

FIGURE 25. PCR amplification products of a part of 18SrDNA using the triplicate DNAs prepared by six protocols in this study. (A); *Geotrichum candidum*, (B); *Penicillium expansum*, (C); *Talaromyces bacillisporus*, Lane M; PCR makers (NOVAGEN) as molecular size makers; lanes 1-3: SDS method with beads grinding; lanes 4-6: SDS method without beads grinding; lanes 7-9: CTAB method with beads grinding; lanes 10-12: CTAB method without beads grinding; lanes 13-15: benzyl chloride method with beads grinding; lanes 16-18: benzyl chloride method without beads grinding.

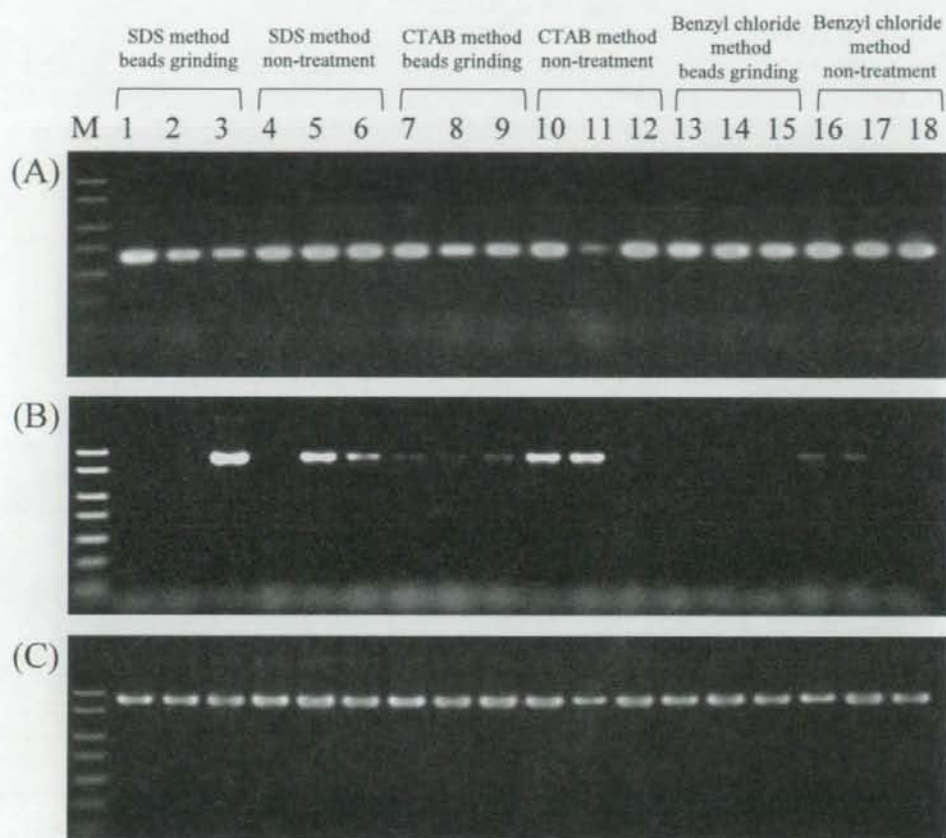


FIGURE 26. PCR amplification products of a part of 18SrDNA using the triplicate DNAs prepared by six protocols in this study. (A); *Trichoderma viride*, (B); *Absidia corymbifera*, (C); *Mucor hiemalis*. Lane M; PCR makers (NOVAGEN) as molecular size makers; lanes 1-3: SDS method with beads grinding; lanes 4-6: SDS method without beads grinding; lanes 7-9: CTAB method with beads grinding; lanes 10-12: CTAB method without beads grinding; lanes 13-15: benzyl chloride method with beads grinding; lanes 16-18: benzyl chloride method without beads grinding.

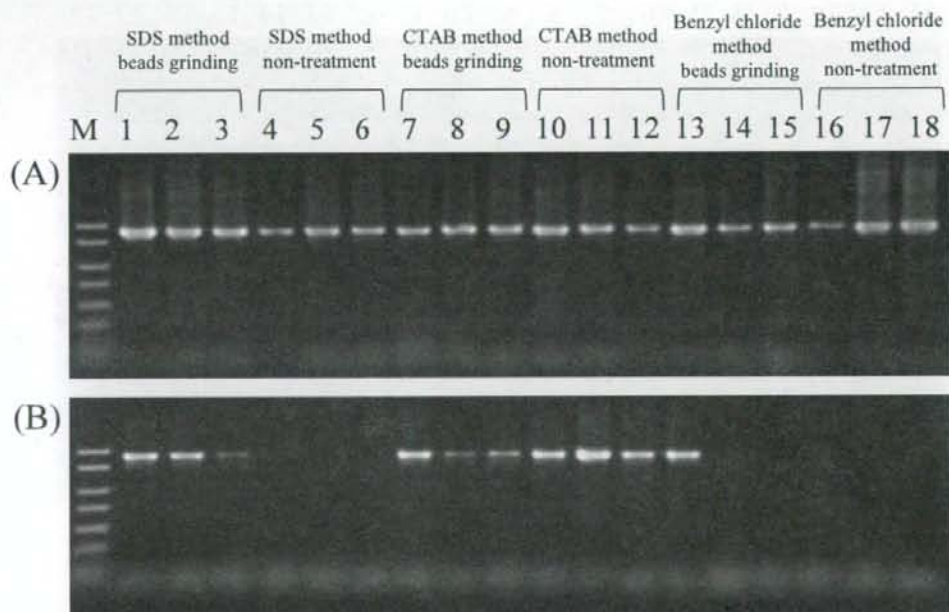


FIGURE 27. PCR amplification products of a part of 18SrDNA using the triplicate DNAs prepared by six protocols in this study. (A); *Rhizopus stolonifer*, (B); *Syncephalastrum racemosum*, Lane M; PCR makers (NOVAGEN) as molecular size makers; lanes 1-3: SDS method with beads grinding; lanes 4-6: SDS method without beads grinding; lanes 7-9: CTAB method with beads grinding; lanes 10-12: CTAB method without beads grinding; lanes 13-15: benzyl chloride method with beads grinding; lanes 16-18: benzyl chloride method without beads grinding.

