

ATP法による豆腐およびスダチ果汁の微生物数の迅速測定

Rapid Measurement for Microbial Counts in Tofu and Sudachi Juice by ATP Method

大村芳正*, 市川亮一**

Yoshimasa Ohmura and Ryoichi Ichikawa

抄 録

ATP 法による豆腐の生菌数およびスダチ果汁の酵母・カビ数を短時間に測定する方法を検討した。ATP 法によるもめん・絹ごし豆腐の生菌数測定は、そのパック水を試料とすることにより約 30 分で豆腐の生菌数を推定できた。なお、検出限界菌数は 300cfu/g であった。スダチ果汁は pH が低く、ATP を測定するための酵素が作用しないため、果汁の pH を 6.5 に調整する必要があった。ATP 法により、スダチ果汁の酵母・カビ数を個別に測定することはできなかったが、果汁の酵母・カビの汚染度判定は約 40 分で可能であった。

1 はじめに

豆腐は栄養成分が多く、水分含量も高いため、製造工程中の細菌汚染により腐敗しやすい食品である。また徳島県の特産品であるスダチ果汁は風味を重視するため、小瓶を除いて加熱殺菌処理を行っていないので、酵母とカビの汚染による品質低下が問題となっている。これらの微生物数を測定する際は、試料の調製後、寒天培地に混釈し、培養後に出現したコロニー数を計数する一連の煩雑な操作が必要であり、また結果を得るのに 2～3 日間を要するのが一般的である。このため、日配食品である豆腐や原料・製造環境の管理が重要であるスダチ果汁は、その衛生管理において迅速性と簡便性が要求されている。しかしながら、豆腐およびスダチ果汁の微生物数の迅速測定法の報告はみられない。

微生物数の迅速測定法にはアデノシン三リン酸(ATP)法、蛍光染色法、フローサイトメトリー法、インピーダンス法、PCR 法などがある¹⁾。いずれの方法も検出感度、検出時間、操作性などにおいて一長一短はあるが、適切な処理法を検討することにより、有用な方法になると思われる。

本研究では、操作法が簡便であり、また高性能の ATP 消去剤が開発され²⁾、微生物以外の ATP(遊離 ATP)を消去し、微生物由来の ATP(微生物 ATP)の測定が可能となっている ATP 法に注目した。最近、ATP 法は生乳などの生菌数測定にも利用されてお

り³⁾、ATP 法を豆腐およびスダチ果汁の微生物数測定法として利用するための諸条件について検討した。

2 実験方法

2・1 豆腐とパック水の生菌数測定

市販豆腐 20 点(もめん豆腐 10 点、絹ごし豆腐 10 点)について、豆腐とそのパック水の生菌数を標準寒天培地を用い、37 °C、48 時間培養後に出現したコロニーを計数した。

2・2 スダチ果汁の酵母とカビ数測定

スダチ果汁(14 点)の真菌数はポテトデキストロス寒天培地を用い、25 °C、72 時間培養後に出現したコロニーを計数した。

2・3 ATP測定試料の調製

豆腐は 9 倍量の蒸留水を加えた後、ホモジナイザー処理し、上澄み液を測定に供した。豆腐パック水はそのまま測定に供した。スダチ果汁は 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液により pH を 6.5 に調整して測定に供した。

2・4 ATP量の測定

遊離 ATP 量の測定は、まず、試料 0.1ml をルミチューブに採取した。次いで、0.1ml の ATP 抽出試薬を添加し、20 秒後に 0.1ml の発光試薬を添加攪拌後、10 秒以内に発光反応により生じた発光量(RLU: Relative Light Unit)を ATP アナライザ(ルミテスター: C-100, キッコーマン製)で測定した。

