食肉製品の汚染乳酸菌検出培地の開発

上崎 (堀越) 菜穂子^{1*}, 岡田幸男¹, 竹下和子¹, 鮫島 隆¹, 有原圭三²

¹ プリマハム株式会社基礎研究所

² 北里大学獣医学部

Media for Detecting Lactic Acid Spoilage Bacteria Isolated from Cured Cooked Meat Products

Naoko Kamisaki-Horikoshi¹, Yukio Okada¹, Kazuko Takeshita¹,
Takashi Sameshima¹ and Keizo Arihara²

¹ Research and Development Department, PRIMA Meat Packers Ltd.,
635 Nakamukaihara, Tsuchiura, Ibaraki 300-0841

² School of Veterinary Medicine, Kitasato University, 23-35-1 Higashi, Towada, Aomori 034-8628

APT broth containing bromocresol purple was modified its concentrations of glucose and agar and buffer capacities to detect lactic acid bacteria with high sensitivity. This novel "LA broth" was used to successfully culture small numbers of lactic acid bacteria compared to conventional broths used for culturing lactic acid bacteria. When incubated in LA broth for 48 hours at 25°C, 97.0% of the 230 stock cultures tested, including lactic acid spoilage bacteria isolated from cooked cured meat products and equipment at a processing plant, were detected. The proportion of bacteria that could be cultured was increased to 99.6% by incubation for an additional 24 h. Since a change in color was associated with an alteration in the mobility of the broth, checking for LAB contamination of cooked cured meat products and in the plant was straightforward. In addition, the source of lactic acid spoilage bacteria that had contaminated Vienna sausages was identified by comparing isolates from the Vienna sausages, against isolates collected from the around plant using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR and 16SrDNA assays. The results showed that the source of contamination was in the packaging room at the plant, which meant that it was possible to prevent further contamination.

(Received Mar. 16, 2012; Accepted May 8, 2012)

Keywords : lactic acid spoilage bacteria, medium, sausage processing plant, RAPD-PCR, 16SrDNA

キーワード : 汚染乳酸菌, 培地, 食肉製品製造工場, RAPD-PCR, 16SrDNA

乳酸菌は、糖を発酵し、乳酸を産生する細菌の総称である。乳酸菌は、伝統的発酵食品などに代表されるように有用なスターターとして活用される一方で、加工食品では酸味、酸臭など、様々な変敗を引き起こす原因菌にもなり得るという二面性を持っている。食肉製品に乳酸菌が汚染すると、緑変や酸味、ネット、ガス膨張、浸出液の白濁などが発生し、商品価値を低下させることが知られている¹⁾²⁾。現在主に流通しているロースハム、ウインナーソーセージなどの加熱食肉製品の多くでは、伝統的な製品に行われていた微生物学的発酵はほとんど実施されておらず、むしろ現在において乳酸菌は変敗原因菌として問題視されている^{3)~5)}。

加熱食肉製品において乳酸菌による変敗は、加熱殺菌以

降での二次汚染によるものが大多数であり、その原因は冷却水、冷却室内での結露（凝結水）によるもの、機械・器具を媒介としたもの、空中浮遊菌として汚染したものなど多岐にわたる⁶⁾⁷⁾。乳酸菌やその他変敗細菌などの汚染が発生した際には、ただちに製造環境の洗浄などにより改善を行う必要があることは当然のことであるが、同時に汚染源を特定することはその改善に重要な要素となる。従って、製造環境に存在する微量な乳酸菌の効率的な検出技術や変敗した製品からの分離ならびに分類および同定は、食肉製品製造工場内汚染源の特定に必要不可欠である。さらに乳酸菌の同定には形態観察や生化学的性状試験に基づいた方法が一般的に行われているが^{2)8)~10)}、これらの方法では熟練の技術と知識を必要とするだけでなく、明確な判定が難しいなどの問題も指摘されていた¹¹⁾¹²⁾。これらを明確化するため、微生物のタンパク質や遺伝子情報などを利用した Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

¹ 〒300-0841 茨城県土浦市中向原 635

² 〒034-8628 青森県十和田市東 23-35-1

* 連絡先 (Corresponding author), naoko.kamisaki@primaham.co.jp

(SDS-PAGE) の菌体タンパク質パターンによる分類法¹³⁾ や Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) -PCR による遺伝子多型分類法¹¹⁾¹⁴⁾、16SrDNA シークエンシングの相同性解析による同定法¹²⁾ など、より正確に分類、同定できる技術が数多く報告されてくるようになった。しかし、食肉製品や食肉製品製造工場での変敗に関与する乳酸菌特定への活用についての報告は十分でない。これらのことから、食肉製品製造工場における汚染乳酸菌検査のためには、迅速、高感度に乳酸菌を検出し、それを正確に分類、同定できる一連のスキームが求められている。

