

食品製造環境における乳酸菌検出に適した培地とふき取り検査キットの開発

朝倉 勇樹¹、○加茂 絢香¹、橋本 美保²、中野 宏幸¹、加藤 重城²

¹日本細菌検査株式会社、²プリマハムグループ 株式会社つくば食品評価センター

目的

食品の腐敗・変敗は、洗浄不足による製造設備からの乳酸菌の二次汚染によることが多く、衛生状況のモニタリングや乳酸菌の制御は食品加工メーカーにとって重要な課題である。しかしながら、一般に乳酸菌検査に用いられるMRS培地やBCP培地は調製に手間がかかることや判定までに72時間を要することから、迅速な結果判定が求められる検査には不向きである。製造現場において簡便で迅速な乳酸菌検査は、食品工場における品質管理に有意義と考え、BCP添加液体培地を利用した色調変化で判定できるふき取り綿棒一体型のキットを考案した(図1)。本研究では、乳酸菌以外の菌の生育を抑制する培地成分と、ふき取り検査に適した培養方法を検討した。



図1 乳酸菌検出用綿棒一体型キット

方法

液体培地は乳酸菌検出用液体培地(LA培地:プリマハム社製)(表1)をベースに、乳酸菌以外の菌を抑制する選択性が高い培地に改良するため以下のとおり検討した。

表1 乳酸菌検出用液体培地の組成

培地組成	1 Lあたりの重量 (g)
トリプトン	12.500
酵母エキス	7.500
グルコース	20.000
塩化ナトリウム	5.000
クエン酸三ナトリウム二水和物	5.000
硫酸マグネシウム	0.800
塩化マンガン	0.140
硫酸鉄(II)第一	0.040
チアミン塩酸塩	0.001
寒天	0.750
プロモクレゾールパープル	0.060
Tween80	0.200
pH: 6.8 (±0.2)	

1)-①乳酸菌の選択性の高い培地の検討(試薬個別での検討)

LA培地に酢酸ナトリウムおよび乳酸ナトリウムをそれぞれ種々の濃度添加したものをチューブに500μLずつ分注した。供試菌(*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*)を所定の菌数(10~10⁵ CFU/チューブ)になるように培地に100μLそれぞれ加え、35℃24時間培養し培地の黄変を確認した。

1)-②乳酸菌の選択性の高い培地の検討(試薬組み合わせの検討)

1)-①で効果が認められた濃度の試薬を組み合わせで最適濃度を検証した。方法は1)-①と同じ方法で実施した。

2)ふき取り検査キットへの応用

1)-②で改良した培地500μLをふき取り検査キットとして作製し、供試菌100μL接種した綿棒を培地に挿入して35℃24時間後の黄変を確認した。

3)培養温度および時間の検討

2)で作製したふき取り検査キットに、乳酸菌3菌株(*Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *E. faecalis*)、対照3菌株(*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*)100μLをそれぞれ接種して25,30,35℃で24~48時間培養し、培地の黄変を確認した。

結果

1)-①乳酸菌の選択性の高い培地の検討(試薬個別での検討)

培地の黄変の強い方から“+>+w>±”と示した。培地が紫色で変化しなかったものは“-”で示した。酢酸ナトリウムでは1.0%以上添加することにより*E. coli*および*S. aureus*の増殖を抑制し、その結果、培地の黄変を抑制できた(表2)。乳酸ナトリウムについても0.5%以上添加することで*S. aureus*の増殖を抑制し、その結果、培地の黄変を抑制できた(表3)。

表2 酢酸ナトリウムを添加した場合の各菌種の判定結果

酢酸Na添加濃度	<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Escherichia coli</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>								
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10				
0.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.05%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表3 乳酸ナトリウムを添加した場合の各菌種の判定結果

乳酸Na添加濃度	<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Escherichia coli</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>								
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10				
0.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.05%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.00%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

結果

1)-②乳酸菌の選択性の高い培地の検討(試薬組み合わせの検討)

