

ペトリフィルム™を用いる食品中の乳酸菌の生菌数測定

達牧子^{1,2}・寺本忠司³・守山隆敏⁴・横井川久己男¹

¹徳島大学大学院総合科学教育部, 〒770-8502 徳島市南常三島町 1-1

²神戸女子短期大学, 〒650-0046 神戸市中央区港島中町 4-7-2

³神戸科学研究所, 〒655-0039 神戸市垂水区霞ヶ丘

⁴スリーエムヘルスケア, 〒158-8583 東京都世田谷区玉川台 2-33-1

コレスポンデンス著者：横井川久己男

Determination of Living Cells of Lactic Bacteria in Foods with Petri-film™

Makiko Tsuji^{1,2}・Tadashi Teramoto³・Takatoshi Moriyama⁴・Kumio Yokoigawa¹

¹ Graduate School of Integrated Arts and Sciences, University of Tokushima, Tokushima 770-8502, Japan

² Kobe Women's Junior college, Kobe 650-0046, Japan

³ Kobe Institute for Science, Kobe 655-0039, Japan

⁴ 3M Health Care Co., Tokyo 158-8583, Japan

Corresponding author: Kumio Yokoigawa

Abstract

We examined the living cell number of lactic bacteria in foods by anaerobic culture with Petri-film™ (PFAC). As the reference medium, the de Man, Rogosa and Sharpe agar medium (MRSA) and an agar medium supplemented with bromocresol purple (BCPA) were used. When we determined the living cell number of lactic bacteria in various products of pickled vegetables (29 products), kimuchi (10 products), meats (13 products), lactic fermenting beverages (24 products) and cultured milks (6 products), the cell numbers determined with PFAC showed high correlations with those determined with MRSA and BCPA.

緒言

乳酸菌は、主に糖を分解して乳酸を生成しエネルギーを獲得するグラム陽性細菌の総称であり、カタラーゼ陽性で嫌気条件でも生育する¹⁾。乳酸菌には *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 等の属が含まれる。*Streptococcus* 属の選択培地として TATAC (Triphenyltetrazolium chloride - acridine orange - thallosulphate - aesculin - crystal violet) 寒天培地, *Lactobacillus* 属の選択培地として LBS (*Lactobacillus* selection) 寒天培地, *Lactobacillus* 属, *Bifidobacterium* 属及び *Streptococcus* 属を検

出する培地として BL (Blood and Liver) 寒天培地などが使用されている²⁾が、これらの乳酸菌の測定に使用される培地は、いずれも完全な選択性をもつわけではなく常に例外が生じる^{3, 4)}。複数種類の培地の併用により生菌数測定の正確性は高まるが、それでも正確な判定には寒天平板培地上に形成されたコロニー形態の観察等が必要となり、これらの判別には経験と熟練を要する⁵⁾。

「乳及び乳製品の成分規格に関する省令」(厚生労働省)で定められた乳酸菌の生菌数測定用の公定培地は、Bromocresol purple 加プレートカウント寒天培地 (BCPA) であり、好気培養または嫌気培養により乳酸菌数を測定する。乳酸菌飲料の成分規格基準では乳酸菌数が 10^6 cells/g 以上、発酵乳の成分規格基準では 10^7 cells/g 以上と規

定され、正確な検査法が望まれている。BCPAは食品衛生法で乳酸菌飲料および発酵乳の乳酸菌数測定培地に限定されているが、栄養要求性の高い乳酸菌は生育が遅いという問題点がある⁶⁾。The de Man, Rogosa and Sharpe 寒天培地(MRSA)は、好気培養または嫌気培養により乳酸菌数を測定することが可能であり、ほとんどの乳酸菌の生育に適しているため、欧米諸国では食品の乳酸菌数測定に広く使用されている⁴⁾。ただし、MRSAを用いて嫌気培養した場合、ビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)が生育する可能性があり、その場合には集落の形状からも乳酸菌(*Lactobacillus* 属)と区別することが困難となる⁶⁾。