従来、食肉製品や食肉製品製造工場における日常的な製造環境の検査にはふき取りによる汚染微生物の採取がなされるが、この分離培地として APT agar^{15)~17)} やプロモクレゾールパープル (BCP) 加プレートカウントアガー¹⁸⁾、指示薬である BCP を APT broth に添加してより簡単に乳酸菌の存在を確認する BCP 添加 APT broth¹⁹⁾ などが用いられている。さらに、分離された乳酸菌の増菌培地として、deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) broth²⁰⁾ などが知られている。しかし、食肉製品で実際に問題になる乳酸菌は 10℃ 以下の低温でも生育し⁵⁾⁹⁾、かつ窒素ガス置換包装や真空包装など低酸素濃度で生育するものが多く見受けられるために、前述の培地を使用しても、培養温度や嫌気状態などの培養条件を組み合わせなければ汚染乳酸菌を捉えられないという問題が残っていた。

そこで本報では、加熱食肉製品および製造環境から少量の汚染乳酸菌を簡便に、精度よく、かつ迅速に検出するための培地と検査法を開発するために、BCP 添加 APT broth の改良を試みた。また、本改良培地の実用性を検討するため、実際の食肉製品製造環境から本培地を用いて乳酸菌を分離し、遺伝子学的解析と組み合わせることで、従来法よりも汚染源特定に有意に活用可能か、検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株

供試菌株として表 1 に示す Japan Collection of Micro-organisms (JCM)、公益財団法人発酵研究所 (IFO)、自社保有分離菌を含む乳酸菌 33 株を用いた。それぞれの供試菌株を 10mL の APT broth (Difco) に接種し、30℃ で 2~3 日間培養したものを前培養液として使用した。

2. 検出用培地のグルコース濃度の影響

BCP 添加 APT broth¹⁹⁾ よりグルコースを除いた培地を基本培地 1 とした。すなわち、1L あたり、トリプトン 12.5 g、酵母エキス 7.5 g、塩化ナトリウム 5 g、リン酸水素二カリウム 5 g、クエン酸三ナトリウム 5 g、硫酸マグネシウム 0.8 g、塩化マンガン 0.14 g、硫酸鉄 0.04 g、チアミン塩酸塩 0.001 g、ツイーン 80 0.2 g、プロモクレゾールパープル 0.06 g とし、滅菌後の pH が 6.8 ± 0.2 になるよう調整した。この基本培地 1 にグルコースを終濃度 0~2.5% (w/v) となる

ようそれぞれ加え、各 10mL を試験管に分注した後 121℃ で 15 分間高圧滅菌し試験培地 1 とした。この試験培地 1 に、乳酸菌供試菌株の前培養液を適宜希釈して約 10 CFU/mL になるように接種後、30℃ で 48 時間培養し、乳酸菌の発育による培地黄変を肉眼で観察した。

3. 検出用培地の緩衝能の影響

BCP 添加 APT broth のグルコース濃度を終濃度 20 g/L とし、リン酸水素二カリウムを除いた培地を基本培地 2 とした。この基本培地 2 に、リン酸水素二カリウムを終濃度 0 g/L、5 g/L となるようそれぞれ加え、滅菌後の pH が 6.5 になるように調整した後、121℃ で 15 分間高圧滅菌し試験培地 2 とした。各培地 100mL に対して 0.1M 乳酸溶液を滴下し、pH0.25 間隔で培地の色の変化の観察および 0.1M 乳酸溶液の滴下量の計測を行った。pH の測定は pH メーター HM-30R (東亜ディーケーケー) を用いてガラス電極法により測定した。

4. 検出用培地の寒天濃度の影響

乳酸菌発育に伴う培地の色調変化の判定を明瞭にするため、寒天の至適添加濃度を求めた。*Lactobacillus brevis* JCM1059 を供試菌株とし、前述の基本培地 2 にグルコースを終濃度 20 g/L、寒天 (Oxoid) を終濃度 0~0.6% (w/v) となるようそれぞれ加え、滅菌後の pH が 6.8 になるよう調整した後、各 10mL を試験管に分注、121℃ で 15 分間高圧滅菌し、試験培地 3 とした。この試験培地 3 に、供試菌株の前培養液を適宜希釈して約 10CFU/mL になるように接種後、25℃ で 24、48 時間培養し、培地の黄変を指標とした判定の容易さを確認した。

5. 検出用培地と既存培地との比較

表 1 に示した供試菌株 33 株に、加工食品、食肉製品、製造環境およびヒト糞便などから分離した 197 株を加えた計 230 株の乳酸菌株を用いた。これらを 10mL の APT broth に接種し、20、25、30、35℃ でそれぞれ 1~7 日間培養し、生育したものを前培養液として用いた。前述の基本培地 2 に終濃度でグルコース 20 g/L、寒天 0.75 g/L を加えた培地を「LA 培地」とし (以下、LA 培地)、以降の実験に用いた。比較培地として、APT broth および MRS broth (Difco) に BCP (和光純薬工業) を終濃度 0.06 g/L 加えたもの (比較培地 1 および比較培地 2)、BCP 加プレートカウントアガーより寒天を除いたもの (比較培地 3) を用いた。

