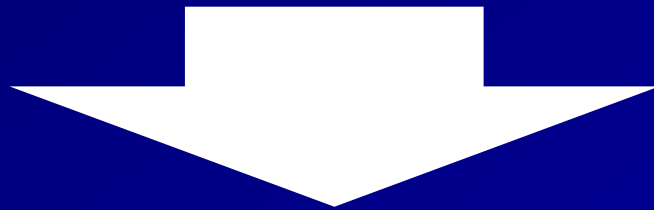


食品における真菌数計測用培地の評価

○寺村 哉、恩地 裕一、牛山 正志（JNC株式会社 横浜研究所）

本発表の背景

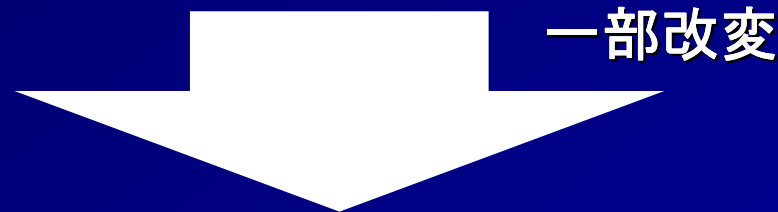
- 食品の衛生管理や品質管理
真菌数の管理は重要な管理項目の一つ
- ISO 21527-1法
Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC) 寒天培地が推奨



塗抹操作が煩雑、5日間という比較的長期間の培養が必要

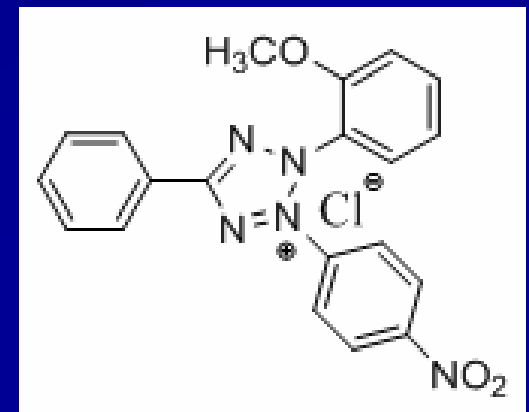
新たな真菌検出法

- 日常の衛生管理現場では
迅速性と簡便性を兼ね備えた真菌検査法への要望
- 微生物検出に広く使用されているTTC(2' 3' 5' -Triphenyl tetrazolium chloride)



