

プレート MPN 法を用いた食品素材中の菌数測定について

大阪職業能力開発短期大学校 登 成 健之介

Application of the Plate MPN Technique for Bacteria Counting in Food Materials

kennosuke TONARI

要約 菌数測定法の一手法として知られるプレート MPN 法について、その適用性をそば粉、小麦粉のような食品素材を例にとり食品の菌数管理項目である一般生菌数、耐熱性菌数、大腸菌群に関して従来の平板培養法と比較検討した。また、乳酸菌飲料については乳酸菌用培地（BCP 加寒天培地）他、一般生菌用培地（標準寒天培地）について菌数比較を実施し、両培地を通じて本法の適用性を確認した。

I 緒言

菌数規格は食品業界において重要な管理項目の一つで、手段として用いる菌数測定法はその簡易化、迅速化が求められ、各種方法の検討や機器の開発がなされている⁽³⁾。

しかし、これら検討されたものは高価な機器であったり、特殊な方法で用途が制限されたりし、従来の平板培養法と比較されたりすると菌数差が生じるなど実用面で問題を残すものである。

このような状況下、著者は Tan⁽¹⁾らが考案したプレート MPN 法に着目し、その適用性を通常、食品で問題となる一般生菌数、耐熱性菌数、大腸菌群および参考として乳酸菌について検討した。プレート MPN 法は MPN 法を寒天板上に適用したもので、通常の平板培養法に比べプレートや培地の節減、集落数をカウントする手間が省けるなど利点が多く、乳酸菌、大腸菌等の特定菌種および生乳、乳酸菌飲料等についてはよく検討されている方法^{(1),(2)}であるが、その他の食品の生菌数については検討されていない状況である。

著者は小麦粉、そば粉等の食品素材を対象として、本法がどの程度生菌数の測定に適用できるか検討し、また、乳酸菌飲料について本法の適用性を乳酸菌用培地（BCP 加寒天培地）と一般生菌用培地（標準寒天培地）について比較検討したので報告する。

II 実験材料および方法

1. 供試試料

市販そば粉（北海道産、平成6年6月29日製造）および小麦粉（薄力粉、平成5年9月18日製造）を用いた。また、入手可能であった市販乳酸菌飲料5種を乳酸菌測定用試料として供した。

2. 菌数測定法

2.1 平板培養法（プレートカウント法、PLC法）

2.1.1 一般生菌数は公定法⁽⁴⁾に準じ、試料（そば粉、小麦粉）10gを生理食塩水100mlで分散させたものを原液とし、この1mlを生理食塩水9mlで希釈し（10倍希釈液）、次にその1mlをまた生理食塩水9mlで希釈する（100倍希釈液）というように、順次十進希釈した試料希釈列を作成し、コロニー数が一平板上30～300個になるように適当な希釈段階の試料液1mlを標準寒天培地（日水製薬⁽⁵⁾製）15mlに混積後、固化させ、35～7℃、48時間培養して生育したコロニー数を計測した。

2.1.2 耐熱性菌数については上記試料原液を75℃、15分加熱後、一般生菌数測定方法（2.1.1）と同様、試料の十進希釈列を作成し、カウントしやすい適切な希釈試料液1mlを標準寒天培地15mlと混積固化、35～7℃、48時間培養後のコロニー数を計測した。

2.1.3 大腸菌群についてはデソキシコレート寒天培地（日水製薬^(株)製）を用いる他、一般生菌数測定法（2.1.1）と同様操作し、混積固化させた培地に同培地をさらに薄く重層し、35～6℃、24時間培養後の生育した赤色コロニーを計測した。

2.1.4 乳酸菌飲料の乳酸菌測定は市販乳酸菌飲料 1 ml を順次生理食塩水で十進希釈し、10～10⁸までの希釈列を作成し、コロニー数が一平板上30～300個になるよう適当な希釈段階の試料液 1 ml をBCP加寒天培地（乳酸菌測定用培地、日水製薬^(株)製）15 ml と混積固化後、同培地を薄く重層し、35℃、72時間後の黄変コロニー数を計測した。また、BCP加寒天培地の代わりに、一般生菌に広く用いられる標準寒天培地を用いて、両培地における乳酸菌数の比較をした。

2.2 プレートMPN法（PLMPN法）

Tan⁽¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、十進希釈段階で調整した上記希釈試料液をマイクロピペットで一希釈段階につき10 ul ずつ、各寒天培地の指定された箇所（シャーレ裏に、一希釈段階につき3箇所のスポット場所を印しておく）に接種し、クリーンベ

