DEFT を乳業で使用する上での問題点とその応用

佐藤 順*・小俣洋子*・児玉優子*・亀井俊郎*・野田勝彦*

The Problem of DEFT on Dairy Industry and Its Applications

Jun SATO*, Yohko OMATA*, Yuhko KODAMA*,
Toshiroh KAMEI*, and Katsuhiko NODA** Central Research Institute of Meiji Milk Products Co., Ltd.
Higashimurayama-shi, Tokyo, 189

The estimation of bacterial counts in raw milk was studied using Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT). The milk inoculated with *Bacillus cereus* was detected 10^3 to 10^7 counts/ml using DEFT. In the case of raw milk, the regression line was $\log(\text{DEFT}) = 0.86 \log(\text{SPC}) + 0.91$; $r = 0.81$, and 10^5 to $10^{6.5}$ counts/ml were detected. Application of DEFT to the sterilizing effect of LTLT (low temperature long time) pasteurized milk and to the post pasteurization contamination of UHT (ultra high temperature) sterilized milk may be useful. The differential determination of sublethal injured bacterial cells was tested by DEFT. The RNA (ribonucleic acid) of viable cells was stained orange by acridine orange, but inactive cells and DNA (deoxyribonucleic acid) were stained green. When sublethal injured cells were prepared by heat treatment, the ratio (injured cells/unharmed cells, green cells/orange cells) were as follows: *Enterobacter cloacae*: (1.89, 1.36), (14.71, 19.75), *Bacillus cereus* (vegetative form): (1.18, 0.88), (2.71, 2.06), and *Staphylococcus aureus*: (0.92, 0.90), (0.50, 0.40), but with poor agreement for *Candida krusei*. Acid producing activity and acridine orange-staining characteristics of lactic starter culture (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) and its concentrates (*L. acidophilus*) were determined. There was a high correlation between acid production and staining characteristics. (Received Jul. 3. 1985)

微生物を迅速かつ簡便に検出する方法としては、光散乱測定法¹⁾、ビルビン酸測定法²⁾、生物ルミネセンス測定法³⁾、インピーダンス測定法³⁾⁴⁾、蛍光染色法⁵⁾、微量熱量分析⁶⁾など、生物化学的または生物物理学の原理に基づいた試験法が近年報告され、その一部は既に実用化されている。

蛍光染色法 (Direct Epifluorescent Filter Technique; 以下 DEFT と略す) は、顕微鏡で直接菌数を計測する方法で、ブリード法⁷⁾と似た点も多い。これらの直接顕微鏡で菌数を計測する方法は、短時間で判定が可能であることから、現在も生乳取り引き上、重要な地位を占めている。

しかし、乳質改善が進歩してきた現在では生乳中の菌数は大幅に改善され、数年前までは数百万個/ml の菌数

レベルを示していたものが、数10万個/ml と1オーダー低下してきた⁸⁾。この菌数レベルはブリード法の検出限界に近く、かつ精度を向上させるには数多くの視野を計測することが必要になり、経済上の不利益は多大のものがある。

DEFT はこれらの点を改善したもので、そのキットも英国 Difco 社から DEFT-KIT として市販されている。この方法は、ブリード法が 0.01 ml を試験するのに対し、DEFT は 2 ml を試験することから検出限界も低く、現在のような低菌数レベルにある生乳中の総菌数計測法として実用性は高いものと思われた。そこで DEFT を生乳の総菌数測定法として使用する上での問題点を中心として、その他に低温殺菌牛乳の殺菌機の管理に使用する上での問題点、発酵乳製品に使用する乳酸菌の管理

* 明治乳業(株)中央研究所 (〒189 東京都東村山市栄町 1-21-3)

