

## 家庭内で調理された食品中における細菌叢の変遷

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2024-01-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 一條, 知昭, 灰尾, 真結子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://osaka-shoin.repo.nii.ac.jp/records/2000074">https://osaka-shoin.repo.nii.ac.jp/records/2000074</a>

## 家庭内で調理された食品中における細菌叢の変遷

健康栄養学部 健康栄養学科 一條 知昭

健康栄養学部 健康栄養学科 灰尾真結子

**要旨：**作り置きは料理の省力化に有効である。冷蔵の場合、調理後の保存期間の目安は2~3日間とされているが、科学的根拠は乏しい。そこで、本研究では作り置きした食品を試料とし、冷蔵保存にともなう細菌叢の変遷を解析した。試料として茹でたほうれん草、きゅうりの浅漬け、きんぴらごぼうを作り、冷蔵庫内に保存した。保存開始後、0、1、3、5、7日目に一部を採取し、細菌数および細菌叢を分析した。細菌数は標準寒天培地を用いた培養法で測定し、細菌叢は試料から培養を経ずに直接抽出したDNAを用いた16S rRNA遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンス法により解析した。その結果、茹でたほうれん草は継続的に細菌数が増加し、きゅうりの浅漬けでは、保存開始後5日目までは、約 $10^5$  CFU/gで推移していたが、7日目で $7.6 \times 10^5$  CFU/gに増加した。細菌叢については、細菌数の増加にともなって大きく変化することが分かった。一方、きんぴらごぼうでは、保存期間中の細菌数は定量限界以下( $<5.0 \times 10^3$  CFU/g)であること、細菌叢の変化は大きくないことが分かった。

**キーワード：**家庭調理、冷蔵保存、細菌モニタリング、アンプリコンシーケンス、16S rRNA 遺伝子

### 1. 背景

近年共働きや単身世帯が増加しており、国勢調査によると、共働きは平成12年には45.3%であったが、平成27年には47.6%と増加している<sup>(1)</sup>。また、同様に単身世帯は平成12年には27.6%であったが、平成27年には34.6%に増加している<sup>(2)</sup>。そのため、中食や作り置きなどで調理に時間をかけない人が多く、作り置きは料理の省力化に有効と考えられる。ソフトブレーン・フィールド株式会社による調査では、直近1年間で「作り置きをしたことがある」と回答した方は「52.8% (n=2,099名)」と半数を超え、そのうち「毎週作り置きをする」と回答した方は、38.9%、「月に2~3回程度」が34.8%と続く<sup>(3)</sup>。

一般的に、作り置き食品の保存期間は、冷蔵保存で2~3日程度と言われているが、著者らの知る限りでは科学的根拠が存在しない。冷蔵保存中における、牛肉に付着した微生物叢の変遷を追う研究<sup>(4)</sup>や、Ready-to-Eat食品の保存中の温度管理の重要性を示す研究<sup>(5)</sup>はあるものの、調理済み食品の保存期間中の細菌叢の変遷に関する論文は見い出されなかった。そこで、本研究では作り置きした食品を試料とし、冷蔵保存に伴う細菌叢の変遷を解析することとした。

従来、食品中の細菌を検出する場合、培養法が広く

用いられている<sup>(6)</sup>。安価で簡単であり、食品衛生の分野で広く用いられているが、結果を得るまでに数日を要す。また、環境中の細菌の90%以上は通常の培養法ではコロニーを形成せず、結果の過小評価となる<sup>(7)(8)</sup>。上記の課題を解決するには、培養法に依存せず、食品環境中の細菌を網羅的に検出可能な手法が必要であり、16S rRNA 遺伝子など細菌の系統分類の基本となる遺伝子を標的とした手法が広く検討されている<sup>(9)(10)(11)</sup>。16S rRNA 遺伝子はタンパク質合成に関わる遺伝子であり、全ての原核生物が保有しているハウスキーピング遺伝子である。保存領域と可変領域を含み、系統分類に用いられる代表的な遺伝子である。また、可変領域上の特定の塩基配列を標的とすることで特定属種の細菌の検出に応用可能である<sup>(12)(13)</sup>。

そこで、本研究では培養に依存しない手法として、16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンス法を用い、作り置き食品中の細菌叢の変遷の解明を目指した。