ンチ内でスポット部分が垂れないよう培地表面をほぼ乾燥後、前述の各菌の培養方法に従って、培養した。

培養後、コロニーの発生の有無を観察し、発育が認められた箇所の数を記録し、3本式MPN表にて、MPN値を求めた。

III 実験結果および考察

小麦粉の場合、一般生菌数、耐熱性菌数、大腸菌群共プレートMPN法では300個/g以下であり、平板培養法でも0～70個/gで菌数が少ないため、以下のPLMPN法およびPLC法の相関関係および分散分析による有意差検定を省略した。

(1) そば粉におけるPLMPN法とPLC法の比較

測定結果を表-1に示す。数値はいずれも実測値の対数をとっている。

表-1より、PLMPN法とPLC法の一般生菌数、耐熱性菌数および大腸菌群についての相関係数(r)はそれぞれ0.875、0.722および0.850であった。

一方、分散分析による有意差検定（F検定）を実施し、その結果を表-2に示す。

表-1 そば粉におけるPLMPN法とPLC法の菌数比較

一般生菌数 (n=5)		耐熱性菌数 (n=6)		大腸菌群 (n=4)	
PLMPN法	PLC法	PLMPN法	PLC法	PLMPN法	PLC法
5.18	4.46	3.88	3.62	4.18	4.88
5.36	4.42	3.18	3.46	4.18	5.04
4.95	3.83	3.36	3.28	3.95	3.76
4.95	4.04	3.63	3.56	3.60	3.76
5.18	4.30	3.85	3.85	—	—
—	—	3.60	3.40	—	—

菌数値はLog₁₀実測菌数値として表示

表-2 そば粉の各菌数における分散分析表

	一般生菌数				耐熱性菌数				大腸菌群			
	平方和	自由度	平均平方	F 比	平方和	自由度	平均平方	F 比	平方和	自由度	平均平方	F 比
要因 (方法)	2.089	1	2.089	40.71*	0.0091	1	0.0091	0.159	0.2927	1	0.2927	1.046
残差	0.410	8	0.051		0.570	10	0.0570		1.6781	6	0.2797	
全体	2.499	9			0.5791	11			1.9708	7		

* 1%レベルで有意差あり

表一2より、一般生菌数の場合を除いて、耐熱性菌数および大腸菌群は5%レベルで有意差なしと考えられた。尚、一般生菌数の有意差検定で有意差を生じた原因として、耐熱性菌は加熱により生育できる菌が淘汰され、大腸菌群はデソキシコレート培地によりグラム陽性菌の生育が阻止される等でこれらの菌は割合菌の科、属が一定していると予測できるのに対して、一般生菌は各種菌の存在が予測され、互いの生存競争で培養中に生育差が生じることが、両方法の菌数差に影響を与え、有意差を生じたと考えられる。

