

栄養士養成教育における品質管理講習プログラムの開発

金 田 一 秀

1. はじめに

静岡英和学院大学短期大学部の一学科である食物学科は、栄養士養成校として認可された学科であり、教育目標として「栄養と健康についての教育研究を目的とし、科学的な思考力や実践力をもって社会に貢献できる食の専門家を育成する」を掲げ、長い歴史の中で、多くの卒業生を輩出してきた学科でもある。2009年度より栄養士養成に加え、社団法人フードスペシャリスト協会が認定するフードスペシャリスト認定試験の受験資格並びに食品科学技術協議会が認定するフードサイエンティスト認定資格を取得できる履修モデルコースを設置する等の改革がなされている。同年には、短期大学部両学科において、教育の目標と共に3つの（アドミッション・ポリシー、カリキュラム・ポリシー及びディプロマ・ポリシー）を掲げて、地域に求められる人材の育成に努める教育活動を展開している。その中で、著者自身もフードサイエンティスト認定資格に必要な多くの科目を担当する様になり、教員から学生への一方通行の教育だけではなく、卒業後、主として食品系企業や研究所で必要とされる知識・技術習得の必要性を強く感じるにようになっていった。その一方で、短期大学という制約上、さらに様々な資格取得をさせるための専門教育カリキュラムの導入は、時間的、人材的かつ財源的にも限界があり、通常二年間のカリキュラムの中で実践的な教育を導入・実施する事は困難であると言わざるを得ない。

静岡英和学院大学短期大学部では、平成22年度の文部科学省補助金「就業力育成支援事業」と平成24年度の「産業界ニーズに対応した教育改善・充実体制整備事業」の採択を受けることができた。産業界のニーズに対応する人材育成の取り組みを行う大学・短期大学が地域と連携し、産学協働を進める機会となったといえる。その取り組みの一環として、主として卒業後、食品系企業や研究所に就職が内定している学生を対象に、品質管理分野で要求される知識、手法並びに操作技術の取得を目的とし、既存のカリキュラムに捕らわれない講習プログラムの開発の必要性を実感した。

栄養士養成カリキュラムに求められる講義や実験実習では、限られた時間数のなかで、説明を含む講義と実験実習がセットとなり、可能な限り一日毎に結果が得られるものになりがちとなり、どうしても内容が限定されてしまうという問題点があった。さらに、食品企業で求められる手技・手法を取り入れるのには困難である。特に、品質管理に求められる食品分析や微生物を扱う場面では、特定の機器の操作や培養に伴う時間がかかるという欠点があった。主として、食品系企業に内定している希望学生を対象に、時間や成績評価にとらわれない品質管理講習プログラムの開発と体験学習を試みることにした。

2. 品質管理と特色ある体験型講習プログラムの開発

食品製造分野において食品の安全を確保するためには、食品工場における正しい衛生管理や異物等の混入予防が必要である。これには、すべての食品製造工程で共通に適用できる手技や手法は存在しない。それぞれ食品工場あるいは調理現場で取り扱う食材や設備類、施設の状態、従業員の衛生に関する知識など、多様な違いがあるので個々に対応した管理が必要である。現場の管理は、毎日の仕事の中で実施される必要があり、それぞれの事業所に合った衛生管理を行うことが重要であるとされている。食品の安全を確保するためには、食品工場における正しい衛生管理や異物等の混入防止が重要となる。その一方で、製造施設で取り扱う食材や設備、従業員の衛生に関する知識や技術等は多種多様で、現場個々に対応した管理が必要となる。

食品系企業や研究所では、高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC) や各種クロマトグラフィーを駆使した自動的かつ網羅的な定性・定量分析、様々な選択培地や特定の培地を使用した微生物の培養と同定並びに遺伝子解析等の専門的な知識や実践的な操作手法等の経験が求められる。具体的な分析・実験方法については公益社団法人日本食品衛生協会が出版している食品衛試験査指針(1)(2)(3)が参考となるであろう。その一方で、これら実験・分析技術は、生化学や食品衛生学等の一部の講義及び実験では触れるものの栄養士養成課程の限られた時間或いは該当実験において学習する機会は少なく、独自に習得する事は困難である場合が多い。品質管理分野で重要となる各種分析法 (例 固相抽出法、HPLCによる成分定量及び分光光度計による比色定量)、微生物の単離と同定、PCR法による品種判定等について、講習プログラムを検討、実施体験することにした。