微生物 ATP 量の測定は、まず、試料 1.0ml をル

*食品技術課, **応用生物課

ミチューブに採取し、そこに 0.1ml の ATP 消去剤を添加し、良く攪拌した。次いで、その中の 0.1ml を別のルミチューブに採取し、良く攪拌後、ラップで覆って室温にて 30 分間反応させ、遊離 ATP を消去した。反応終了後の試料に、遊離 ATP 量の測定と同様、ATP 抽出試薬および発光試薬を添加攪拌後、発光量を測定した。なお、発光量は ATP 量に比例するので、発光量を測定することにより、ATP を定量できる。ATP 測定試薬はキッコーマン製のルシフェール微生物検査キットを用いた。

3 結果および考察

3・1 豆腐とパック水の生菌数

もめん・絹ごし豆腐とそれぞれのパック水の生菌数を測定し、その関係を調べた。もめん豆腐、絹ごし豆腐ともに豆腐の生菌数とパック水の生菌数は高い正の相関が認められた。なお、もめん豆腐、絹ごし豆腐ともにパック水の生菌数が豆腐の生菌数より多い傾向がみられた(図 1.2)。豆腐よりパック水の生菌数が多い要因は、豆腐の生菌数が豆腐内部より、表面に多いことに起因していると考えられた。

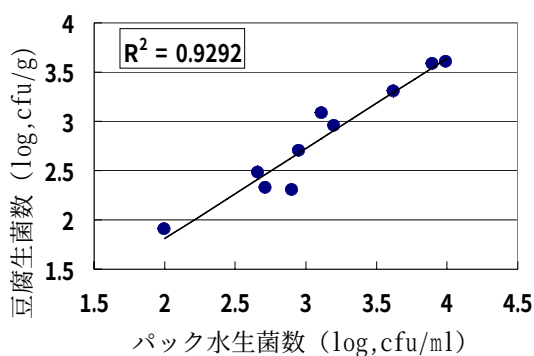


図1 もめん豆腐とパック水の生菌数

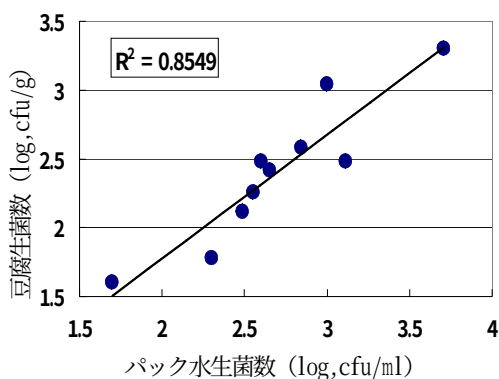


図2 絹ごし豆腐とパック水の生菌数

3・2 ATP法による豆腐の生菌数測定

豆腐には豆腐由来の遊離 ATP が多く含まれており、豆腐を 100 倍希釈した試料においても、発光量は 10^6 RLU を超えてスケールオーバーとなった。遊離 ATP 量の少ない米飯でも微生物の検出限界は 10^6 cfu/g と非常に高いことが報告されている⁴⁾。米飯より遊離 ATP 量が多い豆腐では、豆腐の微生物 ATP 量を測定するには、豆腐由来の遊離 ATP を取り除く必要がある。このため、豆腐を 10 倍希釈したものに、ATP 消去剤を添加し、豆腐由来の遊離 ATP の消去を試みた。ATP 消去剤の性能は高まっているが、豆腐由来の遊離 ATP を完全に消去できないことから、豆腐の上澄み液(10 倍希釈)の検出限界菌数は 10^3 cfu/ml であった。つまり、ATP 法による豆腐の検出限界菌数は 10^4 cfu/g であった。

豆腐の検出限界菌数が 10^4 cfu/g では生菌数測定法としての適用は難しい。迅速測定法であっても、検出限界菌数を 10^2 cfu/g レベルにする必要があると考えられた。前述したように、豆腐パック水の生菌数は豆腐の生菌数と高い正の相関が認められ、かつ豆腐パック水の生菌数は豆腐の生菌数より多い傾向であったことから、豆腐のかわりにそのパック水を試料として適用できるか検討した。

