

製パン工場のカビ汚染と食パンのカビ変敗

内藤茂三

Fungal Contamination of Commercial Bread Factory and Spoilage of Plain Bread

Shigezou Naitou

キーワード：食パン Whight bread, カビ Fungi, エタノール Ethanol, オゾン Ozone

はじめに

パンの変敗には細菌によるものとカビによるものがある。細菌によるものは主として *Bacillus* 属細菌によるものが多いが、これらの細菌芽胞の耐熱性は極めて高いため、パンの焼成が220℃で行なわれた場合、表皮温度は155℃に達し、中心部も96℃に達して通常10分間維持されるが、焼成後のパンにも生き残ってパン内部に糸引き状の変敗を起こさせる。このローブ現象はデコレーションケーキ、ショートケーキ、パン、ブッセ等の洋菓子において多く見られ、その原因菌は *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus* であるとされた¹⁾。この場合一定菌数以上存在して高温、多湿の条件が与えられた場合にのみローブ現象が生じる。このため製パン工場では *Bacillus* 属細菌の汚染の少ない原料を使用し、酢酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、リン酸塩等やプロピオン酸カルシウム、プロピオン酸ナトリウム等を添加してパンの冷却工程や貯蔵条件に注意を払っている。しかし最近では原料小麦粉の製粉技術が進み、また歩留まりの低い上質粉が使用されているため、パンのローブ現象はほとんど起きていないが、カビによる変敗が多発している。カビは耐熱性が弱く、パンの焼成条件下では完全に死滅する。したがってパンに生育するカビは焼成後に付着したカビに起因するものであり、その汚染源は空気中に浮遊する胞

子のほか、工場では作業員の手や衣服、パンを乗せるラック、スライサー、パン運搬用バン等である²⁾。市販食パンを25℃で保存した場合、丸ごとパンはスライス食パンに比しカビ発生は遅延している。このため製パン工場ではスライス工程のカビを殺菌するために殺菌剤としてエタノール系の殺菌剤を使用して効果を上げてきた。しかし最近、全くエタノール殺菌効果のないカビが出現し、大きな問題となっている。このカビはオレンジ色の菌糸をパンの表面に密生させるものであり、生育が極めて早く、エタノールを資化する性質をもつものである。本カビは製造工程の半製品と製品のカビの汚染状況を検討してした結果、*Moniliella suaverolens* と同定され、スライス工程で汚染された³⁾。製パン工場ではエタノール系の殺菌剤が多用されてきたため *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* が抑制されてエタノールに極めて耐性の強い本カビが優先的に増殖してきた。そこで本菌の増殖を抑制するためには他のカビの生育も大きく関係するので全くエタノールを工場殺菌剤として使用していない製パン工場のカビを検討した。

実験方法

1. 試料及び製造方法

試料は製パン工場で製造された食パン及び製造工程中の半製品を用いた。原材料は小麦粉、イースト、食塩、砂糖、ショートニング、油脂、脱脂粉乳、イーストフードである。食パンの一般成分は水分36.5%、たんぱく質8.5%、脂質

3.5%、糖質48.5%、食塩1.2%であり、水分活性は0.95、エタノール濃度は0.5%であった。

本工場での食パンはエタノール系の殺菌剤が多用されてきた食パン工場同様にスポンジ・ドウ法（中種法）を用いて製造されていた。

2. カビの分離と同定

ポテトデキストロース寒天培地（PDA：クロラムフェニコール30 μ g/ml添加）を用いてカビを分離し、PDA及び30%シュクロース加麦芽エキスを寒天培地（30% SMA：ポリペプトン5g、酵母エキス5g、麦芽エキス20g、シュクロース300g、寒天15g、脱イオン水1000ml、pH6.0）を用いて5, 10, 20, 25, 30℃で2週間培養し、寒天培地上に発生した集落を1平板当たり5～10株を無作為に鈎菌し、スライドカルチャーを行い、形態的特徴からBarnett and Hunterの記載⁴⁾及びDe Hoogのマニュアル⁵⁾に従って同定した。なおカビ数の測定は試料25gを無菌的に採取し、これを滅菌したホジナイザーカップに滅菌生理食塩水225mlを入れ、ホモジナイザーで5分間混合し、カビ数を測定した。

3. 空中浮遊カビの測定方法

空中浮遊カビの測定はピンホールサンプラー（三基工業(株)製）により、毎分26.5Lの速度で2分間工場空気を吸引した。この際、サンプラーのターンテーブルの上にはPDAを置き、この平板上に捕集した。空気吸引完了後、25℃で5日間培養し、平板に出現した集落数をカビ数として表示した。