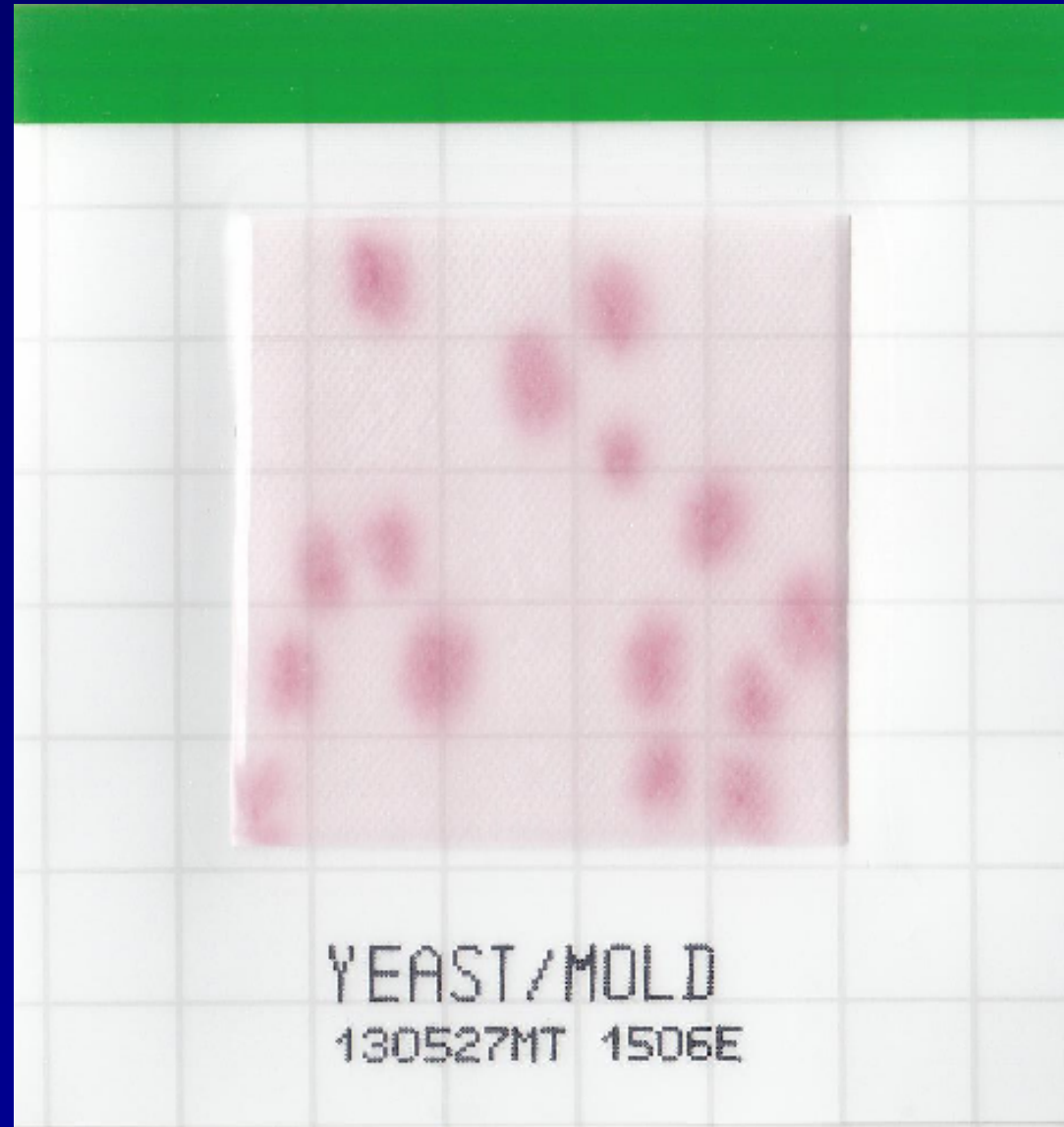
2-(2-Methoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride
を真菌検出に応用

- 真菌数を48～72時間で計測可能な乾燥簡易培地
サニ太くん真菌用(SYM)を開発した



サニ太くん真菌用(SYM)

- 新規酸化還元指示薬を組み込んだ、乾燥簡易培地
- 1mLの液体試料添加後、培地が自動的に再構成され、真菌のみが選択的に発育
- 25°C、48～72時間培養後真菌は赤色の集落を形成