表1 豆腐とパック水の遊離 ATP 量

	未処理(RLU)	ATP 消去剤処理(RLU)
豆腐	6.1×10^8	35
パック水	4.0×10^8	16

注) 豆腐は 10 倍希釈、パック水は希釈なし

豆腐とそのパック水の生菌数が 10cfu/g 以下の絹ごし豆腐について、豆腐とそのパック水の遊離 ATP 量および ATP 消去剤による遊離 ATP 量の消去程度を測定した。その結果、パック水は豆腐より、遊離 ATP 量が少なく、ATP 消去剤による遊離 ATP の消去効果も大きかった(表 1)。さらに、パック水の場合には、豆腐のように希釈する必要がなく、ATP の感度低下を招かないことから、豆腐パック水の微生物 ATP 量を測定した。その結果、豆腐パック水の生菌数が 300cfu/ml 以上において、生菌数 $(\log, \text{cfu/ml}) = 1.111(\log, \text{RLU}) + 0.993$ 、相関係数 $r=0.978$ の直線関係が認められ(図 3)、豆腐パック

水の発光量と生菌数とは高い正の相関が認められた。本測定法により、豆腐の生菌数が 300cfu/g を越えるものは ATP 法により生菌数を推定できた。なお、従来の培養法による生菌数の測定は2日間を要していたが、ATP 法により約 30 分に短縮できた。

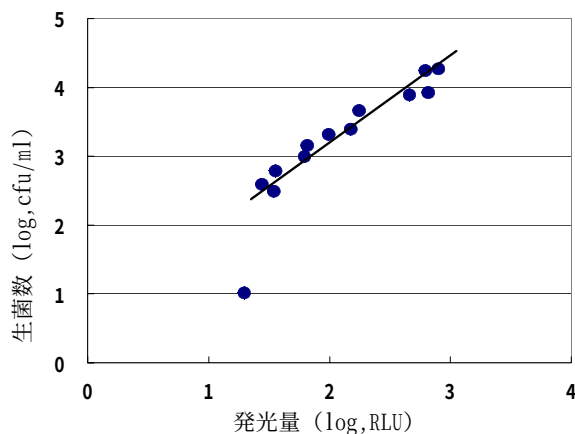


図3 豆腐パック水の発光量と生菌数

3・3 ATP測定におけるスダチ果汁の調製

スダチ果汁の pH は 2.4 程度と低く、そのままでは ATP 測定に関わるルシフェラーゼによる発光反応がなされず ATP 量を測定できなかった。このため、緩衝液 HEPES での希釈や水酸化ナトリウム溶液により pH 調整し、最適な処理条件を検討した。

オレンジ果汁の調製には緩衝液 HEPES が用いられている⁵⁾。しかし、オレンジ果汁より pH が極端に低いスダチ果汁は緩衝液による調製ではルシフェラーゼによる発光反応が不十分であった。そこで、水酸化ナトリウム溶液で pH 調整し、スダチ果汁のルシフェラーゼ発光反応に対する pH の影響を調べた。その結果、相対発光率は pH6.5 程度が最も高かった (図 4)。なお、pH 調整用の水酸化ナトリウム溶液濃度が 0.2mol/l を超えるとスダチ果汁中の酵母数がかなり減少した。このため、酵母の死滅が極めて少なかった 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液によりスダチ果汁の pH を調整した。

3・4 ATP法によるスダチ果汁の酵母・カビ数測定

スダチ果汁は果汁由来の遊離 ATP を多く含んでおり、果汁の酵母・カビ数を測定するには、豆腐と同様、ATP 消去剤により遊離 ATP を消去する必要があった。pH 調整および遊離 ATP 消去処理を施し

