

- major causal agent in the microbial complex associated with the skin sooty dapple disease of the asian pear in Korea The Plant Pathology Journal. 24: 118-124, 2008.
- 15)Pereira, P. T., *et al.* Diversity of microfungi in the phylloplane of plants growing in a Mediterranean ecosystem. Journal of Basic Microbiology. 42: 396-407, 2002.
- 16)Pugh, G. J. F. and Buckley, G. N. *Aureobasidium pullulans*: An Endophyte in Sycamore and Other Trees. Transactions of the British Mycological Society. 57: 227-231, 1971.
- 17)Raper, K. B., *et al.* A manual of the Penicillia. Maryland, The Williams & Wilkins company. 1949.
- 18)Richards, G. M., *et al.* Survey of yeasts for antagonistic activity against Salmonella Poona in cantaloupe juice and wounds in rinds coinfectd with phytopathogenic molds. Journal of Food Protection. 67: 2132-2142, 2004.
- 19)Samson, R. A., *et al.* Introduction to food-and airborne fungi. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2004.
- 20)Showdon, A. L. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables: General Introduction and Fruits. Hoboken, Wiley-Blackwell. 1990.
- 21)Spurr, H. W. J. (1994). The Microbial Ecology of Fruit and Vegetable Surfaces: Its Relationship to Postharvest Biocontrol. Biological Control of Postharvest Diseases. C. L. Wilson and M. E. Wisniewski. Boca Raton, CRC press: 11-23.
- 22)Tournas, V. H., *et al.* Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. Food Microbiology. 23: 684-688, 2006.
- 23)Tournas, V. H. and Katsoudas, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. International Journal of Food Microbiology. 105: 11-17, 2005.
- 24)Tournas, V. H. and Memon, S. U. Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi. International Journal of Food Microbiology. 133: 206-209, 2009.
- 25)Watanabe, M., *et al.* Inactivation effects of UV irradiation and ozone treatment on the yeast and the mold in mineral water. Journal of Food Protection. 73: 1537-1542, 2010.
- 26)Watanabe, M., *et al.* Enumeration of Fungi in Fruits by the Most Probable Number Method. Journal of Food Science. 75: M564-M567, 2010.
- 27)Weidenborner, M., *et al.* Mold spectra of various foods in relation to plating medium. Journal of Food Protection. 58: 661-665, 1995.
- 28)White, T. J., *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications: 315-322, 1990.
- 29)Wilson, C. L. and Chalutz, E.

Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae*. 40: 105-112, 1989.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Watanabe, M., Masaki, H., Mori, T., Tsuchiya, T., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y. and Takatori, K. Inactivation effects of UV irradiation and ozone treatment on the yeast and mold in mineral water. *Journal of Food Protection*. 73, 1537-42. 2010.

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Lee, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. and Konuma, H. Enumeration of Fungi in Fruits by the Most Probable Number Method. *Journal of Food Science*. 75, M564-M567. 2010.

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Konuma, R., Lee, L., Kawarada, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Konuma, H. and Hara-Kudo, Y. Quantitative analysis of mycoflora on commercial domestic fruits in Japan. *Journal of Food Protection*. In press.

Lee, K., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti*, the Starter Molds of Mold-Ripened Cheese, Enhance the Growth and Survival of Shiga toxin-producing

*Escherichia coli* O157 under Mild Acidic Conditions. *Journal of Food Science*. Submitted.

### 2. 学会発表

Watanabe, M., Hara-Kudo, Y., Tsutsumi, F., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Takatori, K. and Konuma, H.. Rapid enumeration methods for fungi in fruit by the most probable number method. IAFP 2010, Anaheim, California, 2010.8.

渡辺 麻衣子, 堤 史行, 小沼 ルミ, 李 謙一, 瓦田 研介, 小西 良子, 熊谷 進, 高鳥 浩介, 小沼 博隆, 工藤 由起子. 市販国産果実における真菌叢の解析. 日本食品衛生学会第100回, 熊本, 2010.9.

