

生ハムの新規迅速製法に関する食品衛生学的研究

—微生物学的安全性の検証と
Listeria monocytogenes 制御のための留意点—

平成 29 年度

大阪市立大学大学院
生活科学研究科 生活科学専攻

大森 康雄

目次

序章

1. 食肉製品に関する法令	2
2. 食肉製品と微生物	5

第1章

生ハムの新規迅速製法における食中毒菌の消長

1.1. はじめに	10
1.2. 材料および方法	11
1.2.1. 供試菌株	11
1.2.2. 培地, 試薬等	11
1.2.3. 菌株の培養	16
1.2.4. 菌株の保存	17
1.2.5. 平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較	17
1.2.6. 選択培地の検討	18
1.2.7. 迅速製法における食中毒菌の消長	20
1.2.8. 統計解析	26
1.3. 結果	27
1.3.1. 平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較	27
1.3.2. 選択培地の検討	27
1.3.3. 迅速製法における食中毒菌の消長	34
1.4. 考察	44
1.4.1. 平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較	44
1.4.2. 選択培地の検討	44
1.4.3. 迅速製法における食中毒菌の消長	46
1.5. 小括	48

第2章

原料肉の細菌検査

2.1.	はじめに	50
2.2.	材料および方法	50
2.2.1.	培地, 試薬等	50
2.2.2.	検体の採取	57
2.2.3.	細菌検査	58
2.3.	結果	66
2.4.	考察	70
2.5.	小括	71

第3章

乳酸処理による *L. monocytogenes* の殺菌

3.1.	はじめに	74
3.2.	材料および方法	75
3.2.1.	供試菌株	75
3.2.2.	培地, 試薬等	76
3.2.3.	供試菌株の培養	77
3.2.4.	供試菌株の保存	77
3.2.5.	乳酸処理	78
3.2.6.	統計解析	78
3.3.	結果	79
3.3.1.	乳酸水溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長	79
3.3.2.	野生株の乳酸耐性	79
3.3.3.	乳酸培地溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長	83
3.4.	考察	89
3.4.1.	乳酸水溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長	89
3.4.2.	野生株の乳酸耐性	89
3.4.3.	乳酸培地溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長	89
3.5.	小括	90

第4章

乳酸処理による *L. monocytogenes* の耐熱性増強

4.1.	はじめに	92
4.2.	材料および方法	93
4.2.1.	供試菌株	93
4.2.2.	培地, 試薬等	93
4.2.3.	供試菌株の培養	94
4.2.4.	供試菌株の保存	94
4.2.5.	乳酸処理	94
4.2.6.	加熱処理	95
4.2.7.	統計解析	96
4.3.	結果	96
4.4.	考察	99
4.5.	小括	99

第5章

乳酸処理による *L. monocytogenes* 耐熱性増強機構の解明

5.1.	はじめに	102
5.2.	材料および方法	104
5.2.1.	供試菌株	104
5.2.2.	培地, 試薬等	104
5.2.3.	供試菌株の培養	108
5.2.4.	供試菌株の保存	109
5.2.5.	乳酸処理	109
5.2.6.	RNA 抽出	110
5.2.7.	RNA 濃度測定	112
5.2.8.	エタノール沈殿	112
5.2.9.	Reverse transcription	112
5.2.10.	定量リアルタイム PCR	114
5.2.11.	統計解析	117

5.2.12. DNase 処理	117
5.2.13. RNA-seq	118
5.3. 結果	119
5.3.1. 乳酸処理による HSGs の発現亢進	119
5.3.2. 乳酸処理による遺伝子発現変化の網羅解析	123
5.4. 考察	129
5.4.1. 乳酸処理による HSGs の発現亢進	129
5.4.2. 乳酸処理による遺伝子の発現変化の網羅解析	130
5.5. 小括	132
総括	133
参考文献	135
謝辞	236

序章

1. 食肉製品に関する法令

我が国における最初のハムは長崎で製造され、第一次世界大戦後に現在主流となっているドイツ式製法が普及したと言われている（押田ら，2013）．今日製造されている食肉製品（ハムやソーセージなど）は、清涼飲料水、牛乳などと同様、その製造基準が食品衛生法により規定されている．規定されているのは、成分規格、製造基準、保存基準である．

成分規格には一般規格と個別規格があり、一般規格として、製品中の亜硝酸の量が 0.070 g/kg を超えてはならないことが定められている．一般規格は種類を問わず、全ての食肉製品で遵守されなければならない事項である．一方、食肉製品は、その製造特性により以下の 5 つのカテゴリーに分類されており、個別規格はカテゴリー別に決められている．(1) 乾燥食肉製品（乾燥させた食肉製品であって、乾燥食肉製品として販売するものをいう）、(2) 非加熱食肉製品（食肉を塩漬けた後、燻煙し、または乾燥させ、かつ、その中心部の温度を 63°C で 30 分間加熱する方法またはこれと同等以上の効力を有する方法による加熱殺菌を行っていない食肉製品で、非加熱食肉製品として販売するものいう．ただし、乾燥食肉製品を除く）、(3) 特定加熱食肉製品（その中心部の温度を 63°C で 30 分間加熱する方法またはこれと同等以上の効力を有する方法以外の方法による加熱殺菌を行った食肉製品をいう．ただし、乾燥食肉製品及び非加熱食肉製品を除く）、(4) 包装後加熱食肉製品（乾燥食肉製品、非加熱食肉製品および特定加熱食肉製品以外の食肉製品で容器包装に入れた後加熱殺菌したもの）、(5) 加熱後包装食肉製品（加熱殺菌した後に容器包装に入れたもの）、以上 5 種である．いわゆる生ハムが含まれる非加熱食肉製品は、a：E. coli（大腸菌の学名ではなく糞便性大腸菌群を意味しており、大腸菌群の内、44.5 °C で 24 時間培養した時に、乳糖を分解して、酸およびガスを産生するもの）が、検体 1 g につき 100 以下でなければならない、b：黄色ブドウ球菌が、検体 1 g につき 1,000 以下でなければならない、c：サルモネラ属菌が陰性でなければならない、d：リステリア モノサイトゲネスが、検体 1 g につき 100 以下でなければならない、と定められている．リステリア モノサイトゲネスの規格は 2014 年に追加された．その他の食肉製品の成分規格については下表に示した．

表. 食肉製品の成分規格

種類	乾燥食肉 製品	非加熱食肉 製品	特定加熱食肉 製品	加熱食肉製品	
				加熱後包装	包装後加熱
大腸菌群	-	-	-	-	陰性
E. coli	陰性	100 以下/g	100 以下/g	陰性	-
黄色ブドウ球菌	-	1,000 以下/g	1,000 以下/g	1,000 以下/g	-
サルモネラ属菌	-	陰性	陰性	陰性	-
クロストリジウム 属菌	-	-	1,000 以下/g		1,000 以下/g
リステリア モノサイトゲネス	-	100 以下/g	-	-	-
その他	水分活性 0.87 未満	-	-	-	-

製造基準の一般基準は、5 項目あり、(1) 製造に使用する原料食肉は、鮮度が良好であって、微生物汚染の少ないものでなければならない、(2) 製造に使用する冷凍原料食肉の解凍は、衛生的な場所で行わなければならない、(3) 食肉は、金属または合成樹脂等でできた清潔で洗浄の容易な不浸透性の容器に収めなければならない、(4) 製造に使用する香辛料、砂糖およびでん粉は、その 1g 当たりの芽胞数が、1,000 以下でなければならない、(5) 製造には、清潔で洗浄および殺菌の容易な器具を用いなければならない、となっている。非加熱食肉製品で、肉塊のみを原料食肉とし、塩水法で製造する場合の個別基準は、①製造に使用する原料食肉は、と殺後 24 時間以内に 4℃ 以下に冷却し、かつ、冷却後 4℃ 以下で保存したものであって、pH が 6.0 以下でなければならない、②製造に使用する冷凍原料食肉の解凍は、食肉の温度が 10℃ を超えることのないようにして行わなければならない、③製造に使用する原料食肉の整形は、食肉の温度が 10℃ を超えることのないようにして行わなければならない、④亜硝酸ナトリウムを使用して塩漬けする場合には、肉塊のまま、食肉の温度を 5℃ 以

下に保持しながら、水分活性が 0.97 未満になるまで行わなければならない、⑤ 15%以上の食塩、塩化カリウムまたはこれらの組み合わせおよび 200 ppm 以上の亜硝酸ナトリウムを含む塩漬液を用いて、食肉を塩漬液に十分浸して行わなければならない、⑥ 燻煙または乾燥は、肉塊のまま、製品の温度を 20°C 以下または 50°C 以上に保持しながら、水分活性が 0.95 未満になるまで行わなければならない。なお、製品の温度を 50°C 以上に保持しながら燻煙または乾燥を行う場合にあっては、製品の温度が 20°C を超え 50°C 未満の状態の時間をできるだけ短縮して行わなければならない、⑦ 燻煙または乾燥後の製品の取扱いは、衛生的に行わなければならない、とある。

保存基準の一般基準は、(1) 冷凍食肉製品（冷凍食肉製品として販売する食肉製品をいう）は、-15°C 以下で保存しなければならない。(2) 製品は、清潔で衛生的な容器に収めて密封するか、ケーシングするか、または清潔で衛生的な合成樹脂フィルム、合成樹脂加工紙、硫酸紙若しくはパラフィン紙で包装して、運搬しなければならない、となっている。非加熱食肉製品で、肉塊のみを原料食肉とし、塩水法で製造する場合の個別基準は、10°C 以下で保存しなければならない、とされている。

この様に、食品衛生法によって食肉製品は、安全性を担保するため、詳細に基準が設けられている。詳細に基準が設けられているが故に、非加熱食肉製品の基準が告示されたのは 1982 年であるが、これまでに新しい製法は考えられてこなかった。我が国で製造される生ハムの多くは、塩水法で製造され、乾燥や燻煙を行うことで香りや保存性が付与されて製品となる。しかしながら、この製法は肉塊からスライスした状態で包装されるまで約 1 ヶ月を要し、食塩濃度のバラつきなど品質の問題や危害微生物による汚染が危惧される。加藤ら (2006) は生ハムの新規迅速製法 (以下迅速製法) を開発した (特許公開番号: 特開 2008-99561)。この製法では、肉を塩漬する前にスライスする。これにより迅速製法は、24 時間以内に生ハムを製造することを可能にし、従来製法 (従来製法) に比べ製造に掛かる時間を大幅に短縮した。この劇的な製造時間の短縮は、主に肉を先にスライスすることで塩漬時に迅速かつ均一にピクル (水に塩や砂糖、調味料などを添加した塩漬工程で肉を漬ける液体) が肉に浸透することによる。そのうえ食塩、亜硝酸、調味料などの濃度管理が容易になり、それ故水分活性の制御もし易

くなっている。製造時間の短縮は、微生物の汚染や増殖する機会を減らすと考えられるが、例えば、作業員から汚染が持ち込まれる場合にはスライスされた肉は重量当たりの表面積が従来製法に比べ大きくなるため、リスクが高くなる可能性がある。そこで本研究は、スライスした原料肉に食中毒菌を接種してから迅速製法に供試し、各工程における消長を従来製法と比較することで迅速製法が微生物学に安全であるかどうかを検証した。

2. 食肉製品と微生物

成分規格に示された細菌を検査することは、それぞれ衛生上の意義がある。大腸菌群は、グラム陰性、芽胞を形成しない好気性または通性嫌気性桿菌で、乳糖を48時間以内に分解して酸とガスを産生するものと定義されている一群の細菌である。大腸菌群という名称は食品衛生の分野で使用されるもので、細菌分類学でいう *Escherichia* や *Enterobacter* など多くの腸内細菌科の菌群が含まれる。大腸菌群は従来、食品中における糞便汚染の指標として扱われ、陽性の場合、赤痢菌やコレラ菌などの腸管系病原菌や食中毒菌の存在の可能性がある不潔な食品と判定されてきたが、大腸菌群の性状を示す菌は自然環境にも広く分布しており、ヒトや動物の糞便とは直接関係ない水生細菌の *Aeromonas* なども含まれることから、今日では安全性の指標というよりは環境衛生管理上の汚染指標菌として考え、加熱済みの食品からの検出は不適当な加熱処理など取扱いの不備を示すものとされている（公益社団法人 日本食品衛生協会，2015）。

E. coli は、糞便系大腸菌群と同義とされ、大腸菌群の内 44.5°C で発育するものである。分類学上の大腸菌が存在することを示すためには、インドール産生能、メチルレッド反応、Voges-Proskauer 反応およびシモンズのクエン酸塩利用能の4つを検査する IMViC 試験を実施しなければならないが、これが煩雑なため、IMViC 試験を行わずに大腸菌の存在を推定しようという意図で考えられた菌群である。*E. coli* の検出は、製品ができるまで不適切な取り扱いを受けたこと、腸管系病原菌の汚染の可能性が高いことを推測する指標とされている（公益社団法人 日本食品衛生協会，2015）。

サルモネラはグラム陰性の通性嫌気性桿菌で、*Salmonella enterica* と *bongori* の2菌種があるが、血清型は2,500種類に及ぶ。サルモネラ属菌による食中毒の主

要な原因食品は、鶏卵を始めとした畜産物である。それ故、食品のサルモネラ属菌の検査には、それ自体食中毒防止の目的があるが、それだけではなく、取扱いが衛生的に行われていることを示す「食肉製品に関連の高い食中毒菌の指標」とされている（公益社団法人 日本食品衛生協会，2015）。

黄色ブドウ球菌は、グラム陽性、無芽胞の通性嫌気性菌で、毒素エンテロトキシンを産生する食中毒菌であるが、健康なヒトの鼻腔や手指、家畜などの様々な動物の腸管内や体表に生息しており、食肉にも汚染がある。このことから製造時の手指および器具などからの汚染の指標として用いられている。

クロストリジウムは、グラム陽性、偏性嫌気性の芽胞形成菌である。製造時の加熱により競合菌が死滅すること、製品を真空包装、ガス置換包装することによりクロストリジウム属菌が発芽・増殖しやすい環境が生まれる。それ故、温度管理が重要であるが、クロストリジウム属菌が製品中に大量に認められる場合には、加工、輸送、加熱後の冷却、保存に不備があったと推測できる。クロストリジウム属菌にはウエルシュ菌やボツリヌス菌も含まれるため食中毒リスクもある（公益社団法人 日本食品衛生協会，2015）。

Listeria monocytogenes（リステリア モノサイトゲネス）は、グラム陽性、通性嫌気性の桿菌である。当初は動物に対してのみ感染すると思われていたが、1970年代になってヒトにも感染することが明らかとなった。さらに1980年代になって食中毒菌であることが認知され（Schlechら，1983）、これまでに野菜、チーズ、肉など様々な食品がリステリア症の原因となり、環境、食品製造現場そして食品中など様々な場所にリステリアが存在することが明らかになった（Canadian Food Inspection Agency，2009；CDC，1985；Flemingら，1985；Gouletら，1998；Hoら，1986；Linnanら，1988；Nakamuraら，2004，2006；Schlechら，1983）。リステリア属菌は現在までに17種知られているが、ヒトに対して危害となるのはモノサイトゲネスのみである（RadoshevichとCossart，2018；OrsiとWiedmann，2016）。リステリア モノサイトゲネスの特徴は、低温、幅広いpH（4.3から9.5）、10%以上の食塩濃度で生育できることである（DonnellyとBriggs，1986；Farber，2000；Farberら，1989）。これが燻製品などの保存食を含む幅広い食品で本菌による食中毒の集団発生や散发事例が発生する要因となっていると考えられる。2010年には、リステリア症患者は世界中で23,150人、その内死者

が 5,463 人であったとの推計があり (de Noordhout ら, 2014), 2017 年には南アフリカで大規模食中毒事件が発生し, 12 月 13 日までに発症者約 600 人, 死者約 40 人が報告されている (Outbreak News Today, 2017). 以上のことから, リステリア モノサイトゲネスは生ハムで大きな危害となる可能性がある. そこで本研究では特にリステリア モノサイトゲネスに焦点を当て, 制御方法を検証した.