3. 実験方法

3-1. 食品成分分析 人工甘味料：アスパルテームの定量分析

3-1-1. 目的

アスパルテーム (APM) はL-アスパラギン酸とL-フェニルアラニンのメチルエステルから成るジペプチドである。食品への使用基準は定められていない。アスパルテームは乾燥状態で安定であるが、水溶液状態では条件によっては分解し甘みを失う。本実験では、食品中のアスパルテームをHPLCにより定量(4)する事を目的とする。

3-1-2. 試薬及び器具

試薬 アスパルテーム (和光純薬工業 食品添加物試験用)、透析内溶液 (10% NaCl-0.01mol/L 塩酸)、透析外溶液 (0.01mol/L塩酸)、HPLC用精製水、HPLC用メタノール、メタノール・水混液 (= 2 : 8)、メタノール・1%リン酸混液 (= 3 : 7)、メタノール・0.02mol/L リン酸緩衝液 (pH 4.0) 混液 (= 1 : 3)、0.2mol/L リン酸緩衝液 (pH未調整)、メタノー

ル・水混液 (= 1 : 1)、10%水酸化カリウム水溶液

器具 超音波洗浄機、セロハンチューブ透析膜 36/32、透析膜クリップ、オクタデシルシリル化カートリッジ (InertSep C18-B)、吸引マニホールドキット、25 μ l マイクロシリンジ、シリンジ用メンブランフィルター (0.45 μ m)、日立製HPLC一式、オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (Inertsil ODS-2)、マグネチックスターラー、ガラスフィルター付きろ過器

3-1-3. 実験方法

< 1日目 >

1) HPLC用溶液 [メタノール・0.02 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 4.0) 混液 (= 1 : 3)] の調製

HPLC用精製水で0.2mol/L リン酸緩衝液 (pH未調整) を10倍に希釈したのち、10%水酸化カリウム水溶液でpH4.0に調整した後、300mlにまでメスアップ、HPLC用メタノール100mlと混合する。得られた溶液をガラスフィルターろ過器 (メンブランフィルター0.45 μ m) でろ過後、超音波洗浄機上で、数分間脱気する。

2) 検量線用標準液の調製

アスパルテーム 0.100gを正確に量り、精製水に溶解して100mlとする。その10mlを正確に取り、精製水に加えて100mlとしたものを標準液 (100 μ g/ml) とする。標準液 0、1、2、4、6 及び10mlを正確に取り、精製水を加えてそれぞれ10mlとし、検量線用標準液とする。

3) 試料の調製

セロハンチューブを10から15cm程度の長さに切り、精製水を適量入れたビーカーに入れ、電子レンジで沸騰するまで加熱する。液体試料20gを正確に計り、透析内溶液20mlを用いて下側をクリップで密封したセロハンチューブ内に移した後、セロハンチューブの上端をクリップで密封し、200mlのメスシリンダーに入れる (乾燥注意)。次いで透析外溶液で全量を200mlとし、スターラーでゆっくりと攪拌しながら室温で24時間透析を行う。

< 2日目 >

4) InertSep C18-Bミニカラムのクリーンアップ

ミニカラムを吸引マニホールドに設置し、メタノール 3 ml、次いで精製水 6 mlを流して、クリーンアップする。

5) InertSep C18-Bによる固相抽出

クリーンアップしたカラムに、透析外溶液10mlを正確に (5 ml \times 2回) 負荷し、精製水 5 ml、次いでメタノール・水混液 (= 2 : 8) 10ml (5 ml \times 2回) を通して、洗浄する。メタノール・

1%リン酸混液(=3:7)約10mlで溶出し、全量を正確に10mlとし、メンブランフィルター(0.45 μ m)を用いてろ過し、ろ液を試料液とする。溶出に時間がかかる場合には、吸引により、洗浄・溶出を早めることも可能である。

6) HPLCによる測定

紫外外部吸収検出器付HPLCにより、次の条件で測定する。試料の注入は、マイクロシリンジをメタノールと超純水で各5回洗浄した後、試料を20 μ l注入、直ちに、マイクロシリンジをメタノールで各5回、精製水で5回、最後にメタノールで5回洗浄する。測定後は、カラムにメタノール・水混液(=1:1)を接続し、少なくとも1時間以上流しカラム内の塩類を除去する。

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル Inertsil ODS-2

カラム温度：25 $^{\circ}$ C

移動相：メタノール・0.02mol/Lリン酸緩衝液(pH 4.0)混液(=1:3)

流速：1.0ml/min

測定波長：210nm(紫外線 UV)