4. 工場の付着カビの測定方法

10cm×10cm（100cm²）の拭き取り棒を用いて滅菌めん棒で拭き取り、界面活性剤（Tween80）入り10ml滅菌水の中に洗い出した。この液を1mlずつ、10枚のシャーレに流し、これにポテトデキストロース寒天培地（PDA：クロラムフェニコール30 μ g/ml添加）を流して固化させた。10枚のシャーレに生成したカビの集落を計測して付着カビ数とした。

5. 水分の測定

水分は105℃、5時間乾燥法を用いた。

6. 糖の発酵性試験

発酵性試験用培地9mlをダーラム管の入った試験管に入れ、シュクロース、グルコース、フルクトース、マンノース、マルトース、ガラクトース、マンニトール、ラフィノース、イノシトール、ラクトース、ソルビトールは20%水溶液0.4mlを、可溶性デンプンは1%水溶液0.8mlを添加後、カビの分生子の1白金線量を接種し25℃で3週間培養した。

7. 炭素化合物資化性試験

10倍濃度のWickerham炭素化合物資化性資化試験用培地を用いて、シュクロース、グルコース、メレチトース、 α -メチル-D-グルコシド、エタノールについて分離菌の生育の有無について検討した。なおエタノールは最終濃度が2%になるように調整した。

8. カビの胞子の調製

カビの胞子の調製はPDA斜面培地で前培養したものをPDA平板培地に塗抹し、25℃で2週間培養した後、滅菌生理食塩水で胞子を集菌して冷却遠心分離器（1500×g）で3回洗浄して調製した。

9. オゾン水殺菌

オゾン水生成装置（ニッスイ(株)製）を用いてオゾン水によるカビの殺菌試験を行なった。

カビのオゾン水殺菌試験は100ml容の三角フラスコに1mlのカビ懸濁液を入れオゾン水49mlと混合後、所定の時間反応させ、反応終了後その1mlをとり9mlのブイヨンに入れてオゾン分解して反応を停止させた。この液の残存したカビをPDA寒天培地と30% SMA寒天培地で測定した。

10. オゾン水濃度の測定

溶存オゾン濃度計（東亜電波(株)製、OZ-20）

11. エタノール濃度の測定

製品中のエタノールはガスクロマトグラフィーにより測定した⁶⁾。ガスクロマトグラフ（株日立製作所製、163型）の測定条件は、検出器；FID、カラム温度；70℃、注入口温度；150℃、カラ

ム；φ 3 mm×2.25mステンレスカラム、充填剤；PEG20M（60/80 mesh）20%クロモソルブW、キャリアーガス；窒素（50ml/分）である。

実験結果と考察

1. 食パン工場の空中浮遊カビ

食パンは製造工程に焼成があるため、原料に付着するカビがそのまま食パンに移行増殖して変敗することはない。しかし焼成以降の工場からのカビの二次汚染により変敗する例は多い。食パン製造工程のカビの変化を検討するために、空中浮遊カビを測定した結果を表1に示す。

本工場内は工程別に仕切られてなく、生地 of 原料混合、第1発酵、混合・分割丸目、成型、第2発酵、焼成、冷却、スライス、包装工程に至るまですべて同一の空間内で行なわれているため、各工程から検出されるカビの菌数は異なってもカビの菌叢はほぼ同じであった。スポンジ・ドウ法は小麦粉の約70%にイースト、水、ドウコンディショナー（食品添加物等）を加えて攪拌後、4時間第1発酵させ、これに残りの小麦粉、砂糖、食塩、油脂、脱脂粉乳、水を加えて混合して分割・丸目、成型して第2発酵を40分間させる。これを220℃、35分間ガスオーブンで焼成し、クーラーで25～30℃まで冷却してスライサーでスライスし包装する。これらの工程を同一空間、開放系で行なっているためカビの二次汚染を受けやすい。食パンの場合、中心部の水分は焼き上がり後でも約45%とほとんどかわらないが、冷却時間が長くなると内層から外皮へ向かって水分の移動が起こり、最終的には38%となる³⁾。表層の水分が増加して、カビの増殖が促進される。工場の空中浮遊カビ *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Moniliella*, *Penicillium*, *Aureobaculum*, *Aternaria*, *Wallemia*, が検出された。最も多く検出されたのは *Cladosporium* であり次いで *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobaculum*, *Moniliella* であった。発酵とスライス工程で多くのカビが検出され、特にスライス工程に *Cladosporium* が多く検出された。エタノール耐性の *Moniliella* は全ての工程で検出されたが、主要5種類のカビの中では最も少なかった。食パンに生育して *Aspergillus* と形態的に