に適用した場合の問題点につき検討したので報告する。

実験方法

1. 供試試料

(1) 生乳

工場で集乳した生乳を用いた。検体は2°Cで保存し、工場到着後24時間以内に試験した。

(2) 低温殺菌牛乳

市販の低温殺菌牛乳を使用した。

(3) 牛乳

市販の牛乳を使用した。

(4) 発酵乳

市販のプレーンタイプのヨーグルトを使用した。

(5) 濃縮スターター

Lactobacillus acidophilus をプロテアーゼで処理したホエーを主成分とした培地で37°C、16時間培養。培養後、遠心分離をして約15倍濃縮した後、液体窒素中で急速に凍結し、-80°Cのディープ・フリーザーにて保存したものを使用した。

2. 試薬および装置

(1) トリプシン

シグマ製 T-8128を用いた。

(2) トリトン X-100

和光純薬製を用いた。

(3) アクリジンオレンジ溶液

0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) にアクリジンオレンジ (メルク製) を 0.025% 溶解した。

(4) イソプロピルアルコール

和光純薬製特級を用いた。

(5) 蛍光顕微鏡

オリンパス製 BH II型を使用した。

(6) 落射蛍光装置

オリンパス製 BH-RFL型を使用した。B励起により、405, 435 nmの輝線と490 nm付近の連続スペクトルを使用した。励起フィルターは BG 12, ダイクロイックミラーは B (DM 500+O 515), 吸収フィルターは O 530である。

3. 生菌数計測法

生菌数 (Standard plate count, 以下 SPC と略記) は標準寒天培地 (栄研) に接種し、30°C, 48時間培養した。

4. 乳酸菌数計測法

乳酸菌数は BCP 加プレートカウント寒天培地 (栄研) に接種し、37°C, 72時間培養した。

5. スターターの調製

10% 脱脂粉乳還元液に酵母エキス (BBL) を 0.1% 添加した後、121°C, 7時間滅菌。これに *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* を各々接種し、35°C, 16時間培養したものをスターターとした。

6. スターターの活力測定法

試料 0.15 ml を 10% 脱脂粉乳還元液 (121°C, 15時間滅菌) 10 ml に接種。45°C の恒温水槽で3時間培養した後、N/10 NaOH で滴定。滴定値を乳酸々度で表わし、スターターの活力とした。

7. DEFT の試験法⁹⁾

試料 2 ml に 2% トリプシン 0.5 ml, 0.5% トリトン X-100 2 ml を加え混合した後、50°C で10分間保持する。予め 0.1% トリトン X-100 5 ml を通流したポリカーボネート製フィルターで反応液を濾過し、さらに 50°C に加温した 0.1% トリトン X-100 5 ml で2回洗浄する。次いで、0.025% アクリジンオレンジ 2.5 ml をフィルターホルダーに満たし、2分間染色する。吸引後、クエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2.5 ml で余分な染色液を除去、イソプロピルアルコール 2.5 ml で洗浄後、フィルターを風乾し、メンブランフィルターをスライドグラスとカバーグラスの間にイマージョンオイルを介してはさみ、落

Fig. 1 Scheme of direct epifluorescent filter technique (DEFT) applied for total cell count in milk

Fig. 2 Distribution of cell count on membrane filter used for enumeration of milk inoculated with *B. cereus*

射型蛍光顕微鏡にてオレンジ色の蛍光を発する細胞を個体法で計測した。

試験法の概略を Fig. 1 に示す。

実験結果および考察

1. DEFT での菌数計測条件の検討

DEFT での菌数計測条件を求めるために、メンブランフィルター上の菌数分布を調査した。牛乳に純粋に培養した細菌 (*Bacillus cereus*) を接種し、DEFT で処理した時の顕微鏡 1 視野中の菌数を縦軸に、メンブランフィルターの直径を横軸にとった (Fig. 2)。

フィルター上の菌数分布は端の方が菌数は多く、中心

部に行くほど菌数は低下した。各視野から求めた菌数の平均値は、メンブランフィルターの端から約 7 mm の視野から求めた菌数とほぼ一致した。そこでその点を中心に前後数視野を鏡検することとした。鏡検する視野数はブリード法の鏡検視野数⁷⁾に準じて実施した。試料中の菌数は計測した菌数の平均値に顕微鏡係数 2231 を乗じ、1 ml 当たりの菌数を求めた。

