

## 細菌構成相解析によるアドバンスドサニタリーシステムの開発

富永達矢\*<sup>1</sup> 関根正裕\*<sup>2</sup>

### Development of the Bacterial Flora Based Advanced Sanitary System.

TOMINAGA Tatsuya\*<sup>1</sup>, SEKINE Masahiro\*<sup>2</sup>

#### 抄録

酸敗食品から乳酸菌が検出された際に、迅速に汚染源を特定するため、汚染源推定システムを開発した。酸敗食品から酸を産生する細菌を分離し、簡易同定を行ったところ、この食品は3種の細菌(*Leuconostoc citreum*・*Leuconostoc lactis*・*Weissella confusa*)に汚染されていることが分かった。PCRをベースにした3種の乳酸菌の検出法により、食品とその製造設備6ヶ所の乳酸菌構成相を調べた。構成相同士の類似性を数値分析手法により解析することにより、食品の汚染源は混合加工機であることが推定された。本研究により、大腸菌群の汚染源推定に成功したシステムが、乳酸菌による酸敗事故の原因究明にも適用できることが示された。

キーワード：食品衛生，乳酸菌，PCR，汚染源探索

## 1 はじめに

食生活の変化から、調理済み食品は近年増加の傾向にある。これらの食品の製造工程中には、加熱調理のプロセスがあり、それにより食品の衛生状態が保持されている。しかし、加熱調理から製品包装に至るまでの工程においては、常に種々の雑菌に汚染される危険性がある。

ある種の乳酸菌が食品に混入した結果、製品の容器膨張や酸敗、異臭・着色・粘質化が引き起こされた事例が、これまでに数多く知られている<sup>1)</sup>。このような事故が起きると、食品生産者は製品の回収や出荷停止などを余儀なくされ、早急に問題を解決する必要性に迫られる。しかし、乳酸菌は食品製造設備の様々な場所から分離されてくるので<sup>1)</sup>、どこから分離された乳酸菌が製品に混入し

たのか突き止め、その汚染源を除去するのに大きな困難が伴い、時間がかかっていた。

これまでの研究で、我々は食品の大腸菌群構成相とその製造環境の構成相とを比較照合することにより大腸菌群の汚染源の推定に成功した<sup>2)、3)</sup>。乳酸菌は、消費したブドウ糖に対して50%以上の乳酸を生成するカタラーゼ陰性のグラム陽性細菌と定義されており<sup>4)</sup>、大腸菌群と同様に様々な細菌の総称である。そこで、大腸菌群を対象とした汚染源探索手法が、乳酸菌を対象とした時も、適用できるのではないかと考えた。本研究では、食品とその製造設備の乳酸菌構成相を調べることにより、酸敗を引き起こした乳酸菌がどこから混入したのか突き止めるシステムの開発を目指した。

## 2 実験方法

### 2.1 乳酸菌の分離

酸敗した食品 1 g を 10 ml の滅菌生理食塩水に

\*<sup>1</sup> 北部研究所 生物工学部

\*<sup>2</sup> 生産技術部

懸濁し、ボルテックス処理を行った。また、食品製造設備表面の 10 cm × 10 cm に相当する面積をふきふきチェック（栄研器材）にて拭き取り、10 ml の滅菌生理食塩水に懸濁した。各々の懸濁液 0.1 ml を BCP プレートカウントアガール上に塗布し、30℃にて 24 時間培養を行った。培養後、生育したコロニーの周辺が酸の産生により黄変したものを移植棒にてピックアップした。

## 2.2 菌株同定試験

微生物株からDNAをISOPLANTキット(ニッポンジーン)を用いて抽出した。DNA ~500 ng、プライマーM27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3')、350R(5'-CTA CTG CTG CCT CCC GTA G -3')各々25 pmol、dNTPs 0.2 mM、ExTaq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ) 2.5 ユニットを混合し、PCR反応は 94℃(3 分)の後、94℃(30 秒)・60℃(30 秒)・72℃(30 秒)を 30 サイクル、最後に 72℃(5 分)の条件で行った<sup>5)</sup>。反応産物は 1.8%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて染色したのち、UVランプにてバンドの確認を行った。

## 2.3 DNA 解析試験

報告<sup>6)</sup>をもとに、*Leuconostoc citreum*、*Leuconostoc lactis*特異的PCRを行った。プライマーにはLcit-f (5'-AAA ACT TAG TAT CGC ATG ATA TC -3') Lcit-r (5'-CTT AGA CGA CTC CCT CCC G -3') Llac-f (5'-AGG CGG CTT ACT GGA CAA C -3') Llac-r (5'-CTT AGA CGG CTC CTT CCA T -3') をLcit-fとLcit-r、Llac-f とLlac-rを各々1 セットとして用いた。PCRの溶液組成は上記と同様とした。PCR反応は 94℃(5 分)の後、94℃(1 分)・60℃(1 分)・72℃(2 分)を 30 サイクル、最後に 72℃(10 分)の条件で行った。検出条件は上記同様とした。

