=原 著=

ゼリー飲料および固形化成分を含有する粉末清涼飲料の 細菌試験法の問題点とその改善法の検討

森 哲也^{*1}・吉田信一郎^{*2}・池本尚人^{*3}・加藤一郎^{*4}・
林 伸之^{*5}・齋藤明美^{*2}・市川希美^{*1}・
伊藤 武^{*1}・工藤由起子^{*6,†}

(^{*1}一般財団法人東京顕微鏡院, ^{*2}一般財団法人日本食品分析センター,

^{*3}サントリービジネスエキスパート株式会社, ^{*4}株式会社伊藤園,

^{*5}キリン株式会社, ^{*6}国立医薬品食品衛生研究所)

(受付: 平成27年6月1日)

(受理: 平成28年1月13日)

Improvement of Microbiological Examination Methods for Jelly Beverage and Powdered Beverage with Solidified Ingredients

Tetsuya MORI^{*1}, Shinichiro YOSHIDA^{*2}, Hisato IKEMOTO^{*3}, Ichiro KATO^{*4},
Nobuyuki HAYASHI^{*5}, Akemi SAITO^{*2}, Nozomi ICHIKAWA^{*1},
Takeshi ITO^{*1} and Yukiko HARA-KUDO^{*6,†}

(^{*1} Incorporated Foundation Tokyo Kenbikyoin, Toyomi-cho, Chuo-ku, Tokyo 104-0055)

(^{*2} Japan Food Research Laboratories, Motoyoyogi-cho, Shibuya-ku, Tokyo 151-0062)

(^{*3} Suntory Business Expert Limited, Seika-cho, Soraku-gun, Kyoto 619-0284)

(^{*4} ITO EN, LTD., Makinohara-city, Shizuoka 421-0516)

(^{*5} Kirin Company, Limited, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-8628)

(^{*6} National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501;

† Corresponding author)

Examination methods for coliform bacteria in jelly beverage and powdered beverage with solidified ingredients, and standard plate counts in powdered beverage with solidified ingredients were investigated. In the examination of coliform bacteria in jelly beverage using Japanese official methods for beverage and powdered beverage, it was demonstrated that gas production by *Escherichia coli* in 10 ml of double strength lactose broth with bromothymol blue (LB) with 10 ml of jelly beverage was incorrectly judged on occasion. Gas, however, was successfully trapped in 100 ml of LB instead of 10 ml of double strength LB. In the examination of the powdered beverage with solidified ingredients, 100-fold diluted homogenate were prepared instead of 10-fold diluted homogenate to weaken solidification because 10-fold diluted homogenate had a high solidification. For coliform bacteria examination, gas was successfully trapped in 100 ml of double strength LB with 100 ml homogenate, and the detection limit was the same as that by

† 連絡先 ykudo@nihs.go.jp

^{*1} ☎ 104-0055 東京都中央区豊海町5-1

^{*2} ☎ 151-0062 東京都渋谷区元代々木町52-1

^{*3} ☎ 619-0284 京都府相楽郡精華町精華台8-1-1

^{*4} ☎ 421-0516 静岡県牧之原市女神21

^{*5} ☎ 230-8628 横浜市鶴見区生麦1-17-1

^{*6} ☎ 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

Japanese official methods. For standard plate count examination, it, however, was difficult to count the colonies by pour plate culture method, and more investigation is needed in the future.

Key words: jelly beverage, powdered beverage, coliform test, standard plate count

緒 言

清涼飲料水および粉末清涼飲料については、食品衛生法第11条第1項の規定に基づき食品、添加物等の規格基準³⁾が定められている。清涼飲料水の成分規格では、「大腸菌群が陰性でなければならない」とされており、大腸菌群試験法が定められている。また、乳酸菌を加えない粉末清涼飲料の成分規格では、「大腸菌群が陰性であり、細菌数が検体1 gにつき3,000以下でなければならない」とされており、大腸菌群試験法および細菌数(生菌数)試験法が定められている。清涼飲料水の生産量や消費量の増加傾向に伴い多様な性質の製品が生産されており(一般社団法人全国清涼飲料工業会, “統計情報”. 全国清涼飲料工業会一のみもの情報館. <http://www.j-sda.or.jp/>, (参照 2015-05-02)), 現行の試験法を適用することが困難な製品が生じている。その一つに、いわゆるゼリー飲料があり、コンニャクグルコマンナンやゲル化剤などに由来する弾力のある固形分を含有する。また、同じく固形化成分を含有する粉末清涼飲料では、固形化成分が水を吸収し、膨張して粘度の高いゲル状となる特性を有する。特に、コンニャクグルコマンナンは食物繊維を多く含み、他の高分子多糖類との特異な相乗効果のため⁴⁾強いゲル化が起こるものと考えられている。これら清涼飲料において、大腸菌群および細菌数の検査を実施するにあたり、固形分によって告示法での検査実施に困難が生じていることが指摘(市川ら, B-1-05, 第35回日本食品微生物学会学術総会, 2014年9月, 大阪府)されている。