良く似ていて食パンに黄色の斑点を生成させる

Eurotium は *Moniliella* に次いで少なかった。これらのカビはエタノール耐性が強いことが知られており工場にエタノールを多用すると *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* は減少するが着色変敗（*Moniliella*：赤色～橙色斑点、*Eurotium*：黄色斑点）が発生することが経験的に知られている。スライス工程に工場浮遊カビが多いのは、スライサーの汚れ、スライスする時に発生する屑によるカビの増殖、従業員からの汚染等が考えられる。食パンの細菌汚染に関してはスライサー、従業員からの二次汚染が多い。保存料無添加の食パンは通常20～25℃で2日放置すると全てカビが発生することが知られている。その時の最初に発生するカビは暗緑色の *Cladosporium* であるのは工場の空气中に最も多いことに起因する。当該食パン工場の空中浮遊カビ（cfu/L）は *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobaculum*, *Moniliella*, が原料混合工程でそれぞれ0.15, 0.13, 0.05, 0.08, 0.02であり、スライス工程でそれぞれ0.90, 0.24, 0.24, 0.06, 0.02であった。

エタノールを多用した食パン工場の空中浮遊カビ（cfu/L）と比較してみると *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobaculum*, *Moniliella*, がエタノール多用した原料混合工程でそれぞれ0.09, 0.04, 0.04, 0.04, 0.06であり、スライス工程でそれぞれ0.06, 0.04, 0.04, 0.02, 0.04と *Moniliella* を除いて非常に少ない³⁾。

特に *Cladosporium* と *Aspergillus* の減少が著しい。これはエタノールの殺菌効果が認められたと考えられる。しかしエタノール耐性の *Moniliella* は原料混合及びスライス工程のいずれにおいても増加している。このため *Moniliella* は他のカビが減少したため増殖しやすくなり、更なるエタノールの多用により急激に増殖して橙色斑点を生成したのと考えられる。他のカビが存在していればエタノールが存在しても急激に増殖しないものと考えられる。エタノールの多投与が食パンの橙色斑点の生成の原因となった。

黒色から暗緑色のカビによる食パンの斑点生成状況を写真1に示した。この原因カビを同定した結果、工場の空中から最も多く検出された

*Cladosporium*であった。その顕微鏡写真を写真2に示した。特徴的なカビとして高湿性の黒色カビである*Aureobacidium*が空中浮遊菌から検出されたので写真3に、エタノール耐性カビ*Moniliella*,を写真4に示した。