TABLE 1. Fungal cultures and taxonomy

| Fungi | Taxonomy/Division                | Species                          | Strain No.                 |           |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------|
| Yeast |                                  | <i>Cryptococcus neoformans</i>   | NBRC <sup>a</sup> 0699     |           |
|       |                                  | <i>Rhodotorula rubra</i>         | NBRC 0909                  |           |
|       |                                  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | NBRC 0233                  |           |
| Mold  | Ascomycota                       | <i>Alternaria alternata</i>      | NBRC 31188                 |           |
|       |                                  | <i>Aspergillus niger</i>         | NBRC 6661                  |           |
|       |                                  | <i>Botrytis cinerea</i>          | NBRC 31831                 |           |
|       |                                  | <i>Byssochlamys fulva</i>        | NBRC 31877                 |           |
|       |                                  | <i>Emericella nidulans</i>       | NBRC 33017                 |           |
|       |                                  | <i>Fusarium subglutinans</i>     | IFM <sup>b</sup> 50097     |           |
|       |                                  | <i>Geotrichum candidum</i>       | NBRC 9541                  |           |
|       |                                  | <i>Penicillium expansum</i>      | NBRC 7604                  |           |
|       |                                  | <i>Talaromyces bacillisporus</i> | NBRC 31150                 |           |
|       |                                  | <i>Trichoderma viride</i>        | NBRC 100100                |           |
|       |                                  |                                  | <i>Absidia corymbifera</i> | NBRC 4009 |
|       |                                  |                                  | <i>Mucor hiemalis</i>      | NBRC 9405 |
|       |                                  |                                  | <i>Rhizopus stolonifer</i> | NBRC 4781 |
|       | <i>Syncephalastrum racemosum</i> | NBRC 4828                        |                            |           |
|       | Zygomycotina                     |                                  |                            |           |

<sup>a</sup>National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center<sup>b</sup>Institute of Food Microbiology (present organization: Medical Mycology Research center), Chiba University

TABLE 2. Ranges of yields of triplicate DNA-extractions from materials of fungal cells extracted by various methods

| Fungi      | Taxonomy/Division | Species                          | SDS method                  |                 | CTAB method     |                 | Benzyl chloride method |                 | Dr. Gentile high recovery (for yeasts) kit |                 | Dreary Plant Tissue kit |               |
|------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------|--|-----------------|-------------------------|---------------|
|            |                   |                                  | Beads grinding              | non-treatment   | Beads grinding  | non-treatment   | Beads grinding         | non-treatment   | Beads grinding                             | non-treatment   | Beads grinding          | non-treatment |
| Yeasts     |                   | <i>Cryptococcus neoformans</i>   | 367.5 - 1211.9 <sup>a</sup> | 1311.1 - 648.3  | 220.0 - 809.8   | 132.5 - 201.6   | 487.5 - 1030.4         | 158.9 - 262.5   | 110.2 - 872.5                              | 15.2 - 342.5    | 99.7 - 124.3            | 19.4 - 75.0   |
|            |                   | <i>Rhodotorula rubra</i>         | 213.1 - 411.8               | 15.7 - 191.8    | 379.8 - 458.5   | 150.7 - 287.8   | 907.5 - 2625.0         | 214.0 - 902.5   | 87.8 - 875.4                               | 112 - 584.9     | 248.9 - 350.0           | 5.5 - 30.9    |
|            |                   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | 2250.3 - 2884.1             | 1707.7 - 2404.1 | 1913.6 - 1403.2 | 2259.2 - 3160.8 | 884.2 - 1874.5         | 137.2 - 233.4   | 228.3 - 1149.1                             | 1293.7 - 2137.1 | 203.5 - 402.0           | 2.6 - 5.6     |
| Ascomycota |                   | <i>Alternaria alternata</i>      | 2047.2 - 2999.9             | 1174.9 - 1901.4 | 1169.1 - 4195.4 | 1405.1 - 2028.6 | 1915.0 - 2207.9        | 1251.5 - 2520.2 | 227.5 - 1887.5                             | 227.5 - 506.0   | 131.1 - 270.0           | 61.1 - 100.0  |
|            |                   | <i>Aspergillus niger</i>         | 1374.8 - 4679.8             | 400.7 - 1417.4  | 852.5 - 3563.9  | 117.5 - 452.2   | 1382.5 - 3525.8        | 237.5 - 462.5   | 1019.5 - 2262.5                            | 107.5 - 372.8   | 50.2 - 317.3            | 0.3 - 48.3    |
|            |                   | <i>Botrytis cinerea</i>          | 2232.5 - 4819.2             | 2214.4 - 3509.6 | 1520.0 - 2994.0 | 622.5 - 2083.2  | 2039.1 - 4831.5        | 1154.3 - 3127.8 | 274.6 - 352.1                              | 206.9 - 405.7   | 138.7 - 505.0           | 83.3 - 293.4  |
|            |                   | <i>Byssosclamps fulva</i>        | 2398.4 - 3726.1             | 1810.0 - 2750.0 | 1290.7 - 2090.2 | 785.5 - 2227.1  | 1490.5 - 2313.6        | 494.7 - 1481.3  | 705.7 - 792.0                              | 406.5 - 491.9   | 205.4 - 373.5           | 65.0 - 181.6  |
|            |                   | <i>Emmericella nidulans</i>      | 1373.6 - 1810.3             | 2203.7 - 2479.1 | 1306.0 - 1078.8 | 915.3 - 2612.1  | 658.1 - 714.5          | 2083.7 - 2501.1 | 534.2 - 723.8                              | 43.4 - 256.4    | 44.6 - 96.1             | 61.3 - 159.4  |
|            |                   | <i>Fusarium subglutinans</i>     | 2103.0 - 2349.4             | 676.1 - 944.0   | 554.9 - 1624.9  | 193.7 - 1051.6  | 839.0 - 1798.2         | 58.3 - 456.9    | 54.4 - 104.3                               | 481.9 - 580.4   | 110.0 - 200.9           | 40.0 - 143.8  |
|            |                   | <i>Geotrichum candidum</i>       | 1519.5 - 1790.5             | 299.9 - 620.0   | 720.9 - 776.6   | 258.5 - 517.5   | 336.4 - 955.8          | 168.1 - 208.1   | 280.0 - 957.6                              | 860.0 - 1008.5  | 31.0 - 48.9             | 5.3 - 20.6    |
|            |                   | <i>Penicillium expansum</i>      | 2118.0 - 3625.9             | 897.5 - 1670.1  | 409.4 - 1435.9  | 365.0 - 742.1   | 332.8 - 2444.4         | 357.2 - 1180.5  | 179.0 - 725.3                              | 260.8 - 764.1   | 34.2 - 317.6            | 8.2 - 213.0   |
|            |                   | <i>Talaromyces fluctiginosus</i> | 3118.0 - 3628.2             | 1722.1 - 2793.1 | 2760.7 - 4210.2 | 1443.0 - 1592.5 | 3009.3 - 3726.8        | 1329.5 - 2573.9 | 183.9 - 277.7                              | 641.0 - 790.2   | 298.6 - 480.4           | 13.6 - 36.5   |
|            |                   | <i>Trichoderma viride</i>        | 5280.4 - 5717.5             | 2257.5 - 3429.6 | 902.5 - 3448.5  | 350.0 - 1442.7  | 2198.0 - 4740.0        | 1710.2 - 3149.4 | 1601.0 - 2607.3                            | 677.5 - 1409.4  | 795.0 - 2424.7          | 175.0 - 978.6 |
| Zygomycota |                   | <i>Abiella corymbifera</i>       | 2033.1 - 5092.5             | 1742.0 - 4183.5 | 2729.3 - 4087.6 | 3161.5 - 3900.7 | 1710.2 - 2641.6        | 842.7 - 2141.7  | 1109.2 - 1737.0                            | 879.2 - 1029.9  | 99.3 - 151.1            | 31.8 - 55.0   |
|            |                   | <i>Mucor hiemale</i>             | 2517.0 - 3336.7             | 1487.5 - 1707.7 | 3017.6 - 3561.7 | 2459.2 - 2918.2 | 2580.4 - 3142.8        | 914.7 - 1319.5  | 1192.2 - 226.8                             | 127.3 - 383.8   | 187.5 - 337.0           | 28.3 - 51.3   |
|            |                   | <i>Rhizoglyphus nidulifer</i>    | 232.5 - 265.9               | 155.9 - 801.4   | 578.2 - 814.0   | 299.7 - 529.0   | 229.6 - 324.0          | 96.5 - 215.8    | 40.0 - 100.0                               | 99.1 - 143.3    | 3.9 - 41.5              | 3.9 - 16.9    |
|            |                   | <i>Syncephalastrum racemosum</i> | 4616.6 - 5283.3             | 4077.2 - 4745.8 | 4035.0 - 4748.7 | 2968.9 - 4024.2 | 3379.5 - 4116.0        | 1137.5 - 2900.4 | 491.3 - 1598.5                             | 394.8 - 980.3   | 96.8 - 107.7            | 19.9 - 47.9   |

