



Title	凍結保存中における生乳および殺菌クリームの細菌数変化
Author(s)	三河, 勝彦; MIKAWA, Katsuhiko; 有馬, 俊六郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 11(4), 336-344
Issue Date	1979-11-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11928
Type	departmental bulletin paper
File Information	11(4)_p336-344.pdf



凍結保存中における生乳および 殺菌クリームの細菌数変化*

三河 勝彦

(北海道大学農学部畜産食品製造学教室)

有馬 俊六郎

(北海道大学農学部酪農科学研究施設)

(昭和54年3月26日受理)

Changes in Bacterial Count of Raw Milk and Pasteurized Cream During Frozen Storage (Studies on the effects of psychrotrophic bacteria on milk quality part II*)

Katsuhiko MIKAWA and Shunrokuro ARIMA**

(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University; **Institute of Dairy Science,
Faculty of Agriculture, Hokkaido University,
Sapporo, 060 Japan)

牛乳やクリームを低温保存するには、ふつう0°C以上の温度が用いられるが、氷点下で凍結保存する事もバター原料としてのクリームでは行なわれている^{1,2)}。

凍結温度における細菌の発育限界はほぼマイナス10°C付近であると言われるが、この温度は菌の種類や、培地等に大きく左右される³⁻⁶⁾。氷点下の温度においては細菌の死滅も一般に認められ、温度が高いほど死滅率が大きい⁷⁻⁹⁾。この凍結貯蔵中の細菌死滅には2種類ある。ひとつは凍結・解凍時のいわゆる Immediate destruction であり、もうひとつは Storage death である^{8,10)}。MOSS & SPECK¹¹⁾による、乳酸菌 *S. lactis* を脱脂乳に浮遊させて-20°Cで凍結すると、その初期ほど損傷菌が多いという報告や、凍結食品中の細菌は最初に急速に減るといふ現象⁶⁾などは前者 Immediate destruction の例であろう。凍結に対する菌の抵抗性も種類によって異なり、一般に球菌が桿菌よりも高い耐凍性を示すといふ^{8,12,13)}。

氷点下の温度における細菌発育の実験は数多く行なわ

れているが^{8,14-16)}、牛乳を用い、しかも低温菌に注目して行なわれた研究は多くはない¹⁷⁾。また、保存温度を途中で変える実験もあまりない¹²⁾。これは温度を変化させる事によって貯蔵中の牛乳の物理的性質が変化し、脂肪球^{18,19)} やタンパク質^{16,20)} が不安定になるという理由によるものであろう。

本報では長期間にわたり凍結保存を行なう際に、生乳中で低温菌がいかなる菌数変化を示すか、また保存温度を変化させた場合はどうかという点を、標準平板菌数 (SPC) と対比しながら検討し、同時に殺菌クリームについても SPC の消長を調べた。また低温菌数測定法としての APHA 法と LEESMENT & DUFEU 法との比較も行なった。

実験材料および実験方法

生乳試料は北海道大学附属農場の牛群から搾乳した新鮮混合乳を、滅菌三角フラスコに1回の分析に必要な量 (100 ml) 宛分注し、各種温度条件で50日間まで保存し

* 「牛乳より分離した低温菌のタンパクおよび脂肪分解性におよぼす温度の影響」、酪農科学の研究, 22: A-176-186. 1973 を「乳質におよぼす低温菌の影響に関する研究」第I報とし、本報を同第II報とする。

* Part I of this series is: Jap. J. Dairy Sci., 22: A-176-186. 1973

た。クリームは札幌市内市乳処理工場の調製による脂肪率56%のものを使用した。その一部は20°C、140 kg/cm²の条件で均質化した後、均質化しない試料と同時に74°C 25分間バッチ法で殺菌を行なってから0°Cで1夜保存した。両試料は翌日滅菌三角フラスコに100 ml 宛分注し、この時点をも0日として50日まで各温度で保存した。なお、以上の生乳およびクリームはいずれも夏期8月の試料である。

菌数測定は所定の時点毎に上記フラスコを1個ずつ取出し、凍結した試料を30°Cのウォーターバス中で解凍したものについて行なった。一般生菌数の測定にはAPHAのStandard Methods²¹⁾の標準平板培養法を採用し、Standard Methods Agarで35°C 48時間培養を行なって標準平板菌数(SPC)を算出した。

低温菌数(PTC)測定法の比較はStandard Methods²¹⁾(6°C 7日間)とLEESMENT & DUFEU法²²⁾(17°C 16時間の前培養に続いて6°C 4日間)について行なった。これには上記生乳試料の他、別ロットの北海道大学附属農場生産混合乳、札幌市内N牧場生産混合乳、札幌市内市乳処理工場受入れ原料乳の計3種類にそれぞれ次の様な処理を施して追加試料とした。すなわち、①生乳そのまま、②75°C 15分間の実験室殺菌、③この殺菌乳に*Pseudomonas fluorescens* AHU 1143を接種したものの3通りである。本菌は北大農学部応用菌学教室より分与されたもので、普通寒天斜面で22°C 24時間の培養を連続数回くり返した後、脱脂乳で22°C 24時間培養したものを、ふたたび脱脂乳に植え、17°C 16時間経過後さらに6°Cで4日間培養した。これを希釈液²¹⁾で1,000倍に希釈し、乳量に対して1/100量を接種した。

