

た。*S. cerevisiae*はわずかな増殖傾向が認められた。

保存時間に伴う濁りの発生は、24 時間後では *L. fermentum* および *E. cancerogenus* に、48 時間後では *E. cancerogenus*、*C. albicans* および *R. mucilaginosa* (25°Cのみ) で認められた。

1-2 果汁飲料

果汁飲料への接種試験結果を図 2-1～図 2-3 に示した。*L. fermentum*、*S. salivarius*、*M. luteus*、*E. cancerogenus*、*E. faecalis* および *K. pneumoniae* の増殖はいずれも認められなかった。一方、酵母の *C. albicans*、*R. mucilaginosa* および *S. cerevisiae* は著しく増殖した。*R. mucilaginosa* では 25°Cの方が 35°Cに比べ著しい増殖傾向を示した。*C. albicans* は 48 時間後に濁りを認めた。また *R. mucilaginosa* では 25°C保存のみ濁りを認めた。酵母の増殖に伴い、濁りのほか浮遊物および気泡の発生が認められた。

1-3 野菜ジュース

野菜ジュースへの接種試験結果を図 3-1～図 3-3 に示した。*S. salivarius* および *M. luteus* の増殖は認められなかった。*L. fermentum*、*E. cancerogenus*、*C. albicans*、*R. mucilaginosa* および *S. cerevisiae* では著しい増殖が認められた。*E. faecalis* および *K. pneumoniae* では若干の増殖があった。

1-4 炭酸飲料

炭酸飲料では、図 4-1～図 4-3 に示したと

おり、すべての接種した細菌および酵母の生育は認められなかった。

1-5 スポーツドリンク

スポーツドリンクへの接種試験結果を図 5-1～図 5-3 に示した。*L. fermentum*、*S. salivarius*、*M. luteus*、*E. faecalis*、*E. cancerogenus* および *K. pneumoniae* の生育は認められなかった。*C. albicans* および *R. mucilaginosa* は 25°Cおよび 35°C保存で、*S. cerevisiae* は 35°Cで若干の増殖傾向が認められた。

1-6 ミルク入りコーヒー飲料

ミルク入りコーヒー飲料への接種試験結果を図 6-1～図 6-3 に示した。*M. luteus*、*C. albicans*、*R. mucilaginosa* および *S. cerevisiae* の増殖はほとんど認められなかった。一方、*L. fermentum*、*S. salivarius*、*E. faecalis*、*E. cancerogenus* および *K. pneumoniae* は顕著な増殖が認められた。*E. faecalis*、*E. cancerogenus* および *K. pneumoniae* を接種し、48 時間後のミルク入りコーヒー飲料を電子レンジで加熱し、味見をしたところ異味があり、腐敗していることが明らかに分かった。

1-7 ニアウォーター

ニアウォーターでは、図 7-1～図 7-3 に示したとおり、すべての細菌および酵母の生育は認められなかった。

1-8 ミネラルウォーター

ミネラルウォーターの結果を図 8-1 から図 8-3 に示した。ほとんどの接種細菌および酵

母の生育は認められなかったが、*K. pneumoniae* では保存に伴うわずかな生育傾向が認められた。

2. 毒素産生性細菌の接種試験

毒素産生性細菌の接種試験の結果を図9～図11に示した。

茶系飲料では *S. Typhimurium* および *E. coli* (EHEC) O157:H7 は 25°C、35°Cともに比較的よく生育したが、静置条件に比べ振盪条件では生育が抑制された。また、*S. aureus* および *B. cereus* はほとんど生育しなかった。

野菜ジュースでは *S. Typhimurium* が 35°C で比較的よく生育したが、25°Cでは中程度の生育であった。また、*S. aureus*、*B. cereus*、*E. coli* (EHEC) O157:H7 はほとんど生育しなかった。

ミルク入りコーヒー飲料では 25°Cでは静置条件、振盪条件ともに *S. Typhimurium*、*E. coli* (EHEC) O157:H7 が比較的よく増殖した。しかし 35°Cでは静置条件ではよく増殖したが、振盪条件では両菌種ともに生育しなかった。

毒素産生の結果を表 3-1～表 3-3 に示した。茶系飲料およびミルク入りコーヒー飲料において *E. coli* (EHEC) O157:H7 の増殖にともない毒素が産生されることが確認された。茶系飲料は 25°Cの静置条件で 1:2 倍、35°Cで 1:8 倍の毒素が検出された。ミルク入りコーヒー飲料は、25°Cの静置条件で 1:8 倍、

振盪条件で 1:32 倍、35°Cの静置条件で 1:64 倍の毒素が検出された。またミルク入りコーヒー飲料では *S. aureus* の増殖がみられたが毒素は検出されなかった。

B. cereus は、いずれの条件でも菌の生育はみられず、検体中に毒素の産生も認められなかった。

培養温度と静置培養、振盪培養の組み合わせから、飲料の種類によっては振盪により菌の増殖性が抑えられるものがある可能性が考えられた。

D. 考察

1. 分離細菌および酵母の接種試験

茶系飲料への接種試験において、*E. cancerogenus* および *K. pneumoniae* の著しい増殖が認められた。*L. fermentum* では 35°Cのみ増殖した。いずれも増殖に伴い濁りが観察された。本試験に供した茶系飲料のカテキン含有量は 57mg/100ml (酒石酸鉄法によるタンニン量として) であり、茶系飲料としては一般的なものである。カテキンはグラム陽性菌に対する抗菌性があるといわれているが、腸内細菌や酵母が増殖する可能性があり、消費者への情報提供が必要であると考えられる。

野菜ジュースでは *L. fermentum*、*E. cancerogenus* および *K. pneumoniae* の増殖が認められた。*L. fermentum* では濁りの発生が観察されたが、これはペットボトルのレベルを剥

がして観察したものであり、消費者が日常的に飲用する場合には気づかないと思われる。

接種した酵母 3 菌株は茶飲料、果汁飲料、野菜ジュースおよびスポーツドリンクで増殖が認められた。これは酵母の栄養要求性によるものと考えられる。一方、ミルク入りコーヒー飲料ではほとんどの細菌の増殖が顕著であったが、*M. luteus* および酵母の増殖は認められなかった。これは本試験に供した製品中の添加物など配合成分の影響によることが考えられる。腐敗レベルに達すれば消費者は味に異常を感じそれ以上飲用しないと思われるが、市場では多様なミルク入りコーヒー飲料が流通していることから、さらなる検討が必要であろう。

2. 毒素産生性細菌の接種試験

茶系飲料では *S. Typhimurium* および *E. coli* (EHEC) O157:H7 (VT2 産生株) の生育が認められた。*E. coli* (EHEC) O157:H7 (VT2 産生株) では毒素も産生された。野菜ジュースでは *S. Typhimurium* が生育した。ミルク入りコーヒー飲料では、*S. Typhimurium* および *E. coli* (EHEC) O157:H7 (VT2 産生株) の生育が認められ、*E. coli* (EHEC) O157:H7 (VT2 産生株) では毒素の産生もあったが、振盪条件の方が静置条件より生育が抑制される傾向にあった。

培養温度と静置培養、振盪培養の組み合

わせから、飲料の種類によっては振盪により菌の発育性が抑えられるものがある可能性が考えられた。したがって毒素産生性細菌が汚染した場合は、保存条件により健康被害をもたらす程度まで増殖する可能性が示唆された。

E. 結論

今回、明らかになったことをまとめると次のようになる。

- ・ 茶系飲料は腸内細菌および酵母が増殖する可能性が示唆された。
- ・ 野菜ジュースは細菌および酵母の増殖が認められた。
- ・ ミルク入りコーヒー飲料では細菌の増殖が認められ、*E. coli* O157:H7 では毒素が産生された。酵母は増殖しなかった。
- ・ 果汁飲料およびスポーツドリンクでは酵母の増殖が認められた。
- ・ 炭酸飲料、ニアウォーターでは細菌、酵母とも増殖しなかった。
- ・ ミネラルウォーターでは、細菌が若干生育する傾向が認められたが著しい増殖はなかった。
- ・ 清涼飲料水中での微生物の増殖に関する清涼飲料水の特長値として、pH および Brix(%)が挙げられた。pH が 4 未満の果汁飲料、炭酸飲料、スポーツドリンクおよびニアウォーターは細菌の増殖が抑制された。

・ 酵母はpH が 4 未満であっても増殖した。

・ pH が 6.5 以上であったミルク入りコーヒー飲料ではほとんどの細菌が増殖したものの酵母の増殖は抑制された。

製造所における細菌汚染検出の試み. 日本食品微生物学雑誌. 27:141-145, 2010

以上のように清涼飲料水は製品特性により、接種した微生物の挙動が異なることが分かった。25℃保存で増殖した微生物は35℃保存でも増殖しており、室温でも十分増殖可能であると思われる。各メーカーは製品特性および本研究の結果等を参考に製品開封後の保存性に関する情報を自ら把握し、消費者に対する注意喚起を行う必要があると考えられた。

F. 参考文献

- 1) Sperber, W.H., *et. al.* Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Springer. 2009.