<sup>a</sup>µg/g of fungal cells

# 分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料のカビ・酵母の腐敗と制御に関する研究

後藤 慶一

平成20年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究  
研究代表者 工藤由起子  
（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

#### 分担研究報告

カビ・酵母の清涼飲料水の汚染と防御方法  
研究分担者 後藤慶一（三井農林株式会社 食品総合研究所）

#### 研究要旨

清涼飲料は年間一人あたり約 150 リットルを消費しており、現在の我々の生活に密着した食品として位置づけられる。一方で、清涼飲料の微生物に起因する苦情は食品全体の 25%に至り、低減化に向けた取り組みが望まれている。しかしながら、清涼飲料の腐敗に関して纏まった情報がないのが実情である。そこで、清涼飲料のカビ・酵母による腐敗について国内外の情報の収集を行った。その結果、果汁飲料、茶系飲料、炭酸飲料およびミネラルウォーターに起因したカビ・酵母に関する情報を得ることができた。属の数としては 42 種類で、*Penicillium*、*Cladosporium*、*Byssochlamys*、*Aspergillus*、*Acremonium*、*Talaromyces*、*Candida*、*Neosartorya* の順で報告例が多かった。また、低減化に関する具体的な策として、加熱殺菌に代わる殺菌法（膜、紫外線およびオゾン）について国内情報を収集したところ、多くの情報を得ることはできなかった。これは、主な清涼飲料の物性上、加熱以外の殺菌法を適応することが困難であり、それ故、実用データが少ないためであると確認された。膜や紫外線についてはミネラルウォーターでの使用が一部見受けられるが、それらについても最終的な殺菌は加熱に依存している場合が過半数を占めた。別途、平成 21 年度に実施予定の口のみ試験・開封試験で得た微生物株の同定法の選定を行った。その結果、遺伝子解析による MicroSEQ 法が簡便性、正確性の面で適当であることが示された。より精度を向上させるため、カビの DNA 相同性試験に基づく形態による分類と遺伝子解析による分類との整合性を評価する必要があると考えられた。

#### 研究協力者：

大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）  
徳田 一、池本尚人（NPO 法人 ILSI Japan 食品微生物部会）  
山下裕司、雛本恵子、峯 孝則、福田正彦（(社) 全国清涼飲料工業会）

#### A. 研究目的

清涼飲料は年間一人あたり 500ml のペットボトル換算で 300 本を消費してお

り、現在の我々の生活に欠くことができない食品の一つである。現在、消費者の趣向やニーズに合わせ、多様な形

態かつ種類の清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造、流通、保管、販売方法、ならびに消費のされ方も多岐にわたっている。清涼飲料が深く浸透する中、消費者から寄せられる苦情も後を絶たず、中でも微生物に起因する苦情は食品全体の25%に至っているのが実情である。しかしながら、清涼飲料の微生物由来の苦情に関し、一元的に集約された情報がなく、問題点を追求する上で支障を来している。そこで、まずは清涼飲料のカビ・酵母による腐敗に関して国内外を問わず情報を収集し、問題を整理する必要がある。しかし、清涼飲料水の殺菌は加熱によるものが主体であるが、それ以外に膜や紫外線、オゾンと言った加熱に代わる殺菌技術がある。食品衛生法では加熱に関しては規格基準が設定されており、それをもとに製造が行われているが、他の技術については加熱殺菌との同等性などが必ずしも十分に評価されているわけではない。また、それらの殺菌法についてのニーズや殺菌力に関する情報も集約されていないのが実情で、微生物の苦情を低減化させることに寄与するためにも、まずは国内の実態を把握する必要がある。以上の課題を行うため、本年度は当該キーワードで情報の収集と精査を行うことを目的として調査を行った。