## 3 結果及び考察

### 3.1 酸敗原因菌株の簡易同定

酸敗惣菜の原因と推定される細菌を、pH 指示薬をふくむ寒天培地を用いて 16 株分離し、それがどのような細菌であるか 16S rDNA の V1 領域

の塩基配列決定により調べた。その結果、*Leu. citreum*・*Leu. lactis*・*Weissella confusa* 各々の基準株と配列が 100%一致した細菌株が 10 株・4 株・2 株得られたことが分かり、この食品は 3 種類の乳酸菌に汚染されていたことが確認された。

### 3.2 細菌株特異的 PCR 法の検討

乳酸菌株構成相を調べるのに、全ての分離菌株の 16S rDNAの塩基配列決定を行うと、非常に労力がかかる。そこで、3 種類の乳酸菌株を簡易検出するための方法を検討した。*Leu. citreum*と*Leu. lactis*の種特異的PCRによる検出法はこれまでに報告されていた<sup>6)</sup>。そこで、その方法によりPCR反応を行ったところ、Lcit-fとLcit-rのプライマーセットでは*Leu. citreum*のみDNA増幅が確認され、Llac-f とLlac-rのプライマーセットでは*Leu. lactis*のみDNA増幅が確認された(図 1)。また、*Leu. citreum*と*Leu. lactis*の 16S rDNA V1 領域が 321 bpであるのに対し、*W. confusa*のそれは 349 bpであり、長さが異なっている。27bpの相違は電気泳動により検出され、これにより*W. confusa*をほかと区別して検出できることが分かった(図 1)。以上から、乳酸菌分離株が*Leu. citreum*、*Leu. lactis*と*W. confusa*のいずれの乳酸菌であるのか簡易に同定する手法が確立された。

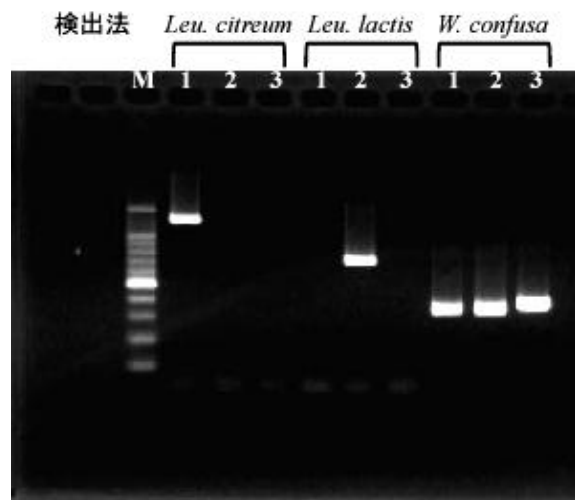


図1 乳酸菌株の種特異的な検出

M: マーカー, 1: *Leu. citreum*, 2: *Leu. lactis*, 3: *W. confusa* 各々のゲノムを鋳型に PCR 反応を行った。

### 3.3 乳酸菌汚染源の推定

乳酸菌汚染源推定のため、食品製造設備 6ヶ所から乳酸菌を 24 株ずつ分離し、1 株ずつ 3 組のプライマーセット (Lcit-f-Lcit-r)(Llac-f-Llac-r)(M27F-350R)で 3 回の PCR 反応を行い、3 種の乳酸菌のうちどの乳酸菌に該当するか調べた。いずれにも該当しない株は”不明”とした。同定結果をもとに、製造設備の乳酸菌構成相を計算した(表 1)。その結果、設備ごとに固有の構成相を有していることが分かった。この中で、どこが汚染源としての可能性があるのか調べるために、類似度を用いた数値分析を行い、製品と構成相が類似している設備の特定を行った(表 1)。その結果、混合加工機・成型機の類似度は各々0.93・0.83 と高い数値を示しており、これらの場所が汚染源であったものと推定された。

### 3.4 乳酸菌汚染経路の推定

製品を基準にした類似度計算により、汚染源を推定できた。しかし、本来、汚染というものは様々な場所が複雑に関連しており、点としてではなく流れとして捉える必要がある。そのようにしなければ、点としての汚染源を除去したとしても、さらに上流の汚染場所から汚染物がその場所に再度流れ込む可能性があり、根本的な解決にはつながらない。また、食品汚染を流れとして捉えれば、一見何の関係もなさそうな場所同士が実はリンクしていたというような新たな動線が見えてくる。そこで、汚染経路の探索を目的に、製造設備の構成相同士の類似度計算を行った(表 2)。その結果、(製品・混合加工機・成型機)が 1 つのグループになっており、(成型スクリュー・混合加工機シャフト・一時冷蔵室床・真空冷却機)が別のグループを形成していることが分かり、成型機 → 混合加工機 → 製品と汚染の流れが想定された。

本工場の乳酸菌の生育分布は大きく 2 つのグループに分かれた。製品に乳酸菌が混入するのを防ぐためには、そのうちの(製品・混合加工機・成型機)グループの清掃から行えばよいことが分か

