

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3921049号
(P3921049)

(45) 発行日 平成19年5月30日(2007.5.30)

(24) 登録日 平成19年2月23日(2007.2.23)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/20

A

請求項の数 3 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2000-521176 (P2000-521176)	(73) 特許権者	000006127
(86) (22) 出願日	平成10年10月22日(1998.10.22)		森永乳業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP1998/004803		東京都港区芝5丁目33番1号
(87) 国際公開番号	W01999/025809	(74) 代理人	100102004
(87) 国際公開日	平成11年5月27日(1999.5.27)		弁理士 須藤 政彦
審査請求日	平成16年8月19日(2004.8.19)	(72) 発明者	富田 守
(31) 優先権主張番号	特願平9-331331		神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森
(32) 優先日	平成9年11月14日(1997.11.14)		永乳業株式会社食品総合研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	外山 一吉
			神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森
			永乳業株式会社食品総合研究所内
		(72) 発明者	工藤 力
			神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森
			永乳業株式会社食品総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 寒天含有即席培地の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

寒天含有培地に使用する寒天所定量の10～80%（重量）の割合の寒天を、培地成分を溶解するために使用する所定量の水の20～50%（重量）に加熱溶解し、冷却し、これとは別に寒天の残部及び他の培地成分を水の残部に分散又は溶解し、得られた両液を混合し、混合液の粘度を40mPa・sから4,000mPa・sの範囲に調整し、容器に充填し、密封し、滅菌することを特徴とする寒天含有即席培地の製造法。

【請求項2】

混合液の粘度が、250mPa・sから1,500mPa・sである請求項1に記載の寒天含有即席培地の製造法。

【請求項3】

加熱溶解する寒天の割合が、寒天所定量の30～60%（重量）である請求項1又は請求項2のいずれかに記載の寒天含有即席培地の製造法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、細菌等の微生物を培養する寒天含有培地が充填された容器を、そのまま短時間加熱して液状となし、即座に培地として使用できる寒天含有即席培地の製造法に関する。更に、詳しくは、本発明は、寒天含有培地に使用する寒天所定量の10～80%（重量）の割合の寒天を、培地成分を溶解するために使用する所定量の水の一部に加熱溶解し、冷却し、これとは別に寒天の残部及び他の培地成分を水の残部に分散又は溶解し、得られた

両液を混合し、混合液の粘度を $40 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ から $4,000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の範囲に調整し、容器に充填し、密封し、滅菌することを特徴とする寒天含有即席培地の製造法、である。

背景技術

従来、細菌等の微生物を培養する場合、寒天を含有する培地の調製は、次のとおり行われるのが一般的であった。即ち、大型三角フラスコ等の容器に所定量の水を秤取し、寒天を含む粉末状培地成分の所定量を添加して分散又は溶解し、加熱して寒天を溶解し、容器に綿栓を施し、オートクレーブ等で滅菌し、液体の状態でシャーレ等に所定量を分注し、冷却し、培養に使用していた（東京大学医科学研究所学友会編、「微生物学実習提要」、第34～57ページ、丸善、平成元年）。

10

しかしながら、この方法においては、容器が完全に密封されていないので、調製した培地が汚染され易く、乾燥し易いという不都合があり、一旦調製した培地を長期間保存することには問題があった。そのため、微生物の培養を行う前に、培地を調製しなければならず、本来の研究又は検査以外に余分な作業を行わなければならなかった。

前記の問題を解決するための技術として次のものが開示されている。培地成分を水に溶解し、pHを調整し、パウチ袋体に封入し、加圧、加熱殺菌する密封容器を用いた微生物用培地の調整方法（特開昭62-11089号公報）。また、包装体内に培地成分と所定量の水を充填、密封後、加熱殺菌処理を施してなる培地（特開平8-205854号公報）。

しかしながら、これらの従来技術において、前者は、培地が袋体に密封されているので、開封時の作業性、火傷等の安全性の点から難点があり、後者は、粉末培地成分と溶解水とを充填する場合では充填操作の点、また、粉末培地成分を加熱溶解する場合では滅菌時における培地の色調、及び培地成分の劣化の点において、それぞれ難点があった。