2. DEFT と SPC との相関

DEFT と SPC との相関を牛乳に *B. cereus* を接種したモデル系を用いて検討した。即ち Trypticase soy broth (BBL) で 30°C、一夜、静置培養した *B. cereus* を希釈して牛乳に接種し、DEFT と標準寒天培地で各々菌数を計測した (Fig. 3)。縦軸に DEFT で求めた菌数 (DEFT)、横軸に SPC をとると、回帰式 $\log(\text{DEFT}) = 1.04 \log(\text{SPC}) + 0.14$ 、相関係数 $r = 0.92$ を得た。また、DEFT の有効計測範囲は、迅速性および経済性を考慮した場合、下限は 10^3 個/ml であり、上限は概ね 10^7 個/ml であった。

3. 生乳中の SPC と DEFT との相関

工場に集乳された生乳の SPC と DEFT との関係を求めた (Fig. 4)。検体は 2°C で保存し、工場到着後、24 時間以内に試験に供した。縦軸に DEFT で求めた菌数 (DEFT)、横軸に SPC をとると、回帰式は $\log(\text{DEFT}) = 0.86 \log(\text{SPC}) + 0.91$ 、相関係数 $r = 0.81$ となった。相関係数は牛乳に *B. cereus* を接種した時の値と比較して低い結果となった。これは生乳には種々の微生物が複雑な菌叢を構成しており¹⁰⁾、単一の細菌を接種した場合と比較すると相関係数は低い結果が得られたものと考えられる。PETTIPHER ら⁹⁾は、90 検体の生乳について

Fig. 3 Correlation of viable cell count between DEFT and standard plate count (Samples were inoculated with *B. cereus*.)

Fig. 4 Correlation of viable cell count in raw milk between DEFT and standard plate count

Fig. 5 Correlation between DEFT and standard plate count used for enumeration of viable cell count in Low Temperature Long Time Pasteurization milk

DEFT による菌数と生菌数との相関を求め、 $r=0.91$ を得ているが、今回の結果はこれよりも劣る成績となった。しかし、最近の生乳でみられる菌数レベル⁶⁾である 10^5 個/ml から $10^{6.5}$ 個/ml の間では良く一致し、実用上問題のないものであった。

4. 低温殺菌牛乳の生菌数管理への応用

低温殺菌牛乳は、現在の市販乳製品の中で最も生菌数レベルの高い製品の一つである。これは低温殺菌牛乳の殺菌条件が温和なため、耐熱性の高い微生物が残存しているものである。そこで、低温殺菌牛乳の菌数を迅速に測定するために DEFT と SPC とを比較した (Fig. 5)。

縦軸に DEFT で求めた菌数 (DEFT)、横軸に SPC をとると、回帰式は $\log (\text{DEFT})=0.97 \log (\text{SPC})+$

Table 1 Comparison between DEFT count and BCP count to enumerate lactic acid bacteria in yoghurt

Sample No.	Log ₁₀ (DEFT count/ml)	Log ₁₀ (BCP count/ml)
1	9.38	9.24
2	9.15	9.13
3	9.32	9.14
4	9.39	9.26
5	9.03	9.08
6	9.24	9.19
7	9.37	9.20
8	9.21	9.13
9	9.16	9.24
10	9.16	9.21

0.17, 相関係数 $r=0.80$ となった。この値は DEFT を低温殺菌牛乳の殺菌後の菌数管理に十分使用可能であることを示すものである。

5. 発酵乳中の乳酸菌数計測への応用

DEFT で発酵乳中の乳酸菌数の計測を試みた (Table 1)。DEFT による菌数と BCP 加プレートカウント培地による菌数について平均値の差の検定を行なったところ、信頼度 95% で両者に有意差は認められなかった。従って、発酵乳中の乳酸菌数計測にも DEFT は使用できるものと考えられる。