現在、一般的によく利用されている遺伝子を用いた微生物（細菌、カビ・酵母）の同定法として、Applied Biosystems 社が製造・販売している「MicroSEQ® ID システム」がある。また、日本の医薬品業界では、準公的に「第15改正日本薬局方 4. 遺伝子解析による微生物の迅速同定法」が認められている。これらは対象としている遺伝子領域が異なるため、同定結果に影響する可能性がある（下記①および②、図1参照）。2009年度には腐敗した清涼飲料から分離された微生物の同定を遺伝子により行うことから、本年度は両手法の精度の検証を代表的な菌株を用いて行った。別途、塩基配列の相同性検索に使用するデータベース3種〔公的遺伝子データベース（国際塩基配列データベース：DDBJ/EMBL/GenBank 提供のデータベース）、市販されているデータベース（MicroSEQ® ID システム付帯データベース）およびプライベートデータベース（三井農林保有塩基配列データベース）〕についても評価を行った。

①MicroSEQ® ID システム（以下、MicroSEQ 法）の対象領域：細菌-16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（5'側約500塩基：Top500領域）、カビ・酵母-26/28S rRNA 遺伝子D2領域の塩基配列（約300塩基）

②第15改正日本薬局方 4. 遺伝子解



析による微生物の迅速同定法（以下、日本薬局方）の対象領域：細菌—解読された 16S rDNA 塩基配列の 5' 側 50 番目から 350 番目の領域（5'側約 300 塩基）、カビ・酵母—ITS-1 領域（不定）

## B. 研究方法

### 1. 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗情報の収集（国内外）

清涼飲料のカビ・酵母による腐敗情報を収集するため、「菌類 (Fungi)」、「真菌 (Fungi)」、「カビ (Molds、Mold、Moulds および Mould)」、「酵母 (Yeasts および Yeast)」、「糸状菌 (Filamentous fungi)」、「清涼飲料 (Soft drink および Beverage)」、「腐敗 (Decomposition および Putrefaction)」、「変敗 (Deterioration および Spoilage)」、「汚染 (Contamination)」、「ミネラルウォーター (Mineral water) \*」、「ナチュラルウォーター (Natural water) \*」、「ナチュラルミネラルウォーター (Natural mineral water) \*」、「ボトルドウォーター (Bottled water) \*」、「異物 (Pellet)」をキーワードとし、SciFinder および JDream2 を使用して検索した。加えて、所有している関連書籍等からも情報収集した。

\*識別は下記を参照のこと。

#### ① ナチュラルウォーター (Natural

water)：特定の水源から採水された地下水を原水とし、沈殿、濾過、加熱殺菌以外の物理的・化学的処理を行わないもの

② ナチュラルミネラルウォーター (Natural mineral water)：ナチュラルウォーターの内、鉱化された地下水を原水としたもので、沈殿、濾過、加熱殺菌以外の物理的・化学的処理を行わないもの

③ ミネラルウォーター (Mineral water)：ナチュラルミネラルウォーターを原水とし、品質を安定させる目的などのためにミネラル調整、ばっ気、複数の水源から採水したナチュラルミネラルウォーターの混合などが行われているもの

④ ボトルドウォーター (Bottled water)：ミネラルウォーター、ナチュラルウォーター、ナチュラルミネラルウォーター以外のもの

### 2. オゾン、膜（濾過）および紫外線 (UV) による清涼飲料の殺菌情報の収集（国内）

オゾン、膜および紫外線による清涼飲料の国内における殺菌情報（強度、利用状況や基準値等）を収集するため、「殺菌 (Disinfection、Sterilization および Pasteurization)」、「除菌 (Sterilization)」、「膜 (Filtration) \*」、「オゾン (Ozone)」、「紫外線 (Eradication)」をキーワードとし、

SciFinder および JDream2 を使用して検索した。加えて、所有している関連書籍等からも情報収集した。

\*識別は下記を参照のこと（清涼飲料の除菌目的には①～③が使用される）。

#### ①濾材ろ過 (Filtration)

[分離媒体/膜 (材料)] 濾紙、濾布、砂、アンスラサイト、珪藻土

[分離粒径/分子量]  $\sim 10 \mu\text{m}$

#### ②精密ろ過 (Microfiltration)

[分離媒体/膜 (材料)] 精密濾過膜 (メンブレンフィルタ、カートリッジフィルタを含む)

[分離粒径/分子量]  $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$

#### ③限外ろ過 (Ultrafiltration)

[分離媒体/膜 (材料)] 限外濾過膜 (セルロース系、ポリスルホンなどの合成高分子)

[分離粒径/分子量] 分子量 1000 ~ 1000000

#### ④ナノろ過 (Nanofiltration)

[分離媒体/膜 (材料)] ナノ膜濾過膜 (ポリスルホン、ポリアミドなどの合成高分子)

[分離粒径/分子量] 分子量 300 ~ 1000

#### ⑤逆浸透 (Reverse osmosis) または超ろ過 (Hyperfiltration)

[分離媒体/膜 (材料)] 逆浸透膜 (酢酸セルロース、ポリアミドなどの合成高分子)

[分離粒径/分子量] 分子量  $\sim 300$

### 3. 細菌、カビ・酵母の遺伝子による

同定法の検証

#### 3-1. MicroSEQ 法

##### ①菌株および培養

国内外の菌株保存機関由来の菌株を機関推奨の方法で復元、培養した (菌株に関する詳細は表 9~15 参照)。

##### ②DNA 調製

PrepMan™ Ultra Reagent (Applied Biosystems 社) を使用して調製した。濃度・純度の測定は NanoDrop® ND-1000 分光光度計 (NanoDrop 社製) を使用して行った。

##### ③PCR 反応およびシーケンス反応

塩基配列を決定するための鋳型 DNA の調製は Applied Biosystems 社が提供する MicroSeq 500 16S rDNA PCR Kit (細菌用) および MicroSeq D2 rDNA Fungal PCR Kit (真菌用) を用いて行った。塩基配列の決定は Applied Biosystems 社が提供する MicroSeq 500 16S rDNA Sequencing Kit (細菌用) および MicroSeq D2 rDNA Fungal Sequencing Kit (真菌用) を用いて行った。

##### ④PCR 産物の精製

QuickStep™2 PCR Purification Kit (Edge BioSystems 社製) を用いて PCR 産物の精製を行った。

##### ⑤シーケンス反応産物の精製

illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE Healthcare Bio Science 社製) を用い