今回、ゼリー飲料やゲル状となる粉末清涼飲料の大腸菌群試験法および細菌数(生菌数)試験法について、市販のゼリー飲料および粉末清涼飲料を対象に大腸菌を添加し、回収試験を行い、現行の試験法の問題点と改善法について検討した。

材料および方法

1. 検体および試験室

清涼飲料水(ゼリー飲料)として、4種類の市販ゼリー飲料(サンプルa: pH 3.6, サンプルb~d: pH 3.8)を用いた。また、粉末清涼飲料として、コンニャクグルコマンナンを主成分とする粉末清涼飲料(粉体: サンプルe, 100倍乳剤のpH 6.8)を用いた。これら検体を6試験室(A~F)にて分担して試験に供した。

2. 供試菌株および接種菌液の作製

添加回収試験に使用した大腸菌は、*Escherichia coli*の基準株である NBRC102203^T (ATCC11775), または

培地の性能評価や精度管理菌株として使用²⁾されている NBRC15034 (ATCC25922)を用いた。供試菌株をトリプティックソイブロス(ベクトン・ディッキンソン) 10 mlに1白金耳植菌し、35~37℃で18時間培養した(約 10^9 CFU/ml)。培養後、滅菌リン酸緩衝液9 mlを用いて 10^{-7} (約 10^2 CFU/ml)まで10倍階段希釈した。

3. 試料原液の調製

ゼリー飲料については、市販ゼリー飲料の開封口をアルコール綿でふき、開口部から無菌的に内容物200 mlをオープンエンドピペット(フナコシ)でストマッカー袋に量り採り、菌数レベル1から菌数レベル3それぞれで各3検体を作製した。また、粉末清涼飲料については、ストマッカー袋に粉体2.0 gを量り採り滅菌リン酸緩衝液198 mlを加えて均一化し、菌数レベル1から菌数レベル4それぞれで各3検体を作製した。なお均一化(ストマッカー処理)は1分間とした。

大腸菌群試験法の検討では、試料原液中の菌数レベルを100 CFU/L (菌数レベル1), 1,000 CFU/L (菌数レベル2) および10,000 CFU/L (菌数レベル3)の3段階とした。ストマッカー袋中の検体(ゼリー飲料および粉末清涼飲料) 200 mlに、菌数レベル1の作製のために 10^{-7} 希釈菌液(約 10^2 CFU/ml)を0.2 ml、菌数レベル2の作製のために 10^{-6} 希釈菌液(約 10^3 CFU/ml)を0.2 ml、菌数レベル3の作製のために 10^{-5} 希釈菌液(約 10^4 CFU/ml)を0.2 ml添加して均一化し、これを試料原液とした。

細菌数(生菌数)試験法の検討では、検体は粉末清涼飲料とし、試料原液中の菌数レベルを10,000 CFU/L (菌数レベル3) および100,000 CFU/L (菌数レベル4)の2段階とした。菌数レベル3は前述と同様に作製し、菌数レベル4の作製のためにストマッカー袋中の検体200 mlに 10^{-4} 希釈菌液(約 10^5 CFU/ml)を0.2 ml添加して均一化し、これを試料原液とした。

また、両試験法の検討において、菌非接種検体として1検体を作製し菌接種検体と同様に試験した。なお、接種菌数確認のために、 10^{-6} 希釈菌液(約 10^3 CFU/ml)をトリプティックソイ寒天培地(ベクトン・ディッキンソン) 10枚に0.1 mlずつ塗抹し、35℃で24時間培養し、生育したコロニー数から接種菌数を算出した。本研究では、ストマッカー袋あるいは試験管への菌接種レベルが<10 cfuのものも設定しており、接種時にばらつきが生じるため複数回の試行を行った。