7) 検量線の作成

検量線用標準液それぞれ20 μ lずつ正確に取り、HPLCに注入し、ピーク面積からアスパルテームの検量線を作成する。

8) アスパルテームの定量

試料液20 μ lを正確にとり、HPLCに注入・測定する。得られたピーク面積と検量線によって試料液中のアスパルテーム濃度(μ g/ml)を求め、次式によって検体中のアスパルテーム含量C(g/kg)を計算する。

$$\text{アスパルテーム含量C (g/kg)} = \frac{20 \times A \times B}{W} \times \frac{1}{1000}$$

A：試料中のアスパルテーム濃度(μ g/ml)

B：試料液の容量(ml)・・・ミニカラムからの全溶出量

W：試料の採取量(g)

1/1000：kg当たりのg数への換算係数：20：透析液量(ml)/透析外液分取量(ml)

3-1-4. 結果

試料の名称 _____
 試料の重さ (W) _____ g
 ミニカラムからの全溶出量 (B) _____ ml
 試料の保持時間 (RT) _____ min
 ピーク面積 _____
 ピーク面積から求めたAPM濃度 (A) _____ μg/ml
 検体中のAPM含量 _____ g/kg

3-2. 微生物の鑑別・同定

3-2-1. IMViC試験とは

IMViC試験はI (インドール産生試験), M (メチルレッド反応試験:MR), Vi (Voges-Proskauer反応試験:VP), C (クエン酸利用試験) の4つの試験の事をいう。インドール試験はSIM培地 (SIM確認培地), MRとVPはブドウ糖リン酸塩ペプトン水培地 (VP-MR用培地), クエン酸利用試験はシモンズクエン酸培地 (SC培地) を使って試験する(1)。腸内細菌科の細菌をインドール産生、MR反応、VP反応及びクエン酸資化性にに基づき、便宜上4つのグループに分けることができる。

グループ		菌 属	インドール産生	MR	VP	クエン酸	硫化水素産生(H ₂ S)
第1群	VP ± IPA + H ₂ S ±	<i>Proteus</i>	d	+	d	+	d
		<i>Providencia</i>	+	+	—	+	—
		<i>Morganella</i>	+	+	—	—	—
		<i>Tatunella</i>	—	—	—	—	—
第2群	VP — IPA — H ₂ S +	<i>Salmonella</i>	—	+	—	d	d
		<i>Edwardsiella</i>	+	+	—	—	d
		<i>Citrobacter</i>	—	+	—	+	d
第3群	VP + IPA — H ₂ S —	<i>Klebsiella</i>	—	d	d	+	—
		<i>Enterobacter</i>	—	—	+	+	—
		<i>Hafnia</i>	—	+	+	—	—
		<i>Serratia</i>	—	+	+	+	—
		<i>Cedecea</i>	—	+	+	+	—
		<i>Yersinia</i>	d	+	— a)	—	—
第4群	VP — IPA — H ₂ S —	<i>Escherichia</i>	d	+	—	—	—
		<i>Shigella</i>	d	+	—	—	—
		<i>Kluyvera</i>	+	+	—	+	—

+ = 陽性、— = 陰性、d = 菌種により陽性/陰性(±)、a) 生育温度依存的

3-2-2. 試薬及び器具

試薬 SIM半流動培地（栄研化学）、VP-MR液体培地、SC寒天培地（栄研化学）、TSI寒天培地（栄研化学）、滅菌生理食塩水、Kavácsインドール試薬、クロロホルム、 α -ナフトールエタノール溶液、40%水酸化カリウム水溶液

器具 エッペンチューブ、白金耳、ふ卵器

標準菌株 5種類

Escherichia coli ATCC8739

Serratia marcescens IID5218

Proteus vulgaris

Salmonella typhimurium GIFU12142

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* ATCC12183

3-2-3. 実験方法

<1日目>

予め培養しておいた5種類の細菌コロニーを観察（集落の色・形）、その後下記の操作を行う。

- 1) 各集落の菌を1白金耳取り、SIM寒天培地に底まで穿刺する。
- 2) 各集落の菌を1白金耳取り、VP-MR液体培地に接種する。
- 3) 各集落の菌を1白金耳取り、TSI寒天培地の寒天培地の底まで穿刺した後、半高層斜面部分に画線接種する。
- 4) 滅菌生理食塩水500 μ lを入れた5個のエッペンチューブそれぞれに、各集落の菌を1白金耳分懸濁し（白く濁る程度、多すぎたはいけない）、SC斜面培地の下から、画線塗布する。
- 5) 1から4までの各培地を30℃24時間ふ卵器内で培養（SC斜面培地は24時間以上培養）し、観察する。

