

学生実験条件の最適化に向けた研究 牛乳の品質検査についての検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-02-08 キーワード (Ja): キーワード (En): food science, food hygiene, food deterioration, dietitian education 作成者: 高橋, 朝歌, 飴谷, 有希子, 狩野, こず恵, 宮田, 祥子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.50818/00000008

【原著】

学生実験条件の最適化に向けた研究 ～牛乳の品質検査についての検討～

Study on food deterioration and hygiene management by students at a dietitian training facility

高橋 朝歌¹ 飴谷 有希子² 狩野 こず恵² 宮田 祥子²
Asaka TAKAHASHI Yukiko AMEYA Kozue KANO Sachiko MIYATA

要 旨

本研究は、栄養士養成施設の学生に対し、食品の変質や衛生管理について効果的に学習させるための検討を行った。特性の異なる細菌を接種した牛乳の化学的および微生物学的変化を確認し、至適増殖温度と乳糖分解性の異なる2つの細菌を接種した牛乳試料を調製した。この試料を用いて学生実験を行い、実践の効果を学生のレポートから判定した。その結果、牛乳の保存温度が不適切だと牛乳が変質すること、大腸菌のような中温細菌による汚染により牛乳の変質が起こること、大腸菌群の乳糖分解性については多くの学生が理解できた一方、乳糖非分解性の細菌がいること、微生物の増殖可能温度域や低温細菌については理解できていない学生が多いことが明らかになった。

キーワード：食品学，食品衛生学，食品の変質，栄養士教育

I. はじめに

牛乳は、水分活性が高く、pH 6.4～6.6で、たんぱく質、カルシウム、脂質など豊富な栄養成分を含む食品である。飲用にするほか、多くの加工品にも利用されている。牛乳に由来する成分がヒトの健康に及ぼす影響についても多くの研究が行われており、血圧降下作用¹⁾、免疫調節作用²⁾、感染防御作用³⁾などを有することが知られている。一方、栄養的に優れているということは、微生物にとっても格好の培養基となることを意味し、ひとたび微生物の汚染を受けると、短時間のうちに牛乳は変質する。牛乳の腐敗には、大腸菌群、*Pseudomonas*属を始めとする低温細菌、*Bacillus*属や*Clostridium*属のような芽胞形成菌、カビや酵母など多くの微生物が関わる⁴⁾。2000年に発生した乳製品を原因とする大規模な食中毒事件は、製造ラインの停電により乳中の黄色ブドウ球菌が増殖し、エンテロトキシンが産生したことにより引き起こされた。牛乳および乳製品については、一般の食品とは別に食品衛生法に基づき「乳および乳製品の成分規格等に関する省

令」(「乳等省令」)があり、厳しい衛生管理が求められている。省令において、牛乳の成分規格は、酸度(乳酸として)0.18%以下、比重(15℃)1.028～1.034、細菌数50,000/mL以下、大腸菌群陰性と定められている⁵⁾。

牛乳の品質検査には、比重測定、酸度測定、乳脂肪測定、微生物検査などがあるが、これらの試験は特別な機械などを必要とせず、比較的簡単に行えることから、栄養士養成課程における食品学実験や食品衛生学実験の中で取り上げられることが多い⁶⁾⁻⁸⁾。東日本栄養医薬専門学校においては、1年次前期に食品学実験、1年次後期に食品衛生学実験が開講されており、これまで食品学実験でのみ牛乳を使った実験を行ってきた。中和滴定の技法を学ぶとともに、牛乳が変質しやすい食品であることを理解することを目的とし、超高温瞬間(UHT)殺菌された市販乳を様々な条件下で保存した試料を用いていた。しかし実際に実験を行うと、賞味期限内、賞味期限切れ、未開封、開封済みにかかわらず、冷蔵保存しておけば酸度や比重がほとんど変化しないため、牛乳の変質について学生が理解しづらい結果となっていた。また、これまでに行った予備実験では、賞味期限切れの牛乳を冷蔵庫で8日あるいは賞味期限内の牛乳を常温で3日保存した牛乳でも

¹ 東都医療大学管理栄養学部管理栄養学科

² 東日本栄養医薬専門学校栄養士学科
E-mail: asaka.takahashi@tohto.ac.jp

酸度や一般細菌数に変化がないことが確認され、市販のUHT殺菌牛乳は未開封であれば賞味期限を過ぎてもほとんど変質しないことが示唆された。現在日本の市場に出回っている牛乳の90%以上はUHT殺菌されたものである⁹⁾。UHT殺菌は耐熱性菌や細菌芽胞のほとんどを死滅させることができるため¹⁰⁾、この殺菌法で処理された牛乳は無菌に近い状態であると考えられる。