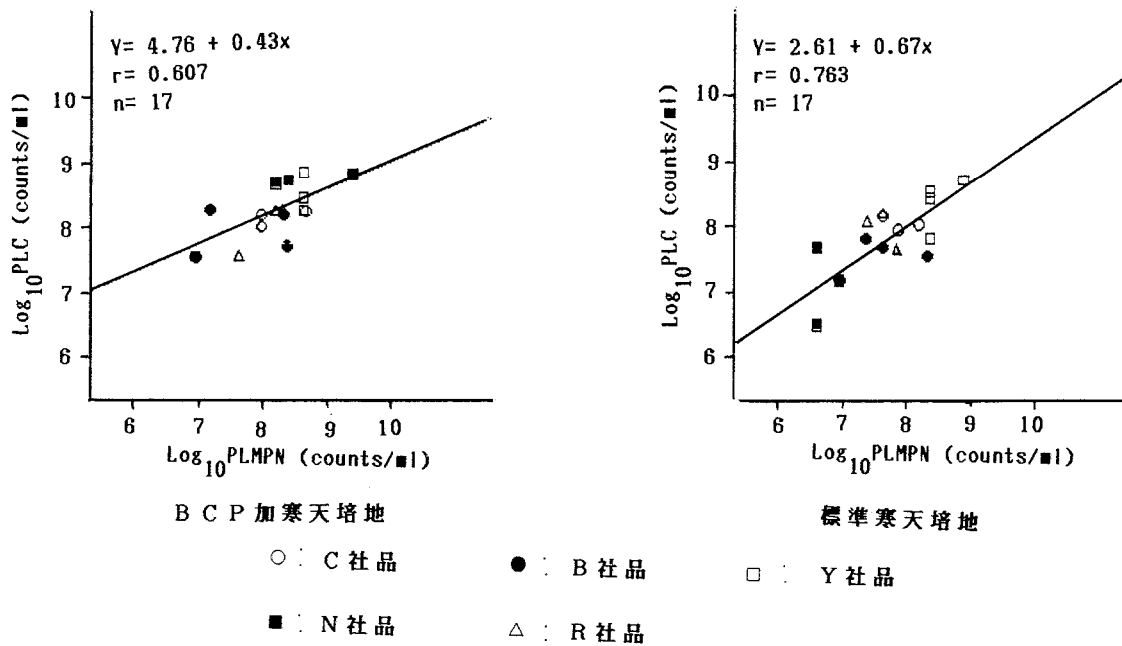
(2) 乳酸菌飲料におけるPLMPN法とPLC法の比較

次に、乳酸菌の場合、PLC法の代わりにPLMPN法が充分適用されるとしており^{(1),(2)}、市販乳酸菌飲料を対象に乳酸菌用培地であるBCP加寒天培地と一般生

菌用培地として知られる標準寒天培地の両方で菌数測定を実施した。両培地における両方法の相関関係を図一1に示す。

両培地を通じて、両方法は文献^{(1),(2)}のような高い相関関係はみられなかった。

また、くりかえし測定数3回を考慮した分散分析による有意差検定を行った結果を表一3に示す。表一3よりBCP加寒天培地における乳酸菌飲料の種類による分散比(F=3.944)は5%レベルの有意差として認められるが、PLMPN法とPLC法の方法による分散比の有意差は認められなかった。一方、標準寒天培地における乳酸菌飲料の種類による分散比(F=18.44)は1%レベルの有意差が認められたが、PLMPN法とPLC法の方法による有意差は認められなかった。



図一1 乳酸菌飲料におけるPLMPN法とPLC法の相関関係

表一3 乳酸菌飲料のBCP加寒天培地および標準寒天培地における分散分析表

	BCP加寒天培地				標準寒天培地			
	平方和	自由度	平均平方	F比	平方和	自由度	平均平方	F比
A(種類)	2.4072	4	0.6018	3.944*	8.1591	4	2.0398	18.44**
B(方法)	0.0002	1	0.00024	-0.002	0.1071	1	0.1071	0.968
AXB	0.0530	4	0.0132	0.087	0.2742	4	0.0685	0.620
残差	3.052	20	0.1526		2.212	20	0.1106	
全体	5.5124	29			10.752	29		

*..... 5%レベルで有意差あり **..... 1%レベルで有意差あり

すなわち、両培地を通じて乳酸菌飲料の種類による有意差は認められるが、方法 (PLMPN 法と PLC 法) による有意差は認められなかったことになりこれまでの報告⁽²⁾と一致するものである。また、乳酸菌用培地である BCP 加寒天培地の方が乳酸菌に対する感度がよいためか、標準寒天培地よりやや高い菌数値が観測されるようである。

IV まとめ

食品中の菌数測定法の簡易化を目的として、食品素材 (小麦粉、そば粉) 中の一般生菌数、耐熱性菌数および大腸菌群について、プレート MPN 法の適用性を従来の平板培養法 (PLC 法) と比較することにより検討した。

また、乳酸菌飲料については乳酸菌用培地と一般生菌用培地について菌数測定を行い、本法の適用性を確認した。

1. そば粉の場合、両方法の相関関係および分散分析結果より、一般生菌数の場合を除いて、耐熱性菌数、大腸菌群共、プレート MPN 法が PLC 法に代わり得る結果を得た。
2. 乳酸菌飲料では両培地を通じて両方法の相関性は文献値ほど高くはなかったが、乳酸菌飲料の種類による有意差は認められ、方法による有意差は認められなかったことからプレート MPN 法が PLC 法に代わり得るとした。

[謝辞]

本実験は平成 5 年度大阪職業能力開発短期大学校、産業化学科の卒業論文の一つのテーマとして取り上げたもので同年卒業生の永重尚紀君および 6 年度卒業生の南有紀嬢の多大の協力を得たものでここに深謝いたします。

[参考文献]

- (1) Tan, S-T., Maxcy, R. B., Stroup, W. W: J. Food Protection 46, 836-41 p (1983)
- (2) 水落慎吾、吉田啓子、荻原博和、春田三佐夫: 食品衛生学会誌 vol. 28, No. 6, 480-2 p (1987)
- (3) 坂崎利一、田村和満: 月刊フードケミカル 5 月号, 105-7 p (1989)
- (4) 厚生省食品保健課、乳肉衛生課、食品化学課共編 “食品六法” 中央法規出版 84-5 p (1985)