結果および考察

1. 生乳

低温、特に凍結によって細菌細胞に障害が起り、さらには死滅する原因としては、細胞内氷晶生成、やや不完全な脱水、塩類濃縮の3つが重要なものであり、また、融解にともなう氷晶の形状変化もその原因とされている^{23,24)}。これに対し、凍結点以上の温度における細菌の死滅は、菌の増殖停止温度以下でも酵素の一部が依然として活性を維持するために、代謝異常が起るからであると考えられている²⁵⁾。従って増殖停止温度が明らかに氷点下である低温菌の場合には、上述の死滅原因の総てが関わっていると考え事ができよう。さらに、菌死滅の速度は菌の種類、培養期、菌濃度、分散媒、凍結条件、保存条件、融解条件等によって左右されるといわれる^{26,27)}。

本実験で用いた-2°Cという保存条件は牛乳の凍結点である-0.515~-0.577°C^{16,28)}よりもやや低く、一般に最大氷晶帯といわれる-1~-5°C^{29,30)}に含まれる温度である。設定温度に対する変動の範囲を実測した結果は-2.2±1.7°C程度(中心温度±上下限温度)であり、変動はかなり大きいといえる。このような温度においては牛乳が凍結しても、保存中にそれが融解する可能性も考えられる。事実、本実験においては所定時間保存後にとり出した時点で凍結していない試料も見うけられた。なおたとえ周りの水分が凍結しても、-2°C位では細胞中に含まれる成分のために氷晶は生成しないといわれている¹⁰⁾。

本実験では保存温度を0°C以下に設定したが、+2°Cについても対照の意味で実験を行なった。Fig. 1にはこの+2°Cの他、-2°Cおよび-25°Cで保存した生乳について、PTC(LEESMENT & DUFEU法およびAPHA法)とSPCを示した。+2°CではPTC、SPC共に約

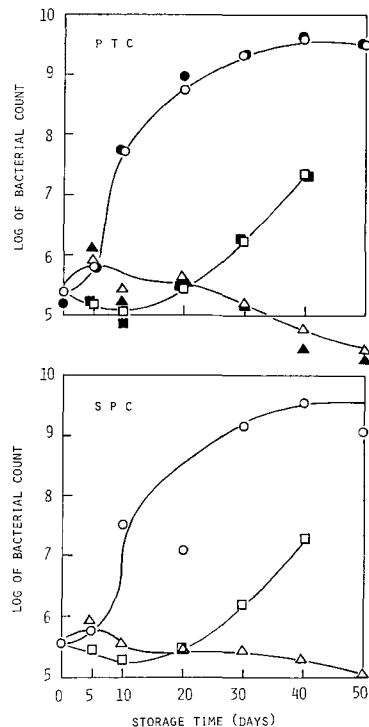


Fig. 1. Standard plate count (SPC: 35°C 48 h) and psychrotrophic count (PTC: 17°C 16 h followed by 6°C 4 d, open symbols; 6°C 7 d, closed symbols) of frozen stored raw milk: ○—○ +2°C, □—□ -2°C, and △—△ -25°C.

30日間で $10^9/\text{ml}$ を越え、40日目で定常期と思われる最高値に達している。20日目のSPCが全体の傾向から大きくずれているが、誤差にしては大き過ぎるようであり、原因は不明である。最も増殖速度の大きい5~10日における平均世代時間は中温菌(SPC)で20.17時間、低温菌では両測定法平均の値が18.35時間であった。この世代時間はMORITAの総説³¹⁾に掲げられた低温菌世代時間の分布範囲に含まれている。

牛乳やクリームを 0°C で保存すると、細菌数が一時的に減り、それに続いて増加するのは一般的に認められた現象であるといわれる¹⁴⁾。Fig. 1において -2°C のグラフを見ると、保存10日目までは菌数がPTC, SPC共に低下を示し、20日目でほぼ最初の菌数程度まで増殖している。上述のように本実験では温度のふれが大きい。従って -2°C よりも温度が上昇して 0°C 近くになった時には一部液状水が生成し、この状態では細菌繁殖の可能性が生じる³²⁾。けれども再び温度が低下すると凍結が始まる。この結果、凍結融解のくり返しが起って菌が死滅し、数が減少したものと考えられる。しかし、生存している菌は、完全に凍結せずに残っている液状水中で増殖を始め、これが対数増殖期になって死滅速度を上まわる時点(20日目以後)で、急激に測定菌数が増加するものと推察される。この20日目以後の増殖速度は低温菌、中温菌共に $+2^\circ\text{C}$ における対数増殖期後半の発育とあまり変わらず、その平均世代時間は20~40日間について低温菌では両測定法平均で77.09時間、中温菌では80.46時間であった。 -2°C 程度の低温では、生乳の細菌数の増加は約20日間迄しか抑制されず、それ以上では急速に菌数増加の起きる事は注目すべきである。

