

## 薬剤共存下の加熱殺菌処理によるういろうの変敗防止

南場 毅・伊藤元貞\*

著者ら<sup>1)~2)</sup>は水ようかんの変敗防止に対して、餡、砂糖及び寒天などの加熱混合の際、混合液のpHを5.5に調整するとともにエタノールを1~2%添加することにより変敗微生物菌数が減少し、保存性が向上することを報告した。

一方、ういろうも微生物汚染を受けやすく、日持ちの向上が課題となっている。ういろうの微生物による変敗の防止をはかるため、まず、変敗したういろうなどから*Bacillus*を分離、同定し、さらに*Bacillus*孢子懸濁液のエタノールやアスコルビン酸などの薬剤共存下における加熱殺菌特性を調べ、それらの結果に基づいて、ういろうの殺菌、保存に関する実用試験を行ったので報告する。

## 実験方法

## 1. 使用した薬剤及び分析方法

薬剤としては、エタノール(99.5% w/v)、L-(+)-アスコルビン酸及びポリリジンは試薬特級、しらこ蛋白は上野製菓(株)製、ショ糖脂肪酸エステルは三菱化成食品(株)製P-1670、グルコノデルタラクトンはフジグルコン(藤沢薬品工業(株)製)を用いた。Brixは糖度計((株)アタゴ製)、水分活性はAwメーター(ロトロニック(株)製)を用いて測定した。

## 2. 供試菌株、菌株の同定及び生菌数の測定

菌株の*Bacillus* strain No. 1(水ようかん)、*Bacillus* strain No. 2(ういろう)、*Bacillus* strain No. 3(ういろう)、*Bacillus* strain No. 4(ういろう)、*Bacillus* strain No. 5(米粉)、*Bacillus* strain No. 6(米粉)、*Bacillus* strain No. 7(加糖あん)、*Bacillus* strain No. 8(抹茶)はそれぞれの食品から分離(かっこ内は分離源)して用いた。各菌株は形態学的及び生理的試験<sup>3)</sup>を行い、Bergey's, manual 8th<sup>4)</sup>に従って同定した。

生菌数は希釈平板培養法により測定してCFU(Cell Forming Unit)/g(mℓ)またはLog CFU/g(mℓ)で表した。

3. *Bacillus* 孢子懸濁液の殺菌試験

前報<sup>5)</sup>と同様、供試*Bacillus*の前培養液を芽胞形成

培地に滴下して塗抹し、30℃、24時間培養後、菌苔を集めて磷酸緩衝液に懸濁させた。懸濁液は沸騰水中で10分間加熱後、濾紙(No. 5A)で濾過して栄養細胞を除去し、遠沈させて孢子懸濁液を調製した。孢子懸濁液は10<sup>5</sup>レベルに希釈して5mℓずつ試験管に分注して、各種薬剤を添加してシリコ栓で封した後、沸騰水中で加熱処理し、生残菌数を測定した。加熱中にエタノールの逸散が考えられるが、今回は特にそれ以上の防止方法は行わなかった。

エタノールを共存させた試験では、供試菌胞子の耐熱性が異なるため、*Bacillus* strain No. 1及びNo. 6は60分間、*Bacillus* strain No. 2, 3, 7は30分間、*Bacillus* strain No. 4, 5, 8は10分間と加熱処理時間を変えて行った。

4. 走査型電子顕微鏡による*Bacillus* 胞子の損傷の観察

前報<sup>5)</sup>に従って*Bacillus*の胞子を滅菌磷酸緩衝液に懸濁させ、加熱処理後、遠心沈殿させた菌体をポリリジン膜に滴下させ、グルタルアルデヒドで2時間固定させた。さらにエタノール洗浄、臨界点乾燥した後、金を蒸着させて走査型電子顕微鏡で観察した。

## 5. ういろうの殺菌、保存試験

実験室におけるういろうの試作試験は石田ら<sup>6)</sup>の報告を参考にして表1に示す原料配合で行った。使用した原材料はロール粉(吉村穀粉(株)製)、小麦澱粉(グリコ栄養食品(株)製)、グラニュー糖(市販品)を用いた。