また、食品に混入したガス産生乳酸菌が食品の品質を低下させる場合があり、ガス産生乳酸菌数の測定も必要となるが、生菌数測定用のBCPAやMRSAを用いる平板培養法では、それらを正確に判定することができない。一方、生菌数測定用の簡易検査キットは操作に経験や熟練を必要とせず簡便であり、一般細菌用、大腸菌群用、黄色ブドウ球菌用等の種々の細菌群用に開発され市販されているが、乳酸菌用の簡易検査キットは開発されていない。

一般細菌用の簡易検査キットとして汎用されているペトリフィルム™AC(PFAC)は、ゲル状培地を2枚の透明プラスチックフィルムで挟み込んだ形状で、好氣的培養条件で使用する。構造上ガス産生菌の検出も可能である。本研究では、PFACを本来の使用法とは異なる嫌気条件で使用することにより、乳酸菌数及びガス産生菌数の計測を検討した。

実験材料と方法

1) 使用培地

BCPA(日水製薬, 東京), MRSA(オキソイド, 英国), およびPFAC(スリーエムヘルスケア, 東京)の3種類の培地を使用した。

2) 供試菌株と培養条件

乳酸菌の標準菌株として *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891T, *Lactobacillus casei* NBRC 15883T, *Lactobacillus animalis* NBRC 15882T を使用した。培養条件は35℃で48時間または72時間の静置培養とした。PFACを用いる場合は嫌気培養を行い、BCPA および MRSA を用いる場合は好気培養を行った。

3) 供試食品

食品中の乳酸菌の生菌数を前述の3種類の培地で測定し、得られた結果を比較検討するため、市販乳酸菌飲料・発酵乳(30例)、漬物・キムチ(39例)・食肉(13例)の計82例を検査対象とした。

4) 乳酸菌数測定法

乳酸菌標準株を普通ブイヨンの10mlに接種

し、35℃で24時間培養後、滅菌生理食塩水で希釈し、PFAC, BCPA 及び MRSA を用いて生菌数を測定した。PFACを用いる場合には、アネロパック・ケンキおよび嫌気指示薬(三菱ガス化学, 東京)と共に、接種したPFACを嫌気培養用ナイロン袋に入れ、35℃で48時間嫌気培養後、発育した赤色コロニーを計測した。

乳酸菌飲料・発酵乳、及び食品中の乳酸菌数試験は、試料の10gを滅菌ストマッカー袋に入れ、滅菌生理食塩水90mlを加えて、ストマッカーで30秒間処理したものを試料液とした。これらの試料を用いて、前述の標準菌の場合と同様に、3種類の培地を用いて生菌数測定を行った。BCPAを用いる生菌数測定は、「乳及び乳製品の成分規格に関する省令」に従い形成された黄色コロニーを乳酸菌として計測し、MRSAを用いる場合にはすべてのコロニーを乳酸菌として計測した。PFACを用いる場合は赤色コロニーを乳酸菌として計測し、ガス産生菌数も肉眼で観察して計測した。また、すべての菌数測定は6連で行った(n=6)。

結果

乳酸菌標準株の生菌数を3種類の培地で測定した結果を表1に示した。*L. plantarum*, *L. casei* 及び *L. animalis* のいずれの場合も、使用した培地にかかわらず生菌数に有意差は見られず、PFACを用いる嫌気培養法は、乳酸菌測定が可能と思われた。

表1. 異なる培地で測定した乳酸菌生菌数

菌株	培地	生菌数(log CFU)
<i>L. plantarum</i>	PFAC	7.52±0.04
"	MRSA	7.56±0.12
"	BCPA	7.51±0.10
<i>L. casei</i>	PFAC	7.64±0.17
"	MRSA	7.45±0.19
"	BCPA	7.43±0.19
<i>L. animalis</i>	PFAC	7.77±0.24
"	MRSA	7.74±0.43
"	BCPA	7.76±0.32