G. 研究発表

1. 論文発表

Moe, K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Nakai, M. and Misawa, N. The mode of biofilm formation on Smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. J. Vet. Med. Sci. 74: 411-416, 2010

大西 貴弘. 国産ミネラルウォーターのエンドトキシン濃度測定による水源およびその

(参考資料1)

試験結果記録表

■検体番号

製品	菌種	温度	静置・振盪	試験開始日： 月 日
				担当組織名：

製品				
A…茶系飲料	B…果汁飲料	C…野菜ジュース	D…炭酸飲料	E…スポーツドリンク
F…ミルク入りコーヒー飲料	G…ニアウォーター	H…ミネラルウォーター		

菌種				
1 … <i>Enterobacter cancerogenus</i>	2 … <i>Enterococcus faecali</i>	3 … <i>Staphylococcus aureus</i>	4 … <i>Bacillus cereus</i>	
5 … <i>Salmonella typhimurium</i>	7 … EHEC O157:H7	8 … <i>Candida albicans</i>	9 … <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
10… <i>Lactobacillus fermentum</i>	11… <i>Streptococcus salivarius</i>	12… <i>Micrococcus luteus</i>	13… <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
14… <i>Cladosporium cladosporioides</i>	15… <i>Aspergillus sydowii</i>	16… <i>Penicillium olsonii</i>	17… <i>Exophiala xenobiotica</i>	
18… <i>Aureobasidium pullulans</i>				

毒素産生性 (VTEC・SET・CRET)

サンプル No.	#1	培養時間		
		6時間後	24時間後	48時間後
	#2			
	#3			
	平均凝集価			

- 凝集価を記入する

接種菌液

サンプル No.	希釈倍数				
コロニー数					
平均コロニー数					
菌数	cfu/ml				

() 倍希釈した前培養菌液 (μ l) 接種⇒接種菌数 (cfu/ペットボトル)

培養6時間後

サンプル No.	サンプル No.		
	#1	#2	#3
コロニー数			
菌数	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml
平均菌数± S.D.	cfu/ml		
備考			

- 各サンプルを0.2 ml ずつ5枚の平板に接種し、コロニー数を合計し1 ml あたりの菌数とする。

(参考資料 1)

培養 24 時間後 濁り (なし・あり・判定不能)

(A)

	サンプル No.								
	#1			#2			#3		
コロニー数									
菌数	cfu/ml			cfu/ml			cfu/ml		

(B)

	サンプル No.					
	#1		#2		#3	
希釈倍数						
コロニー数						
平均コロニー数						
菌数	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml

(C)

	サンプル No.		
	#1	#2	#3
菌数	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml
平均菌数 ± S.D.	cfu/ml		
備考			

- 濁りなし⇒各サンプルを 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種し、コロニー数を合計し 1 ml あたりの菌数とする。結果を表 (A) に記入。
10⁻²希釈したサンプルを 0.1ml ずつ 2 枚の平板に接種。結果を表 (B) に記入。
- 濁りあり⇒10⁻⁵、10⁻⁶希釈したサンプルをそれぞれ 0.1ml ずつ 2 枚の平板に接種。結果を表 (B) に記入。
- 判定不能⇒各サンプルを 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種し、コロニー数を合計し 1 ml あたりの菌数とする。結果を表 (A) に記入。
10⁻²、10⁻⁴希釈したサンプルをそれぞれ 0.1ml ずつ 2 枚の平板に接種。結果を表 (B) に記入。
- 表 (A)、(B) より求めた菌数を表 (C) に記入し、培養 24 時間後の菌数を計算する。

培養 48 時間後 濁り (なし・あり・判定不能)

(A)

	サンプル No.								
	#1			#2			#3		
コロニー数									
菌数	cfu/ml			cfu/ml			cfu/ml		

(B)

	サンプル No.					
	#1		#2		#3	
希釈倍数						
コロニー数						
平均コロニー数						
菌数	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml

(C)

	サンプル No.		
	#1	#2	#3
菌数	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml
平均菌数 ± S.D.	cfu/ml		
備考			

- 濁りなし⇒各サンプルを 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種し、コロニー数を合計し 1 ml あたりの菌数とする。結果を表 (A) に記入。
10⁻²希釈したサンプルを 0.1ml ずつ 2 枚の平板に接種。結果を表 (B) に記入。
- 濁りあり⇒10⁻⁵、10⁻⁶希釈したサンプルをそれぞれ 0.1ml ずつ 2 枚の平板に接種。結果を表 (B) に記入。
- 判定不能⇒各サンプルを 0.2 ml ずつ 5 枚の平板に接種し、コロニー数を合計し 1 ml あたりの菌数とする。結果を表 (A) に記入。
10⁻²、10⁻⁴希釈したサンプルをそれぞれ 0.1ml ずつ 2 枚の平板に接種。結果を表 (B) に記入。
- 表 (A)、(B) より求めた菌数を表 (C) に記入し、培養 48 時間後の菌数を計算する。

