

77 書	総	-	II 清涼飲料水、井上哲秀・西野甫 編、食品プラント洗浄殺菌マニユア ル、177-191、2006	炭酸飲料、酸性飲料（ホットバツク）、低酸性飲料（レトルト飲料）の殺菌方法に ついて概説。
78 書	総	-	第6章 飲料、食品腐敗変敗防止研 究会、サイエンスフォーラム、 395-441、2006	果汁飲料、野菜濃縮汁、乳飲料、コーヒー、ミネラルウォーターおよび茶飲料に ついて製造方法を踏まえながら概説。
79 書	総	-	第VI節 清涼飲料、食品産業戦略研 究所編、サイエンスフォーラム、 387-396、1996	清涼飲料および果汁飲料について殺菌条件に触れている（加熱のみ）。
80 書	総	<i>A. niger</i>	HACCP：衛生管理計画の作成と実 践 清涼飲料水実践編、厚生省生活 衛生局監、中央法規、2000	清涼飲料水の加熱殺菌以外の殺菌方法（濾過除菌、紫外線殺菌、オゾン殺菌）に ついて、必要となる要件について詳細に説明。品種別の殺菌・除菌条件について も言及。 <i>A. niger</i> の胞子について、85℃・30分の加熱処理におけるD値は24.6 分であり、これに対応するオゾン処理は、0.4ppmで33.2分が相当する（表8）。
81 書	紫	<i>C. globosum</i>	第1節 紫外線、山本茂貴監、サイ エンスフォーラム、207-221、2005	紫外線殺菌の原理から応用までを概説。流体殺菌として水をあげている。装置能 力の安全率として、実験値の50%程度の能力として設定する。ランプの管理は重 要。補助殺菌的に使用するのが良いと言及。

82 書	紫	<p><i>S. cerevisiae</i> <i>Z. barkeri</i>, <i>P. miragii</i> <i>W. anomala</i>, <i>O. lactis</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. expansum</i> <i>P. digitatum</i> <i>A. glaucus</i>, <i>A. flavus</i> <i>R. nigricans</i>, <i>A. niger</i> <i>M. racemosus</i></p>	第3節 冷殺菌、石井泰造監、微生物制御実用辞典、167-170、1993	<p>紫外線殺菌の基礎から応用までを概説。カビ・酵母での殺菌線量について具体的なデータを紹介(表5)。カビの多くは細菌芽胞の何倍も紫外線に対して耐性がある。紫外線殺菌は不透明であったり濁度が高く懸濁物の多い水や溶液には利用できない。</p>
83 書	膜	<p><i>S. diastaticus</i> <i>S. sake</i></p>	第1節 精密ろ過、山本茂貴監、サイエンスフォーラム、269-286、2005	<p>精密濾過による除菌について基礎から応用を概説(表4)。濾過減菌グレードのフィルターは指標菌 <i>Brevundimonas diminuta</i> をフィルターの有効濾過面積 1cm^2 あたり 10^7cfu 以上供試した場合に無菌の濾液を得るものと定義されている。ピールやミネラルウォーターでの使用例を注記。酵母では $1.0\mu\text{m}$ で十分補足される。</p>
84 書	膜	—	第1節 除菌、石井泰造監、微生物制御実用辞典、106-110、1993	<p>除菌の概念と意義について説明。全ての微生物を取り除くことはできなくても、特定の微生物は除くことができると説明(完全な除菌は困難)。殺菌の前処理として除菌が利用されるケースを概説。</p>
85 書	膜	—	第3節 ろ過による除菌、石井泰造監、微生物制御実用辞典、123-134、1993	<p>微生物濾過の基礎理論から各論について概説。汚濁水や清浄水の無菌濾過について、完全な除菌を実施するために、蒸留、イオン交換、紫外線殺菌などの組み合わせが必要と言及している。</p>
86 書	オ	<p><i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Wallemia</i> <i>Cladosporium</i></p>	第2節 オゾン殺菌装置、石井泰造監、微生物制御実用辞典、417-427、1993	<p>オゾンの一般特性から装置までを詳細に説明。気中オゾンと水中オゾンについてそれぞれ性質を示している。ヨーロッパでは飲料水のオゾン殺菌が一般的に行われている。日本では原料水の殺菌や製造環境の殺菌に使用されている。表中に糸状菌に対するデータ有り(引用不明)。</p>