第1章

生ハムの新規迅速製法における食中毒菌の消長

1.1. はじめに

本章では、迅速製法で製造した生ハムのリスクを評価する為に、代表的な食中毒菌を原料となる食肉に接種し工程中または製品保存中に制御できるかどうかを従来製法と比較することにした。リステリア モノサイトゲネス、enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7（腸管出血性大腸菌 O157: H7）、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis（サルモネラ エンテリティディス）、*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）を豚ロース肉に接種し、これら食中毒菌の消長を確認するとともに、一般生菌数、大腸菌群数、クロストリジウム属菌数、低温増殖性乳酸菌数についても衛生指標菌として、その消長を調べた。検出にあたっては、一度に複数の検体を細菌検査に供試する為、1つの検体の検査に掛かる時間が長くなるほど正確な結果が得られなくなる可能性が考えられた。そのため、精度を保ちつつ可能な限り迅速に検査を行う必要があると考え、スパイラルプレーティング法の採用を検討した。スパイラルプレーティング法は、塗沫法による細菌数の測定を簡易化、迅速化することを目的として、FDA（アメリカ食品医薬局）の Gilchrist ら（1973）によって開発された。スパイラルプレーターによって検体を寒天培地表面に自動的に区画毎に予め決まった量を塗沫する方法であり、理論的には 500-500,000 個程度の細菌を一枚の寒天培地で測定できる（社団法人 日本食品衛生協会，2004）。スパイラルプレーティング法は、FDA の検査法に記載されており、他にも APHA（アメリカ公衆衛生協会）と AOAC（アメリカ公的分析科学者協会）に公認され、標準平板培養法の代わりに利用できるとされており、日本では食品衛生検査指針 微生物編に掲載されている。スパイラルプレーティング法は従来製法と極めて高い相関があることが証明されている（Gilchrist ら，1977；和田ら，1986）。

1.2. 材料および方法

1.2.1. 供試菌株

- ・腸管出血性大腸菌 O157:H7 96-98-83 株（以下，腸管出血性大腸菌）
大阪市立環境科学研究所で下痢症患者の糞便より分離された株である。
- ・サルモネラ エンテリティディス PT-1 株（以下，サルモネラ）
大阪市立環境科学研究所で下痢症患者の糞便より分離された株である。
- ・黄色ブドウ球菌 96-55-11A 株（以下，黄色ブドウ球菌）
大阪市立環境科学研究所で下痢症患者の糞便より分離された株である。
- ・サルモネラ（白）
サルモネラを CHROMagar O157 で培養した際に，コロニーが白色を呈した
もの。
- ・サルモネラ（紫）
サルモネラを CHROMagar O157 で培養した際に，コロニーが紫色を呈した
もの。
- ・サルモネラ（青）
サルモネラを CHROMagar O157 で培養した際に，コロニーが青色を呈した
もの。
- ・リステリア モノサイトゲネス ATCC7644 1/2c（以下，リステリア）
American Type Culture Collection（ATCC）（Virginia, USA）より購入した。

1.2.2. 培地，試薬等

- ・ドルセットの卵培地
日水製薬株式会社。（東京，日本）（以下，日水製薬）製を使用した。使用ま
で常温に保存した。
- ・トリプトソーヤブイヨン（以下 TSB）
日水製薬製を使用した。純水 500 ml に TSB 15.0 g を溶解後，10 ml ずつ試
験管に分注し，オートクレーブ滅菌（121℃，15 分）した。使用まで常温で保
存した。
- ・トリプトソーヤ寒天培地（以下，TSA）

日水製薬製を使用した。純水 400 ml に TSA 16.0 g を溶解後、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで常温で保存した。

- ・リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄)

和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) (以下, 和光純薬) 製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・水酸化ナトリウム (以下, NaOH)

和光純薬製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・1N NaOH 水溶液

NaOH 8.0 g に純水 200 ml を加え、溶解させた。使用まで常温で保存した。

- ・塩化ナトリウム (以下, NaCl)

和光純薬製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・リン酸緩衝生理食塩水 (以下, PBS)

リン酸二水素カリウム 34.0 g を純水 500 ml に溶解後、1N NaOH 水溶液を約 175 ml 添加して pH を 7.2 に調整し、純水で 1000 ml にメスアップした。オートクレーブ滅菌し、室温まで冷却した。これを原液とし、使用時に純水で 800 倍に希釈したものに 0.85% となるように NaCl を添加し、オートクレーブ滅菌した。使用まで常温で保存した。

- ・Dimethyl sulfoxide (以下, DMSO)

Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA) 製を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・Egg yolk-tellurite emulsion (以下, 亜テルル酸加卵黄乳液)

OXOID Ltd. (Basingstoke, Hampshire, UK) (以下, OXOID) 製を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- ・Baird-Parker 寒天培地

OXOID 製を使用した。25.2 g を純水 400 ml に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、亜テルル酸加卵黄乳液を 20 ml 添加し十分に混合した。直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した (以下, Baird-Parker)。使用まで 4°C で保存した。

- ・MLCB 寒天培地

日水製薬製を使用した。19.6 g を純水 400 ml に添加し、電子レンジで加温溶解させた（オートクレーブ滅菌はしない）。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した（以下、MLCB）。使用まで 4°C で保存した。

- ・X.L.D.寒天培地

OXOID 製を使用した。21.2 g を純水 400 ml に添加し、電子レンジで加温溶解させた（オートクレーブ滅菌はしない）。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで 4°C で保存した。

- ・Bismuth sulphite 寒天培地

OXOID 製を使用した。16.0 g を純水 400 ml に添加し、電子レンジで加温溶解させた（オートクレーブ滅菌はしない）。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで 4°C で保存した。

- ・Hektoen enteric 寒天培地

OXOID 製を使用した。30.4 g を純水 400 ml に添加し、電子レンジで加温溶解させた（オートクレーブ滅菌はしない）。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで 4°C で保存した。

- ・CHROMagar O157

CHROMagar (Paris, France) 製を使用した。11.7 g を純水 400 ml に添加し、電子レンジで加温溶解させた（オートクレーブ滅菌はしない）。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで 4°C で保存した。

- ・セフスロジンナトリウム（以下、セフスロジン Na）

関東化学株式会社。（東京，日本）（以下，関東化学）より購入した。使用まで凍結保存した。

- ・TSI 培地

栄研化学株式会社（東京，日本）（以下，栄研化学）製を使用した。30.0 g を

純水 500 ml に溶解後，約 3 ml ずつ小試験管に分注し，オートクレーブ滅菌した．高層斜面（上部 1/3 が斜面，下部 2/3 が高層）培地となるように固化させた．使用まで常温に保存した．

- ・ LIM 培地

栄研化学製を使用した． 15.0 g を純水 500 ml に溶解後，約 3 ml ずつ小試験管に分注し，オートクレーブ滅菌した．高層培地となるように固化させた．使用まで常温に保存した．

- ・ 酵母エキス（以下，YE）

Becton, Dickinson and Company (Maryland, USA) 製を使用した．使用まで常温に保存した．

- ・ 0.6% YE 加 TSB（以下，TSBYE）

純水 500 ml に TSB 15.0 g 及び YE 3.0 g を溶解後，10 ml ずつ試験管に分注し，オートクレーブ滅菌した．室温まで冷却した後，使用まで常温で保存した．

- ・ 0.6% YE 加 TSA（以下，TSAYE）

純水 400 ml に TSA 16.0 g, YE 2.4 g を溶解後，オートクレーブ滅菌した．約 50°C に冷却後，直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し，固化するまで静置した．使用まで常温で保存した．

- ・ リステリア選択剤

Merck KGaA (Darmstadt, Germany)（以下，Merck）製を使用した．使用まで 4°C で保存した．

- ・ PALCAM Listeria selective agar

Merck 製を使用した． 35.9 g を純水 500 ml に溶解させ，オートクレーブ滅菌した．約 50°C に冷却後，滅菌水 1 ml に溶解したリステリア選択剤 1 バイアルを添加し十分に混合した．直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し，固化するまで静置した（以下，PALCAM）．使用まで 4°C で保存した．

- ・ 標準プレートカウント寒天培地

関東化学製分包タイプを使用した．純水 400 ml に 1 包 (9.4 g) を溶解させ，オートクレーブ滅菌した．約 50°C に冷却後，直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し，固化するまで静置した．使用まで常

温で保存した.

- ・デソキシコレート寒天培地

OXOID 製を使用した. 18.0 g を純水 400 ml に溶解させ, 電子レンジで加温溶解した (オートクレーブ滅菌はしない). 約 43°C に冷却後使用した.

- ・ de Man Rogosa Sharpe (MRS) ブイヨン

OXOID 製を使用した. 使用まで常温で保存した.

- ・寒天

和光純薬製を使用した. 使用まで常温で保存した.

- ・ MRS 寒天培地

MRS ブイヨン 20.8 g と寒天 4.0 g を純水 400 ml に添加し, オートクレーブ滅菌した. 約 45°C に冷却後使用した.

- ・ アネロパックシステム (嫌気培養)

三菱ガス化学株式会社 (東京, 日本) (以下, 三菱ガス化学) 製アネロパック・ケンキおよびアネロパック角型ジャーを使用した.

- ・ クロストリジア測定用培地

日水製薬製を使用した. 28.2 g を 400ml の純水に添加し, オートクレーブ滅菌した. 約 55°C に冷却し使用した.

- ・ 嫌気パウチ

三菱ガス化学製を使用した.

- ・ 滅菌袋

株式会社アイセロ (豊橋, 愛知, 日本) 製を使用した.

- ・ フィルター付きストマッカーバッグ

ELMEX (東京, 日本) 製を使用した.

- ・ 生ハム (市販品)

従来製法で製造した生ハムを想定して, 市販品を購入した. 使用まで 10°C で保存した.

- ・ スライサー

ワタナベフーマック株式会社 (名古屋, 愛知, 日本) (以下, ワタナベフーマック) 製 Super deluxe slicer WSD を使用した.

- ・ 冷凍冷蔵庫

ホンザキ株式会社（豊明，愛知，日本）製テーブル型冷蔵庫 RT-150SNC を使用した.

- ・ 冷蔵庫

三菱電機エンジニアリング株式会社（東京，日本）製 CN-25C を使用した.

- ・ 乾燥庫

株式会社小野商事（市原，千葉，日本）より購入した KLIMA K-750 を使用した.

- ・ 真空包装機

ワタナベフーマック.製 COMPACK WVC-J280B を使用した.

- ・ 塩分計

東亜ディーケーケー株式会社（東京，日本）製 Salt Analyzer SAT-210 を使用した.

- ・ 水分活性測定機

Decagon Devices Inc. (Pullman, Washington, USA) 製 AquaLab model CX-3 TE を使用した.

- ・ pH メーター

株式会社堀場製作所（京都，日本）製 pH Meter F-52 を使用した.

- ・ 分光光度計

日本分光株式会社（八王子，東京，日本）製 V-530 UV-VIS spectrophotometer を使用した.

- ・ スパイラルプレーター

IUL, S. A. (Barcelona, Spain) 製 Eddy Jet を使用した.

- ・ オートダイリューター

IUL, S. A.製 BIO DILUTOR を使用した.

- ・ ストマッカー

IUL, S. A.製 Masticator Classic 400 ml を使用した.

1.2.3. 菌株の培養

1) 各菌株を保存培地から白金線を用いて採取し，それぞれTSBに植菌して.

37°Cで一晩培養した.

- 2) 培養液を一白金耳採り, 新しいTSBに継代し, 37°Cで一晩培養した.
リステリアについては, TSBに替えTSBYEを使用した.

1.2.4. 菌株の保存

- 1) 継代培養した培養液に5.0%となるようにDMSOを無菌的に添加し, 混和した.
- 2) 1.5 mlチューブに0.5 mlずつ分注し, -45°Cで凍結保存した.

1.2.5. 平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較

1.2.5.1. 平板塗抹法

- 1) オートダイリ्यूターで菌株培養液の10倍希釈系列をPBSで作製した.
- 2) 適切な希釈系列より100 µlを採取した.
- 3) 2枚のTSAにそれぞれ滴下し, コンラージ棒にて塗抹した.
- 4) 37°Cで一晩培養した.
- 5) 培地表面に形成されたコロニー数を計数した.

1.2.5.2. スパイラルプレーティング法

- 1) オートダイリ्यूターで菌株培養液の10倍希釈系列をPBSで作製した.
- 2) 適切な希釈系列より1 mlを専用サンプルカップに採取した.
- 3) 培地量の異なる3種類のTSA (15 ml, 20 ml, 25 ml) 2枚ずつにそれぞれスパイラルプレーティングした.
- 4) 表面が乾燥するまでガスバーナーの近くに置いた.
- 5) 37°Cで24時間培養した.
- 6) 培地表面に形成されたコロニー数を計数した.
- 7) 同様の試験を4回行い, 平均を算出した.
- 8) 統計解析を行い, 平板塗抹法, スパイラルプレーティング法 (培地量 15 ml, 20 ml, 25 ml) の間に差があるかどうかをそれぞれ検定した.

1.2.6. 選択培地の検討

1.2.6.1. 各選択培地におけるコロニー生育数の比較

- 1) オートダイリ्यूターで菌株培養液の 10 倍希釈系列を PBS で作製した。
- 2) 10 倍希釈系列より 1 ml を専用サンプルカップに採取した。
- 3) それぞれの選択培地にそれぞれスパイラルプレーティングした。
- 4) 表面が乾燥するまでガスバーナーの近くに置いた。
- 5) 37°C で 24 時間または 48 時間培養した。
- 6) コロニーの形成状態、培地の透明度（スパイラルプレーティング法では、区画毎に検体溶液の塗抹量が決まっている為、培地を透かして平板裏の区画線を確認する必要がある）等を確認した。

1.2.6.2. 選択培地と非選択培地の検出コロニー数の比較

- 1) オートダイリ्यूターで菌株培養液の 10 倍希釈系列を PBS で作製した。
- 2) 10 倍希釈系列より 1 ml を専用サンプルカップに採取した。
- 3) それぞれの選択培地（CHROMagar O157, MLCB, Baird-Parker, PALCAM）と TSA（リステリアのみ TSAYE）にそれぞれスパイラルプレーティングした。
- 4) 表面が乾燥するまでガスバーナーの近くに置いた。
- 5) 37°C で 24 時間または 48 時間培養した。
- 6) 形成されたコロニー数を計数した。
- 7) 統計解析を行い、検出された菌数に違いがあるかどうか確認した。

1.2.6.3. 生ハムサンプルの調製

- 1) 豚ロース肉を厚さ約 1 mm にスライスした。
- 2) 15% NaCl および 0.25%の亜硝酸 Na を含むピクルに 10°C で 35 分間浸漬した。
- 3) 18°C, 相対湿度 85%で 18 時間乾燥した。
- 4) 滅菌袋に入れ、真空包装した。
- 5) 使用まで 10°C に保存した。

1. 2. 6. 4. 夾雑物存在下での食中毒菌の検出

- 1) 生ハム（市販品および調製サンプル）から 25 g ずつ採り，それぞれフィルター付きストマッカーバッグに入れた。
- 2) 10 倍希釈となるように PBS を添加した。
- 3) ストマッカーで 60 秒均質化を行った。
- 4) 各菌株培養液を終濃度 5 Log CFU/ml 程度となるようにそれぞれ別々の均質化溶液に添加した。
- 5) 再度 30 秒均質化を行い，菌をよく混合した。
- 6) オートダイリ्यूーターを用いて PBS で希釈系列を作製した。
- 7) それぞれの選択培地（CHROMagar O157, MLCB, Baird-Parker）と TSA にそれぞれスパイラルプレーティングした。
- 8) 表面が乾燥するまでガスバーナーの近くに置いた。
- 9) 37°C で 24 時間または 48 時間培養した。
- 10) 形成されたコロニー数を計数した。
- 11) 統計解析を行い，検出された菌数に違いがあるかどうか確認した。

1. 2. 6. 5. 各菌株に対する選択培地の選択性確認

- 1) 菌株培養液を各選択培地に一白金耳を画線塗抹した。
- 2) 37°C で 24 時間または 48 時間培養した。
- 3) コロニー形成の有無を確認した。

1. 2. 6. 6. CHROMagar O157 で検出されたサルモネラの確認

- 1) MLCB に画線塗抹した。
- 2) TSI 培地には，高層部の底まで穿刺し，斜面部は画線を行った。
- 3) LIM 培地には，半分の位置まで穿刺した。
- 4) 37°C で 24 時間培養した。

1. 2. 6. 7. 生ハムに混合接種した食中毒菌の検出

- 1) PBS 50 ml にそれぞれの菌株培養液を約 5 Log CFU/ml となるように添加した。

- 2) 生ハム（市販品および調製サンプル）約 25 g ずつをそれぞれ菌液に 1 分浸漬した。
- 3) 生ハムを取り出し，1 分ステンレス製の網の上で風乾した。
- 4) 生ハムをそれぞれフィルター付きストマッカーバッグに入れ，10 倍希釈となるように PBS を添加した。
- 5) ストマッカーで 60 秒均質化を行った。
- 6) オートダイリ्यूーターを用いて PBS で希釈系列を作製した。
- 7) それぞれの選択培地（CHROMagar O157, MLCB, Baird-Parker）と TSA にそれぞれスパイラルプレーティングした。
- 8) 表面が乾燥するまでガスバーナーの近くに置いた。
- 9) 37°C で 24 時間または 48 時間培養した。
- 10) 形成されたコロニー数を計数した。
- 11) 必要に応じて統計解析を行い，検出された菌数に違いがあるかどうか確認した。