4. 大腸菌群試験法

4.1 ゼリー飲料

ダーラム管入り2倍濃度乳糖ブイヨン培地(LB) 10 ml(中試験管)に、菌数レベル1から3の試料原液10 mlをオープンエンドピペットで加えた(サンプルa~d)。試料原液の粘度が高いため、滅菌ガラス棒などで軽くかき混ぜLBと混合した。また、ストマッカー袋にダーラム管を入れたLB 100 mlを調製し、これに試料原液10 mlをオープンエンドピペットで加え、袋の外から塊を押しつぶしLBになじませた(サンプルa~d)。次に、試料原液の1 mlをLB 10 mlに加えた。さらに、試料原液の10 mlを滅菌リン酸緩衝液90 mlに加えて均一化し、試料原液の10倍希釈液を作製し、この10倍希釈液1 mlをLB 10 mlに加えた。これらを $35\pm1^{\circ}\text{C}$ にて 48 ± 3 時間培養し、ダーラム管中のガスの発生を判定した。

4.2 粉末清涼飲料

ストマッカー袋にダーラム管を入れた2倍濃度LB 100 mlに菌数レベル1から3の試料原液100 mlをオープンエンドピペットで加え、袋の外から塊を押しつぶしLBになじませた。次に、ダーラム管入り2倍濃度LB 10 mlに試料原液10 mlをオープンエンドピペットで加えた。さらに、試料原液の1 mlをLB 10 mlに加えた。これらを $35\pm1^{\circ}\text{C}$ にて 48 ± 3 時間培養し、ダーラム管中のガスの発生を判定した。

5. 細菌数(生菌数)試験法

粉末清涼飲料の菌数レベル3および4の試験原液2 mlずつを5枚のシャーレに分注し標準寒天培地15 mlを加え、混釈した。また、試料原液の1 mlを1枚のシャーレに分注し標準寒天培地にて混釈した。さらに、試料原液の10 mlを滅菌リン酸緩衝液90 mlに加えて均一化し、試料原液の10倍希釈液を作製した。これを繰り返し試料原液の100倍希釈液を作製し、各1 mlを1枚のシャーレに分注し標準寒天培地にて混釈した。これらを $35\pm1^{\circ}\text{C}$ にて 24 ± 2 時間培養し、生育コロニー数を計測した。なお、細菌数は各条件につき3検体の結果を平均し、平均値±標準偏差として表記した。

結 果

1. ゼリー飲料での大腸菌群試験法

4種類のゼリー飲料を用いた大腸菌群試験法の検討結果をTable 1に示した。2倍濃度LB 10 mlにゼリー飲料10 mlを接種した条件では、菌数レベル3で4サンプルいずれも3検体すべてで菌の発育に伴う培地の濁りが認められるものの、明らかなガス発生が認められたのが3検体中1検体あるいは2検体であった。また、菌数レベル3の1 ml/接種では、4サンプルいずれも3検体すべてでガス発生が認められた。しかし、菌数レベル3の1 ml/接種と接種菌数が同等である菌数レベル2の10 ml/接種では、サンプルa~cではいずれも3検体すべてで菌の発育が認められるものの明らかなガス発生は1検体で、サ

ンプルdでは3検体すべてで菌の発育があるもののガス発生は認められなかった。さらに、菌数レベル3の0.1 ml/接種および菌数レベル2の1 ml/接種では、4サンプルのほとんどで2検体にガス発生が認められた。しかし、菌数レベル1の10 ml/接種では、菌の発育に伴うガス発生が認められたのは、サンプルcの1検体のみであった。いずれの菌数レベルでも、10 ml/接種においてガス発生の試験管数が少ない傾向であった。

LB 100 mlにゼリー飲料10 mlを接種した条件では、菌数レベル3の試料液の10 ml/接種で4サンプルのいずれも3検体すべてで菌の発育に伴うガス発生が認められた。また、菌数レベル3の1 ml/接種では、サンプルaでは1検体で、サンプルb~dでは3検体すべてでガス発生が認められた。菌数レベル3の1 ml/接種と接種菌数が同等である菌数レベル2の10 ml/接種では、いずれのサンプルも3検体すべてで菌の発育に伴うガス発生が認められた。さらに、菌数レベル3の0.1 ml/接種では、1~3検体でガス発生が認められた。接種菌数が同等である菌数レベル2の1 ml/接種および菌数レベル1の10 ml/接種では、3検体すべてでガス発生が認められたものや全く認められないものまで、サンプル間でばらつきが認められた。菌数レベル2の0.1 ml/接種および菌数レベル1の1 ml/や0.1 ml/接種では、サンプルa, b(試験室B)およびdを除きガス発生が認められなかった。