ここで増殖を始めた細菌の数を、 35°C で培養した中温菌(SPC)と低温菌とについて比べてみるとほぼ同数である(Fig. 1)。牛乳を 0°C 以上の低温で保存した場合、一般に中温菌数と低温菌数は近い値になる傾向が認められるが^{33~35)}、しかし低温菌数の方が多くなるケースもある³⁶⁾。本実験のデータは、凍結保存という条件にもかかわらず、増殖する菌叢の殆んどがいわゆるPsychrotrophs³⁷⁾であって、真のPsychrophilesではないことを示唆している。

-25°C で凍結保存を行なって5日目に生乳の菌数はPTC, SPC共に一たんわずかに上昇し、続いて貯蔵日数の経過につれてゆっくりと減少を示した(Fig. 1)。この減少速度は中温菌よりも低温菌で大きく、一般にいわれているような低温菌が中温菌よりも耐凍性が大きいという説^{32,38)}とは反対の結果を示している。この原因は、

前述のように真のPsychrophilesではなくPsychrotrophsが菌叢の殆んどを占めると考えれば、凍結障害によってこの菌の 6°C における発育能が低下したためであると推定することができる。READら³⁸⁾は生乳を -20 , -78 , および -196°C の各温度で28日間凍結保存し、SPCの変化を観察したが、菌数は試料により大きく変動し、増加したものも認められると報告している。またJOHNS & BERZINS³⁹⁾は凍結した牛乳やクリームにおいて同様にSPCが増加する現象を認め、原因は不明であると述べている。一方、低温菌は牛乳中でクランプを作る傾向のある事が知られている^{40,41)}。このことから推察すると、死滅のまだ少ない保存初期には凍結時あるいは解凍時に際し、このクランプが分散するために、菌数が増加を示すものと考えられる。今もし、この菌数増加がないものと仮定しても、 -2°C と -25°C の菌数を比べた場合、20日間までは明らかに -25°C の方がPTC, SPC共に高い値を示している。氷点下の温度で食品を保存する際に、温度の高い方が菌の死滅が大きいという事は一般に認められている^{6,8,42)}。HAINES¹³⁾によれば*E. coli*ではこの現象は150日以上も続くというが、本実験の場合には20日目を過ぎる頃から -2°C において低温菌の増殖が死滅を上廻る様になるために -25°C における菌数との逆転が生じている。

牛乳の凍結保存を行なう場合には一定の温度で保持するのが普通であるが、この理由は温度の変化が多ければ牛乳の物理的性質が損われるためである^{16,18~20)}。本報では細菌学的観点から敢て貯蔵温度の移動を試みたがこの試みには同時に経済的な側面からの意図も含まれている。 -25°C で5時間放置することにより凍結した生乳試料を -2°C で保存すると、Fig. 1の -2°C で見られたような菌数の減少が5~10日間にわたって認められ、続いて一定菌数が保たれた後、40日目を過ぎる頃から急速な増殖が観察された(Fig. 2)。この結果はPTC, SPCの双方で共通しているが、PTCの減少がSPCの減少に比べてやや大きい。最初から -2°C で保存したFig. 1に比較してみると、 -25°C 処理が菌数の増加を15~20日間にわたって遅らせていることが判る。もし牛乳の物理的な変化を考慮に入れなければ、本処理は細菌学的に非常に効果的な貯蔵法であると考えられる。

生乳を $+2^\circ\text{C}$ で各5, 10, 15日間保存した後、 -25°C に移して凍結させた実験結果(Fig. 2)からは、 $+2^\circ\text{C}$ における各保存期間に応じて異なった過程が見られる。5日間および15日間 $+2^\circ\text{C}$ で保存後に凍結した試料では、菌数の増加は約15日間続き、20~30日目にピークに達し、

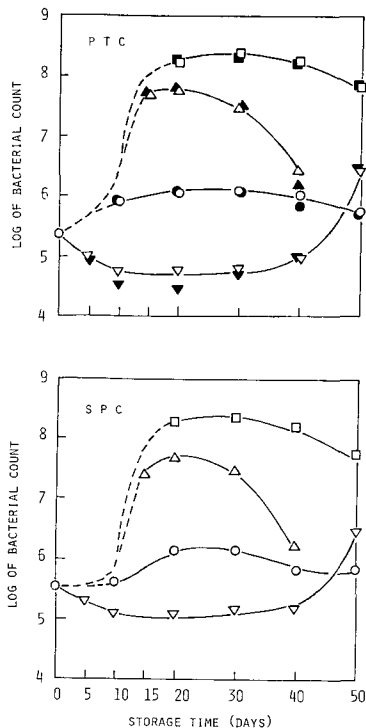


Fig. 2. SPC and PTC (17°C 16 h followed by 6°C 4 d, open symbols; 6°C 7 d, closed symbols) of frozen stored raw milk:
 ▽—▽ frozen at -25°C for 5 h and stored at -2°C
 ○—○ stored at +2°C for 5 d and frozen at -25°C
 △—△ stored at +2°C for 10 d and frozen at -25°C
 □—□ stored at +2°C for 15 d and frozen at -25°C.