試作及び殺菌方法は図1に示す方法で実施した。すなわち、グラニュー糖を溶解後、グルコノデルタラクトン、

表1 殺菌試験用ういろうの原料配合

	対照区	L-アスコルビン酸区	グルコノデルタラクトン区
米粉(ロール粉) (g)	14	14	14
小麦でん粉 (g)	7	7	7
グラニュー糖 (g)	24	24	24
水 (mℓ)	55	55	55
孢子懸濁液* (mℓ)	1	1	1
L-(+)-アスコルビン酸 (mg)	0	100	0
グルコノデルタラクトン (mg)	0	0	150
エタノール(99.5%W/V) (mℓ)	0	3	3

\* *Bacillus* stain No.1 孢子懸濁液 1.0×10<sup>5</sup>/mℓ

\*太田油脂(株)

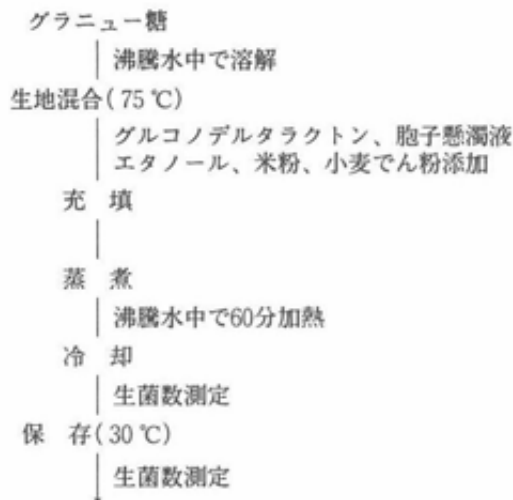


図1 ういろうの試作工程及び保存試験

胞子懸濁液、エタノール、米粉、小麦澱粉をそれぞれ順次添加して溶解、懸濁後、ケーシングチューブに充填、沸騰水中で60分間加熱し、加熱直後と30℃で保存後の生残菌数を測定した。

工場試験では米粉10kg、でんぶん4kg、砂糖14kg、水25kgを釜にいれ攪拌、練り上げて容器に充填し、強い蒸気で蒸し上げてういろうを試作した。

### 実験結果及び考察

#### 1. 市販ういろうの生菌数などの測定結果

ういろうの生菌数（保存前後）、Brix、Awと使用した米粉の生菌数の測定結果を表2に示した。初発菌数はいずれも300以下/gであったが、保存中にNo. 1以外の試料では生菌数の増加が認められ、特にNo. 2、No. 6では1gあたり $10^9$ /gレベルにまで増加し、また、No. 2からNo. 7までの6試料で寒天上に*Bacillus*と思われるコロニーが検出された。

さらに、原料米粉の生菌数を測定すると1gあたり $10^3$ から $10^5$ レベル検出された。ういろう製造時に加熱殺菌されても細菌が残存していたためか、保存中に再び増加して変敗、離水の原因となるのではないかと考えられた。*Bacillus* strain No. 2とNo. 3を分離したういろうを製造した工場の空中落下菌からも*Bacillus*が検出され、汚染の原因の一つと考えられた。

ういろうのBrixは46から49、Aw値が0.93から0.95の測定結果が得られ、いずれの試料も細菌の増殖が可能な数値であった。

表2 市販の黒糖ういろう\*の分析結果

試料	生菌数 (CFU/g)			Brix	Aw
	米粉**	初発	保存後***		
No.1	$3.0 \times 10^4$	300以下	300以下	46.0	0.95
No.2	$4.0 \times 10^4$	300以下	$7.0 \times 10^9$	46.5	0.94
No.3	$3.0 \times 10^5$	300以下	$4.0 \times 10^4$	49.8	0.94
No.4	$8.0 \times 10^4$	300以下	30	46.0	0.94
No.5	$1.0 \times 10^3$	300以下	100	47.0	0.94
No.6	$1.0 \times 10^5$	300以下	$4.0 \times 10^9$	47.0	0.94
No.7	$6.0 \times 10^3$	300以下	$10^8$	48.0	0.94
No.8	$4.0 \times 10^4$	300以下	300	47.0	0.93
No.9	$8.0 \times 10^4$	300以下	300	49.0	0.93

\*黒糖ういろう：市販品

\*\*米粉：黒糖ういろうの使用粉

\*\*\*保存条件：30℃、15日

#### 2. ういろうなどからの*Bacillus*の分離、同定

ういろうなどから分離した8菌株とも標準寒天培地上でシワのある灰白色円形のコロニーでグラム染色、カタラーゼ反応ともに陽性の桿菌であり、いずれも*Bacillus*と考えられた。それらのうち、*Bacillus* strain No. 1, 2, 3の3菌株について形態学的、生理的性質を検討した結果を表3に示した。その結果、*Bacillus* strain No. 1とNo. 3の大きさはそれぞれ $0.8 \times 2.0 \mu\text{m}$ と $0.8 \times 2.2 \mu\text{m}$ で硝酸塩還元試験陽性、7%食塩下で生育できた。両菌ともBersey's manual 8th<sup>4)</sup>により*Bacillus subtilis*と同定した。