Table 2 Viable cell count of DEFT and standard plate count of UHT milk to estimate the keeping quality of post pasteurization contamination

Sample No.	Log ₁₀ (DEFT count/ml)	Log ₁₀ (SPC /ml)
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	6.49	7.25
5	—	—
6	—	—
7	6.64	7.45
8	7.52	7.32
9	—	—
10	—	—
11	—	—
12	—	—
13	7.49	7.53
14	—	—
15	—	—
16	7.47	7.47
17	—	—
18	7.87	7.64
19	—	—
20	—	—
21	—	—
22	—	—
23	—	—
24	7.64	7.63
25	—	—
26	7.62	7.68
27	—	—
28	—	—
29	7.55	7.69
30	—	—

Table 3 The acridine orange-staining characteristics of non-spore forming organisms by sub-lethal injured heat treatment

Organisms	Ratio of orange-red and green fluorescence			
	None	50°C, 30 min	63°C, 30 min	70°C, 10 min
<i>Enterobacter cloacae</i>	89% R, 11% G	80% R, 20% G	L	L
<i>Bacillus cereus</i> (Vegetative form)	69% R, 31% G	50% R, 50% G	100% G	100% G
<i>Staphylococcus aureus</i>	85% R, 15% G	55% R, 45% G	100% G	100% G
<i>Candida krusei</i>	34% R, 66% G	21% R, 79% G	11% R, 89% G	13% R, 87% G

R; Orange-red fluorescence

G; Green fluorescence

L; Lysed

6. UHT 殺菌乳の二次汚染管理への応用

UHT 殺菌された牛乳は、二次汚染が低い確率ではあるが発生することがあり、牛乳製造時の最重点管理項目の一つである。そこで DEFT がその二次汚染の管理手法として使用可能か否かにつき検討した。

市販の牛乳 30 検体を、30°C の恒温水槽で 24 時間増菌培養を行ない、DEFT による菌数と SPC とを比較した (Table 2)。増菌培養後、汚染が認められた検体 (生菌数が増加した検体) は 9/30=30 (%) であった。No. 4 と No. 7 は 1 オーダー、SPC の方が DEFT と比較して高い結果を得たが、他の 7 検体については、近似した値が得られた。

7. 無孢子細菌の加熱処理と蛍光の関係

DEFT では生細胞はオレンジ色の蛍光を、死滅した細胞は緑色の蛍光を発すると言われている¹¹⁾。そこで、*Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* および *Bacillus cereus* (栄養細胞) を接種した牛乳を各々、50°C, 30 分, 63°C, 30 分, 70°C, 10 分加熱処理し、処理の違いによる蛍光の変化を観察した (Table 3)。

緑色の菌の割合は、未加熱の場合、細菌では 10% から

30% を占め、酵母にいたっては 66% が緑色を呈していた。従って、緑色の蛍光を発する細胞は死滅した細胞のみならず、損傷細胞も含まれる可能性がある。63°C, 30 分間加熱すると、耐熱性の低い *E. cloacae* は溶菌してしまい、菌形は観察されなくなった。*B. cereus*, *S. aureus* は 63°C, 30 分以上加熱するとすべて緑色を呈したが、溶菌はみられなかった。*C. krusei* は一部 オレンジ色のものもあったが、これが菌体の生死によるものか、それとも細胞壁構造の違いによるものかは不明であった。

8. 損傷菌と非損傷菌との DEFT による判別

食品衛生上、重要な微生物である損傷菌は通常の試験法¹²⁾でも検出される可能性は低く、実際の菌数よりも低い値を示すことになり、食品の微生物学的品質に誤った評価を与える危険性が高い。DEFT は細胞の生死により、その蛍光が異なるという性質がある。この性質を利用して、損傷菌と非損傷菌とを区別することが可能か否かにつき検討した。