<2日目>

6) SIM寒天培地

SIM培地において、運動性並びに硫化水素産生を観察する。その後、培地上にKavácsインドール試薬を数滴滴下して軽く振り混ぜた後、静置する。不明瞭な場合には、クロロホルムを1ml加え、軽く振り混ぜた後、静置する。

7) TSI培地

TSI培地の高層部、斜面部、硫化水素産生並びにガス産生を観察する。

8) VP-MR液体培地

VP-MR液体培地を別の試験管に、2 ml分注し、 α -ナフトールエタノール溶液 1 ml及び40%水酸化カリウム水溶液を0.2ml加えて数分間激しく振盪する。液面が広がる（液面が酸素と接する面積が広がる）ように斜面位で37°Cふ卵器内で静置する。1時間後観察する。

残りのVP-MR液体培地にメチルレッド試薬数滴を滴下し、観察する。

< 3日目 >

9) SC培地

SC培地上の菌の生育と、培地の色の変化を観察する。

3-2-4. 結果

鑑別結果

性状	培地	A	B	C	D	E
インドール産生	SIM 培地					
MR 試験	VP-MR 培地					
VP 試験						
クエン酸産生	SC 培地					
IPA 反応	SIM 培地					
硫化水素産生						
グルコース分解性	TSI 培地	高層				
ラクトース分解性 スクロース分解性		斜面				
集落 色						
集落 形						

同定結果

細菌 A _____

細菌 B _____

細菌 C _____

細菌 D _____

細菌 E _____

3-3. PCRを用いたお米の品種判定

3-3-1. 目的

お米遺伝子について4種のプライマーを用いたマルチプレックスPCRを行い、その増幅断片の識別パターンより、お米の品種を判別(5)することを目的とする。

3-3-2. 試薬及び器具

試薬 コメ判別用PCR kit I (TAKARA)、Proteinase K (Sigma)、 α -amylase (15mg/ml、*Bacillus licheniformis*由来) (Sigma)、RNase A (Sigma)、エタノール (99.5%)、100bp分子量マーカー、エチジウムブロミド、泳動用アガロース、1×TAEバッファー、滅菌精製水

器具 DNeasy Tissue kit (QIAGEN)、遠心機、ピックス、ヒートブロッカー、UVトランスイルミネーター、PCRサーマルサイクラー、Mupid電気泳動装置、ゲル撮影装置

3-3-3. 実験方法

<1日目>

1) コメからのDNA抽出

① 米粒(5粒)を1.5mlチューブに入れる。精製水100 μ lを加え、25℃で一晩静置する。

<2日目>

② ATLバッファー150 μ l加えて、ピックスで破碎する。

チューブに下記の各酵素を加え、55℃で1時間酵素消化する。

タンパク質分解酵素 (Proteinase K) 20 μ l

デンプン分解酵素 (α -amylase) 20 μ l

RNA分解酵素 (RNase A) 10 μ l

③ 遠心機にチューブを入れて、13,500rpmで4℃・5分間遠心する。

④ 上清を、新しい1.5mlチューブに移す。

⑤ ALバッファー200 μ lを加え、70℃・10分間ヒートブロック上で加温する。

⑥ エタノール (99.5%) 200 μ lを加えて、ボルテックスミキサーにより混合する。

⑦ Mini Spin Columnの中に、溶液を移し、8,000rpmで4℃・1分間遠心する。

⑧ Collection tube内の液を捨てた後、AW1バッファー500 μ lを加えて、8,000rpmで4℃・1分間遠心する。

⑨ Collection tube内の液を捨てた後、AW2バッファー500 μ lを加えて、14,000rpmで4℃・3分間遠心する。

⑩ Mini Spin Columnを新しいCollection tubeに付け替え、AEバッファー200 μ lを加えて、室温で1分間放置する。

⑩ Mini Spin Columnを8,000 rpmで4°C・1分間遠心し、得られた溶液をDNA溶液とする。

2) 品種により異なるDNA配列のPCR増幅

① 各チューブにAからHとそれぞれマジックでチューブ側面に記入し、各お米から得られたDNA溶液をそれぞれ加える（以下、②のステップまで氷上で行う）。

A	ひとめぼれ	10 μ l
B	赤米	10 μ l
C	こしひかり	10 μ l
D	関取米	10 μ l
E	黒米	10 μ l
F	各自抽出した米	10 μ l
G	ポジティブコントロール	5 μ l (Control template 6, kit付属) + 精製水 5 μ l
H	ネガティブコントロール	精製水10 μ l