20

前記従来技術においては、使用直前に寒天を含有する培地を調製するか、又は寒天を含有する培地を滅菌し、容器に保存して長期間保存し、使用するとき加熱溶解するか、いずれかの方法を採用しなければならなかった。後者の場合、温湯、オートクレーブ等により加熱溶解しなければならないが、前記のとおり培地調整時に、培地成分が再三加熱されているので、色素、寒天のゲル強度、微生物の栄養成分等が劣化する不都合があった。

発明の要約

本発明は、使用時に寒天含有培地が充填された容器を、短時間加熱し、即座に培地として使用でき、長期間保存可能であり、培地成分の劣化が少ない寒天含有即席培地の製造法を提供する。

30

本発明は、寒天含有培地に使用する寒天所定量の10～80%（重量）の割合の寒天を、培地成分を溶解するために使用する所定量の水の一部に加熱溶解し、冷却し、これとは別に寒天の残部及び他の培地成分を水の残部に分散又は溶解し、得られた両液を混合し、混合液の粘度を $40 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ から $4,000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の範囲に調整し、容器に充填し、密封し、滅菌することを特徴とする使用時短時間加熱することにより溶解可能な寒天含有即席培地の製造法、に関する。

本発明によれば、1）培地成分の劣化が少ない培地を提供できる、2）使用時、短時間加温するのみで、直ちに使用できる培地を提供できる、3）長期間の保存により変質しない培地を提供できる、等の格別の効果が得られる。

40

発明の開示

本発明者らは、前記従来技術に鑑みて、培地成分の劣化がない培地について鋭意研究を行った結果、所定量の水の一部に、所定量の寒天の一部を加熱溶解し、寒天が固化しない温度まで冷却し、残部の水に残部の寒天及び寒天以外の培地成分を分散又は溶解し、両液を混合して粘度を調整し、容器に充填し、密封し、滅菌することにより、前記従来技術の問題点の全てを解決し得ることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、使用時に寒天含有培地が充填された容器を、短時間加熱し、即座に培地として使用でき、長期間保存が可能であり、培地成分の劣化が少ない寒天含有即席培地の製造法を提供することを目的としている。

50

前記課題を解決する本発明は、寒天含有培地に使用する寒天所定量の10～80%（重量）の割合の寒天を、培地成分を溶解するために使用する所定量の水の一部に加熱溶解し、冷却し、これとは別に寒天の残部及び他の培地成分を水の残部に分散又は溶解し、得られた両液を混合し、混合液の粘度を40mPa・sから4,000mPa・sの範囲に調整し、容器に充填し、密封し、滅菌することの特徴とする寒天含有即席培地の製造法であり、混合液の粘度が、250mPa・sから1,500mPa・sであること、加熱溶解する寒天の割合が、寒天の所定量の30～60%（重量）であること、及び所定量の水の一部が、水の所定量の20～50%（重量。以下、特に断りのない限り同じ。）であることを望ましい態様としてもいる。

次に本発明について詳細に説明する。

10

本発明の方法において、寒天を含有する培地は、通常、微生物の培養に使用する寒天又は精製寒天（以下、これらをまとめて寒天と記載する。）を含有する公知の培地であり、標準寒天培地、ブドウ糖加寒天培地、デソキシコレート寒天培地等を例示することができる。

寒天を含有する培地に使用する所定量の寒天の10～80%、望ましくは30～60%、を培地成分の溶解に使用する所定量の精製水等の水の一部、望ましくは20～50%、に添加し、加熱して寒天を完全に溶解し、40～60℃に冷却する。溶解する寒天の量、溶解に使用する精製水の量及び冷却する温度は、製造する培地の成分等により異なり、次に説明する溶液と混合し、容器に充填する時の充填適性とも関係する。