標準菌株を用いた評価

供試菌株—カビ19株、酵母13株、細菌4株、計36株を使用

カビ： サブローデキストロース寒天(Difco)にて25°C、1週間培養後、
形成した胞子を滅菌0.1%Tween80加リン酸緩衝生理食塩水で
回収し使用

酵母： サブローデキストロースブイヨン(Difco)で25°C、72時間培養し使用

細菌： トリプトソイブイヨン(Difco)で35°C、24時間培養し使用

供試菌株の接種

滅菌0.1%ペプトン水で適宜10倍段階希釈後、

菌希釈液の1mLをSYMに接種

0.1mLをDRBCに接種し、コンラージ棒により塗抹

判定および菌数計測

SYMは25°C、48および72時間培養後、

DRBCは25°C、5日間培養後、

各培地上での発育および集落性状の観察を行った

標準菌株を用いた評価結果

Growth and color development of SYM (Colony color: logCFU/ml) ^a

Microbes tested	SYM 48 h	SYM 72 h	DRBC 5days	Microbes tested	SYM 48 h	SYM 72 h	DRBC 5days
Molds				Yeasts			
<i>Alternaria alternata</i> isolate	Red 5.20	Red 5.26	5.00	<i>Candida albicans</i> NBRC 1594	Red 7.09	Red 7.09	7.07
<i>A. tenuissima</i> isolate	Red 4.48	Red 6.98	7.15	<i>C. viswanathii</i> NBRC 589	Red 6.99	Red 6.99	7.01
<i>Aspergillus brasiliensis</i> IFO 9455	Red 5.85	Red 5.85	5.90	<i>Cryptococcus fluvas</i> isolate	Red 5.89	Red 6.41	6.49
<i>A. niger</i> NBRC 4091	Red 6.16	Red 6.16	5.95	<i>Rhodotorula glutinis</i> NBRC 389	Red 6.18	Red 6.21	6.30
<i>A. sydowii</i> isolate 1	not grown	Red 6.24	6.54	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCM 1499	Red 7.38	Red 7.38	7.25
<i>A. sydowii</i> isolate 2	not grown	Red 7.06	7.16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC 2379	Red 7.02	Red 7.25	7.27
<i>Aureobasidium pullulans</i> isolate	Red 6.35	Red 6.36	6.40	<i>S. cerevisiae</i> isolated 1	Red 7.74	Red 7.77	7.76
<i>Chaetomium globosum</i> IFO 6347	Red 4.00	Red 4.00	5.00	<i>S. cerevisiae</i> isolated 2	Red 5.69	Red 7.60	7.62
<i>Cladosporium</i> sp. Isolate	Red 5.66	Red 6.04	6.00	<i>S. cerevisiae</i> isolated 3	Red 7.68	Red 7.91	7.76
<i>C. cladosporioides</i> IFO 6348	Red 6.36	Red 7.12	6.87	<i>S. cerevisiae</i> isolated 4	Red 6.54	Red 7.68	8.10
<i>C. cladosporioides</i> IFO 6368	Red 6.75	Red 7.41	6.92	<i>S. cerevisiae</i> isolated 5	Red 7.72	Red 7.72	7.08
<i>Eurotium chevalieri</i> IFO 4086	not grown	Red 7.13	6.92	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> NBRC 146	Red 7.60	Red 7.60	7.59
<i>E. echinulatum</i> NBRC 5862	Red 4.00	Red 5.11	3.87	<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 746	Red 7.38	Red 7.38	7.16
<i>Fusarium avenaceum</i> NBRC 33236	Red 6.86	Red 6.91	7.18	Bacteria			
<i>F. solani</i> NBRC 9955	Red 5.88	Red 5.89	5.73	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC 3134	not grown (7.92) ^b		
<i>Penicillium</i> sp. Isolate	Red 5.28	Red 7.65	7.24	<i>Escherichia coli</i> NBRC 3972	not grown (8.89)		
<i>P. citrinum</i> isolate	Red 5.98	Red 6.03	6.04	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	not grown (8.51)		
<i>P. janthinellum</i> isolate	not grown	Red 5.11	5.00	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910	not grown (8.47)		
<i>Wallemia sebi</i> NBRC 6668	Red 2.34	Red 5.41	5.38				

^a Numbers (logCFU/ml) were undiluted microbe number obtained from each tested method.

^b Parentheses were indicated undiluted bacterial number (logCFU/ml) obtained from tryptic soy agar.

**SYMでは48時間で全ての酵母、19株中15株のカビが赤色集落として発育した。
72時間培養では供試した全ての真菌でDRBCと同等の発育菌数が得られた。**

市販食品検体を用いた評価

市販食品検体—横浜市内で購入した市販食品80検体を使用
(生野菜・果実類、精肉類、生鮮魚介類、乳製品、穀類)