このことから、栄養士を目指す学生の興味を引きつけ、限られた授業時間の中で食品の変質や衛生管理について考察させるためには、牛乳に人為的に細菌を接種するなど試料の調製方法を再検討する必要がある。また、これまで食品学実験でのみ行っていた牛乳の実験を食品衛生学実験でも行い、1年間に行われる実験科目の連携を図ることで、食品の変質についてより理解を深められる。これまでに、市販乳の衛生管理の面からセレウス菌接種牛乳の挙動を調べた例¹¹⁾はあるが、学生に対する教育実践法を考慮して人為的に細菌を接種し、その変化を検討した例はない。

以上のような背景から、本研究では特性の異なる細菌を人為的に接種した際の牛乳の化学的および微生物学的変化を確認し、それに基づき牛乳の変質について効果的に学習させるための学生実験の実践法を計画、実施した。実践の効果は、実施後に学生が提出するレポートから判定した。

II. 方法

II-1 試料および試薬

実験に用いた牛乳は、UHT殺菌(130℃、2秒間)された市販品を、群馬県内のスーパーマーケットで購入した。使用菌株は、*Escherichia coli* (NBRC 3301)、*Pseudomonas fluorescens* (NBRC 14160)、*Staphylococcus epidermidis* (NBRC 100911)を独立行政法人製品評価基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)より購入した。Soybean-Casein Digest培地「ダイゴ」(SCD培地)、ラクテスターA錠、ラクテスターA標準色調表は和光純薬工業株式会社、ニュートリオンブイヨン(Oxoid Nutrient Broth)は関東化学株式会社より購入した。

II-2 学生実験の条件設定のための予備検討

*E. coli*および*P. fluorescens*はSCD培地中、30℃で24～48時間前培養した。*S. epidermidis*は、ニュートリ

オンブイヨンを用いて37℃で16～24時間前培養した。無菌的に開封した牛乳パックに前培養した菌株をそれぞれ 1×10^5 CFU/mLになるように接種し、滅菌三角フラスコに分注して5℃または30℃で0～8日間培養した。ブランクとして菌株を接種しない牛乳を5℃または30℃で同様に培養したものを用意した。これらの牛乳は経時的にサンプリングを行い、酸度と細菌数を測定した。細菌数は、一平板に30～300個のコロニーが得られるように牛乳を生理食塩水で希釈し、ソフトアガー(0.7% NaCl, 0.8% 寒天)と混和してSCD平板培地上で24時間培養し菌数を測定した。

酸度の測定は、経時的に採取した試料10 mLをビーカーにとり、蒸留水を等量加えて希釈し、フェノールフタレイン指示薬を加えて0.1 M水酸化ナトリウム溶液で滴定した。30秒間微紅色が消失しない点を終点とし、滴定値から試料中の乳酸%として求めた。

II-3 学生実験の条件設定ならびに実施

予備検討の結果をもとに、実際に学生実験に取り入れるための最適な条件を設定し、学生実験の方法を計画、実施した。まず、1年生の前期に行う食品学実験は、中和滴定の技法を学ぶことと、保存方法の違いによる牛乳の化学的性質の変化を理解させることを目的として平成27年8月26日に実施した。賞味期限内と期限切れの牛乳を用意し、開封または未開封で保存温度の異なる8種類を試料とした。開封済み牛乳は、家庭での保存状態を想定し、実験室内で牛乳パックを開封し、3分間開放した後パックを閉めた。保存は、5℃の冷蔵庫内または30℃のインキュベーター内で行った。これらの試料の酸度測定は、II-2で述べた方法で行った。

1年生の後期に行う食品衛生学実験では、微生物の汚染により牛乳の変質が起こること、大腸菌群の乳糖分解性、低温増殖細菌の存在を理解させる目的で平成28年1月22日に実施した。予備検討の結果を踏まえ、大腸菌群の一種である*E. coli*と、低温細菌で牛乳の二次的な汚染にも関わる*P. fluorescens*を使用することとした。賞味期限内の牛乳を用いて、前培養した*E. coli*を 1×10^5 CFU/mLになるよう接種し30℃で2日間培養したもの、前培養した*P. fluorescens*を 1×10^5 CFU/mLになるよう接種し5℃で5日間培養したもの、対照として菌を接種しないものを試料とし、学生には微生物を接種した牛乳を使用することを事前に説明した上で実験を行った。