LA 培地および比較培地 1~3 を試験管にそれぞれ 10 mL ずつ分注した後、121℃ で 15 分間高圧滅菌した (滅菌後の pH 6.8 ± 0.2)。この培地に、各乳酸菌株の前培養液を適宜希釈して約 10CFU/mL になるように接種後、20、25、30、35℃ で 72 時間培養し、乳酸菌の発育による培地黄変を肉眼で経時的に観察した。

6. 乳酸菌汚染源の解析

実際の食肉製品製造環境から LA 培地を用いて乳酸菌を分離し、汚染源特定解析を行った手順を図 1 に示した。汚

図1 食肉製品製造工場からの乳酸菌の分離と汚染源解析方法

染乳酸菌が検出された食肉製品製造環境について、機械器具、作業員のふき取り検査や半製品など計33箇所88検体を採取した。工程のふき取り検査では、希釈水を染み込ませた綿棒を滅菌して使用した拭き取り法で行った。機械、器具の表面および作業員の前掛け、手など10cm×10cmをふき取り、滅菌希釈水10mLに懸濁することで、試料原液とした。また、半製品、製品の検査では、無菌的に製品を25g採取し、225mLの滅菌生理食塩水を加え、ストマッカーで約30秒間粉碎し、これを試料原液とした。それぞれの試料原液10mLを滅菌した倍濃度のLA培地10mLに加え、25°Cで48時間培養した。培養後、培地の黄変が認められたものについて、1白金耳をLA培地に終濃度1.5%の寒天を加えた平板培地（以下、1.5%寒天添加LA平板培地）に画線し、25°Cで48時間培養した。

空中浮遊菌の検査は、床上110cmの位置に、バイオテスト・RCS・エアーサンプラー（Biotest）を設置し、毎分40Lの流量で4分間吸引して行った。浮遊細菌の捕集には専用のストリップアガーに1.5%寒天添加LA培地を注入し固化させたものを用いた。冷却水の検査は、冷却水を無菌的に採取し、メンブランフィルター法で行った。メンブランフィルターには、0.45μm ボトルトップフィルター（Falcon）を用いた。吸引過後、フィルターを無菌的に取り出し、1.5%寒天添加LA平板培地上にろ過面を上にして気泡が入らないように置き、25°Cで48時間培養した。

培養後、周辺の培地を黄変させたコロニーを釣菌し、別の1.5%寒天添加LA平板培地に画線し、25°Cで48時間培養した。単離したコロニーについて、3%過酸化水素水を用いてカタラーゼ試験し、カタラーゼ陰性のものを乳酸菌として分離した。

それぞれから分離された乳酸菌について、RAPD-PCR法を用いて解析した。RAPD-PCR法は、インスタジマトリックス（Bio-Rad）を用いてDNA抽出を行い、PCR試薬にはAmplitaq Gold DNA Polymerase kit（Applied Biosystems）を用いた。50μLのPCR反応液には、DNA抽出液20μLと30μLのPCR Master Mixを加えた。PCR Master Mixは、1×PCRバッファー（10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% (w/v) のゼラチン）、各0.2mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.4μMのプライマーとなるよう調製し、0.25UのTaq DNAポリメラーゼを混合した。プライマーには、5′ AGT CAG CCA C 3′, 5′ GGG TAA CGC C 3′を混合して使用した。PCR反応条件には、GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）を用い、95°C 10分間の熱変性に続き、熱変性94°C 1分、アニーリング40°C 1分、伸張72°C 2分を45サイクル反応後、72°C 7分間伸張反応を行った。

RAPD-PCR法で製品と同様のグループに属したものについて、森ら¹⁴⁾²¹⁾の手法に従って16SrDNAシーケンシングによる相同性解析を行った。

表 1 試験培地 1 での供試菌株の生育に対するグルコース濃度の影響 (30℃ 48 時間)

