

デジタル顕微鏡方式を使用した はっ酵乳や乳酸菌飲料の乳酸菌数 リアルタイム定量測定

マイクロバイオ株式会社

技術開発部 高原 望、小野寺 崇

1 要約

はっ酵乳や乳酸菌飲料製造業界では成分規格検査として通性嫌気性乳酸菌数の把握が行われている。今回は、デジタル顕微鏡方式システムによる通性嫌気性乳酸菌数把握の自動化を目的とし、さらに、これまで大掛かりな設備や手間の掛る操作を必要としてきた偏性嫌気性菌であるビフィズス菌数把握についても簡便にできる定量の自動化を検討した。

2 はじめに

近年、私たち日常生活において健康意識の高まりからはっ酵乳や乳酸菌飲料は恒常的に気軽に摂取されるようになり、ヒトに有用な食品として需要が高まっている。その中でも腸内環境の改善等において有用な乳酸菌やビフィズス菌を使用したプロバイオティクス食品や特定保健用食品などの市場拡大は著しい。これははっ酵乳や乳酸菌飲料を製造している事業所における出荷製品の品質に関連して、厚生労働省の乳及び乳製品の成分規格は未殺菌のはっ酵乳、乳

製品乳酸菌飲料については乳酸菌（または酵母）の生菌数が1ml当たり1000万以上、乳酸菌飲料については1ml当たり100万以上と定められており、各製造事業所ではロット毎等の成分規格検査が行われている。

ここでは、この成分規格検査について公定法を踏まえたデジタル顕微鏡方式（以下DMCS）を使用したはっ酵乳や乳酸菌飲料の通性嫌気・嫌気性生菌数リアルタイム定量測定を紹介する。

2・1 乳酸菌・ビフィズス菌について

乳酸菌は通性嫌気性のグラム陽性桿菌または球菌で、カタラーゼ（-）、芽胞を形成せず、運動性が無く、糖類を発酵して消費した糖類から50%以上の割合で乳酸を生成する細菌と定義され、土壌、乳、植物等の自然界に広く分布し、古くから経験的に発酵食品などに利用されて来た。近年プロバイオティクス食品や特定保健食品に多く利用されているビフィズス菌 *Bifidobacterium* はグラム陽性多型性桿菌で哺乳類等の腸管由来の

株が多く、従来は *Lactococcus* 属の一種とされていたが、乳酸の他に酢酸も生成し酸素が存在する環境では生育できない偏性嫌気性であるという点で、一般の乳酸菌とは大きく異なり *Bifidobacterium* 属として分類された。

3 測定方法

通性嫌気性菌である乳酸菌は、公定法で定められたBCP加プレートカウント培地を用い、混釈法にて35℃で72±3時間培養した。偏性嫌気性菌であるビフィズス菌はTOSプロピオン酸寒天培地を用い、マイクロバイオ社嫌気性システムを使用し、平板塗抹にて37℃で72時間嫌気培養しながらDMCSにて測定した。

3・1 デジタル顕微鏡方式について

Biomatic DMCS FA-100 (Digital Microscope Culturing System Full Auto100) は、デジタル顕微鏡技術を応用した微生物検出装置である。公定法に基づき寒天培地を用いて試

験法に準じた培養を行い、ミクロのレベルで発生したコロニーの影をCCDカメラで撮影し、コンピュータ画像処理により目視では確認不可な微小レベルのコロニーを自動的にカウントするシステムである。仮に試料残渣がある場合でも画像処理技術により判別除去可能である。同時に100枚のシャーレを計測する事ができ、シャーレをセットするだけで計測が開始され、シャーレを抜き取れば検査が終了する。また測定時間は各シャーレ毎に設定でき任意の時間で計測を終了させる事もできる。Biomatic DMCS FA-100は通常90φのシャーレによる混釈平板培養法や表面塗抹培養法を使用した寒天培地の計測を自動でリアルタイムに行える他、目視では確認不可能なミクロレベルで発生したコロニーをリアルタイムで計測しているのが、公定法の培養を行いながら規定の培養時間より速くコロニーを検出できるといった迅速性をも併せ持っている。さらに、マイクロバイオ社製の嫌気システムI-PPMシリーズを用いる事によって嫌気培養を行いながら嫌気菌のコロニーも微小レベルで自

