

- ③ コロニー形成数をカウントし、芽胞数を求める。

## ・栄養細胞液（菌液）の調製方法

### 1. 試薬

- ① 滅菌 PBS 溶液
- ② 標準寒天培地
- ③ SCD (=TS) 液体培地

### 2. 操作

菌液調製操作は、以下のフローに沿って安全キャビネット内にて無菌的に行う。

#### 2.1 菌起こし

- ① 滅菌済ループを用いてカジトン培地に保存してあった菌体入りチューブから菌体をかき取る。
- ② 標準寒天培地に菌体を画線し、培地を反転させ、35℃で24時間培養する。

#### 2.2 本培養

- ① 滅菌済白金線を用いて純粋培養された集落の一部を取り、SCD 液体培地 (10 mL) に菌体を接種し、35℃で15時間培養する。

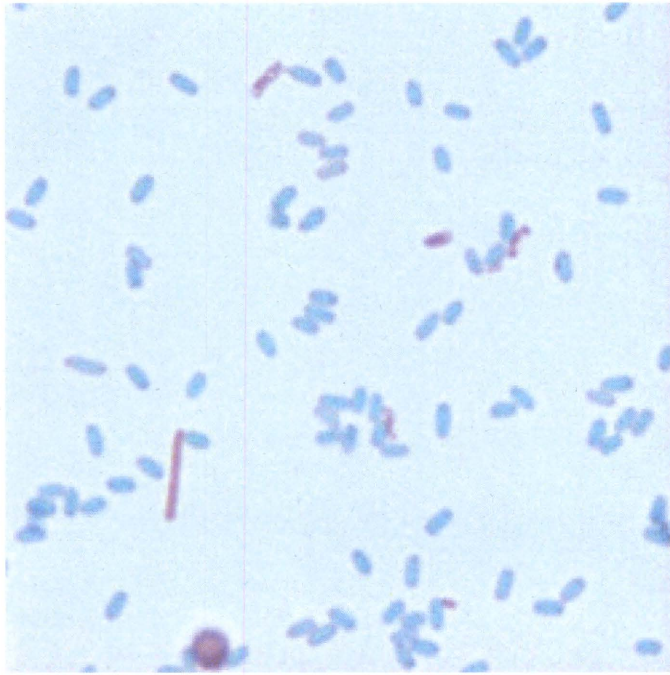
#### 2.3 集菌・洗浄

- ① 菌液を遠心沈殿管に移し、遠心分離 (3,500 rpm×10 min、4℃) して上清を取り除き、沈殿を滅菌 PBS 溶液 10 mL に懸濁させる。
- ② ①の処理を3回繰り返し、洗浄する。