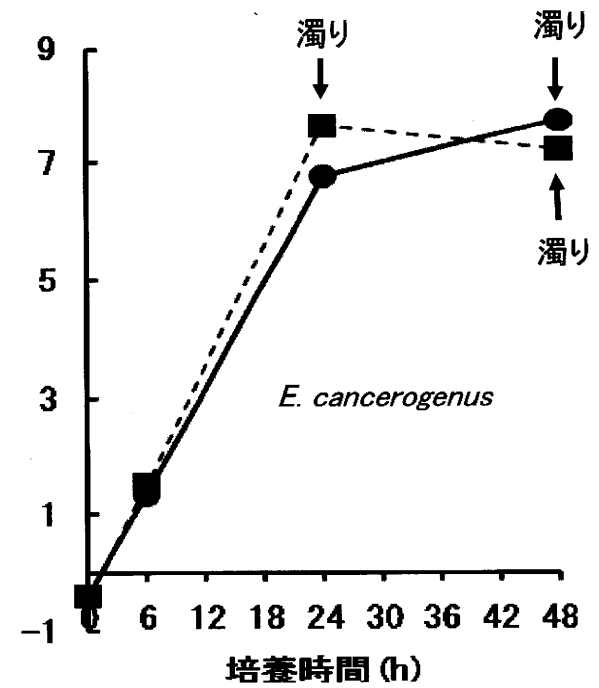
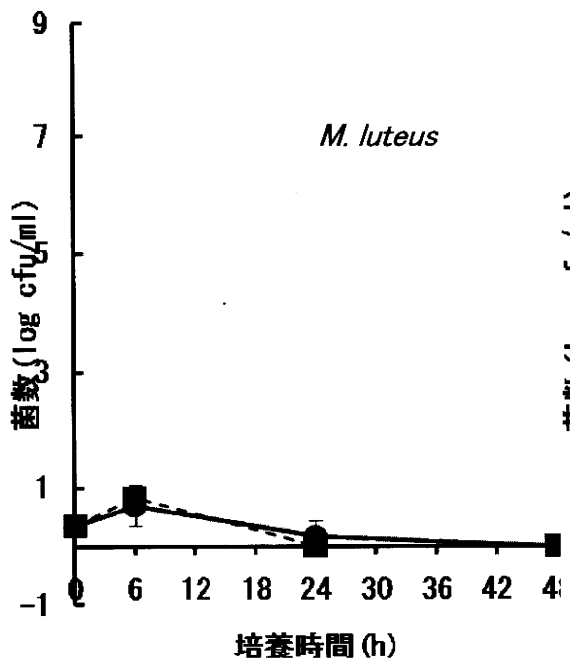
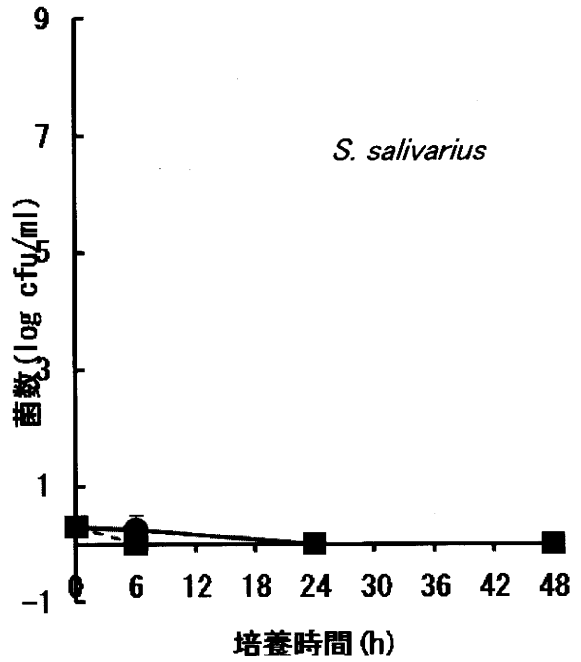
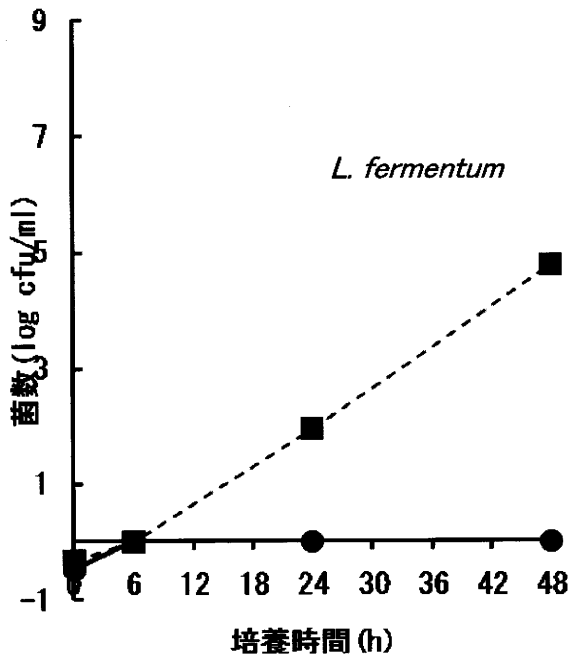


図 1-1 茶系飲料 接種試験(細菌 1/2)

保存条件 : ● 25°C, ■ 35°C

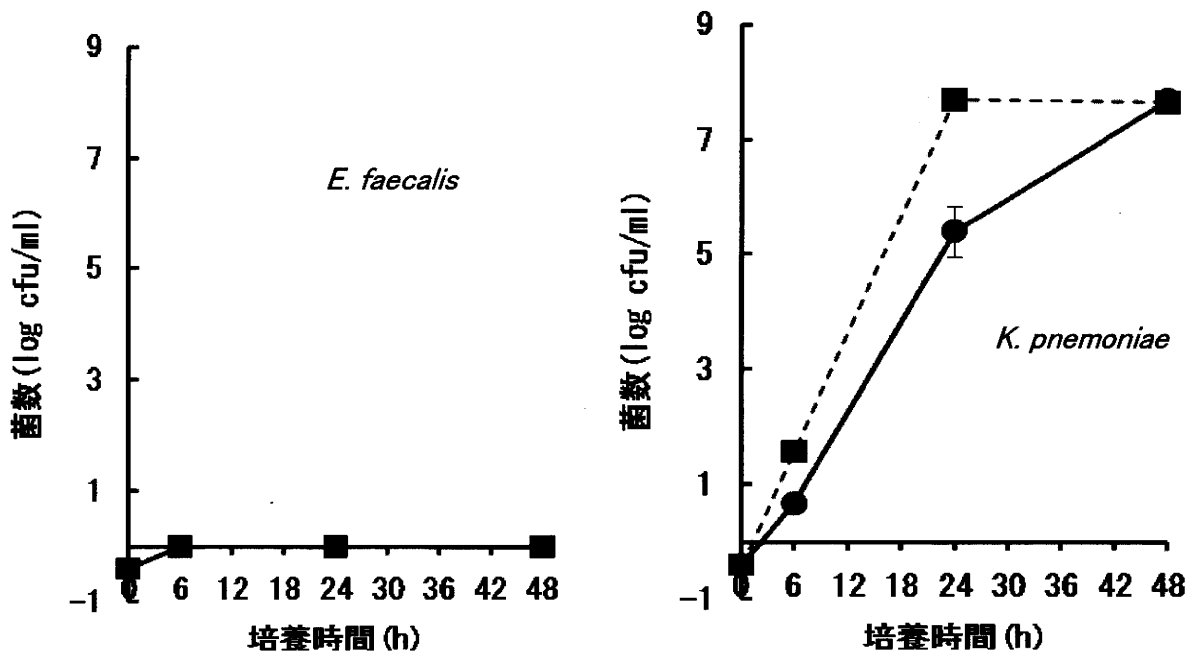


図 1-2 茶系飲料 接種試験(細菌 2/2)