写真1 食パンに発生した黒色カビ

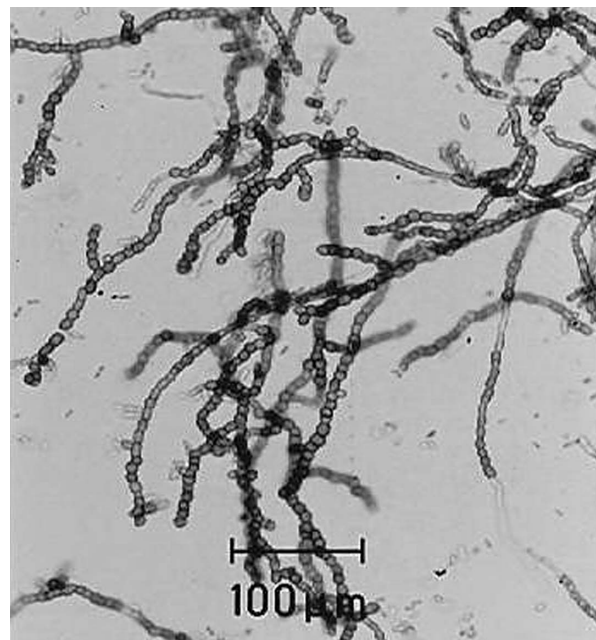


写真3 食パン工場より分離した
*Aureobacidium*属カビ

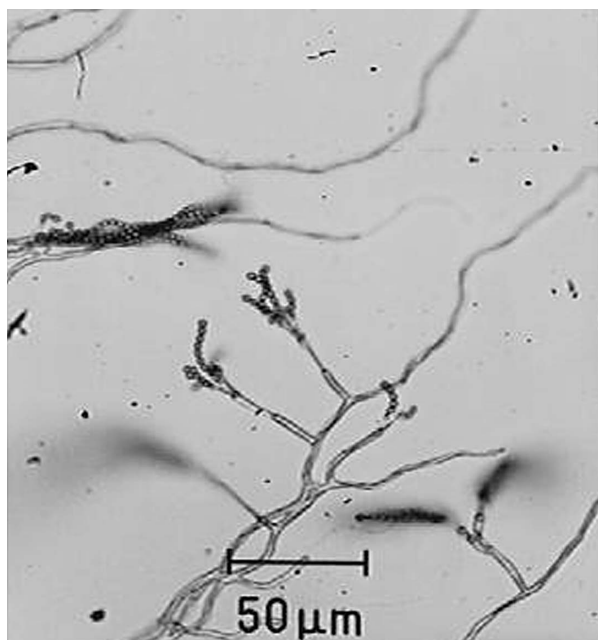


写真2 食パン工場より分離した
*Cladosporium*属カビ

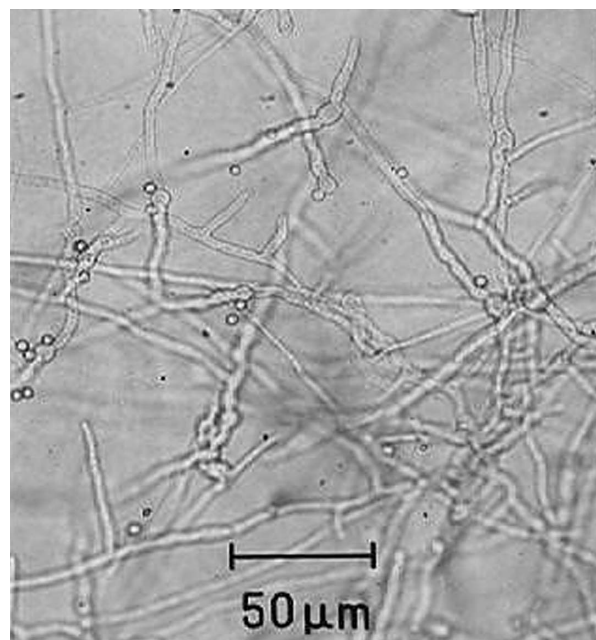


写真4 食パン工場より分離した
*Moniliella*属カビ

表1 食パン工場の空中浮遊カビ

| 検査場所 | cfu/L | <i>Cladosporium</i> | <i>Aspergillus</i> | <i>Aureobacidium</i> | <i>Moniliella</i> | <i>Penicillium</i> |
|------|-------|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| 原料混合 | | 0.15 | 0.13 | 0.08 | 0.02 | 0.05 |
| 第2発酵 | | 0.36 | 0.30 | 0.18 | 0.10 | 0.21 |
| 冷却 | | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.08 | 0.11 |
| スライス | | 0.90 | 0.24 | 0.06 | 0.02 | 0.24 |
| 包装 | | 0.32 | 0.04 | 0.05 | 0.03 | 0.16 |

2. 食パン工場の付着カビ

最も空中浮遊カビの多く検出されたスライス工程の床、壁、側溝、スライサー、ラックの付着カビを測定した結果を表2に示した。床、壁、側溝からは $1.4 \times 10^2 \sim 3.8 \times 10^2$ cfu/100cm²のカビが検出された。スライサー及びラックからは*Cladosporium*、*Aspergillus*、*Penicillium*のいずれのカビも検出されたが、比較的少なかった。なお*Moniliella*はスライス工程のいずれの場所からも検出されなかった。

従来からスライス前の食パンとスライス後の食パンでは菌数の差異が認められ、その原因は取扱者の手指等及びスライス時に発生する粉体からの二次汚染であるとされた。今回、スライサーの各部分からも*Cladosporium*、*Aspergillus*、*Penicillium*が検出された。*Moniliella*はスライス工程のいずれの場所からも検出されなかった。

表2 食パン工場のスライス工程の付着カビ

| 検査場所 | <i>Clado.</i> | <i>Asp.</i> | <i>Pen.</i> |
|-------|---------------|-------------|-------------|
| 床 | 175 | 123 | 35 |
| 壁 | 135 | 87 | 53 |
| 側溝 | 380 | 196 | 130 |
| スライサー | 36 | 30 | 32 |
| ラック | 53 | 39 | 31 |