E. cloacae, *S. aureus*, *C. krusei*, *B. cereus* を Trypticase soy broth (BBL) にて 30°C, 一夜、静置培養後、菌体を 2 度洗浄し、*E. cloacae* は 50°C, 5 分, *S. aureus*

Table 4 Media for the differential determination of sublethal injured cells and unharmed cells

Organisms	Non-selective medium	Selective medium
<i>Enterobacter cloacae</i>	BHI (BBL)	VRBA* (DIFCO)
<i>Bacillus cereus</i> (Vegetative form)	BHI (BBL)	BHI+3% NaCl (BBL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI (BBL)	BHI+8% NaCl (BBL)
<i>Candida krusei</i>	PDA (EIKEN)	PDA+8% NaCl (BBL)

* Violet red bile agar¹⁸⁾

Table 5 The application of DEFT to the differential determination of sublethal injured cells and unharmed cells

Organisms	Injured cells/ Unharmed cells	Green/Orange
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.89	1.36
	14.71	19.75
<i>Bacillus cereus</i>	1.18	0.88
(Vegetative form)	2.71	2.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.92	0.90
	0.50	0.40
<i>Candida krusei</i>	0.93	0.79
	0.30	2.73

は60°C, 5分, *B. cereus* と *C. krusei* は50°C, 5分加熱処理を行ない, それぞれ損傷菌検出のための完全培地, 選択培地に接種した. 使用した培地は Table 4 に示した. DEFT で求めた値と比較したものが Table 5 である. *E. cloacae*, *S. aureus*, *B. cereus* (栄養細胞) については良く一致したが, *C. krusei* は損傷菌/非損傷菌の値が0.93と0.30に対し, 緑色の菌/オレンジ色の菌の値が0.79, 2.73とほとんど一致しなかった. 即ち, 細菌については損傷菌の有無を判別するのに有効と思われたが, 酵母に対して無効であった.

9. 乳酸菌の活力測定への応用

乳酸菌の活力測定法は, 森地らの方法¹⁴⁾, 神辺らの方法¹⁵⁾, 菊池の方法¹⁶⁾, 吉岡らの方法¹⁷⁾があるが, 酸生成力試験は今回の比較では十分機能すると考えられたことから, 一定量の乳酸菌を培地に接種し, 一定時間培養し

た後の滴定酸度をもって乳酸菌の活力とする前述の方法を採用した.

Fig. 6 と Fig. 7 は, それぞれ *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の酸生成力と DEFT における緑色の菌の比率の関係を示したものである. *L. bulgaricus* は酸生成力が強く, 開始時0.3%であったが, 保存中に酸度が上昇し, そのため乳酸菌が損傷を受け, 保存後1日目の活性は0%となった. 1日目の緑色の菌は12.5%であり, 2日目には62%が緑色の菌となった. *S. thermophilus* は酸生成力が *L. bulgaricus* に比較してやや劣り, 1日目の活性の低下は0.05%であり, 緑色の菌も約2%増加したのみであった. 2日目では活性は0%となり, 緑色の菌も46%と急激に増加した.

次に, 市販のヨーグルトを37°Cに保存し, 乳酸菌と同様の関係を求めたものが Fig. 8 である. 乳酸菌の活性

Fig. 6 Acid producing activity and acridine orange-staining characteristics of *Lactobacillus bulgaricus*

Fig. 7 Acid producing activity and acridine orange-staining characteristics of *Streptococcus thermophilus*

Fig. 8 Acid producing activity and acridine orange-staining characteristics of lactic acid bacteria in fermented milk

Fig. 9 Acid producing activity and acridine orange-staining characteristics of lactic acid starter culture concentrates

は5日目まで消失し、緑色の菌の割合は7日目までは10～20%であったものが、10日目には40%となった。この結果は先の乳酸菌単独の場合とは異なり、活力の低下、緑色の菌の増加も遅くなった。