漬物・キムチ(39例)の乳酸菌生菌数を3種類の培地で測定した結果を表2に示した。また、各培地で測定した生菌数の相関性を図1に示した。

PFACは、MRSAやBCPAを用いて測定した生菌数と同様の結果を示した。PFACとMRSAで測定した乳酸菌数の相関係数は0.98、PFACとBCPAの間の相関係数は0.98であった。また、BCPAとMRSAで測定した時の乳酸菌数の相関係数は0.96であった。一方、PFACに発育したコロニーの周辺にはガスの蓄積が見られ(図2)、ガス産生菌の計測が容易であった(表2)。

続いて、食肉13例の乳酸菌生菌数を3種類の培地で測定した結果を表3に示した。また、各培地で測定した生菌数の相関性を図3に示した。食肉

の場合も、培地の種類にかかわらず、生菌数はほぼ同様の結果となった。各培地で測定した乳酸菌生菌数の相関係数は、培地の組合せにかかわらず0.99となった。

次に、乳酸菌飲料・発酵乳30例の乳酸菌生菌数を3種類の培地で測定した結果を表4に示した。

また、各培地で測定した生菌数の相関性を図4に示した。PFACとMRSAで測定した乳酸菌数の相関係数は0.90、PFACとBCPAの間の相関係数は0.84であった。また、BCPAとMRSAで測定した時の乳酸菌数の相関係数は0.91であった。

表2. 漬け物・キムチ中の乳酸菌生菌数

試料 食品 番号	生菌数(log CFU)			ガス産生菌 (log CFU)
	PFAC	MRSA	BCPA	
(漬け物)				
1 野沢菜	5.5	5.8	5.6	5.5
2 大根	2.9	2.0	3.0	2.3
3 キュウリ	4.8	4.6	4.7	4.3
4 沢庵	3.7	3.5	3.9	3.7
5 白菜	7.5	7.5	7.3	7.3
6 白菜	8.2	8.2	8.2	8.2
7 キュウリ	7.2	7.3	7.3	7.2
8 赤カブ	4.6	5.0	5.0	4.6
9 ナス	5.5	5.6	5.4	5.5
10 キュウリ	7.0	7.1	7.0	6.9
11 沢庵	5.3	5.5	5.2	5.3
12 野沢菜	8.0	8.1	8.0	8.0
13 茄子	4.9	4.9	5.2	4.9
14 キュウリ	7.2	8.2	8.1	7.0
15 沢庵	8.2	8.0	8.0	8.0
16 大根	4.8	5.1	4.8	4.6
17 沢庵	5.8	5.6	5.5	5.6
18 白菜	4.9	4.9	4.9	4.9
19 茄子	4.8	4.9	4.9	4.7
20 キュウリ	7.0	7.1	7.2	7.0
21 カブラ	4.9	4.8	4.7	4.7
22 白菜	7.2	7.0	7.0	7.0
23 白菜	7.9	8.0	7.1	7.9
24 キュウリ	8.2	7.9	8.1	8.2
25 沢庵	5.2	5.4	5.3	5.1
26 白菜	6.9	6.7	6.7	6.7
27 キュウリ	7.3	7.0	7.0	7.3
28 大根	5.8	5.7	5.2	5.7
29 赤カブ	5.3	5.4	5.2	5.3
(キムチ)				
30 白菜	6.4	6.4	6.2	6.4
31 大根	3.7	3.1	3.3	3.4
32 白菜	4.3	4.4	4.2	4.4
33 大根	3.7	3.1	3.1	3.5
34 白菜	5.0	5.0	5.4	5.0
35 白菜	4.9	5.2	5.1	4.9
36 大根	5.0	5.3	5.2	5.0
37 大根	4.3	4.0	3.9	4.0
38 白菜	3.5	3.3	3.4	3.4
39 大根	3.6	3.1	3.1	3.3