単位：cfu/100cm²，*Clado.*： *Cladosporium*，*Asp.*： *Aspergillus*，*Pen.*： *Penicillium*

表3 食パン工場の第2発酵工程の付着カビ

| 検査場所 | <i>Clado.</i> | <i>Asp.</i> | <i>Pen.</i> |
|---------|---------------|-------------|-------------|
| 床 | 570 | 421 | 351 |
| 壁 | 2600 | 1100 | 211 |
| 棚 | 580 | 336 | 35 |
| コンベアーの上 | 432 | 328 | 64 |

単位：cfu/100cm²，*Clado.*： *Cladosporium*，*Asp.*： *Aspergillus*，*Pen.*： *Penicillium*

次いで空中浮遊カビの多く検出された第2発酵工程（ホイロ）の付着カビの測定を行なった。この工程は温度35℃、湿度85%で40分間処理するのでカビは生育しやすい。

第2発酵工程の床、壁、棚、コンベアーの上の付着カビを測定した結果を表3に示した。工場内の床、壁、棚からは $5.7 \times 10^2 \sim 2.6 \times 10^3$ cfu/100cm²のカビが検出された。

コンベアーの上からは*Cladosporium*、*Aspergillus*、*Penicillium*のいずれのカビも $6.4 \times 10 \sim 4.3 \times 10^2$ cfu/100cm²のカビが検出された。なお*Moniliella*は第2発酵工程の棚より検出された。第2発酵工程の壁には多くのカビが検出された。製造中のこの工程の壁の温度が20℃前後とカビの生育に最適であり、湿度も最適の85%であったことによる。*Moniliella*は第2発酵工程の棚より検出されたところから、本工程でエタノールが生産されていることが予測されるが壁から本菌は検出されていない。*Moniliella*の生育にはエタノールが少ないともいえる。エタノールを環境殺菌剤として散布すると*Moniliella*が増殖すると考えられる。そこでエタノールと殺菌機構の異なる殺菌剤を使用

する必要がある。酢酸等の有機酸はエタノールとはほぼ同じ殺菌機構であるので殺菌効果は弱い。また殺菌剤のパンへの移行も予測されるので、残留性のない食品添加物であり、殺菌機構も異なるオゾンが効果的であると考えられる。

4. 食パン製造工程のカビ

当該工場はスポンジ・ドウ法によりにより製造を行っており、本方法は小麦粉の70%とイーストだけで中種を作り、第1発酵させた後、残りの全原料を加えて再度捏ね上げて、第2発酵（ほいろ）、焼成を行なう工程である。中種は25℃になるように捏ね上げてから湿度78%の第1発酵室で4時間発酵を行い、生地は発酵により1時間に1℃の割合で上昇するため醗酵室内の温度は上昇する。また生地のpHは1時間に0.15の割合で低下し、発酵終了時のpHは5.3となった。これは生地の発酵中に生産される有機酸が生地を酸性にするためである。製造工程中のpHの変化を検討すると、中種の捏ね上がりで6.2、中種発酵終了時で5.3、生地の捏ね上がりで5.6、焼き上がりの製品で5.8となった。焼き上がりのパンがパン生地よりもpHが高くなるのは焼成中に水分が蒸発するため水素イオン濃度が低くなるためである。第1発酵室内の空気中にも*Cladosporium*、*Aspergillus*、*Penicillium*のいずれのカビも存在するため生地に汚染して増殖するため中種発酵終了後の生地に 7.1×10^2 cfu/gのカビが検出され、分割、丸目、成型、第2発酵で 1.5×10^3 、 3.4×10^3 、 7.3×10^3 、 8.2×10^3 cfu/gとなった。

一方、エタノールを多用して*Moniliella*の橙色斑点が生成した食パン工場では中種発酵終了後の生地に 3.5×10^2 cfu/gのカビが検出され、分割、丸目、成型、第2発酵で 6.5×10^2 、 6.4×10^2 、 8.2×10^2 、 1.2×10^3 cfu/gであった³⁾。これらの仕上げ工程を終えた生地は、ガスが抜かれて体積が非常に小さくなっている。焼成に先立ってこの生地を膨張させておく必要があるため、予定体積の70～80%になるまで第2発酵（ほいろ）をとり最終発酵させる。発酵促進を図る目的で温度を38℃と高くすると共に、生地表面の乾燥を防ぐために湿度を85%とするためカビの増殖が認められた。このため約40分間の第2発酵終