供試菌	グルコース濃度 (%) (w/v)				
	0.0	1.0	1.5	2.0	2.5
<i>Lactobacillus alimentarius</i> JCM1095	— ^a	++	++	++	++
<i>Lactobacillus brevis</i> JCM1059	—	—	+	++	++
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> JCM1134	—	+	++	++	++
<i>Lactobacillus curvatus</i> JCM1091	—	++	++	++	++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM1012	—	—	+	++	++
<i>Lactobacillus fermentum</i> JCM1173	—	++	++	++	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149	—	++	++	++	++
<i>Lactobacillus viridescens</i> JCM1174	—	+	++	++	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO3349	—	++	++	++	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JCM6124	—	++	++	++	++
<i>Streptococcus lactis</i> JCM5805	—	++	++	++	++
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO14714	—	++	++	++	++
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	—	++	++	++	++
<i>Enterococcus faecium</i> IFO3535	—	++	++	++	++
<i>Enterococcus faecium</i> JCM5804	—	++	++	++	++
<i>Tetragenococcus halophilus</i> IFO12172	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i> PSC-Y510904	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus amylovorus</i> PSC-Y511401	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus coprophilus</i> PSC-Y512001	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus crispatus</i> PSC-Y511501	—	+	++	++	++
<i>Lactobacillus gasseri</i> PSC-Y510807	—	+	++	++	++
<i>Lactobacillus helveticus</i> PSC-Y512201	—	+	++	++	++
<i>Lactobacillus johnsonii</i> PSC-Y511002	—	+	++	++	++
<i>Lactobacillus pentosus</i> PSC-Y512101	—	++	++	++	++
<i>Lactobacillus reuteri</i> PSC-Y511201	—	++	++	++	++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PSC-Y511301	—	++	++	++	++
<i>Lactobacillus sake</i> PSC-Y510702	—	++	++	++	++
<i>Lactobacillus salivarius</i> PSC-Y511107	—	++	++	++	++
<i>Lactococcus piscium</i> PSC-Y560101	—	+	+	+	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> PSC-Y540204	—	++	++	++	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PSC-Y540101	—	++	++	++	++
<i>Streptococcus parauberis</i> PSC-Y520401	—	+	++	++	++
<i>Enterococcus mundtii</i> PSC-Y650306	—	++	++	++	++
培地の黄変が認められた菌株数	0	27	29	29	29

^a — : 培地の色が変化せず, 紫色のままであるもの

+: やや黄変したもの

++: 鮮明に黄変したもの

実験結果および考察

食肉製品で二次汚染によりしばしば変敗の原因となる乳酸菌は, 低温発育性のものが多数分離される傾向にあるが, 包装工程などの清浄区域での汚染はごく微量である。さらに, 汚染している乳酸菌の種類も多く, これら乳酸菌を製造現場で BCP 添加 APT broth などの分離培地を用いて検出する場合, いくつかの培養条件で検査をしなければ一部の乳酸菌を検出できないという問題があった。そのため, 検査精度が高く, 迅速かつ判定が容易な汚染乳酸菌検出用培地の開発が求められていた。また, 汚染源解析の迅速化も求められており, 製造現場では, 問題発生箇所の改善に

つながる解析手法が切望されていた。本研究では, 汚染乳酸菌検出培地の検討と, 遺伝学的手法による汚染源解析法について検討した。

まず, 汚染乳酸菌検出用培地として, BCP 添加 APT broth の改良を試みた。改良では, 汚染乳酸菌の検出感度を向上させ, さらに判定を容易にするために BCP 添加 APT broth のグルコース濃度, リン酸水素二カリウム濃度および寒天濃度の改良を検討した。

検出用培地のグルコース濃度を変化させた際の検討結果を表 1 に示した。グルコース濃度 1% (w/v) 以上で 30℃ 48 時間培養後に, 乳酸菌発育による培地の黄変が認められ, 特に 1.5~2.5% (w/v) では鮮明に観察された。これま

で、培地中においてグルコースなどの糖類増量は乳酸菌の発育を促進することが報告されており²²⁾、著者らの試験でもこのことを裏付ける結果となった。表1の結果において、供試菌株に対するグルコース濃度の影響は2.0%以上でも変化が認められなかったことから、培地のグルコース

濃度は終濃度2.0% (w/v) とし、以降の実験に用いた。

検出用培地の緩衝能について検討した結果を表2に示した。pH6.5の培地が黄変するために必要な0.1M乳酸溶液は、リン酸水素二カリウム0g/Lでは11.0mL/100mL、リン酸水素二カリウム5g/Lでは18.1mL/100mLで、0g/Lに比べて5g/Lでは7.1mL多く必要であった。少ない乳酸量で培地が黄変するということは、より少菌量の乳酸菌で培地を黄変させることができると考えられた。一般に培地の緩衝剤は、微生物増殖時における培地pHの低下を緩和し、生育を維持することを目的として使用される²³⁾。本検討では、工程や製品から乳酸菌を精度よく、迅速かつ簡単に検出することを目的としており、生育した乳酸菌を保護し、利用することは目的としていないため、リン酸水素二カリウムは添加しないこととした。また、原材料や製品の検査をする際、検体のpHが低いと培地の色に変化し、乳酸菌の有無を正確に測定できないと懸念されたことから、培地のpHは 6.8 ± 0.2 に設定した。このことにより、pH4などの酸性食材を検査する際は検体のpHを調整する必要があるが、通常の加熱食肉製品や拭き取り検体について検討した結果、検体のpHを調整しなくても検査可能であった(データ省略)。