② 以下の溶液のPCRプレミックス溶液が入った1.5mlチューブから、10 μ lずつ、0.2mlチューブのAからHに分注する。

I.	2 \times PCR Buffer	2 μ l	} PCRプレミックス溶液チューブ1本分 \times 8本数
II.	MgCl ₂	2 μ l	
III.	dNTP	2 μ l	
IV.	Primer	1.3 μ l	
V.	Taq (酵素)	0.2 μ l	
VI.	精製水	2.5 μ l	
Total		10 μ l	

③ P-20ピペットマンにより穏やかに出し入れてして混ぜた後（泡が立たないように注意）、フラッシュ、チューブのフタを閉じる。

④ PCR装置にチューブを置き、下記の条件で、翌日までPCRを行う。

【PCR条件】

96°C	2 min	} 35cycles
94°C	1 min	
62°C	1 min	
72°C	2 min	
4°C	オーバーナイト	

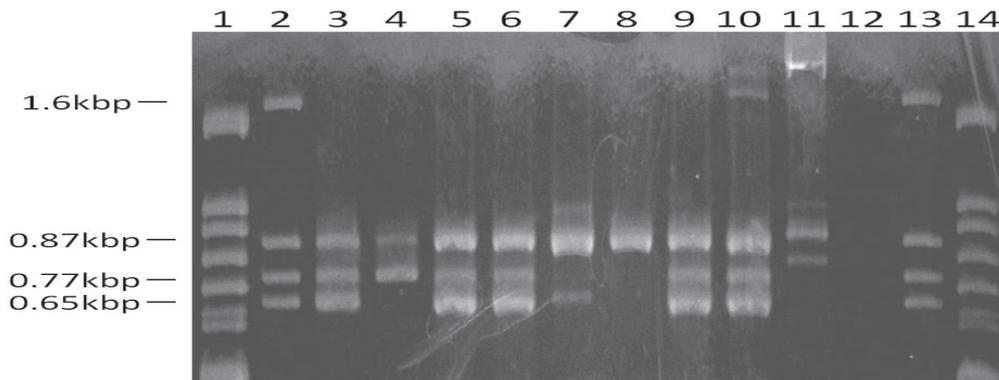
< 3日目 >

3) 増幅されたDNAの電気泳動

- ① PCRが終わった0.2mlチューブの各に、5 μ lのローディングバッファーを加える。
- ② 100bp分子量マーカー、kit付属マーカー、AからHまでのPCR産物をアガロース（寒天）ゲルのウェルに10 μ lずつP-20ピペットで静かに加える。
- ③ 約25分、100Vで電気泳動を行う。
- ④ 泳動したゲルをエチジウムブロミドで約30分間染色し、UVトランスイルミネーター上でデジカメを用いて写真撮影を行う。

4) 増幅パターンからのお米の品種判別パターン

PCRによる遺伝子増幅で得られた4つの増幅断片（約0.65kbp、約0.77kbp、約0.87kbp、約1.6kbp）の識別パターンにより、品種判定を行う。



レーン	レーン
1 100bp分子量マーカー	8 黒米
2 kit付属マーカー	9 金太もち
3 ひとめぼれ	10 サンプル検体
4 赤米	11 ポジティブコントロール (control template)
5 ミルキークイーン	12 ネガティブコントロール
6 コシヒカリ	13 kit付属マーカー
7 関取米	14 100bp分子量マーカー

識別パターン

- 例 ひとめぼれ／ミルキークイーン／コシヒカリ／金太もち
約0.65kbp、約0.77kbp、約0.87kbpの3つの増幅断片が観察される。
- 例 赤米
約0.77kbp、約0.87kbpの2つの増幅断片が観察される。
- 例 関取米
約0.65kbp、約0.87kbpの2つの増幅断片が観察される。

例 黒米

約0.87kbpの1つの増幅断片が観察される。

3-4. 分光光度計を用いた缶詰中のスズの定量（ヘマテイン法変法）

3-4-1. 目的

缶詰食品の容器としては、現在ブリキ、アルミニウム、その他が用いられている。ブリキは低炭素鋼版にスズをメッキしたもので、食品容器として使用した場合には、食品と直接接触する事により、金属の溶出が起こる。食品衛生法においては清涼飲料水中のスズ量としては、容器包装に由来する場合に限り、150ppm、その他の場合15ppmと定められている(3)。スズイオンと特異的に結合する酸化ヘマトキシリン（ヘマテイン）を用いたヘマテイン法(6)により、食品中のスズを直接定量することを目的とする。