検体の処理

9倍量の滅菌0.1%ペプトン水を加え、90秒間ストマッキングを行い試料原液とした
試料原液は滅菌0.1%ペプトン水で10倍段階希釈を繰り返し、各希釈液を調製

検体の接種

希釈液の1mLを各2枚のSYM、乾燥簡易培地AおよびBへ接種
0.1mLを各2枚のDRBCに接種しコンラージ棒により塗抹

判定

SYMは25°C、48および72時間培養後、発育菌数を計測
DRBCおよび乾燥簡易培地A、Bは25°C、5日間培養後、発育菌数を計測

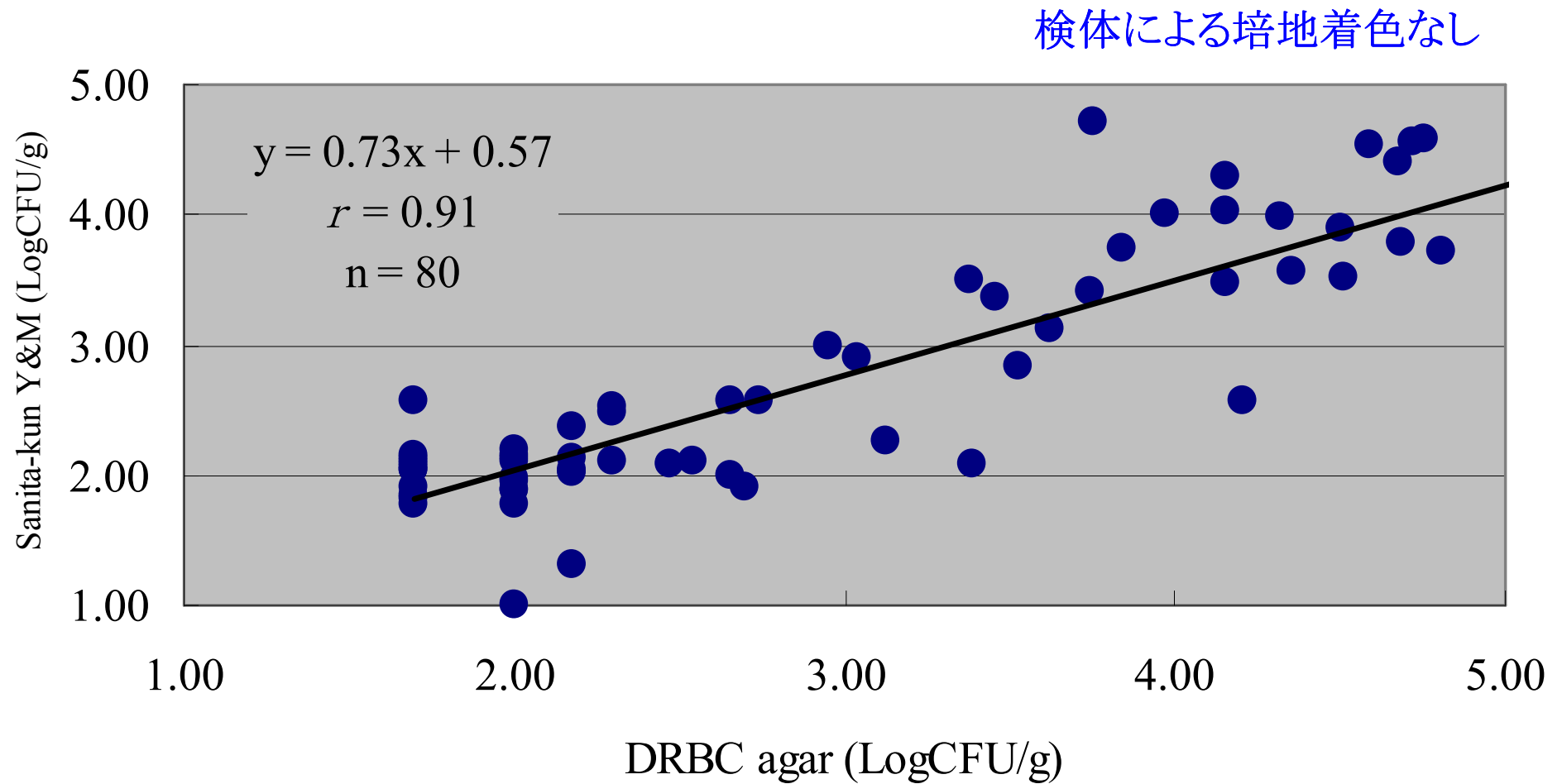
各方法において得られた菌数をそれぞれ対数に変換後
SYMの菌数の対数値をy軸に、
対照とする培地での菌数の対数値をx軸にそれぞれプロット後、相関係数を算出