保存条件 : ● 25°C, ■ -35°C

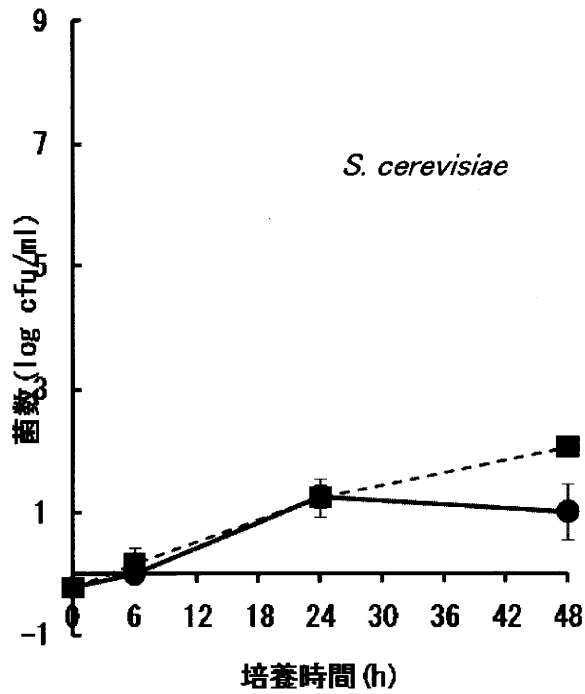
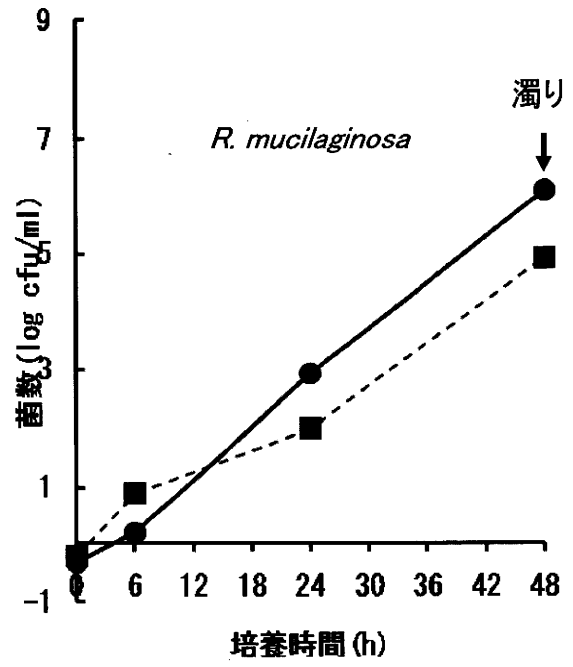
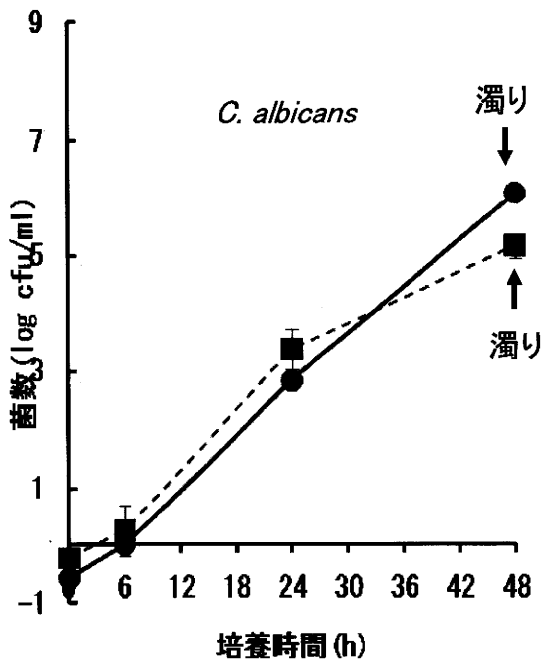


図 1-3 茶系飲料 接種試験(酵母)

