

## 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 (2)

富永達矢\*<sup>1</sup> 関根正裕\*<sup>2</sup>

### Development of the Bacterial Flora Based Advanced Sanitary System(2)

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

抄録

食品から芽胞が検出された際に、迅速な汚染源推定が可能なシステムの開発を検討した。醤油麴とその製造設備表面から分離された芽胞菌のRandom Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)パターンを4工場で調べたところ、A工場では18、B工場では10、C工場では21、D工場では36のRAPDパターンが得られた。各々のRAPDタイプの代表株の16S rRNA遺伝子の配列から、8種のバチルス属細菌、バチルス属近縁菌が同定された。醤油麴とその製造設備表面の芽胞菌フローラ間の類似度計算を行い、各々の工場において、汚染源の候補をしぼりこむことができた。さらに、芽胞菌フローラの簡易分析キットの開発のために、今回分離された芽胞菌の表現形質の比較を行った結果、糖発酵性や酵素活性の相違点を見出した。

キーワード：食品衛生， 孢子， PCR， 汚染源探索

#### 1 はじめに

多くの食品は、加熱調理のプロセスにより、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。

バチルス属細菌やクロストリジウム属細菌は、芽胞を形成する。芽胞の混入した食品が、その発芽条件に適した環境下に置かれると、芽胞菌は発芽・増殖する。その結果、食品のタンパク質やデンプンが分解され、異臭や粘質物などが生成されるに至る<sup>1),2)</sup>。そこで、食品生産者は、このような変敗食品が検出されると、早急に芽胞の混入源を突き止め、汚染を除去する必要性に迫られる。

しかし、芽胞は、乾燥や高温など様々な環境ストレスに対して抵抗力を示し、非常に広範な食品製造環境から分離される<sup>1),2)</sup>。また、加熱調理のプロセスを経ても生残することもあるので、食品の混入源となった場所を特定するのに大きな困難が伴っていた。

我々はこれまでに、食品の大腸菌群フローラとその製造環境のフローラとを比較照合することにより、大腸菌群汚染源の推定を試みた<sup>3),4)</sup>。また、乳酸菌を対象としても同様の手法で、汚染源の推定を行った<sup>5)</sup>。芽胞菌も大腸菌群や乳酸菌と同様に、様々な細菌属種の総称である。そこで、これまでに開発した汚染源探索手法が、芽胞菌を対象とした場合にも適用できるのではないかと考えた。

本研究では、醤油製造工程を例にとり、醤油麴とその製造設備の芽胞菌フローラを調べ、芽胞菌が製造設備のどこから醤油麴に混入したのか突き

\*<sup>1</sup> 北部研究所 生物工学部

\*<sup>2</sup> 生産技術部

止めるシステムの開発を目指した。

## 2 実験方法

### 2.1 耐熱性芽胞菌の分離

醤油麹 10 g を 90 ml の滅菌生理食塩水に懸濁し、ストマッカーにて懸濁処理を行った。また、食品製造設備表面の 10 cm × 10 cm に相当する面積を拭取り試験用滅菌麵棒（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 0.5 ml を 80°C にて 10 分間、加熱処理した。処理後の溶液を Brain Heart Infusion Agar (Oxoid) 上に塗布し、30°C にて 24 時間、好気条件下、培養を行った。培養後、生育したコロニーを芽胞菌として分離した。

### 2.2 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) 分析

文献をもとに行った<sup>4),6)</sup>。分離株から 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(5'-ACG CGC CCT -3') 50 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 は 94°C(5 分)・37°C(5 分)・72°C(5 分)を 4 サイクル行ったのち、94°C(1 分)・37°C(1 分)・72°C(2 分)を 30 サイクル、最後に 72°C(10 分)の条件で行った。反応産物は 1.2%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 菌株同定試験

以前の報告と同様に行った<sup>7)</sup>。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°C(3 分)の後、94°C(30 秒)・60°C(30 秒)・72°C(30 秒)を 30 サイクル、最後に 72°C(5 分)の条件で行った。反応産物は塩基配列の決定に供した。解析された塩基配列は、相同性検索を行い、100%の相同性を示した菌株名を分離株の種名と推定した。