ペトリフィルム™を用いる食品中の乳酸菌の生菌数測定

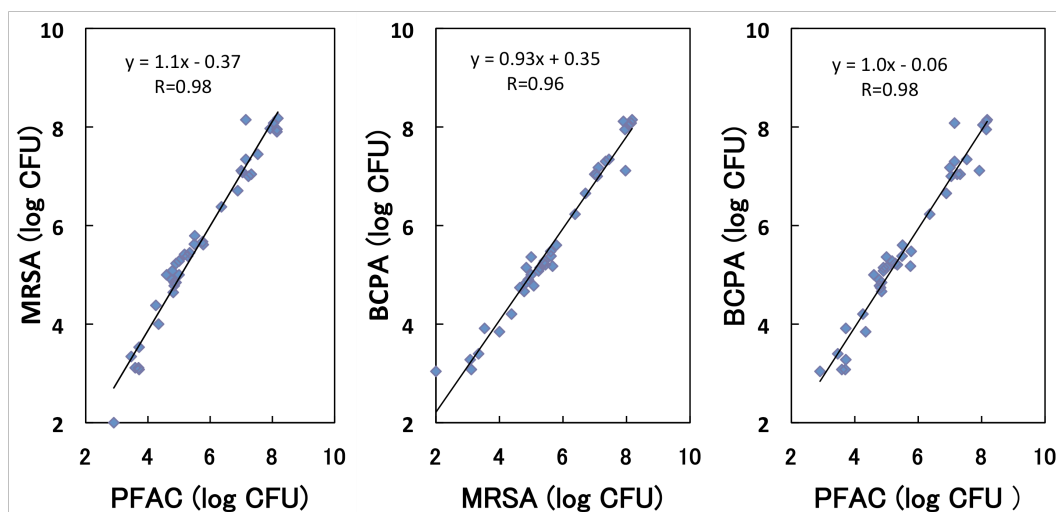


図1.異なる培地で測定した漬物中の乳酸菌生菌数の相関性

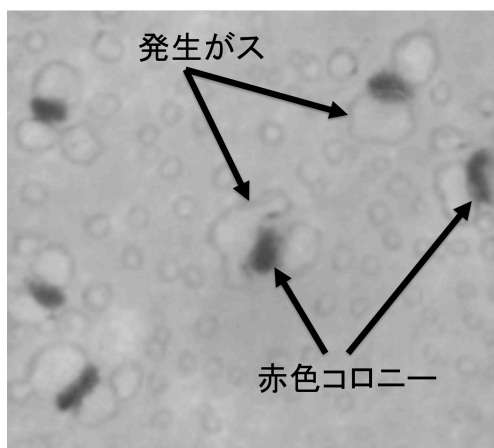


図2.PFACで観察されるガス産生菌

表4.発酵乳・乳飲料中の乳酸菌生菌数
試料生菌数(log CFU)

試料番号	PFAC	MRSA	BCPA
1	8.5	8.5	8.5
2	8.0	8.2	8.6
3	8.3	8.4	8.4
4	7.1	7.2	7.3
5	7.4	7.3	7.6
6	8.4	8.3	8.5
7	7.9	8.0	7.0
8	8.2	8.3	8.2
9	7.5	7.0	7.3
10	8.2	7.9	8.0
11	7.7	7.8	7.6
12	8.2	8.2	8.6
13	7.1	6.8	7.1
14	8.0	7.0	7.0
15	8.2	8.1	8.1
16	8.2	7.9	8.0
17	8.3	8.5	8.4
18	9.0	9.2	9.4
19	7.7	7.8	7.6
20	8.0	8.2	8.2
21	8.4	8.6	8.7
22	8.5	8.2	8.4
23	8.7	8.7	8.5
24	8.0	7.9	8.0
25	8.6	8.7	8.7
26	7.8	7.8	7.8
27	8.0	8.0	8.0
28	8.2	8.0	8.2
29	7.5	7.2	7.3
30	7.9	8.0	8.1