以後したいに Fig. 1 における -25°C 保存乳の菌数とはほぼ同じ割合で減少した。この傾向は PTC および SPC のいずれにおいても同様に認められた。一方 +2°C で 10 日間保持した生乳を -25°C で凍結させた場合には、それ以後の菌数の増加は約 10 日間しか認められず、ひき続いて起る菌数減少の速度も他の 2 試料 (+2°C の保存期間が 5 日間および 15 日間のもの) に比べてかなり大きいのが注目される。これは +2°C で 10 日間という保存期間が本実験条件における細菌の発育にとってはちょうど対数増殖期の中央付近であり (Fig. 1), そのため他の時点で -25°C に移した試料よりも耐凍性が低く⁴³⁾, 急激に菌数が減少したものと考えられることができる。

2. 殺菌クリーム

脂肪率 56% のクリームを 74°C で 25 分間殺菌の後、生乳の場合と同じ各種温度で保存した際の SPC 変化を Table 1 に示した。+2°C の場合、菌数は均質化したクリーム (Table 1 カッコ内の数字) を含め 20 日間までは全く増加を示さず、誘導期にとどまっているが、25 日目を過ぎる頃から急速な増殖が始まった。-2°C および -25°C に連続保存した場合、また -25°C で 5 時間放置して凍結の後、-2°C で保存した場合には菌数の増加が殆んど認められず、これは ROADHOUSE & HENDERSON の結果とも一致した⁴⁴⁾。-2°C の 45 日目および -25°C の 15 日目で 1 桁高い数字が現われているが、全体の傾向からすると、これらはあまり大きな意味を持つものではない様に見うけられる。しかし、Fig. 1 の SPC の場合と同様、データのばらつきとしては、やや大きすぎると考えられる。この原因は不明である。+2°C で 5 日間または 10 日間保存の後、-25°C で凍結したクリームの場合も最後まで菌数増加は見られなかったが、+2°C で 15 日間保存後に -25°C で凍結した試料では、最終の 50 日目で対数増殖期の初めと考えられる 1 桁高い菌数を示した。

FABIAN & TROUT⁴⁵⁾ は殺菌クリームを凍結保存する場合、ホモジナイズの圧力に応じて最初の菌数が多くなり、保存中にその差は少なくなることを報告している。本実験の均質化クリームでは当初の菌数が未処理試料に比べて逆にやや少なく、凍結保存中の菌数の多少に関する一定の傾向は認められなかった。しかし、+2°C で連続保存したものおよび +2°C での保持期間の長い均質化クリームでは、明らかに殺菌前の均質化処理によって菌数の多くなる結果が得られた。

SMITH⁴⁶⁾ は殺菌クリームを +1.7°C で保持すると 6 週間は保存可能というデータを出しているが、本実験における +2°C の場合には、やや温度が高いためもあり、保存限度は 4 週間程度であった。それ以外の氷点下の温度における保存では、最高 2 週間まで +2°C に放置後に凍結した場合でも、本実験の条件下で最低 50 日間は細菌学的な意味で安全に保存できることが示された。

殺菌クリームの保存中の菌数増加を生乳のそれ (Fig. 1 および 2) と比較してみると非常に様相が異なっている。+2°C の場合にはある時点から急速に菌数が増すという共通点が見いだされるが、その他の温度ではかなりかけはなれ、クリームでは -2°C における菌の増殖、-25°C における菌数の減少が殆んど認められない。生乳とクリームという製品の違いにもよるのであろうが、

Table 1. Standard plate count of frozen stored laboratory pasteurized cream ($\times 10^{-3}$)

Days of storage	Storage temperature							
	+2°C	-2°C	-25°C	-25°C $\xrightarrow{5h}$ -2°C	+2°C $\xrightarrow{5d}$ -25°C	+2°C $\xrightarrow{10d}$ -25°C	+2°C $\xrightarrow{15d}$ -25°C	
0	6.7 (4.2)*	—	—	—	—	—	—	—
5	5.2	3.5	4.5	3.6	—	—	—	—
10	5.0	4.6	3.9	2.7	2.4	—	—	—
15	4.9 (160)	4.3 (4.9)	13 (5.4)	4.7 (8.7)	8.1 (5.7)	8.2 (10)	—	—
20	4.5	5.0	6.1	7.2	5.5	—	4.1	—
25	29	2.7	4.4	5.2	6.2	5.0	3.4	—
30	3,300 (18,000)	3.8 (1.9)	4.0 (0.9)	2.8 (1.8)	2.7 (2.5)	5.2 (6.6)	3.9 (50)	—
35	—	2.1	3.9	1.4	4.7	3.0	3.5	—
40	1,200	3.1	5.5	1.7	—	3.7	3.9	—
45	— (20,000)	49 (4.4)	6.3 (4.6)	2.6 (4.6)	5.6 (5.8)	4.8 (7.9)	2.6 (29)	—
50	4,000	3.8	—	1.5	2.7	1.1	28	—

* Values in parentheses represent the SPC of homogenized samples.

