プレート MPN 法による発酵乳・乳酸菌飲料中の 乳酸菌数の簡易測定

(昭和 62 年 1 月 16 日受理)

水落 慎吾* 吉田 啓子*
荻原 博和* 春田三佐夫*

Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Drinks by the Plate MPN Technique

Shingo MIZUOCHI, Keiko YOSHIDA, Hirokazu OGIHARA
and Misao HARUTA

(College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University:
3-34-1, Shimouma, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

In 1983, Tan and his co-workers presented a plate MPN technique for estimating viable cell counts as a substitute for the traditional method. This simple system was compared with the pour plate method for the estimation of lactic acid bacterial counts in fermented milks and lactic acid bacteria drinks.

The correlation coefficients between plate MPN counts and pour plate counts in pure cultures of lactic acid bacteria, and fermented milks and lactic acid bacteria drinks were 0.983 and 0.929, respectively.

The plate MPN technique appears to be a convenient procedure for the estimation of lactic acid bacterial counts in fermented milks and lactic acid bacteria drinks.

(Received January 16, 1987)

Key words: プレート MPN 法 plate MPN technique; 乳酸菌数 lactic acid bacterial counts; 発酵乳 fermented milks; 乳酸菌飲料 lactic acid bacteria drinks

緒 言

日常行われている食品の衛生あるいは品質管理の場では、多数の検体の処理が必要とされる。これに対応する意味で現に微生物検査の面で手法の簡易化、迅速化、機械化、自動化の動きが活発化している。

このような状況の中で Harris ら¹⁾、Fung ら²⁾の報告をもとにネブラスカ大学食品科学工学部の Tan ら³⁾は、従来の細菌数測定の方法の利点を生かし、より簡易に生菌数を測定する手法としてプレート MPN 法を提案している。この手法は平板塗抹法と MPN による生菌数測定法の特徴を巧みに捕えて、それらを組み合わせた手法であり、従来の平板培養法や MPN 法と比較すると集落数を個々に算出する手数が省け、寒天平板が 1 検体、1

平板ですむなどの利点がある。

今回、著者らは、食品の品質管理の場でのプレート MPN 法の実用性について、発酵乳・乳酸菌飲料を対象として検討したので報告する。

実験材料及び方法

1. 供試菌株

実験に用いた菌株は、農林水産省・畜産試験場より分与を受けた *Lactobacillus bulgaricus* AY, *Lactobacillus helveticus* HCH, *Streptococcus thermophilus* 10 Y, 本研究室保存菌株である *Lactobacillus casei* L 14, *Lactobacillus acidophilus* L 54 の 5 菌株であり、10% 滅菌脱脂乳に 35° で 3 代継代培養したものを供試菌液とした。

2. 供試試料

市販発酵乳を 20 検体、乳酸菌飲料のうち無脂乳固形分

* 日本大学農獣医学部：東京都世田谷区下馬 3-34-1

Fig. 1. Successive steps for a single plate in the plate MPN technique

+: growth; -: no growth

3% 以上のものを 10 検体, 無脂乳固形分 3% 未満のものを 10 検体の計 40 検体を供試した。

3. 乳酸菌数の測定

(1) プレート MPN 法

Tan ら³⁾の方法に準拠した。まず、BCP 加プレートカウント培地 (栄研化学 (株) 製) の寒天平板を作製し、その表面をクリーンベンチ内で 20 分間倒置乾燥した。表面が十分乾燥した後、Fig. 1 のように 4 等分にし、希釈試料を接種する箇所を○印を 3 個ずつ付け、その横に希釈段階を記入した。

次に 10 進希釈法で調製した各希釈試料をマイクロピペットを用いて 1 段階につき 0.01 ml ずつ 3 箇所接種し、しばらく室温に放置して接種試料の吸収を待ち同一培地を数 ml 重層した後、35°, 72 時間培養を行った。

培養後、黄変細菌集落の発生の有無を観察し、発育の認められたものを +、発育の認められなかったものを - と記録した。菌数は 3 本式 MPN 表を使って MPN 値として求めた。なお 1 試料につき、3 回ずつ測定を行った。

(2) 平板培養法

公定法⁴⁾に準拠し、1 平板上の集落が 30~300 個となるように調製した各希釈試料を BCP 加プレートカウント培地に混釈接種し、固化後、寒天表面における乳酸菌の発育をよくするため同一培地を重層して、35°, 72 時間培養を行った後、黄変細菌集落を計測した。