87	書	オ	—	第5章 オゾンによる変敗防止、食品腐敗変敗防止研究会、サイエンスフォーラム、165-175、2006	食品および食品原料のオゾン処理による変敗防止について概説。清涼飲料での事例無し。
88	書	オ	<i>M. suaveolens</i> <i>C. cladosporioides</i> <i>C. herbarum</i> <i>A. niger</i> (胞子)	第4節 オゾン水、山本茂貴監、サイエンスフォーラム、161-175、2005	オゾン水の殺菌メカニズムから実用面までデータをもとに概説。 <i>Moniliella suaveolens</i> 、 <i>Cladosporium cladosporioides</i> 、 <i>Cladosporium herbarum</i> および <i>Aspergillus niger</i> (胞子) でのデータ有り。菌種により効果濃度が異なる。
89	書	オ	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Wallemia</i> <i>Cladosporium</i>	第5章 食品の腐敗変敗事例から見た微生物対策、食品産業戦略研究所編、サイエンスフォーラム、87-107、1996	カビ・酵母におけるオゾンによる殺菌効果について解説。水中での酵母のオゾン殺菌は容易で、0.3~0.5ppm の処理で5~10分で大部分が死滅する。糸状菌についても30~60分の処理で0.1%以下の生存率となった。糸状菌は他の微生物に比べてオゾン耐性は高い。
90	書	総	<i>S. diastaticus</i>	殺菌・除菌実用便覧、横山理雄・田中芳一編、サイエンスフォーラム、1996	紫外線殺菌フィルタールによる除菌およびオゾン殺菌について項目別に概説。ビール(国内メーカーの75%が導入)とミネラルウォーター(普及率は高い)の膜処理について言及している。
91	書	総	<i>Saccharomyces</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Rhizopus nigricans</i> <i>Mucor</i>	殺菌・除菌応用ハンドブック、芝崎勲監、サイエンスフォーラム、1985	紫外線殺菌フィルタールによる除菌およびオゾン殺菌について項目別に概説。紫外線の項目では、各種真菌を90%および100%殺菌するのに必要な紫外線量を記載。 <i>S. cerevisiae</i> は $6000 \mu W \cdot sec/cm^2$ 、 <i>A. niger</i> は $132000 \mu W \cdot sec/cm^2$ と報じている。
92	テ	総	<i>A. niger</i>	第3期 HACCP 対応 主任微生物管理者講座、高野光男ら、サイエンスフォーラム、2004	容器包材の紫外線殺菌についてふれている。 <i>P. fluorescens</i> : 紫外線照射量 (D 値) = $3000 \mu W \cdot sec/cm^2$ 、 <i>B. subtilis</i> : D 値 = $11000 \mu W \cdot sec/cm^2$ 、 <i>A. niger</i> : D 値 = $133000 \mu W \cdot sec/cm^2$ で、万能ではないと報じている。

(注) 論：論文、学：学会要旨、書：書籍、テ：テキスト、総：総論、オ：オゾン、紫：紫外線、加熱：熱、規：規格

表 4. UF 膜による *Saccharomyces cerevisiae* の除菌効果⁸³⁾

分画分子量	#10000	#20000	#30000	#50000	#150000
<i>Saccharomyces sake(cerevisiae)</i>	ND	ND	ND	ND	ND

(注) ND: 検出せず

表 5. 各種カビ・酵母を殺滅するのに必要な紫外線量⁸²⁾

菌種	99.9%殺滅必要線量 ($\mu\text{w}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	420
<i>Zygosaccharomyces barkeri</i>	452
<i>Willia anomala</i>	815
<i>Phichia miyagi</i>	825
<i>Penicillium roqueforti</i>	440
<i>Penicillium expansum</i>	370
<i>Penicillium digitatum</i>	1470
<i>Aspergillus niger</i>	4400
<i>Aspergillus flavus</i>	2000
<i>Aspergillus glaucus</i>	1470
<i>Rhizopus nigricans</i>	3700
<i>Mucor racemosus</i>	570
<i>Oospora lactis</i>	170

表 6. *Aspergillus niger* に対する紫外線照射の効果⁸⁰⁾

	85°C加熱条件		紫外線処理	
	時間 (分)	生菌数 (対数值)	照射 ($\mu\text{w}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$)	生菌数 (対数值)
計算値	0	5.48	0	5.00
	1	2.58	25200	4.18
	3	1.43	63000	3.62
	5	0.30	84000	3.30
	-	-	126000	3.20
	回帰式	$y=4.53-0.93x$		$y=4.70-0.000014x$
算出 D 値	1.08 分		$71500 \mu\text{w}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$	
5D 値	5.4 分		$357200 \mu\text{w}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$	
85°C・30 分殺菌力(A)	27.8D		-	
A 対応照射量	-		$1985800 \mu\text{w}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$	

表 7. 各種カビに対するオゾン水の殺菌効果⁸⁸⁾

菌名	オゾン濃度(mg/L=ppm)	初発菌数(cfu/g)	殺菌効果 (log N/N ₀)				
			1分	3分	5分	10分	
<i>Moniliella suaveolens</i>	1	2.7 × 10 ⁵	-0.3	-0.5	-1.0	-1.0	
	5		-1.2	-1.7	-2.0	-2.0	
	10		-2.0	-3.0	-4.0	-4.0	
	15		-3.0	-4.0	-5.4	-5.4	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	6.0 × 10 ⁴	-0.8	-0.9	-0.9	-0.9	
	5		-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	
	10		-4.8	-	-	-	
<i>Cladosporium herbarum</i>	1	1.0 × 10 ⁵	-0.2	-0.3	-0.3	-0.3	
	5		-2.2	-2.3	-2.3	-2.3	
	10		-5.0	-	-	-	
<i>Aspergillus niger</i> (胞子)	0.2	1.5 × 10 ⁵	-0.2	-0.3	-0.8	-1.0	

(注) 表中の数値は生存率の対数 (log N/N₀)、N₀:初発菌数、N:処理後の菌数

表 8. *Aspergillus niger* に対するオゾンの殺菌力⁸⁰⁾

項目	0.2ppm		0.4ppm		0.6ppm		85°C・30分加熱		
	回帰式	D値(分)	回帰式	D値(分)	回帰式	D値(分)	回帰式	D値(分)	
<i>Aspergillus niger</i> (胞子)			$y = -0.45x + 5.17$	2.22	$y = -0.74x + 5.37$	1.35	$y = -4.8x + 6.6$	0.2	$y = -0.82x + 4.84$
			11.1	6.8	1	6.1			
	加熱殺菌力 A		-	-	-	-	-	-	24.6D
	A 対応処理時間(分)		54.6	33.2	4.9	-	-	-	

表 9. 細菌の抽出 DNA 濃度および解読可能塩基長 (bp)

