

イムノクロマト試験紙によるパン種微生物叢のモニター技術の開発

＜公益財団法人 飯島藤十郎記念食品科学振興財団2019年度助成＞

富永達矢*

Development of a monitoring method of sour-dough microflora by the immunochromatographic strip

TOMINAGA Tatsuya*

抄録

サワー種中の乳酸菌を迅速に検出可能なイムノクロマト試験紙を開発した。3種類の市販サワー種に生育している乳酸菌の種類を調べたところ、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus sanfranciscensis*が検出された。各々の乳酸菌を検出する試験紙を用意し、特異性を調べたところ、*L. sanfranciscensis*を検出する試験紙が高い特異性を示した。小麦粉への添加試験の結果から、 1×10^7 cfu/g以上の*L. sanfranciscensis*が生育しているときにこの試験紙で検出できることが分かった。

キーワード：乳酸菌，試験紙，検出，サワー種

1 はじめに

近年、風味の豊かさから、サワー種をベースにしたパンの消費が急速に拡大している。小麦粉やライ麦粉に水を加え、混捏後に放置すると、粉や環境由来の微生物が繁殖する。このとき、酵母菌や乳酸菌が存在すると生地が発酵が始まり、サワー種になる。パン製造現場では、発酵が進んだサワー種の一部をとり、数日に一度、小麦粉や水を継ぎ足して種を継代している(種継ぎ)。

種継ぎでは、もとの種の乳酸菌を新たな種で繁殖させることが求められる。この過程において、雑菌が増殖して乳酸菌の生育が抑制されると、種から異臭がするようになり、その種はやがて使用できなくなる。そこで、サワー種中の乳酸菌数をモニターし、その数が減少する兆候がみられた場合、種継ぎの際に種と小麦粉の配合を調整することで安定的な乳酸菌の生育を維持している。モニ

ター法としては、寒天培地を用いた培養法が知られるが、結果を得るまでに2日以上も要する。また、近年、PCR法に基づく手法が開発されたが²⁾³⁾、この技術を用いても測定に数時間を要する。乳酸菌数は刻一刻と変化するため、測定時間のさらなる短縮が望まれている。

そこで、本研究では、迅速に乳酸菌を検出可能なイムノクロマト試験紙の開発を試みた。

2 実験方法

2.1 試験に用いた菌株

乳酸菌 21 株、酵母菌 3 株、小麦粉分離菌 8 株を用いた。これらの株は MRS、PDA、BHI 培地にて培養した。

2.2 試験紙の構築

乳酸菌 *Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus sanfranciscensis*、を検出する 3 種類の試験紙(以降、Lbr、Lpl、Lsa)を構築

* 食品・バイオ技術担当

した。

2.3 添加試験

小麦粉 5 g に滅菌水を 5 ml 混ぜ、菓さじで混捏した。そこに適当な濃度になるよう調製した *L. sanfranciscensis* A1 懸濁液を添加し、さらに菓さじでこねたのち 1 g を分取し、9 ml の滅菌済み PBS 緩衝液に懸濁した。その溶液を試験紙に展開した。

3 結果及び考察

3.1 市販サワー種の分析

市販サワー種を 3 種類用意し(市販品 A、B、C)、これらから乳酸菌を分離し、属種の簡易同定を試みた。市販品 A からは *L. sanfranciscensis* が 100%(10 株/10 株)、市販品 B からは *L. brevis* が 54%(7 株/13 株)、*L. plantarum* が 46%(6 株/13 株)、市販品 C からは *L. sanfranciscensis* が 100%(10 株/10 株)の乳酸菌が分離された。

3.2 試験紙の構築

イムノクロマト Lbr では、想定どおり、*L. brevis* のみ検出した(表 1)。Lpl では、*L. plantarum* のみならず、多くの乳酸菌と交差反応を示した。Lsa では、1 株の *L. plantarum* と弱い交差反応を示したが、それ以外の交差反応は確認されず、*L. sanfranciscensis* を明瞭に検出した。

小麦粉分離株との交差反応性を調べた(表 1)。Lsa では交差反応はみられなかった(0 株/8 株)のに対し、Lbr では 13% (1 株/8 株)、Lpl では 38% (3 株/8 株)で交差反応を示した。

上記特異性の試験結果から、以降、特異性が高い Lsa について試験を進めた。

3.3 イムノクロマト Lsa の性能

4 株の *L. sanfranciscensis* を用い、検出感度を調べた。*L. sanfranciscensis* A1、A2 では 1×10^4 cfu/test、*L. sanfranciscensis* C1 では 1×10^5 cfu/test、*L. sanfranciscensis* NBRC111534^T では 1×10^6 cfu/test 以上の菌濃度で対象を検出できた。

サワー種には、微生物以外に、小麦粉が多量に

存在する。こうしたマトリックス中であっても、溶液が試験紙上に正常に展開され、培養液を展開したときと同等の感度を示すか調べた。その結果、 1×10^8 cfu 以上の *L. sanfranciscensis* A1 を添加した区分($\geq 1 \times 10^7$ cfu/g)から検出できた。これは $\geq 1 \times 10^4$ cfu/test に相当し、培養液を試験紙に展開したときと同等の感度を達成することができた。以上の結果から、特段の精製工程を要せずにサワー種中の乳酸菌を検出し得ることが分かった。

表 1 試験紙の特異性

	Lbr	Lpl	Lsa
<i>Lactobacillus brevis</i>	3/3	3/3	0/3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0/3	3/3	1/3
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	0/4	4/4	4/4
上記以外の乳酸菌	0/11	11/11	0/11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0/3	0/3	0/3
小麦粉分離菌	1/8	3/8	0/8

陽性を示した株数 / 試験を実施した株数

4 まとめ

(1) 市販サワー種の分析

市販品から 3 種類の乳酸菌が分離された。

(2) 試験紙の構築

L. sanfranciscensis を特異的に検出できた。

(3) 性能試験

小麦粉に 1×10^7 cfu/g 以上の *L. sanfranciscensis* が存在するときに本試験紙で検出可能となった。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御指導いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科の石井正治教授に感謝の意を表します。なお、本研究は飯島藤十郎記念食品科学振興財団の 2019 年度助成を受けて実施したものです。

参考文献

- (1) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編, (2015)
- (2) Ventimiglia, G., Alfonzo, A., et al.: Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation, Food Microbiol. **51**,

(2015)57.

- 3) Robert, H., Gabriel, V., et al.: Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **135**, (2009)53.