動計測する事ができる。

「概念」…光源から光を媒体に照射し、観察される媒体が光を通過させるだけの透明度を有しているとするれば、1画素のサイズが数μmのCCDエリアセンサーを用いて培養しながら観察した場合、生菌が何回か分裂増殖してコロニーサイズが画素サイズより大きくなつたときに陰影像としてコロニーが画像で確認される。数ミリの厚さをもつた寒天培地の場合でも、いろいろな深度に分布する直径が数十μmのコロニーを、特に焦点を合わせることなく観測が可能である(図1)。

「計測原理」…コロニー検出画像処理システムは、培養開始時から寒天培地を観測し結果を一定時間間隔で逐次画像情報としてコンピュータに取り込む方法を採用している。その都度、取得画像に対してコンピュータで適切な画像処理を行いデジタル顕微鏡の解像度に達したもののうち画像処理の条件に応じてコロニーと

判断されたものから順に検出され、コロニーの数が確定される(図2)。

3・2 嫌気培養システムについて
 マイクロバイオ社製の嫌気性菌検出システムI-PPMシリーズは、2分画シャーレの片方には培地が充填されていて、もう片側へ脱酸素剤及び嫌気センサーを入れて専用袋に

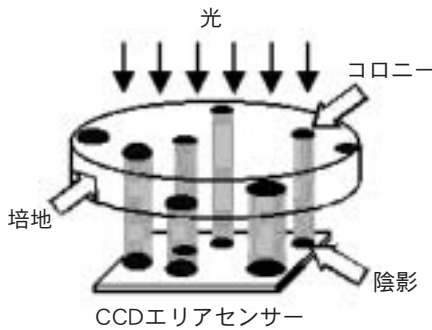


図1 DMCS測定概念

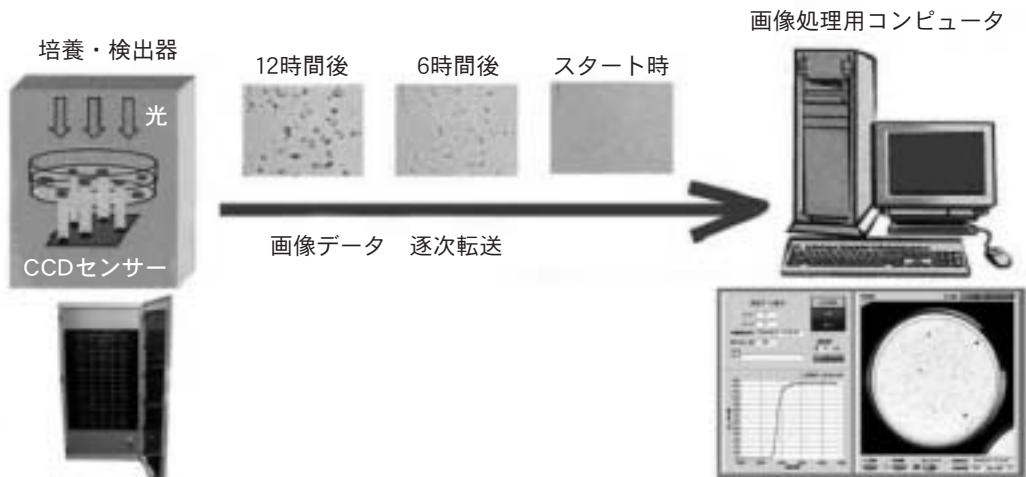


図2 DMCS計測原理

Micro Bio
寒天入り 嫌気性菌用シャーレ
脱酸素 特性

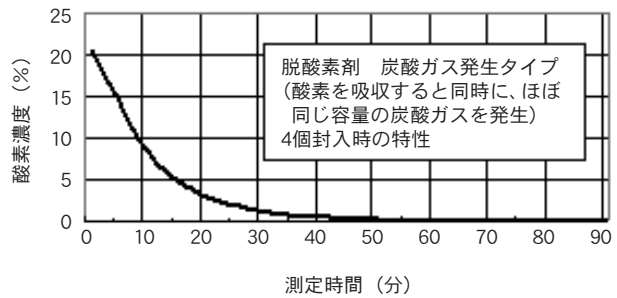


図3 嫌気システムの性能



図4 嫌気培養システム

このシャーレを封入して使用するもので、嫌気培養がシャーレ毎に実施でき嫌気性菌を検出する事が出来るシステムである。使用される脱酸素剤は二酸化炭素置換タイプであり図3のような性能を有したものを採用している。

また、バキュームシーラーで脱気して密封する事によりDMCSFA100で正確にリアルタイム検出が

できる。また、25mmメンブレンフィルターを使用したフィルター法にも使用でき、多量のサンプル中の少数の菌を捕集し計数する事も可能である。嫌気センサーは、通常の大気条件下では青を呈色し嫌気条件下では赤を呈色する(図4)。

3・3 乳酸菌・ビフィズス菌数の測定

①BCP加プレートカウント培地を用いた通性嫌気性乳酸菌の定量