菌種名・菌株番号	MicroSEQ 法		日本薬局方	
	濃度	解読塩基長	濃度	解読塩基長
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 ^T	62	495	394	765
<i>Lactobacillus brevis</i> JCM 1059 ^T	55	511	231	781
<i>Clostridium sporogenes</i> JCM 1410 ^T	34	457	285	727
<i>Microbacterium barkeri</i> IAM 12585 ^T	93	462	463	732
<i>Methylobacterium adhaesivum</i> DSM 17169 ^T	51	432	413	702
<i>Methylobacterium isbiliense</i> DSM 17168 ^T	38	430	444	700
<i>Methylobacterium variabile</i> DSM 16961 ^T	34	433	427	703
<i>Serratia grimesii</i> LMG 7883 ^T	95	485	507	755
<i>Serratia liquefaciens</i> LMG 7884 ^T	59	483	430	753
<i>Pragia fontium</i> LMG 7875 ^T	179	485	520	755
<i>Acinetobacter baumannii</i> JCM 6841 ^T	157	480	479	750
<i>Acinetobacter lwoffii</i> LMG 1029 ^T	120	480	548	750

(注 1) 濃度の単位: ng/μL

(注 2) 日本薬局方では解読塩基の内、最初から 50 番目から 350 番目までの領域を検索に使用

表 10. カビ・酵母の抽出 DNA 濃度および解読可能塩基長 (bp)

菌種名・菌株番号	MicroSEQ 法		日本薬局方	
	濃度	解読塩基長	濃度	解読塩基長
<i>Chaetomium funicola</i> IFO 30059	22	277	417	220
<i>Fusarium solani</i> IFO 8505	14	278	376	206
<i>Gibberella zeae</i> IFO 9462	28	278	359	203
<i>Stachybotrys chartarum</i> IFO 30797	25	274	380	215
<i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i> CBS 310.38	37	280	393	232
<i>Aspergillus niger</i> JCM 10254	15	279	486	241
<i>Eurotium amstelodami</i> IFO 33018	69	279	398	198
<i>Geosmithia putterilii</i> IFO 31130	25	275	380	228
<i>Nigrospora oryzae</i> CBS 480.73	15	277	348	209
<i>Paecilomyces variotii</i> CBS 102.74	24	280	360	240
<i>Thamnidium elegans</i> IFO 6152	40	392	373	297
<i>Trichothecium roseum</i> NBRC 31647	28	276	384	229

(注) 濃度の単位: ng/μL

表 11. 細菌の検索結果

菌種名・菌株番号	MicroSEQ 法	
	Top 500 領域(合致数)	日本薬局方
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 ^T	<i>B. subtilis</i> (495/495)	<i>B. subtilis</i> (300/300)
<i>Lactobacillus brevis</i> JCM 1059 ^T	<i>L. brevis</i> [509/511(2N)]	<i>L. brevis</i> [298/300(2N)]
<i>Clostridium sporogenes</i> JCM 1410 ^T	<i>C. sporogenes</i> (457/457)	<i>C. sporogenes</i> (300/300)
<i>Microbacterium barkeri</i> IAM 12585 ^T	<i>M. barkeri</i> (462/462)	<i>M. barkeri</i> (300/300)
<i>Methylobacterium adhaesivum</i> DSM 17169 ^T	<i>M. adhaesivum</i> (432/432)	<i>M. adhaesivum</i> (300/300)
<i>Methylobacterium isbilense</i> DSM 17168 ^T	<i>M. isbilense</i> (430/430)	<i>M. isbilense</i> (300/300)
<i>Methylobacterium variabile</i> DSM 16961 ^T	<i>M. variabile</i> (433/433)	<i>M. variabile</i> (300/300)
<i>Serratia grimesii</i> LMG 7883 ^T	<i>S. grimesii</i> [478/485(7N)]	<i>S. grimesii</i> (299/299)
<i>Serratia liquefaciens</i> LMG 7884 ^T	<i>S. liquefaciens</i> [480/485(2N)]	<i>S. liquefaciens</i> (288/288)
<i>Pragia fontium</i> LMG 7875 ^T	<i>P. fontium</i> [481/482(1N)]	<i>P. fontium</i> (300/300)
<i>Acinetobacter baumannii</i> JCM 6841 ^T	<i>A. baumannii</i> (480/480)	<i>A. baumannii</i> (300/300)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> LMG 1029 ^T	<i>A. lwoffii</i> [477/480(3N)]	<i>A. lwoffii</i> [298/300(2N)]

(注) N: 多型数

表 12. カビ・酵母の検索結果

菌種名・菌株番号	MicroSEQ 法		日本薬局方
	D2 領域(含致率)	ITS1 領域(含致率)	
<i>Chaetomium funicola</i> IFO 30059	<i>C. funicola</i> (277/277)	<i>C. funicola</i> (220/220)	
<i>Fusarium solani</i> IFO 8505	<i>F. solani</i> (277/278)	<i>F. solani</i> (206/206)	
<i>Gibberella zeae</i> IFO 9462	<i>G. zeae</i> (278/278)	<i>G. zeae</i> (203/203)	
<i>Stachybotrys chartarum</i> IFO 30797	<i>S. chartarum</i> (274/274)	<i>S. chartarum</i> (215/215)	
<i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i> CBS 310.38	<i>T. flavus</i> (280/280)	<i>T. flavus</i> (218/218)	
<i>Aspergillus niger</i> JCM 10254	<i>A. niger</i> (279/279)	<i>A. niger</i> (241/241)	
<i>Eurotium amstelodami</i> IFO 33018	<i>E. amstelodami</i> (279/279)	<i>E. amstelodami</i> (198/198)	
<i>Geosmithia putterilii</i> IFO 31130	<i>G. putterilii</i> (275/275)	<i>G. putterilii</i> (214/214)	
<i>Nigrospora oryzae</i> CBS 480.73	<i>N. oryzae</i> (277/277)	<i>N. oryzae</i> (203/203)	
<i>Paecilomyces variotii</i> CBS 102.74	<i>P. variotii</i> (280/280)	<i>P. variotii</i> (240/240)	
<i>Thamnidium elegans</i> IFO 6152	<i>T. elegans</i> (390/391)	<i>T. elegans</i> (297/297)	
<i>Trichothecium roseum</i> NBRC 31647	<i>T. roseum</i> (276/276)	<i>T. roseum</i> (229/229)	