即ち、溶解する寒天の量が少ない場合、培地成分の溶解に使用する残部の精製水に分散する寒天の量が多くなり、加熱滅菌工程により寒天を完全に溶解することが不可能となる。また、寒天の量が多い場合、充填を終了するまで混合液の流動性を維持するため、混合液を高い温度に保持する必要があるため、寒天以外の培地成分に余分の熱を加えることとなり、培地の劣化を惹起することとなる。

20

培地成分の溶解に使用する残部の精製水に、残部の寒天及び寒天以外の培地成分を添加し、必要に応じて加温し、残部の寒天を分散させ、かつ寒天以外の培地成分を溶解させる。寒天以外の培地成分は、製造する培地により異なり、例えば、標準寒天培地では、培地1l当たりペプトン10g、酵母エキス2.5g、ブドウ糖1g及び寒天15gの割合である。

次に、前記寒天溶解液と残部の寒天を分散させ、寒天以外の培地成分を溶解させた液とを混合し、混合液の粘度を少なくとも40mPa・s、望ましくは250～1,500mPa・sに調整する。この混合液のpHを必要に応じて所定のpHに調整することもできる。この粘度の調整は、溶解する寒天の量、混合液の温度調整により行うことができる。所定の粘度に調整された混合液は、培地を容器に充填する場合、均一な分散性を有していること、定量的に充填できること等の点において極めて有効である。

30

前記混合液を充填する容器は、次の工程である滅菌による加熱に耐えられる材質で製造された容器であれば、どのような容器であってもよいが、取扱いが容易であることから、ボトル型が特に望ましい。

前記容器に、混合液を充填し、容器を密封し、加熱滅菌し、放冷し、本発明の寒天含有即席培地が得られる。培地の容器への充填には、例えば、シリンダー式充填機、ロータリー式充填機等を使用することができ、容器の密封は常法、例えば、プラスチックフィルム、アルミフィルム等を用いてヒートシールする方法、キャップにパッキングを配設して密封する方法等により行うことができる。また、培地の加熱滅菌は、オートクレーブ、レトルト滅菌機等を使用し、常法により実施することができる。この培地の加熱滅菌工程により、混合液中に分散していた寒天が溶解し、均一な溶液となる。

40

以上、説明したとおり、本発明の方法の特長は、寒天及び寒天以外の培地成分を一度加熱溶解し、それを容器に充填し、密封し、更に加熱滅菌する従来の製造法、即ち、二度加熱する方法とは異なり、一度の加熱滅菌により培地を製造する点にある。従って、過剰な加熱による培地成分の劣化、寒天のゲル強度の低下等がなく、品質の優れた寒天含有培地を製造することができるのである。

50

本発明の方法により製造された培地は、充填された容器の容量により異なるが、使用時約 30～60 分加温し、液状となし、直ちに微生物の培養に用いることができる。

次に、試験例を示して本発明を詳細に説明する。

試験例 1

この試験は、最終製品である培地の色調を調べるために行った。

1) 試料の調製

実施例 1 と同一の方法により製造したデソキシコレート寒天培地（500 ml 容のポリプロピレン製ボトル充填）を本発明の試料とした。また、対照試料として次の方法により製造した 500 ml 容のポリプロピレン製ボトル入りデソキシコレート寒天培地を用いた。実施例 1 に記載した全成分の所定量を、所定量の精製水に添加し、95℃に加熱して各成分を溶解し、のち 50℃に冷却し、500 ml 容のポリプロピレン製ボトルに充填し、以下実施例 1 と同一の方法により対照試料を調製した。

2) 試験方法

本発明の試料は、滅菌後、使用時及び再溶解後に無作為に各 10 本を採取し、対照試料は、溶解後、滅菌後及び使用時再溶解後に無作為に各 10 本を採取し、同時測光方式分光色差計（日本電色工業社製）により各試料、及び本発明の充填後の試料との色差を測定し、その平均値を算出し、色調の変化を試験した。