酸度と比重の測定に加えて、細菌の増殖を確認するためにレザズリン法による簡易細菌検査を行った。これは、細菌の脱水素酵素の作用により酸化還元指示薬であるレザズリンが変色することを利用したもので、牛乳の細菌汚染度を測定する方法である。ラクテスター A 錠 1 個を滅菌蒸留水 50 mL に溶解した原液 1 mL、牛乳試料 10 mL を試験管にとって混合し、37 °C の恒温水槽で遮光して 60 分間反応させた。反応後速やかにラクテスター A 色調表と比較し、試料が淡青色～淡赤紫色なら A 級（新鮮牛乳）、淡赤紫色～ピンク色なら B 級（A 級と C 級の間）、ピンク色～淡黄紅色～乳白色なら C 級（細菌汚染された牛乳）と判定した。また、pH 試験紙による試料の pH 測定も同時に行った。

いずれの学生実験においても、実験後に学生 59 名がまとめたレポートの考察内容から、学生の理解状況を検討した。

Ⅲ. 結果および考察

Ⅲ-1 学生実験の条件設定のための予備検討

微生物の汚染による牛乳の変質について、より効果的に学習できる汚染モデルを作成するため、市販の牛乳に 3 種の菌株をそれぞれ接種し、経時的にサンプリングを行って酸度と生存菌数の変化を測定した。菌株には、乳糖分解性をもつ大腸菌群の一種として *E. coli*、牛乳の変質に関わる微生物として乳糖非分解性の低温細菌である *P. fluorescens*、グラム陽性細菌である *S. epidermidis* を使用した。

生存菌数の変化を図 1 に、酸度の変化を図 2 に示した。菌を接種しない牛乳は、5 °C 培養、30 °C 培養ともに 7 日後も生菌は確認されず、酸度も 0.11 % で変化は見られなかった（データなし）。

E. coli を接種した牛乳は、5 °C 培養では 8 日後も菌数、酸度ともに変化は見られなかったが、30 °C 培養では 24 時間後から菌数が急激に増加し、2 日後に 3.3×10^{12} CFU/mL に達し、8 日後まで変化しなかった（図 1(a)）。酸度も細菌数の増加とともに上昇し、8 日後には 0.47 % となった（図 2(a)）。2 日を経過した頃から異臭が感じられるようになり、8 日目には凝固していた。