培地黄変の評価は1)-①と同様に実施した。酢酸ナトリウムと乳酸ナトリウムを組み合わせで添加することにより、*E. coli*および*S. aureus*の増殖抑制は単独で添加するよりも高い効果がみられた(表4)。その中でも乳酸菌の検出が良好、かつその他の細菌の増殖を抑制することができた配合比率は、酢酸ナトリウム2.0%と乳酸ナトリウム1.0%または酢酸ナトリウム1.8%と乳酸ナトリウム1.0%であった。

表4 酢酸ナトリウムと乳酸ナトリウムを添加した場合の各菌種の判定結果

酢酸Na	乳酸Na	<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Escherichia coli</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>							
		10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10			
2.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2)ふき取り検査キットへの応用

1)-②で良好な結果であった酢酸ナトリウム1.8%と乳酸ナトリウム1.0%を添加した改良培地をふき取り検査キットとして使用した結果、綿棒上でも問題なく黄変が確認でき、*E. coli*, *S. aureus*の増殖抑制効果が認められた(図2)。

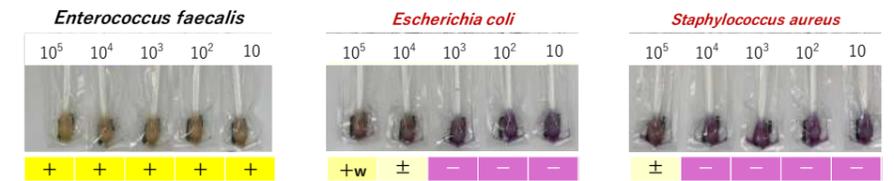


図2 ふき取り検査キットでの各菌種の判定結果

3)培養温度および時間の検討

24時間培養の結果、30および35℃で乳酸菌の検出が良好であり、かつ乳酸菌以外の細菌の抑制効果が高いことが確認された(図3)。特に30℃では乳酸菌以外の細菌の抑制効果が高かった。また、48時間培養の場合では、25℃で同等の検出感度および抑制効果が確認された(結果省略)。

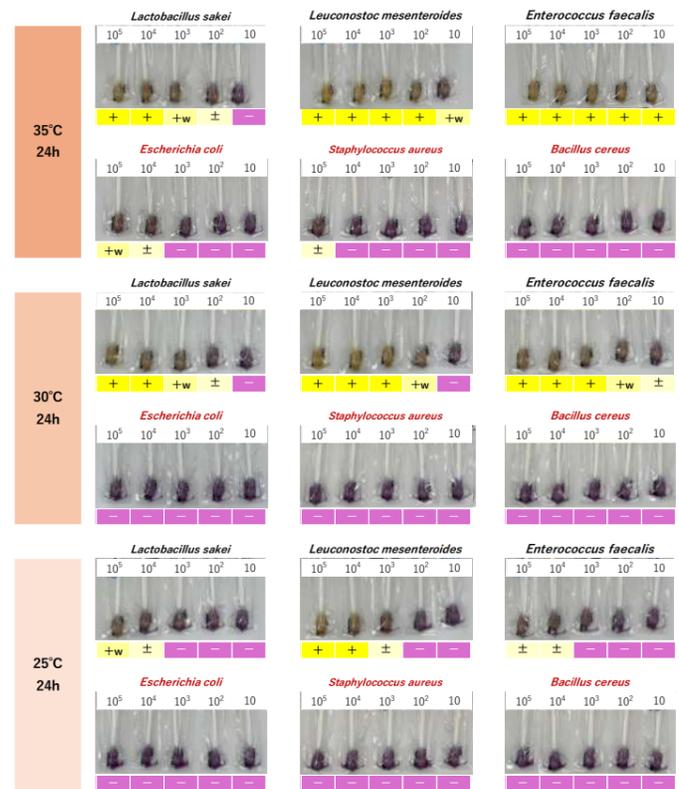


図3 培養温度と各菌種の判定結果

考察

本研究で開発したふき取り検査キットは乳酸菌を優位に検出可能で、製造環境の簡便な衛生管理方法としての活用が期待できる。今後は試験菌種を増やし、本検査キットの有効性を検証する。さらに、選択性や簡便性を向上させたキットに改良を進める予定である。