実験結果及び考察

1. 純培養菌株を対象としたプレート MPN 法及び平板培養法の比較

Fig. 2 はプレート MPN 法と平板培養法による純培養乳酸菌数を比較したものである。統計学的検定の結果、両方法の間には相関係数 0.983 と高い相関が認められ、直線回帰 $Y = 0.99X + 0.19$ が得られた。

さらに、純培養乳酸菌を対象に、プレート MPN 法と平板培養法で得られた測定値について分散分析法により有意差検定を行った結果、Table 1 に示す成績を得た。すなわち、プレート MPN 法による乳酸菌数と平板培養法によるそれらとの間には、分散比 $F = 0.1306$ で有意差は認められなかった。

Fig. 2. Correlation between plate MPN and plate counts of pure culture lactic acid bacteria

○: *L. bulgaricus*; △: *L. helveticus*;
□: *L. casei*; ●: *L. acidophilus*;
▲: *S. thermophilus*

Table 1. Analysis of Variance of Pure Culture Lactic Acid Bacterial Counts

Source	Sum of squares	df	Mean square	F ratio
Methods ^a	0.7127	1	0.7127	F=0.1306
Strains	39.3043	4	9.8261	F=1.8007 ^b
Error	785.7840	144	5.4568	
Total	825.8010	149		

^a Plate MPN technique and pour plate method

^b Significance at the 5% level

従って、プレート MPN 法は乳酸菌数の測定に十分応用可能と思われる。

2. 市販発酵乳・乳酸菌飲料を対象としたプレート MPN 法及び平板培養法の比較

市販発酵乳・乳酸菌飲料の計 40 検体を対象に、プレート MPN 法と平板培養法による乳酸菌数を比較し、その成績を Fig. 3 に示した。なお 1 検体につき 3 回のくり返し測定を行った。統計学的検定の結果、両方法間には相関係数 0.929 と高い相関が認められ、直線回帰 $Y = 0.80X + 1.66$ が得られた。

さらに、Table 2 にプレート MPN 法と平板培養法で得られた測定値について分散分析法による検定結果を示した。すなわち、プレート MPN 法で求めた乳酸菌数と平板培養法による乳酸菌数の間には、分散比 $F = 0.0130$

Fig. 3. Correlation between plate MPN and plate counts of lactic acid bacteria in fermented milks and lactic acid bacteria drinks

○: fermented milk; △: lactic acid bacteria drinks (SNF 3% ≤); ●: lactic acid bacteria drinks (SNF 3% >).

Table 2. Analysis of Variance of Lactic Acid Bacterial Counts in Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Drinks

Source	Sum of squares	df	Mean square	F ratio
Methods ^a	0.003	1	0.003	F=0.0130
Strains	69.534	2	34.767	F=150.51 ^b
Error	54.550	236	0.231	
Total	124.087	239		

^a Plate MPN technique and pour plate method

^b Significance at the 1% level

と有意差は認められなかった。

従って品質管理の場で本法を採用すれば、乳酸菌数の測定を簡易化することが可能と考える。

なお、本法では、大型長方形のシャーレなどを用いて分割数を増すことにより、より多くの検体を1平板で検査することも可能である。

まとめ

簡易な生菌数測定法として Tan らが提案したプレート MPN 法による発酵乳・乳酸菌飲料中の乳酸菌数の測定を試み、平板培養法と比較して以下のような結果を得た。

(1) 純培養乳酸菌を対象とした場合、プレート MPN 法と平板培養法の間には相関係数 0.983 と高い相関がみられ、両方法間には有意差は認められなかった。

(2) 市販発酵乳・乳酸菌飲料を対象とした場合、プレート MPN 法と平板培養法の間には相関係数 0.929 と高い相関がみられ、両方法間には有意差は認められなかった。

本稿を終わるに臨み、種々御助言をいただいた都立衛生研究所、松本昌雄博士、本実験に協力された後藤直正氏、古崎一郎氏に対して衷心より厚く御礼申し上げる。

なお、本法の要旨は、日本食品衛生学会第51回学術講演会(昭和61年5月、東京)において発表した。

文 献

- 1) Harris, R. F., Sommers, L. E.: Appl. Microbiol. **16**, 330~334 (1968).
- 2) Fung, D. Y. C., Kraft, A. A.: J. Milk Food Technol. **32**, 408~409 (1969).
- 3) Tan, S-T., Maxcy, R. B., Stroup, W. W.: J. Food Protection **46**, 836~841 (1983).
- 4) 厚生省食品保健課, 乳肉衛生課, 食品化学課共編: “食品六法” p. 84~85 (1985) 中央法規出版。