表 13. 各種データベースを用いた細菌データの検索結果 (MicroSEQ 法)

供試菌種	検索結果	
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 ^T	DB1	<i>B. subtilis</i> (495/495)
	DB2	<i>B. subtilis</i> (495/495)
	DB3	<i>B. subtilis</i> (495/495)
<i>Lactobacillus brevis</i> JCM 1059 ^T	DB1	<i>L. brevis</i> [509/511(2N)]
	DB2	<i>L. brevis</i> [509/511(2N)]
	DB3	<i>L. brevis</i> [(511(2N)/511(2N))]
<i>Clostridium sporogenes</i> JCM 1410 ^T	DB1	<i>C. sporogenes</i> (457/457)
	DB2	<i>C. sporogenes</i> (457/457)
	DB3	<i>C. sporogenes</i> (457/457)
<i>Microbacterium barkeri</i> IAM 12585 ^T	DB1	<i>M. barkeri</i> (462/462)
	DB2	<i>M. barkeri</i> (462/462)
	DB3	<i>M. barkeri</i> (462/462)
<i>Methylobacterium adhaesivum</i> DSM 17169 ^T	DB1	<i>M. adhaesivum</i> (432/432)
	DB2	<i>M. aminovorans</i> , <i>M. rhodinum</i> (424/432)
	DB3	<i>M. adhaesivum</i> (432/432)
<i>Methylobacterium isbiliense</i> DSM 17168 ^T	DB1	<i>M. isbiliense</i> (430/430)
	DB2	<i>M. aminovorans</i> , <i>M. radiotolerans</i> (416/430)
	DB3	<i>M. isbiliense</i> (430/430)
<i>Serratia grimesii</i> LMG 7883 ^T	DB1	<i>S. grimesii</i> , <i>S. proteamaculans</i> [478/485(7N)]
	DB2	<i>S. quinivorans</i> [478/485(7N)], <i>S. grimesii</i> [477/485(7N)]
	DB3	<i>S. grimesii</i> [485(7N)/485(7N)]
<i>Serratia liquefaciens</i> LMG 7884 ^T	DB1	<i>S. liquefaciens</i> [480/485(2N+3G)]
	DB2	<i>S. liquefaciens</i> [478/483(2N+2G)]
	DB3	<i>S. liquefaciens</i> [483(2N)/485(2N)]
<i>Pragia fontium</i> LMG 7875 ^T	DB1	<i>P. fontium</i> [481/482(1N)]
	DB2	<i>P. fontium</i> [483/485(1N)]
	DB3	<i>P. fontium</i> [485(1N)/485(1N)]
<i>Acinetobacter baumannii</i> JCM 6841 ^T	DB1	<i>A. baumannii</i> (480/480)
	DB2	<i>A. baumannii</i> (480/480)
	DB3	<i>A. baumannii</i> (480/480)

(注) 括弧内は一致塩基数/全塩基数を示す、N: 多型数、G: ギャップ数

表 14. 各種データベースを用いたカビ・酵母データの検索結果 (MicroSEQ 法)

供試菌種	検索結果	
<i>Chaetomium funicola</i> IFO 30059	DB1	<i>C. funicola</i> (277/277)
	DB2	<i>C. funicola</i> (276/277)
	DB3	<i>C. funicola</i> (277/277)
<i>Fusarium solani</i> IFO 8505	DB1	<i>F. solani</i> , <i>F. falciforme</i> (277/278)
	DB2	<i>F. solani</i> (277/278)
	DB3	<i>F. solani</i> (277/278)
<i>Gibberella zeae</i> IFO 9462	DB1	<i>G. zeae</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. brasilicum</i> , 他 6 菌種(278/278)
	DB2	<i>Fusarium graminearum</i> (278/278)
	DB3	<i>G. zeae</i> (278/278)
<i>Stachybotrys chartarum</i> IFO 30797	DB1	<i>S. chartarum</i> (274/274)
	DB2	<i>S. chartarum</i> (273/274)
	DB3	<i>S. chartarum</i> (274/274)
<i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i> CBS 310.38	DB1	<i>T. flavus</i> (280/280)
	DB2	<i>T. flavus</i> (280/280)
	DB3	<i>T. flavus</i> (280/280)
<i>Aspergillus niger</i> JCM 10254	DB1	<i>A. awamori</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. niger</i> (279/279)
	DB2	<i>A. awamori</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. niger</i> (279/279)
	DB3	<i>A. niger</i> (279/279)
<i>Eurotium amstelodami</i> IFO 33018	DB1	<i>E. amstelodami</i> , <i>E. chevalieri</i> (279/279)
	DB2	<i>E. amstelodami</i> , <i>E. chevalieri</i> , <i>E. intermedium</i> , <i>Bipolaris urochloae</i> , <i>B. panici-milacei</i> (279/279)
	DB3	<i>E. amstelodami</i> , <i>E. chevalieri</i> (279/279)
<i>Geosmithia putterillii</i> IFO 31130	DB1	<i>G. putterillii</i> (275/275)
	DB2	<i>Acremonium sclerotigenum</i> , <i>Beauveria felina</i> (261/275)
	DB3	<i>G. putterillii</i> (275/275)
<i>Nigrospora oryzae</i> CBS 480.73	DB1	<i>N. oryzae</i> (277/277)
	DB2	<i>N. oryzae</i> (277/277)
	DB3	<i>N. oryzae</i> (277/277)
<i>Paecilomyces variotii</i> CBS 102.74	DB1	<i>P. variotii</i> (280/280)
	DB2	<i>P. puntonii</i> (274/280))
	DB3	<i>P. variotii</i> (280/280)