2. 粉末清涼飲料での大腸菌群試験法

1種類の粉末清涼飲料を用いた大腸菌群試験法の検討結果をTable 2に示した。菌数レベル3の試料液の100 ml/接種の実測接種菌数は740~1,200 CFU、菌数レベル3の10 ml/および菌数レベル2の100 ml/接種の実測接種菌数は74~120 CFU、菌数レベル3の1 ml、菌数レベル2の10 ml/および菌数レベル1の100 ml/接種の実測接種菌数は7.4~12 CFUであった。4試験室のいずれでも3検体すべてでガス発生が認められた。次に、菌数レベル2の1 ml/接種および菌数レベル1の10 ml/接種の実測接種菌数は0.74~1.2 CFUで、両条件ともに1~3検体でガス発生が認められた。また、菌数レベル1の1 ml/接種の実測接種菌数は0.07~0.12 CFUであり、ほとんどの試験室でガス発生が認められなかった。

3. 粉末清涼飲料での細菌数試験法

粉末清涼飲料を用いた細菌数試験法の検討結果をTable 3に示した。菌数レベル4の10 ml/接種の実測接種菌数は1,000~1,700 CFU(平均1,267 CFU)であり、回収率は26.5~71.3%(平均56%)であった。1 ml/接種では回収率45.3~91.0%(平均72%)、0.1 ml/接種では72.7~182%(平均109%)、0.01 ml/接種では41.2~100%(平均77%)であった。菌数レベル3の10 ml/接種の実測接種菌数は100~170 CFU(平均127 CFU)であり、回収率は66.5~96.0%(平均84%)であった。1 ml/接種では回収率57.3~160%(平均94%)、0.1 ml/接種では17.6~100%(平均60%)であった。

Table 1. Detection of coliform bacteria by gas production-based method in jelly beverages

Broth and the volume (ml) for incubation of 10 ml/ jelly beverage	Sample	Laboratory	Jelly beverage volume for inoculation (ml)	Jelly beverage						Gas production of non-inoculation sample
				Bacterial level 1; 100 CFU/L		Bacterial level 2; 1,000 CFU/L		Bacterial level 3; 10,000 CFU/L		
				Inoculum size*1 (CFU)	Gas production*2	Inoculum size*1 (CFU)	Gas production*2	Inoculum size*1 (CFU)	Gas production*2	
10 ml/ of double strength LB with bromothymol blue	a	A	10	1	0/3	10	1/3	100	1/3	0/1
			1	0.1	1/3	1	2/3	10	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.1	0/3	1	2/3	0/1
	b	B	10	0.9	0/3	9	1/3	90	1/3	0/1
			1	0.09	1/3	0.9	1/3	9	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.09	0/3	0.9	2/3	0/1
	c	C	10	0.79	1/3	7.9	1/3	79	2/3	0/1
			1	0.08	0/3	0.79	2/3	7.9	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.08	0/3	0.79	2/3	0/1
	d	B	10	1.4	0/3	14	0/3	140	1/3	0/1
			1	0.14	0/3	1.4	1/3	14	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.14	0/3	1.4	2/3	0/1
	Total		10	0.79-1.4	1/12	7.9-14	3/12	79-140	5/12	0/4
			1	0.08-0.14	2/12	0.79-1.4	6/12	7.9-14	12/12	0/4
			0.1*3	0.01	0/12	0.08-0.14	0/12	0.79-1.4	8/12	0/4
100 ml/ of LB with bromothymol blue	a	F	10	3.6	3/3	36	3/3	360	3/3	0/1
			1	0.36	0/3	3.6	0/3	36	1/3	0/1
			0.1*3	0.04	0/3	0.36	2/3	3.6	3/3	0/1
	b	D	10	0.85	3/3	8.5	3/3	85	3/3	0/1
			1	0.09	0/3	0.85	3/3	8.5	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.09	0/3	0.85	3/3	0/1
		B	10	1.4	2/3	14	3/3	140	3/3	0/1
			1	0.14	1/3	1.4	3/3	14	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.14	1/3	1.4	1/3	0/1
	c	E	10	0.97	1/3	9.7	3/3	97	3/3	0/1
			1	0.10	0/3	0.97	2/3	9.7	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.10	0/3	0.97	2/3	0/1
	d	B	10	1.4	3/3	14	3/3	140	3/3	0/1
			1	0.14	0/3	1.4	2/3	14	3/3	0/1
			0.1*3	0.01	0/3	0.14	1/3	1.4	1/3	0/1
	Total		10	0.85-3.6	12/15	8.5-36	15/15	83-360	15/15	0/5
			1	0.09-0.36	1/15	0.85-3.6	10/15	8.3-36	13/15	0/5
			0.1*3	0.01-0.04	0/15	0.09-0.36	4/15	0.83-3.6	10/15	0/5