3) 試験結果

この試験の結果は、表 1 に示すとおりである。表 1 から明らかなとおり、本発明の試料においては、滅菌後及び再溶解後においても培地本来の色調を維持していた。これに対して、対照試料においては、再溶解後に顕著に退色し、食品の検査に使用した場合、大腸菌群の識別が極めて困難な状態になることが判明した。

従って本発明の方法により製造された培地は、簡単に使用できるうえに、品質的にも優れていることが認められた。

尚、培地の種類及び製造方法を変更して試作した試料についても同様の試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

表 1

試料	色 差		
	溶 解 後	殺 菌 後	再 溶 解 後
本発明の方法	—	1. 337	1. 290
従来の方法	1. 567	1. 584	1. 665

試験例 2

この試験は、培地に使用する寒天の溶解する割合を調べるために行った。

1) 試料の調製

溶解する寒天の割合を表 2 に示すとおり変更したことを除き、実施例 2 と同一の方法により試料を調製した。

2) 試験方法

▲ 1 ▼ 充填適性

各試料をボトルに充填するとき、無作為かつ経時的に 10 の被験試料を採取し、その充填適性を次の評価基準により判定し、その平均値を算出し、充填適性を試験した。

3：充填に何ら障害がない場合

2：未溶解の寒天の沈澱が存在するか、又は増粘により攪拌を必要とするか、いずれの場合

10

20

30

40

50

1：充填不可能の場合

▲2▼分離状態

また、試料調製後、24時間静置し、無作為に10個を採取し、ボトル内培地の液体の分離状態を肉眼で観察し、次の評価基準により判定し、その平均値を算出し、充填適性を試験した。

3：分離がない場合

2：若干の分離があり、攪拌を必要とする場合

1：分離が著しいか、又は固化が著しい場合

▲3▼粘度

各試料の温度を25℃に調整し、粘度計（東機産業社製。RB80型）を用いて常法により粘度を測定した。 10

3）試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなとおり、加熱溶解する寒天の割合が10～80%の試料においては容器への充填は可能であり、特に加熱溶解する寒天の割合が30～60%の試料においては、一定の容量を定量的に充填が容易であった。加熱溶解する寒天の割合が0%の試料は、未溶解の寒天が沈澱し、充填された培地が不均一となり、加熱溶解する寒天の割合が90～100%の試料は、攪拌を行っても固化し、加熱しなければ充填が不可能な状態であった。

以上の結果から、加熱溶解する寒天の割合は10～80%、望ましくは30～60%、であること、及び粘度を40～4,000mPa・s、望ましくは250mPa・sから1,500mPa・s、に調整すること、が判明した。 20

尚、培地の種類及び製造方法を変更して試作した試料についても同様の試験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られた。

表 2

測定項目	加熱溶解する寒天の割合(%)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
粘度(mPa・s)	20	40	205	255	485	1034	1530	2950	4050	4800	5620
液の分離状態	1.5	2.0	2.1	3.0	3.0	3.0	3.0	2.8	2.4	1.8	1.2
充填適性	1.0	2.1	2.3	3.0	3.0	3.0	2.5	2.5	2.3	2.0	1.2

発明を実施するための最良の形態

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

1 l 当たり次の組成のデソキシコレート寒天培地（好井久雄ら編、「食品微生物学ハンドブック」、第1版、第610ページ、技報堂、1995年）を、次のとおり製造した。

乳糖（森永乳業社製）	10（g）
ペプトン（森永乳業社製）	10
塩化ナトリウム（和光純薬工業社製）	5
クエン酸アンモニウム（和光純薬工業社製）	2
リン酸水素二カリウム（和光純薬工業社製）	2
デソキシコール酸ナトリウム（和光純薬工業社製）	1
ニュートラル・レッド（和光純薬工業社製）	0.03
精製寒天（伊那食品工業社製）	15

精製寒天の所用量の40%を、所用量の30%の精製水に添加し、90℃に加熱して精製寒天を溶解し、のち50℃に冷却した。

これとは別に、精製寒天の残量及び他の培地成分を、残量の精製水に分散又は溶解し、両液を混合し、常法によりpHを7.4に調整し、30℃に冷却して混合液の粘度を500 mPa・sに調整した。500 ml 容のポリプロピレン製ボトル（東洋製罐社製。断面形