また最近、発酵乳製品に使用されることの多い濃縮スターターの保存性を、緑色の菌の割合と酸生成力とを特性値として測定した。即ち、冷凍1カ月、3カ月、5カ月保存の *L. acidophilus* の濃縮スターターを解凍後、10 ml ずつ分取し、30°C で菌体のまま保存し前述の乳酸菌と同様の方法により、酸生成力と緑色の菌の割合を求めた (Fig. 9)。

30°C に保存しても乳酸菌自体は酸を生成しないため、

菌の活力の低下も緩慢で緑色の菌の増加も緩やかとなった。この実験では酸生成力と緑色の菌の比率は直線関係となり、乳酸菌の活力測定の一手法としての DEFT の有効性が示唆された。

要 約

DEFT を生乳の菌数測定法として使用する上での問題点に検討を加えるとともに、低温殺菌牛乳の殺菌機の管理、UHT 乳の二次汚染管理への適用の可能性を検討し、以下の結果を得た。

- (1) DEFT の有効計測範囲は、 10^3 個/ml から 10^7 個/ml である。
- (2) 生乳では、実用上問題となる菌数レベルの 10^5 個/ml から $10^{6.5}$ 個/ml では DEFT は使用可能である。
- (3) 低温殺菌牛乳の殺菌後の菌数管理や UHT 乳の二次汚染の管理手法として使用可能である。
- (4) 食品中の損傷菌の有無を判別するのに有効であったが、酵母に対しては判別が困難であった。
- (5) 乳酸菌の活力測定の一手法としての有効性が示唆される。

本研究の概要は、日本食品工業学会第 32 回大会 (1985, 名古屋) にて発表した。

文 献

- 1) GOLDSCHMIDT, M. C. and FUNG, D. Y. C.: *Food Technol.*, **33**, 63 (1979).
- 2) COUSINS, C. M., RODRIGUES, U. M. and FULFORD, R.: *Journal of Dairy Research*, **48**, 45 (1981).
- 3) CADDY, P., HARDY, D., MARTINS, S., DUFOUR, S. W. and KRAEGER, S. J.: *Journal of Food Protection*, **41**, 277 (1978).
- 4) GNAN, S. and LUEDECKE, L. O.: *Journal of Food Protection*, **45**, 4 (1982).
- 5) PETTIPHER, G. L.: *Dairy Industries International*, **48**, 21 (1983).
- 6) BERRIDGE, N. J., COUSINS, C. M. and CLIFFE, A. F.: *Journal of Dairy Research*, **41**, 203 (1974).
- 7) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針 I (日本食品衛生協会, 東京), p. 100 (1978).
- 8) 高橋正義・古山清一・板橋一男・荒井威吉・酪農科学・食品の研究, **31**, 23 (1982).
- 9) PETTIPHER, G. L., MANSELL, R., MCKINNON, C. H. and COUSINS, C. M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 423 (1980).
- 10) 清水苗一・吉村 進・中島之博・白井泰博: 乳技協資料, **30**, 5, 24 (1981).

-
- 11) Hobbie, J. E., Daley, R. J. and Jasper, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225 (1977).
- 12) 森地敏樹: 最新食品微生物制御システムデータ集, 春田三佐夫・宇田川俊一・横山理雄編 (サイエンスフォーラム, 東京), p. 151 (1983).
- 13) Maxcy, R. B.: *Journal of Milk and Food Technology*, **33**, 445 (1970).
- 14) 森地敏樹・矢野信礼・入江良三郎・見坊 寛: 農化, **35**, 150 (1961).
- 15) 津郷友吉監修: 乳製品工業 上巻 (地球出版, 東京), p. 43 (1971).
- 16) 菊池俊彦: 酪農科学・食品の研究, **25**, 185 (1976).
- 17) 吉岡八洲男・豊田修次: 酪農科学・食品の研究, **30**, 227 (1981).
- (昭和60年7月3日受理)
-