P. fluorescens を接種した牛乳は、5 °C 培養、30 °C 培養ともに経時的に菌数が増加した。5 °C で培養した牛乳は、24 時間後から徐々に菌数が増加し 8 日後に

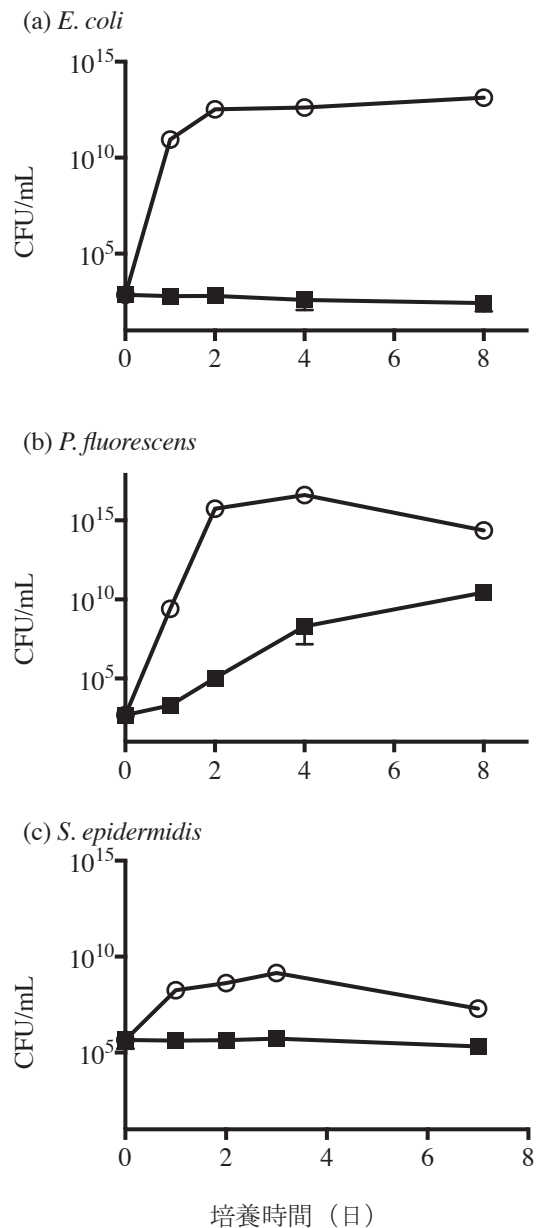


図 1 細菌を接種した UHT 牛乳の菌数変化

■ 5 °C ○ 30 °C

は 2.7×10^{10} CFU/mL になった。30 °C 培養では 24 時間後から増加し、4 日後に 4.0×10^{16} CFU/mL と最大になり、その後わずかに減少した（図 1(b)）。一方、酸度は 5 °C 培養、30 °C 培養ともに培養直後から変化は見られなかった（図 2(b)）。

S. epidermidis を接種した牛乳は *E. coli* と同様の傾向を示し、5 °C 培養では 7 日後も菌数、酸度ともに変化は見られなかったが、30 °C 培養では 24 時間後から菌数が増加し、3 日後に 1.4×10^9 CFU/mL と最大になった（図 1(c)）。酸度は菌数が最大となった 3 日目から

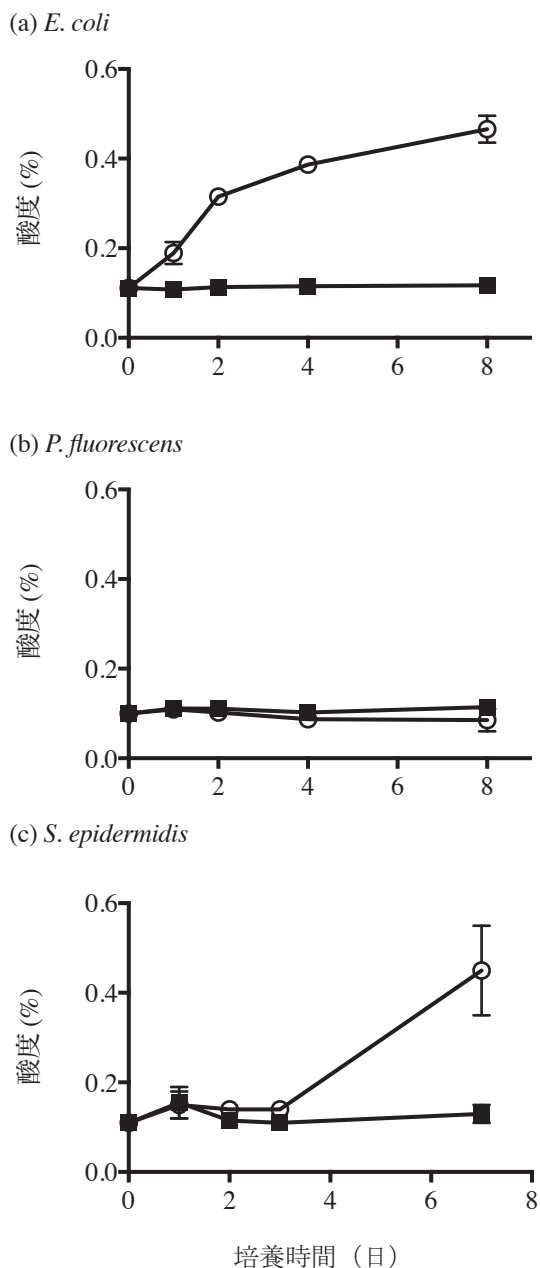


図2 細菌を接種したUHT牛乳の酸度変化

■ 5°C ○ 30°C

上昇し始め、7日後に0.45%となった。(図2(c)). 8日後には凝固し、わずかに異臭が感じられた。

以上の結果から、牛乳中における各菌株の増殖可能温度および乳糖分解性の違いが確認された。食品衛生学上の分類である大腸菌群は乳糖分解性があることと定義されている。*E. coli*と*P. fluorescens*を用いて牛乳試料を調製することにより、細菌により乳糖分解性が異なること、低温保存でも食品の腐敗が起こることを学習できると考えられた。また、酸度や比重の測定に加えて細菌の増殖を確認することが必要であるが、限