1.2.7. 迅速製法における食中毒菌の消長

1.2.7.1. 供試肉の準備

デンマーク産豚ロース肉を使用した。

・従来製法

- 1) 豚ロース肉を肉温が 10°C を超えないように半解凍した。
- 2) pH が 6.0 未満であることを確認した。
- 3) 一塊当たり 400 g（長さ：10.0±0.7 cm×幅：6.1±0.5 cm×厚さ：6.8±0.8 cm）となるように切った。
- 4) 肉塊は冷凍冷蔵庫で 5°C に保存した。

・迅速製法

- 1) 豚ロース肉を肉温が 10°C を超えないように半解凍した。
- 2) スライサーで厚さおよそ 1 mm/枚となるようにスライスした。
- 3) これを 3 枚 1 組で約 5 mm ずつずらして重ねた。
- 4) 食品用ラップに包んだ。
- 5) 冷凍冷蔵庫で -3°C に保存した。

1.2.7.2. 菌液の作製

- 1) 各菌株の凍結保存チューブから一白金耳ずつ、それぞれ TSB または TSBYE に懸濁した。
- 2) 37°C で菌数が約 8 Log CFU/ml となるまで一晩培養した。
- 3) 各菌株培養液を 50 ml チューブに移した。
- 4) 10,000×g, 5 分, 4°C で遠心分離を行った。
- 5) 上清を棄て、PBS で懸濁した。
- 6) 10,000×g, 5 分, 4°C で遠心分離を行った。
- 7) 上清を棄て、PBS で懸濁した。
- 8) 10,000×g, 5 分, 4°C で遠心分離を行った。
- 9) 上清を棄て、PBS で懸濁した。
- 10) 黄色ブドウ球菌, 腸管出血性大腸菌, サルモネラを同じ滅菌袋に、それぞれ濃度約 5 Log CFU/ml となるように PBS に添加し、接種用菌液とした。
- 11) リステリアは、単独で濃度約 5 Log CFU/ml となるように PBS に添加し、接種用菌液とした。

1.2.7.3. 菌の接種

菌の接種は、菌液に肉を浸漬することで行った。

- 1) 肉重量に対して 2 倍量の接種用菌液に肉を 1 分間浸漬した。
- 2) 1 分間安全キャビネット内で余分な液を落とした。

1.2.7.4. 非加熱食肉製品の製造

・従来製法

日本の食品衛生法に準じて製造した。

- 1) 肉塊重量の60%量のピクル（15%食塩，10%水あめ，20%ブドウ糖，2%グルタミン酸，0.25%亜硝酸Na製剤（10%亜硝酸Na含），0.5%アスコルビン酸Na，52.25%水）に肉塊を浸漬した（塩漬）。
- 2) 水分活性が0.97未満となるまで冷凍冷蔵庫（5°C）で塩漬した。
- 3) 温度18°C，湿度85%の乾燥庫に静置した。
- 4) 水分活性0.95未満となるまで乾燥を行った。

5) 滅菌袋に入れ，真空包装機で真空包装を行った。

6) 冷凍冷蔵庫（10℃）で保存した。

今回の試験では室内への菌の飛散を考慮して，スライスは行わなかった。

・迅速製法

1) 従来製法と同配合のピクルスをスライス肉重量の60%量添加し，スライス肉を塩漬した。

2) 水活性0.97未満となるまで冷蔵庫（10℃）で塩漬した。

3) 温度18℃，湿度85%の乾燥庫に静置した。

4) 水分活性0.95未満となるまで乾燥を行った。

5) 滅菌袋に入れ，真空包装機で真空包装を行った。

6) 冷凍冷蔵庫（10℃）で保存した。

1.2.7.5. 細菌検査用検体の採取

・従来製法

1) 黄色ブドウ球菌，腸管出血性大腸菌，サルモネラを接種した肉は，接種後，塩漬後，乾燥後，10℃保存7日目に検体を5個ずつ採取した。

2) 菌を接種していない同様の非加熱食肉製品を製造し，各工程後検体を5個ずつ採取した。

3) リステリアを接種した肉は，真空包装後，10℃で保存し7日間毎に検体を3個ずつ採取した。

4) 滅菌したナイフで肉塊短径の中心部に対して垂直に輪切りにしたものおよそ25 gを細菌検査用検体とした。

5) 検体を無菌的にフィルター付ストマッカーバッグに入れた。

6) PBSで10倍希釈した後，ストマッカーで90秒均質化した。

・迅速製法

1) 黄色ブドウ球菌，腸管出血性大腸菌，サルモネラを接種した肉は，接種後，塩漬後，乾燥後，10℃保存7日目，12日目に検体を5個ずつ採取した。

2) 菌を接種していない同様の非加熱食肉製品を製造し，各工程後検体を5個

ずつ採取した。

- 3) リステリアを接種した肉は、真空包装後、10°Cで保存し7日間毎に検体を3個ずつ採取した。
- 4) スライス肉3枚1組全量を細菌検査用検体とした（およそ20-30 g）。
- 5) 検体を無菌的にフィルター付ストマッカーバッグに入れた。
- 6) PBSで10倍希釈した後、ストマッカーで90秒均質化した。

1.2.7.6. 菌数測定

・黄色ブドウ球菌数の測定

- 1) 均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) Baird-Parker にスパイラルプレーティングした。
- 3) 37 °C で 48 時間培養した。
- 4) 典型的なコロニーを計数した。
- 5) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

・腸管出血性大腸菌数の測定

- 1) 均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) CHROMagar O157 にスパイラルプレーティングした。
- 3) 37°C で 24 時間培養した。
- 4) 典型的なコロニーを計数した。
- 5) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

・サルモネラ数の測定

- 1) 均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) MLCB にスパイラルプレーティングした。
- 3) 37°C で 24 時間培養した。
- 4) 典型的なコロニーを計数した。
- 5) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

・リステリア数の測定

- 1) 均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) PALCAM にスパイラルプレーティングした。
- 3) 37°C で 48 時間培養した。
- 4) 典型的なコロニーを計数した。
- 5) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

・一般生菌数の測定

- 1) 菌を接種していない検体の均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) 標準プレートカウント寒天培地にスパイラルプレーティングした。
- 3) 35°C で 48 時間培養した。
- 4) コロニーを計数した。
- 5) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

・大腸菌群数の測定

- 1) 菌を接種していない検体の均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) 1 ml をシャーレに滴下し，デソキシコレート寒天培地 15 ml を入れ，充分に混和した。
- 3) 培地が固化した後，デソキシコレート寒天培地を 5 ml 重層した。
- 4) 培地が固化した後，35°C で 24 時間培養した。
- 5) 典型的なコロニーを計数した。
- 6) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

・低温増殖性乳酸菌数の測定

- 1) 菌を接種していない検体の均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) 1 ml をシャーレに滴下し，MRS 寒天培地 15 ml を入れ，充分に混和した。
- 3) 培地が固化した後，MRS 寒天培地を 5 ml 重層した。

- 4) 培地が固化した後、アネロパックシステムを用いて嫌気状態にした。
- 5) 10°C で 10 日間培養した。
- 6) コロニーを計数した。
- 7) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

・クロストリジウム属菌数の測定

- 1) 菌を接種していない検体の均質化液から PBS で 10 倍希釈系列を作製した。
- 2) 適当な希釈系列から 10 ml を試験管に採り、70°C、20 分で加熱処理した。
- 3) 10 ml を嫌気パウチに添加し、クロストリジア測定用培地 15 ml を入れ、十分に混合した。
- 4) 気泡を除去し、首部をシーラーでシールした。
- 5) 35°C で 24 時間培養した。
- 6) 典型的なコロニーを計数した。
- 7) 消長に有意差があるか統計解析を行い確認した。

1.2.7.7. 理化学分析

菌を接種していない製品を用いて、食塩濃度、水分活性、pH、亜硝酸濃度の測定を行った。ピクル、原料肉、塩漬後、乾燥後、10°C 保存 7 日後の検体で測定を行った。

・従来製法生ハムの検体調製

- 1) 肉塊の 6 面を厚さ 5 mm で切り落とした。
- 2) 残った部分をフードカッターで破碎し均質化したものを検査に供試した。

・迅速製法生ハムの検体調製

- 1) スライス肉 3 枚 1 組全量をフードカッターで破碎し均質化したものを検査に供試した。

・食塩濃度の測定

- 1) 検体 1 g をイオン交換水で 50 倍希釈した。

- 2) 湯浴にて 80°C で 20 分間加熱した.
- 3) 塩素イオン濃度を塩分計で電量滴定法により測定した.
- 4) 塩素イオン濃度から食塩濃度を算出した.
- 5) 従来製法と比較して値に差があるか統計解析を行い, 確認した.

・水分活性の測定

- 1) 検体を測定用カップに一様に詰めた.
- 2) 水分活性測定機により露点法で測定した.
- 3) 従来製法と比較して値に差があるか統計解析を行い, 確認した.

・pH の測定

- 1) 検体 5 g をイオン交換水で 10 倍希釈した.
- 2) pH メーターで測定した.
- 3) 従来製法と比較して値に差があるか統計解析を行い, 確認した.

・亜硝酸濃度の測定

- 1) ジアゾ化法で比色吸光度を分光光度計で測定した.
- 2) 従来製法と比較して値に差があるか統計解析を行い, 確認した.

一連の試験をそれぞれ 3 度行った.

1.2.8. 統計解析

菌数に関わる統計解析は全て Log 形式で行った. コロニーが検出されなかった場合には, 検出限界値と同じとして計算した. 理化学分析において値が検出されなかった場合には, 検出限界値として示した.

“平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較”あるいは, “選択培地の検討”では Tukey-Kramer 法で分散分析 (一元配置) および多重比較検定を行った. 二群間比較のみの場合は, 一元配置分散分析および Student's t-test を使用した.

“迅速製法における食中毒菌の消長”で, 各工程もしくは経過日数が菌の消長に与える影響は Tukey-Kramer 法で分散分析 (一元配置) および多重比較検定を

行って統計解析した。各工程における EC, SA, SE の消長の差は Tukey-Kramer 法で分散分析（二元配置）および多重比較検定を行って確認した。従来製法と迅速製法における理化学分析の結果の違いは、Student's t-test 及び Welch's t-test を用いて統計解析した。

1.3. 結果

1.3.1. 平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較

腸管出血性大腸菌，サルモネラ，黄色ブドウ球菌いずれにおいても平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の間で，検出された菌数に有意差はなかった ($P > 0.05$) (Table 1)。また，スパイラルプレーティング法で培地量による検出感度にも差がなかった ($P > 0.05$)。

1.3.2. 選択培地の検討

各選択培地のコロニー生育数の比較

腸管出血性大腸菌について，CHROMagar O157 で検出されたコロニーは，一様に腸管出血性大腸菌に典型的な藤色で，腸管出血性大腸菌のコロニーとして判別し易いものであった。培地の透明度も充分であり，区画の確認を妨げるものではなかった (Fig. 1A)。黄色ブドウ球菌について，Baird-Parker で検出されたコロニーは，一様に黄色ブドウ球菌に典型的な黒色で卵黄反応を示すもので，黄色ブドウ球菌のコロニーと判別し易いものであった。培地の透明度は充分ではないが，区画の確認を妨げるほどのものではなかった (Fig. 1B)。サルモネラについて，MLCB で検出されたコロニーは，一様にサルモネラに典型的な黒色で，容易にサルモネラのコロニーと判別できた。培地の透明度は問題無く区画の確認ができるものであった (Fig. 1C)。一方 X.L.D.寒天培地および Hektoen enteric 寒天培地では，サルモネラに典型的な黒色コロニーはコロニーの密度が低い培地外周部でのみ確認され，密度が濃い部分では確認できなかった (Fig. 1D, F)。Bismuth sulphite 寒天培地では一様に黒色コロニーが形成されたが，培地の透明度が低く，区画が確認し難いものであった (Fig. 1E)。

Table 1. 平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較.

菌種	平板塗抹法		スパイラルプレーティング法	
	20 ml	15 ml	20 ml	25 ml
腸管出血性大腸菌	8.68 ± 0.13	8.89 ± 0.06	8.93 ± 0.04	8.95 ± 0.04
サルモネラ	8.56 ± 0.05	8.73 ± 0.08	8.66 ± 0.04	8.78 ± 0.05
黄色ブドウ球菌	9.04 ± 0.07	8.84 ± 0.05	8.85 ± 0.05	8.85 ± 0.06

データは平均値±標準誤差 (Log CFU/ml) で示した (n=4).

数値 (ml) は, シャーレに添加した TSA の量を示している.

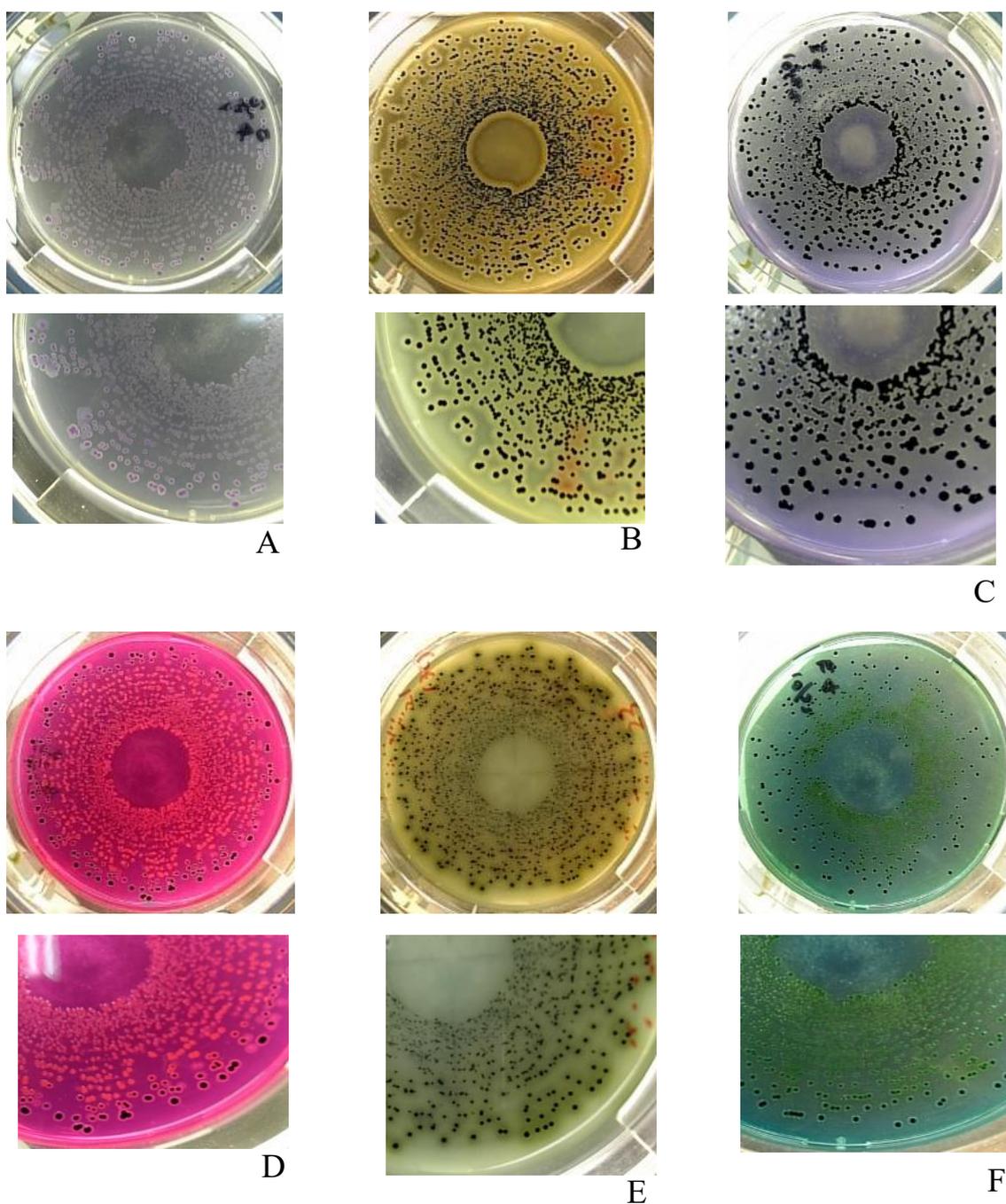


Fig. 1. 各選択培地のコロニー検出状態等の確認. 培地に検出されたコロニーの全体像とその一部を拡大した図を上下に配置した. A : CHROMagar O157, B : MLCB, C : Baird-Parker, D : X.L.D.寒天培地, E : Bismuth sulphite 寒天培地, F : Hektoen enteric 寒天培地.