市販のはつ酵乳や乳酸菌飲料を105〜107希釈し1mlを90φのシャーレに分注後、滅菌済みで約45℃程度に保持されたBCP加プレートカウント培地を約15ml加え混釈し固化させ、混釈平板培地を作成する。それを、DMCSFA100にセットし36±1℃、で72±3時間培養し通性嫌気性乳酸菌数として計測した。

②TOSプロピオン酸寒天培地を用いた偏性嫌気性乳酸菌(ビフィズス菌)の定量

市販のはつ酵乳や乳酸菌飲料を10⁵〜10⁷程度希釈しTOSプロピオン酸寒天培地が充填されたTOSプロピオン酸培養システムへ0.1ml分注しスプレッター等で均等に塗抹し、嫌気センサー及び脱酸素剤を充填し専用袋に入れた後バキュームシーラーで脱気して密封したものをDMCSFA100にセットし、37℃で72時間培養して偏性嫌気性乳酸菌数(ビフィズス菌数)として計測した。このシステムでは一部ビフィズス菌以外の乳酸菌がコロニーを形成する可能性があるが、ビフィズス菌の

コロニーに比べ小さくコロニーのサイズや形態が異なるので、DMCSで計測する場合は画像処理により除外や別にカウントする事も可能である。

4 結果

①BCP加プレートカウント培地を用いた通性嫌気性乳酸菌の定量では、この市販のはつ酵乳の場合乳酸菌の第一検出は約15時間程で、全体の9割以上の計数には約30時間程であった(図5)。

②TOSプロピオン酸寒天培地を用いた偏性嫌気性乳酸菌の定量では、この市販のはつ酵乳の場合Bifidobacteriumの第一検出は約20時間程で、全体の9割以上の計数には約25時間程であった(図6)。

BCP加プレートカウント培地を用いた通性嫌気性乳酸菌の定量及び、TOSプロピオン酸寒天培地を用いた偏性嫌気性乳酸菌(ビフィズス菌)の定量において、インキュベータにて培養を行い目視で算定する場合、規定の培養時間後に算定するケースが殆どであると思われる。しかしな

がら、計測しようとする乳酸菌の状態、増殖性、使用培地、培養温度、その他の培養条件にも依存するが、今回Bionatic DMCS FA-100を使用し、計数した結果、菌数全体の9割〜10割を計数してから、定められた培養終了時間までかなりの時間の無駄が認められたので、あらかじめ使用する乳酸菌・ビフィズス菌のデータを一度採取しておけば、規定の培養時間を前倒しして算定する事が可能であるという事が確認された。