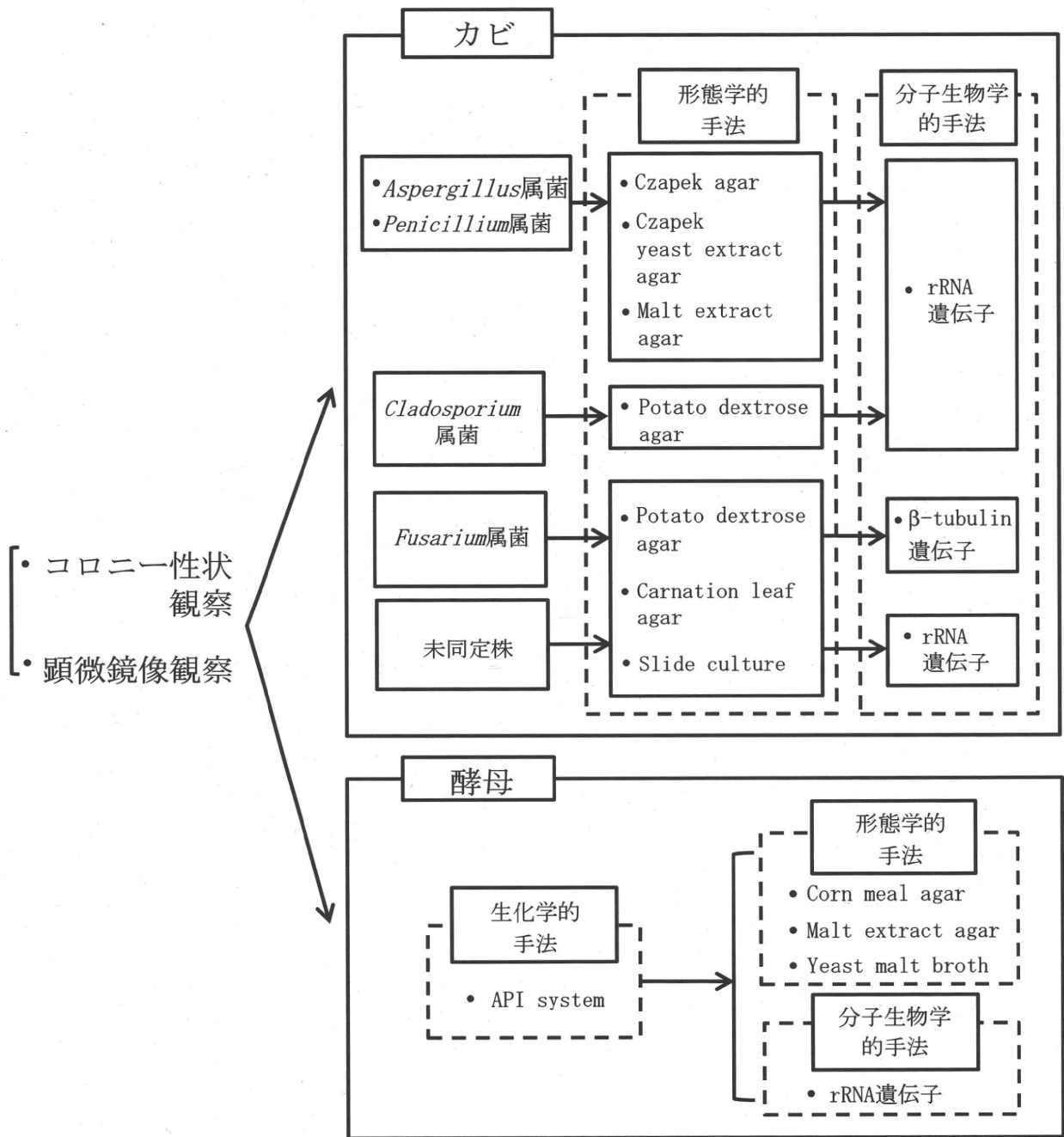


図1. 分離時の同定手順

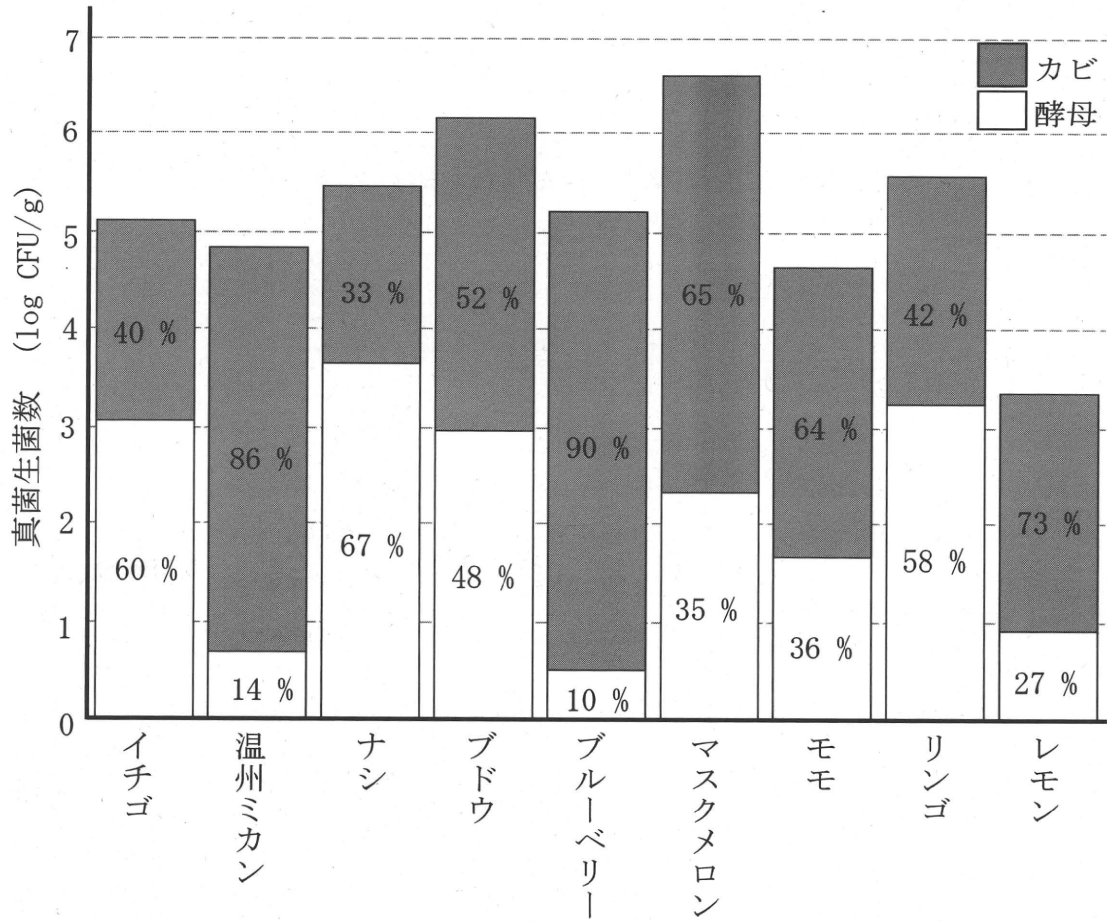
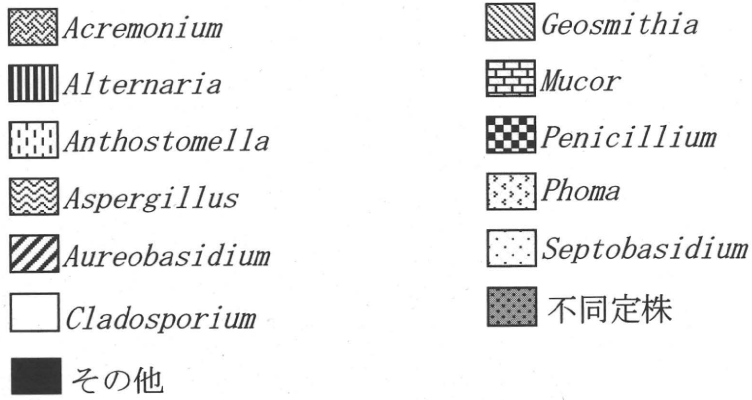


