

# MALDI-MS を中心とした食品異変の究明体制の構築と

## 保有微生物の利活用に関する研究

－第1報－

松田みゆき・後藤優治

大分県産業科学技術センター 食品産業担当

### Investigation into the causes of food accidents and the categorization of useful microorganisms for the manufacturing of food products and beverages in our collection using the MALDI-MS technique.

－First Report－

Miyuki Matsuda・Yuji Goto

Food Industry Section, Oita Industrial Research Institute

#### 要 旨

食品の変敗（微生物が関与すると思われるもの）のうち、清酒を変質させる乳酸菌（以下、火落菌）に着目し、火落菌検出培地として用いられる半流動培地からの微生物の回収と同定、データベース化を試みた。結果、ろ過により寒天と分離することで再現性よくスペクトルを得ることができた。

#### 1. はじめに

従前より臨床現場において感染性微生物の迅速簡易同定装置として活用されていた MALDI-MS を食品産業の分野でも利活用する試みが増えてきた。MALDI-MS は高分子化合物の分析を得意とする質量分析装置で、生物学の分野では主にタンパク質がその分析対象となることが多い。例えば、細胞内のタンパク質合成に関与している Ribosomal Protein を主な対象とした菌の同定<sup>1-2)</sup>や、毛髪を構成しているケラチンを対象とした獣毛の鑑別(JIS L10030-2, 2023)等に利用されている。

弊所ではこれら産業界の動向を鑑み、県内食品産業の振興に資するべく令和4年度に Bruker 社の MALDI-MS を導入した。

そこで本研究では本機器を利用して①食品の異変（変敗・異物）に対する原因究明が円滑に行えるように技術的な支援体制を整えること、②弊所で保有する未利用微生物を解析し、食品等の製造に利活用できないかを探ることで今後、新規有用微生物の探索等のニーズがあった際に対応できる体制を整えることの2つを目標とした。

今年度は、食品の異変のうち変敗（微生物が関与すると思われるもの）に着目し、火落菌を例に微生物同定の際に必要なであろう条件検討とデータベース化を試みたので報告する。

火落菌は清酒中で増殖可能な乳酸菌で、製造過程で混入・増殖すると白濁、不快臭を発生させるなど清酒の著しい品質低下を招く。火落菌の検出には半流動培地である火落菌検出培地（以下、SI 培地）が用いられており、検液の白濁、沈殿、液内集落の形成によって火落菌の存在を判別している。

アルコール耐性の高い火落菌（真性火落菌・火落性乳酸菌）以外にも、普通培地にもよく増殖し、アルコール耐性の比較的低い腐造性乳酸菌も品質管理上、制御すべき対象であり、火落菌と同様に SI 培地において検液の白濁、沈殿、液内集落の形成を認めるため、先の培養で陽性と判断された検体からアルコール濃度を上げた培地に再度接種し、追加培養することで判別している。このため火落菌と腐造性乳酸菌の判別には培養期間が2週間程度必要となるが、MALDI-MS で微生物を同定することにより、この期間を短縮できないかと考えた。

MALDI-MS で微生物を同定する際は通常、検出しようとする菌の生育に適した寒天培地で培養したコロニーを供するが、火落菌の場合、SI 培地で作製した平板では火落菌の種類や培養条件によって生育しない場合があると SI 培地の添付文書に記載があり、まずは SI 培地（半流動培地）で火落菌の有無を確認することが定石になると考えられる。よって、培養後の SI 培地から直接、再現性

のよいスペクトルデータを得ることを今回の目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1 試料および培養液

独立行政法人酒類総合研究所が保有する火落菌・腐造乳酸菌株を譲受した。これらを清酒に接種して、実験的に腐造酒を作製し、腐造酒 1ml をアルコール 10% 添加 SI 培地（(公財) 日本醸造協会）9ml に接種した。30℃ で白濁、沈殿、液内集落の形成が認められるまで培養したものを試験に供する培養液とした。また以下の検討試験において 9104 (*Lactobacillus casei*), 9120 (*Lactobacillus fructivorans*), 9151 (*Lactobacillus homohiochii*) の 3 種を代表株として用いた。