*1 Bacterial number in a stomacher bag or test tube with LB with bromothymol blue.

*2 Number of gas production positive samples/number of tested samples.

*3 Inoculated with 1 ml/ of 10-fold diluted jelly beverage.

考 察

現在、告示³⁾による清涼飲料水の大腸菌群試験法は、推定試験として検体10 ml、1 mlおよび10倍希釈液1 mlをLBと混合し、培養後のガス発生を確認する。試料原液（ゼリー飲料）10 mlを2倍濃度LB 10 mlに接種した菌数レベル3の試験管内に大腸菌が79～140 CFUが含まれている条件でも、ガス発生は4サンプル（a～d）ともに3検体中1または2検体にとどまった（Table 1）。詳細に試験管を観察すると、試験管の上層部にたまったゼリー塊に菌の発育に伴う濁りや気泡が認められ、発生したガスのダーラム管への捕集をゼリー塊が妨げていると考えられた。なお、培地の濁りが認められるにもかかわらず

ダーラム管内にガス発生が認められない試験管の培養液を、SMAC平板培地に画線し培養すると大腸菌の生育が認められた。また、菌数レベル3の試料原液1 mlを接種した場合、接種菌数が1/10であったにもかかわらず、いずれのサンプルも3検体中3検体でガス発生が認められた。さらに、接種菌数レベル2においても、試料原液10 mlを接種した結果よりも試料原液1 mlを接種した結果のほうがガス発生の認められた試験管数が多かった。これらの結果から、固形分を含有するゼリー飲料の大腸菌群試験では、本来ガス発生が検出されるべき試料原液10 mlを2倍濃度LB 10 mlに接種した場合、偽陰性となる可能性が確認された。また、今回の試験に供したゼリー飲料は、pH 3.8程度と酸性のため2倍濃度LB 10 ml

Table 2. Detection of coliform bacteria by gas production-based method in powdered beverages with solidified ingredients

Sample	Laboratory	Powdered beverage homogenate volume for inoculation (ml)	Powdered beverage homogenate						
			Bacterial level 1; 100 CFU/L		Bacterial level 2; 1,000 CFU/L		Bacterial level 3; 10,000 CFU/L		Gas production of non-inoculation sample
			Inoculum size*1 (CFU)	Gas production*2	Inoculum size*1 (CFU)	Gas production*2	Inoculum size*1 (CFU)	Gas production*2	
e	A	100	12	3/3	120	3/3	1,200	3/3	0/1
		10	1.2	1/3	12	3/3	120	3/3	0/1
		1	0.12	1/3	1.2	2/3	12	3/3	0/1
	B	100	10	3/3	100	3/3	1,000	3/3	0/1
		10	1	3/3	10	3/3	100	3/3	0/1
		1	0.1	0/3	1	2/3	10	3/3	0/1
	C	100	11	3/3	110	3/3	1,100	3/3	0/1
		10	1.1	2/3	11	3/3	110	3/3	0/1
		1	0.11	0/3	1.1	1/3	11	3/3	0/1
	E	100	7.4	3/3	74	3/3	740	3/3	0/1
		10	0.74	1/3	7.4	3/3	74	3/3	0/1
		1	0.07	0/3	0.74	3/3	7.4	3/3	0/1
Total	100	7.4-12	12/12	74-120	12/12	740-1,200	12/12	0/4	
	10	0.74-1.2	7/12	7.4-12	12/12	74-120	12/12	0/4	
	1	0.07-0.12	1/12	0.74-1.2	8/12	7.4-12	12/12	0/4	

*¹ Bacterial number in a stomacher bag or test tube with LB with bromothymol blue.*² Number of gas production positive samples/number of tested samples.