評価培地の比較

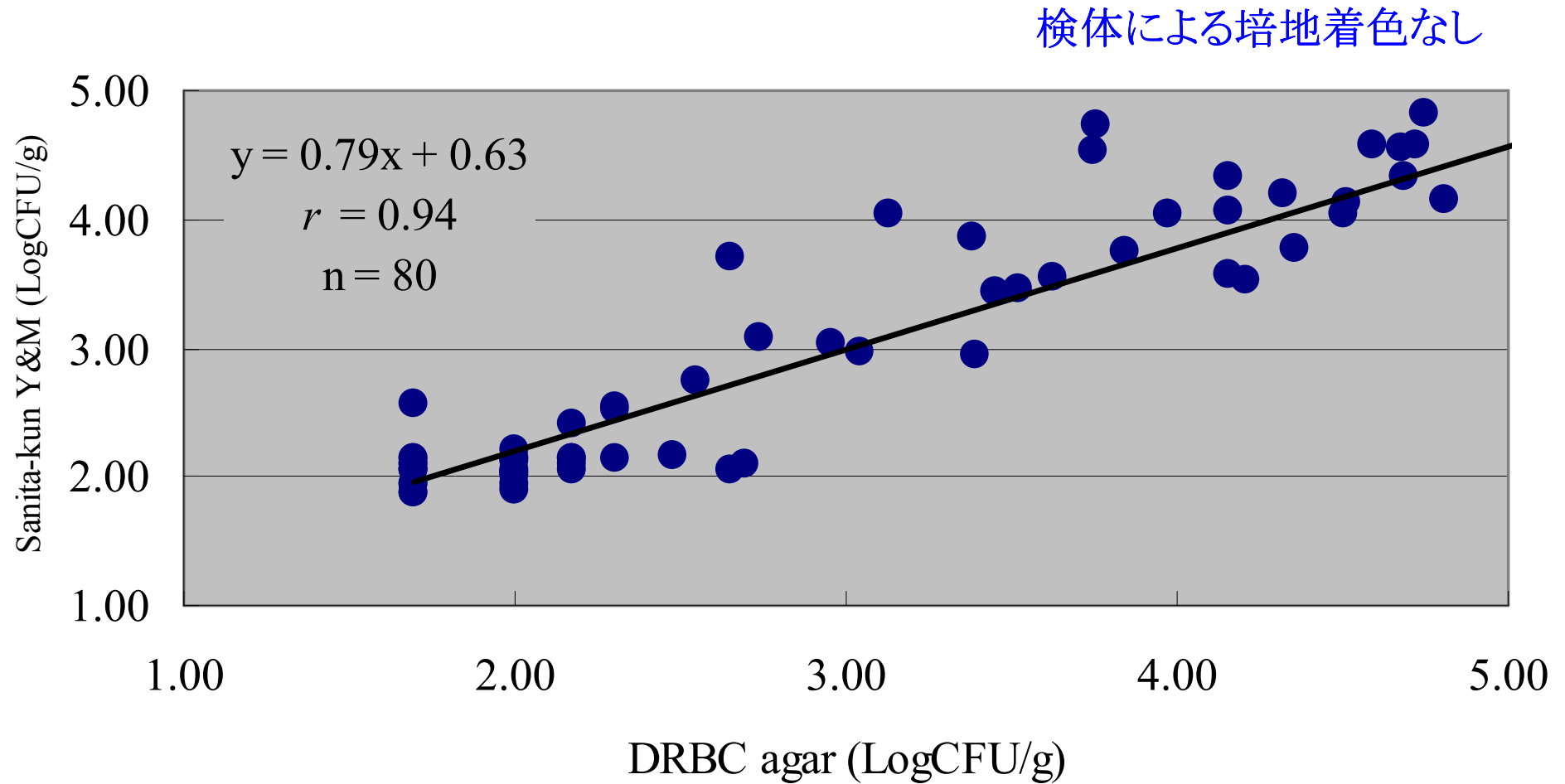
評価培地	培養温度	培養時間	発色剤	発色
サニ太くん	25℃	48～72時間	酸化還元指示薬	赤
DRBC	24～26℃	5～7日	なし	なし/真菌由来の色
乾燥簡易培地A	20～25℃	3～5日	phosphatase基質	青/真菌由来の色
乾燥簡易培地B	20～25℃	3～7日	phosphatase基質	青/真菌由来の色