図2. 真菌生菌数に占めるカビおよび酵母の占有率



(*Arthrinium, Botrytis, Cylicodrocarpon, Drechslera, Epicoccum, Eupenicillium, Fusarium, Granulobasidium, Graphiopsis, Paecilomyces, Pestalotia, Ulocladium, Sphaeropsidales*)

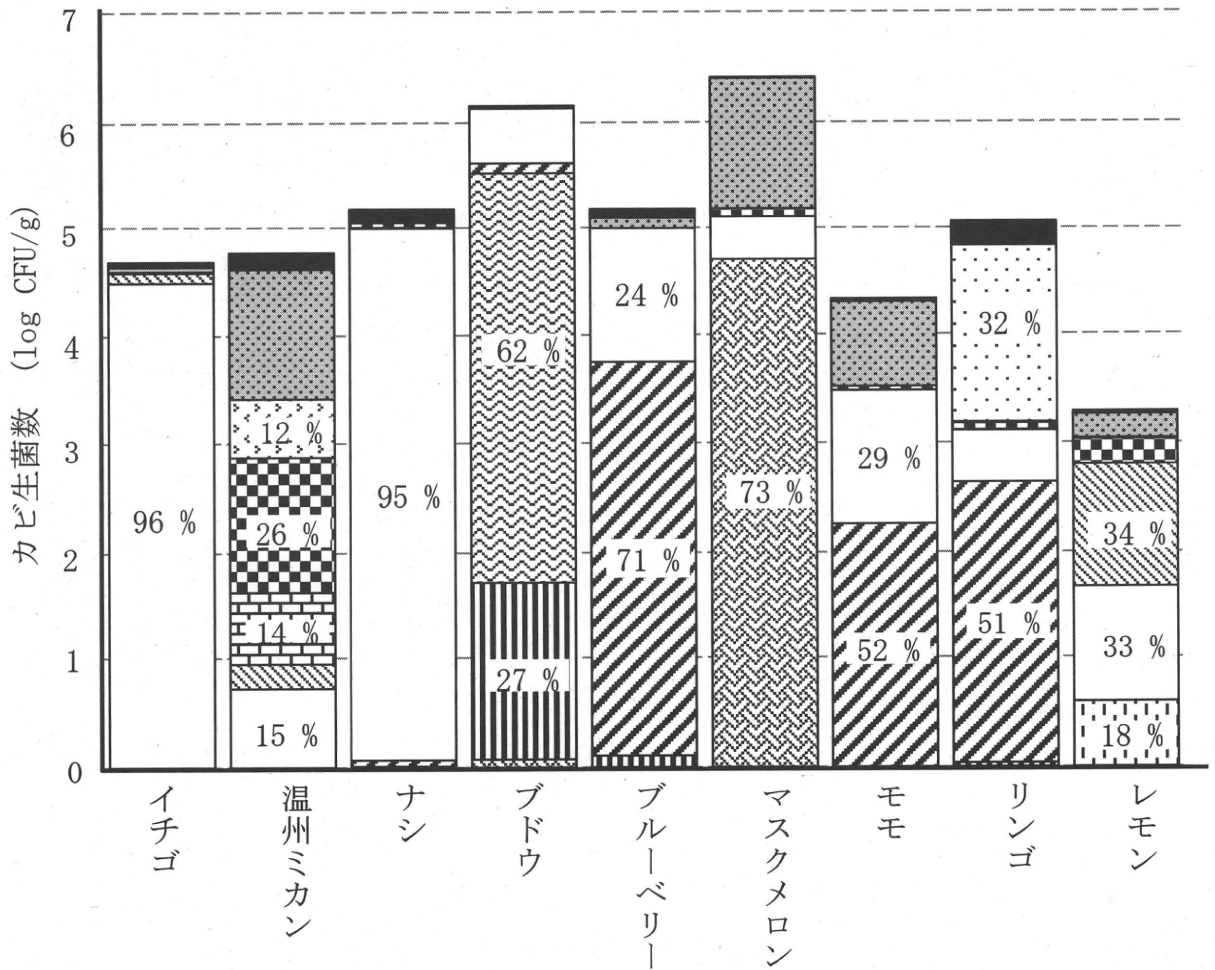


図3. カビ生菌数に占める主な属の占有率

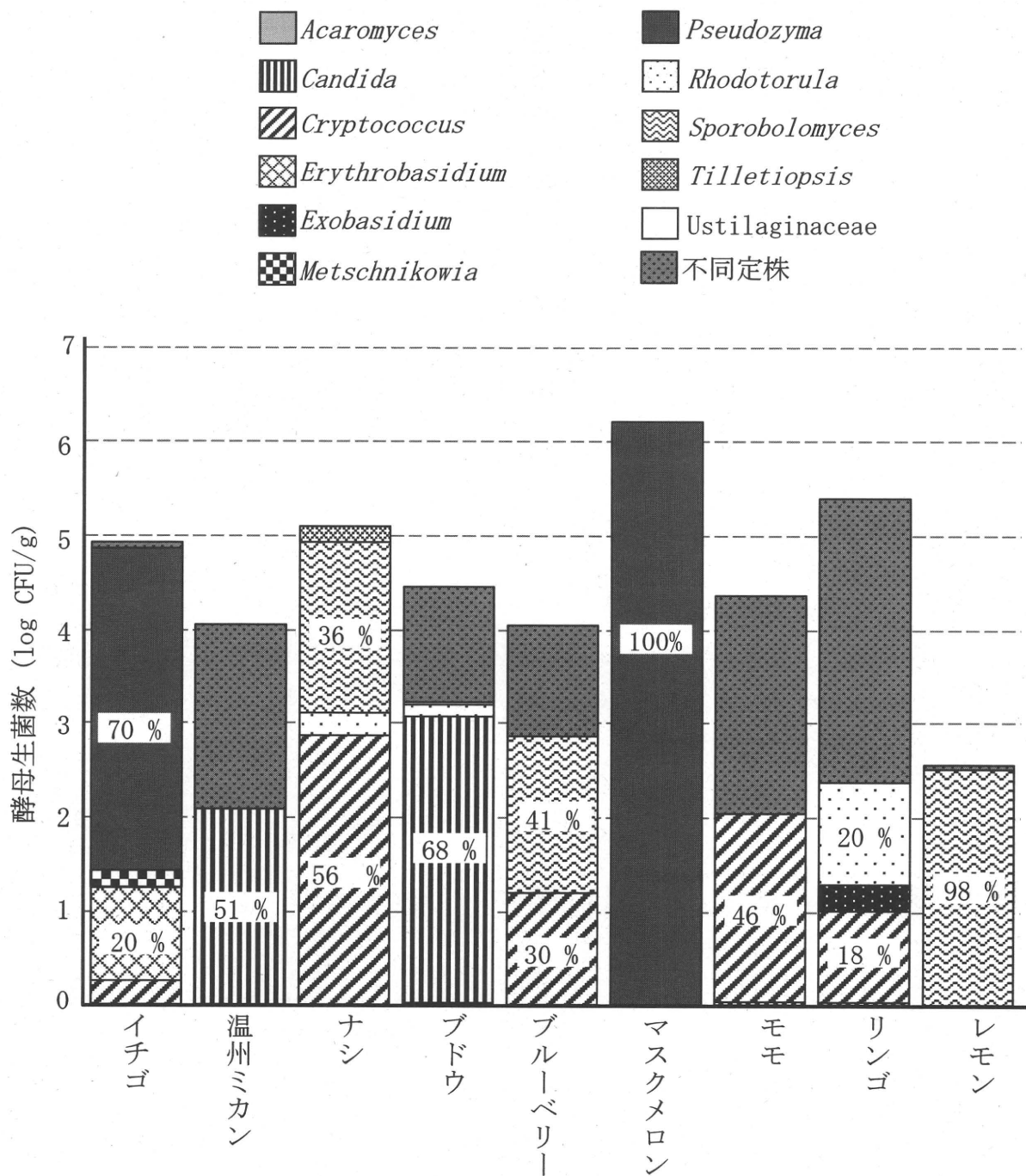


図 4. 酵母生菌数に占める主な属の占有率

表1. イチゴにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に 占める 陽性検体 の割合
	S-1		S-2		S-3		
	生菌数		生菌数		生菌数		
	log cfu/g	% <sup>a</sup>	log cfu/g	%	log cfu/g	%	
<i>Candida</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	ND	0%	3	0%	1/3
<i>Cryptococcus</i> sp.	ND	0%	4	9%	ND	0%	2/3
<i>Erythrobasidium</i> sp.	3	36%	ND	0%	ND	0%	2/3
酵母 <i>Metschnikowia</i> sp.	ND	0%	ND	0%	4	7%	1/3
<i>Pseudozyma</i> sp.	3	57%	ND	0%	5	67%	2/3
Unknown	ND	0%	3	2%	ND	0%	2/3
小計	3	89%	4	12%	5	80%	3/3
<i>Botrytis</i> sp.	1	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	9%	5	92%	ND	0%	3/3
<i>Cladosporium herbarum</i>	ND	0%	ND	0%	5	21%	1/3
<i>Geosmithia</i> sp.	ND	0%	3	2%	ND	0%	2/3
カビ <i>Epicoccum</i> sp.	ND	0%	ND	0%	2	0%	1/3
<i>Fusarium</i> sp.	1	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
<i>Penicillium implicatum</i>	ND	0%	ND	0%	1	0%	1/3
<i>Penicillium steckii</i>	ND	0%	2	0%	ND	0%	2/3
Unknown	2	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
小計	3	11%	5	88%	5	20%	3/3
計	4	100%	5	100%	5	100%	

<sup>a</sup> 各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup> 不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

表 2. 温州ミカンにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に 占める 陽性検体 の割合
	U-1		U-2		U-3		
	生菌数		生菌数		生菌数		
	log cfu/g	% <sup>a</sup>	log cfu/g	%	log cfu/g	%	
<i>Candida</i> sp.	3	20%	ND	0%	ND	0%	2/3