5 終りに

今回紹介した「デジタル顕微鏡方式を使用したはっ酵乳や乳酸菌飲料の乳酸菌数リアルタイム定量測定」は、公定法を自動化し迅速性をも併せ持つシステムであるという点で利便性に優れる。さらに、偏性嫌気性乳酸菌の検出では、通常の細菌検査と異なる設備や操作が必要であったが敬遠されて来た経緯があり、安価かつ簡単な操作で通常の検査と同等に扱う事ができるシステムや自動化の要望も多かった。はっ酵乳や乳酸菌飲料を製造されている事業所にお

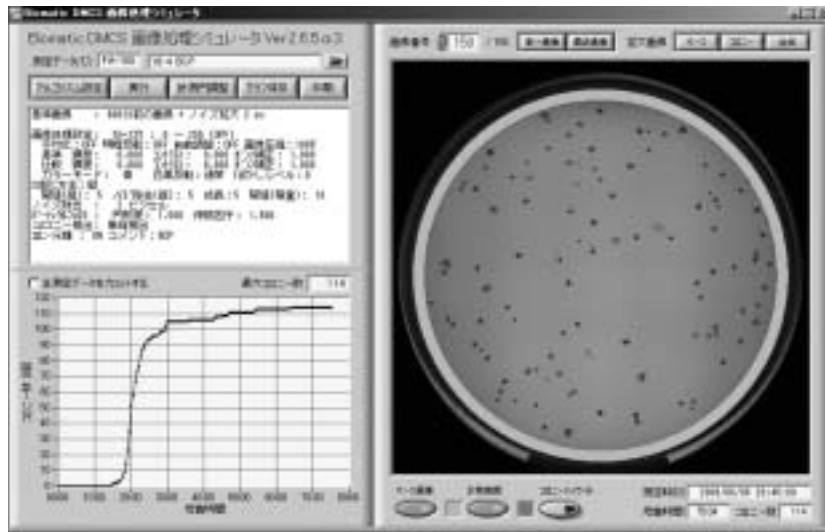


図5 BCP加プレートカウント培地を用いた通性嫌気性乳酸菌の定量

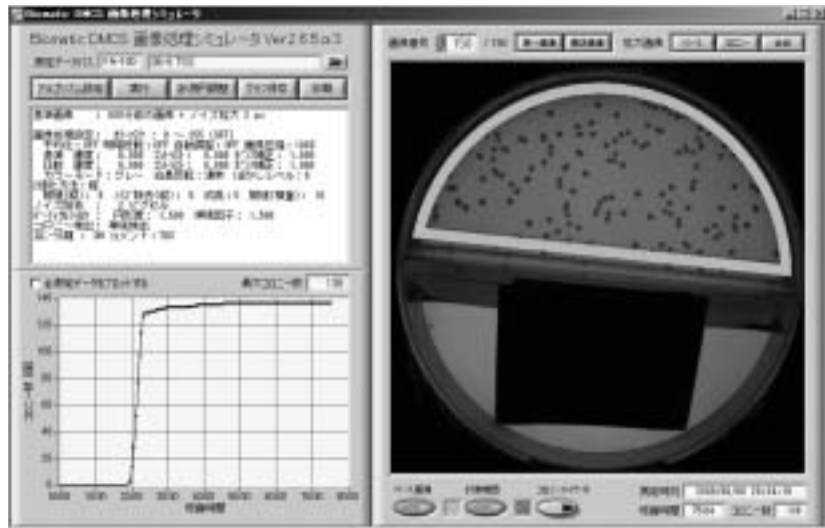


図6 TOSプロピオン酸寒天培地を用いた偏性嫌気性乳酸菌（ビフィズス菌）の定量

ける出荷体制や品質管理体制等を考えた場合、DMCSのシステムにて測定するという事は、計測における操作の手間を軽くするだけでなく好気・嫌気培養を問わず培養の記録が

残せるので、たいへん有意義である。尚今回は、BCP加プレートカウント培地及びTOSプロピオン酸寒天培地を使用した、BL寒天培地やMGLP寒天培地でも同様である。

また、今回紹介した乳酸菌に関する計測ばかりではなく、嫌気性菌による事故を危惧される食品を製造する事業所においては、製品管理に有用であると言える。