

1. MALDI-TOF MS を活用した迅速かつ精緻な微生物同定

○島谷 佳奈果、佐藤 惇、園田 拓三
花王株式会社 安全性科学研究所

1. 目的

食品製造における微生物制御は、pH や水分活性等の微生物の生育に関連する因子を把握し、制御対象となる菌に対して、原料の選別や製造環境の整備、適切な製造条件の設定等の対応が必要となる。このような微生物の危害性や制御法の妥当性を判断する上で、原料や製造環境から検出された菌の特性に関する情報を得ることは必要不可欠であり、数多くの検出菌を迅速かつ正確に同定することが可能な技術が求められる。現在、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いる同定方法は、細菌における菌種同定法の主流として用いられている。一方で、近年普及し始めたマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOF MS) による菌種同定は、データベースに課題はあるものの、操作の簡便性、迅速性に優れた方法である。また、MALDI-TOF MS を用いた解析法は、菌株レベルの識別についても研究が進められている。そこで我々は、飲料製造に用いる原料や製造工程から分離した細菌に対し MALDI-TOF MS による解析を行い、16S rRNA 遺伝子配列の解析と組み合わせることで、迅速かつ簡便で正確な菌種同定および製造関連判断に応用が可能か検討を行った。

2. 方法

果汁、植物エキス、増粘多糖類、デキストリンを孔径 0.45 μm のメンブレンを用いて濾過し、Soybean-Casein Digest (SCD) 寒天培地にのせ、35°C で 2 日間培養を行った。分離したコロニーは、MALDI-TOF MS または 16S rRNA 遺伝子(約 500 bp) の配列から菌種を同定した。菌株識別は、SARAMIS ソフトウェアを用いたクラスター解析からデンドログラムを作成し、菌株間の類縁性を判断した。

3. 結果

植物エキスにおいて、SCD 寒天培地上で 67 CFU /10 g のコロニーが検出された。これらのコロニーを MALDI-TOF MS に供し、マススペクトルパターン解析によって得られたデンドログラムから、2 菌種が存在することが推定された。各菌種のグループから代表的な菌株を選抜し、16S rRNA 遺伝子配列解析に供した結果、*Brevibacillus agri* と *Bacillus megaterium* が同定され、MALDI-TOF MS 解析と一致した。多数のコロニーの菌種同定を行う場合、MALDI-TOF MS による菌種・菌株レベルでの識別情報を活用し、16S rRNA シーケンスに供するコロニーを選別することで、迅速かつ精緻な菌種同定が可能であることが示された。また、原料から分離された数株の *B. agri* を MALDI-TOF MS および Rep-PCR による菌株識別解析に供した結果、各手法によるグルーピング結果は高い一致率を示した。このことから MALDI-TOF MS による菌種同定・菌株識別は、迅速性・簡便性・網羅性に優れ、食品・飲料の製造環境における混入源の特定や環境モニタリングにも有用であることが予想された。