Table 3. Recovery of bacteria by pour plate culture method in powdered beverages with solidified ingredients

Laboratory	Powdered beverage homogenate volume for inoculation (ml)	Powdered beverage homogenate						Bacterial cell count of non-inoculation sample (CFU)
		Bacterial level 3; 10,000 CFU/L			Bacterial level 4; 100,000 CFU/L			
		Inoculum size* ¹ (CFU)	Recovery		Inoculum size* ¹ (CFU)	Recovery		
			Bacterial cell count (CFU)* ²	(%)		Bacterial cell count (CFU)* ²	(%)	
A	10	170	113 ± 39	66.5	1,700	450 ± 149	26.5	13
	1	17	11 ± 3	64.7	170	77 ± 14	45.3	3
	0.1	1.7	0.3 ± 0.6	17.6	17	31 ± 21	182	0
	0.01	0.17	0	0	1.7	0.7 ± 1.2	41.2	0
B	10	100	96 ± 13	96.0	1,000	713 ± 48	71.3	6
	1	10	16 ± 5	160	100	91 ± 22	91.0	0
	0.1	1	1.0 ± 1.0	100	10	7.3 ± 3.2	73.0	0
	0.01	0.1	0	0	1	1.0 ± 1.0	100	0
C	10	110	98 ± 32	89.1	1,100	780 ± 72	70.9	0
	1	11	6.3 ± 3.1	57.3	110	86 ± 30	78.2	0
	0.1	1.1	0.7 ± 0.6	63.6	11	8.0 ± 2.6	72.7	0
	0.01	0.11	0	0	1.1	1.0 ± 1.7	90.9	0
Mean	10	127	103 ± 27	84 ± 15	1,267	648 ± 174	56 ± 26	6.3
	1	12.7	11 ± 5	94 ± 57	127	85 ± 21	72 ± 24	1
	0.1	1.27	0.7 ± 0.7	60 ± 41	12.7	15 ± 16	109 ± 63	0
	0.01	0.13	0	0	1.27	0.9 ± 1.2	77 ± 32	0

*¹ Bacterial number in powdered beverage homogenate.*² Values are provided as the mean ± SD ($n=3$).

と混合させた段階でpH 4.5程度となり培地が黄変し、酸の産生を確認することが困難であった。改善法としては、現行の試験法との検出感度の同等性を考慮し、試料

原液10 mlの測定が必要であると考え、試料原液10 mlを100 mlのLBに加える方法を検討した(Table 1)。その結果、菌数レベル2および3では、4サンプル(a~d)と

もに3検体中3検体でガス産生が認められた。しかし、pH 5.4~6.3となり培地が黄変したことから、2倍濃度LB 10 mlを用いる場合と同様に酸の産生を確認することが難しいと考えられた。これらのことから、試料原液10 mlをLB 100 mlで培養することによって酸の産生を確認することは難しいものの、固形分が分散しやすくなりダーラム管の開口部をふさぐことなくガス産生が判定しやすくなると考えられた。しかし、試料原液1 mlをLB 10 mlに加えた場合よりも、10倍希釈試料液1 mlをLB 10 mlに加えた場合のほうがガス発生の陽性試験管数が多い結果が試験室Fで認められた(Table 1)。この理由として、試料原液1 mlをLB 10 mlに加えたもののうち、LBに濁りが認められ固形分に気泡の存在も認められているにもかかわらず、固形分がダーラム管の開口部を塞ぎガスが捕集されなかった試験管があったことが考えられた。このため、試料原液1 ml接種の場合も、固形分の破碎の検討が必要であると思われた。

今回、コンニャクグルコマンナンを含有する粉末試料では試料原液を作製する段階で粘度の高いゲル状となる検体があり、ピペットで計量できないなどの事例が生じていることを背景に改善法を検討した。予備検討の結果から、試験には100倍乳剤を試料原液とすることが適切であることが判明したが、告示法³⁾との検出感度の同等性を考えると、大腸菌群試験法では試料原液100 mlの測定が実施されなければならない。このため、菌数レベル1から菌数レベル3の粉末清涼飲料を用い、100倍乳剤の100 mlをストマッカー袋中の2倍濃度のLB 100 mlに、10 mlを試験管中の2倍濃度のLB 10 mlに、1 mlを試験管中のLB 10 mlに加えて試験した。その結果、ストマッカー袋または試験管あたりの接種菌数が7.4 CFU以上の場合にはいずれの菌数レベルの試料液でも3検体中3検体でガス発生が認められ、7.4 CFU未満では接種菌数の減少に伴い陽性数も減少した。以上の結果、本研究で設定した試験法によって、固形化成分を含有し粘度の高いゲル状となる粉末清涼飲料においても、大腸菌群の試験が実施可能と考えられた。