てシーケンス反応産物の精製を行った。

#### ⑥電気泳動

PCR 反応産物の確認は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) を用いて行った。シーケンス反応産物の泳動は ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。

#### ⑦波形データの解析および塩基配列の決定

波形データは、Sequencing Analysis v5.1.1 (Windows 版、Applied Biosystems 社製)、Sequencing Analysis v3.4.1 (Mac 版、Applied Biosystems 社製)、Factura v2.2.2 (Mac 版、Applied Biosystems 社製) および GeneWorks 2.5 (IntelliGenetics 社製) を用いて塩基の読み取りが不良な箇所を目視で確認および修正し、コンセンサス配列を得た。

#### ⑧相同性解析

決定した塩基配列を国際 DNA データバンクの一つである DNA Data Bank of Japan (DDBJ) または National Center for Biotechnology Information (NCBI) の検索・解析ツール「BLAST」に供し、相同性検索を行った。別途、MicroSeq® ID v2.0 (Applied Biosystems 社製) および

自社データベースの「BLAST」を利用して相同性解析を行った。

#### 3-2. 日本薬局方

MicroSEQ 法と異なる箇所についてのみ以下に記載する。

#### ①DNA 調製

1.5mL 遠心チューブに被検菌処理液 (1ml Triton X-100 を 300mL の TE 緩衝液に溶解したもの) を 0.3mL 入れ、これに白金耳で集落の一部をとり懸濁させ、沸騰湯浴を用いて懸濁液を 100°C で 10 分間加熱し、DNA 溶液とした。

#### ②PCR 反応

PCR 反応液 [10 倍緩衝液 5  $\mu$ L、dNTP 溶液 (各 2.5nmol/L) 4  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L センスプライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L アンチセンスプライマー 1  $\mu$ L、TaKaRa Taq™ (5U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ L および滅菌水 36.8  $\mu$ L] に DNA 溶液を 2  $\mu$ l 加え、細菌の場合は 10F および 800R プライマーセット\*1、真菌の場合は ITS1F および ITS1R プライマーセット\*2 を添加して所定の条件 [(94°C・30 秒→55°C・60 秒→72°C・60 秒) × 30 サイクル] で PCR 反応を行った。

\*1 10F (センスプライマー)

5' -GTTTGATCCTGGCTCA-3'

800R (アンチセンスプライマー)

5' -TACCAGGGTATCTAATCC-3'

\*2 ITS1F (センスプライマー)

5' -GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'

ITS1R (アンチセンスプライマー)  
5' -CGTTCCTTCATCGATG-3'

#### ③PCR産物の電気泳動

PCR反応溶液5 $\mu$ Lを1 $\mu$ Lのローディング緩衝液と混合し、1.5w/v%アガロースゲルのウェルに添加し、1倍TAE緩衝液を用いて電気泳動した。

#### ④シーケンス反応

シーケンス反応は BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。反応は 96°C・1分→(96°C・10秒→50°C・5秒→60°C・4分)×25サイクルの条件で行った。

#### ⑤シーケンシング反応物の精製

1.5mL遠心チューブに95%エタノールを75 $\mu$ L入れ、反応溶液を加えた。水中に20分間放置後、15,000rpmで20分間遠心分離した。終了後、上清を除去し、95%エタノール250 $\mu$ Lを入れ、15,000rpmで5分間遠心分離した。上清を除去し、真空ポンプを用いて15分間脱気して乾燥させた。

#### ⑥塩基配列の解析

試料に15 $\mu$ LのHi-DiTM Formamideを加えて、よく攪拌後、沸騰湯浴中で2分間加熱した。この試料をABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) にセットし、電気泳動を行った。

### C. 結果

#### 1. 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗情報の収集 (国内外)

該当するキーワードで情報検索したところ、数万を超える情報がヒットした(1次情報)。しかしながら、その多くは必要とする内容ではなかったため、「清涼飲料のカビ・酵母による腐敗」を対象として表題と要旨をもとに1次情報の絞り込みを行った。その結果を表1に示す(2次情報)。また、2次情報のまとめとして、検出されたカビ・酵母の種類と清涼飲料の種類の間関係を表2に示す。得られた情報から開封前・後の識別はできなかった(記載がなかった)。また、個々の情報の種類が様々で、正確な件数の把握はできなかったが、検出頻度と菌種の概要をつかむことができた。情報量の多さは、果汁飲料(103菌種)、ミネラルウォーター(55菌種)、茶系飲料(50菌種)、炭酸飲料(23菌種)、コーヒー(3菌種)、乳酸菌飲料(3菌種)、スポーツドリンク(1菌種)の順であった(清涼飲料の種類が判明しないもの由来の情報として20菌種あった)。清涼飲料全体として、*Penicillium* (15.5%)、*Cladosporium* (10.0%)、*Byssochlamys* (7.8%)、*Aspergillus* (5.8%)、*Acremonium* (5.0%)、*Talaopomyces* (5.0%)、*Candida* (5.0%)、*Neosartorya* (4.3%)が多かった。以下、清涼飲料別に示す。

①果汁飲料：*Penicillium* を筆頭に、*Talaromyces* 等の耐熱性カビ、*Aspergillus* および *Candida* の検出情報が多かった。報告された菌の種類は清涼飲料の中で最も多く、32種類（属レベル）であった。

②ミネラルウォーター：*Cladosporium*、*Penicillium*、*Acremonium*、および *Alternaria* が多かった。また、カビの事例がほとんどであった（13属中12属がカビ）。

③茶系飲料：*Penicillium*、*Cladosporium*、*Aspergillus* および *Byssochlamys* が多かった。果汁飲料に続き、属レベルで21種類の情報があつた。

④炭酸飲料：*Candida* および *Penicillium* が多かった。また、酵母の事例が他と比べて多かった（14属中8属が酵母）。

⑤コーヒー、スポーツドリンクおよび乳酸菌飲料の情報は少なかった。

## 2. オゾン、膜および紫外線による清涼飲料の殺菌情報の収集（国内）

該当するキーワードで情報検索し、該当する情報を表題と要旨をもとに絞り込んだ結果を表3に示す。清涼飲料に限定した場合、情報の量は膜、紫外線、オゾンの順であった。しかしながら、カビ・酵母に絞った場合、情報は非常に少なかった。特に、カビ・酵母は細菌よりも細胞が大きいいため、膜