一方、*Bacillus* strain No. 2は大きさ $0.5 \sim 0.7 \times 2.0 \sim 2.5 \mu\text{m}$ で硝酸塩還元試験陰性、TAA培地で45℃で生育せず、また7%食塩下で生育しないとの結果を得たが、

表3 分離菌株の形態学的及び生理的性質

測定項目	No. 1	No. 2	No. 3
大きさ ( $\mu\text{m}$ )	a	b	c
運動性	+	+	-
胞子	+	+	+
グラム染色	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+
V-P反応	+	+	+
メチルレッド試験	-	+	-
メチレンブルー試験	-	-	-
インドールの生成	-	-	-
H <sub>2</sub> Sの生成	-	-	-
でんぶんの分解	+	+	+
クエン酸利用	+	+	+
硝酸塩還元	+	-	+
ウレアーゼの利用	+	+	+
アセトインの産生	+	+	+
ゼラチンの液化	-	-	-
7%食塩での生育	+	-	+
酸素に対する態度	+	+	+
グルコースからの酸生成	+	+	-

a:  $0.8 \times 2.0$  b:  $0.5 \sim 0.7 \times 2.0 \sim 2.5$  c:  $0.8 \times 2.2$

+ : 陽性 - : 陰性

他の5菌株の場合と同様、同定するには到らなかった。

### 3. 各種薬剤の共存下における *Bacillus* 孢子懸濁液の殺菌

エタノールの共存下における分離菌株の孢子懸濁液に関する殺菌試験の結果を図2に示した。*Bacillus* strain No. 4ではエタノールの添加によって殺菌効果がやや高まったが、その他の菌株の孢子懸濁液では無添加区と比べて菌数の減少において大きな差は認められなかった。また、*Bacillus* strain No. 1においてエタノールの添加量を20%まで増加させて殺菌試験を行ったが、菌数の減少は5%添加の場合とほとんど変わらない結果であった。

エタノール以外の薬剤の共存下における加熱殺菌効果の結果を図3に示した。その結果、無添加区の1gあた

り Log CFU/ml が 5.8 に対して L(+)-アスコルビン酸添加区は 4.3、ポリリジン添加区は 4.5 となり、やや殺菌効果が認められた。しよ糖脂肪酸エステル、L-アスコルビン酸ナトリウム及び、しらこ蛋白製剤の添加効果は微弱であった。

やや殺菌効果が認められた L(+)-アスコルビン酸の殺菌効果を *Bacillus* strain No. 1 と No. 3 両菌について、250~1000ppm まで添加量を変えてさらに検討した(図4)。*Bacillus* strain No. 1 では初発の Log CFU/ml が 6.45 に対して無添加区が 5.34 となり、これに対して 500ppm 添加では Log CFU/ml が 2.78、750ppm 以上では 1 以下と著しい殺菌効果が得られた。

*Bacillus* strain No. 3 は初発 Log CFU/ml が 8.18、無添加区が 6.64 に対して 250ppm 添加区で 5.57、500ppm 添加区で 5.15、1000ppm 添加区で 3.80 を示し、添加量が増すほど有効であり、両菌とも殺菌効果が認められた。なお、加熱処理によって pH の変動がみられ、初発と無添加区では pH 7.0 であったが、L(+)-アスコルビン酸の 250ppm 添加区は pH 6.75 が 6.82 に変動した。同様に、加熱処理により、500ppm 添加区は pH 6.38 が 6.51 に、750ppm 添加区は pH 5.82 が 5.95、1000ppm 添加区は pH 4.87 が 5.38 と変動した。

次に懸濁液の pH が加熱殺菌処理に及ぼす影響について磷酸緩衝液の pH を変えて試験した結果を図5に示した。その結果、pH を酸性すなわち 5.5 以下にすると強い