表3.食肉中の乳酸菌生菌数

試料番号	食肉	生菌数(log CFU)		
		PFAC	MRSA	BCPA
1	豚	8.8	8.7	8.5
2	鶏	5.2	4.8	5.1
3	牛	6.9	7.0	7.0
4	豚	4.4	4.5	4.5
5	牛	6.6	6.7	6.8
6	豚	3.9	3.9	3.8
7	豚	4.5	4.5	4.5
8	牛	6.9	6.8	6.9
9	豚	5.5	5.6	5.7
10	鶏	4.9	4.5	4.9
11	牛	5.5	5.9	5.9
12	豚	6.1	6.3	6.3
13	鶏	5.2	5.0	5.0

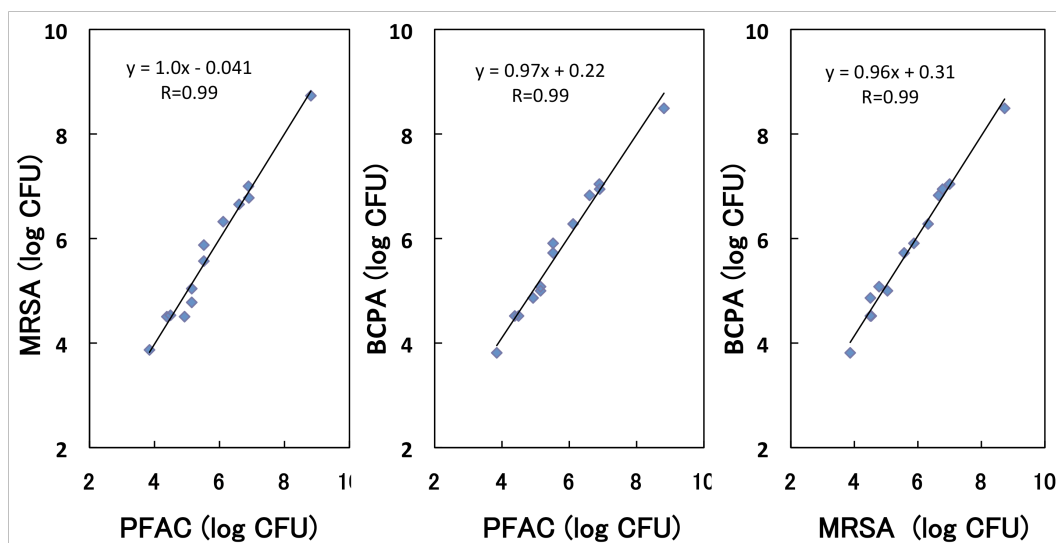


図 3.異なる培地で測定した肉類の乳酸菌生菌数の相関性

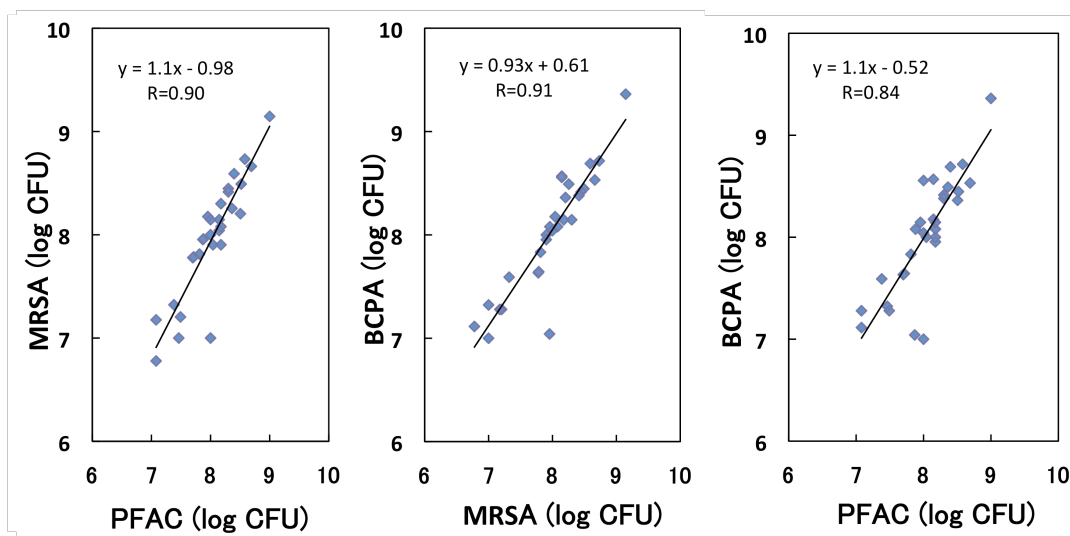


図 4.異なる培地で測定した乳酸菌飲料・発酵乳の乳酸菌生菌数の相関性

考察

食品中の乳酸菌数を 3 種類の培地を用いて測定した。食品としては乳酸菌の存在が知られている漬物・キムチ、食肉類、及び発酵乳・乳飲料を使用した。これらの食品に存在する標準的な乳酸菌として *L. plantarum*, *L. casei*, *L. animalis* を用いた。*L. plantarum* は乳酸生産量が多く、漬物の品質低下を引き起こす主要な乳酸菌であり、*L. casei* は乳製品や漬物に見られる主要乳酸菌で 15℃ 程度の冷温でも良く生育する⁷⁾。*L. animalis* は動物の小腸等から分離される乳酸

菌で肉類等にしばしば混入する⁸⁾。これら 3 種類の標準株を用いて、3 種類の培地で乳酸菌数を測定したところ、有意な違いは見られず、PFAC は乳酸菌測定に利用可能であると思われた。次に、漬物・キムチ中の乳酸菌数を測定したところ、PFAC は公定法の BCPA と同様の生菌数を示した。また、PFAC を用いて同時にガス産生菌を計測することも可能であった。漬物・キムチに関する消費者からの苦情の主要原因の一つはガス産生であり、これらの食品の微生物学的な品質管理に PFAC が極めて有効であると考えられた。食肉の乳酸菌測定では、3 種類何れの培地を用

いても、計測された乳酸菌数はほぼ同様であったが、乳酸菌飲料・発酵乳の乳酸菌数測定においては、試料によって結果に違いが見られた。試料番号7では、BCPAを用いた場合のみ、菌数が約一桁少ない結果となったが、BCPAは栄養要求製の高い乳酸菌の培養に適していない⁶⁾ためと考えられる。また、試料番号14では、PFACのみが他の培

地より一桁多い結果となったが、PFACを嫌気条件で使用しているため、嫌気性菌が生育したと推定される。顕微鏡観察において、ビフィズス菌特有の不定形細胞は観察されなかったため、嫌気性菌の詳細は不明である。しかし、全体として、PFACは食品の乳酸菌測定に有用であると考えられた。