(注) 括弧内は一致塩基数/全塩基数を示す、N:多型数、G:ギャップ数

表 15. 各種データベースを用いた細菌データの検索結果 (日本薬局方)

供試菌種	検索結果	
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 ^T	DB1	<i>B. subtilis</i> (300/300)
	DB2	<i>B. subtilis</i> (300/300)
	DB3	<i>B. subtilis</i> (300/300)
<i>Lactobacillus brevis</i> JCM 1059 ^T	DB1	<i>L. brevis</i> [298/(300-2N)]
	DB2	<i>L. brevis</i> [298/(300-2N)]
	DB3	<i>L. brevis</i> [298/(300-2N)]
<i>Clostridium sporogenes</i> JCM 1410 ^T	DB1	<i>C. sporogenes</i> (300/300)
	DB2	<i>C. sporogenes</i> (300/300)
	DB3	<i>C. sporogenes</i> (300/300)
<i>Microbacterium barkeri</i> IAM 12585 ^T	DB1	<i>M. barkeri</i> (300/300)
	DB2	<i>M. barkeri</i> (300/300)
	DB3	<i>M. barkeri</i> (300/300)
<i>Methylobacterium adhaesivum</i> DSM 17169 ^T	DB1	<i>M. adhaesivum</i> (300/300)
	DB2	<i>M. aminovorans</i> , <i>M. extorquens</i> , <i>M. dichloromethanicum</i> 、 <i>M. rhodinum</i> (292/300)
	DB3	<i>M. adhaesivum</i> (300/300)
<i>Methylobacterium isbiliense</i> DSM 17168 ^T	DB1	<i>M. isbiliense</i> (300/300)
	DB2	<i>M. fujisawaense</i> , <i>M. radiotolerans</i> , <i>M. suomiense</i> (289/300)
	DB3	<i>M. isbiliense</i> (300/300)
<i>Serratia grimesii</i> LMG 7883 ^T	DB1	<i>S. grimesii</i> , <i>S. proteamaculans</i> (299/299)
	DB2	<i>S. grimesii</i> , <i>S. quinivorans</i> [300(1N)/300]
	DB3	<i>S. grimesii</i> (299/299)
<i>Serratia liquefaciens</i> LMG 7884 ^T	DB1	<i>S. liquefaciens</i> (288/288)
	DB2	<i>S. entomophila</i> , <i>S. liquefaciens</i> [300(2N+1G)/300(1N)]
	DB3	<i>S. liquefaciens</i> [297/297(1N)]
<i>Pragia fontium</i> LMG 7875 ^T	DB1	<i>P. fontium</i> (300/300)
	DB2	<i>P. fontium</i> [300/300(1N)]
	DB3	<i>P. fontium</i> (300/300)
<i>Acinetobacter baumannii</i> JCM 6841 ^T	DB1	<i>A. baumannii</i> , <i>A. calcoaceticus</i> (300/300)
	DB2	<i>A. baumannii</i> [300/300(2N)]
	DB3	<i>A. baumannii</i> (300/300)

(注) 括弧内は一致塩基数/全塩基数を示す、N：多型数、G：ギャップ数

分 担 研 究 報 告 書

細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

大西 貴弘

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（食の安心・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

主任研究者 工藤 由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

分担研究者 大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

研究要旨 清涼飲料水における細菌の動態および清涼飲料水の殺菌・除菌方法に関するデータ収集を行った。細菌の動態に関する文献は 38 報収集した。今回収集したデータは果汁飲料，茶系飲料，ミネラルウォーター，その他の飲料に分類された。しかし，今回収集できたデータは特定の飲料，特定の細菌に関するものが中心であり，必ずしも国内の現状と一致するものではなかった。今後接種試験等を行いさらにデータを蓄積していく必要性が認められた。殺菌・除菌方法に関する文献は 22 報収集した。今回は既存の加熱殺菌に代わる紫外線殺菌，オゾン殺菌，膜による除菌の有効性，安全性に関するデータの収集を行った。しかし，今回の調査では膜による除菌に関するデータはほとんど公表されていないことがわかった。今後，補足試験を行いデータの拡充をおこなう必要性が認められた。

研究協力者

後藤 慶一 三井農林株式会社 食品総合研究所

A. 研究目的

今日わが国においては多種多様な清涼飲料水が市販されており，その消費も増大する一方である。それに伴って多数の衛生微生物学的な問題が発生し，地方自治体や製造業者へ消費者から苦情として報告されている。本研究課題は清涼飲料水に関する諸問題を整理し，安全な製品が消費者に提供されるように情報を提示することが目的であ

る。現在清涼飲料水に関しては，1) 清涼飲料水中で微生物が増殖することにより発生する事故，2) 加熱殺菌に変わる新しい殺菌・除菌方法の有効性，安全性が問題になっている。

1) に関しては，現在非常に多くの清涼飲料水が市販されており，それらの製造，保管，消費のされ方も多様である。特に近年ではペットボトルや紙パックの普及により，開封後の清涼飲料水を容易に長期間保

存できるようになっている。その結果、清涼飲料水に微生物が混入して生じる微生物事故が多発している。清涼飲料水における微生物事故を防止するためには、清涼飲料水中で細菌がどのような挙動をするのか調べ、消費者や企業に清涼飲料水の安全な取り扱いを提示する必要がある。そのために本研究では公表されている既存の文献から清涼飲料水中での細菌の動態に関するデータの収集を行った。さらに、今回収集を行ったデータに不足している部分に関しては次年度以降に接種試験を行うが、その接種試験を計画するために、既存のデータのどのような部分が不足あるいは問題なのか解析を行った。