最も大きな原因は殺菌による菌叢の変化であると考えられる。低温菌が一般に普通の殺菌条件で殆んど死滅することは良く知られている⁵⁾。殺菌クリーム中に生き残った菌は耐熱性を有する中温菌がほぼ主体であろうと想定される。このために生乳で見られたような-2°Cにおける発育が認められなかったものと考えられる。-25°Cでの菌数の減少がクリームで殆んど見られない原因は、Fig. 1のSPCがPTCよりも-25°Cでの減少率が少ないことから、殺菌クリームにおける生残中温菌の耐凍性が大きいと推定することによって説明できよう。

3. 低温菌数測定法の比較

Fig. 1およびFig. 2における低温菌数は6°C 7日間培養 (APHA法) と17°C 16時間—6°C 4日間培養 (LEESMENT & DUFEU法) の両法によるプロットがなされており、これらの数値は実用上殆んど等しいとみなすことができる。この点を確かめるために、上述の実験で得たデータを含めて各種生乳49、殺菌乳9、実験室殺菌乳に *Pseudomonas fluorescens* の純粋培養を植えたもの、およびこれらを低温保存したもの12の以上総計70試料について、上記2方法による低温菌数の比較を行った (Fig. 3)。

相関係数は $r = +0.998$ でその母集団の99%信頼限界は0.9961~0.9989である (Table 2)。回帰式は $Y = 1.0190 (\pm 0.0080) X - 0.1719$ 但し、Yは6°C法による菌数の対

数であり、Xは17°C—6°C法における菌数の対数である。両法による菌数の対数値の差は正規分布をしていないが⁴⁷⁻⁴⁹⁾、この差の有意性の検定をノンパラメトリック法⁴⁸⁾で行なってみると、 $P < 0.05$ の危険率で差は有意であった。回帰直線から見ると、菌数が $6 \times 10^8 / \text{ml}$ 以下で

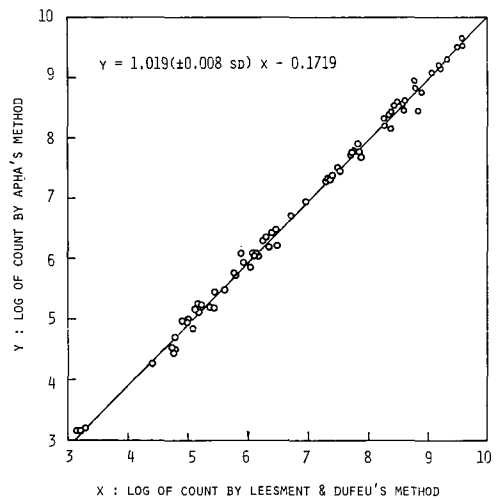


Fig. 3. Relationship between APHA's method (6°C 7 d) and Leesment & Dufeu's method (17°C 16 h followed by 6°C 4 d) for psychrotrophic count of cold stored various milk.

Table 2. Correlation between three kinds of bacterial counts

X Log count at	Y Log count at	Number of pairs (n)	Correlation coefficient (r)	99% Confidence interval in the universe of r	Regression equation
17/6°C ^{a)}	6°C ^{b)}	70	0.9979 (P<0.001)	0.9961-0.9989	$Y=1.019 X-0.1719$
17/6°C	35°C	175	0.9422 (P<0.001)	0.9155-0.9606	$Y=0.8401 X+1.0119$
6°C	35°C	60	0.9745 (P<0.001)	0.9502-0.9870	$Y=0.8618 X+0.9089$

a) Leesment & Dufeu's method²²⁾b) APHA's method²¹⁾

は LEESMENT & DUFEU 法による菌数が APHA 法のそれよりも高く、この差は菌数が少ないほど大きくなっている。しかし相関係数 $r=+0.998$ は非常に高いものであり、回帰式から APHA 法の菌数をかなり高い精度で推定できるので、この LEESMENT & DUFEU 法は低温菌数を測定する方法としては、充分実用になると結論された。