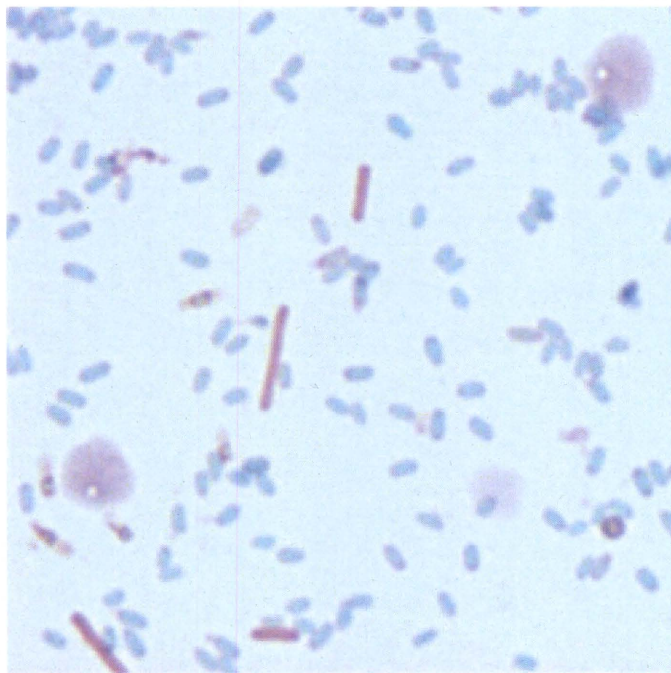
#### 2.4 菌数測定

- ① 菌液 1 mL を滅菌 PBS 溶液 9 mL と混和し、10倍希釈液を調整する。さらに滅菌 PBS 溶液で希釈して、段階希釈液（必要に応じ  $10^7$  倍希釈液まで）を調整する。
- ② 段階希釈液 100  $\mu$ L を標準寒天培地上に滴下して滅菌済コンラージ棒を用いて塗抹し、培地を反転させ、35℃で24時間培養する（一希釈段階につき2連で実施）。
- ③ コロニー形成数をカウントし、菌数を求める。

（注）栄養細胞の菌液は試験ごとに調製する。濁度計などを用い、あらかじめ約  $10^7$  cfu/ml の濃度に調製できる目安（濁度など）を作っておき、試験毎の濃度調整はその目安をもとに行う。