酵母 Unknown	ND <sup>b</sup>	0%	ND	0%	5	19%	1/3
小計	3	22%	0	0%	5	21%	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	4%	ND	0%	4	5%	2/3
<i>Cladosporium herbarum</i>	ND	0%	4	32%	ND	0%	2/3
<i>Fusarium semitectum</i>	ND	0%	3	1%	ND	0%	2/3
<i>Mucor</i> sp.	ND	0%	1	0%	5	39%	2/3
<i>Penicillium capsulatum</i>	3	63%	ND	0%	ND	0%	2/3
カビ <i>Penicillium digitatum</i>	2	3%	3	5%	ND	0%	3/3
<i>Geosmithia</i> sp.	3	13%	ND	0%	ND	0%	2/3
<i>Graphiopsis</i> sp. <sup>c</sup>	ND	0%	ND	0%	3	0%	1/3
<i>Phoma</i> sp.	ND	0%	ND	0%	5	31%	1/3
Sphaeropsidales sp.	ND	0%	ND	0%	4	8%	1/3
Unknown	ND	0%	4	64%	ND	0%	2/3
小計	3	78%	5	100%	5	79%	
計	3	100%	5	100%	5	100%	

<sup>a</sup>各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup>不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

<sup>c</sup>84%の遺伝子塩基配列相同性により同定



表3. ナシにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に 占める 陽性検体 の割合
	N-1		N-2		N-3		
	生菌数		生菌数		生菌数		
	log cfu/g	% <sup>a</sup>	log cfu/g	%	log cfu/g	%	
<i>Cryptococcus</i> spp.	4	23%	4	3%	5	93%	3/3
<i>Rhodotorula</i> sp.	4	9%	ND	0%	ND	0%	2/3
酵母 <i>Sporobolomyces</i> spp.	5	72%	4	3%	3	1%	3/3
<i>Tilletiopsis</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	ND	0%	4	7%	1/3
小計	5	99%	4	6%	5	96%	3/3
<i>Arthrinium</i> sp.	ND	0%	3	0%	ND	0%	2/3
<i>Aspergillus niger</i>	2	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
<i>Aureobasidium</i> sp.	ND	0%	ND	0%	4	1%	1/3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ND	0%	ND	0%	4	1%	1/3
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	ND	0%	6	85%	ND	0%	2/3
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	3	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
カビ <i>Drechslera</i> sp.	2	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