選択培地と非選択培地の検出コロニー数の比較

選択培地にスパイラルプレーティングした場合の菌数と非選択培地である TSA または TSAYE にスパイラルプレーティングした場合の菌数に差が観られるのか確認した (Table 2 および Table 3). 腸管出血性大腸菌, サルモネラ, 黄色ブドウ球菌, リステリアいずれにおいても選択培地と非選択培地で検出された菌数に有意な差はなかった ($P > 0.05$). PALCAM については, リステリアが典型的なコロニーとして検出できることも確認できた (Fig. 2).

夾雑物存在下での食中毒菌の検出

夾雑物となる生ハムが存在する条件であっても非選択培地と遜色無く食中毒菌が検出できるかどうか確認した (Table 4). 腸管出血性大腸菌, 黄色ブドウ球菌について, 生ハム (市販品) でも迅速製法の生ハムを使用した検体でも選択培地と TSA で検出された菌数の間に有意差は無かった ($P > 0.05$). サルモネラについては, 同様に検出された菌数に有意差は無かった ($P > 0.05$) が, MLCB で検出された菌数は TSA で検出された菌数よりも 0.5 Log CFU/g 少なかった.

各菌株に対する選択培地の選択性確認

腸管出血性大腸菌は, MLCB および Baird-Parker 上にコロニーを形成しなかった. 黄色ブドウ球菌は, CHROMagar O157 および MLCB 上にコロニーを形成しなかった. サルモネラは, Baird-Parker 上にコロニーを形成しなかったが, CHROMagar O157 上に白色および紫色のコロニーを形成した (Fig. 3).

CHROMagar O157 で検出されたサルモネラの確認

MLCB で培養した結果, CHROMagar O157 で白色, 紫色, 青色を呈したいずれのサルモネラもサルモネラ属菌に典型的な黒色のコロニーを形成した. さらに TSI 培地でも乳糖・白糖非分解, ブドウ糖分解, 硫化水素産生とサルモネラ属菌に典型的な性状を示した. LIM 培地でもリジンを脱炭酸し, 穿刺部外増殖し, インドール非産生というサルモネラ属菌に典型的な性状を示した.

Table 2. 選択培地と非選択培地 (TSA) の検出コロニー数の比較.

菌種	EC		SE		SA	
培地	<u>CHROMagar O157</u>	<u>TSA</u>	<u>MLCB</u>	<u>TSA</u>	<u>Baird-Parker</u>	<u>TSA</u>
菌数 (Log CFU/ml)	9.00 ± 0.06	8.98 ± 0.07	8.68 ± 0.05	8.85 ± 0.09	8.58 ± 0.06	8.74 ± 0.08

データは平均値±標準誤差で示した (n=3).

Table 3. リステリア選択培地の検討

<u>TSAYE</u>		<u>PALCAM</u>	
15 ml	15 ml	20 ml	25 ml
8.87 ± 0.09	8.63 ± 0.16	8.62 ± 0.18	8.78 ± 0.12

データは平均値±標準誤差 (Log CFU/ml) で示した (n=5).

量 (ml) は, シャーレに添加した培地の量を示している.

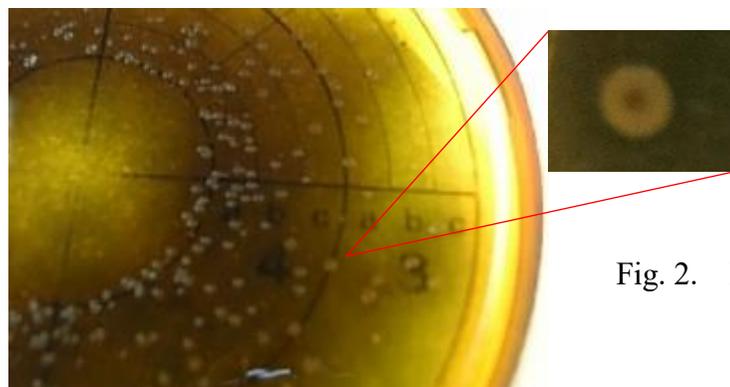


Fig. 2. PALCAM 上のリステリアのコロニー.

Table 4. 夾雑物存在下での食中毒菌の検出.

菌種	生ハム（市販品）		生ハム（調製サンプル）	
	選択培地	TSA	選択培地	TSA
腸管出血性大腸菌	6.08 ± 0.02	6.13 ± 0.02	6.08 ± 0.02	6.36 ± 0.12
サルモネラ	5.77 ± 0.07	5.86 ± 0.07	5.77 ± 0.09	6.23 ± 0.12
黄色ブドウ球菌	5.89 ± 0.02	5.95 ± 0.05	5.83 ± 0.03	5.95 ± 0.04

データは平均値±標準誤差で示した（n=3）.

選択培地は，腸管出血性大腸菌：CHROMagar O157，サルモネラ：MLCB，黄色ブドウ球菌：Baird-Parker である.

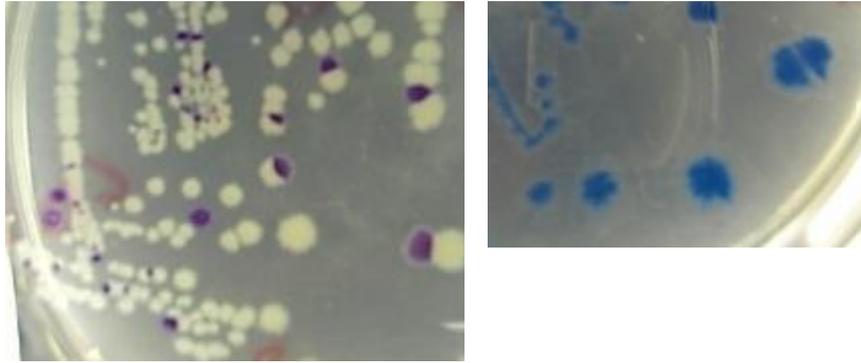


Fig. 3. 左：CHROMagar O157 上に形成されたサルモネラのコロニー（紫色および白色）。右：後に確認された青色のコロニー。

生ハムに混合接種した食中毒菌の検出

腸管出血性大腸菌，サルモネラ，黄色ブドウ球菌を混合して市販の生ハムまたは迅速製法の生ハムに接種した (Table 5) . 市販の生ハムでは腸管出血性大腸菌は 6.17 ± 0.05 Log CFU/g，サルモネラは 5.76 ± 0.06 Log CFU/g，黄色ブドウ球菌は 5.75 ± 0.03 Log CFU/g 付着しており，3 菌種の菌数の合計 (SUM) は， 6.42 ± 0.03 Log CFU/g であった. 非選択培地である TSA で検出された菌数は 6.46 ± 0.01 Log CFU/g であった. SUM と TSA で検出された菌数はほぼ同じ値であった. 迅速製法の生ハムでは腸管出血性大腸菌は 6.29 ± 0.02 Log CFU/g，サルモネラは 5.82 ± 0.11 Log CFU/g，黄色ブドウ球菌は 5.75 ± 0.05 Log CFU/g 付着しており，3 菌種の菌数の合計 (SUM) は， 6.51 ± 0.01 Log CFU/g であった. 非選択培地である TSA で検出された菌数は 6.53 ± 0.02 Log CFU/g であった. SUM と TSA で検出された菌数はほぼ同じ値であった.

1.3.3. 迅速製法における食中毒菌の消長

理化学分析

従来製法では，塩漬工程により水分活性を 0.97 未満とするのにおよそ 8 日間，その後の乾燥工程により水分活性を 0.95 未満とするのにさらに約 7 日間を要した (Fig. 4). 迅速製法では約 35 分の塩漬工程で水分活性は 0.97 未満となった. 乾燥工程により水分活性を 0.95 未満とするのに要する時間は 18 時間であった (Fig. 4).

各工程における理化学分析の結果を Table 6 に示した. 迅速製法では，塩漬，乾燥いずれの工程直後においても亜硝酸濃度は従来製法よりも有意に高値であった ($P < 0.01$). 10°C 以下保存 7 日目でも有意な差が観られた ($P < 0.05$).

Table 5. 生ハムに混合接種した食中毒菌の検出.

菌種	生ハム（市販品）	生ハム（調製サンプル）
腸管出血性大腸菌	6.17 ± 0.05	6.29 ± 0.02
サルモネラ	5.76 ± 0.06	5.82 ± 0.11
黄色ブドウ球菌	5.75 ± 0.03	5.75 ± 0.05
SUM	6.42 ± 0.03	6.51 ± 0.01
TSA	6.46 ± 0.01	6.53 ± 0.02

データは平均値±標準誤差で示した（n=3）.

使用した選択培地は、腸管出血性大腸菌：CHROMagar O157, サルモネラ：MLCB, 黄色ブドウ球菌：Baird-Parker である.

SUM は、計算上の腸管出血性大腸菌，サルモネラ，黄色ブドウ球菌菌数の合計を示している.

TSA は、実際に非選択培地（TSA）で検出された総菌数を示している.

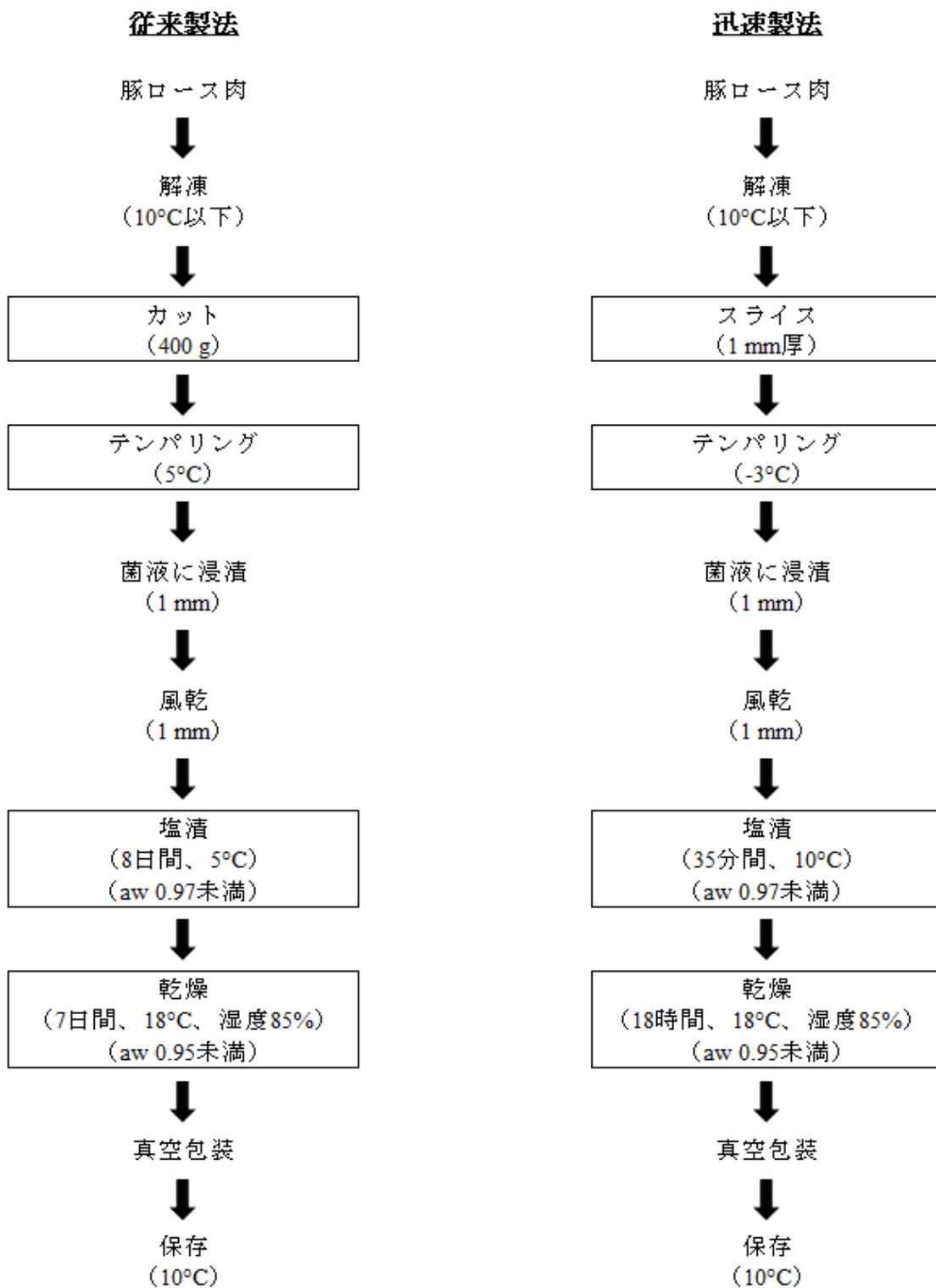


Fig. 4. 従来製法と迅速製法による生ハム製造工程の流れ.

Table 6. 各工程における理化学分析値.

Processing step	pH	a_w	NaCl (%)	亜硝酸 (ppm)
豚ロース肉	5.36 ± 0.14	0.990 ± 0.002	0.06 ± 0.01	ND
ピクル	7.01 ± 0.08	0.794 ± 0.002	14.97 ± 0.17	146.4 ± 4.7
塩漬工程直後				
迅速製法	5.40 ± 0.02 **	0.957 ± 0.001	3.43 ± 0.15 **	23.7 ± 1.4 **
従来製法	5.48 ± 0.07	0.956 ± 0.004	3.96 ± 0.33	1.8 ± 1.3
乾燥工程直後				
迅速製法	5.50 ± 0.04 *	0.925 ± 0.004	5.62 ± 0.41 *	6.9 ± 1.2 **
従来製法	5.55 ± 0.04	0.930 ± 0.005	5.21 ± 0.34	ND
保存 7 日目				
迅速製法	5.56 ± 0.08	0.922 ± 0.009	5.79 ± 0.46	1.8 ± 0.8 **
従来製法	5.51 ± 0.08	0.924 ± 0.008	5.47 ± 0.42	ND

データは、平均値±標準偏差で示した。(n=9, ピクルのみ n=6). *は $P < 0.05$; **は $P < 0.01$; ND は検出限界以下をそれぞれ示している.

従来製法における菌の消長

従来製法における食中毒菌の消長を確認した (Fig. 5). 従来製法において黄色ブドウ球菌は, 水分活性 0.97 未満となるまでの 8 日間の塩漬でおよそ 1.3 Log CFU/g 減少したが, 乾燥後および 10°C 保存 7 日間では減少しなかった. サルモネラは, 8 日間の塩漬でおよそ 1.4 Log CFU/g, 7 日間の乾燥でおよそ 1.4 Log CFU/g 減少し, 7 日間の 10°C 保存で 0.6 Log CFU/g 減少した. 接種後と比較しておよそ 3.4 Log CFU/g の減少が観察された. 腸管出血性大腸菌は, 8 日間の塩漬で約 2.0 Log CFU/g 減少し, 7 日間の乾燥ではおよそ 0.8 Log CFU/g 減少した. 7 日間の 10°C 保存で菌数は 0.2 Log CFU/g 減少したが有意差は観られなかった ($P > 0.05$). 接種後と比較して, 3.0 Log CFU/g 程度減少した. 腸管出血性大腸菌とサルモネラの消長の間には有意な差はなく, 黄色ブドウ球菌とサルモネラ, 腸管出血性大腸菌と黄色ブドウ球菌の消長の間には有意な差が観られ, サルモネラ, 腸管出血性大腸菌いずれに対しても黄色ブドウ球菌が高い菌数を示した ($P < 0.01$).

リステリアは, 10 °C 保存開始時点で迅速製法に比べ約 1.5 Log CFU/g 菌数が低値であった. さらに保存中に減少していき, およそ 70 日で検出限界 (2.3 Log CFU/g) 以下となった (Fig. 6). しかし, 初発とそれ以降の菌数に統計的に有意な差は観られなかった.

