				
皮膜の形成	有り	有り	有り	有り	有り

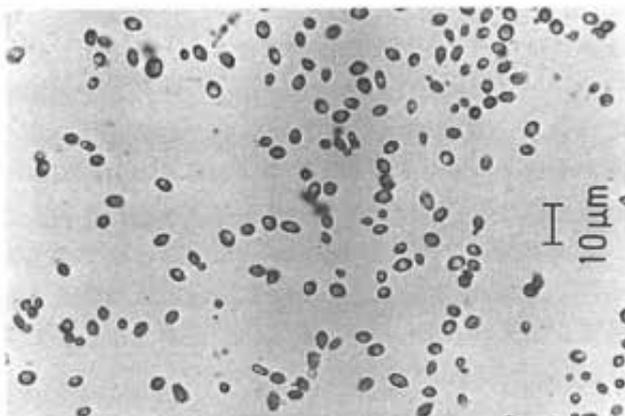


写真 4 甘栗より分離した酵母 (No 4)

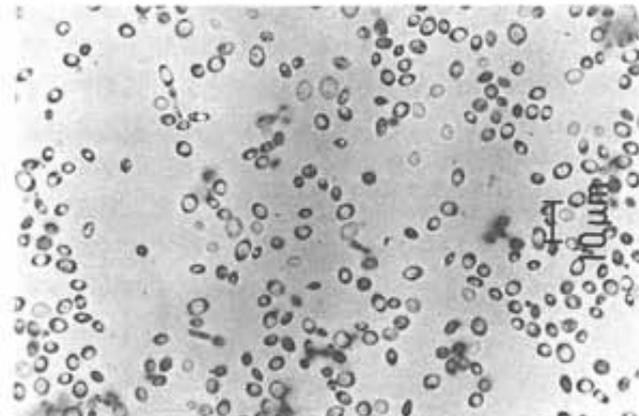


写真 5 甘栗より分離した酵母 (No 5)

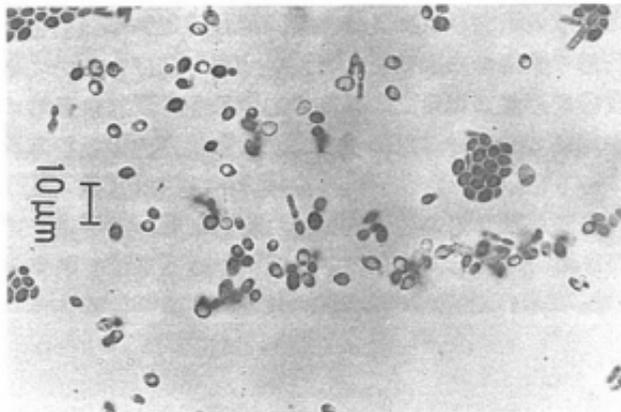


写真6 包装甘栗製造工場の空中浮遊菌より分離した酵母 (No.6)

に示した。いずれの菌株も硝酸塩資化性、アルブチン分解、ガス発生、エステル生成、でんぷん分解、ウレアーゼ活性は陽性であった。糖類の発酵性は多くの糖で見られ、また糖類の同化性はグルコース、シュクロース、ガラクトース、ラフィノース、トレハロース、セロビオース、ラムノース、グリセロール等に認められた。

これらの酵母はいずれも5~25℃で生育し、25℃以上では全く生育しないところから低温性の酵母であると考えられ、いずれも同じ種類の酵母であると考えられた。

以上の結果から今回、甘栗の白色斑点の生成原因菌

第7表 甘栗の白色斑点生成菌の生理的性質

	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8
硝酸塩資化性	+	+	+	+	+
アルブチン分解	+	+	+	+	+
ビタミン要求性	+	+	+	+	+
子嚢胞子の形成	-	-	-	-	-
ガス発生	+	+	+	+	+
エステル生成	+	+	+	+	+
ウレアーゼ活性	+	+	+	+	+
でんぷん分解性	+	+	+	+	+
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	-	-	-	-	-
ラフィノース	+	+	+	+	+
メリビオース	-	-	-	-	-
トレハロース	-	-	-	-	-
炭水化物の同化性					
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	-	-	-	-	-
ラフィノース	+	+	+	+	+
メリビオース	-	-	-	-	-
トレハロース	+	+	+	+	+
セロビオース	+	+	+	+	+
キシロース	-	-	-	-	-
アラビノース	-	-	-	-	-
リボース	-	-	-	-	-
ラムノース	+	+	+	+	+
グリセロール	+	+	+	+	+
エリスリトール	-	-	-	-	-
クエン酸	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	-	-	-
生育温度(YM培地, ℃)					
40	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+