### 2. 材料と方法

#### サンプル

茹でたほうれん草は、ほうれん草を水道水で洗い、根を切った。沸騰した水に塩をひとつまみ入れ約2分

表 1. 各試料中の細菌数

	0 日目	1 日目	3 日目	5 日目	7 日目
茹でたほうれん草	$< 3.5 \times 10^3$	$< 5.8 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	$> 4.7 \times 10^5$	$> 3.9 \times 10^5$
きゅうりの浅漬け	$1.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$9.4 \times 10^4$	$2.0 \times 10^5$	$7.6 \times 10^5$
きんぴらごぼう	$< 5.3 \times 10^3$	$< 4.1 \times 10^3$	$< 4.4 \times 10^3$	$< 4.7 \times 10^3$	$< 3.1 \times 10^3$

(CFU/g)

間茹でた後、水道水で冷やし、手で絞り、最後に一口大に切った。きゅうりの浅漬けは、きゅうりを水道水で洗い、乱切りにした。ジップロックにきゅうりと浅漬けの素 (100 ml) を入れ、空気を抜いて軽くもみ、冷蔵庫で 30 分間程度漬け込んだ。その後、浅漬けの素は廃棄した。きんぴらごぼうは、ごぼうを洗い、皮をこそげ取り、ささがきにした。水に浸けて褐変を防ぎ、2~3 度水を取り替えて洗った。鍋でごぼうを炒め、砂糖・醤油を加えて味をしみ込ませ、最後に唐辛子を加えて炒めた。試料は全てタッパーに入れ、冷蔵庫 (4℃) にて保存した。それぞれ分析に十分な量を作り、0、1、3、5、7 日目に試料を一部採取し、以下の分析を行った。

#### 生菌数測定

50 ml 容コニカルチューブに試料を約 10 g 採取し、滅菌蒸留水を加えた。ボルテックスミキサーの最大速度で 1 分間処理し、試料に付着している微生物を滅菌蒸留水中に懸濁させた。懸濁液を標準寒天培地 (アテクト) に塗抹し、37℃で 48 時間倒立培養したのち、生じたコロニー数を測定した。

#### DNA 抽出

50 ml 容コニカルチューブに試料を約 10 g 採取し、滅菌蒸留水を加えた。ボルテックスミキサーの最大速度で 5 分間処理し、試料に付着している微生物を滅菌蒸留水中に懸濁させた。20 ml の懸濁液に含まれる微生物を MicroFunnel with Super 0.2 μm (日本ポール) を用いて、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター上に捕集した。

#### 配列解析

16S rRNA 遺伝子の増幅産物を 16S Barcoding Kit 1-24 (Oxford Nanopore Technologies) でシーケンシング前処理を行い、ナノポアシーケンサー MinION (Oxford Nanopore Technologies) で配列解析を行った。

### 3. 結果

#### 保存期間中の細菌数の変遷

保存期間中の細菌数の変化を表 1 に示した。茹でた

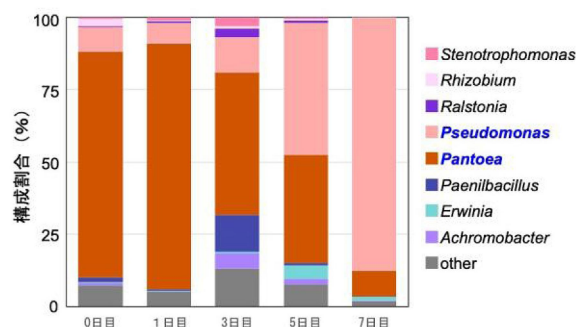


図 1. 茹でたほうれん草中の細菌叢の変化

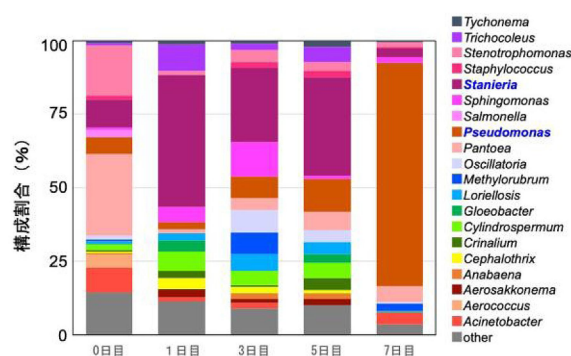


図 2. きゅうりの浅漬け中の細菌叢の変化

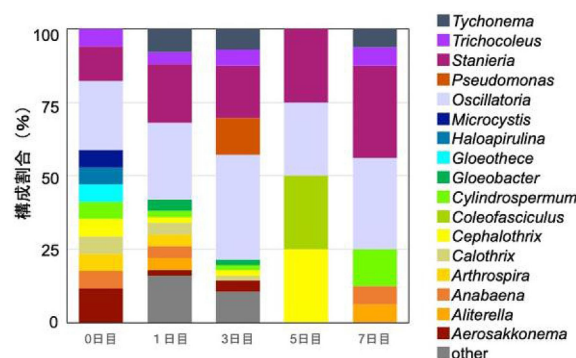


図 3. きんぴらごぼう中の細菌叢の変化

ほうれん草は、保存開始直後では細菌数は定量限界以下と低値を示していたが、3 日目以降細菌数が増加し、5 日目以降は定量上限をも上回った。きゅうりの浅漬けでは、保存開始後 5 日目までは、約  $10^5$  CFU/g で推移していたが、7 日目で  $7.6 \times 10^5$  CFU/g に増加した。きんぴらごぼうでは、保存期間を通じて細菌数は