保存条件 : —●— 25°C, --■-- 35°C

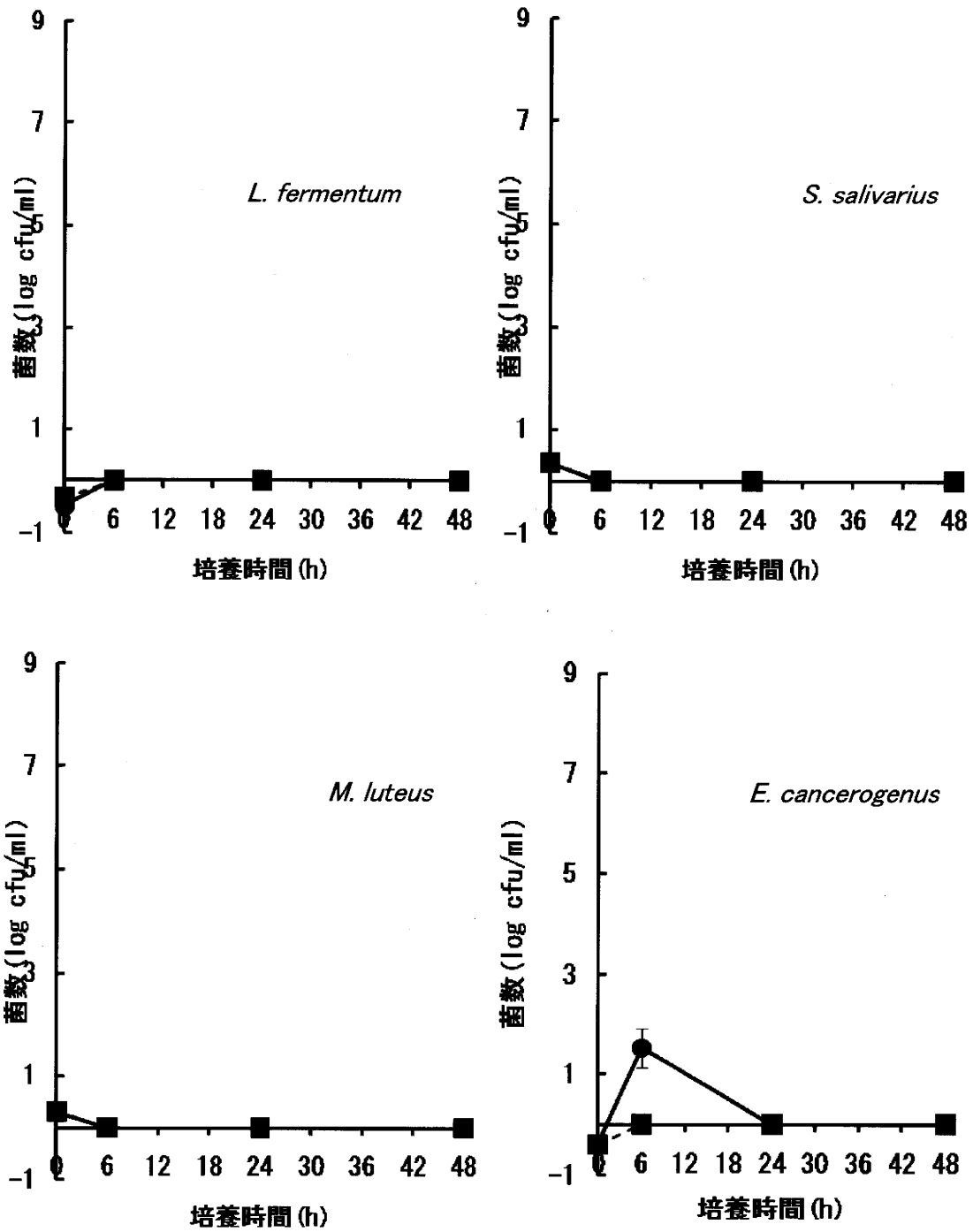


图 2-1 果汁飲料 接種試驗(細菌 1/2)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C

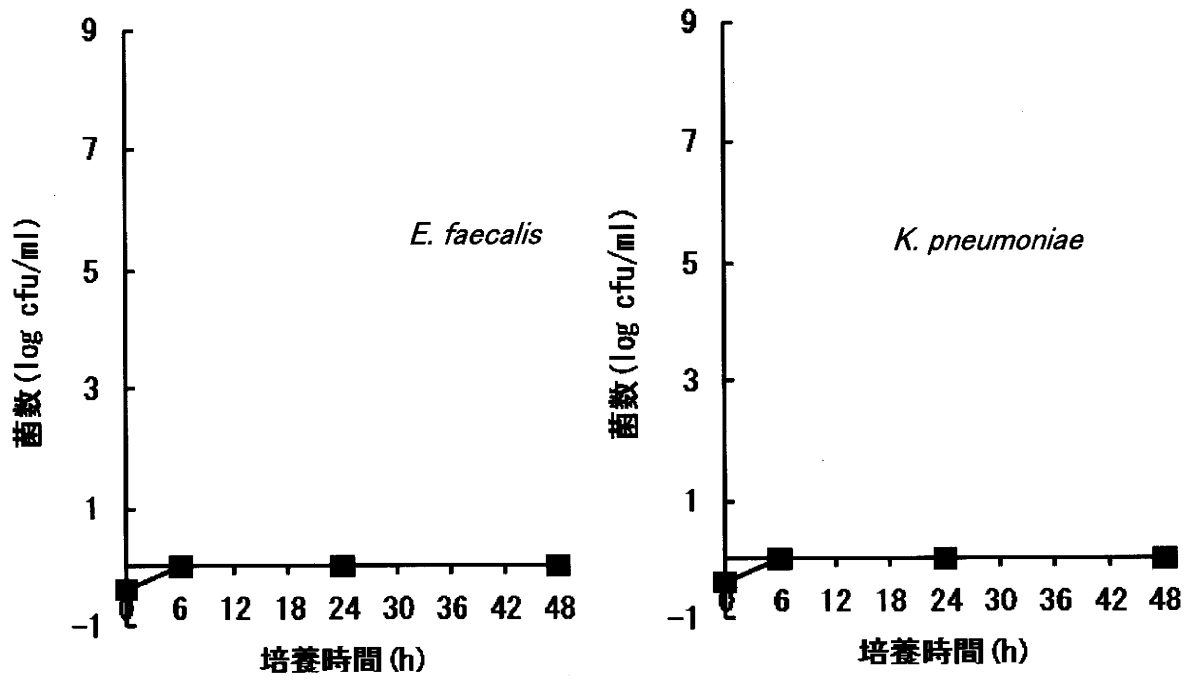


图 2-2 果汁飲料 接種試驗(細菌 2/2)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C

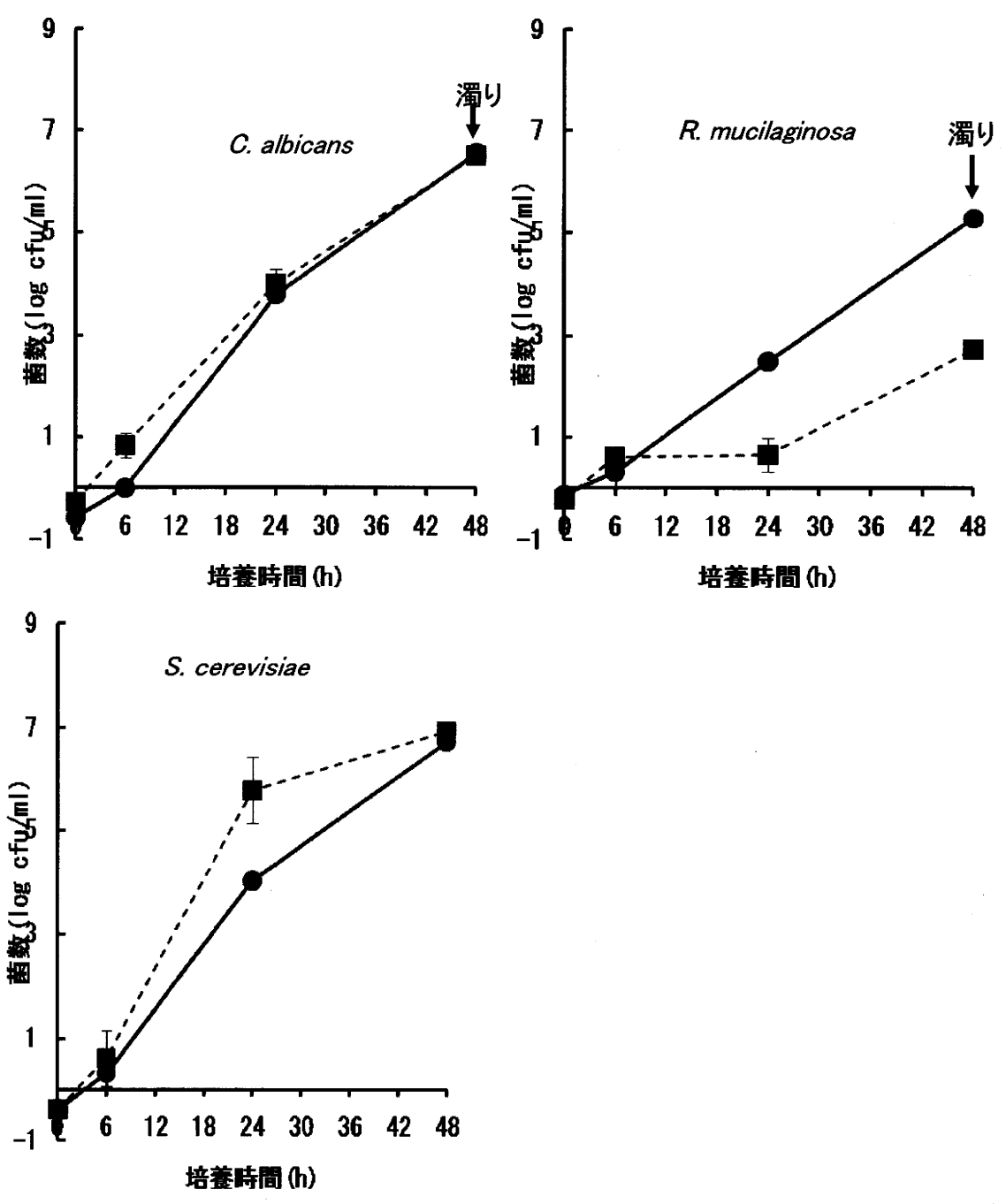


図 2-3 果汁飲料 接種試験(酵母)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C

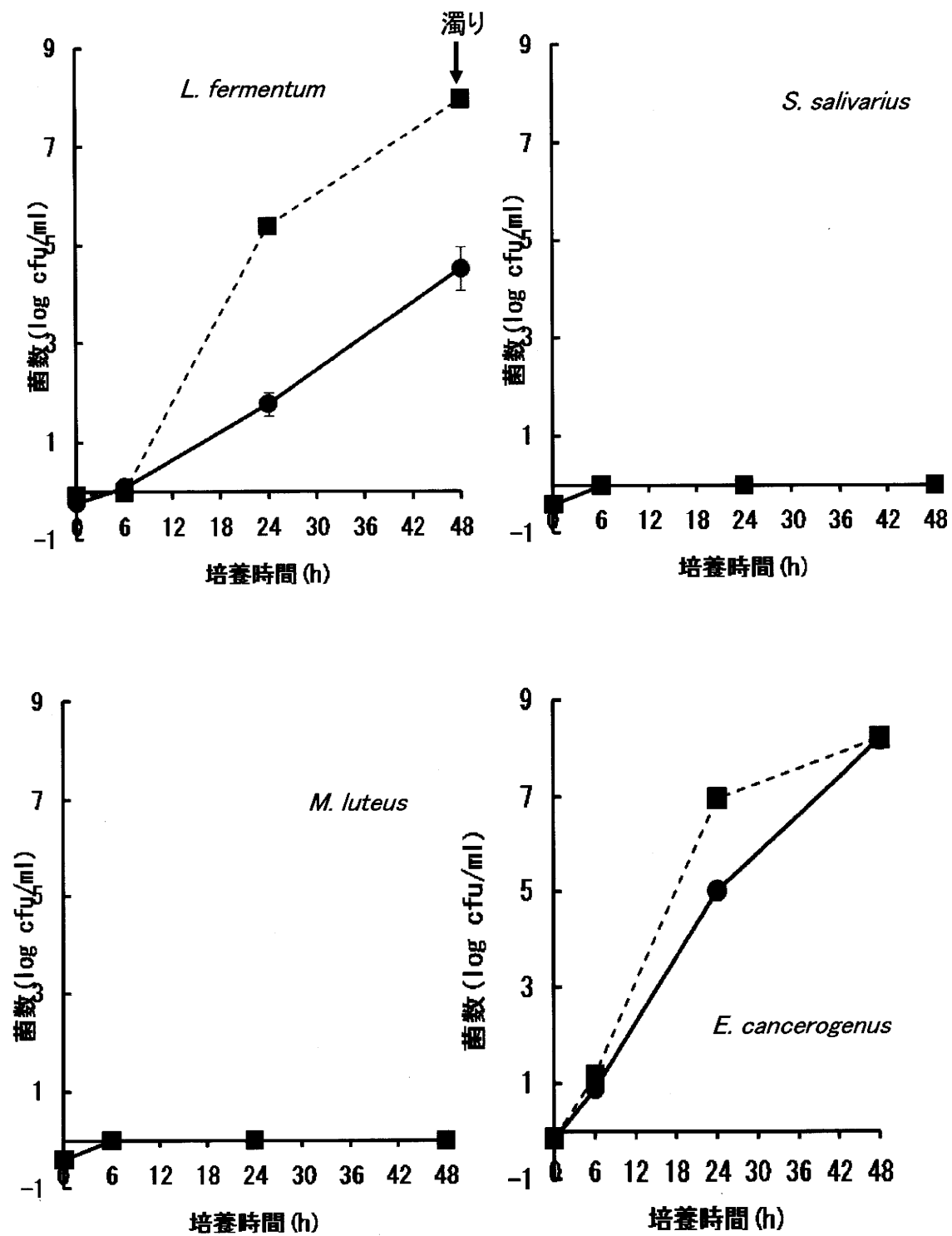


図 3-1 野菜ジュース 接種試験(細菌 1/2)