においてはほとんどが細菌の情報であつた。以下、それぞれの手法ごとに示す。

①膜：分画分子量150000のUF膜で *Saccharomyces cerevisiae* を除菌できたとの報告があつた（表4）<sup>83</sup>。また、0.22~1.0 $\mu$ mのPVDF製メンブレンフィルタを用いた試験で、*Saccharomyces diastaticus* が完全に補足されたとの報告があつた<sup>83</sup>。

②紫外線：具体的な数値情報を表5および6に示す。カビ・酵母を99.9%殺滅させるのに必要な紫外線量は、菌種により大きく異なり、知見上は170~4,400 $\mu$ w $\cdot$ min/cm<sup>2</sup>の範囲であつた（表5）<sup>82</sup>。*Aspergillus niger* では、85 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30分の加熱殺菌（27.8D）と同じ殺菌能力の紫外線照射量は1,985,800 $\mu$ w $\cdot$ sec/cm<sup>2</sup>と報告されていた（表6）<sup>80</sup>。

③オゾン：具体的な数値情報を表7および8に示す。オゾン水の効果として、菌種によって若干異なるが、1ppm程度の濃度では十分な殺菌はできないが、10ppmで数分処理すればほとんど死滅することが示されている（表7）<sup>88</sup>。*Aspergillus niger* では、85 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30分の加熱殺菌（24.6D）と同じ殺菌能力を示す条件は0.6ppmのオゾンで4.9分と報告されている（表8）<sup>80</sup>。

## 3. 細菌、カビ・酵母の遺伝子による同定法の検証

### 3-1 手法の比較

各菌株を復元、培養後、それぞれの方法に基づいて DNA を調製した。その結果を表 9 および 10 に示す。濃度は MicroSEQ 法より日本薬局方の方が高かった。一方、純度 (260/280nm) は MicroSEQ 法では 1.5 以上の値であったのに対し、日本薬局方では 0.5~0.6 程度であった (Data not shown)。いずれの手法においても鋳型 DNA 量としては十分な量が得られた。

調製した DNA を用い、それぞれの手法に基づき塩基配列を決定した。決定した塩基配列の長さを表 9 および 10 に示す。決定に際し得られた波形データは両手法とも良好であった。決定した塩基配列につき、DDBJ のデータベースを用いて BLAST 検索した結果を表 11 および 12 に示す。結果的に、MicroSEQ 法においても日本薬局方においても供した菌種と同じ菌名が得られ、概ね同等の性能が確認されたが、他の菌種も同じ相同値%で検索された。以下に詳細を示す。

#### ① MicroSEQ 法

##### (1) 細菌 (Top 500 領域)

1) *Serratia grimesii* と *S. proteamaculans* が同じ塩基配列であった。

##### (2) 真菌 (D2 領域)

1) *Eurotium amstelodami*、*E. intermedium*、*E. chevalieri* など 6 菌

種が同じ塩基配列であった。

2) *Aspergillus niger*、*A. brasiliensis* および *A. phoenicis* が同じ塩基配列であった。

3) *Gibberella zeae* と *Fusarium culmorum*、*F. brasiliense* など 8 菌種が同じ塩基配列であった。

4) *Fusarium solani* と *F. falciforme* が同じ塩基配列であった。

#### ② 日本薬局方

##### (1) 細菌 (80-380 領域)

1) *Serratia grimesii* と *S. proteamaculans* が同じ塩基配列であった。

2) *Acinetobacter baumannii* と *A. calcoaceticus* が同じ塩基配列であった。

##### (2) 真菌 (ITS1 領域)

1) *Gibberella zeae*、*Fusarium culmorum*、*F. brasiliense* など 13 菌種が同じ塩基配列であった。

2) *Eurotium amstelodami*、*E. rubrum* および *E. chevalieri* が同じ塩基配列であった。

3) *Stachybotrys chartarum* と *S. chlorohalonata* が同じ塩基配列であった。

4) *Paecilomyces variotii* と *Talaromyces spectabilis* が同じ塩基配列であった。

5) *Aspergillus niger*、*A. awamori* および *A. foetidus* が同じ塩基配列であ

った。

### 3-2 データベースの比較

3-1 で得た塩基配列を DDBJ (DB1)、MicroSeq® ID v2.0 (DB2) および自社のデータベース (DB3) を利用して相同性解析を行った。その結果を表 13 および 14 に示す。概して、DB1 には今回供試した菌種のデータが全て登録されており、単一、あるいは複数の候補とともに検索することができた。DB2 および DB3 では登録されていない菌種が一部に見られ、検索することができなかったが、登録されているものでは DB1 と概ね同じ結果であった。以下に詳細を示す。

#### ① MicroSEQ 法

##### (1) 細菌 (Top 500 領域)

1) *Serratia grimesii* を除き DB1 と DB3 の検索結果は完全に一致した。DB2 では一位に *S. quinivorans* が挙がり、二位に一塩基の不一致で *S. grimesii* が挙がった。DB2 に登録されている *S. quinivorans* ATCC 33765<sup>T</sup> は *S. proteamaculans* subsp. *quinovora* を経て再分類された菌種であるが、*S. grimesii*、*S. liquefaciens*、*S. proteamaculans* とともに互いに非常に近縁な種であることが知られている。DB1 でも *S. grimesii* と *S. proteamaculans* の基準株は同じ塩基配列であった (*S. quinivorans* と *S. grimesii* は基準株レベルで 1 塩基しか

違わない)。

2) DB2 では、*Methylobacterium adhaesivum* および *M. isbiliense* に関し、近縁種が候補の菌種として列記された。これは、*M. adhaesivum* および *M. isbiliense* のデータが DB2 にないためであった。

##### (2) D2 領域 (カビ・酵母)

1) *Chaetomium funicola*、*Stachybotrys chartarum*、*Talaromyces flavus* および *Nigrospora oryzae* についてはいずれのデータベースでも同じ結果が得られた。

2) DB1 および DB2 では、*Aspergillus niger* に加え、*A. awamori* および *A. foetidus* も検索された。

3) *Fusarium solani* に関し、DB1 では *F. falciforme* も検索された。DB2 および DB3 には *F. falciforme* のデータが登録されていなかった。

4) *Gibberella zeae* に関し、DB2 では *F. graminearum* と検索されたが、*F. graminearum* は *G. zeae* のアナモルフなので同一種であった。