表 1 食品とその製造設備の乳酸菌構成相

	<i>L.citreum</i>	<i>L.lactis</i>	<i>W.confusa</i>	不明	類似度
製品	63	25	13	0	/
成型機	63	4	0	33	0.83
成型スクリュー	4	17	0	79	0.12
混合加工機	79	8	0	13	0.93
混合加工機シャフト	13	0	0	88	0.13
一時冷蔵室床	0	0	0	100	0.00
真空冷却機	0	0	0	100	0.00

数字は各々の細菌の存在比(%)。

表 2 食品から分離された乳酸菌の汚染源推定

	製品	成型機	成型スクリュー	混合加工機	混合加工機シャフト	一時冷蔵室床
製品	/	/	/	/	/	/
成型機	0.83	/	/	/	/	/
成型スクリュー	0.12	0.52	/	/	/	/
混合加工機	0.93	0.94	0.22	/	/	/
混合加工機シャフト	0.13	0.59	0.97	0.29	/	/
一時冷蔵室床	0.00	0.47	0.98	0.16	0.99	/
真空冷却機	0.00	0.47	0.98	0.16	0.99	1.00

数値は各々の設備間の構成相の類似度

製品から分離された *Leu. citreum* の割合を  $x_1$ , *Leu. lactis* の割合を  $x_2$ , *W. confusa* の割合を  $x_3$  とし、製造設備から分離された *Leu. citreum* の割合を  $y_1$ , *Leu. lactis* の割合を  $y_2$ , *W. confusa* の割合を  $y_3$  とし、類似度を以下の式により計算した。

$$\text{類似度} = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

った。本技術を用いると、このように優先順位をつけた清掃ができるため、大幅な時間・費用・労力の軽減につながる。

本研究の食品の汚染は *Leu. citreum* が汚染の主要菌相を占めており、*Leu. lactis* が第 2 菌相、*W. confusa* が第 3 菌相を占めていた。これらの 3 種の乳酸菌は、ソーセージやハム、調理済み食肉などの様々な食品の汚染原因として報告されている<sup>7)~10)</sup>。これらの食品や乳酸菌汚染に困っている様々な食品<sup>1)</sup>の解決策として、今回開発したシステムが貢献できると期待される。

今後検討すべき点は以下のとおりである。食品製造設備からは、”不明”の画分に入る菌株が多数分離された。特に、一時冷蔵室床や真空冷却機の全ての分離株が *Leu. citreum*、*Leu. Lactis*、*W. confusa* いずれにも分類されないものであった。そのうちのいくつかについて、16S rDNA の V1 領域を調べてみると、*Lactococcus lactis* や *Lactococcus garvieae* であることが分かった。類

似度計算では、“不明”の画分を1つのものとして扱っており、設備間同士の計算で、本来よりも高い類似度の数値が計算されている可能性がある。今後は、“不明”の画分に分類された *Lc. lactis* や *Lc. garvieae* に対する新たな種特異的 PCR プライマーを開発し、“不明”画分に分類される細菌の数を減らしていく必要がある。

#### 4 まとめ

- (1)酸敗食品から分離された乳酸菌株を 16S rDNA の V1 領域から同定を行ったところ、3 種の乳酸菌が食品を汚染していたことが分かった。
- (2)種特異的 PCR 法及び 16S rDNA の V1 領域の長さの相違に基づいた方法で、3 種の乳酸菌について、塩基配列決定を行うことなく、同定する手法を確立した。
- (3)食品と食品製造設備 6 ヶ所の乳酸菌構成相を調べ、その比較照合により、汚染源ならびに汚染経路の推定に成功した。

#### 謝辞

本研究を御指導いただきました東京大学大学院農学系研究科小柳津広志教授に深謝致します。

#### 参考文献

- 1) 内藤茂三: 乳酸菌による食品の変敗現象とその防止対策, 醤研, **33**(2007)257.
- 2) 富永達矢、本多春樹、関根正裕: 食品製造工程における微生物検出技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **4**(2006)72.
- 3) 富永達矢、本多春樹、関根正裕: 食品製造工程における微生物検出技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **5**(2007)66.
- 4) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針微生物編, (2004).
- 5) 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 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa., Int. J. Syst. Bacteriol.,

**47**(1997)54.

- 6) Lee, H.-J., Park, S.-Y., and Kim, J.: Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species., FEMS Microbiol. Lett., **193**(2000)243.
- 7) Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., and Morita, H.: Behavior of psychotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products., Appl. Environ. Microbiol., **69**(2003)3668.
- 8) Paludan-Mueller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H., and Gram, L.: Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5°C., Int. J. Food Microbiol. **39**(1998)155.
- 9) Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H., and Bjoerkroth, J.: Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”, Int. J. Food Microbiol., **97**(2005)285.
- 10) Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V., and Debevere, J.: In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products., J. Appl. Microbiol., **98**(2005)33.