文献

- 1) 日本食品衛生協会, 食品衛生検査指針(微生物編), 349-360 (2004).
- 2) 光岡知足, ヒトフローラ研究. 腸内細菌学雑誌, 19: 179-192 (2005).
- 3) Talwalkar, A. and Kailasapathy, K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. Int. Dairy J., 14:143-149 (2004).
- 4) Ashraf, R. and Shah, N.P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* in yoghurt - A review, Int. J. Food Microbiol., 149:194-208 (2011).

- 5) De Castele, S.V., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Assche, P.V., Swings, J., and Huys, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of *lactobacilli* and *bifidobacteria* in combination with yoghurt or cheese starters. Int. Dairy J., 16:1470-1476 (2006).
- 6) 厚生労働省, 食品衛生検査指針(微生物編), 日本食品衛生協会, 349-360 (2005).
- 7) 森地敏樹, 微生物の分離法, 各種微生物群, R&Dプランニング, 435-444 (2001).
- 8) Hayes1, M., Stanton1, C., Slattey1, H., O'Sullivan1, O., Hill, C., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. Casein Fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 Contains a Range of Novel Propeptide Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. Appl. Environ. Microbiol., 73:4658-4667 (2007).

論文受付 2011年12月16日
改訂論文受付 2011年12月19日
論文掲載受理 2011年12月20日