### 2.2 平板培養による検討

MALDI-MS で微生物同定を行う場合、通常、平板上にコロニーを形成させ、試験に用いる。この方法でコロニーを得るまでに、どの程度日数が必要となるかを明らかにするために、SI 培地に最終濃度 1.5% となるように寒天を追加し、平板としたもの（SI 寒天培地）に上記の培養液 100  $\mu$  l を塗抹し、30℃ で培養した。

### 2.3 菌体回収に関する検討

SI 培地は半流動培地であり、菌液から菌体を回収する目的で遠心分離を行うと寒天も沈降するため、後の抽出操作に影響を及ぼす恐れがある。このため、寒天と菌液を分離する目的で、ろ過を行うこととした。ろ過の方法として、操作が簡便で特殊な機器を必要としないこと、ディスプレイで 1 回あたりの資材が比較的安価であることを条件に、フィルター付きストマッカー用バッグでろ過する方法とプラスチックシリンジの外筒に脱脂綿を 1 cm 程度詰めたものに培養液を加え内筒で押し出す方法の 2 つを比較した。

### 2.4 抽出および MALDI-MS による測定

前項のろ過処理後、遠心 (15,000  $\times$  g) して得られたペレットに蒸留水 1ml を添加し、攪拌、遠心して再度上清を除去する操作を 2 回繰り返すことで残存する水溶性の培地成分を除去した。得られたペレットに対して、蒸留水を加え再懸濁した。

測定に供する菌量の目安を調べる目的で、吸光度計（ヤマト科学 PiCOEXPLORER）を用いてこの再懸濁液を濁度 0.02, 0.1, 0.5 に調製し、それぞれ 300  $\mu$  l をエタノール・ギ酸抽出法で抽出し、MALDI-MS (Bruker Biotyper Sirius RUO) での測定に用いた。マトリックス剤として  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸を用いた。

### 2.5 培地・培養法の違いによるスペクトルの変化

先に述べたように MALDI-MS に登録されている微生物は原則、寒天培地で生育させたコロニーを用いて測定し

たデータで構成されている。そこで培地や培養法の違いがどの程度スペクトルに影響をあたえるのかを把握する目的で 9104 を一般細菌の培養に用いられる標準寒天培地と乳酸菌の培地として一般的に用いられる MRS 寒天培地、SI 寒天培地にそれぞれ植菌し、得られたスペクトルの比較を行った。

## 3. 結果

### 3.1 平板培養による検討

SI 寒天培地で培養したところ、コロニーを得るまで 9104 では 3 日、9120 は 5 日、9151 は 10 日以上を要した。

### 3.2 菌体回収に関する検討

SI 培地からの菌体の回収について、一般的な 400ml 容のバッグ（フィルター孔：<20  $\mu$  m, <60  $\mu$  m, <350  $\mu$  m）に培養液 5ml を入れ、圧力をかけると、どのフィルターも寒天が多く流出し、ろ過の効果は薄かった。次に培養液を加える部分の袋の容量が少なくなるようにヒートシーラーで熱圧着し、数分静置ろ過を行ったところ、<350  $\mu$  m 孔のバッグでは多量の寒天の流入を認めたが、<60  $\mu$  m 孔のバッグでは無濾過の場合の半量以上、<20  $\mu$  m 孔のバッグではその殆どを除去することができた。しかしながら、バッグの形状が不安定でろ過条件を一定にすることが難しく、除去できる寒天の量が安定しなかったため、実際に検体を処理するには不向きであった。

対して、プラスチックシリンジに脱脂綿を詰めた棉栓ろ過では、肉眼で見る限りほぼすべての寒天を安定して除去することができた (Fig. 1)。

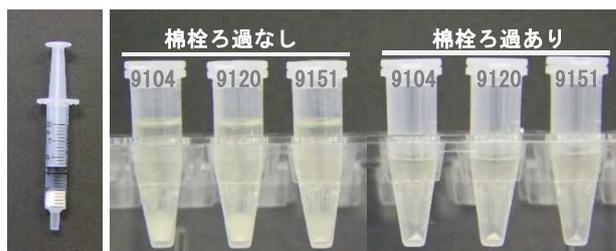


Fig. 1 棉栓ろ過器（左）と遠心後の沈殿物の様子（右）

ろ過により寒天を除去して得られたペレットを蒸留水で濁度 0.02, 0.1, 0.5 になるように再懸濁した液 300  $\mu$  l をそれぞれエタノール・ギ酸抽出法で抽出したところ、どの検体も濁度 0.1, 0.5 に調製した懸濁液で良好なスペクトルが得られた。対して、濁度 0.02 に調製した懸濁液では、ピーク強度が低く、同定に用いることは困難であった。