<i>Granulobasidium</i> sp. <sup>c</sup>	ND	0%	ND	0%	4	1%	1/3
<i>Mucor</i> sp.	ND	0%	ND	0%	1	0%	1/3
<i>Penicillium digitatum</i>	ND	0%	4	1%	ND	0%	2/3
<i>Penicillium oxalicum</i>	1	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
Sphaeropsidales sp.	ND	0%	ND	0%	1	0%	1/3
小計	3	1%	6	94%	4	4%	3/3
計	5	100%	6	100%	5	100%	

<sup>a</sup> 各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup> 不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

<sup>c</sup> 93%の遺伝子塩基配列相同性により同定

表4. ブドウにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に占める陽性検体の割合	
	G-1		G-2		G-3			
	生菌数	% <sup>a</sup>	生菌数	%	生菌数	%		
	log cfu/g		log cfu/g		log cfu/g			
酵母	<i>Acaromyces</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	ND	0%	5	1%	1/3
	<i>Candida</i> sp.	4	95%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Rhodotorula</i> sp.	ND	0%	3	4%	ND	0%	2/3
	Ustilaginaceae sp.	ND	0%	ND	0%	5	1%	1/3
	Unknown	ND	0%	4	44%	ND	0%	2/3
小計	4	99%	4	44%	5	1%	3/3	
カビ	<i>Acremonium</i> sp.	ND	0%	ND	0%	5	2%	1/3
	<i>Aureobasidium</i> sp.	2	1%	2	1%	ND	0%	3/3
	<i>Alternaria</i> sp.	ND	0%	4	44%	3	0%	2/3
	<i>Aspergillus sydowii</i>	ND	0%	ND	0%	7	96%	1/3
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ND	0%	3	14%	ND	0%	2/3
	<i>Cladosporium</i> sp.	1	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Epicoccum</i> sp.	1	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Fusarium proliferatum</i>	ND	0%	ND	0%	2	0%	1/3
	<i>Geosmithia</i> sp. <sup>c</sup>	1	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Penicillium citrinum</i>	1	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Penicillium chermesinum</i>	ND	0%	2	0%	ND	0%	2/3
	小計	2	1%	4	56%	7	99%	3/3
計	4	100%	4	100%	7	100%		