たスダチ果汁の発光量と酵母数の関係を図 5 に示した。スダチ果汁にカビが存在しない場合、ATP 法により、果汁の酵母数は測定可能であった。しかし、実際には酵母とカビがともに存在するケースもみられた。ATP 法の微生物区別について、種々の分解手法が検討され、微生物の分離が試みられているが、カビ・酵母・細菌の区別はできていない状況である⁶⁾。このため、ATP 法ではスダチ果汁の酵母、カビ数を個別に測定することはできなかった。しかし、従来の培養法による酵母・カビ数の測定は3日間を要していたが、本測定法は約 40 分でスダチ果汁の酵母・カビ汚染度を予測可能であった。汚染度区分は発光量が 1000RLU 未満であれば酵母・カビ汚染がほとんどなく A ランク、1000 ~ 3000RLU の範囲は中程度の汚染がみられる B ランク、3000RLU 以上の場合は汚染が大きい C ランクに設定した。

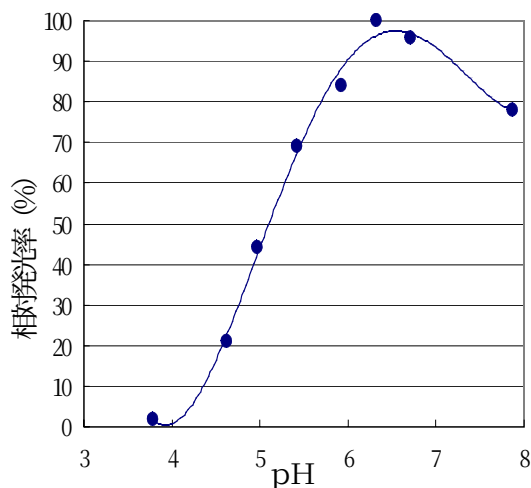


図4 スダチ果汁の発光反応に対する pH の影響

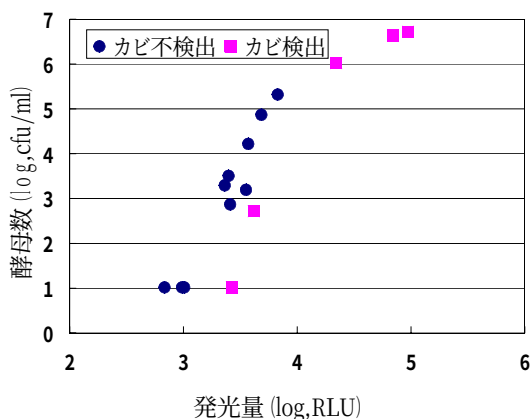


図5 スダチ果汁の発光量と酵母数

4 まとめ

ATP 法による豆腐の生菌数およびスダチ果汁の酵母・カビ数を短時間に測定する方法を検討し、以下の結果を得た。

(1) もめん豆腐、絹ごし豆腐ともに豆腐の生菌数とパック水の生菌数は高い正の相関が認められ、もめん・絹ごし豆腐ともにパック水の生菌数が豆腐の生菌数より多い傾向がみられた。

(2) 豆腐パック水の生菌数が 300cfu/ml 以上において、ATP 法による豆腐パック水の発光量と生菌数とは高い正の相関が認められた。

(3) スダチ果汁は pH が低く、ルシフェラーゼが作用しないため、果汁の pH を 6.5 程度に調整する必要がある。

(4) ATP 法により、スダチ果汁の酵母・カビ数を個別に測定することはできなかったが、果汁の酵母・カビの汚染度判定は可能であった。

参考文献

- 1) 宮本敬久：「食品衛生細菌の簡易迅速検出法」，食科工，47，pp173-180(2000)
- 2) 本間茂：「ルシフェラーゼを利用した微生物測定」，第 10 回 HACCP・微生物制御講演要旨集，pp41-44(2003)
- 3) 田中孝：「ATP 法による生乳および脱脂濃縮乳の生菌数迅速測定法」，食品工業，47(8)，pp25-31(2004)
- 4) 伊藤武監修：「ATP ふき取り検査」，鶏卵肉情報センター，pp6(2002)
- 5) 杉本勝俊：私信
- 6) 竹内秀行：「ATP 測定システムで何ができるのか」，食品と開発，32(11)，pp11-14(1997)