3-4-2. 試薬及び器具

試薬 0.3%酸化ヘマトキシリン溶液、スズ標準溶液（1 mg/ml）（東京化成 原子吸光分析用）、20%硫酸溶液、0.5%硫酸溶液、10%酒石酸溶液、1%フェノールフタレイン・エタノール溶液、10%水酸化ナトリウム溶液、10%塩酸溶液、1%アラビアゴム溶液

器具 pH試験紙、50mlチューブ、分光光度計（V-630Bio）

3-4-3. 実験方法

1) 試料溶液並びにスズ標準溶液の調製

試料/スズ標準 (μl)	試料溶液 (液体部分)		スズ標準溶液 (ppm)					
	50	100	0	5	10	50	100	500
精製水 (μl)	950	900	1000	995	990	950	900	500
合計	1ml							

上記表の通りに各50mlチューブに調製する。

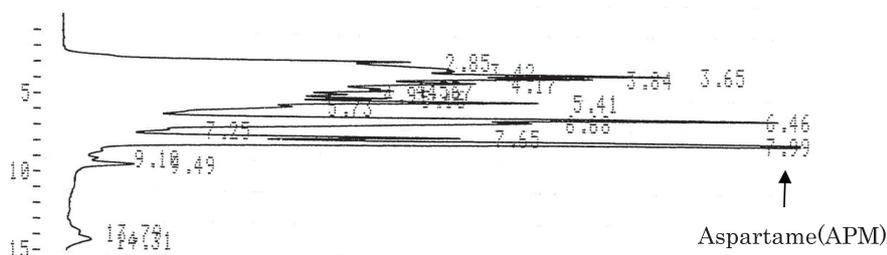
（試料に固形部分が多い場合には、ろ過又は遠心分離して透明試料とする）

- 2) 各試験チューブに、10%酒石酸溶液 0.1mlとフェノールフタレイン溶液 1滴を加える。
- 3) 10%水酸化ナトリウムで中和する（溶液が赤紫色に着色＜アルカリ性＞したら、10%塩酸溶液で透明になるまで少量ずつ加える）。確認は、pH試験紙で行う。
- 4) 20%硫酸溶液 2 mlと1%アラビアゴム溶液 2 mlを加え、精製水で15mlにする。
- 5) 0.3%酸化ヘマトキシリン溶液 5 mlを加えてよく混合し、室温で40分間放置する。
- 6) 0.5%硫酸溶液20mlを加えて、吸光度535nmで測定する。

4. 実験結果例

4-1. アスパルテームの分析結果

柑橘系ジュース中のアスパルテームのHPLCクロマトグラフ



試料の名称	柑橘系ジュース
試料の重さ (W)	20.00g
ミニカラムからの全溶出量 (B)	10.0ml
試料の保持時間 (RT)	7.99min
ピーク面積	132689
ピーク面積から求めたAPM濃度 (A)	231.074416 μ g/ml
検体中のAPM含量	2.3g/kg

以上の結果から、柑橘系ジュースの中に、アスパルテームは2.3 g/kg含まれることがわかった。食品衛生法では、アスパルテームに関する基準値は設けられていないので、試料によって含まれる量に、かなりの差が見受けられた。

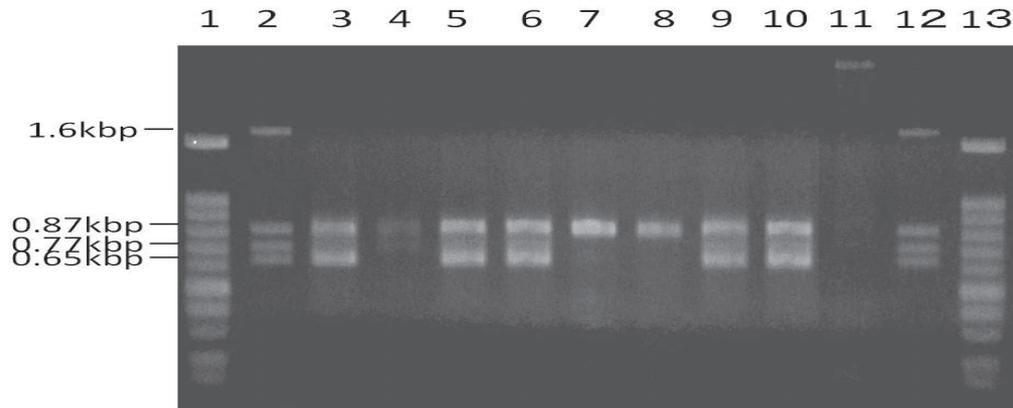
4-2. 微生物の鑑別・同定結果

鑑別結果

性状	培地	A	B	C	D	E	
インドール産生	SIM 培地	+	—	+	—	—	
MR 試験	VP-MR 培地	+	— (d)	+	+	+	
VP 試験		—	+	—	—	—	
クエン酸産生	SC 培地	—	+	—	+	d	
IPA 反応	SIM 培地	—	—	+	—	—	
硫化水素産生		—	—	+	+	—	
グルコース分解性	TSI 培地	高層	—	—	+	+	—
ラクトース分解性			AG	A	AG	AG	AG
スクロース分解性		斜面	A	A	A	A	A
集落 色		白	赤	黄—白	黄	黄	
集落 形		正円	正円	不定	円形	円形	