2) に関しては、これまで清涼飲料水の殺菌方法として加熱殺菌が確立された方法として広く使われてきているが、加熱を行うため風味や栄養の点で劣るとされてきた。また、加熱殺菌だけでは耐熱性細菌や芽胞による事故を防ぐことができないと考えられる。そこで近年では加熱殺菌に代わる、あるいは加熱殺菌を補足する技術として、紫外線殺菌、オゾン殺菌、膜による除菌が注目されている。しかし、これらの殺菌・除菌方法の安全性、加熱殺菌との同等性などは十分に評価されていない。そこで本研究では既存の文献から新しい殺菌・除菌方法に関するデータの収集を行い、これらの有用性、安全性、問題点などを整理した。

B. 研究方法

1. 清涼飲料水中の細菌の動態に関するデータ収集

一般に公表されている文献を PubMed から検索を行ない、清涼飲料水中の細菌の動態に関する文献 38 報を収集した。これらの文献から清涼飲料水中の細菌の動態に関するデータの抽出を行ない、飲料種別、細菌種別に分類を行なった。

2. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法に関するデータ収集

一般に公表されている文献を PubMed から検索を行ない、清涼飲料水中の殺菌・除菌方法に関する文献 22 報を収集した。これらの文献からオゾン殺菌、紫外線殺菌、膜による除菌など清涼飲料水における加熱殺菌以外の殺菌方法に関するデータの抽出を行なった。さらに、これらのデータを殺菌・除菌方法別、細菌種別に分類した。

C. 研究結果

公表されている文献から清涼飲料水中の細菌の動態と加熱殺菌以外の殺菌・除菌方法に関するデータを収集した。以下に詳細を示す。なお、本文中で引用した文献の内容、情報を表 1-4 と巻末の引用文献リストにまとめた。

1. 清涼飲料水中の細菌の動態に関するデータ収集

公表されている文献 38 報から、清涼飲料水中の細菌の動態に関するデータの収集を行った。得られたデータを飲料種別に分

類すると、ほとんどが果実飲料、茶系飲料、ミネラルウォーターに分類された。炭酸飲料やコーヒー飲料、スポーツ飲料などに関するデータは今回調査した限りでは非常に少なかった。

1.1 果汁飲料

果汁飲料は pH がおよそ 3 から 4 前後と低いいため、細菌が生存しにくいと考えられてきた。しかし、アメリカで果汁飲料を介した集団食中毒が多発しており、果汁飲料が細菌の汚染に対して必ずしも安全でないことが明らかになってきている。実験的に果汁飲料へ細菌を接種した場合、果汁飲料中で細菌が増殖できることが報告されている [8-10,14,17,18]。また、増殖できなくても細菌が果汁飲料中で長期間残存できることが報告されている [1,3,4,6,7,14,17,18]。しかし、同じ細菌、同じカテゴリーの飲料を用いた接種試験を行っても、報告によって結果が大きく異なっており、単純に菌種と飲料種を合わせただけの実験を行っても、再現性が得られないことが示唆される。そこで、果汁飲料中における細菌の動態に関与する因子の分析を行った。果汁飲料中における細菌の動態に関わる因子として次の三つが挙げられる。

1. 飲料側の因子
2. 細菌側の因子
3. 環境の因子

まず飲料側の因子であるが、例えば一口にオレンジジュースと言っても、その成分、品質に非常に多くのバリエーションが見

られ、こうした因子が細菌の増殖に大きく関わっている。実際に同じカテゴリーの飲料の内、数種類の銘柄に細菌を接種しても、特定の銘柄に接種した時にだけ菌の増殖が良かったことが報告されている [1,8]。一般的に飲料の pH が低い程、細菌の増殖、残存に不適であると考えられている [9,18]。また、飲料の糖度も複雑に関与していると考えられる [19]。さらに、飲料中の添加物が細菌の動態に関与しているとの報告がある [5,10,13,15,17]。例えば栄養強化の目的で添加されたカルシウムや保存料の有無が細菌の動態に影響を与えている [10,15,17]。

細菌側の因子で一番特徴的なのが酸性条件への耐性の度合いである。菌種によって増殖、残存に適した pH が異なるだけでなく、同じ菌種の中でも酸性条件に適応した株が存在していたり、また、酸性条件への耐性を後天的に獲得できることも知られている [3,4,8,10,11,15]。そのため、今回収集した文献では細菌を一度酸性条件に順応させた後に実験に用いる場合が比較的多く見られた。さらに、同じ菌株でも飲料の種類によって残存、増殖できる pH が異なっている [14]。また、他の細菌側の因子として、その細菌が増殖曲線のどの段階にあるかというのも重要であり、静止期にある細菌の方が酸性条件に対して耐性であるとの報告がある [19]。また、飲料中の添加物が菌の動態に与える影響も、菌種によって異なる [5,10,13,15,17]。さらに、*Alicyclobacillus acidoterrestris* の様な耐熱性好酸菌や芽

胞は低温殺菌では不活化されないため注意が必要である。環境の因子として清涼飲料水中の細菌の動態に最も影響を与えるのが温度である。細菌を接種した清涼飲料水を 4 °C の様な低温で培養すると、増殖することはほとんどなかったが、室温で培養した場合よりも長期にわたって飲料中に残存することができた [3-6,8,18]。一方、室温で培養すると細菌の動態は 1) 一時的に菌数が上昇した後、菌数が減少していきやがて消失する場合、2) 増殖した後、そのままの菌数を維持できる場合、3) 増殖することなく消失する場合とに分かれたが、多くの場合、培養開始と共に増殖することなく速やかに菌は消失した [3-6,8,14,18]。また、ある細菌にとって残存できない温度でも他の菌の残存に影響を与えない場合や [4,7,6]、同じ菌種でも飲料の種類によって残存できる温度が異なる場合があった [14]。-20 °C で凍結した場合で 12 週間、残存することができた [11,12]。