低温菌数測定に際してその培養時間を短縮しようとする試みは種々行なわれている。SOBECK-SKAL & NEUER⁵⁰⁾ はスライドグラスと顕微鏡を用いる Little plate 法によって低温菌数を測定する場合に LEESMENT & DUFEU 法を小型化したものともいえる 17°C 4 時間-7°C 2 時間培養法が良いとしている。また JUFFS⁵¹⁾ は 15°C で 24 時間培養後 5~7°C で 3 日間培養を続ける方法が 7°C 10 日間法の菌数と 5% レベルで有意差のないことを認めた。LEESMENT & DUFEU 法と APHA 標準法との比較は WAES⁵²⁾ が行なっている。彼によれば、殺菌乳については両法が良く一致するけれども、生乳では差が大きいという。本実験の場合は生乳、殺菌乳、さらに殺菌乳に *Ps. fluorescens* を植えた計 3 種類の試料が含まれているにも拘わらず両法は良く一致している。彼の実験と本実験の結果の差は主として培養時間の差に由来するものと思われる。

一方、35°C 48 時間培養で測定した SPC と上述の 2 方法で測定した PTC とを比べるため、すでに掲げた試料の他にさらに試料数を増し、各種生乳 76、市販殺菌乳 53、実験室殺菌乳 23、およびこれに *Ps. fluorescens* を植えたもの 23 の総計 175 試料について 17/6°C 法による PTC (対数: X) と SPC (対数: Y) との相関を、また生乳 47、実験室殺菌乳 6、これに *Ps. fluorescens* を加えたもの 7 の合計 60 試料について 6°C 法による PTC (対数: X) と SPC (対数: Y) との相関を求めた。Table 2 に示したように、それぞれ +0.942 および +0.975 の相

関係数が得られ、これらはいずれも 0.1% 水準で有意であった。

要 約

生乳および脂肪率 56% の殺菌クリームを -25°C、-2°C、+2°C、またはこれらの温度間を途中で移動させて 50 日間貯蔵し、経時的に生乳では標準平板菌数 (SPC) と低温菌数 (PTC) を、クリームでは SPC を測定した。さらに PTC について APHA 法と LEESMENT & DUFEU 法とを比較した。その結果は次の通りである。

1) 一定温度に生乳を保存した場合: -25°C では一たん菌数が僅かに増加した後すぐに減少した。-2°C ではこれとは逆に一たん減少の後、20 日目を過ぎる頃から急速に増加した。20~40 日間における -2°C の平均世代時間は、中温菌 (SPC) では 80.5 時間、低温菌では 77.1 時間であった。また +2°C では 30 日間で $10^9/\text{ml}$ を越える菌数に達し、最大の増殖は 5~10 日間で見られた。その間の平均世代時間は中温菌で 20.2 時間、低温菌では 18.4 時間であった。

2) 生乳の保存温度を途中で変えた場合: -25°C で 5 時間放置して凍結の後 -2°C で保存すると菌数は一たん低下し、そのまま約 40 日間殆んど増加を見せなかった。+2°C で 5~15 日間保持の後に -25°C で凍結保存すると、+2°C に保つ時間に比例してピークの菌数が多くなり、ピーク後の減少率は +2°C で 10 日間保持したものが最大を示した。

以上 1) と 2) の菌数変化は SPC と PTC の両方に認められ、両者間に大きなへだたりは見られなかった。したがって菌叢の主体は Psychrophiles ではなく Psychrotrophs であると推察された。これらの結果から、もし牛乳の物理的変化を考慮しなければ、生乳の細菌学的品質を 30~40 日間保つには、-25°C で凍結させた後に -2°C で保存する方法が経済的にみて優れていると考

えられた。

3) 殺菌クリームの場合: +2°Cで30日間以上保存すると急激に菌数が増加する以外, いずれの条件においても50日間まで目立った菌数の増加は認められなかった。均質化した試料では+2°Cにおける菌数の増加が目立った。

4) 低温菌数測定における APHA 法 (菌数の対数: Y) と LEESMENT & DUFEU 法 (菌数の対数: X) との間には $r=+0.998$ ($P<0.001$) の相関が認められ, $Y=1.0190 X-0.1719$ の回帰式が得られた。

本研究を行なうにあたり有益なご指導, ご助言をいただいた安井勉教授に感謝の辞を表します。また生乳試料を提供していただいた永野牧場, クリームを提供していただいた雪印乳業札幌研究室の皆様へ感謝致します。