4-3. PCRを用いたお米の品種判定結果

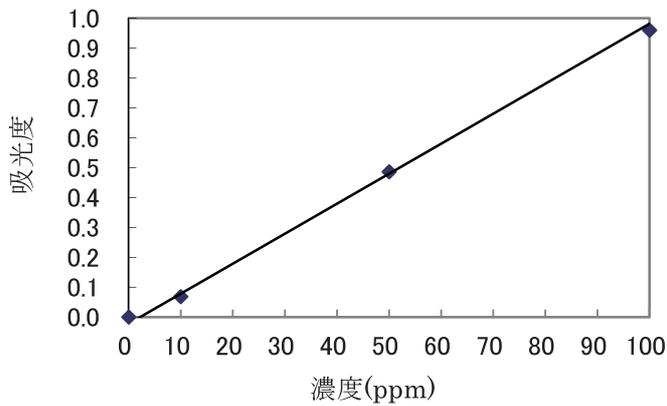
PCR結果例



レーン	レーン
1 100bp分子量マーカー	8 F 黒米
2 kit付属マーカー	9 G 金太もち
3 A ひとめぼれ	10 サンプル検体
4 B 赤米	11 ネガティブコントロール
5 C ミルキークイーン	12 kit付属マーカー
6 D コシヒカリ	13 100bp分子量マーカー
7 E 関取米	※実験方法とは異なる

4-4. 缶詰中のスズの定量結果

標準スズ溶液の検量線



スズ標準溶液 (ppm)	吸光度
0	0.0000
10	0.0683
50	0.4860
100	0.9596

市販缶詰中のスズ含有量

	吸光度 (535 nm)	濃度(ppm)
缶詰 (ミカン)	0.399	42.098
缶詰 (モモ)	0.576	60.613

5. 考察

5-1. 人工甘味料分析に関する考察

本方法は、透析法による抽出、固相抽出及び高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた分析法であり、試料からの抽出と定量まで2日以内で完了する事から、各種分析手法を学習するのに最適である。その一方で、アスパルテームは水溶液中ではpHや温度の影響により分解し、ジケトピペラジンに変化することが知られている。さらに、HPLCの移動相のpHにおり、保持時間が大きく変化し、pH5にしたときに最も分離能が良いとされおり、本実験では、pH4で分析を行った。柑橘系ジュース中のアスパルテームの含有量は2.3g/kgであった。本方法は、アスパルテーム以外の甘味料（アセスルファムカリウム、サッカリンナトリウム並びにサイクラミン酸並びにズルチン等）の一斉分析に応用できることが報告(4)されている方法である。本分析法の欠点としては、1回のHPLC分析に数分から十数分の時間を要するため、講習プログラムとして実施するには、時間的な制約がかかることである。その一方で、高速液体クロマトグラフィーの手技そのものは、分析技術に欠かす事の出来ないものであり、今後どの様に講習プログラムに組み入れていくかが今後の課題と言える。

5-2. 腸内細菌科の鑑別・同定に関する考察

IMViC試験の結果から、細菌A、細菌B、細菌C、細菌D及び細菌Eを下記のように鑑別・同定する事ができた。

	IMViC試験				
細菌A	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC8739
細菌B	-	-	+	+	<i>Serratia marcescens</i> II D5218
細菌C	+	+	-	-	<i>Proteus vulgaris</i>
細菌D	-	+	-	+	<i>Salmonella typhimurium</i> GIFU12142
細菌E	-	+	-	d	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC12183

細菌Aと細菌C及び細菌Dと細菌EはIMViC試験では、同一の結果を示したが、SIM培地及びTSI培地における硫化水素産生能で区別することが出来る。現在では、16SrRNA配列解析やDNA-DNA相同性試験により、多くの細菌について属レベルまで鑑別可能ではあるが、従来の培養を伴う性状解析を行うことで、微生物の取扱技術の習得と効果的な鑑別・同定を行うことが可能である。