☒ 1. *Bacillus subtilis* NBRC 3134



☒ 2. *Bacillus subtilis* NBRC 14117

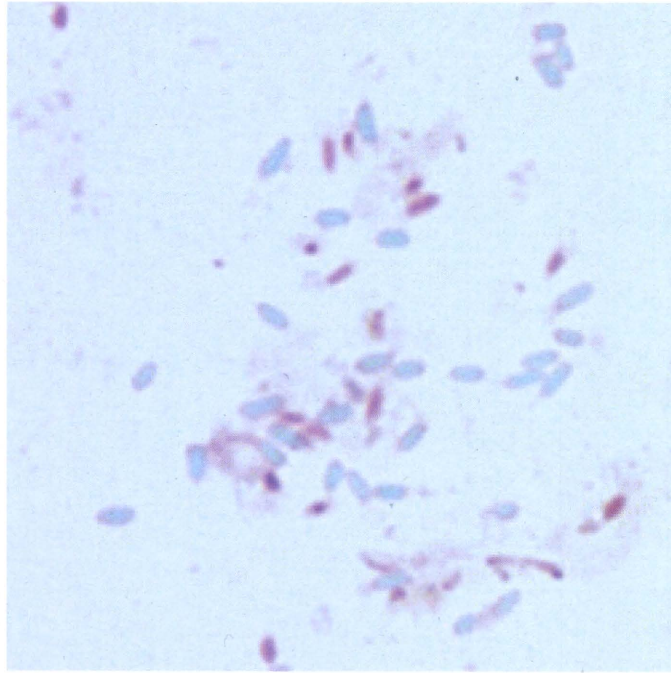


図 3. *Bacillus cereus* NBRC 13494

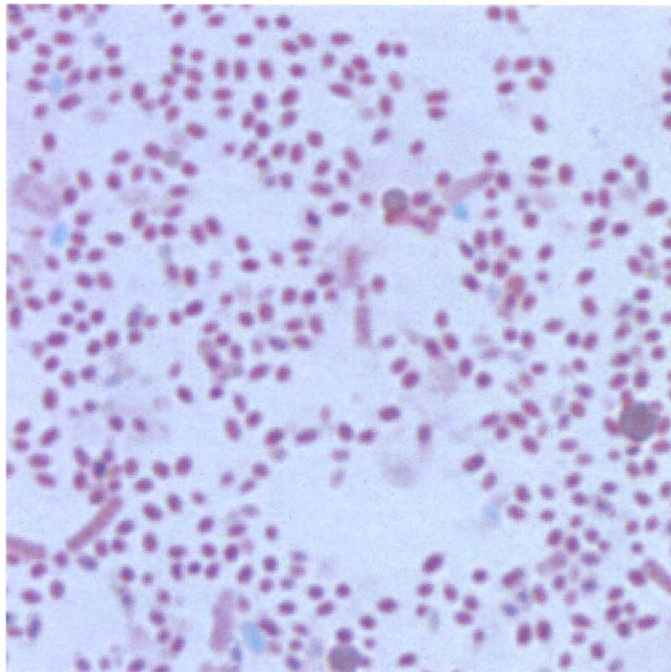


図 4. *Bacillus cereus* JCM 2152<sup>T</sup>



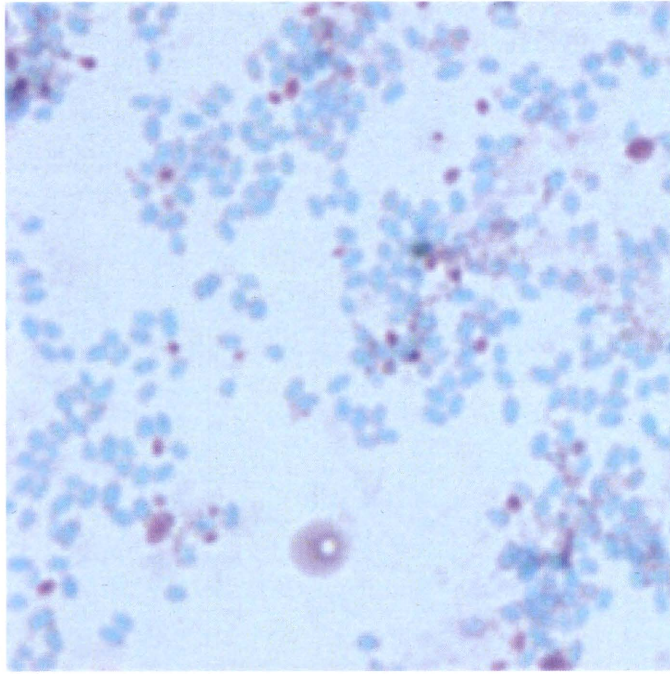


図 5. *Bacillus cereus* JCM 2152<sup>T</sup> (熱処理なし)

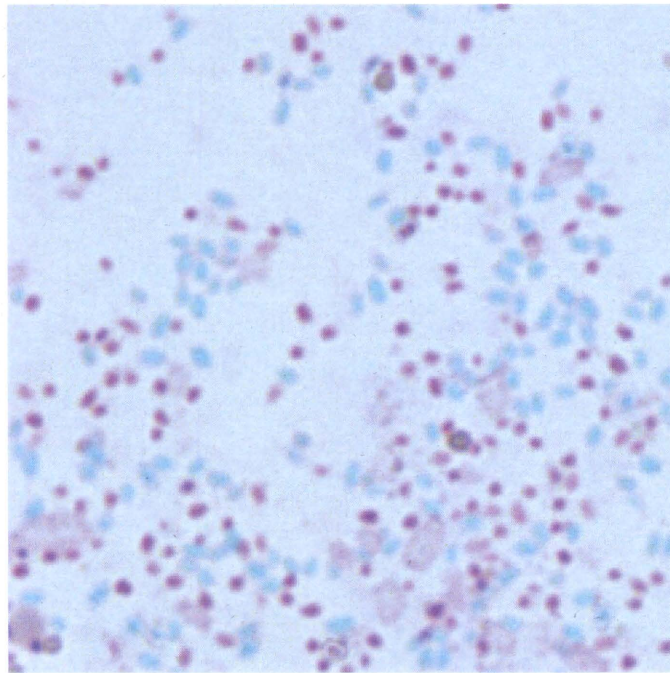


図 6. *Bacillus cereus* JCM 2152<sup>T</sup> (75°C、1 分熱処理)