引用文献

1. 猪木三吉・西村英夫: 乳業技術講座 2, 乳製品製造学 I, (同講座編集委編), p. 42. 朝倉書店, 1967
2. TRESSLER, D. K. and EVERS, C. F.: The freezing preservation of foods, 3rd ed., Vol. 1, p. 867-871. AVI Publishing Co. Inc., Westport, Conn., 1957
3. STOKES, J. L.: Recent progress in microbiology VIII, 8th Int. Congr. Microbiol. Montreal 1962, p. 187-192. Univ. Tokyo Press, 1963
4. INGRAHAM, J. L. and STOKES, J. L.: Psychrophilic bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **23**: 97-108. 1959
5. WITTER, L. D.: Psychrophilic bacteria ... A Review, *J. Dairy Sci.*, **44**: 983-1015. 1961
6. BORGSTROM, G.: Microbiological problems of frozen food products, *Adv. Food Res.*, **6**: 163-230. 1955
7. HUCKER, G. J., BROOKS, R. F. and EMERY, A. J.: The source of bacteria in processing and their significance in frozen vegetables, *Food Technol.*, **6**: 147-155. 1952
——— cited from 6.
8. SAMUELSSON, E.-G., THOMÉ, K. E., BORGSTRÖM, G. and HJÄLMDAHL, M.: The manufacture and storage of frozen milk and cream Part II, A review, *Dairy Sci. Abstr.*, **19**: 975-984. 1957
9. ULRICH, J. A. and HALVORSON, H. O.: Changes in foods during storage in frozen conditions, *Hormel Inst. Univ. Minn. Ann. Rept.*, **48**: 48-52. 1947
10. WEISER, R. S. and OSTERUD, C. M.: Studies on the death of bacteria at low temperatures; I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **50**: 413-439. 1945
11. MOSS, C. W. and SPECK, M. L.: Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and storage, *J. Dairy Sci.*, **45**: 654. 1962
12. 堀江 進: 冷凍調理食品の細菌, *ニュー・フード・インダストリー*, **14**(5): 2-9. 1972
13. HAINES, R. B.: *Proc. Roy. Soc.*, **124B**: 451. 1938
——— cited from 43.
14. HAMMER, B. W.: Dairy bacteriology, 3rd ed., p. 194-198. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1948
15. 谷川英一: 水産細菌学, p. 322-337. 生活社, 1948
16. 穴釜雄三: 乳製品製造学, p. 49, 324, 462. 光琳書院, 1967
17. PENNINGTON, M. E.: Bacterial growth and chemical changes in milk kept at low temperatures, *J. Biol. Chem.*, **4**: 353-393. 1908
18. 菊池美世子・金 栄 教・有馬俊六郎・橋本吉雄: クリームの冷蔵保存に関する研究—位相差顕微鏡による脂肪球の観察, 北海道栄養食糧学会誌, **10**: 65. 1964
19. LAGONI, H. und PETERS, K.-H.: Die Gefrierdestabilisierung von Milch und Rahm, ein Problem der Wärmeleitfähigkeit, *Milchwissenschaft*, **16**: 197-200. 1961
20. DOAN, F. J. and WARREN, F. G.: Observations on the instability of the protein phase of frozen concentrated milk, *J. Dairy Sci.*, **30**: 837-848. 1947
21. American Public Health Association: Standard methods for the examination of dairy products, 11th ed., p. 47 & 148. APHA, New York, 1960
22. LEESMENT, H. and DUFEU, J.: A Rapid method for determining the psychrophilic count in milk, *Proc. 16th Int. Dairy Congr.*, **C**: 392-397. 1962
23. 森地敏樹: 凍結・乾燥と細胞障害 (根井外喜男編), p. 45-63. 東大出版会, 1970
24. 森地敏樹: 細菌の凍結傷害, *化学と生物*, **7**: 400-406. 1969
25. 石田祐三郎: 冷蔵・冷凍と微生物, *食品工誌*, **18**: 538-546. 1971
26. 森地敏樹: 乳酸菌の凍結・乾燥とその利用性, 乳技協資料, **21**(4): 3-14. 1971