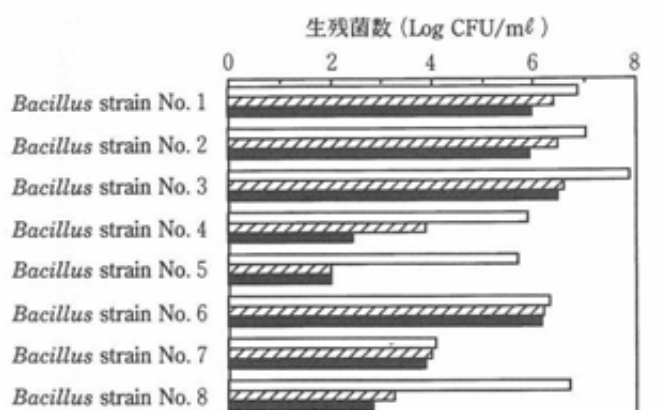


図2 *Bacillus* 孢子の加熱殺菌に及ぼすエタノールの影響

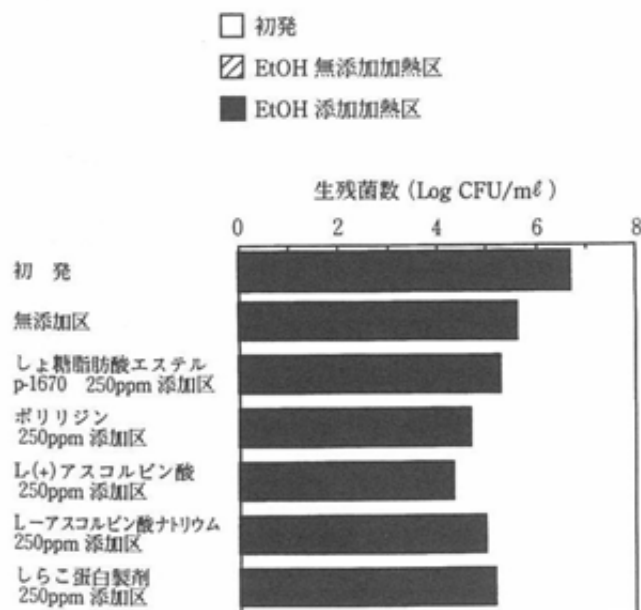


図3 *Bacillus* 孢子の加熱殺菌に及ぼす各種薬剤の影響 (*Bacillus* strain No. 1, 加熱条件 沸騰水中, 60分)

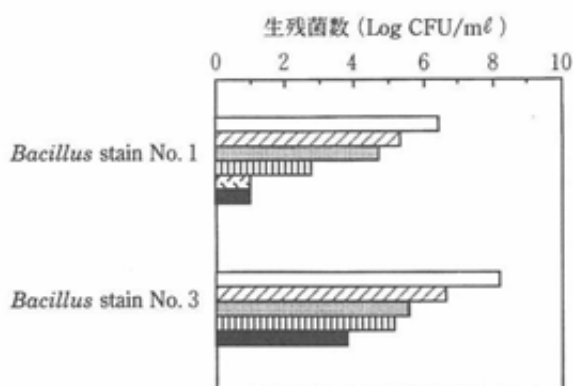


図4 *Bacillus* 孢子の加熱殺菌に及ぼす L(+)-アスコルビン酸の影響 (加熱条件 沸騰水中, 60分)

- 初発
- ▨ 無添加区
- L(+)-アスコルビン酸250ppm 添加区
- ▤ L(+)-アスコルビン酸500ppm 添加区
- ▥ L(+)-アスコルビン酸750ppm 添加区
- L(+)-アスコルビン酸1000ppm 添加区

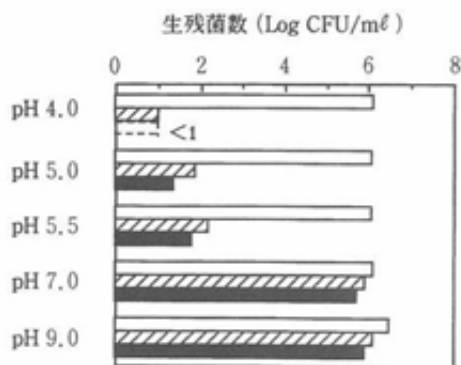


図5 *Bacillus* 胞子の加熱殺菌に及ぼす pH の影響  
(*Bacillus* strain No. 1, 加熱条件 沸騰水中, EtOH 濃度 5%)