一方、粉末清涼飲料の細菌数の試験では、試料原液2 mlや1 mlを混釈培養した場合にゲル化した検体に沿って菌の増殖が認められた平板があり、これはゲル化した検体を標準寒天培地で混釈する際に均一な混和が困難であったためと考えられた。さらに、培養後の培地中に細かい気泡の発生が認められコロニー数の計測が困難な場合もあり、菌数計測の際の正確性が不十分となる可能性が考えられた。しかし、算出された接種菌数の回収率の値には70~120%の回収率が得られている結果もあり、今回設定した条件で細菌数の試験が実施可能と考えられるものの、回収率が20%前後の結果も認められることから、さらに検討が必要であると考えられた。なお、1試験室においてコンラージ棒による塗抹での細菌数の測定や、4試験室において最確数法による測定も検

討されたが、回収率が低く、さらに検討を要すると思われた。

本研究では、ゼリー飲料やコンニャクグルコマンナンを含む粉末清涼飲料の微生物の試験法を検討したが、基本的な試験操作として、ゼリー固形分や粘度の高いゲル状の検体を量り採る際に検体がピペット内壁に付着し正確に計量することが困難である場合が認められ、容量ではなく重量での計測がより正確な試験の実施に必要であることも考えられた。また、酸性食材を検査する際は検体のpHを調整する必要¹⁾があるとの指摘があり、今回のゼリー飲料の大腸菌群試験法の検討においても、試料原液10 mlをLB 100 mlと混合した段階で培地が黄変し、酸の産生を確認することが困難な結果も認められたことから、酸性の清涼飲料でのpH調整の必要性検討の余地が考えられた。

以上、本研究で得られた結果から、ゼリー飲料の大腸菌群試験では、試料原液10 mlをLB 100 ml、試料原液1 mlおよび10倍希釈液1 mlをLB 10 mlで培養すること、また、粉末清涼飲料では試料原液(100倍乳剤)100 mlおよび10 mlを2倍濃度LB 100 mlおよび10 ml、試料原液1 mlをLB 10 mlで培養することで、高い強度のゲルが存在することによるガス産生確認の不具合を改善することができ、現行の試験法と同等の検出感度での検査を実施することが可能になると考えられた。ただし、粉末清涼飲料の細菌数(生菌数)測定については、さらに検討が必要と考えられた。

要 約

ゼリー飲料における大腸菌群試験法、およびゲル状となる粉末清涼飲料における大腸菌群試験法および細菌数(生菌数)試験法について検討した。現行の大腸菌群試験法に従い2倍濃度のLB 10 mlにゼリー飲料検体10 mlを加えて培養する場合、ガス産生が正しく判定されない場合があることが判明した。そこで、LB 100 mlに検体10 mlを加えて培養する方法を検討した結果、ガス産生が確認された。また、コンニャクグルコマンナンなどが含まれる粉末清涼飲料の試験では、10倍乳剤ではゲル強度が高いために、試験の操作が困難となるため、100倍乳剤を用いて検討した。大腸菌群の検査では、2倍濃度のLB 100 mlに100倍乳剤を加えて培養することによってガスの産生が確認され、現行の試験法と同等の検出感度での大腸菌群の検査が実施できた。一方、細菌数(生菌数)測定に関しては、混釈培養法でのコロニー数測定が困難であったため、今後さらに検討が必要である。

謝 辞

本研究は、厚生労働省食品等試験検査費にて実施された。

文 献

- 1) 上崎(堀越)菜穂子, 岡田幸男, 竹下和子, 鮫島 隆, 有原圭三: 食肉製品の汚染乳酸菌検出培地の開発. 日本食品科学工学会誌, **59**, 378-386 (2012).
- 2) 川崎浩子: 臨床分離株の取り扱いと菌株保存 産業利用可能な微生物の保存・提供. 真菌誌, **55**, 3-12 (2014).
- 3) 厚生省生活衛生局: 食品, 添加物等の規格基準, 昭和34年12月28日, 厚生省告示370号 (最終改正 平成27年3月27日厚生労働省告示第151号) (1962).
- 4) 吉村美紀: 食品混合ゲル. 日本調理科学会誌, **34**, 424-431 (2001).