27. MAZUR, P.: Cryobiology (MERYMAN, H. T. ed.), p. 213. Academic Press, 1966
——— cited from 26.
28. POTTER, F. E. and ARIMA, S.: The Freezing point of milk from individual cows, *J. Dairy Sci.*, **43**: 1888. 1960
29. 加藤舜郎：低温生物学概説(根井外喜男編), p. 160-194. 東大出版会, 1971
30. 橋本吉雄：凍結が畜肉の組織学的構造の変化並びに理化学的性状に及ぼす影響に関する研究—特に最大氷結晶生成帯に於ける影響, 北海道大学農学部畜産製造学教室, 1959
31. MORITA, R. Y.: Psychrophilic bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **39**: 144-167. 1975
32. FARRELL, J. and ROSE, A. H.: Low-temperature microbiology, *Adv. Appl. Microbiol.*, **7**: 335-378. 1965
33. JUFFS, H. S.: Proteolysis detection in milk; III. Relationships between bacterial populations, tyrosine value and organoleptic quality during extended cold storage of milk and cream, *J. Dairy Res.*, **42**: 31-41. 1975
34. 小川益男：牛乳の低温菌に関する衛生学的研究, 東京農工大農学部報告, No. **11**: 1-88. 1968
35. BUSSE, M.: Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der bakteriologischen Qualität kühlgelagerter Milch, *Milchwissenschaft*, **21**: 289-293. 1966
36. GRÜN, L. und KONSTANTINIDOU, A.: Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in kühlgelagerter Rohmilch, *ibid.*, **26**: 413-415. 1971
37. EDDY, B. P.: The use and meaning of the term 'psychrophilic', *J. appl. Bact.*, **23**: 189-190. 1960
38. READ, R. B. Jr., BRADSHAW, J. G. and FRANCIS, D. W.: Effect of freezing raw milk on standard plate count, *J. Dairy Sci.*, **52**: 1720-1723. 1969
39. JOHNS, C. K. and BERZINS, I.: The effect of freezing on the standard plate count of milk, *J. Milk Food Technol.*, **18**: 297. 1955
40. LA GRANGE, W. S. and NELSON, F. E.: Bacteriological evaluation of manufacturing-grade bulk-tank milk, *J. Dairy Sci.*, **44**: 1440-1445. 1961
41. LA GRANGE, W. S.: Manufacturing milk quality: A re-evaluation, *J. Milk Food Technol.*, **34**: 249-255. 1971
42. GEORGALA, D. L. and HURST, A.: The survival of food poisoning bacteria in frozen foods, *J. appl. Bact.*, **26**: 346-358. 1963
43. 大林容二：低温生物学概説(根井外喜男編), p. 81-116. 東大出版会, 1971
44. ROADHOUSE, C. L. and HENDERSON, J. L.: *Food Industr.*, **12**: 54. 1940
——— cited from 8.
45. FABIAN, F. W. and TROUT, G. M.: Influence of various treatments on the bacteria content of frozen cream, *J. Dairy Sci.*, **26**: 959-965. 1943
46. SMITH, A. C.: The effects of storage temperatures on the keeping quality of half and half, *J. Milk Food Technol.*, **34**: 574-575. 1971
47. SNEDECOR, G. W.: 統計的方法(畑村又好ら訳), 4版, p. 171-178. 岩波書店, 1954
48. SNEDECOR, G. W. and COCHRAN, W. G.: 統計的方法(畑村又好ら訳), 6版, p. 123-126. 1976
49. 寺田一彦・鈴木栄一：推測統計法, p. 43-67. 朝倉書店, 1974
50. SOBECK-SKAL, E. und NEUER, B.: Untersuchungen zur Keimzahlbestimmung nach der Kleinplattenmethode unter besonderer Berücksichtigung der Psychrotrophenzählung in Rohmilch, *Österr. Milchwirtsch., Wiss. Beil.*, **24**: 7-18. 1969
51. JUFFS, B. H. S.: A four-day count for psychrotrophs, *Austr. J. Dairy Technol.*, **25**: 30-32. 1970
52. WAES, G.: Some observations on the enumeration of psychrotrophic bacteria in milk, *Milchwissenschaft*, **21**: 282-285. 1966

Summary

Standard pate count (SPC) and psychrotrophic count (PTC) on raw milk sample and SPC on pasteurized cream sample containing 56% fat were periodically determined during storage at various temperatures up to 50 days: -25°C , -2°C , $+2^{\circ}\text{C}$, -2°C after 5 h-storage at -25°C ; and -25°C after 5 day-, 10 day-, or 15 day-storage at $+2^{\circ}\text{C}$.

The following results were obtained.

1) Constant temperature storage of raw milk: The bacterial count of the sample stored at -25°C increased slightly in the early period of storage and then decreased gradually. On the contrary, the bacterial count of milk stored at -2°C decreased slightly in the initial 10 days and then increased rapidly after 20 days of storage. Mean generation times at this rapid increasing stage were 80.5 h and 77.1 h for SPC and PTC, respectively. The bacterial number of the sample stored at $+2^{\circ}\text{C}$ went up to over $10^9/\text{ml}$ within 30 days. A maxi-

mum growth was observed between 5 and 10 days storage and their mean generation times were 20.2 h and 18.4 h for SPC and PTC, respectively.

2) Effect of temperature shift during storage on raw milk: The bacterial count of the sample stored at -25°C for 5 h and then at -2°C decreased during the initial 10 days and kept the same level of population up to 40 days. The maximum bacterial count of the samples stored at $+2^{\circ}\text{C}$ for 5 to 15 days and subsequently to -25°C were proportional to the length of storage at $+2^{\circ}\text{C}$. After the peak of growth, the sample of 10-day holding at $+2^{\circ}\text{C}$ reduced the count most rapidly.

In the results of above 1) and 2), there were little differences between the bacterial counts of SPC and of PTC. This finding suggests that a major part of the bacterial flora is not psychrophiles but psychrotrophs. The above results also indicate

that the shifting of storage temperature to -2°C after freezing at -25°C might be economical in order to keep good bacterial quality of raw milk for 30 days, although some physical problems in freezing remained.

3) Little increase in SPC were observed during 50 days storage of non-homogenized cream at all tested conditions except at $+2^{\circ}\text{C}$. Homogenized cream stored at $+2^{\circ}\text{C}$ showed a remarkable increase in SPC after 30 days or longer.

4) Comparison of PTC enumeration methods between Leesment & Dufeu's (log of the count: X) and APHA's (log of the count: Y) gave a regression equation written as

$$Y = 1.0190 X - 0.1719$$

and there was a correlation coefficient of $+0.998$ ($P < 0.001$).