検出用培地の寒天濃度を検討した結果を図2に示した。通常、半流動培地は、嫌気性菌を培養する際、その粘性により培地の嫌気状態を保つ目的や微生物の運動性観察の簡

表2 試験培地2におけるリン酸水素二カリウム濃度と0.1M乳酸溶液量の関係

pH	リン酸水素二カリウム 0g/L		リン酸水素二カリウム 5g/L	
	黄変	0.1M 乳酸溶液 滴下量 (mL) ^a	黄変	0.1M 乳酸溶液 滴下量 (mL)
6.50	—	0.0	— ^b	0.0
6.25	—	2.9	—	5.8
6.00	—	5.7	—	11.8
5.75	—	8.0	—	14.7
5.50	+	11.0	+	18.1
5.25	+	13.5	+	21.2
5.00	++	16.4	++	24.3
4.75	++	19.0	++	27.4
4.50	++	22.4	++	31.0
4.25	++	26.5	++	36.8
4.00	++	30.9	++	43.1

^a 100 ml の試験培地2 に対しての滴下量を示す。

^b — : 培地の色に変化せず、紫色のままであるもの

+: やや黄変したもの

++ : 鮮明に黄変したもの

図2 寒天濃度0% (w/v) および0.075% (w/v) における供試菌株の生育状況 (25℃)

寒天濃度

① : 0% (w/v)

② : 0.075% (w/v)

表3 各種乳酸菌用液体培地における供試菌株の検出

培地 ^a	48時間培養後の検出数 (検出率: %)				72時間培養後の検出数 (検出率: %)			
	20℃	25℃	30℃	35℃	20℃	25℃	30℃	35℃
① 比較培地1	170 (73.9) ^b	209 (90.9)	200 (87.0)	182 (79.1)	191 (83.0)	212 (92.2)	204 (88.7)	184 (80.0)
② 比較培地2	168 (73.0)	202 (87.8)	193 (83.9)	180 (78.3)	191 (83.0)	216 (93.9)	203 (88.3)	181 (78.7)
③ 比較培地3	129 (56.1)	155 (67.4)	163 (70.9)	158 (68.7)	143 (62.2)	182 (79.1)	181 (78.7)	170 (73.9)
④ LA 培地	179 (77.8)	223 (97.0)	205 (89.1)	189 (82.2)	206 (89.6)	229 (99.6)	208 (90.4)	191 (83.0)

^a 比較培地1は、APT brothにBCPを加えたもの、比較培地2はMRS brothにBCPを加えたもの、比較培地3はBCP加プレートカウントアガーより寒天を除いたものを示す。

^b 230株中の検出数および()内は検出率(%)を示す。

表 4 各種乳酸菌用液体培地における 25℃ 培養 48 時間, 72 時間後の供試菌株の検出状況

供試菌株	菌株数	増殖による黄変が認められた菌株数							
		比較培地 1 ^a		比較培地 2 ^a		比較培地 3 ^a		LA 培地	
		48 時間	72 時間	48 時間	72 時間	48 時間	72 時間	48 時間	72 時間
<i>Lactobacillus alimentarius</i> JCM1095	1	1 ^b	1	1	1	0	0	1	1
<i>Lactobacillus brevis</i> JCM1059	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> JCM1134	1	0	1	1	1	0	1	1	1
<i>Lactobacillus curvatus</i> JCM1091	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM1012	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus fermentum</i> JCM1173	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lactobacillus viridescens</i> JCM1174	1	0	1	1	1	0	1	1	1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> PSC-Y510904	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus amylovorus</i> PSC-Y511401	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus coprophilus</i> PSC-Y512001	1	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>Lactobacillus crispatus</i> PSC-Y511501	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus gasseri</i> PSC-Y510807	1	1	1	1	1	0	0	1	1
<i>Lactobacillus helveticus</i> PSC-Y512201	1	1	1	1	1	0	1	1	1
<i>Lactobacillus johnsonii</i> PSC-Y511002	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus pentosus</i> PSC-Y512101	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lactobacillus reuteri</i> PSC-Y511201	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PSC-Y511301	1	1	1	1	1	0	1	1	1
<i>Lactobacillus sake</i> PSC-Y510702	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lactobacillus salivarius</i> PSC-Y511107	1	1	1	1	1	0	0	1	1
<i>Lactobacillus</i> sp.	122	117	117	111	119	92	102	122	122
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO 3349	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JCM6124	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Leuconostoc</i> sp.	47	47	47	44	46	37	41	47	47
<i>Lactococcus piscium</i> PSC-Y560101	1	0	0	0	1	0	0	1	1
<i>Lactococcus</i> sp.	10	10	10	9	10	6	10	10	10
<i>Pediococcus acidilactici</i> PSC-Y540204	1	1	1	1	1	0	1	1	1
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PSC-Y540101	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pediococcus</i> sp.	4	4	4	3	4	2	2	4	4
<i>Streptococcus lactis</i> JCM5805	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Streptococcus parauberis</i> PSC-Y520401	1	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>Streptococcus</i> sp.	10	9	9	8	9	3	6	10	10
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO14714	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enterococcus faecium</i> IFO3535	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enterococcus faecium</i> JCM5804	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enterococcus mundtii</i> PSC-Y650306	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enterococcus</i> sp.	4	3	3	4	4	1	2	3	4
<i>Tetragenococcus halophilus</i> IFO12172	1	0	0	0	0	0	0	0	1
合計菌株数	230	209	212	202	216	155	182	223	229
検出率 (%)		90.9	92.2	87.8	93.9	67.4	79.1	97.0	99.6