定量限界以下 ( $<5 \times 10^3$  CFU/g) であった。

保存期間中の細菌群集構造の変遷

細菌群集については、日を追うごとに大きく変化することがわかった (図 2~4)。茹でたほうれん草では、0 日目と 1 日目の間には細菌叢に大きな変化は見られなかったが、3 日目以降は、それまで優占していた *Pantoea* 属細菌が減少し、*Pseudomonas* 属細菌が増加した (図 2)。きゅうりの浅漬けでは、1~5 日目の細菌叢は、保存開始直後と比較して、*Stanieria* 属細菌が存在の割合を増やしていた (図 3)。また、*Pseudomonas* 属細菌も徐々に増加しており、7 日目に優占種となった。一方、きんぴらごぼうでは他の試料と比較して細菌叢の増減に大きな変化が見られなかった (図 4)。

#### 4. 考察

本研究では、作り置き食品として、最終工程が加熱調理でないほうれん草、非加熱調理であるきゅうりの浅漬け、最終工程が加熱調理であるきんぴらごぼうを試料として、冷蔵保存中の細菌叢の変化を明らかにすることを目指した。

茹でたほうれん草やきゅうりの浅漬けでは、保存開始当初は *Pantoea* 属細菌が優占し、その後 *Pseudomonas* 属細菌が大きく存在割合を増やす傾向が見られた (図 2, 3)。また、*Pseudomonas* 属細菌の存在割合が変化するほうれん草試料の 5, 7 日目、きゅうりの 7 日目では細菌数も大きく増加していた (表 1)。すなわち、植物に存在する細菌として知られている<sup>(14)</sup> *Pantoea* 属細菌が保存初期では多く検出されたものの、その後は低温環境に適応した *Pseudomonas* 属細菌が食品中で増殖し、優占したと推測される。*Pseudomonas* 属細菌は水環境やヒトなど幅広い環境に常在する細菌であり<sup>(15)(16)(17)</sup>、*Pseudomonas* 属細菌の中には低温でも増殖可能な種が存在すること<sup>(18)(19)</sup> もこの推測を支持する。この *Pseudomonas* 属細菌の由来は当初から野菜に含まれていた、または調理工程においてヒトや調理器具等から汚染されたことが考えられる。*Pseudomonas* 属細菌の広い分布域や *Pseudomonas* 属細菌はカット野菜から検出されていることが先行研究により報告されている<sup>(14)</sup> ことから、当初から食材の野菜に付着していたものが、冷蔵保存中に増殖したものと考えられる。

一方、きんぴらごぼうでは、保存期間中の細菌数は定量限界以下であること、細菌叢の変化は大きくないことが分かった (表 1, 図 4)。きんぴらごぼうは、調

理中に高温で加熱しており、調理工程で多くの微生物が死滅し、また調理後にまな板などの調理器具や手に触れる機会が限られていたことが影響していると考えられる。

以上のことから、食品を保存するにあたって、加熱調理は有効であると考えられる。しかし、家庭で調理したもの、特に最終工程が加熱でないものは冷蔵保存であっても、なるべく早く消費することが必要であると考えられる。

また、本研究で用いた実験系は、食品中の微生物の全体像を捉えることができるだけでなく、試料の処理から結果の取得までを 1 日で完了することが可能である。従来の培養に依存した食品中の微生物の検査法では、結果を得るまでに数日を要することから大幅な時間短縮が可能である。このことから、本研究で用いた手法は微生物検査の迅速化に有効であり、食品衛生管理の新たな展開が期待されると考えている。

#### 謝辞

本研究は大阪樟蔭女子大学健康栄養学部健康栄養学科食品衛生学研究室の 2020 年度卒業研究として実施した。2020 年度在学生の有若称奈子さん、勝原愛恵さん、佐藤希良梨さん、新里梨沙さん、原涼音さん、森下智美さんの協力に深謝いたします。