表 1. 85°C・30 分の加熱処理の菌数低減効果

菌種	菌株 No.	菌数(log cfu/ml)	
		加熱前	加熱後
大腸菌	NBRC 3301	6.95±0.40	0.00±0.00
	NBRC 3972	7.15±0.03	0.00±0.00
	平均	7.05±0.30	0.00±0.00
サルモネラ菌	NBRC 100797	7.46±0.61	0.00±0.00
	NBRC 105726	7.47±0.09	0.00±0.00
	平均	7.46±0.44	0.00±0.00
腸球菌	NBRC 100482	7.08±0.03	0.00±0.00
	NBRC 100480	7.70±0.08	0.00±0.00
	平均	7.39±0.32	0.00±0.00
黄色ブドウ球菌	NBRC 13276	7.64±0.10	0.00±0.00
	NBRC 12732	6.98±0.02	0.00±0.00
	平均	7.31±0.34	0.00±0.00
枯草菌	NBRC 3134	7.45±0.22	7.19±0.50
		Y=7.4505-0.0087X	
	NBRC 14117	7.34±0.23	7.26±0.26
		Y=7.3424-0.0028X	
平均	7.40±0.23	7.22±0.40	
セレウス菌	NBRC 13494	7.22±0.32	7.02±0.48
		Y=7.2247-0.007X	
	JCM 2152 <sup>T</sup>	7.28±0.18	3.84±0.43
		Y=7.2821-0.1146X	
平均	7.25±0.26	5.43±1.65	

Y: 菌数の対数值(CFU/mL)

X: 加熱時間(分)

表 2. 清涼飲料水の殺菌・除菌の方法等

殺菌または除菌を要するもの		殺菌または除菌を要しないもの	
a pH4.0 未満のもの 菌は中心部の温度を 65℃・10 分加熱またはこ れと同等以上の効力を 有する方法で行う	b pH4.0 以上もの (pH4.6 以上で、かつ水分活性 が 0.94 を越えるものを除 く) の殺菌は中心部の温 度を 85℃・30 分加熱す る方法またはこれと同等 以上の効力を有する方 法で行う	c pH4.6 以上、かつ水分 活性が 0.94 を越えるも のの殺菌は原材料等に 由来して当該食品中に 存在し、かつ発育し得る 微生物を死滅させるの に十分な効力を有する 方法または b に定める方 法で行う	d 除菌は原材料等に由 来して当該食品中に存 在し、かつ発育し得る微 生物を除去するのに十 分な効力を有する方法 で行う

(注釈 1) 食品衛生法で清涼飲料水とは「乳酸菌飲料、乳及び乳製品を除く酒精分 1 容量パーセント未満を含有する飲料をいう」と定義されている。

(注釈 2) 食品衛生法に基づく告示(「食品、添加物等の規格基準」昭和 34 年 12 月 28 日厚生省告示第 370 号)で清涼飲料水の規格基準が示されている。清涼飲料水は原水の微生物基準ならびに表 2 に示す殺菌・除菌の方法等(前述の告示中の製造基準より抜粋)を遵守して製造を行わなければならない。成分規格としては、大腸菌群陰性が必須。

表 3. ミネラルウォーターの殺菌・除菌の方法等

殺菌または除菌を要するもの		殺菌または除菌を要しないもの	
中心部 85℃・30 分加熱、または原水等に由来し製品中に存在し、かつ発育し得る微生物を殺菌または除菌するのに十分な効力を有する方法で行う	①二酸化炭素圧力が 98kpa (20℃) 以上のもの	②二酸化炭素圧力が 98kpa (20℃) 未満で、次の条件を満たすもの	容器包装詰め直後の細菌数が 20/mL 以下のもの
		②二酸化炭素圧力が 98kpa (20℃) 未満で、次の条件を満たすもの ① 源泉(硬水)から直接採水したもの ② 自動的に充填し、密栓または密封するもの ③ 曝気または二酸化炭素の注入もしくは脱気以外の操作を施さないもの	

(注釈 1) ミネラルウォーターに関しては、「水のみを原料とする清涼飲料水で、鉱水のみのも、二酸化炭素を注入したもの、カルシウム等を添加したもの等、水質基準に関する省令(昭和 53 年厚生省令第 56 号)の表の中の中欄に掲げる事項のうち臭気、味、色度及び濁度に関する規定を満たすものが、これに含まれるものであること」と食品衛生法に定義されている。