保存条件 : ●— 25°C, —■— 35°C

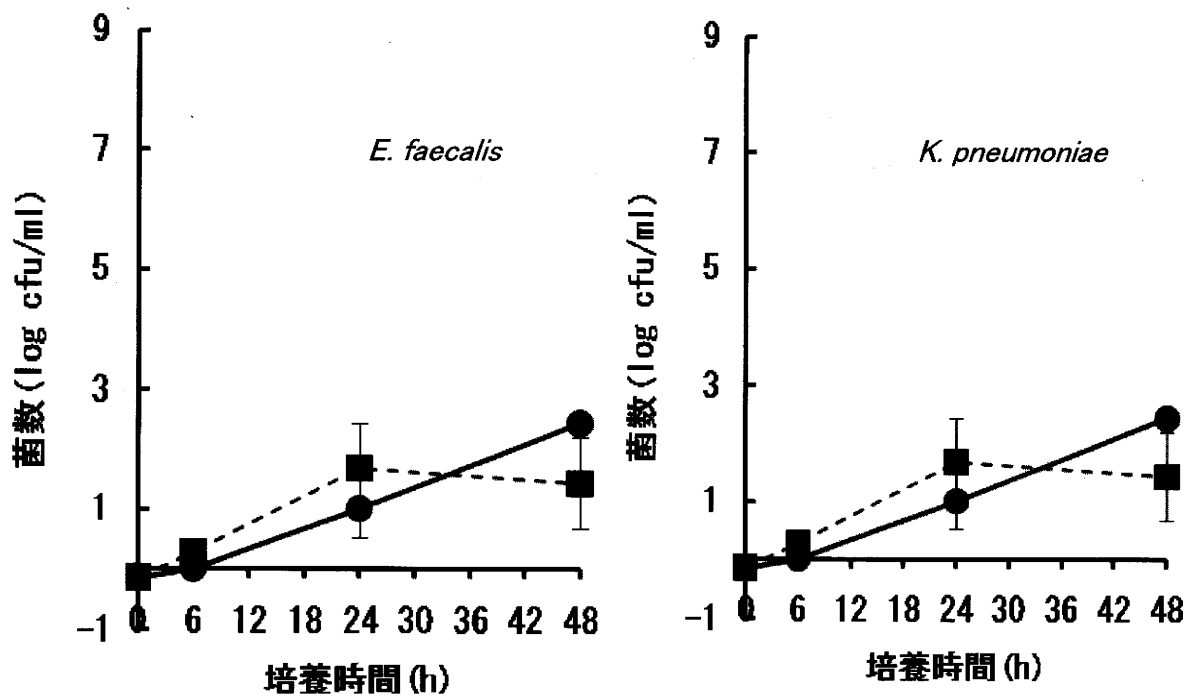


図 3-2 野菜ジュース 接種試験(細菌 2/2)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C

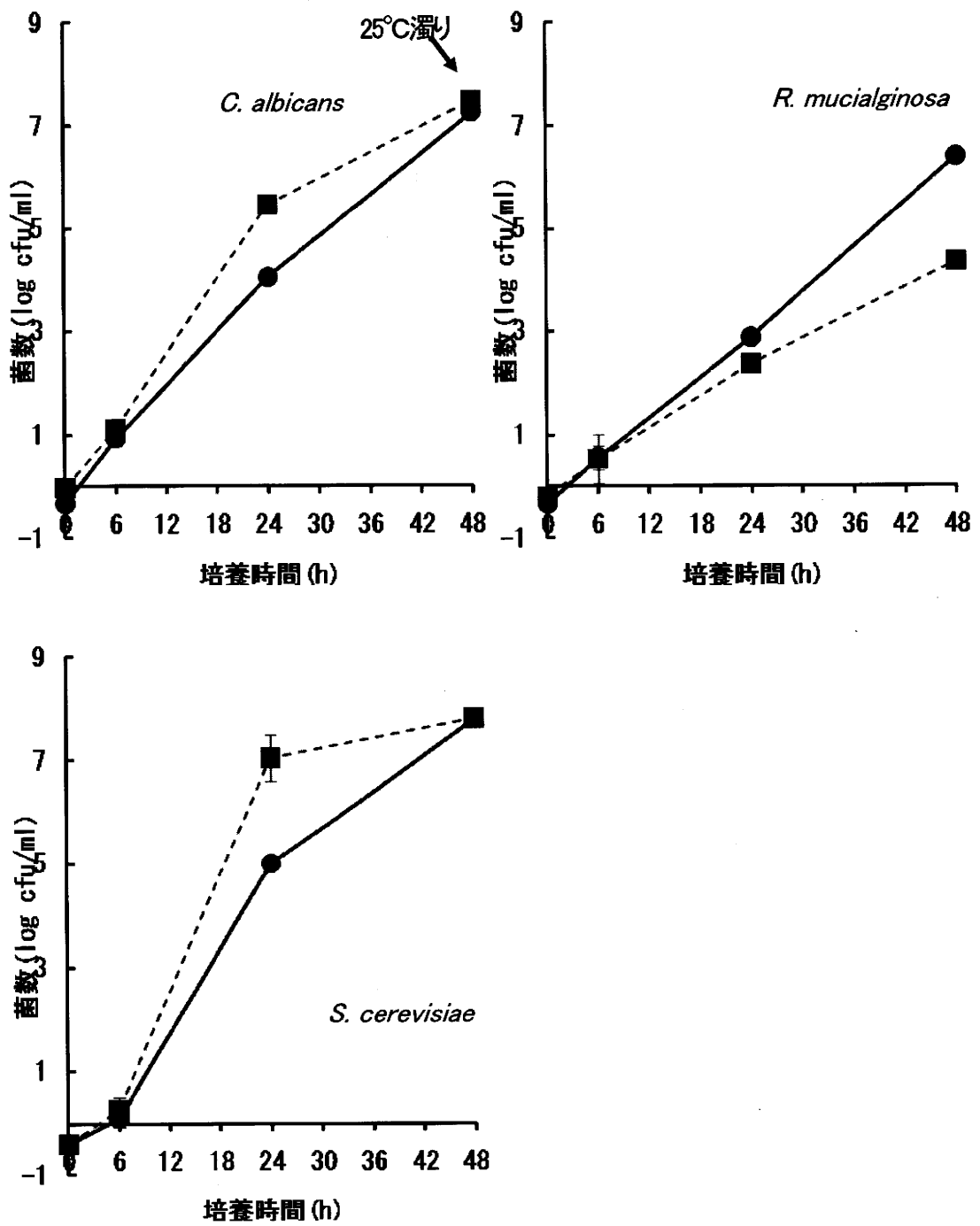


図 3-3 野菜ジュース 接種試験(酵母)