□ 初発  
 ▨ EtOH 無添加加熱区  
 ■ EtOH 添加加熱区

殺菌効果が認められ、さらに pH 酸性下においてはエタノールの添加効果が認められ、生残菌数が減少することが確認された。図2においてはエタノール添加の効果は微弱であったが、pH 酸性下ではエタノールが殺菌効果を強めると考えられた。中條ら<sup>8)</sup>も *B. coagulans* の加熱殺菌において pH を酸性にするほど殺菌効果が高まると報告している。

一方、L-(+)-アスコルビン酸の効果は pH が酸性を示すためと考えられたが、図4の試験結果において 500ppm 添加区で懸濁液の pH は 6.38 で中性付近にあり pH 酸性下の加熱殺菌効果のみでは説明できないと考えられ興味深い結果であると考えられた。

なお、図示していないがポリリジン、しらこ蛋白とも添加量を 1000ppm まで増加させて加熱殺菌処理を行ったが強い殺菌効果は得られなかった。

#### 4. 走査型電子顕微鏡による *Bacillus* 胞子の破壊、損傷

胞子懸濁液の pH を酸性にし、エタノールを添加すると強い殺菌効果が認められたので走査型電子顕微鏡を用いて *Bacillus* strain No. 1 の胞子の損傷の状況を観察した結果を写真1～3 (写真1は栄養細胞) に示した。写真2の磷酸緩衝液で pH を 7.0 に調整した懸濁液で加熱した場合、胞子の表面はさほど大きな変化は認められないが、緩衝液の pH を 5.0 に調整し、かつエタノールを 5% 添加して加熱殺菌処理させた場合、写真3に示すように胞子の一部が空洞となって欠けるほど著しい破壊、

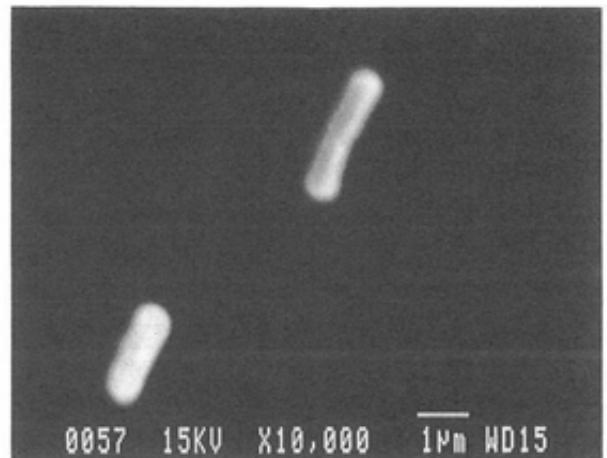


写真1 *Bacillus* strain No. 1 の栄養細胞

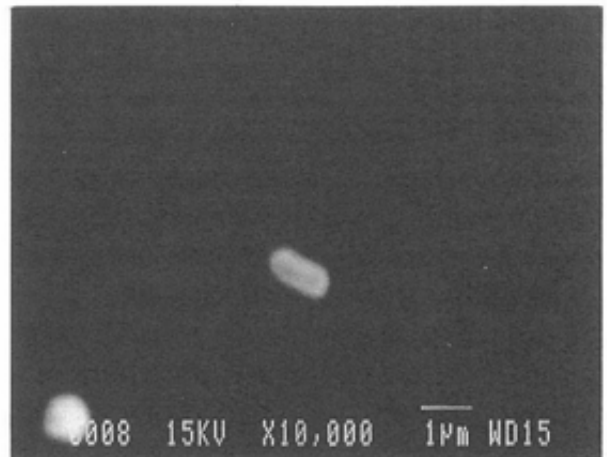


写真2 *Bacillus* strain No. 1 の胞子  
(加熱処理 97°C, 60分後)

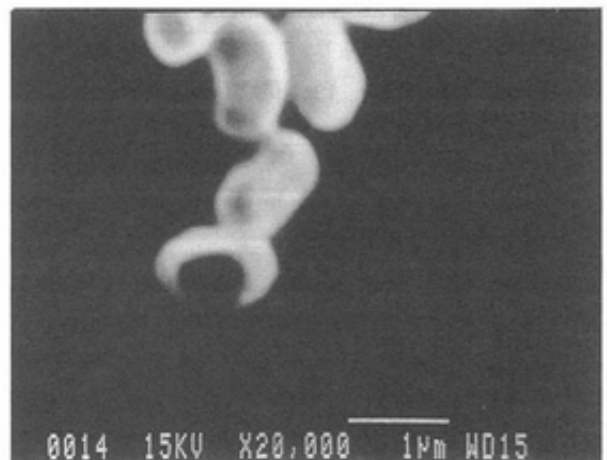


写真3 *Bacillus* strain No. 1 の胞子  
(加熱処理 97°C, 60分後, 5%EtOH 添加, pH5.0)