5) *Eurotium amstelodami* に関し、DB2 では *Bipolaris* 属 (2 菌種：基準株ではない) や他の *Eurotium* 属の菌種も同時に検出された。

6) *Geosmithia putterilii* に関し、DB2 にはデータがなく、低い相同値で *Acremonium sclerotigenum* と

*Beauveria felina* が検索された。

7) *Paecilomyces variottii* に関し、DB2 では *P. puntonii* が低い相対値で検索された。

②日本薬局方

(1) 細菌 (80-380 領域)

Top500 領域の結果と概ね同じ傾向であった。しかしながら、*Serratia liquefaciens* や *Acinetobacter baumannii* では、Top500 領域では単一菌種の検索結果であったが、80-380 領域では複数菌種が検索された。詳細を表 15 に示す。

(2) カビ・酵母 (ITS1 領域)

DB2 および DB3 には ITS1 のデータが入っていないため、検索は割愛した。詳細は表 12 に示す。

#### D. 考察

1. 清涼飲料のカビ・酵母による腐敗情報の収集 (国内外)

栄養分を多く含み、加熱殺菌 (一般的な微生物は死滅する条件) も風味を損なうことから強い条件で行えない果汁飲料で 32 属ものカビの報告があったことは合点がいくところである。果汁飲料は濁っているものも多く、そのため風味や外観に影響がなければカビ・酵母による増殖が起こっていたとしても気づかずに飲用してしまう場合もあると推察された。耐熱性カビも複数見られていることから、殺菌不

良が原因の腐敗も示唆される。他の飲料にも共通するが、耐熱性カビは報告数としては多いが、消費者からの苦情としては、*Aspergillus*、*Cladosporium* や *Penicillium* など、耐熱性のない菌種による事例が多いのが実態のようである<sup>1,34)</sup>。

ミネラルウォーターで問題となる微生物は主として細菌であるが、カビ・酵母は異物として検出される事例が多い傾向である。特に輸入製品での事例が多いようであるが、これは殺菌条件 (国産の多くは殺菌か除菌をする) の違いや流通に時間がかかることが要因であると推察される。菌種の報告数としては茶系飲料よりも多くなっているが、消費者からの苦情は茶系飲料の方が高い傾向にあるのが実情のようである<sup>1,34)</sup>。

茶系飲料については、果汁飲料に比べると栄養分は少なく、また強い加熱殺菌で製造されているにもかかわらず多くの菌種が報告されていることは、飲用の形態が主要な要因であると示唆された。耐熱性カビも複数見られており、一部は殺菌不良が原因となった可能性もあろう。

炭酸飲料では酵母の報告が多いが、これは一部の酵母が高濃度の炭酸ガス条件下でも生育することができるためである。カビは十分な量の炭酸ガスが含まれていると生育できないた



め、カビによる腐敗は主に開封や何らかの要因によりガス圧が低下したことによるものと推察される。

その他については情報量が少なく、明確な知見が得られないが、腐敗に関与するカビ・酵母は前述の飲料とほとんどが重複している。総じて、清涼飲料の腐敗に関与するカビ・酵母は良く見聞きするものがほとんどであり、我々の生活に極めて密着したものであると言えよう

## 2. オゾン、膜および紫外線による清涼飲料の殺菌情報の収集 (国内)

国内の清涼飲料の殺菌はミネラルウォーターや一部の透明な飲料を除き熱によるものである。加熱以外にも膜、紫外線やオゾンといった殺菌法があるが、それらが使用できない理由としては、①オゾン殺菌は製品中の有機物でオゾン効果が失われる事と、オゾンの強い酸化力で製品特性 (官能・脱色等) が失われる可能性が高い、②UV殺菌においても製品の固形物等でのUV光が遮蔽されるシャドウ効果でUV殺菌効果が確認出来ない可能性が高い、③膜は確実性の高い除菌方法であり、信頼性も高いが②同様固形物等により使用が限定されるといったためである。膜やUV処理が有効な清涼飲料についても加熱殺菌と併用して用いられるケースが過半数で、実用性が少ないために (微生物の種類によって

は十分な殺菌を行えず、事故の原因となりうる)、それぞれ単独での清涼飲料の殺菌に関する情報が少ないと考察された。膜や紫外線は単独でミネラルウォーターなどの清涼飲料を殺菌することが基礎研究的には可能であるにもかかわらず単独使用されない理由として、微生物に起因する以外のこととして、加熱以上に製造条件 (設備や環境のモニタリング、要員のトレーニング等) に配慮しなければならないこともあげられる。米国においてはボトルドウォーターの95%がオゾン処理されているが、その反面、熱殺菌の重要性が謳われている<sup>60)</sup>。

## 3. 細菌、カビ・酵母の遺伝子による同定法の検証

### 3-1 手法の比較

今回、いずれの解析でも不具合は見られなかったが、細菌の場合、MicroSEQ法では相補的に塩基配列を決定することができるが、日本薬局方ではプライマーが離れすぎているため、完全には相補することができず、また使用する塩基配列も120bp短いため、細菌の種類によっては正確さを欠く可能性があると考えられた。

検索結果において、細菌では *Serratia grimesii* や *Acinetobacter baumannii*、カビ・酵母では5種が複数の菌種も候補として挙がった。使用した菌種が候補から外れてはいない

が、これら遺伝子指標だけでは一種に絞り込むことができなかった。これは、いずれの菌種も互いに近縁であるために起こる事象であり、リボゾーム関連遺伝子の塩基配列に着目した同定限界であると考えられたが、細菌とカビ・酵母を比較した場合、細菌の方が精度が高かった。これは、細菌とカビの分類手法の違いが影響している可能性もある（酵母は細菌と類似している）。すなわち、細菌の分類は究極的な分類・同定指標である DNA-DNA 類似度に基づいている反面、カビでは形態的な差異に基づいている。近年ではカビの分類に遺伝子の塩基配列情報も加味されつつあるが、①形態に基づく分類体系、②塩基配列に基づく分類体系および③DNA 類似度に基づく分類体系の整合性が十分検討されていない。これは、カビにおいて技術的に DNA 類似度を調べる試験が難しいといった点が主要な理由であると考えられるが、カビの同定精度を向上させるためには、DNA 類似度に基づく分類体系の再調査が必要であると考えられた。