保存条件 : ●— 25°C, —■— 35°C

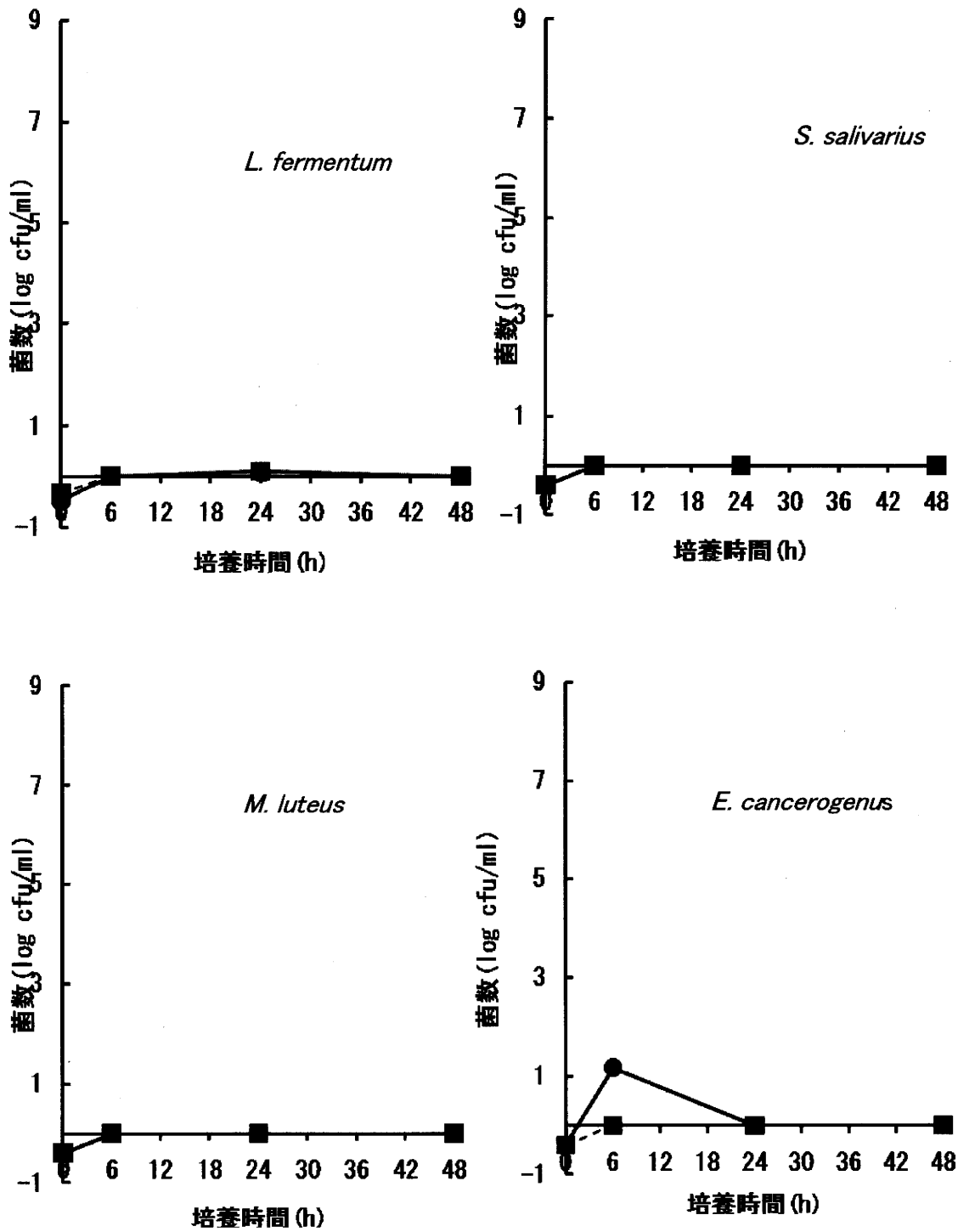


圖 4-1 炭酸飲料 接種試驗(細菌 1/2)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C

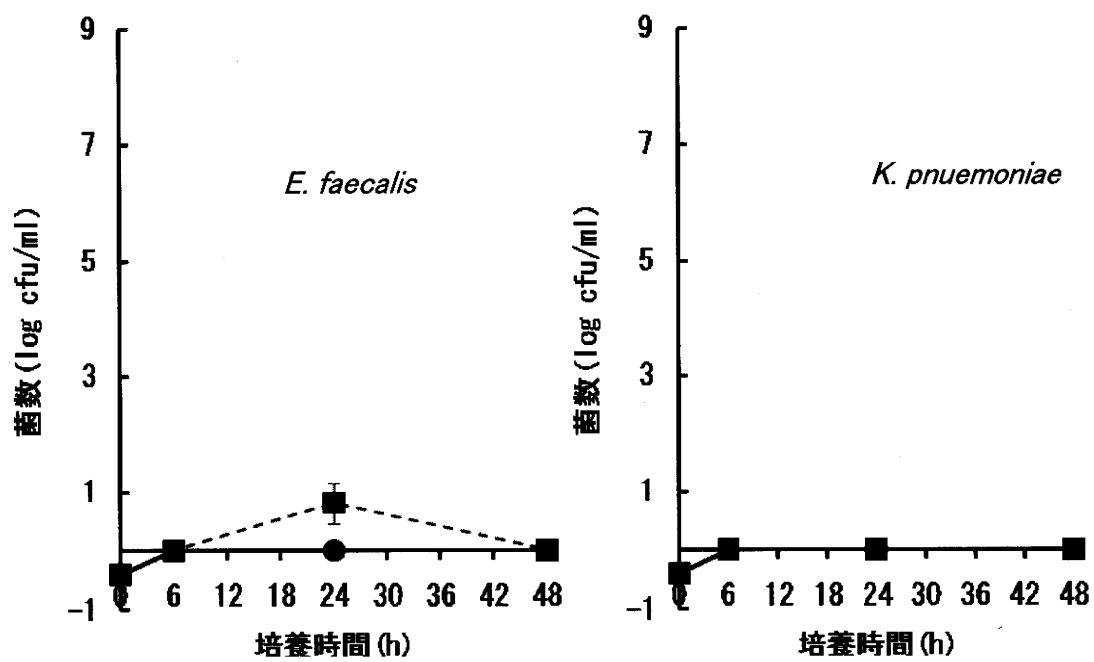


図 4-2 炭酸飲料 接種試験(細菌 2/2)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C

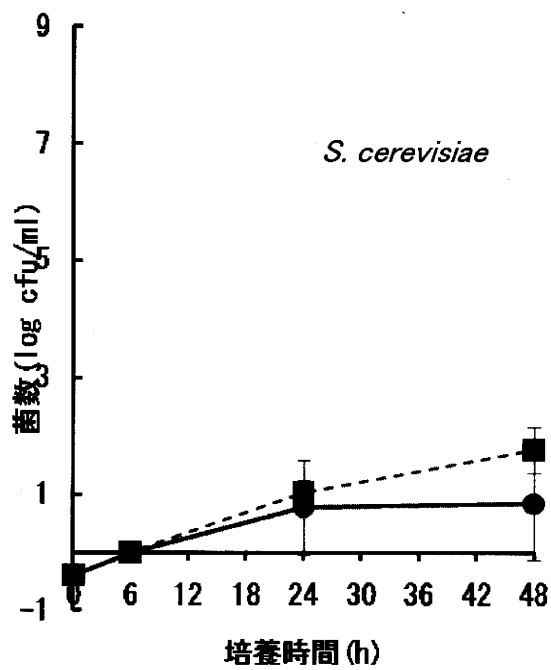
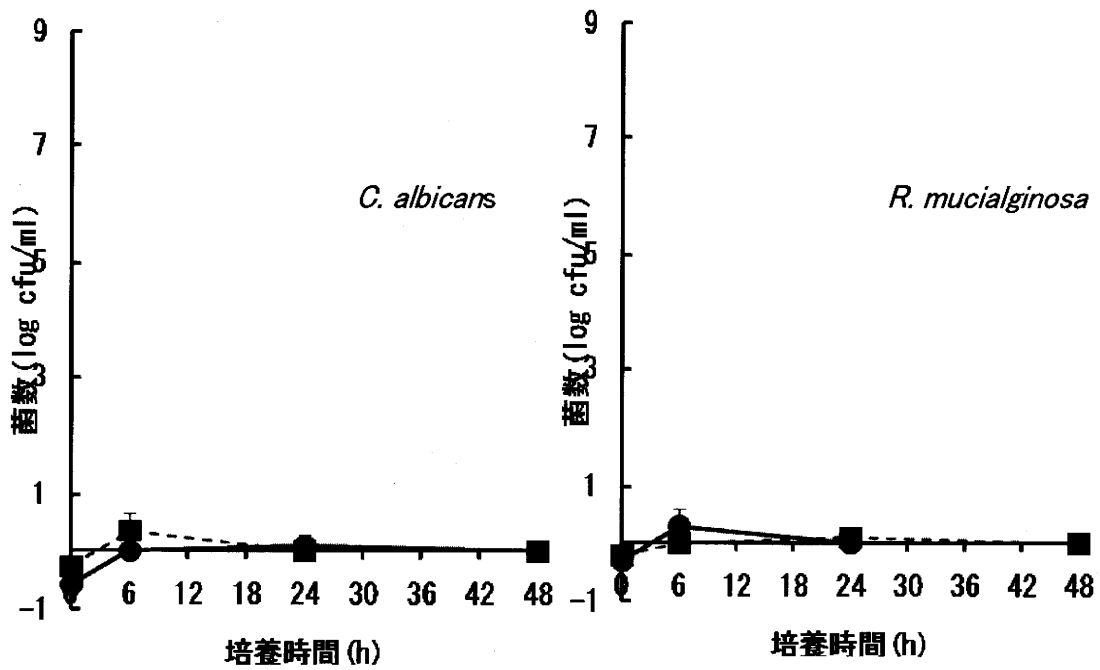