迅速製法における菌の消長

迅速製法における食中毒菌の消長を確認した (Fig. 7). 迅速製法において黄色ブドウ球菌は, 水分活性 0.97 未満となるまでの 35 分間の塩漬中に 0.2 Log CFU/g 減少した. 水分活性 0.95 未満となるまでの 18 時間の乾燥中におよそ 0.4 Log CFU/g 減少した. 更に真空包装後 12 日間の 10°C 保存の間で 2.7 Log CFU/g 減少し, 最終的に接種後と比較して約 3.3 Log CFU/g の減少が観られた. サルモネラは, 18 時間の乾燥までに 0.5 Log CFU/g 減少, 12 日間の 10°C 保存で 1.7 Log CFU/g, 最終的に接種後と比較しておよそ 2.2 Log CFU/g の減少が観られた. 腸管出血性大腸菌は, サルモネラと概ね同様の挙動を示し, 最終的に接種後と比較して約 1.2 Log CFU/g の減少が観られた. 乾燥工程までの消長において, サルモネラと腸管出血性大腸菌の間には有意差はなかった ($P > 0.05$). 一方, サルモネラと黄色ブドウ球菌, 腸管出血性大腸菌と黄色ブドウ球菌の間および 10°C 保存

12 日目までの 3 菌株の消長の間には有意差が観られ、黄色ブドウ球菌がサルモネラ、腸管出血性大腸菌に対して低い菌数を示した ($P < 0.01$).

一般生菌数、低温増殖性乳酸菌数及びクロストリジウム属菌数は、各工程を通してほぼ横ばいで増減はなく統計的にも有意差はなかった (Fig. 8). 大腸菌群数は、工程を経る毎に減少し、10°C 保存 12 日目までの間におよそ 1.0 Log CFU/g 減少した.

リステリアは、10°C 保存開始時点では従来製法に比べ約 1.5 Log CFU/g 菌数が高値であったが、保存開始 35 日目には 2.3 Log CFU/g まで減少し、それ以降検出限界以下となった (Fig. 6). 初発菌数と比較して、28 日目以降に有意な低下が確認された ($P < 0.01$).

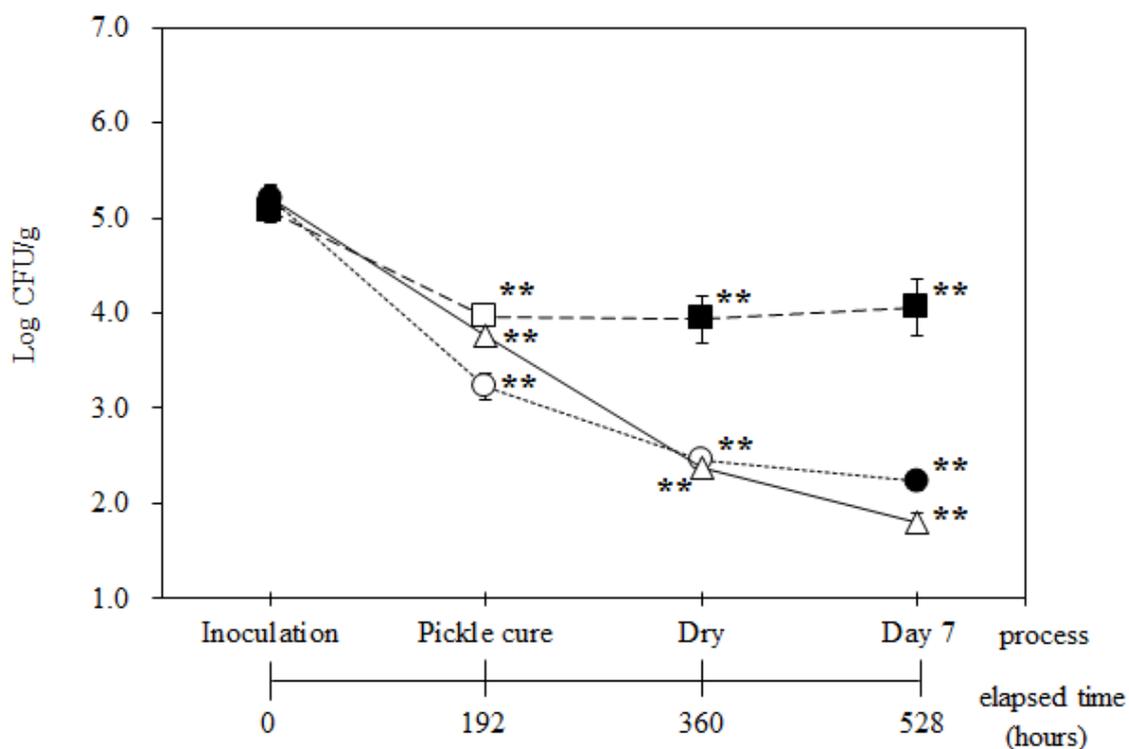


Fig. 5. 従来製法における食中毒菌の消長. 横軸に示したそれぞれの工程直後における腸管出血性大腸菌 (●), サルモネラ (▲), 黄色ブドウ球菌 (■) の消長を 3 回の試験の平均値でそれぞれ示した. 横軸の各工程の下には, 接種直後 (Inoculation) からの経過時間を示した. それぞれ 1 つ前の工程直後の菌数と有意な差がある場合には, その工程のシンボルをオープンシンボルで表した. **は塩漬工程直後 (Pickle cured) と比較して菌数に有意差があったことを表しており, $P < 0.01$ である. 乾燥工程直後 (Dry) および保存 7 日目 (Day 7) の黄色ブドウ球菌の菌数と腸管出血性大腸菌およびサルモネラの菌数との間には有意な差があった. それぞれ菌数 \pm 標準誤差で示した (n=15, 1 回の試験を n=5 で実施した).

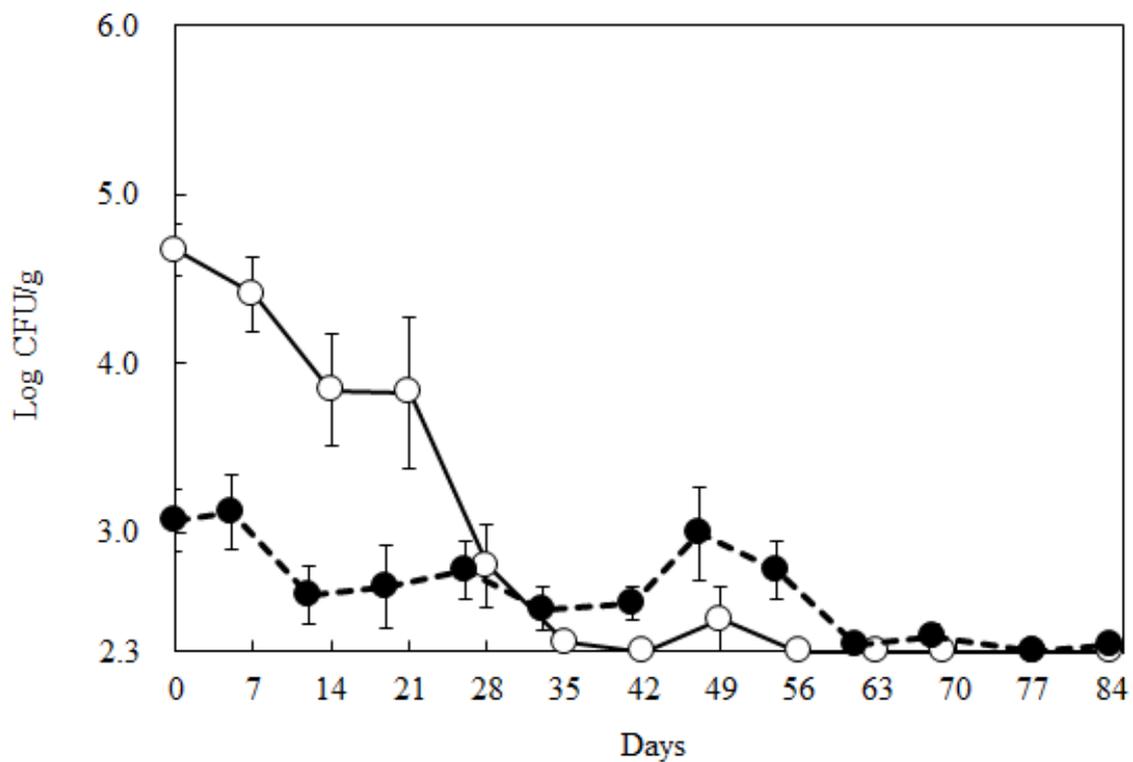


Fig. 6. 迅速製法における保存中のリステリアの消長. 迅速製法で製造した生ハム (○) と従来製法で製造した生ハム (●) の 10°C 保存中におけるリステリアの消長を確認した. 3 回の試験を行い, それぞれ菌数±標準誤差で示した (n=9, 1 回の試験を n=3 で実施した). 横軸は検出限界を表している.

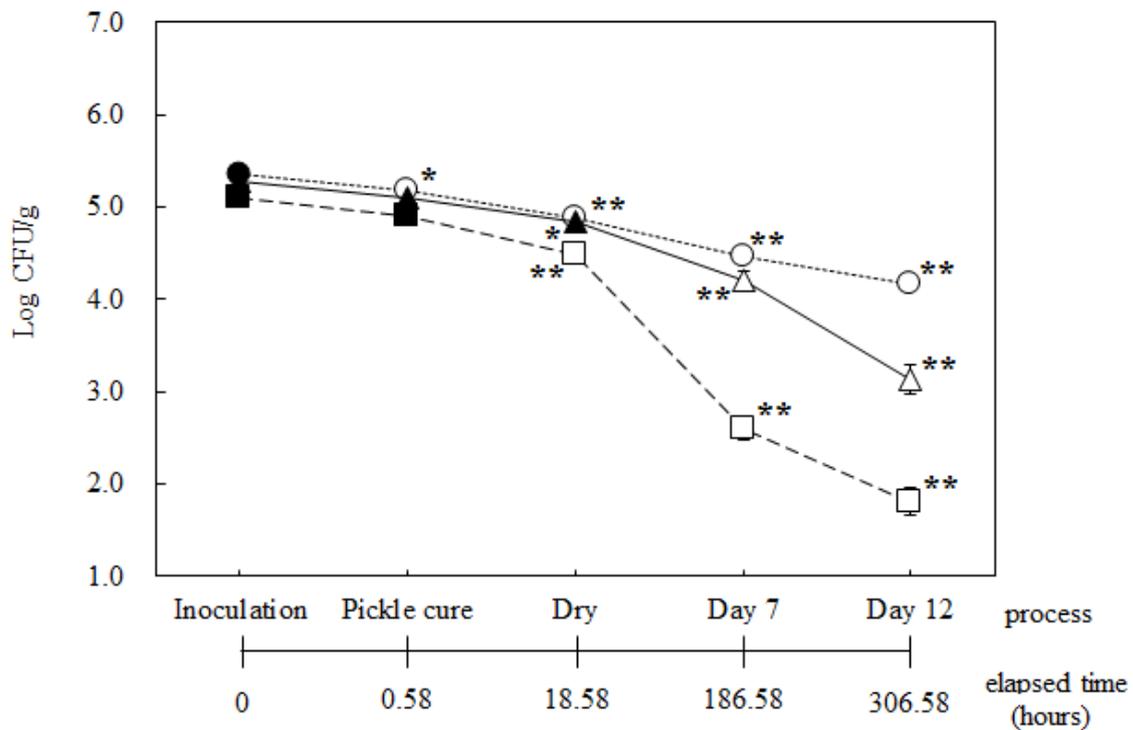


Fig. 7. 迅速製法における食中毒菌の消長. 横軸に示したそれぞれの工程直後における腸管出血性大腸菌 (●), サルモネラ (▲), 黄色ブドウ球菌 (■) の消長を 3 回の試験の平均値でそれぞれ示した. 横軸の各工程の下には, 接種直後 (Inoculation) からの経過時間を示した. それぞれ 1 つ前の工程直後の菌数と有意な差がある場合には, その工程のシンボルをオープンシンボルで表した. *および**は塩漬工程直後 (Pickle cured) と比較して菌数に有意差があったことを表しており, それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$ である. 乾燥工程直後 (Dry), 保存 7 日目 (Day 7) および 12 日目 (Day 12) の黄色ブドウ球菌の菌数と腸管出血性大腸菌およびサルモネラの菌数との間には有意な差があった. それぞれ菌数±標準誤差で示した (n=15, 1 回の試験を n=5 で実施した).

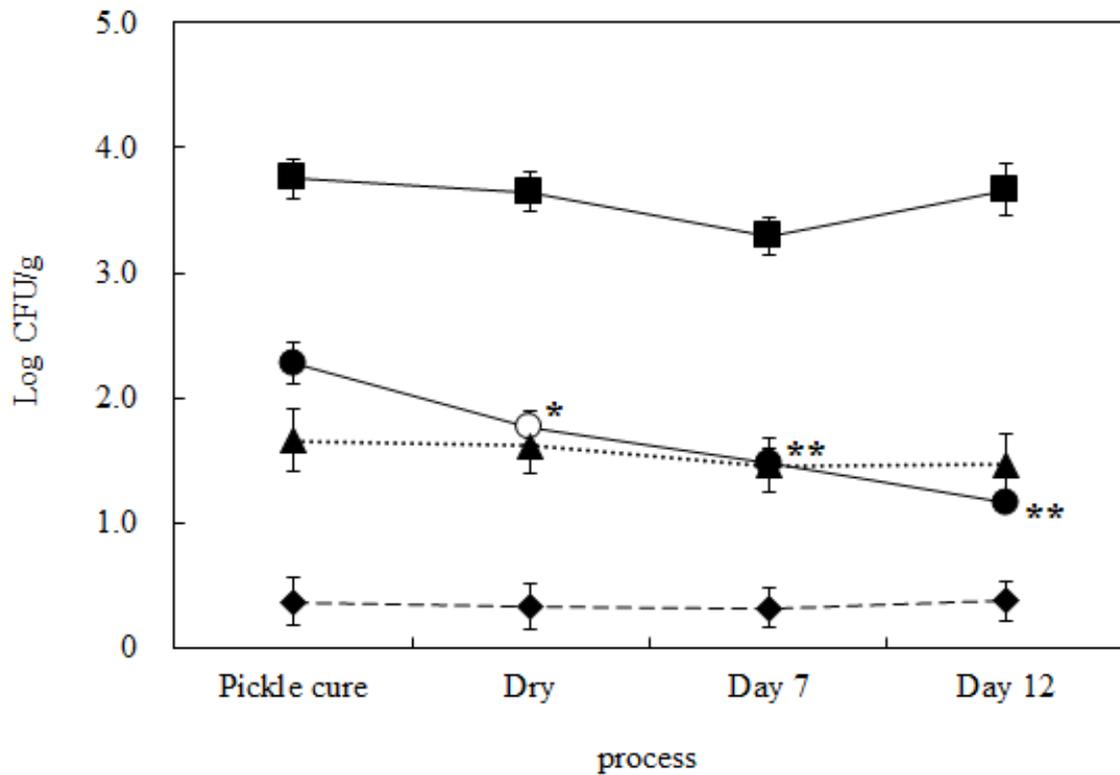


Fig. 8. 迅速製法における衛生指標菌の消長. 横軸に示したそれぞれの工程直後における一般生菌数 (■), 大腸菌群数 (●), 低温増殖性乳酸菌 (▲), クロストリジウム属菌数 (◆) を3回の試験の平均値でそれぞれ示した. クロストリジウム属菌は3回の試験の内1回のみ, 低温増殖性乳酸菌は3回の試験の内2回検出された. それぞれ1つ前の工程直後の菌数と有意な差がある場合には, その工程のシンボルをオープンシンボルで表した. それぞれ菌数±標準誤差で示した (n=15, 1回の試験を n=5 で実施した). *および**は塩漬工程直後 (Pickle cure) と比較して菌数に有意差があったことを表しており, それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$ である.