### 2.4 表現形質試験

ラピッド 20(ピオメリュー)を用いた。手法はマニュアルに従った。培養した菌株を 0.85%の滅菌食塩水に懸濁し、その溶液をプレートへ接種した。プレートは 37°C にて 4 時間培養し、結果を解析した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 芽胞菌の RAPD 分析

図 1 に醤油麹の製造フローを示す。原料である大豆は蒸煮され、小麦は高温で炒られて殺菌される。したがって、醤油麹から分離される芽胞菌は、加熱処理後のいずれかの工程において、混入したものと考えられる。そこで、醤油工場の様々な設備表面および醤油麹から分離された芽胞菌株の RAPD 分析を行った(図 2 に例示)。分離株は様々なパターンを示したが、一部は類似性の高いパターンを示し(図 2、レーン 1, 2, 3, 5)、同一の細菌株であると推定された。A 工場では 18 種、B 工場では 10 種、C 工場では 21 種、D 工場では 36 種の RAPD パターンが得られた。

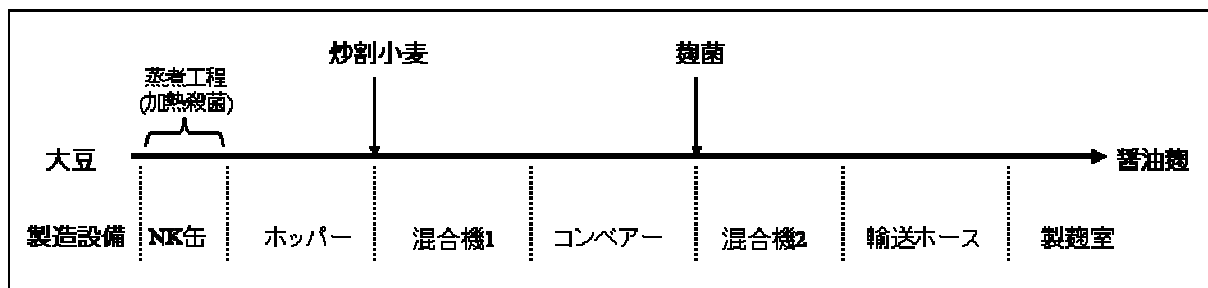


図 1 醤油麹の製造工程

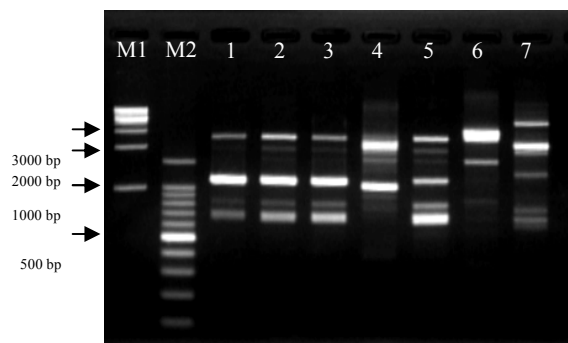


図2 RAPD 分析  
M1, M2: マーカー, 1~7: 分離株。

### 3.2 芽胞菌のフローラ分析

前述の各 RAPD パターンの代表株について、16S rRNA 遺伝子の V1 領域を解析し、推定された各所のフローラを表 1 に示す。*Bacillus subtilis* (または *Bacillus amyloliquefaciens*) 及び *Bacillus thuringiensis* は全ての工場から分離され、醤油工場に存在する一般的な芽胞菌であることが示唆された。この傾向はこれまでに知られていた報告に沿う<sup>8)~10)</sup>。しかし、工場によっては、*Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus* 及び *Paenibacillus amylolyticus* など、多様な芽胞菌株が分離された。