※ISO21527-1および各メーカーHPより抜粋

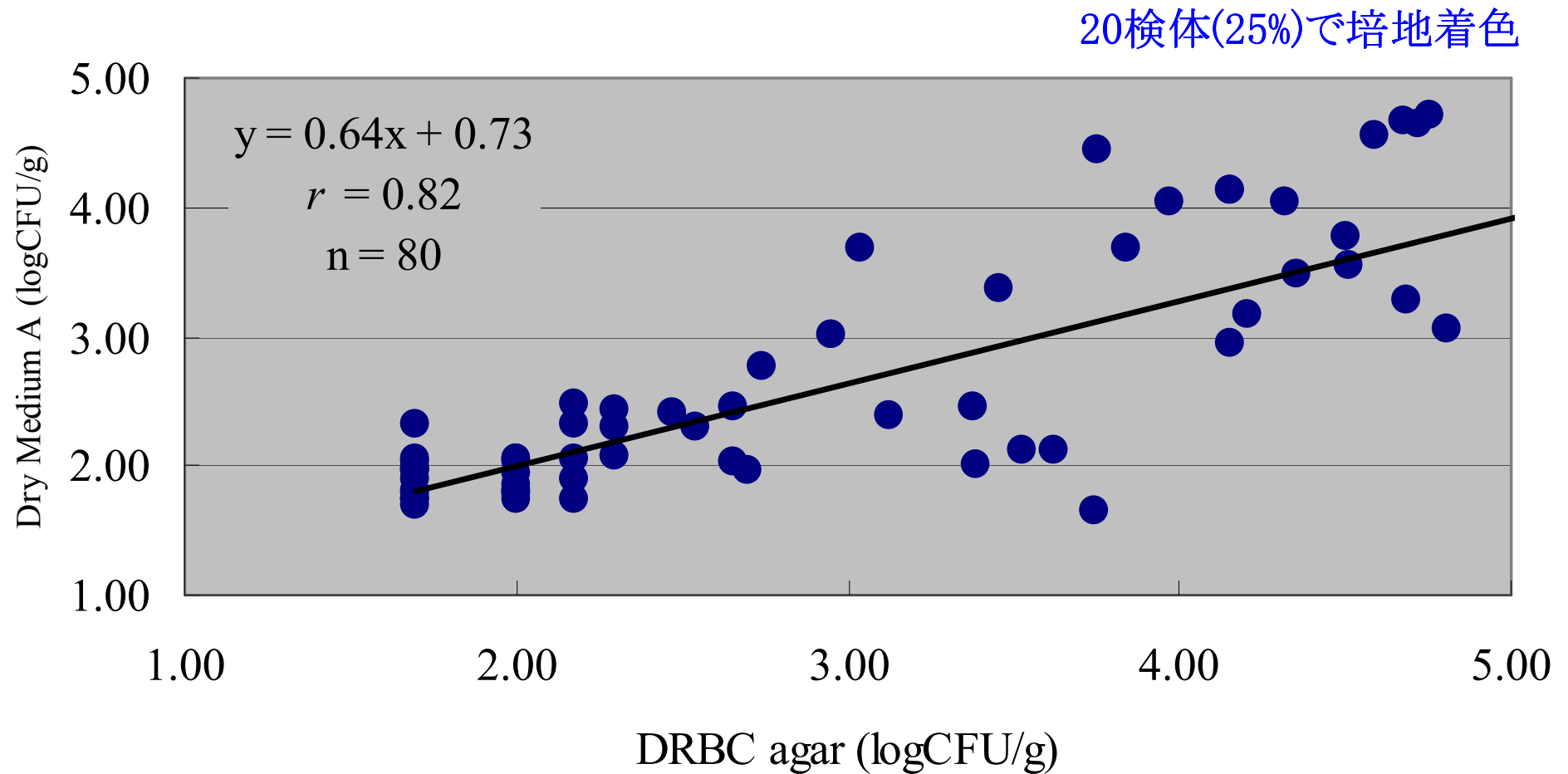
SYM 2days vs. DRBC agar 5days



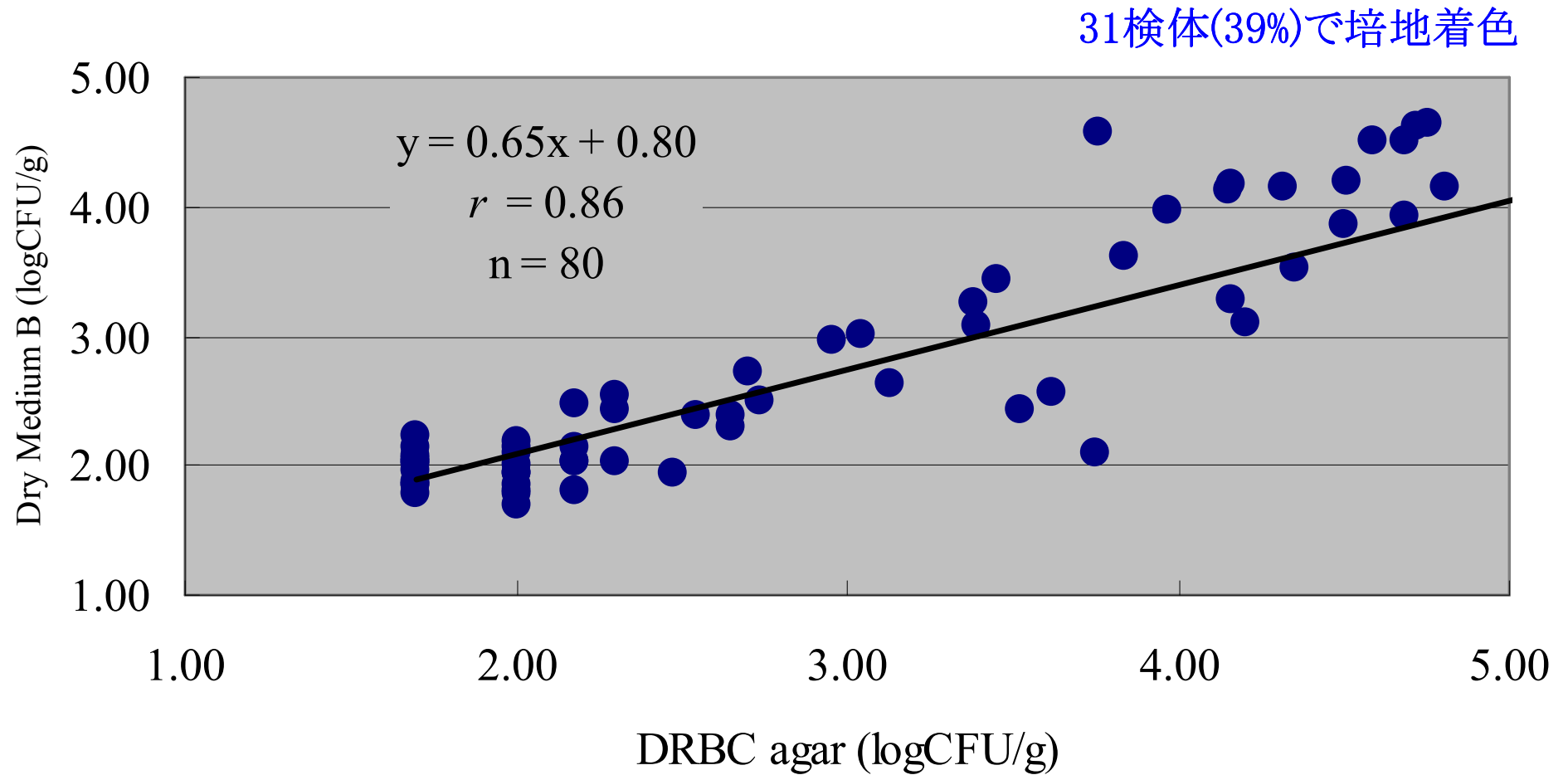
SYM 3days vs. DRBC agar 5days



Dry medium A 5days vs. DRBC agar 5days



Dry medium B 5days vs. DRBC agar 5days



市販食品検体を用いた評価

48時間培養でのSYMとDRBC (ISO21527-1法)間では
直線回帰式 $y = 0.73x + 0.57$ 、相関係数(r) 0.91

72時間培養でのSYMとDRBC (ISO21527-1法)間では
直線回帰式 $y = 0.79x + 0.63$ 、相関係数(r) 0.94

SYMはいずれの培養時間においても高い相関を認めた。
また、食材による培地面の着色を認めなかった。

一方、DRBC (ISO21527-1法)と乾燥簡易培地 A 間では
直線回帰式 $y = 0.64x + 0.73$ 、相関係数(r) 0.82

DRBC (ISO21527-1法)と乾燥簡易培地 B 間では
直線回帰式 $y = 0.65x + 0.80$ 、相関係数(r) 0.86

SYMの48時間培養においても、
乾燥簡易培地AおよびBの5日間培養よりもDRBCとの高い相関が得られ、
かつ直線回帰式の傾きが1に近く、切片が0に近い結果となった。

まとめ

今回の評価において

サニ太くん真菌用は48-72時間という比較的短い時間の培養でISO 21527-1と高い相関を有する方法であった。

さらに48-72時間で明瞭な赤色集落として真菌を検出できる点と、食材由来の発色発生の影響を受けずに計測できる点から、食品製造および加工現場などの自主衛生検査等において有用な簡易手段の一つであると考えられた。