#### 参考文献

- (1) 平成 27 年国勢調査、総務省統計局、  
<https://www.stat.go.jp/data/kokusei/2015/kekka/kihon2/pdf/gaiyou.pdf>、2020 年 12 月 17 日
- (2) 平成 27 年国勢調査、総務省統計局、  
<https://www.stat.go.jp/data/kokusei/2015/kekka/kihon3/pdf/gaiyou.pdf>、2020 年 12 月 18 日
- (3) 作り置き、直近 1 年間での経験者半数以上、平日の家事短縮をきっかけに定着化～「作り置きに関するアンケート調査報告」～、ソフトブレン・フィールド株式会社、  
<https://www.sbfield.co.jp/press/20181130-13537/>、2020 年 12 月 17 日
- (4) Ercolini D, Russo F, Torrieri E, Masi P, Villani F. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72(7):4663-4671.

- (5) Jofré A, Latorre–Moratalla ML, Garriga M, Bover–Cid S. Domestic refrigerator temperatures in Spain: Assessment of its impact on the safety and shelf-life of cooked meat products. *Food Res. Int.*, 2019, 126:108578.
- (6) Jackson CR, Randolph KC, Osborn SL, Tyler HL. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC Microbiol.*, 2013, 13:274.
- (7) Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 369–394.
- (8) Staley, J., Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321–346.
- (9) Yamaguchi, N., Ichijo, T., Sakotani, A., Baba, T., Nasu, M., 2012. Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. *Sci. Rep.*, 525.
- (10) Ichijo, T., Yamaguchi, N., Tanigaki, F., Shirakawa, M., Nasu, M., 2016. Four-year bacterial monitoring in the International Space Station–Japanese Experiment Module “Kibo” with culture-independent approach. *npj Microgravity* 2, 16007.
- (11) Kawai M, Ichijo T, Takahashi Y, Noguchi M, Katayama H, Cho O, Sugita T, Nasu M. Culture independent approach reveals domination of human-oriented microbes in a pharmaceutical manufacturing facility. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2019, 137:104973.
- (12) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59(1):143–169.
- (13) Bouvier T, Del Giorgio PA. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003, 44(1):3–15.
- (14) 泉 秀実. カット野菜の微生物学品質と微生物制御. 日本食品科学工学会誌, 2005, 52(5):197–206. (2005)
- (15) 古川 謙介. *Pseudomonas* 物語. 生物工学会誌, 2011, 89(9):549–552.
- (16) Kong HH, Segre JA. Skin microbiome: looking back to move forward. *J. Invest. Dermatol.* 2012, 132(3 Pt 2):933–939.
- (17) Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, 105(46):17994–17999.
- (18) Fonseca P, Moreno R, Rojo F. Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2011, 3(3):329–339.
- (19) Tribelli PM, Solar Venero EC, Ricardi MM, Gómez–Lozano M, Raiger Iustman LJ, Molin S, López NI. Novel Essential Role of Ethanol Oxidation Genes at Low Temperature Revealed by Transcriptome Analysis in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0145353.

## Temporal Changes in Microbial Communities in Home-Cooked Food

Faculty of Health and Nutrition, Department of Health and Nutrition  
Tomoaki ICHIJO

Faculty of Health and Nutrition, Department of Health and Nutrition  
Mayuko HAIO

### Abstract

Meal prepping is an effective method for simplifying cooking tasks. In the case of refrigerated storage, the recommended shelf life for post-cooking storage is generally stated as 2–3 days, but there is limited scientific evidence to support this guideline. Therefore, this study aimed to analyze the changes in microbial communities associated with refrigerated storage of pre-prepared foods. Samples of cooked spinach, lightly pickled cucumbers, and sautéed burdock roots were prepared and stored in a refrigerator. Samples were collected on days 0, 1, 3, 5, and 7 after the start of storage, and bacterial counts and microbial communities were analyzed. Bacterial counts were measured using a culture-based method with standard agar medium, while microbial communities were analyzed using 16S rRNA gene amplicon sequencing, targeting DNA extracted directly from the samples without prior cultivation. The results revealed that bacterial counts steadily increased in the case of cooked spinach, and in the case of lightly pickled cucumbers, the count remained around  $10^5$  CFU/g up to the 5th day but increased to  $7.6 \times 10^5$  CFU/g on the 7th day. It was also observed that the microbial communities changed significantly with the increase in bacterial counts. In contrast, for sautéed burdock roots, bacterial counts remained consistently below the quantification limit ( $<5.0 \times 10^3$  CFU/g) throughout the storage period, and microbial community changes were minimal.

Keywords: home-cooked food, refrigerated storage, bacterial monitoring, amplicon sequencing, 16S rRNA gene