### 3-2 データベースの比較

MicroSEQ 法において、DB2 で被検菌が未登録の菌種であることにより同定できない事例が若干目立ち、DB2 単独で結果を出すことは正確性の面で支障があると考えられた。DB3 も

DB1 に比べればデータ数は少なく、従って、最も信頼度の高い結果が得られるのは豊富なデータを備えている DB1 であると判断された。しかしながら、DB1 でも質の低いデータが希に見られるため、DB2 や DB3 も必要に応じて補足データベース（それぞれ単独で結果が出る場合は問題ない）として使用するのが誤同定を未然に防ぐ一因であると考えられた。しかしながら、DB1 ではデータ数が豊富なことが足枷となり、数多くの候補が挙がってしまうことがある。この中には不適切なデータや誤同定されたもの、旧分類体系のままのものなどがあり、見極めるためには相応の知識と経験が必要であると考えられた。

### E. 結論

清涼飲料のカビ・酵母による腐敗について国内外の情報の収集を行ったところ、果汁飲料、茶系飲料、炭酸飲料およびミネラルウォーターについて起因したカビ・酵母に関する情報を多く得ることができた。カビ・酵母の種類としては 42 属にまたがったが、*Penicillium*、*Cladosporium*、*Byssosclamyces*、*Aspergillus*、*Acremonium*、*Talaromyces*、*Candida*、*Neosartorya* の報告例が多かった。また、低減化に関する具体的な策として、加熱殺菌に変わる殺菌法（膜、紫外線

およびオゾン)に関する国内情報を収集したところ、多くの情報を得ることはできなかった。これは、主な清涼飲料の物性上、加熱以外の殺菌法を適応することが困難であり、それ故、実用データが少ないと確認された。膜や紫外線についてはミネラルウォーターでの使用が一部見受けられるが、それらについても最終的な殺菌は加熱に依存している場合が過半数を占めた(日本ミネラルウォーター協会調べ)。別途、微生物株の同定法の選定を行った。その結果、遺伝子解析によるMicroSEQ法が簡便性、正確性の面で適当であることが示された。より精度を向上させるため、カビのDNA相同性試験に基づく形態による分類と遺伝子解析による分類との整合性を評価する必要があると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

後藤慶一、分子生物学的手法、NPO法人 第6回カビ講話会(迅速・簡易なカビ検査法)

後藤慶一、遺伝子同定の基礎編、NPO法人 第7回カビ講話会

後藤慶一、遺伝子同定の応用編、NPO法人 カビ相談センター 第9回カビ講話会

後藤慶一、遺伝子解析手法による微生物同定システムの効果的運用、Applied Biosystems 第1回SEQ®セミナー

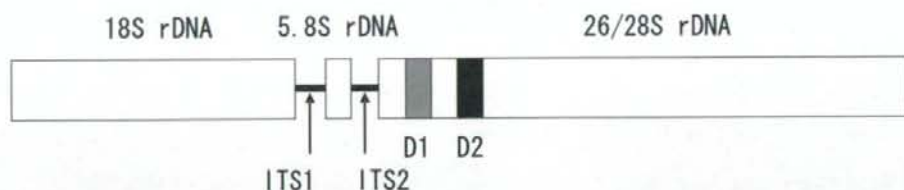
後藤慶一、耐熱性好酸性菌統一検査法の現状、(社)日本果汁協会 平成20年実務担当者研修会

K. Matsumoto, Y. Kato and K. Goto, Genetic Diversity of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and the Correlation with Their Spoilage Ability, IAFP2008 95<sup>th</sup> Annual Meeting.

G. 知的財産の出願・登録状況(予定も含む)

特になし

①真菌の解析対象領域



②細菌の解析対象領域

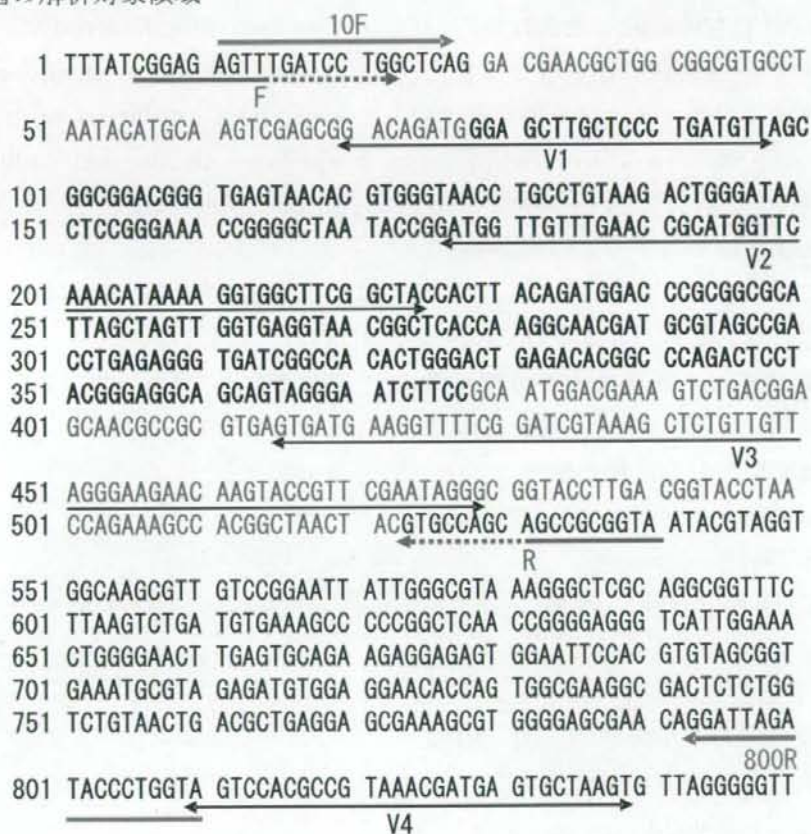


図 1. MicroSEQ 法および日本薬局方の解析対象領域

(注) ②の塩基配列は *Bacillus subtilis* *rrnE* の 16S rDNA 塩基配列 (D88802) を抜粋。検索対象領域—日本薬局方：ボールド表示の領域 (80-380 領域)、MicroSEQ 法：ボールド表示+青文字で示した領域。赤の矢印は日本薬局方のプライマー、青の矢印は MicroSEQ 法のプライマーを示す (波線部分は推定)。黒の矢印の領域は可変領域 (V1~V4) を示す。