了時にカビ数は 8.2×10^3 cfu/gとなった。しかし成型工程等に比較してカビの増殖が以外と少ないのは発酵生産物として2.7%ものエタノールが生産されたためであると考えられる。

食パン製造工程におけるエタノール含量を測定し結果、中種発酵、分割、丸目、成型、第2発酵終了時でそれぞれ1.5、1.7、1.9、2.1、2.7%であった。また焼き上げ直後の食パンの内部のエタノールは0.6%となり、水分は48%であった。3時間放冷後にはエタノール0.4%、水分40%であった。

5. 食パンより分離したカビのオゾン水殺菌

食パン工場の空中浮遊カビを測定した結果、最も多く検出されたのは*Cladosporium*であり次に*Aspergillus*、*Penicillium*、*Aureobacidium*、*Moniliella*であった。これらのカビのオゾン水殺菌効果について検討した。オゾン水濃度1、5、8、10、15ppmで1分間から10分間処理を行った結果、いずれの菌株も同様の殺菌効果を示した。*Cladosporium*の結果を表4に示した。

表4 *Cladosporium*のオゾン水殺菌

| オゾン濃度 (ppm) | 殺菌効率(Log No/N), 処理時間 (分) | | |
|----------------|-----------------------------|---|----|
| | 1 | 5 | 10 |
| 1 | 1 | 2 | 2 |
| 5 | 2 | 2 | 3 |
| 8 | 2 | 3 | 4 |
| 10 | 3 | 4 | 4 |
| 15 | 5 | 5 | 5 |

殺菌効率(Log No/N), No; 初発菌数、N; 処理の菌数、初発カビ数; 1.1×10^5 cfu/g
オゾン水濃度15ppmでは、1分間、5分間、10分間処理でほぼ完全に死滅した。

要 約

1. 食パン工場の空中浮遊カビを測定した結果、各工程から検出されるカビの菌数は異なったが、菌叢はほぼ同じであった。スライス工程に最も多く、次いで第2発酵工程、包装工程であった。

いずれの工程でも *Cladosporium* が最も多く、次いで *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobaculum*, *Alternaria*, *Wallemia* が検出された。

2. 最も空中浮遊カビの多く検出されたスライス工程の床、壁、側溝、スライサー、ラックの付着カビを測定した結果、床、壁、側溝からは $1.4 \times 10^2 \sim 3.8 \times 10^2$ cfu/100cm² のカビが検出された。スライサーの各部分からは *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* が検出された。第2発酵工程の床、壁、棚、コンベアーの上の付着カビを測定した結果、工場内の床、壁、棚からは $5.7 \times 10^2 \sim 2.6 \times 10^3$ cfu/100cm² のカビが検出された。コンベアーの上からは *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* のいずれのカビも $6.4 \times 10 \sim 4.3 \times 10^2$ cfu/100cm² のカビが検出された。なお *Moniliella* は第2発酵工程の棚より検出された。

3. 中種発酵終了後の生地には 7.1×10^2 cfu/g のカビが検出され、分割、丸目、成型、第2発酵で 1.5×10^3 , 3.4×10^3 , 7.3×10^3 , 8.2×10^3 cfu/g となった。

4. 製造工程より検出された *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobaculum*, *Moniliella* のオゾン水殺菌効果について検討した。オゾン水濃度 1、5、8、10、15ppm で 1 分間から 10 分間処理を行った結果、いずれの菌株に対しても同様の殺菌効果を示した。*Cladosporium* はオゾン水濃度 15ppm では、1 分間、5 分間、10 分間処理でほぼ完全に死滅した。

参考文献

- 1) 内藤茂三：洋菓子のローブ生成原因微生物の分離・同定、愛知食品工試年報、27, 51-60 (1986)
- 2) 坪内春夫：食パンのカビ汚染、名古屋市衛生研究所報、35, 48-55 (1989)
- 3) 内藤茂三、関啓数、水野龍二：食パンから分離したエタノール耐性カビの生育性状と汚染源、日本食品微生物学会誌、17, 181-197 (2000)
- 4) Bennett, H.L. and Hunter, B.B.: Illustrated genera of imperfect fungi, 3rd ed., p.52-209, Burgess Publishing Company (1972)
- 5) De Hoog, G.S.: Taxonomic review of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *hyalodendron*. The black yeasts, II, *Moniliella* and allied genera, studies in mycology, No19, De Hoog, G.E. (ed.), p.1-36, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn (1979)