<sup>a</sup> 各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup> 不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

<sup>c</sup> 91%の遺伝子塩基配列相同性により同定

表5. ブルーベリーにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に 占める 陽性検体 の割合	
	B-1		B-2		B-3			
	生菌数		生菌数		生菌数			
	log cfu/g	% <sup>a</sup>	log cfu/g	%	log cfu/g	%		
酵母	<i>Cryptococcus</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	ND	0%	4	9%	1/3
	<i>Sporobolomyces</i> sp.	ND	0%	ND	0%	4	14%	1/3
	Unknown	ND	0%	ND	0%	4	9%	1/3
	小計	0	0%	0	0%	5	29%	1/3
カビ	<i>Aureobasidium</i> sp.	4	40%	6	95%	5	54%	3/3
	<i>Alternaria</i> sp.	3	5%	2	0%	ND	0%	3/3
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	51%	3	0%	4	14%	3/3
	<i>Epicoccum</i> sp.	3	5%	ND	0%	ND	0%	2/3
	Unknown	ND	0%	4	2%	4	3%	2/3
小計	5	100%	6	100%	5	71%	3/3	
計	5	100%	6	100%	5	100%		

<sup>a</sup>各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup>不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

表6. マスクメロンにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に 占める 陽性検体 の割合	
	M-1		M-2		M-3			
	生菌数		生菌数		生菌数			
	log cfu/g	% <sup>a</sup>	log cfu/g	%	log cfu/g	%		
酵母	<i>Pseudozyma</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	6	45%	7	58%	2/3
	小計	0	0%	6	41%	7	64%	2/3
カビ	<i>Acremonium</i> sp.	6	47%	6	56%	6	37%	3/3
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ND	0%	ND	0%	5	1%	1/3
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6	12%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Fusarium semitectum</i>	ND	0%	2	0%	ND	0%	2/3
	<i>Fusarium</i> sp.	ND	0%	4	0%	ND	0%	2/3
	<i>Penicillium citrinum</i>	5	2%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Penicillium oxalicum</i>	ND	0%	ND	0%	1	0%	1/3
	Unknown	6	37%	ND	0%	ND	0%	2/3
	小計	7	100%	6	59%	6	36%	3/3
	計	7	100%	6	100%	7	100%	

<sup>a</sup> 各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup> 不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

表7. モモにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に 占める 陽性検体 の割合	
	P-1		P-2		P-3			
	生菌数	% <sup>a</sup>	生菌数	%	生菌数	%		
	log cfu/g		log cfu/g		log cfu/g			
酵母	<i>Candida</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	3	1%	ND	0%	2/3
	<i>Cryptococcus</i> sp.	ND	0%	ND	0%	3	50%	1/3
	Unknown	ND	0%	5	54%	ND	0%	2/3
	小計	0	0%	5	58%	3	50%	2/3
カビ	<i>Aureobasidium</i> sp.	4	85%	4	9%	ND	0%	3/3
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	5%	ND	0%	3	50%	2/3
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	ND	0%	3	1%	ND	0%	2/3
	<i>Fusarium proliferatum</i>	ND	0%	ND	0%	1	0%	1/3
	<i>Fusarium</i> sp.	ND	0%	ND	0%	1	0%	1/3
	<i>Penicillium digitatum</i>	ND	0%	3	2%	ND	0%	2/3
	Unknown	3	3%	5	34%	ND	0%	3/3
	小計	4	100%	5	42%	3	50%	3/3
計	4	100%	5	100%	3	100%		

<sup>a</sup>各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup>不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

表8. リンゴにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に占める陽性検体の割合	
	A-1		A-2		A-3			
	生菌数	% <sup>a</sup>	生菌数	%	生菌数	%		
	log cfu/g		log cfu/g		log cfu/g			
酵母	<i>Candida</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	ND	0%	4	1%	1/3
	<i>Cryptococcus</i> spp.	ND	0%	5	18%	5	14%	2/3
	<i>Exobasidium</i> sp.	4	9%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Rhodotorula</i> sp.	5	21%	5	14%	ND	0%	3/3
	Unknown	5	19%	ND	0%	6	80%	2/3
	小計	5	49%	5	32%	6	95%	3/3
カビ	<i>Alternaria</i> sp.	3	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Aureobasidium</i> sp.	4	7%	5	55%	4	2%	3/3
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4	2%	4	7%	4	3%	3/3
	<i>Epicoccum</i> sp.	ND	0%	4	1%	ND	0%	2/3
	<i>Eupenicillium</i> sp.	3	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Fusarium</i> sp.	ND	0%	4	2%	ND	0%	2/3
	<i>Fusarium oxysporum</i>	ND	0%	ND	0%	2	0%	1/3
	<i>Mucor</i> sp.	2	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Penicillium steckii</i>	ND	0%	4	1%	ND	0%	2/3
	<i>Phoma</i> sp.	3	0%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Septobasidium</i> sp. <sup>c</sup>	5	40%	ND	0%	ND	0%	2/3
	<i>Ulocladium</i> sp.	ND	0%	3	1%	3	0%	2/3
	Sphaeropsidales sp.	ND	0%	3	1%	ND	0%	2/3
小計	5	51%	5	68%	4	5%	3/3	
計	6	100%	6	100%	6	100%		