^a 比較培地 1 は, APT broth に BCP を加えたもの, 比較培地 2 は MRS broth に BCP を加えたもの, 比較培地 3 は BCP 加プレートカウントアガーより寒天を除いたものを示す.

^b 黄変が認められた菌株数を示した.

易化に用いられる²⁴⁾. 今回の検討では, 図 2 に示したように, 寒天無添加では 24 時間培養後および 48 時間培養後に試験管の深部の方だけ黄色く変化したのに対し, 寒天濃度 0.075% では 24 時間培養後に培地の一部が, 48 時間後には培地全体が黄色く変化した. 通常, 半流動培地には 0.3%

程度の寒天濃度が含まれるが²⁴⁾, 今回の試験から, 0.075% という微量の寒天濃度でも, 判定を容易にするには十分量であることがわかった. 以上の検討から, 以降の実験には前述の BCP 添加 APT broth のグルコース終濃度を 20 g/L にし, pH 緩衝作用のあるリン酸水素二カリウムを除き,

表 5 ソーセージ包装工程における汚染乳酸菌の分離と汚染源解析結果

検体採取箇所		検体数	分離された 乳酸菌株数	汚染源解析結果	
				RAPD-PCR	16SrDNA
冷却出口	冷却出口コンベア	3 ^a	3 ^b	A ^c	
	熱処理棒返却コンベア	3	5	A, B	
	冷却水	1	0		
	空中浮遊菌	1	0		
	半製品	3	0		
作業台	作業台	3	0		
	作業員	4	2	B	
	半製品	3	0		
	壁	2	3	C	
コンベア 1	コンベア	3	0		
	ホース	1	0		
コンベア 2	コンベア	4	4	B, C	
	半製品	3	0		
投入口	投入口	4	0		
	作業員	2	0		
	空中浮遊菌	1	0		
	半製品	3	0		
コンベア 3	コンベア	3	0		
整列機	整列機	4	3	D	<i>Lactobacillus brevis</i> -1 ^d
	半製品	3	0		
	壁	2	0		
コンベア 4	コンベア	3	0		
	ホース	1	4	D	<i>Lactobacillus brevis</i> -1 <i>Lactobacillus brevis</i> -2
コンベア 5	コンベア	3	4	D	<i>Lactobacillus brevis</i> -2
	作業員	2	0		
	半製品	3	0		
コンベア 6	コンベア	3	0		
	ホース	1	0		
	壁	2	4	E, F	
包装機	包装機	4	0		
	容器	3	0		
	包装用エアアー	1	0		
	空中浮遊菌	1	0		
製品	製品	5	5	D	<i>Lactobacillus brevis</i> -2
合計		88	37		

^a 各箇所では検査した検体数を示した。

^b 各箇所での検査から分離された乳酸菌株数を示した。

^c 分離した乳酸菌株を RAPD-PCR 法により分類したグループを示した。

^d RAPD-PCR 法により製品と同じグループに分類された菌株について、16SrDNA 解析により同定した結果を示した。

寒天終濃度を 0.75 g/L にしたものを用い、これを「LA 培地」とした。

乳酸菌検出に対する 各温度での既存培地と LA 培地の比較結果を表 3 に、25℃培養における既存培地と LA 培地の比較結果を表 4 に示した。LA 培地は比較培地に比べいづれの温度でも 10CFU/mL 接種した乳酸菌を高感度に検出でき、特に 25℃では供試菌株 230 株の 97% を検出できた。食肉製品製造工場の衛生管理として、汚染乳酸菌を検