1.2 茶系飲料

茶系飲料は以前からその強力な抗菌、殺菌作用が知られている。そのため、茶系飲料中での細菌の動態を調べた文献はほとんど見られず、そのほとんどが茶および茶抽出物の抗菌作用を調べたものであった。そこで、今回はそれらの文献からのデータも含めて茶系飲料中での細菌の動態について考察を行った。

PET ボトルの茶系飲料に接種試験を行ったところ、緑茶、ウーロン茶、紅茶（ス

トレートティ）中では細菌は残存することができなかった [1,22]。麦茶では細菌は菌数を変化させることなく残存する場合と、菌数が増加する場合とに分かれた [1]。紅茶ではストレートティは強力な殺菌作用を示すが [1,22]、ミルクティのようにミルク成分や砂糖が入っている場合には菌数は増加した [1]。また、同じ茶系飲料でもメーカー、銘柄によって菌の動態に大きな差が見られた [1]。お茶の抽出成分は非常に強力な殺菌作用を持っている [20-24]。緑茶では玉露、煎茶、番茶の順に殺菌作用が強かった [21]。しかし、菌種によって感受性が異なり、お茶に対して全く感受性を示さない菌種も見られた [21,23]。茶系飲料の殺菌作用は成分中のカテキンに由来すると考えられているが [22,24]、PET ボトル入りの緑茶と通常の緑茶のカテキン含量を比較した場合、PET ボトル入りの緑茶には通常の緑茶の約 8 分の 1 程度のカテキンしか含まれていないとの報告がある [22]。そのため、通常の緑茶に関するデータを PET ボトル入りの緑茶に適用する場合には注意が必要である。茶系飲料含有培地ではペロ毒素の産生が抑制されることも知られている [22,24]。おそらく、果汁飲料の場合と同じように茶系飲料でも pH や添加物、培養温度などによって大きく菌の動態が変化すると考えられるが、今回は詳細なデータを入手することができなかった。

1.3 ミネラルウォーター

日本国内ではミネラルウォーターの殺菌が認められているが、ヨーロッパでは殺

菌されていないものが一般的である。そのため、原水に含まれる細菌の動態に関するデータが比較的多く見られた。今回はこれらのデータも含めてミネラルウォーター中の細菌の動態について考察を行った。

一般的にミネラルウォーターは有機物の含量が少なく、細菌の増殖には向かないと考えられているが、ミネラルウォーター中で細菌が増殖できることを示す多くの報告がある [25,27,31-34]。また、増殖できなくても細菌がミネラルウォーター中で長期間残存できることも報告されている [25-28,30-37]。これらのことからミネラルウォーターは細菌の増殖、残存に不向きな飲料ではなく、その中で細菌が増殖する可能性を十分持っていることをあらかじめ知っておく必要がある。また、ミネラルウォーターにおける細菌の動態も果汁飲料と同様に、飲料側の因子、細菌側の因子、環境の因子に影響を受ける。ミネラルウォーターと一口に言っても、総溶解固形分、有機物、炭酸などその成分含量には非常にばらつきが多い [38]。そのため、ミネラルウォーターの銘柄の違いや組成の違いが細菌の動態に影響を与える例が多く見られた [28,29,34,37]。しかし、今回調査した中では有機物の含量が多いと細菌が増殖しやすく [28]、炭酸を含むと増殖し難い [37] といった一般的に知られているような傾向以外に特定の傾向を見出すことはできなかった。また、同じミネラルウォーター中でも菌種間、あるいは菌株間でその動態が異なることが報告されている [25,26,34]。

さらに飲料が細菌によって汚染される場合、必ずしも単独の菌種によって汚染されるわけではなく、複数の菌種によって汚染される場合が多い。その場合、菌種間で競合や共生が発生することがあるが、ミネラルウォーター中でも異なる細菌種間の相互作用が菌の動態に影響を及ぼすことが報告されている [26,33]。接種された細菌が増殖曲線のどの段階に位置するかも細菌の動態に影響を与えることが示唆されている [28,29]。温度もミネラルウォーター中での細菌の動態に影響を与えると考えられるが [28,31]、温度の影響を受けない場合も存在した [34,37]。

1.4 その他の清涼飲料水

その他の飲料としては炭酸飲料、コーヒー飲料、スポーツドリンク、乳酸菌飲料などが挙げられるが、これらの飲料に関するデータは非常に少なく不完全である。そのため、その他の清涼飲料水中での細菌の動態に関して詳しく解析できなかった。そこで、今回はこれらのデータを列挙するに留めておく。

スポーツドリンクや乳酸菌飲料では菌種によって増殖せず、接種菌数を長く維持できる場合と、接種後急速に菌数が減少する場合とに分かれた [1]。いずれの場合も飲料の銘柄によって細菌の動態が大きく異なった。炭酸飲料中では細菌は増殖できず、急速に減少した [2]。コーヒーを含む飲料中でも細菌が増殖できることを示唆する報告があった [16]。

2. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法に関するデータ収集

公表されている文献 22 報から、従来の加熱殺菌に代わる殺菌・除菌法であるオゾン殺菌、紫外線殺菌、膜による除菌に関するデータを収集した。これらの殺菌・除菌法は水道水や排水、医薬品分野に対してはすでに広く利用されており、公表されている文献の数も多く見られた。しかし、これらの殺菌・除菌法の清涼飲料水への応用に関する文献で公表されているものは非常に少なかった。そこで、今回は水道水、排水、医薬品に対するデータも含めて、これらの新しい殺菌・除菌法の有効性、安全性について考察したい。