### 3.3 芽胞菌汚染源の推定

醤油麹に混入した芽胞菌の汚染源を推定するために、醤油麹の芽胞菌フローラを基準として、類似度の計算<sup>4),5)</sup>を行った(表 2)。A 工場については、混合機 1 ならびにコンベアーは、汚染源としての可能性が除外され、ホッパーまたは製麹室が汚染源であろうと推定された。B 工場については、混合機 1 またはコンベアーが汚染源ではないかと考えられた。C 工場については、コンベアーが最も高い類似度を示した。D 工場については、混合機 1 及び製麹室で高い類似度を示し、これらの場所が汚染源ではないかと推定された。4 工場ともに製造工程はほとんど同一であるが、汚染源と考えられた場所は、工場により相違した。

表 1 芽胞菌のフローラ解析

(A) A工場				
場所	株数	内訳	割合	16S
ホッパー	21	21	100%	<i>B. thuringiensis</i>
混合機1	20	20	100%	<i>B. subtilis</i>
コンベアー	21	21	100%	<i>B. subtilis</i>
製麹室	20	18	90%	<i>B. thuringiensis</i>
		2	10%	<i>B. flexus</i>
		13	59%	<i>B. thuringiensis</i>
		6	27%	<i>B. megaterium</i>
		2	9%	<i>B. flexus</i>
		1	5%	<i>B. licheniformis</i>
(B) B工場				
場所	株数	内訳	割合	16S
混合機1	4	4	100%	<i>B. subtilis</i>
コンベアー	9	9	100%	<i>B. subtilis</i>
製麹室	18	11	61%	<i>B. thuringiensis</i>
		5	28%	<i>B. subtilis</i>
		1	6%	<i>B. flexus</i>
		1	6%	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
醤油麹	4	3	75%	<i>B. subtilis</i>
		1	25%	<i>B. thuringiensis</i>
(C) C工場				
場所	株数	内訳	割合	16S
混合機1	1	1	100%	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
コンベアー	7	3	43%	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
		3	43%	<i>B. thuringiensis</i>
		1	14%	<i>B. subtilis</i>
製麹室	23	1	4%	<i>B. subtilis</i>
		22	96%	未同定
醤油麹	6	5	83%	<i>B. subtilis</i>
		1	17%	<i>B. thuringiensis</i>
(D) D工場				
場所	株数	内訳	割合	16S
ホッパー	15	6	40%	<i>Bacillus thuringiensis</i>
		5	33%	<i>Bacillus subtilis</i>
		1	7%	<i>Bacillus megaterium</i>
		3	20%	未同定
混合機1	14	7	50%	<i>Bacillus subtilis</i>
		1	7%	<i>Bacillus megaterium</i>
		6	43%	未同定
製麹室	15	7	47%	<i>Bacillus subtilis</i>
		3	20%	<i>Bacillus thuringiensis</i>
		5	33%	未同定
醤油麹	14	8	57%	<i>Bacillus subtilis</i>
		1	7%	<i>Bacillus pumilus</i>
		1	7%	<i>Bacillus thuringiensis</i>
		4	29%	未同定

今回の研究では、汚染源の場所の候補をしぼりこむことはできた。しかし、大腸菌群や乳酸菌を対象とした過去の汚染源推定試験と比較して<sup>3)~5)</sup>、今回の試験では明確な汚染源を特定することができなかった。その要因としては、拭取り検査 1 ヲ所あたりの分離株の数の少なさが挙げられる。これまでは、1 ヲ所あたり数 10~200 株の解析を行い、フローラを得ていた。しかし、今回は、場所によっては数個のコロニーしか得られなかった。この数でフローラ分析を行うと、1 株の細菌がフローラに占める構成比が高くなり、解析した場所のフローラを適正に捉えることができな

表2 芽胞菌汚染源の推定

	A工場	B工場	C工場	D工場
ホッパー	0.90	/	/	0.76
混合機1	0.00	0.95	0.00	0.95
コンベアー	0.00	0.95	0.36	/
製麹室	0.91	0.68	0.04	0.96