査する際には、精度が高く、操作が簡便であるだけでなく、結果が迅速に得られることが必要である。これまで、乳酸菌の検査は APT broth や MRS broth などが使用されてきた^{25)~27)}。今回、BCP 添加 APT broth を改良した LA 培地は多種の乳酸菌の増殖の有無を短時間で肉眼により容易に判定することが可能であった。また、LA 培地を使用して 25℃ 48 時間培養で検出されなかった乳酸菌について、さらに 24 時間培養することで *Lactobacillus amylovorus* 以

外の株をすべて検出することができた (検出率 99.6%)。 *L. amylovorus* については、30、35℃で 48 時間培養することにより検出できた。 LA 培地が既存培地に比べ生育が速かった理由として、1) APT broth、比較培地 3 に比べてグルコース濃度が高いこと、2) LA 培地は緩衝能が低いため黄変が速いこと、3) LA 培地には寒天が含まれているため微好気の状態となり、より嫌気性を好む乳酸菌が生育しやすいことなどが考えられた。無菌試験や微生物の酸素要求性の鑑別などに用いられているチオグリコレート培地では、0.075% の寒天が含まれているが、その開発段階で、Falk ら²⁸⁾により、0.06~0.25% の寒天を含むことで一部の微好気性の細菌の増殖が良好になることが報告されている。今回の LA 培地では、培地の色の変化をより肉眼で判定しやすくするために寒天を添加したが、乳酸菌の中にはより嫌気状態を好む細菌が存在することが知られており²⁹⁾、少量の寒天培地を加えたことで LA 培地が嫌気状態に近づき、他の培地に比較して検出感度が高くなったと考えられた。

食肉製品製造工場における乳酸菌の分離と汚染源解析の結果を表 5 に示した。食肉製品製造工程のふき取り検査を行ったところ、冷却出口コンベアから 3 株、熱処理棒返却コンベアから 5 株、作業台の作業員から 2 株、作業台の横の壁から 3 株、コンベア 2 から 4 株、整列機から 3 株、コンベア 4 の横のホースから 4 株、コンベア 5 から 4 株、コンベア 6 の横の壁から 4 株、製品から 5 株の計 37 株の乳酸菌を分離した。これらの乳酸菌は、RAPD-PCR 法による解析から 6 グループ (A~F) に分類され、製品を汚染していた乳酸菌は D グループに属した。さらに D グループを対象に、16SrDNA シークエンシングによる相同性解析を実施したところ、製品を汚染している乳酸菌および整列機、コンベア 4 の横のホース、コンベア 5 から分離された乳酸菌はいずれも *Lactobacillus brevis* と同定された。そのうち、製品の 5 株と 16SrDNA の塩基配列が完全に一致したのは、コンベア 4 の横のホースの 1 株、コンベア 5 の 4 株であった。このことから、製品を汚染している乳酸菌の汚染源は、コンベア 4 横のホースとコンベア 5 であることが推定された。

乳酸菌による変敗を防ぐために乳酸菌を制御することは食肉加工メーカーにとって重要な課題である。今回、検出精度が高く、簡便で迅速に乳酸菌を検出できる新たな乳酸菌検出用培地を作製し、それを用いて乳酸菌を検査、分離し、RAPD-PCR 法と 16SrDNA 解析法を利用することによって、乳酸菌の汚染源を推定できることを示した。

要 約

食肉製品製造工場における汚染乳酸菌を対象に、簡便で高感度に検出する改良培地と培養条件を検討するとともに、RAPD-PCR 法などを利用した食肉製品製造工場にお

ける汚染源解析を試みた。

(1) BCP 添加 APT broth からグルコース濃度、寒天濃度、緩衝能を調整した LA 培地は、既存の培地に比べ高感度に乳酸菌を検出できた。

(2) LA 培地は、25℃で 48 時間培養することにより、食肉製品製造工場から分離した汚染乳酸菌を含む供試乳酸菌 230 株中の 97% を検出し、さらに 24 時間培養することで全体の 99.6% を検出した。

(3) LA 培地は試験管内の培地全体において指示薬の色の変化が鮮明になるため、LA 培地を用いることによって、効果的に汚染乳酸菌を検出できることが明らかとなった。

(4) LA 培地を用いて食肉製品製造工場の汚染乳酸菌を検査、分離し、RAPD-PCR 法と 16SrDNA 解析を利用することにより、製品を汚染している乳酸菌の汚染源を特定できることが確認され、衛生改善に役立つことが実証された。