图 4-3 炭酸飲料 接種試驗(酵母)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C

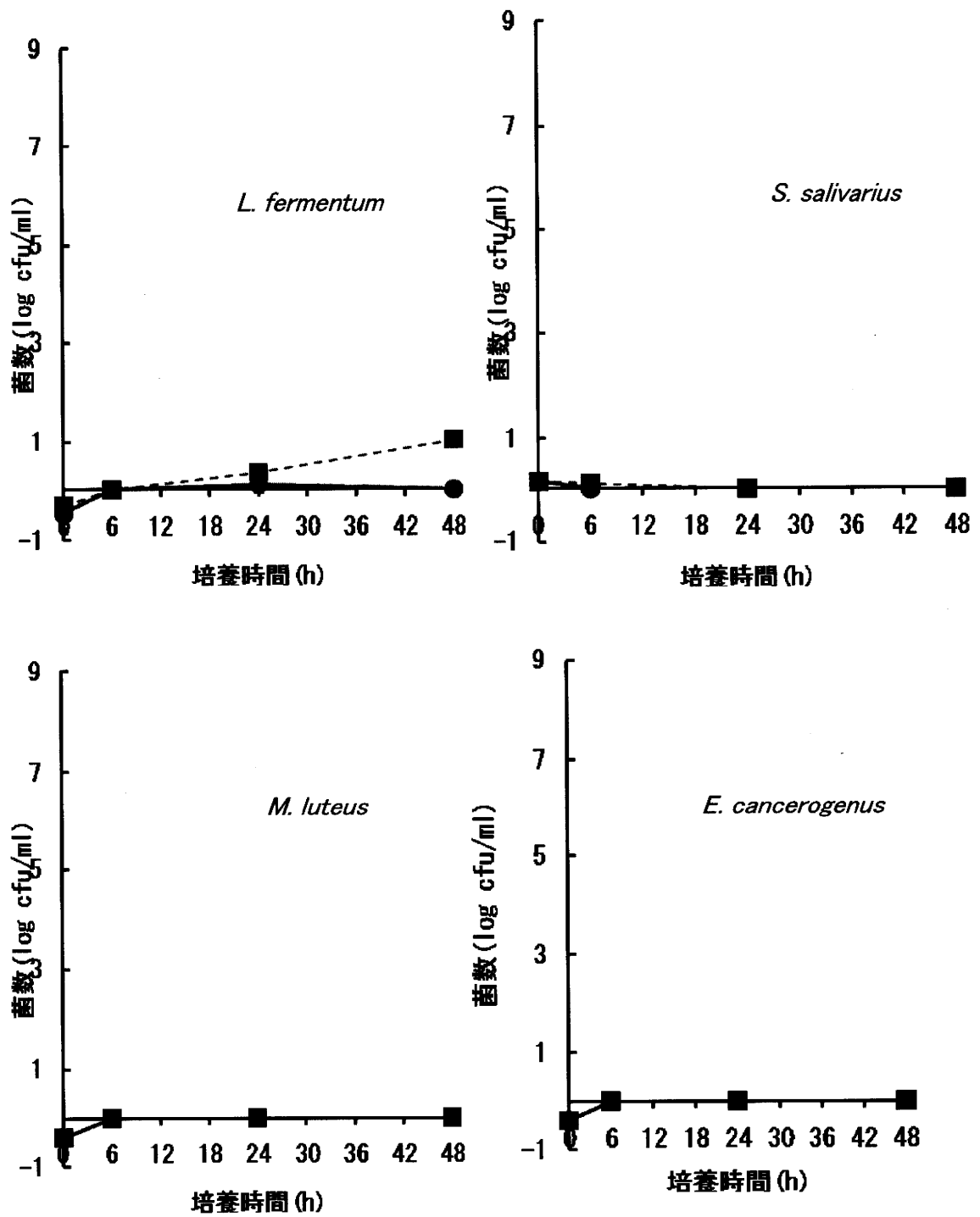


図 5-1 スポーツドリンク 接種試験(細菌 1/2)

保存条件 : ●— 25°C, —■— 35°C

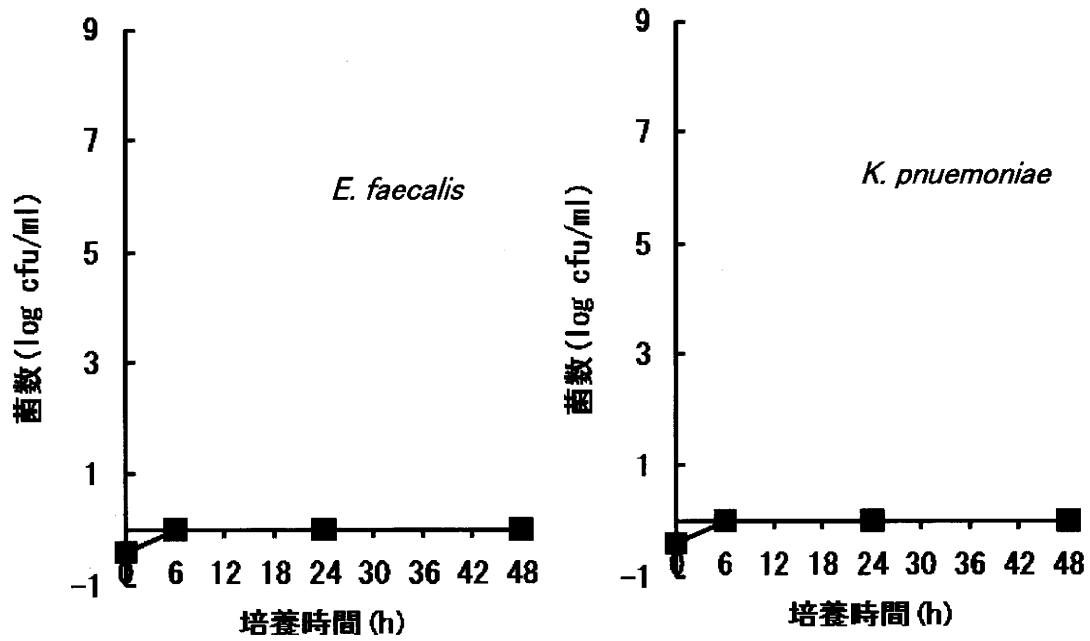


図 5-2 スポーツドリンク 接種試験(細菌 2/2)

保存条件 : —●— 25°C, -■- 35°C