### 3.3 培地・培養法の違いによるスペクトルの変化

それぞれの培地に接種した菌株から得られたスペクトルを以下に示す (Fig. 2)。なお SI 培地のスペクトルは棉

栓ろ過で得られた菌体を用いた。

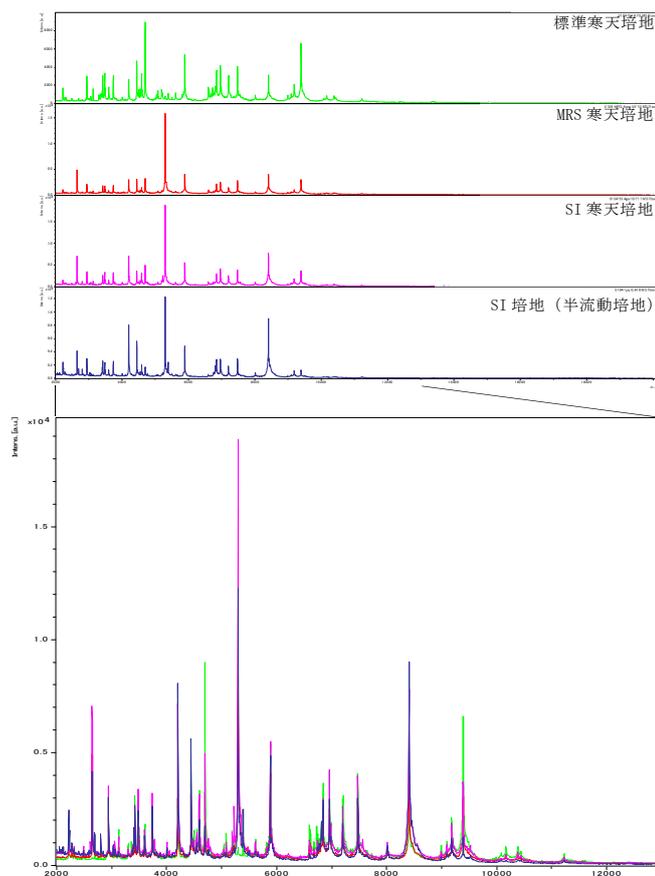


Fig.2 各種培地において9104株を生育させた場合のスペクトルの様子  
(下図は上図のスペクトルを重ねたもの)

この図から分かるとおり、SI培地から棉栓ろ過によって得られた菌体でも良好なスペクトルが得られることが分かった。なお、それぞれのスペクトルからS/N比が高い順に上位20ピークのm/zを比較したところ、10ピークが全ての検体で一致し、MRS寒天培地とSI培地のみの比較では、さらに5ピークが一致した。既存のデータベースと照合したところ、いずれのスペクトルも*Lactobacillus paracasei*と非常に高い相同性 (Score Value 2.0以上)を示した。

#### 4. 考察

SI培地から棉栓ろ過によって寒天を除去することで、再現性のよいスペクトルを得ることができた。MALDI-MSで菌の同定を試みる場合、通常、平板上に生育したコロニーを供するのが一般的であるが、本法によりSI培地からの直接集菌、同定に供することが可能となるため、改めてSI培地から寒天培地に植菌・培養する操作が不要となり、同定までの期間短縮が期待された。

また、先述のとおり半流動培地では生育するが、寒天培地では生育が難しい火落菌や腐造性乳酸菌に対して、同定できる可能性が示唆された。

実際の火落菌検査によって白濁、沈殿、液内集落の形成が認められた検体を用いて試験を実施した際に、今回の結果を基に新たに構築したデータベースと従来使用しているデータベースを比較した場合、マッチングスコアが向上するかどうかについては今後の課題である。

#### 参考文献

- (1) Analytical Chemistry, 75(15), pp.3187-22(2003)
- (2) Rapid Commun Mass Spectrom, 20(24), pp.3789-98(2006)
- (3) 分析化学, 53(6), pp.603-608(2004)