(注釈 2) ミネラルウォーター類の内、未殺菌(CO<sub>2</sub> 圧 98kPa (1.0kgf/cm<sup>2</sup>) 以下)のものは別途腸球菌陰性と緑膿菌陰性が要求される(その原水には孢子形成亜硫酸還元嫌気性菌陰性と細菌数 5/ml 以下がさらに求められる)。

表 4. 日本における清涼飲料水の分類

分類	小分類
炭酸飲料	炭酸水、コーラ炭酸飲料、透明炭酸飲料、果実着色炭酸飲料など
果実飲料等	果実ジュース、果肉飲料、果汁入り混合飲料、フルーツシロップなど
コーヒー飲料等	コーヒー、コーヒー飲料、コーヒー入り清涼飲料
茶系飲料	烏龍茶飲料、紅茶飲料、緑茶飲料、麦茶飲料、混合茶飲料など
ミネラルウォーター類	ナチュラルウォーター、ナチュラルミネラルウォーターなど
豆乳類等	豆乳、調製豆乳、豆乳飲料、大豆たん白飲料
他野菜飲料	トマトジュース、にんじんジュース、野菜ジュースなど
スポーツ・機能性飲料	スポーツドリンク、アイントニック飲料など
乳性飲料	乳性飲料、希釈用乳性飲料
その他	ココア飲料、栄養飲料、ぜんざいドリンク、甘酒など



表 5. 2004 年におけるアメリカ、EU および日本における主要品目別消費・生産量

	アメリカ <sup>*1</sup>	EU <sup>*1</sup>	日本 <sup>*2</sup>
炭酸飲料	55,594	16,949	2,754
果汁・野菜飲料	12,513	7,633	1,988
ボトルドウォーター <sup>*3</sup>	21,722	31,010	1,296
機能性飲料	4,304	734	1,380
希釈飲料	58	1,037	183
茶系飲料	2,121	1,723	5,511
コーヒー飲料	110	17	2,717
合計	96,422	59,103	17,209

\*1:消費量

\*2:生産量

\*3:ナチュラルウォーター、ナチュラルミネラルウォーターおよびミネラルウォーター以外のもの(水道水など)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y.	Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA	J. Food Prot.	73	1077-1084	2010
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	J. Food Prot.	73	1537-1542	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	J. Food Sci.	75	M564-M567	2010
後藤 慶一、大西 貴弘、渡辺 麻衣子、神田 隆、金澤 裕司、小澤 一弘、餅田 薫、田中 裕子、藤田 理英子、吉田 義博、松本 幸平、大谷 俊次、杉山 寛治、小沼 博隆、高鳥 浩介、工藤 由起子	清涼飲料水の開封・口飲み保管により検出される微生物	日本清涼飲料研究会編	「第20回研究発表会」講演集	33-38	2010
田中 廣行、土屋 禎、大島 赴夫、鈴木 達也、工藤 由起子	技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定	日本食品微生物学会雑誌	27	158-162	2010
森 哲也、田中 廣行、和田 真太郎、伊藤 武、宇田川 藤江、工藤 由起子	市販の生食用カット野菜、カット果実およびスプラウトの微生物汚染調査	日本食品微生物学会雑誌	27	163-170	2010
Ohtsuka, K., Tanaka, M., Ohtsuka, M., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y.	Comparison of detection methods for <i>Escherichia coli</i> O157 in beef livers and carcasses	Foodborne Pathog. Dis.	7	1563-1567	2010

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Konuma, R., Lee, K., 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	J. Food Prot.			印刷中
Hara-Kudo, Y. and Takatori, K.	Contamination level of food borne pathogens in food associated with the infections	Epidemiol. Inf.			印刷中
Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. and Hara-Kudo, Y.	Evaluation of genetic markers for identifying isolates to of the species of the genus <i>Fusarium</i>	J. Sci. Food Agric.			印刷中
Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. and Hara-Kudo, Y.	Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the <i>Fusarium</i> genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes	BMC Evol. Biol.			投稿中