+ : 陽性, - : 陰性

は、工場の浮遊菌から検出された *Candida curosa* と同定した。

考 察

甘栗製造工程の微生物的变化を調べた結果、原料栗には細菌 3.5×10^3 、わずかな酵母とカビが存在するが、焼成工程でかなり減少し (細菌: 3.9×10^2)、黒砂との分離、冷却、包装工程で二次汚染を受けて増加する (細菌: 1.5×10^4)。

プラスチック小袋詰した製品を長期間貯蔵すると甘栗の表面にかかっている糖類が細菌により資化され、ゴマ油が酸化されることにより袋内が嫌氣的になり、酵母が増殖しやすくなる。甘栗の白色斑点の原因微生物は工場の空中浮遊および落下菌である酵母であり、*Candida curosa* であった。この酵母は低温性でいずれも $5 \sim 25^\circ\text{C}$ で生育し、 25°C 以上では全く生育しなかった。

Candida curosa は多極出芽、細胞は球形から円筒伸長形であり、偽菌糸を常に形成し、真菌糸や厚膜胞子を形成する。また糖類の発酵性を有し、酸化性資化を行う。このため甘栗の表面に白色斑点として増殖したと考えられる。本菌は低温性の酵母であり 25°C を超えると増殖が停止される。このため $25 \sim 30^\circ\text{C}$ で貯蔵すると白色斑点は生成しないが、細菌の増殖により香気が変化する。品質および外観を良好に保つためには比較的低温に保存しておく必要がある。

従来栗の貯蔵には、収穫直後、二硫化炭素による燻蒸を施した後、木屑中に埋没して $0 \sim 2^\circ\text{C}$ の冷蔵庫内に貯蔵すれば、長期にわたり品質および外観ともに良好な状態で貯蔵できるといわれている。しかし冷蔵した場合は、ポリフェノールによる暗紫色斑点が多発することが経験的に知られている。常温で貯蔵すればポリフェノールによる暗紫色斑点は生成しないが、多くが腐敗する。

甘栗の場合は、加熱しているため冷蔵してもポリフェノールによる暗紫色斑点は生成せず、また微生物の増殖も抑制される。しかし、今回の甘栗の白色斑点の原因である *Candida curosa* は低温でも増殖するため、長期にわたって貯蔵すると白色斑点が生成すると考えられる。本菌の汚染源は工場の空中浮遊および落

下菌であるため、工場を清掃および種々の方法で殺菌することができれば、甘栗の白色斑点生成は減少すると考えられる。工場では、清掃、殺菌後、夜間のみ工場内をオゾン処理することにより甘栗の酵母による白色斑点生成を防止することが可能となった。

要 約

1. 包装甘栗に生成した白色斑点原因微生物を調べるため、原材料および製造工程中の半製品、製品の微生物を測定した結果、原料栗に 3.5×10^3 CFU/g の細菌が検出された。焼成後の栗からは 3.9×10^2 CFU/g の細菌が検出され、酵母やカビは検出されなかった。冷却および包装工程において細菌が増加することを認めた。

2. 包装甘栗の製造工場の空中浮遊および落下微生物を測定した結果、甘栗の白色斑点生成に関与する微生物として *Candida* 属の酵母が原料栗置場から包装工程にいたるまですべての工程で検出された。特に冷却工程に多いことを認めた。

3. 白色斑点が生成した甘栗より 3 菌株の細菌 (No 1~3, 細菌数 2.7×10^3 CFU/g)、2 菌株の酵母 (No 4~5, 酵母数 4.1×10^5 CFU/g) が検出された。また正常品より 3 菌株の細菌 (No 1~3, 細菌数 1.2×10^3 CFU/g) が検出された。白色斑点生成に関与する微生物は、甘栗工場の空中浮遊および落下酵母である *Candida curosa* と同定した。また本菌は 25°C 以下でのみ生育する低温性酵母であった。

4. 防止対策としては、工場の清掃および種々の殺菌 (オゾン等) すること、製品を低温で保存すればある程度、品質および外観を保持できると考えられる。

文 献

- 1) 飯塚 広, 後藤昭二: 酵母の分類同定法, p 1~74, 東京大学出版会 (1969)
- 2) 内藤茂三: 愛知食品工試年報, 23, 36-45 (1982)
- 3) 萩島太一: 食品と微生物, 3, 115-117 (1986)
- 4) 内藤茂三: 愛知食品工試年報, 27, 61-68 (1986)
- 5) 萩原 博, 大河内卓士, 山口英明, 島田邦夫, 木村英二, 安井陽子: 食品衛生研究, 42, 73-80 (1992)
- 6) 内藤茂三: 未発表