2.1 オゾン殺菌

オゾンは 3 つの酸素原子からなる分子である。オゾンによる殺菌作用はオゾンが酸素分子になる過程で生じる強力な酸化作用を持つ OH ラジカルによって生じる。オゾン殺菌はこれまでに水道水や排水の殺菌に使用されてきた。最近では食品の表面の殺菌に利用され始めている。しかし条件設定の難しさやさまざまな制限から、清涼飲料水へのオゾン殺菌の応用は進んでいない [48]。

オゾンの殺菌効率に影響を与える項目として、オゾン濃度、処理時間、pH、温度、バッチの大きさ、飲料中の有機物（固形物）の量などがある [39,42,47,48,54,55]。この中で飲料中の有機物の量は特に重要で、オゾンから生じたラジカルが飲料中の有機物の分解に消費される結果、殺菌効率が

著しく低下する恐れがある [43,47,55,48]。特に果汁飲料のように天然の原料を用いる場合、バッチごとに有機物の量が異なる可能性がある。このため、原料によって殺菌効率が変化することを考慮した条件の下でオゾン殺菌を用いなければならない。また、微生物種によってオゾンに対する感受性が大きく異なっていることが報告されている [54,55]。特に *E. coli* O157:H7 や *Bacillus subtilis* の芽胞、さらに細菌ではないが *Cryptosporidium parvum* が強い耐性を示すことが知られている [54,55]。このため細菌種による感受性の差も考慮して、条件を決定しなければならない。しかし、安全性を優先して高濃度のオゾンで長時間処理すれば良いかと言えばそうではなく、オゾンは化学的に活性に富んだ分子であるため、オゾン処理をした飲料に沈殿物の発生、色調の変化、ビタミンや糖度の減少、異臭の発生などさまざまな変化を生じさせる [40,41,45,55,56]。さらにオゾンが引き起こした化学変化から、さまざまな副産物が生成される。この副産物の中でもっとも問題なのが、発がん性が疑われている臭素酸塩である [41,42,54]。このため臭素酸塩濃度が基準内に収まるように、条件設定に気をつけなければならない。また、オゾンは飲料の容器に使用されているプラスチックと化学反応を起し、異味、異臭の原因となる揮発性物質を発生させる可能性が指摘されている [46]。ただし、ペットボトルの材料である poly ethylen terephthalate とは化学反応を起さないことが確認され

ている [46]。また、残留オゾンが臭いや刺激の原因となることも知られている [55]。

この様に非常に制限が多く、条件設定が難しいオゾン殺菌であるが、従来の加熱殺菌では不活化しきれなかった *Allycyclobacillus acidocaldarius*, *Neosartorya fischeri*, *Zygosaccharomyces bailii* などの様な耐熱性の微生物に効果的である可能性が報告されている [55]。さらに、オゾンは飲料中の有機物の分解を引き起こすため、他の殺菌法の殺菌効率を高める働きがある [44,45,55]。以上のことから、オゾン殺菌を清涼飲料水に应用する場合、単独で用いるよりも他の殺菌法の欠点を補う目的で、他の殺菌法と併用するのがオゾン殺菌の最も効果的な利用法であると考えられる [55]。

2.2 紫外線殺菌

紫外線は 100-380nm の波長を持つ光の一種である。この紫外線の内、約 250-260nm の波長を持つものが最も DNA に吸収されやすく、DNA に損傷を与え細菌の不活化を引き起こす。紫外線殺菌による殺菌効果はその照射量とほぼ比例するが、オゾン殺菌と同様に種々の制限が存在する。まず、殺菌の対象となる飲料中の固形物や色調によって紫外線の透過、吸収に影響が出る可能性がある [56]。例えば、ある特定の品種のリンゴから作ったリンゴジュースに菌を接種すると、その細菌の紫外線殺菌に対する感受性が低下することが報告されているが [49]、これは特定のリンゴジュースの成分が紫外線を吸収してし

まったため殺菌効率が低下した結果による可能性が示唆されている [49]。また、細菌だけでなくカビなども含めた飲料中に含まれる微生物叢が大きいほど殺菌効率が低下することが知られている [50]。さらに、オゾン殺菌と同様に菌種や菌株間で感受性が異なることも報告されている [49]。殺菌条件の小さな変動が殺菌効率に影響することが報告されている [52]。特に紫外線ランプには寿命があるため、照射量が変化しないように管理する必要がある。また、飲料によっては紫外線殺菌を行うことによって液温が上昇する場合がある [52]。また、米国食品医薬品局 (FDA) の定める 5 対数減少値に相当する菌の不活化という基準をクリアするためには他の殺菌法との併用が必要な紫外線殺菌機が市販されているとの報告もある [50]。

しかし、紫外線殺菌もしくは加熱殺菌したリンゴジュースを消費者に評価してもらったところ、紫外線殺菌したものは色、味、風味などほぼすべての項目で加熱殺菌したものより高い評価を得ている [56]。また、長期の保存を行っても品質の低下が少なく、紫外線殺菌は最も費用対効果の大きい殺菌法であるとの報告もある [56]。さらに、紫外線殺菌は残留性がなく、オゾン殺菌では不活化しにくかった *Cryptosporidium parvum* にも効果があるとされる [51]。この様に紫外線殺菌は他の殺菌法にはない多くの利点を持つため、応用次第では清涼飲料水の殺菌に大きな変化をもたらす可能性がある。しかし、紫外線殺菌を単独で使用