<sup>a</sup> 各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup> 不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

<sup>c</sup> 98%の遺伝子塩基配列相同性により同定

表9. レモンにおける真菌生菌叢

菌種または属	供試検体						全検体に 占める 陽性検体 の割合
	L-1		L-2		L-3		
	生菌数		生菌数		生菌数		
	log cfu/g	% <sup>a</sup>	log cfu/g	%	log cfu/g	%	
<i>Sporobolomyces</i> sp.	ND <sup>b</sup>	0%	3	81%	ND	0%	2/3
酵母 Unknown	2	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
小計	2	1%	3	81%	0	0%	2/3
<i>Anthostomella</i> spp. <sup>c</sup>	3	36%	2	3%	ND	0%	3/3
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	2	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	4	58%	ND	0%	ND	0%	2/3
<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	ND	0%	2	10%	ND	0%	2/3
<i>Geosmithia</i> sp.	ND	0%	ND	0%	2	73%	1/3
<i>Paecilomyces</i> <i>lilacinus</i>	ND	0%	ND	0%	1	1%	1/3
カビ <i>Penicillium</i> <i>caseicolum</i>	ND	0%	ND	0%	2	12%	1/3
<i>Penicillium</i> <i>citrinum</i>	1	0%	ND	0%	1	1%	2/3
<i>Penicillium</i> <i>steckii</i>	ND	0%	2	3%	ND	0%	2/3
<i>Pestalotia</i> sp.	ND	0%	1	0%	ND	0%	2/3
<i>Phoma</i> sp.	2	1%	ND	0%	ND	0%	2/3
Unknown	ND	0%	2	3%	2	12%	2/3
小計	4	99%	2	19%	2	100%	3/3
計	4	100%	3	100%	2	100%	

<sup>a</sup>各供試検体における総生菌数に対する特定の種の生菌数の割合

<sup>b</sup>不検出、検出限界は 1.3 log cfu/g

<sup>c</sup>87-89%の遺伝子塩基配列相同性により同定

表10. 果実から検出された主な真菌の属とその検出頻度

真菌	検出された真菌 (5種以上の果物から検出)	陽性果実種 頻度 (%)	陽性検体 頻度 (%)
カビ	<i>Cladosporium</i> 属	9/9 ( 100)	23/27 ( 85)
	<i>Penicillium</i> 属	8/9 ( 89)	15/27 ( 56)
	<i>Fusarium</i> 属	6/9 ( 67)	7/27 ( 26)
	<i>Aureobasidium</i> 属	5/9 ( 56)	11/27 ( 41)
酵母	<i>Cryptococcus</i> 属	5/9 ( 56)	8/27 ( 30)
	<i>Candida</i> 属	5/9 ( 56)	5/27 ( 19)



# 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 22 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

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

現在、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、それらの消費や製造、流通、保管方法は様々である。このため、安全な製品が消費者に提供され安全に消費されるための要点を検討し、情報を提示することを目的とし、平成 21 年度の本研究において、清涼飲料水の口飲み・開封試験および飲用時に起こる微生物腐敗が検討された。本年度は平成 21 年度の口飲み・開封試験で分離された菌株および毒素産生性細菌を用いて接種試験を行い、清涼飲料水中の微生物動態を詳細に検討した。

ペットボトル入りの清涼飲料水を半量捨て、残った清涼飲料水に対し 100cfu の菌を接種した。キャップをして 25℃および 35℃に 48 時間保存し、経時的に採取して菌数を測定した。その結果、清涼飲料水中の pH, Brix(%)あるいは炭酸ガスまたは栄養源の有無など、製品の特性によって微生物動態が異なった。とくに茶系飲料、野菜ジュースおよびミルク入りコーヒー飲料では著しく生育する菌株が認められた。またこれら 3 種類の清涼飲料水中に毒素産生性細菌を接種し静置及び振盪条件で保存したところ、静置条件で毒素の産生が認められたものの振盪条件では産生が認められない菌株があり、飲料の種類によっては振盪により菌の増殖性に影響を与える可能性があることが分かった。

口飲み・開封時に混入する微生物の発育性は、製品の特性によって異なることから、製品開封後の飲用に関する表示は、十分配慮する必要があることが示唆された。

#### 研究協力者

杉山 寛治, 神田 隆 (静岡県環境衛生研究所)

富田 敦子 (静岡市環境保健研究所)

小沢 一弘 (株式会社 中部衛生検査センター)

小沼 博隆, 荒木 恵美子 (東海大学海洋学部)

後藤 慶一 (三井農林株式会社 食品総合研究所)