数値は類似度の値を示す。

かったと考えられる。芽胞菌の汚染源推定にあたっては、食品製造設備表面の拭取り面積を 10 cm × 10 cm よりも大幅に広くとる必要があると考えられる。

### 3.4 芽胞菌の表現形質の差異

これまで、フローラ解析の手法として、高精度な細菌同定が可能である DNA 分析を用いた結果を示した。しかし、この手法は分析に時間と労力を要するため、多検体の処理には適さない。そこで、既報<sup>3),4)</sup>と同様、プレート上で芽胞菌フローラ分析を行うために、分離株について、各酵素の活性や各糖の発酵性を調べた(表3)。*P. amylolyticus* と *L. sphaericus* を *B. subtilis*、*B. thuringiensis* と区別するのは、D-ラフィノース(RAF)やブドウ糖(GLU)の発酵性から、容易であることが示唆された。また、白糖の発酵性は *B. subtilis* (+)、*B. thuringiensis* (-)であり、VP 試験は *B. subtilis* (+)、*B. thuringiensis* (-)であることから、これらの項目を用いれば、*B. subtilis* と *B. thuringiensis* を区別できる可能性が示唆された。

表3 分離芽胞菌の表現形質

分離源 種名	混合機1 <i>P. amylolyticus</i>	コンベアー <i>L. sphaericus</i>	コンベアー <i>B. thuringiensis</i>	醤油麹 <i>B. subtilis</i>	醤油麹 <i>B. thuringiensis</i>	醤油麹 <i>B. subtilis</i>
ONPG	+	-	-	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	+	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-
PPA	-	-	-	-	-	-
MNT	-	-	-	-	-	-
ESC	+	-	-	-	+	-
ARA	+	-	-	+	-	-
XYL	+	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-
CEL	+	-	w	-	w	w
MEL	+	-	-	-	-	-
SAC	+	-	-	+	-	+
TRE	+	-	+	+	+	-
RAF	+	-	-	-	-	-
GLU	+	-	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	+	-	+

+: 酵素活性または糖発酵性がみられたもの, w: 活性が弱かったもの, -: 活性がみられなかったもの。

さらに、β-ガラクトシダーゼの活性(ONPG)、ウレアーゼの活性(URE)、β-グルコシダーゼの活性(ESC)や L-アラビノースの発酵性(ARA)は、*B. subtilis* の株間、*B. thuringiensis* の株間で異なっており、これらの項目を用いれば、同じ種内でグループの細分化が可能であると示唆された。

### 4 まとめ

- (1)醤油麹及びその製造設備表面から分離された芽胞菌株について、RAPD 分析を行ったところ、RAPD パターンの異なる菌株が A 工場では 18 種、B 工場では 10 種、C 工場では 21 種、D 工場では 36 種得られた。
- (2)上記芽胞菌株について、16S rRNA 遺伝子解析を行ったところ、8 種のバチルス属細菌、バチルス属近縁菌が同定された。
- (3)醤油麹とその製造設備表面の芽胞菌フローラの類似度計算を行い、汚染源の候補をしぼりこむことができた。
- (4)分離されたバチルス属細菌について、糖発酵性や酵素活性の相違点を見出した。

### 謝辞

サンプリングを行わせていただいた各企業の皆様に深謝致します。

### 参考文献

- 1) 内藤茂三: バチルス属細菌による食品の変敗と防止技術, 醬研, 34(2008)21.
- 2) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針微生物編, (2004).
- 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, 4(2006)72.
- 4) 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.
- 5) 富永達矢、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, 6(2008)74.

- 6) Barrangou, R., Yoon, S.-S., Breidt, F., Jr., Fleming, H. P. and Klaenhammer, T. R.: Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation., Appl. Environ. Microbiol., **68** (2002)2877.
- 7) 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.
- 8) 関根一男、重田敏右: 醤油製造工程に存在する *Bacillus* 属細菌について, 醤研, **13**(1987)149.
- 9) 高實繁、遠藤隆史、信太治、田上秀男、高木広明、門脇清: 醤油麹に存在する *Bacillus* 属細菌の醤油製造に及ぼす影響(第1報), 醤研, **24**(1998)77.
- 10) 亀倉正博: 醤油の製造と耐塩性・好塩性微生物, 醤研, **31**(2005)273.