1.4. 考察

1.4.1. 平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の比較

いずれの菌種においても平板塗抹法とスパイラルプレーティング法の間に出される菌数の差は無かった。機械で塗抹する迅速性、簡便性、精度を考慮して、以降の試験においても主にスパイラルプレーティング法を使用して問題無いと考えられた。培地量についても検出される菌数に有意差は無かったため、簡便性、経済性を考慮して、以降の試験の培地量は主に 15 ml で行うこととした。

1.4.2. 選択培地の検討

CHROMagar O157 と Baird-Parker についてはコロニーの検出状態、培地の透明度について良好な結果が得られた。CHROMagar O157 および Baird-Parker は世界的によく使用されている選択培地である。黄色ブドウ球菌の検出について、日本においては卵黄加マンニット食塩寒天培地が広く使用されているが、損傷菌回復能は Baird-Parker の方が高いことが示されている（尾上ら，2002）。また，2015 年の厚生労働省通知により Baird-Parker は，黄色ブドウ球菌試験法において第一に選択すべき培地となった。サルモネラについて，諸外国でよく使用されている X.L.D.寒天培地では，サルモネラの菌数が多い場合にはスパイラルプレート法による検出に適さない可能性が示唆された。Hektoen enteric 寒天培地についても同様であり，Bismuth sulphite 寒天培地では検出はされたが，その培地の不透明性から，スパイラルプレーティング法でコロニー数を計数する場合には不適であった。MLCB では，問題無く検出および計数ができた。

以上のことから，迅速製法における食中毒菌の消長を確認する試験においては，腸管出血性大腸菌は CHROMagar O157，サルモネラは MLCB，黄色ブドウ球菌は Baird-Parker が検出に適していると考えられた。しかしながら，これらの選択培地がその選択性により菌数を過少に検出するという懸念がある為，非選択培地と比較して検出される菌数に差があるかどうかを確認する必要があった。検討したところ，いずれの培地においても TSA に比べやや低い値を示す傾向があり，特に MLCB で差が大きかったが，いずれの培地も TSA との間で生育コロニー数の有意な差は観察されなかった。それ故，CHROMagar O157，MLCB，Baird-

Parker の採用で問題無いと判断した。TSAYE との間に有意差が無かったこと、供試したリステリアが PALCAM 上でリステリア属に典型的な中央に窪みのある灰緑色のコロニー、黒色ハローを形成したことから、リステリアの選択培地には PALCAM を使用することとした。次に夾雑物、今回の場合は生ハムの成分が存在する場合に、同様に問題無く検出ができるかどうかの確認が必要と考えられた。生ハム成分と一緒に培地に塗抹した場合でも TSA と各選択培地との間に検出感度に差は無く、生ハムからの腸管出血性大腸菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌の検出は問題無くできると考えられた。

腸管出血性大腸菌は、MLCB および Baird-Parker 上にコロニーを形成せず、黄色ブドウ球菌も CHROMagar O157 および MLCB 上にコロニーを形成しないことが分かった。これらのことから、以降の試験においても腸管出血性大腸菌検出には CHROMagar O157、黄色ブドウ球菌検出には Baird-Parker をそれぞれ使用して行くこととした。一方、サルモネラは、Baird-Parker 上にはコロニーを形成しなかったが、CHROMagar O157 上にコロニーを形成することが分かった。しかも白色と紫色の 2 種類のコロニーを形成し、紫色のコロニーは腸管出血性大腸菌コロニーの藤色と区別のつきにくいものであった。白色コロニーを形成したサルモネラと紫色コロニーを形成したサルモネラをそれぞれ別々に純培養し、凍結保存した。それら菌株を改めて継代培養したが、白色コロニーを形成したサルモネラは、その後も白色コロニーを形成したが、紫色コロニーを形成したサルモネラでは、一部青色のコロニーが生じる場合があった。まずこれら 3 種類の菌が本当にサルモネラであるか確認する必要があると考えられた。それぞれ CHROMagar O157 上で異なる色を呈した菌は、やはりサルモネラの生化学的性状を示した。公益社団法人 大阪生活衛生協会に血清型の鑑別を依頼した結果、3 つとも *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis であることが確認された。さらに同協会が所有しているいくつかのサルモネラ エンテリティディスを CHROMagar O157 に画線した所、今回の事例と同様に白色、紫色、青色のコロニーが存在したとのことであった。以上のことから、以降、腸管出血性大腸菌の選択培地として CHROMagar O157 を使用する為には、CHROMagar O157 上でサルモネラが生育しないように薬剤を添加すること、腸管出血性大腸菌と区別できるように CHROMagar O157 上で白色のコロニーを形成するサルモネラを使

用することなどが考えられたが、薬剤を添加する場合は、その影響を詳細に確認しなければならないことから、以降の試験では、CHROMagar O157 上で白色のコロニーを形成するサルモネラを使用することとした。

市販の生ハム、迅速製法の生ハムいずれにおいても、選択培地を用いて検出した3菌種の合計菌数（SUM）と選択性のないTSAで検出された菌数が、ほぼ同じ値で有意差が無かったことから、3菌種を混合接種しても問題無くそれぞれ選択培地で検出できたと考えられた。

1.4.3. 迅速製法における食中毒菌の消長

今回の試験により迅速製法は、安全で迅速な加工法であることが証明された。従来製法と比較して製造に要する時間が縮小することから、環境中の微生物と接触する機会も減ると考えられ、その点からするとより安全性が高まったと考える。

迅速製法では従来製法と比較して極めて短時間で a_w を目的の値以下に下げることができた。包装を行うまでの時間も従来製法に比べおよそ1/20倍に短縮された。接種テストの結果は、迅速製法においても食中毒菌は増殖せずに減少することが明らかとなった。特に黄色ブドウ球菌およびリステリアの菌数は従来製法より有意に減少した。また、衛生指標菌も増殖せず、なかでも大腸菌群は減少したことから迅速製法で製造した生ハムの保存安定性が担保できていることが示された。理化学分析の結果でも、従来製法と迅速製法を比較して大きな違いはなかった。亜硝酸濃度は従来製法に比べ迅速製法では高値であったが、日本の食品衛生法において食肉製品に許容される70 ppm以下であった。むしろ、スライスから塩漬、乾燥、真空包装、そして10°C保存に至るまで、亜硝酸により細菌の増殖を抑制できる利点となることが示唆される。実際に、黄色ブドウ球菌が従来製法の乾燥工程以降でわずかながら増殖したのに対し、迅速製法では大きく減少した。この予想していなかった抑制は、その高い亜硝酸の残存によるものと推測された。様々な研究が亜硝酸は嫌気条件下で黄色ブドウ球菌に対して強い抑制効果を発揮することを報告しており (Buchanan と Solberg, 1972; Castellani ら, 1955 ; Fang ら, 1985 ; Lechowich ら, 1956), 従来製法では真空包装後の亜硝酸レベルが低いこともこの推測を支持している。

リステリアも迅速製法において大きく減少した。この食中毒菌は、物理的・化学的なストレスに耐性があることが知られているが、増殖する為には pH 5.6 および a_w 0.94 以上の環境である必要があると言われている (Gray と Killinge, 1966 ; de Daza ら, 1991)。従来製法, 迅速製法に関わらず製造した生ハムはどちらもこの値を下回っていた。そして, 迅速製法の塩漬において亜硝酸濃度が維持されたことがリステリアの早い減少をもたらしたと推察される。pH, a_w , NaCl 濃度, 温度, 包装条件, 保存時間と適切に組み合わせることにより亜硝酸がリステリアを抑制できるとの報告とも合致する (Buchanan ら, 1989 ; McClure ら, 1991 ; Pelroy ら, 1994)。今回の試験では 400 g の豚ロース肉を従来製法により生ハムにしている。しかしながら, 実際の製造工場では通常 3 kg 程度の豚ロース肉を使用している。肉塊が大きくなると, pH, a_w , 食塩濃度にバラつきが生じる可能性がさらに高くなることを考慮すると塩漬前にスライスする迅速製法は, 従来製法よりこれらの因子を制御し易く, 亜硝酸を有効的に働かせることができるであろう。一方で, 保存開始時点では従来製法より迅速製法ではリステリア菌数が高値であったため, 原料肉に高い汚染があれば食中毒リスクが排除できない可能性があると考えられた。このことから原料肉の微生物汚染状況を把握する必要があると思われる。

迅速製法においてサルモネラおよび腸管出血性大腸菌は黄色ブドウ球菌に比べ緩やかに減少した。この結果は大腸菌群の消長と同じような傾向であった。グラム陰性菌に対して亜硝酸の効果は比較的弱いことが報告されている (Castellani ら, 1955 ; Rice と Pierson, 1982 ; Gibson と Roberts, 1986)。これらのことが, より高い濃度の亜硝酸が残っていた迅速製法においても抗菌効果は観られなかったことを支持している。しかし, Gibson と Roberts (1986) は, pH 6.8 未満, 10°C, 食塩濃度 4%以上でサルモネラ属菌の生育が抑制できたこと, Hew ら (2005) は水分活性 0.95 未満ではサルモネラ属菌が増殖しなかったことを報告しており, Doyle と Schoeni (1984) は, 10°C 以下で腸管出血性大腸菌の増殖が抑えられたことを示している。迅速製法で製造した生ハムはこれらの条件に適合していたため, サルモネラと腸管出血性大腸菌が増殖することがなかったと考えられた。つまり, これらの食中毒菌は亜硝酸で殺菌することはできなかったが増殖は抑制できていたことから, 結果として保存 7 日目まで従来製

法より緩やかな減少になったと思われる。しかしながら、従来製法では保存7日目に至るまでの経過時間は528時間であるのに対し、迅速製法では186.6時間であり、この増殖抑制期間の短さが従来製法に比べてやや高い腸管出血性大腸菌やサルモネラの菌数につながったようだ。菌数測定までの経過時間を従来製法と同程度まで延長すれば、これらの菌数もさらに低下すると期待できる。

結論として、迅速製法は安全で安定した保存ができる生ハムを迅速に製造する新たな手法であることが証明された。迅速な加工が、製品を真空包装するまで食中毒菌の制御に有効な亜硝酸の残存を助けている。つまり、黄色ブドウ球菌とリステリアは真空包装された状態で亜硝酸によって効果的に減少し、サルモネラと腸管出血性大腸菌の減少は従来製法と同等の時間を要したが、増殖することはない。この製法は、将来の製造に向けた小規模な生産環境で検証を行う価値が充分にあると思われる。

1.5. 小括

スパイラルプレーティング法は、平板塗抹法と比較して遜色ない検出感度を示した。また、選定した選択培地、MLCB 寒天培地、CHROMagar O157, PALCAM *Listeria selective agar*, Baird-Parker 寒天培地は、供試食中毒菌を検出するに問題無いものであった。

これらを使用し、迅速製法における食中毒菌の消長を評価した結果、懸案事項であった工程中のコンタミネーションに対して、その後の工程で食中毒菌、衛生指標菌は増殖しないことが示された。これは迅速製法では生ハムの製造に掛かる時間を大幅に短縮するだけでなく、水分活性などの値も短い時間で従来製法と同等とすることができるためであると思われる。

以上のことから、迅速製法は安全な製法であり、食品工業用の大型生産プラントで試験製造するに値する製法であると言える。一方で、食中毒を引き起こすに足る菌数が原料肉に付着していた場合などについては、その発生を防ぎきれないリスクが考えられることから、原料肉の汚染状況など製造工程以外についても分析・管理する必要があると考えられる。

第 2 章

原料肉の細菌検査

2.1. はじめに

第 1 章において、迅速製法は危害微生物が増殖しない微生物学的に安全な製法であることが示された。しかしながら、製造に要する時間が従来製法に比べ極端に短い分、微生物の死滅に掛ける時間もないことが示唆された。つまり、原料肉の段階で危害微生物の高い汚染があった場合には、工程中に減らしきれなかった危害微生物が危害を発生させるレベルで製品に残存する可能性がある。そこで、迅速製法で原料肉として使用するデンマーク産豚ロース肉について、細菌検査を実施し、汚染状況を確認することとした。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 培地, 試薬等

- ・標準プレートカウント寒天培地

関東化学株式会社 (東京, 日本) (以下, 関東化学) 製分包タイプを使用した。純水 400 ml に 1 包 (9.4 g) を溶解させ、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで常温で保存した。

- ・トリプトソーヤ寒天培地 (以下, TSA)

日水製薬株式会社 (東京, 日本) (以下, 日水製薬) 製を使用した。純水 400 ml に TSA 16.0 g を溶解後、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで常温で保存した。

- ・水酸化ナトリウム (以下, NaOH)

和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) (以下, 和光純薬) 製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・1N NaOH 水溶液

NaOH 8.0 g に純水 200 ml を加え、溶解させた。使用まで常温で保存した。

- ・リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄)

和光純薬製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・塩化ナトリウム（以下，NaCl）

和光純薬製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・リン酸緩衝生理食塩水（以下，PBS）

リン酸二水素カリウム 34.0 g を純水 500 ml に溶解後，1N NaOH 水溶液を約 175 ml 添加して pH を 7.2 に調整し，純水で 1000 ml にメスアップした。オートクレーブ滅菌し，室温まで冷却した。これを原液とし，使用時に純水で 800 倍に希釈したものに 0.85% となるように NaCl を添加し，オートクレーブ滅菌した。使用まで常温で保存した。

- ・ペプトン

極東製薬工業株式会社（東京，日本）（以下，極東製薬）製を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・ペプトン加リン酸緩衝生理食塩水

純水 500 ml に NaCl 8.5 g，ペプトン 1.0 g，リン酸緩衝液（pH 7.2）10 ml を添加し，溶解させた。純水で 1000 ml にメスアップした。オートクレーブ滅菌し，使用まで室温で保存した。

- ・XM-G 寒天培地

日水製薬製を使用した。15.8 g を純水 400 ml に溶解させ，オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後，直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し，固化するまで静置した。使用まで常温で保存した。

- ・MRS 寒天培地

OXOID Ltd. (Basingstoke, Hampshire, UK)（以下，OXOID）製を使用した。24.8 g を純水 400 ml に溶解させ，オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後，直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し，固化するまで静置した。使用まで常温で保存した。

- ・50%卵黄液

市販品で，新鮮卵で卵殻に傷のないものを選び，洗剤でブラシ洗浄した。流水で水洗後，エタノールを噴霧し火炎滅菌した。無菌的に割卵しステンレス製の黄身取り器を用いて卵白を除去した。卵黄（約 20 g）を滅菌した広口ビンに入れ，10% NaCl 水溶液を 20 ml 加え，ガラス棒を用いてエマルジョンを作製した。

- ・卵黄加マンニット食塩寒天培地

OXOID 製を使用した。44.4 g を 360 ml の純水に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、50%卵黄液 40 ml を添加し、よく混合した。直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで 4°C で保存した。

- ・ウサギ血漿

栄研化学株式会社（東京，日本）（以下，栄研化学）製ウサギプラズマ栄研を使用した。使用まで 4°C で保存した。使用の際は生理食塩水 7 ml に溶解させて使用した。

- ・卵黄加 MYP 寒天培地

Merck KGaA (Darmstadt, Germany)（以下，Merck）製，Cereus selective agar (base) with polymyxin B sulfate を使用した。17.2 g を 360 ml の純水に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、50%卵黄液 40 ml を添加し、よく混合した。直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで 4°C で保存した。

- ・緩衝ペプトン水

OXOID 製を使用した。20.0 g をイオン交換水 1000 ml に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。使用まで常温に保存した。

- ・Rappaport-vassiliadis 培地

OXOID 製を使用した。純水 500 ml に 15.0 g を溶解後、10 ml ずつ試験管に分注し、オートクレーブ滅菌（115°C，15 分）した（以下，RV 培地）。使用まで 4°C で保存した。

- ・MLCB 寒天培地

日水製薬製を使用した。19.6 g を純水 400 ml に添加し、電子レンジで加温溶解させた（オートクレーブ滅菌はしない）。約 50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した（以下，MLCB）。使用まで 4°C で保存した。

- ・TSI 培地

栄研化学製を使用した。30.0 g を純水 500 ml に溶解後、約 3 ml ずつ小試験管に分注し、オートクレーブ滅菌した。高層斜面（上部 1/3 が斜面，下部 2/3

が高層) 培地となるように固化させた。使用まで常温で保存した。

- LIM 培地

栄研化学製を使用した。15.0 g を純水 500 ml に溶解後、約 3 ml ずつ小試験管に分注し、オートクレーブ滅菌した。高層培地となるように固化させた。使用まで常温で保存した。

- VP 半流動培地

栄研化学製を使用した。15.5 g を純水 500 ml に溶解後、約 3 ml ずつ小試験管に分注し、オートクレーブ滅菌した。使用まで 4°C で保存した。

- Kovcs インドール試薬

Merck 製を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- 無水エタノール (CH₃CH₂OH)

和光純薬製日本薬局方を使用した。使用まで常温で保存した。

- アルファナフトール (C₁₀H₈O)

和光純薬製特級、1-Naphthol を使用した。使用まで遮光、常温で保存した。

- VP 試薬 A

無水エタノール 100 ml にアルファナフトールを 6 g 添加し混合した。

- 水酸化カリウム (KOH)

和光純薬製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- クレアチン (C₄H₉N₃O₂)

和光純薬製を使用した。使用まで常温で保存した。

- VP 試薬 B

純水で 40%水酸化カリウム溶液を調製し、100 ml に対してクレアチンを 0.3 g 添加し、混合した。

- ノボビオシン加 mEC 培地

栄研化学製を使用した。14.6 g を 400 ml の純水に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。