## A. 研究目的

現在、多種多様な形態および種類の清涼飲料水が製造販売されている。それに伴い製品の製造、流通、保管、消費のされ方が複雑になってきている。通常、清涼飲料水は一括表示に「保存方法：直射日光を避け、常温、暗所で保存してください」などと明記されており、欄外に「開封後はすぐにお飲みください」と注意表示がなされている。しかし PET ボトル入りの飲料は開封後の保存が容易であり、飲用時、特に口飲み時に微生物が混入し、増殖する可能性がある。平成 21 年度の本研究において、清涼飲料水の口飲み・開封試験および飲用時に起こる微生物腐敗が検討された。その結果、人の口腔内に常在する 400 株以上の細菌あるいは真菌が分離された。一部、毒素産生性細菌も分離された。そこで本年度は平成 21 年度の試験で分離された菌株および毒素産生性細菌を用いて接種試験を行い、清涼飲料水中での微生物動態を詳細に検討することを目的とした。

供試する清涼飲料水は、平成 21 年度の口飲み試験の結果から微生物の増殖が観察された PET ボトル入りの茶系飲料、果汁飲料、炭酸飲料(果汁入り)、スポーツドリンク(果汁入り)、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーターおよびミネラルウォーターを選定した。

また消費者が清涼飲料水を飲み残したのちキャップをして保存することを想定して試

験を行うこととした。あらかじめ半量とした飲料に各微生物を 100cfu 程度接種し、キャップを施し 25°C および 35°C で 48 時間まで保存し、経時的に菌数を測定した。毒素産生性細菌についても同様に試験を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試清涼飲料水

茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、炭酸飲料、スポーツドリンク、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーターの 8 種類の清涼飲料水を用いた。各飲料の pH(堀場製作所 pH メーター D-51)および Brix (%) (アタゴ 液体濃度計 PAL-1) を測定した(表 1)。

### 2. 使用菌株

#### 2-1 分離株(細菌)

*Lactobacillus fermentum*、*Streptococcus salivarius*、*Micrococcus luteus*、*Enterobacter cancerogenus*、*Enterococcus faecalis*、*Klebsiella pneumoniae*

#### 2-2 分離株(酵母)

*Candida albicans*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Saccharomyces cerevisiae*

#### 2-3 毒素産生性細菌

昨年度の研究で *Staphylococcus aureus*、*Bacillus cereus*、*Salmonella Typhimurium*、*Escherichia coli* など毒素産生性細菌が分離されたことから、本年度は毒素産生性能が明らかでない次の菌株を用いて接種試験を実施し

た。

*S. aureus*(A型毒素産生株)、*B. cereus*(エンテロトキシン産生株)、*S. Typhimurium* および *E. coli* (EHEC) O157:H7(VT2産生株)

### 3. 試験方法

#### 3-1 使用菌株の前培養

Trypticase Soy Broth(OXOID)を用いて37℃で18時間前培養した。培養後、リン酸緩衝液(PBS)(日水製薬)で段階的に約100cfu/100μlとなるように希釈した。接種菌数は、希釈した菌液100μlを標準寒天平板(関東化学)2枚に塗抹し、37℃で24時間培養し、得られたコロニー数から算出した。

#### 3-2 接種試験

開封後、半量を廃棄したペットボトルにペットボトル1本当たり100cfuとなるように希釈した菌液を接種した。1飲料につきペットボトル3本に接種し、キャップをしたのち25℃および35℃に設定したインキュベーター中に立てて保存した。0時間、6時間、24時間および48時間保存後の飲料を採取し菌数測定に供した。各測定時、ペットボトルをインキュベーターから取り出し、泡立えないように穏やかに攪拌後、10mlを採取した。残りは速やかにキャップを施し、インキュベーターに戻した。各菌数はPBSを用いて段階的、すなわちコロニー数が30から300となるように希釈し、その100μlまたは200μlを標準寒天平板に塗抹し、37℃で20時間培養し試料1ml当たりの菌数を算出した。結果は試験結果記

録表に記録した(参考資料1)

なおペットボトルをインキュベーターから取り出す際、濁りの有無を観察した。

#### 3-3 毒素産生性細菌の接種試験

毒素産生性細菌の接種試験は、茶系飲料、果汁飲料およびミルク入りコーヒー飲料について実施した。

半量にしたペットボトル1本当たり100cfuに調整した菌液を添加し、25℃および35℃の温度条件、並びに静置および振盪(100rpm/min)を組み合わせた4条件で各3本ずつ保存し、菌の増殖は0時間、6時間、24時間および48時間後に、毒素産生性は6時間、24時間および48時間後に測定した。*S. aureus*の毒素はSET-RPLA「生研」(デンカ生研)、*B. cereus*の毒素はCRET-RPLA「生研」(デンカ生研)および*E. coli* O157:H7の毒素はVTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いて測定した。

### C. 研究結果

#### 1. 分離細菌および酵母の接種試験

##### 1-1 茶系飲料

茶系飲料への接種試験結果を図1-1~図1-3に示した。*S. salivarius*、*M. luteus*および*E. faecalis*の増殖傾向は認められなかったが、*E. cancerogenus*、*K. pneumoniae*、*C. albicans*および*R. mucilaginosa*は25℃および35℃で顕著な増殖を認めた。また*L. fermentum*は35℃で顕著な増殖が認められ