10

20

30

50

状が円形のボトル)に、前記混合液各450mlを充填し、密封した。

次いで、レトルト殺菌機(日阪製作所製)により95℃の温度で5分間滅菌し、放冷し、デソキシコレート寒天培地を製造した。

得られたポリプロピレン製ボトル入りデソキシコレート寒天培地は、色調等の劣化がなく、全体が均一に溶解しており、直ちに微生物の培養に使用することが可能であった。

実施例2

1l当たり次の組成の標準寒天培地(好井久雄ら編、「食品微生物学ハンドブック」、第1版、第608ページ、技報堂、1995年)を、次のとおり製造した。

ペプトン(森永乳業社製。カゼイン製) 5(g)

酵母エキス(オリエンタル酵母工業社製) 2.5

ブドウ糖(和光純薬工業社製) 1

寒天(伊那食品工業社製) 15

寒天の所用量の10%を、所用量の20%の精製水に添加し、90℃に加熱して寒天を溶解し、のち40℃に冷却した。

これとは別に、寒天の残量及び他の成分を、残量の精製水に分散又は溶解し、両液を混合し、常法によりpHを7.1に調整し、20℃に冷却して混合液の粘度を200mPa・sに調整した。500ml容のポリプロピレン製ボトル(東洋製罐社製。断面形状が円形のボトル)に、前記混合液各450mlを充填し、密封した。

次いで、レトルト殺菌機(日阪製作所製)により120℃の温度で15分間滅菌し、放冷し、標準寒天培地を製造した。

得られたポリプロピレン製ボトル入り標準寒天培地は、色調等の劣化がなく、全体が均一に溶解しており、直ちに微生物の培養に使用することが可能であった。

実施例3

1l当たり次の組成のブドウ糖加寒天培地(好井久雄ら編、「食品微生物学ハンドブック」、第1版、第608ページ、技報堂、1995年)を、次のとおり製造した。

ペプトン(森永乳業社製) 10(g)

酵母エキス(オリエンタル酵母工業社製) 3

ブドウ糖(和光純薬工業社製) 10

塩化ナトリウム(和光純薬工業社製) 5

寒天(伊那食品工業社製) 15

寒天の所用量の80%を、所用量の40%の精製水に添加し、90℃に加熱して寒天を溶解し、のち40℃に冷却した。

これとは別に、寒天の残量及び他の成分を、残量の精製水に分散又は溶解し、両液を混合し、常法によりpHを7.4に調整し、20℃に冷却して混合液の粘度を4,000mPa・sに調整した。220ml容のポリプロピレン製ボトル(東洋製罐社製。断面形状が円形のボトル)に、前記混合液各200mlを充填し、密封した。

次いで、レトルト殺菌機(日阪製作所製)により120℃の温度で10分間滅菌し、放冷し、ブドウ糖加寒天培地を製造した。

得られたポリプロピレン製ボトル入りブドウ糖加寒天培地は、色調等の劣化がなく、全体が均一に溶解しており、直ちに微生物の培養に使用することがかのである。

産業上の利用可能性

以上詳細に記載したとおり、本発明は、使用時に寒天含有が充填された容器を、そのまま短時間加温し、即座に培地として使用できる寒天含有即席培地の製造法に関するものであり、本発明により奏せられる効果は次のとおりである。

- 1) 培地成分の劣化が少ない培地を提供できる。
- 2) 使用時、短時間加温するのみで、直ちに使用できる培地を提供できる。
- 3) 長期間の保存により変質しない培地を提供できる。

フロントページの続き

- (72)発明者 水口 建治
神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品総合研究所内
- (72)発明者 清瀧 兼司
神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品総合研究所内
- (72)発明者 丹野 大樹
神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品総合研究所内

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 特開昭63-173579 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/20

WPI