- CT-SMAC 寒天培地

関東化学製生培地を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- クロモアガー O157 TAM 培地

関東化学製生培地を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- ・ CLIG 寒天培地

極東製薬製，セロビオース添加 LIG 寒天培地を使用した． 20.5 g を純水 500 ml に溶解後，約 3 ml ずつ小試験管に分注し，オートクレーブ滅菌（115°C，15 分）した． 高層斜面（上部 1/3 が斜面，下部 2/3 が高層）培地となるように固化させた．

- ・ UV ライト

フナコシ株式会社（東京，日本）製 Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator を使用した．

- ・ ヒートブロック

Eppendorf AG. (Barkhausenweg, Hamburg, Germany) 製 Thermomixer 5436 を使用した．

- ・ O157（ベロ毒素遺伝子） One Shot PCR Screening Kit

タカラバイオ株式会社（草津，滋賀，日本）（以下，タカラバイオ）製を使用した． 使用まで凍結保存した．

- ・ サーマルサイクラー

タカラバイオ製 PCR Thermal Cycler PERSONAL TP240 を使用した．

- ・ TBE buffer

タカラバイオ製を使用した． TBE (Tris-borate-EDTA) powder 1 包 (17.04 g) を純水に溶解させ，全量を 1,000 ml とした．

- ・ アガロース

Lonza (Basel, Switzerland) 製，Nusieve 3: 1 Agarose を使用した． 使用まで常温で保存した． TBE buffer に 3.0%となるように添加して電子レンジで加温溶解して使用した．

- ・ 電気泳動装置

株式会社ミューピッド（東京，日本）製を使用した．

- ・ エチジウムブロマイド

Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA) 製 (10 mg/ml) を使用した． 5 μ l を純水 50 ml に添加して使用した．

- ・ カンピロバクター発育サプリメント

OXOID 製を使用した． 使用まで -20°C に保存した．

- ・アセトン

和光純薬製特級を使用した。

- ・Preston カンピロバクター選択サプリメント

OXOID 製を使用した。アセトンと滅菌水の 1:1 溶液 2 ml を 1 バイアルに添加し、混合した。使用まで-20°C に保存した。

- ・馬溶血液

有限会社ジャパン・ラム（福山，広島，日本）製を使用した。使用まで-20°C に保存した。

- ・Preston 培地

OXOID 製，Nutrient broth No. 2 を使用した。2.5 g を 100 ml の純水に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。使用まで 4°C に保存した。

- ・アネロパック微好気システム

三菱ガス化学株式会社（東京，日本）（以下三菱ガス化学）製アネロパック・微好気およびアネロパック角型ジャーを使用した。

- ・Loopamp カンピロバクター検出試薬キット

栄研化学製を使用した。

- ・濁度測定装置

栄研化学製 Turbidimeter RT-160C を使用した。

- ・UVM- I

Merck 製を使用した。27.2g を純水 500 ml に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。

- ・リステリア選択剤

Merck 製を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- ・PALCAM Listeria selective agar

Merck 製を使用した。35.9 g を純水 500 ml に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、滅菌水 1 ml に溶解したリステリア選択剤 1 バイアルを添加し十分に混合した。直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 15 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した（以下，PALCAM）。使用まで 4°C で保存した。

- CHROMagar Listeria

CHROMagar 製を使用した。25.8 g を純水 500 ml に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後、サプリメント 4.5 g を滅菌水 20 ml に溶解したもの（溶液がクリーム状懸濁液になるまでスターラーで 30 分間以上攪拌した）を添加し十分に混合した。直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用まで 4°C で保存した。

- グラム染色キット

日水製薬製、フェイバーG を使用した。使用まで常温で保存した。

- 過酸化水素 (H₂O₂)

関東化学製特級 (30%品) を使用した。使用まで暗所、常温で保存した。純水で希釈し、3%濃度でカタラーゼ試験に用いた。

- 羊血液寒天培地

栄研化学製生培地、Pourmedia Sheep Blood Agar M58 を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- ラムノース (C₆H₁₂O₅·H₂O)

和光純薬製特級、α-L(+)-Rhamnose Monohydrate を使用した。使用まで常温で保存した。

- キシロース (C₅H₁₀O₅)

和光純薬製特級、D(+)-xylose を使用した。使用まで常温で保存した。

- 糖分解用半流動培地

栄研化学製を使用した。10.5 g を 500 ml の純水に溶解させ、ラムノースまたはキシロースを最終濃度 0.5% となるように添加した。小試験管に約 3 ml ずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。

- Chromocult Listeria Selective Supplement

Merck 製を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- Chromocult Listeria Enrichment Supplement

Merck 製を使用した。使用まで 4°C で保存した。

- Chromocult Listeria Selective Agar

Merck 製を使用した。35g を純水 476 ml に添加し、沸騰水中で加温溶解させた（オートクレーブ滅菌はしない）。約 50°C まで冷却した後、Chromocult Listeria

Selective Supplement (4 ml の純水／エタノール混合物 (1 : 1) を添加し、溶解させたもの)を加え、混合した。予め 50°C に恒温しておいた Chromocult Listeria Enrichment Supplement 20 ml 全量を添加し、十分に混合した。直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 18 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。(以下、ALOA) 使用まで 4°C に保存した。

- ・アネロパックシステム (嫌気培養)

三菱ガス化学製アネロパック・ケンキおよびアネロパック角型ジャーを使用した。

- ・クロストリジア測定用培地

日水製薬製を使用した。28.2 g を 400ml の純水に添加し、オートクレーブ滅菌した。約 55°C に冷却し、あらかじめ 70°C, 20 分で加熱処理した検体 10 ml を入れた嫌気パウチに 15 ml 注入し検体と十分に混合した後、気泡を除去して首部をシーラーでシールした。

- ・嫌気パウチ

三菱ガス化学製を使用した。

- ・フィルター付きストマッカーバッグ

ELMEX (東京, 日本) 製を使用した。

- ・ストマッカー

IUL, S. A. (Barcelona, Spain) 製 Masticator Classic 400 ml を使用した。

2.2.2. 検体の採取

- 1) 迅速製法の製造に使用するデンマーク産豚ロース肉を対象とした。
- 2) 採取する検体数は、国際食品微生物規格委員会 (ICMSF; International Commission on Microbiological Specification for Foods) のサンプリングプラン (ICMSF, 2013) を参考にした。すなわち、最も厳しい条件を想定して、n=60 をベースとした。
- 3) 異なる製造年月 12 か月分、ひと月当たり 5 製造日分の計 60 日分の検体を用意した。

用意した豚ロース肉の製造年月は、2009 年 11 月, 12 月, 2010 年 3 月, 7 月, 8 月, 10 月, 11 月, 12 月, 2011 年 1 月, 2 月, 3 月, 5 月で、いずれも

凍結状態であり，その各製造月から 5 製造日分を検体とした．

4) 1 製造日から豚ロース肉を 2 本採取した．

5) 赤身部分を $2 \pm 1\text{mm}$ で滅菌したピーラーで削ぎ取った（厚さについては、『食安監発第 1102004 号腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について』を参考にした．平成 24 年 5 月及び平成 26 年 11 月に改正）．

6) 検体は細切，混合し検査まで凍結保存した．

2.2.3. 細菌検査

食品衛生検査指針 微生物編（日本食品衛生協会，2004）および衛生試験法・注解（日本薬学会，2000）を参考に実施した．

・一般生菌

1) 検体 25 g をペプトン加リン酸緩衝生理食塩水で 10 倍希釈した．

2) ストマッカーで 30 秒均質化を行った．

3) ペプトン加リン酸緩衝生理食塩水で 10 倍希釈系列を作製した．

4) 希釈液 1 ml をシャーレに滴下した．

5) 約 50°C に冷却しておいた標準プレートカウント寒天培地を 20 ml 添加した．

6) 十分に混和した．

7) 培地が固化したことを確認後， 35°C で 48 時間培養した．

8) コロニー数を計数した．

9) 1 つの希釈系列につき，2 枚のシャーレでコロニー数を計数し，その平均から菌数を算出した．

・低温菌

1) 一般生菌数と同様の手順で行い，培養条件を 10°C ，10 日間とした．

2) コロニー数を計数した．

3) 1 つの希釈系列につき，2 枚のシャーレでコロニー数を計数し，その平均から菌数を算出した．

・大腸菌・大腸菌群

- 1) 前述の希釈系列より 1 ml をシャーレに滴下した。
- 2) 約 50°C に冷却しておいた XM-G 寒天培地を 20 ml 添加した。
- 3) 十分に混和した。
- 4) 培地が固化したことを確認後、35°C で 24 時間培養した。
- 5) 青色コロニー数を大腸菌数、赤色と青色のコロニー数の合計を大腸菌群数として計数した。
- 6) 1 つの希釈系列につき、2 枚のシャーレで各コロニー数を計数し、その平均から菌数を算出した。

・乳酸菌

- 1) 約 50°C に冷却しておいた MRS 寒天培地を 20 ml, シャーレに添加した。
- 2) 培地が固化したことを確認後、前述の希釈系列より 0.1 ml をシャーレに滴下した。
- 3) コンラージ棒を用いて培地に均一に塗抹した。
- 4) アネロパックシステムを用いて、嫌気状態にした。
- 5) 30°C で 48 時間培養した。
- 6) コロニー数を計数した。
- 7) 1 つの希釈系列につき、2 枚のシャーレで各コロニー数を計数し、その平均から菌数を算出した。

・黄色ブドウ球菌

以下の検査は、厚生労働省通知衛乳第 54 号（平成 27 年改正）も参考にした。

- 1) 約 50°C に冷却しておいた卵黄加マンニット食塩寒天培地を 20 ml, シャーレに添加した。
- 2) 培地が固化したことを確認後、前述の希釈系列より 0.1 ml をシャーレに滴下した。
- 3) コンラージ棒を用いて培地に均一に塗抹した。
- 4) 35°C で 48 時間培養した。
- 5) 卵黄反応が観られた黄色の正円形コロニー数を計数した。

- 6) 1つの希釈系列につき、2枚のシャーレで各コロニー数を計数し、その平均から菌数を算出した。
- 7) 卵黄反応陽性コロニーを釣菌し、標準寒天培地に画線した。
- 8) 35°C、24時間培養した。
- 9) コロニーを0.5 mlのウサギプラズマ溶液に接種した。
- 10) 十分に混合した。
- 11) 35°Cに静置した。
- 12) 4, 6, 24時間後に溶液の凝固またはフィブリン析出の有無を確認した。
- 13) 溶液の凝固またはフィブリン析出があったものを黄色ブドウ球菌と確定した。

・バチルス セレウス

- 1) 約50°Cに冷却しておいた卵黄加MYP寒天培地を20 ml、シャーレに添加した。
- 2) 培地が固化したことを確認後、前述の希釈系列より0.1 mlをシャーレに滴下した。
- 3) コンラージ棒を用いて培地に均一に塗抹した。
- 4) 32°Cで24時間培養した。
- 5) 卵黄反応が観られた灰色の扁平コロニー数を計数した。
- 6) 1つの希釈系列につき、2枚のシャーレで各コロニー数を計数し、その平均から菌数を算出した。

・クロストリジウム属菌

以下の検査は厚生労働省通知衛乳第54号も参考とした。

- 1) 希釈液10 mlを試験管に採り、70°Cで20分加熱した。
- 2) 全量をパウチに添加した。
- 3) 約55°Cに冷却したクロストリジア測定用培地を15 mlパウチに添加した。
- 4) 十分に混和した後、気泡を抜き、パウチの首部をシールした。
- 5) 35°C、24時間培養した。
- 6) 黒色コロニー数を計数した。

7) 2つのパウチで各コロニー数を計数し、その平均から菌数を算出した。

・サルモネラ属菌

以下の検査は厚生労働省通知衛乳第 54 号も参考とした。

- 1) 検体 25 g を緩衝ペプトン水で 10 倍希釈した。
- 2) ストマッカーで 60 秒均質化を行った。
- 3) 35°C で 18 時間培養した。
- 4) RV 培地 15 ml に培養液 1 ml を滴下した。
- 5) 43°C で 18 時間培養した。
- 6) 1 白金耳を MLCB に画線した。
- 7) 35°C で 24 時間培養した。
- 8) 黒色コロニーを釣菌し、TSI 培地, LIM 培地, VP 半流動培地に接種した。
- 9) TSI 培地には、高層部の底まで穿刺し、斜面部は画線を行った。
- 10) LIM 培地には、半分の位置まで穿刺した。
- 11) VP 半流動培地には、半分の位置まで穿刺した。
- 12) 35°C で 24 時間培養した。
- 13) TSI 培地で、斜面部赤鮮色（乳糖・白糖非分解）、高層部黄色（ブドウ糖分解）、黒色（硫化水素産生）を呈し、気泡や亀裂（ガス産生）が生じたもの、LIM 培地で、全体が紫色（リジン脱炭酸）で、運動性（穿刺部外増菌による混濁）を呈したもので、インドール試薬の添加により黄色色素の変化のないもの（インドール非産生）、VP 半流動培地で、VP 試薬添加により 1 時間以内に発色を呈さないもの（アセトイン非産生）をサルモネラ属菌と確定した。

・腸管出血性大腸菌 O157: H7

以下の検査は厚生労働省通知食安監発第 1102004 号も参考とした。

- 1) 検体 25 g をノボビオシン加 mEC 培地で 10 倍希釈した。
- 2) ストマッカーで 60 秒均質化を行った。
- 3) 42°C で 24 時間培養した。
- 4) 培養液 CT-SMAC 寒天培地, クロモアガー O157 TAM 培地に画線した。

- 5) 35°C で 24 時間培養した。
- 6) CT-SMAC 寒天培地で無色のコロニー，クロモアガーO157 TAM 培地で藤色を呈したコロニーをラテックス凝集反応試験（UNI キット）に供試し，CLIG 寒天培地に接種した。
- 7) ラテックス凝集反応試験では，1 分後にラテックス試薬と混合したものと陽性コントロールのみ凝集が観られたものを陽性とした。
- 8) CLIG 寒天培地では，高層部底まで穿刺し，斜面部に画線した。
- 9) 35°C で 24 時間培養した。
- 10) 斜面部に赤色を呈し（セロビオース非分解），高層部が黄変し（乳糖分解），添加したインドール試薬が赤色に変化（インドール産生）し，オキシダーゼ試験紙に接触させても試験紙に変化はなく（オキシダーゼ非産生），暗所で 365 nm の紫外線照射を行っても蛍光発色しないもの（ β -グルクロニダーゼ非産生）を陽性とした。
- 11) 陽性となったコロニーを 1.5 ml チューブで 200 μ l の滅菌蒸留水に懸濁した。
- 12) *E. coli* O157: H7 死菌液（陽性コントロール）を 1.5 ml チューブで 200 μ l の滅菌蒸留水に懸濁した。
- 13) ヒートブロックで 95°C，10 分加熱した。
- 14) 4°C で 10 分冷却した。
- 15) 10,000 \times g，5 分，4°C で遠心分離した。
- 16) 上清を O157（ベロ毒素遺伝子）One Shot PCR Screening Kit に 50 μ l ずつ，それぞれ添加した。陰性コントロールとして滅菌蒸留水 50 μ l も添加した。
- 17) ボルテックスミキサーで混合後，スピンドウンした。
- 18) サーマルサイクラーにそれぞれセットした。
- 19) 以下の条件で PCR を実施した。

ステップ	温度	時間	サイクル数
変性	94°C	1分	35
アニーリング	55°C	1分	
伸長	72°C	1分	
伸長	72°C	10分	1
冷却	4°C	—	1

- 20) それぞれを 10 µl ずつ 6×loading buffer 2 µl と混合した。
- 21) 3%アガロースゲルのウェルに混合液をそれぞれ添加した。
- 22) 100 V で電気泳動した。
- 23) 10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 5 µl, 50 ml の蒸留水に添加した。
- 24) これに電気泳動を終了したゲルを入れた。
- 25) 30 分静置した。
- 26) UV トランスイルミネーターでバンドを確認した。
- 27) 陽性コントロールと同位置にバンドが検出された場合、腸管出血性大腸菌 O157: H7 と確定した。

・カンピロバクター ジェジュニ/コリ

- 1) 検体 25 g を調製した Preston 培地 100 ml, カンピロバクター発育サプリメント 400 µl と混合した。
- 2) ストマッカーで 15 秒均質化を行った。
- 3) 10 ml を試験管に分取し, Preston カンピロバクター選択サプリメントを 40 µl 添加した。
- 4) 馬溶血液 500 µl を添加し, 混合した。
- 5) アネロパックシステムで微好気条件にした。
- 6) 42°C で 24 時間培養した。
- 7) 1.5 ml チューブに培養液 50 µl と Loopamp カンピロバクター検出キット添付の Extraction Solution for Foods 50 µl を添加した。
- 8) ボルテックスミキサーで混合し, スピンダウンした。
- 9) ヒートブロックで 95°C, 5 分加熱した。

- 10) スピンドアウンした.
- 11) キット添付の 1M Tris-HCl: pH 7.0 (Tris)を 10 μ l 添加した.
- 12) ボルテックスミキサーで混合した.
- 13) 2,000 \times g, 1 分, 室温で遠心分離した.
- 14) 氷上に静置した.
- 15) LAMP 法マスターミックスを以下の通り調製した.