られた時間の中で平板培地を用いた生菌数の確認は難しいことから、短時間で結果が良好に判定できるレサズリン法を行うこととし、学生実験を計画した。

III-2 学生実験の実施

予備検討の結果をもとに、食品学実験と食品衛生学実験の内容を計画し、実施した。

食品学実験では、賞味期限内および賞味期限切れの牛乳を使用し、開封または未開封の状態で保存温度を変えた試料8種類を用意した。試料牛乳の酸度測定結果を表1に示した。賞味期限内の牛乳は保存温度、開封済・未開封に関わらず酸度は0.16%となり変化がなかった。賞味期限切れの牛乳で5°Cで保存したものは開封済・未開封に関わらず酸度は0.15~0.16%となりほとんど変化がなかった。一方、賞味期限切れで30°C保存、未開封の牛乳は酸度の変化は見られなかったが、開封済の牛乳は0.18%とわずかに酸度が上昇した。学生のレポートでは、賞味期限内の牛乳は、保存温度、開封済・未開封に関わらず酸度に変化がない一方、賞味期限切れ・開封済の牛乳については、30°Cで保存すると若干酸度が上昇したことから、低温で保存した方が鮮度の変化が少ないと理解しているものが多かった。このことから、食品学実験の目的ではある程度理解ができたものと考えられた。しかし、酸度が上昇する理由については、何らかの細菌が増殖したために牛乳が変質したという理解にとどまっておらず、乳糖が分解し酸が生成すると考察していたレポートはなかった。

食品衛生学実験は、汚染モデルとして乳糖分解性のある*E. coli*と、非乳糖分解性で低温増殖菌の*P. fluorescens*を接種した試料を用いて行った。各種牛乳の化学的試験および細菌検査の結果を表2に示した。試料はすべて賞味期限内の牛乳を使用した。微生物を接種していない牛乳の酸度は0.16%、*E. coli*を接種し30°Cで2日間培養した牛乳の酸度は0.40%、*P. fluorescens*を接種し、5°Cで5日間培養した牛乳の酸度は0.17%となった。レサズリン法による簡易細菌検査では、微生物を接種していない試料はA級(細菌性または非細菌性因子の少ない新鮮な牛乳)、*E. coli*または*P. fluorescens*を接種した試料はC級(細菌性または非細菌性因子の多い牛乳)となった。*E. coli*接種試料は強い腐敗臭が認められたが、*P. fluorescens*接種試料は新鮮牛乳とあまり変わらないにおいであった。

表1 食品学学生実験における牛乳の酸度測定の結果

保存温度 (°C)	賞味期限	開封/未開封	酸度 (%)
5	期限切れ	未開封	0.17 ± 0.02
5	期限切れ	開封	0.16 ± 0.03
30	期限切れ	未開封	0.16 ± 0.02
30	期限切れ	開封	0.25 ± 0.05
5	期限内	未開封	0.16 ± 0.03
5	期限内	開封	0.16 ± 0.02
30	期限内	未開封	0.17 ± 0.02
30	期限内	開封	0.16 ± 0.03

表2 食品衛生学学生実験における牛乳の化学的試験および細菌検査の結果

試料	酸度 (%)	比重	pH	レサズリン法*による細菌検査の結果
対照	0.16 ± 0.01	1.032	6.7	A
<i>E.coli</i> 接種	0.40 ± 0.03	1.031	5.8	C
<i>P.fluorescens</i> 接種	0.17 ± 0.01	1.032	6.7	C

*A 級：細菌性または非細菌性因子の少ない新鮮な牛乳，C 級：細菌性または非細菌性因子の多い牛乳

学生のレポートでは、*E.coli* 接種試料の酸度が上昇した理由について、簡易細菌検査の結果と、*E.coli* の乳糖分解性を含めて考察できていた者が59名中35名であった。一方、*P.fluorescens* 接種試料については、簡易細菌検査で菌数が増加しているにも関わらず酸度に変化しないという結果を、「*P.fluorescens* は乳糖分解性を持たないからである」と理解できた者は59名中8名であった。多くの学生は酸度測定の結果と簡易微生物検査の結果を関連付けることができず、酸度測定の結果のみで乳等省令の成分規格に適合していると判定していた。また、*E.coli* 接種試料は30°Cで、*P.fluorescens* 接種試料は5°Cで保存したが、牛乳の変質は低温細菌の混入によっても進むので、一度開封した牛乳は早く消費するほうがよいと考察した者は59名中16名であった。先に述べたように、*P.fluorescens* 接種試料はにおいの変化があまり感じられなかったために、腐敗していることが理解しにくかったと考えられた。