表4 ういろうにおける殺菌結果

種別	試験区	pH	生菌数 (CFU/g)		
			殺菌前	殺菌後	保存後
試作試験	無添加区	5.80	$1.5 \times 10^5$	$6.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^6$
	L-アスコルビン酸区	4.70	$1.5 \times 10^5$	300以下	300以下
	グルコノデルタラクトン区	4.78	$1.5 \times 10^5$	300以下	300以下
工場試験	無添加区	5.90	$6.0 \times 10^3$	300以下	$2.0 \times 10^7$
	グルコノデルタラクトン区	5.43	$6.0 \times 10^3$	300以下	300以下

損傷が観察され、強い殺菌効果を確認することができた。

## 要約

### 5. ういろうの殺菌結果

孢子懸濁液の殺菌の結果から L-(+)-アスコルビン酸の添加または pH 調整とエタノールの併用方法が有効と考えられたので、ういろうの殺菌試験を実施し、結果を表4に示した。

実験室における試作試験による殺菌と保存の結果、生菌数は 1g 当たり  $10^5$  レベルに対し、殺菌後の対照区は  $10^3$  レベル残存していた。これに対して L-(+)-アスコルビン酸添加区とグルコノデルタラクトン添加区の両区とも 300 以下/g と *Bacillus* strain No. 1 の菌数の減少が認められ、保存性が向上できると考えられた。L-(+)-アスコルビン酸の添加による場合は加熱後に保存すると白色のういろうが茶色に褐変し、白色のういろうへの使用は不相当と考えられた。

しかし、L-(+)-アスコルビン酸の 500ppm の添加ではかなりの殺菌効果が認められ、かつ pH も中性付近であることから、ういろう以外の食品の殺菌に活用することは有効な手段ではないかと考えられた。

以上の試験結果をもとに、実際の工場では殺菌と保存試験を行った。対照区のういろうは加熱直後の生菌数は 300 以下/g が保存 14 日後には  $2.0 \times 10^7$  /g となった。なお、pH は 5.90 であった。加熱前にグルコノデルタラクトンで pH を 5.43 に調整し、エタノールを約 1% 添加した試験区は初発菌数 300 以下/g で 22 日保存後も 300 以下/g となり、保存性を向上させることができた。しかし、pH を酸性にすることはういろうの香味に影響すると考えられ、今後さらに pH の中性付近での保存性向上に有効な殺菌法を検討する必要がある。

- 1) 市販のういろうの保存試験を行い、変敗したういろうなどから *Bacillus* を分離し、ういろうの変敗、離水が *Bacillus* に起因することを確かめた。さらに、分離した *Bacillus* の形態学的、生理学的試験を行い、2 菌株を *Bacillus subtilis* と同定した。
- 2) *Bacillus* 孢子懸濁液の各種薬剤共存下の加熱試験を行い、加熱殺菌の際に懸濁液に L-(+)-アスコルビン酸を 250ppm 以上添加するか、または懸濁液の pH を 5.5 以下に調整し、エタノールを数% 添加することが孢子の殺菌に有効であることを認めた。これらの結果を基に、ういろうの加熱の際、グルコノデルタラクトンで pH を 5.5 以下に調整し、エタノールを添加して実験室及び工場レベルで加熱殺菌を行った結果、対照区に比べて保存期間を延長できる結果を得た。

## 文献

- 1) 南場 毅・長谷川雅則：愛知食品工技年報，28，48 (1987)
- 2) 南場 毅・井上靖也・鈴木峰夫：愛知食品工技年報，31，19 (1990)
- 3) 長谷川武治編：微生物の分類と同定，東京大学出版会
- 4) Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., by R. E Buchanan and M. E. Gibbons, The Williams Wilkins, co., Baltimore (1974)
- 5) 南場 毅・戸谷精一・金田睦美・川口悦子・加藤 熙：愛知食品工技年報，37，5 (1996)
- 6) 石田欽一：日食工誌，33，227 (1986)
- 7) 内藤茂三：防菌防黴，20，565，629 (1992)
- 8) 中條均紀・森山裕子：日食工誌，40，268 (1993)