今回、性状の明らかな標準菌株を新たに購入し、鑑別・同定を行った。クエン酸資化性培地(SC培地)での培養には、適度な菌量の塗布と明瞭な結果が得られるまでに2日間程度の培養時間を要することから、結果が出るまでに数日かかるという問題点がある。さらに、標準菌株の性状を維持するため、今後安定的な微生物の保存方法の確立が不可欠であると言える。

5-3. お米の品種判定に関する考察

サンプル検体（レーン10）のPCR結果は0.65kbp、約0.77kbp、約0.87kbpの3つの増幅バンドが観察されたことから、コシヒカリ系統の品種であると判別することが出来た。理論的には米粒1粒からDNAを抽出、品種判定が可能(5)であるとされているが、お米からのDNA抽出効率が低いのが現実である。本法では、耐熱性 α -アミラーゼと耐熱性プロテアーゼを用いた酵素消化と組織由来DNA抽出キットを用いているが、それでも抽出効率は低く、さらなる改良が必要であるといえる。DNA抽出効率の低い理由の一つとして植物組織に大量に存在する多糖の存在が影響しているものと考えられる。今後、植物組織からのDNA抽出のさらなる改良が必要であると考えている。

5-4. 缶詰中のスズの定量に関する考察

食品衛生法において、清涼飲料水中のスズ量として容器包装に由来する場合に限り成分規格として150ppm以下、その他の場合には15ppm以下と規定されているが、果実などの缶詰については量的な規制措置はとられていない。国際食品規格委員会食品添加物部会において、ジュース、果実、野菜缶詰などのスズ含有量について議論されており、アスパラガス、パイナップル並びにミカンなどは250ppm以下が暫定承認されている。

本法の原理は、試薬として用いるヘマトキシリンを過硫酸アンモニウムを酸化剤として反応させヘマテインとし、スズと（1：2）の複塩を形成、発色させるものであり、発色剤としてヘマテインを用いた方法が報告(3)されている。ヘマトキシリンで調製したものでも、調製数日以内であれば、十分にスズの比色定量に用いる事ができることが実証された。スズ標準溶液500ppm及び1000ppmについては、吸光度が2以上となり、実用的な測定範囲外であるため、今回作成した検量線には含めていないが、希釈のために添加する0.5%硫酸溶液の量を変えることで、スズの測定範囲を調整する事は可能である。今回実験に使用したミカン缶詰とモモ缶詰含まれるスズの量は、それぞれ42ppmと61ppmであり、食品衛生法で定められている150ppm以下であることが確認できた。本法は、SATP法と比較し、有機溶剤（キシレン）を用いた抽出行程を必要とせず、より安全かつ短時間に比色定量できる方法であると言える。

6. 学生からの評価と要望

今回、4種類の講習プログラムを実施した。受講学生中の各講習プログラムの受講率は、「HPLCを用いた甘味料の定量」「お米の品種判定」「微生物の鑑別・同定」及び「分光光度計を用いた缶詰中のスズの定量」の順となり、それぞれ71.4%、57.1%、53.6%及び39.3%となった。受講した理由としては、学生実験よりも少ない人数で体験が出来るため、学生実験の学習した事の復習になるため、学生実験の中で扱うことのない手技手法を体験できる及び食品系企業で実際に必要とされる手技手法の学習・体験が出来るためとの意見が多かった。さらに、卒業後の講習プログラムを希望する意見も多く見られた。今後、在校生並びに卒業生を対象とした食品系企業の品質管理分野に求

められる実践的な講習プログラムの開発を行っていきたいと考えている。

7. 謝辞

本事業を行うにあたり、食物学科の教職員並びに産業界ニーズ担当の竹井祐子様をはじめ多く方のご支援をいただくことが出来ました。本事業は文部科学省補助金「就業力育成支援事業」と「産業界ニーズに対応した教育改善・充実体制整備事業」の一部として実施することが出来ました。この場を借りて感謝いたします。

8. 参考文献

1. 公益社団法人日本食品衛生協会、食品衛生検査指針 食品添加物編 (2003)
2. 公益社団法人日本食品衛生協会、食品衛生検査指針 2015微生物編 (2015)
3. 公益社団法人日本食品衛生協会、食品衛生検査指針 2015理化学編 (2015)
4. 松本ひろ子ら、化学生物総合管理 Vol.6, No.1, p25-35 (2010)
5. 大坪研一ら、日本農芸化学会誌 Vol.76, No.4, p388-397 (2002)
6. 塚田司郎ら、衛生化学 Vol.24, No.4, p255-228 (1979)