以上2つの学生実験の結果から、牛乳の保存温度が不適切だと牛乳が変質すること、大腸菌のような中温細菌による汚染により牛乳の変質が起こること、大腸菌群の乳糖分解性については多くの学生が理解できていた。しかし、食品衛生学実験では、2種類の微生物を接種した試料を用いることを事前に学生に説明した上で行ったにもかかわらず、乳糖非分解性の細菌がいること、微生物の増殖可能温度域や低温細菌については理解できていない学生が多いことも明らかになった。

今後は、食品学実験では牛乳の酸度測定の意義を理解させ食品衛生学との関連を図ること、食品衛生学実験では乳糖分解性のない細菌や低温増殖菌が存在することを理解させることに重点を置き授業を行うことが必要であると考えられる。また、低温殺菌牛乳はUHT殺菌牛乳に比べ微生物が残存していることが明らかとなっている¹²⁾。食品学実験では、保存方法による化学的性質の変化をより明確にするために、殺菌方

法の異なる牛乳を用いて比較実験を行うことも検討する必要がある。さらに、食品学や食品衛生学の講義の中でも牛乳の変質、食中毒細菌や食品の腐敗に関わる微生物の特性、特に細菌の至適増殖温度と増殖可能温度域について授業内容を改善していくことも必要と考えられる。

文献

- 1) Groziak SM, Miller GD: Natural bioactive substances in milk and colostrum: effects on the arterial blood pressure system. *Br J Nutr* 84: 119-125, 2000.
- 2) Gill HS, Doull F, Rutherford KJ, et al.: Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr* 84: 111-117, 2000.
- 3) van Hooijdonk AC, Kussendrager KD, Steijns JM: In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br J Nutr* 84: 127-134, 2000.
- 4) 上野川修一編著：シリーズ食品の科学 乳の科学：朝倉書店；66-70, 1996.
- 5) 食品衛生研究会編：平成30年版食品衛生小六法I：新日本法規；161-225, 2017.
- 6) 橋本俊二郎編：食品学実験：講談社；116-118, 2010.
- 7) 谷口亜樹子, 古庄律, 松本憲一編著：基礎から学ぶ食品化学実験テキスト：建帛社；132-133, 2014.
- 8) 増田修一編著：健康と食の安全を考えた食品衛生学実験 改訂新版：アイ・ケイコーポレーション；134-143, 2013.
- 9) 平成28年度乳肉関係統計資料, 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課, *食品衛生研究* 68, 2018.
- 10) 上野川修一編著：食物と健康の科学シリーズ 乳の科学：朝倉書店；58, 2015.
- 11) 安形則雄, 森正司, 小沼博隆ら：牛乳におけるセレウス菌の挙動に関する検討. *食品と微生物* 10: 211-213, 1994.
- 12) 水取敦子, 藤井真理子, 田中達也ら：都内に流通する低温殺菌牛乳の微生物学的実態調査. *食品衛生研究* 65: 33-38, 2015.

受付日：2018年9月27日 受諾日：2019年2月1日

[Original Article]

Study on food deterioration and hygiene management by students at a dietitian training facility

Asaka TAKAHASHI¹ Yukiko AMEYA² Kozue KANO² Sachiko MIYATA²

Abstract

In this study, we examined effective learning methods for students at dietitian training facilities concerning the deterioration and hygiene management of food. Preliminary experiments investigated the chemical and microbiological changes in ultra-high temperature (UHT) processed milk inoculated with bacteria. Student experiments were conducted using UHT-processed milk inoculated with two bacteria species that had different optimum growth temperatures and lactose-degrading abilities. Students understood the following concepts through the experiments: 1) milk stored at inappropriate temperatures changes in quality; 2) changes in milk quality are caused by contamination of mesophilic bacteria, such as *E. coli*; and 3) coliform bacteria degrade lactose. Further, this study indicated the need to develop additional lectures on non-lactose-degrading bacteria and psychophilic bacteria.

Key words : food science, food hygiene, food deterioration, dietitian education