文 献

- 1) Egan, A. F., Ford, A. L. and Shay, B. J., A comparison of *Microbacterium thermosphactum* and lactobacilli as spoilage organisms of vacuum-packaged sliced luncheon meats. *J. Food Sci.*, **45**, 1745-1748 (1980).
- 2) Makela, P. M., Korkeala, H. J. and Laine, J. J., Ropy slime-producing lactic acid bacteria contamination at meat processing plants. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 27-35 (1992).
- 3) Holy, A. V., Cloete, T. E. and Holzapfel, W. H., Quantification and characterization of microbial populations associated with spoiled, vacuum-packed Vienna sausages. *Food Microbiol.*, **8**, 95-104 (1991).
- 4) Korkeala, H. and Makela, P., Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **9**, 33-43 (1989).
- 5) Borch, E., Kant-Muermans, M. L. and Blixt, Y., Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**, 103-120 (1996).
- 6) Dykes, G. A., Cloete, T. E. and Holy, A. V., Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**, 239-248 (1991).
- 7) Makela, P. and Korkeala, H., *Lactobacillus* contamination of cooked ring sausages at sausage processing plants. *Int. J. Food Microbiol.*, **5**, 323-330 (1987).
- 8) Kotula, A. W. and Emswiler-Rose, B. S., Airborne microorganisms in a pork processing establishment. *J. Food Prot.*, **51**, 935-937 (1988).
- 9) Makela, P. M., Korkeala, H. J. and Laine, J. J., Raw materials of cooked ring sausages as a source of spoilage lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, **53**, 965-968 (1990).
- 10) 渡辺 至, 江崎 真, スライスパック食肉製品の汚染乳酸菌の検討, 防菌防黴誌, **20**, 301-307 (1992).
- 11) Tompkins, T. A., Stewart, R., Savard, L., Russell, I. and Dowhanick, T. M., RAPD-PCR characterization of brewery yeast and beer spoilage bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **54**, 91-96 (1996).
- 12) 森 勝美, 16S リボゾーム RNA 遺伝子情報を利用した乳酸菌の同定システム, 日本醸造協会誌, **92**, 188-194 (1997).
- 13) Patarata, L., Pimentel, M. S., Pot, B., Kersters, K. and Faia, A. M., Identification of lactic acid bacteria isolated from

- Portuguese wines and musts by SDS-PAGE. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, 288-293 (1994).
- 14) Johansson, M. L., Quednau, M., Molin, G. and Ahrne, S., Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**, 155-159 (1995).
- 15) Evans, J. B. and Niven, C. F., Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bacteriol.*, **62**, 599-603 (1951).
- 16) Deibel, R. H., Evans, J. B. and Niven, C. F., Microbiological assay for thiamin using *Lactobacillus viridescens*. *J. Bacteriol.*, **74**, 818-821 (1957).
- 17) Egan, A. F., Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 327-336 (1983).
- 18) 辨野義己, 乳酸菌, ビフィズス菌, 「食品衛生検査指針-微生物編」, 初版, 厚生労働省監修, (日本食品衛生協会, 東京), pp.349-360 (2004).
- 19) Marvin, L. S., Preparation of microbiological materials. In "Compendium of methods for the microbiological examination of foods." 2nd ed. (American Public Health Association, Inc.), Washington, pp. 788-897 (1984).
- 20) Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E., A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135 (1960).
- 21) Mori, K., Yamazaki, K., Ishiyama, T., Katsumata, M., Kobayashi K., Kawai, Y., Inoue, N. and Shinano, H., Comparative sequence analyses of the genes coding for 16SrRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 54-57 (1997).
- 22) Charalampopoulos, D., Vazquez, J. A. and Pandiella S. S., Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal-based media with different sugar concentrations and buffering capacities. *Biochem. Eng. J.*, **44**, 96-105 (2009).
- 23) 駒 大輔, 山中勇人, 森芳邦彦, 大本貴士, 培地の成分知っていますか?, 生物工学会誌, **89**, 195-199 (2011).
- 24) 五十嵐英夫, 太田建爾, 善養寺浩, 腸炎起病性腸内細菌鑑別用 Lysine-Indole-Motility (LIM) 培地について, 日本細菌学雑誌, **24**, 338-344 (1969).
- 25) Sharpe, M. E. and Fryer, T. F., Media for lactic acid bacteria. *Lab. Prac.*, **6**, 697-701 (1965).
- 26) Casey, G. P. and Ingledew, W. M., The use and understanding of media used in brewing bacteriology. *Brewers Digest*, **56**, 38-45 (1981).
- 27) Kreft, M. E., Champagne, C. P. and Jelen, P., Growth of *Lactobacillus* dairy cultures on two different brands of MRS medium. *Milchwissenschaft*, **56**, 315-317 (2001).
- 28) Falk, C. R., Bucca, H. B. and Simmons, M. P., A comparative study of the use of varying concentrations of agar in the test medium used to detect contaminants in biologic products. *J. Bacteriol.*, **37**, 121-131 (1939).
- 29) 岡田早苗, 柳田藤寿, 鈴木健一郎, I 乳酸菌の定義と分類・同定, 「乳酸菌の科学と技術」, 初版, 乳酸菌研究集談会編, (学会出版センター, 東京), pp. 9-58 (1996).
- (平成 24 年 3 月 16 日受付, 平成 24 年 5 月 8 日受理)