試薬	μ l/検体
2 \times Reaction Mix.	12.5
Primer Mix. Cam	2.5
Distilled Water	4.0
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0
合計	20.0

- 16) タッピングにより調製したマスターミックスを混合した.
- 17) スピンドアウンした.
- 18) Loopamp 反応チューブに 20 μ l ずつ分注した.
- 19) 氷上に置いていた検体の上清 5 μ l を Loopamp 反応チューブに添加した.
- 20) 陽性コントロールとして Positive Control Cam を 5 μ l, 陰性コントロールとして Distilled Water を 5 μ l, それぞれ検体と同様に用意した.
- 21) タッピングで混合し, スピンドアウンした.
- 22) 濁度測定装置 RT-160C にセットした.
- 23) 以下の条件で LAMP 法を実施した.

項目	条件
温度	reaction block: 65°C, hot bonnet: 75°C
測定時間	60 分
酵素不活性化	80°C, 2 分

- 24) 濁度の上昇が観られた検体を陽性とした.

・リステリア モノサイトゲネス

- 1) 検体 25 g を UVM- I 培地で 10 倍希釈した.
- 2) ストマッカーで 30 秒均質化を行った.
- 3) 30°C で 48 時間培養した. PALCAM に画線後, 0°C に保存した.
- 4) 培養液を PALCAM に画線した.
- 5) PALCAM は, 30°C で 48 時間培養した.
- 6) 黒色ハローを形成する灰緑色コロニーをリステリア属陽性とした.
- 7) 陽性コロニーをクロモアガーリステリア培地に穿刺した.
- 8) 35°C で 24 時間培養した.
- 9) 白濁ハローを形成する水色コロニーを陽性とした.
- 10) 陽性コロニーを TSA に画線した.
- 11) 30°C で 24 時間培養した.
- 12) 形成されたコロニーから釣菌し, グラム染色を実施した.
- 13) 形成されたコロニーから釣菌し, カタラーゼ試験を実施した.
- 14) 形成されたコロニーから釣菌し, VP 半流動培地の半分の位置まで穿刺し, 30°C で 48 時間培養した.
- 15) 形成されたコロニーから釣菌し, 羊血液寒天培地に垂直に穿刺し, 35°C で 24 時間培養した.
- 16) 形成されたコロニーから釣菌し, 糖分解試験用培地 (ラムノース) に穿刺し, 35°C で 72 時間培養した.
- 17) 形成されたコロニーから釣菌し, 糖分解試験用培地 (キシロース) に穿刺し, 35°C で 72 時間培養した.
- 18) グラム陽性, 短桿菌, カタラーゼ試験で気泡が発生し, VP 半流動培地または糖分解試験用培地 (ラムノース) で傘状発育を示し, 添加した VP 試薬が赤変 (VP 反応陽性) し, β 溶血性が観られ, ラムノース分解陽性 (培地黄変), キシロース分解陰性 (培地紫色) であったものをリステリア モノサイトゲネス陽性とした.

以下の検査は, United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) の Microbiology Laboratory Guidebook “Most probable Number Procedure and Tables”, “Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from

Red meat, Poultry, Egg, and Environmental Samples” および ISO 11290-1 も参考とした。

- 19) 9)で陽性となった検体について、0°C に保存しておいた均質化液を用いて Most Probable Number (MPN) 法で菌数を推定した。
- 20) 試験管 3 本に均質化液を 10 ml ずつ添加した。
- 21) 9.0 ml の UVM- I を入れた試験管 3 本に均質化液を 1 ml ずつ添加した。
- 22) 9.9 ml の UVM- I を入れた試験管 3 本に均質化液を 0.1 ml ずつ添加した。
- 23) 30°C で 48 時間培養した。
- 24) 培養液を ALOA と PALCAM にそれぞれ画線した。
- 25) 37°C で 48 時間培養した。
- 26) PALCAM で、黒色ハローを形成する灰緑色コロニーをリステリア属陽性とした。
- 27) ALOA で、不透明な乳白色のハローを形成する青緑色コロニーをリステリア モノサイトゲネス陽性とした。
- 28) 両培地で陽性コロニーが確認された元の試験管の本数と MPN 表から MPN 値を算出した。

2.3. 結果

生ハム製造に使用する原料肉の細菌検査を行った (Table 7)。一般生菌数について、検出された菌数は 2 Log CFU/g 台から 4 Log CFU/g 台であった。3 Log CFU/g 台が最も多く、全体の 63%であった。平均値は 3.68 Log CFU/g で標準誤差は 0.06、標準偏差は 0.48 であった。低温菌について、一般生菌数と同様の傾向を示し、3 Log CFU/g 台が最も多く、全体の 62%であった。平均値は 3.59 Log CFU/g で標準誤差は 0.07、標準偏差は 0.54 であった。乳酸菌数は、2 Log CFU/g 台が最も多く全体の 48%であった。検出限界以下の検体も 30%観られたが、4 Log CFU/g 台が 1 検体あった。検出限界以下の検体を検出限界値として算出した平均値は、2.49 Log CFU/g で、標準誤差は 0.07、標準偏差は 0.58 であった。大腸菌群数、大腸菌数は全体の 78%および 93%が検出限界以下であった。同じく検出限界以下の検体を検出限界値として算出した平均値は、1.12 および 1.04 Log

Table 7. デンマーク産豚ロース肉における衛生指標菌の汚染状況.

Log CFU/g ^a	< 1	< 2	< 3	< 4	< 5	合計
一般生菌	-	-	5 (8%)	38 (63%)	17 (28%)	60
低温菌	-	-	8 (13%)	37 (62%)	15 (25%)	60
乳酸菌	-	18 (30%) ^b	29 (48%)	12 (20%)	1 (2%)	60
大腸菌群	47 (78%) ^b	11 (18%)	2 (3%)	-	-	60
大腸菌	56 (93%) ^b	4 (7%)	-	-	-	60

a : 検出された菌数の該当範囲を示している.

b : 検出限界以下であったことを示している.

値は該当検体数 (60 検体に占める割合) を示している.

CFU/g で、標準誤差は 0.04 および 0.02、標準偏差は 0.32 および 0.16 であった。

食中毒菌等の検査も実施した (Table 8)。リステリア モノサイトゲネスは、全体の 96.7%が 25 g 中陰性、陽性検体が 2 検体あったが、その菌数は < 0.3 MPN/g であった。黄色ブドウ球菌について、98.3%が検出限界以下であったが、1 検体から、最も希釈率の低いサンプルを添加した培地で 1 つだけコロニーが検出された。バチルス セレウス、クロストリジウム属菌は全て検出限界以下であった。腸管出血性大腸菌 O157:H7、サルモネラ属菌、カンピロバクター ジェジュニ／コリは、全ての検体で 25 g 中からは検出されなかった。

Table 8. デンマーク産豚ロース肉における食中毒菌等の汚染状況.

菌名	検出量	該当数 (検体)	該当率
リステリア モノサイトゲネス	陰性/25g	58/60	96.7%
	< 0.3 MPN/g	2/60	3.3%
黄色ブドウ球菌	< 2 Log CFU/g ^a	59/60	98.3%
	2 Log CFU/g ^b	1/60	1.7%
バチルス セレウス	< 2 Log CFU/g ^a	60/60	100%
クロストリジウム属菌	< 1 CFU/g ^a	60/60	100%
腸管出血性大腸菌 O157: H7	陰性/25g	60/60	100%
サルモネラ属菌	陰性/25g	60/60	100%
カンピロバクター ジェジュニ/コリ	陰性/25g	60/60	100%

a : 検出限界以下であったことを示している.

b : 最も希釈率の低いサンプルを添加した培地上にコロニーが 1 つだけ, 検出されたことを示している.

2.4. 考察

今回の検査における一般生菌数は、平均値±標準偏差が 3.59 ± 0.54 Log CFU/g、同じく大腸菌数は 1.04 ± 0.16 Log CFU/g であった。これについて、Ghafir と Daube (2008) は、ベルギー産豚肉枝肉の背、顎、腿、腹部を約 $5 \text{ cm}^2 \times 5 \text{ mm}$ でサンプリングした肉の Aerobic plate counts と *E. coli* counts は、平均値±標準偏差で 4.95 ± 0.87 Log CFU/cm² および 1.37 ± 0.73 Log CFU/cm² (検出限界以下の検体は検出限界値の半分の値として計算) であったことを報告している (n=133)。今回の試験結果を平方センチメートルあたりに換算し (1 本の豚ロース肉の赤身部分の面積は約 600 cm^2 、削ぎ取った肉の重量は約 150 g であった)、検出限界以下の検体は検出限界値の半分の値、つまり大腸菌数では 10 CFU/g 未満を 5 CFU/g として計算すると、一般生菌数は、 3.08 ± 0.48 Log CFU/cm²、大腸菌数は 0.72 ± 0.09 Log CFU/cm² となった。さらに Koo ら (2016) は、韓国の中心部で購入した豚挽肉 46 検体の Aerobic plate counts の平均は 5 Log CFU/g で、範囲は 3 Log CFU/g から 6 Log CFU/g であったとしている。肉の原産地も検出方法も異なる為、単純な比較はできないが、今回検査したデンマーク産豚ロース肉は汚染度の比較的低い衛生的に処理されたものであったと推察される。今回の大腸菌、大腸菌群検査のほとんどが検出限界以下であったこともこの結論を支持している。それは、大腸菌、大腸菌群が低値であることは、屠殺後の解体時に腸管内容物のコンタミネーションがなかった、もしくは非常に低値であったことを示しているからである。

今回検査に供試したデンマーク産豚ロース肉には食中毒菌のリスクがほとんど無いことが分かった。特に腸管出血性大腸菌 O157: H7、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌は、迅速製法工程中で増殖することはない為、この原料肉の清浄度を維持すれば製造した生ハム製品についても食中毒菌のリスクはほとんど無いと考えられる。リステリア モノサイトゲネスについて、今回の検査では 60 検体中陽性検体が 2 検体あった (3.3%)。Okutani ら (2004) は、日本国内に流通している豚肉 (ブロック) の 8.0% (4,421 検体中 355 検体) でリステリア モノサイトゲネスが陽性であったこと、豚肉スライス品および豚肉ミンチ品ではそれぞれ 32.2% (128/397 検体) と 19.2% (20/104 検体) が陽性であったことを報告している。これらのことから、今回検査に供試したデンマーク産豚ロース肉はリ

ステリア モノサイトゲネスの汚染が比較的少ないものであることが示唆された。加えて Codex Alimentarius Commission（国際食品規格委員会）による「Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61-2007」では、リステリア モノサイトゲネスの増殖が起こらない Ready-to-eat (RTE) 食品（生ハムなど調理を要しないで食べることのできる食品の総称）では、 < 100 CFU/g までリステリア モノサイトゲネスの存在を許容している。今回調べたロース肉はリステリア汚染から見ても許容レベルの優良な肉と判断される。しかしながら、汚染量は 0.3 MPN/g 未満と極めて少ないもののリステリア モノサイトゲネスが原料肉に付着している可能性が示されたことから、このリスクを低減する措置を予め検討する必要がある。

2.5. 小括

迅速製法に使用する原料肉には食中毒菌付着のリスクはほとんどなかったため、第 1 章の結果と合わせて迅速製法の安全性を強調する結果が示された。原料、製法が安全であることが分かったため、原料の段階から消費者が手にするまで、フードチェーン全体において、温度管理などの一般的衛生管理プログラムを遵守することが肝要になると想定される。

一方で、リステリア モノサイトゲネスが微量に検出されたことから、リスク低減の余地は残されていると考えられる。

第3章

乳酸処理による *L. monocytogenes* の殺菌

3.1. はじめに

リステリア モノサイトゲネスは、1980年代初頭に食中毒菌として認知されたが、近年においてもなお多くのリステリア症アウトブレイクと散発事例を引き起こしている (Barkley ら, 2016; Laksanalamai ら, 2012; Lassen ら, 2016; Stephan ら, 2015; Thomas ら, 2015). リステリア モノサイトゲネスは、他の食中毒菌が生育できないような環境条件下でも増殖することができる (Farber と Peterkin, 1991; Ferreira ら, 2014). これらの特徴が食品や食品製造現場にリステリア モノサイトゲネスが汚染することを助け、リステリア モノサイトゲネスの制御を難しくする要因となっている. それ故、ハードル理論をベースに Lm を制御する試みが食品や培地用いて多数検討され、報告されてきた (Ahamad と Marth, 1989; Buchanan ら 1993 と 1994; Carrier ら, 1996; Faleiro ら, 2003; Francis と O'Beirne, 2005; Foegeding と Leasor, 1990; Lunden ら, 2008; Schirmer ら, 2014.).

第1章で示した様に、今回評価した生ハムの迅速製法でリステリア モノサイトゲネスは増殖することなく減少したものの、第2章で加工に用いる原料肉 (豚ロース肉) には微量ながらリステリア モノサイトゲネスの汚染があることが分かった. この結果を受けて、原料肉中のリステリア モノサイトゲネスリスクをより低くする必要があるのではないかと考えられた.

有機酸、特に乳酸は家畜枝肉の洗浄 (Official Journal of the European Union, 2013; USDA-FSIS, 2016) や食品中に添加してリステリア モノサイトゲネスの増殖を抑制する為に用いられている (Byelashov ら, 2010; Wemmenhove ら, 2016; Yoon ら, 2011) が、複数のリステリア モノサイトゲネス株を用いて、異なる濃度別に乳酸の殺菌力を系統的に評価した報告は無い. その為、まず *in vitro* においてリステリア モノサイトゲネスに対する乳酸の殺菌力を評価することとした.

3.2. 材料および方法

3.2.1. 供試菌株

- ・リステリア モノサイトゲネス ATCC19115 4b (以下, Lm19115)
American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) より購入した。
- ・リステリア モノサイトゲネス MCRI-471 1/2a (以下, Lm471)
デンマーク産豚ロース肉より分離した。
- ・リステリア モノサイトゲネス ATCC15313 1/2a (以下, Lm15313)
ATCC より購入した。
- ・リステリア モノサイトゲネス ATCC7644 1/2c (以下, Lm7644)
ATCC より購入した。
- ・野生株
大阪健康安全基盤研究所 (旧大阪市立環境科学研究所) 中村 寛海先生より野生株 16 菌株を供与頂いた。供与菌株のリストは、以下の通りである。

No.	株名	分離年月日	分離源	血清型
1	a04 (20-6)	2002.08.02	水産加工場	1/2a
2	a07 (40-1)	2002.09.10	水産加工場	3a
3	a48 (33c-1)	2003.10.29	水産加工場	3b
4	b045	1999.09.06	スモークサーモンマリネ	1/2a
5	a40 (8-3)	1999.09.17	水産加工場	3a
6	a11 (8-3)	2002.11.06	水産加工場	1/2b
7	c10 (0308c084)	2003.08	塩漬けたらこ	1/2b
8	a06 (16-2)	2002.09.10	水産加工場	1/2b
9	b118	2000.09.17	スモークサーモンマリネ	1/2a
10	c08 (0308c082)	2003.08	スモークサーモン	1/2b
11	e08 (10-1)	2014.07.24	浅漬け漬物加工場	3a
12	b057	1999.10.14	スモークサーモン	4b
13	b001	1999.08.23	スモークサーモン	1/2a

14	c01 (0307c050)	2003.07	辛子明太子	1/2a
15	c15 (0309c109)	2003.08	辛子明太子	3a
16	g01	2015.01.24	浅漬け漬物加工場	1/2a

3.2.2. 培地, 試薬等

- ・乳酸

和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) (以下, 和光純薬) 製の食品添加物規格 (90%乳酸) を使用した。

- ・ 500 ml Filter System (以下, フィルター滅菌システム)

Corning Incorporated (NY, USA) 製 (0.22 μ m, Polyethersulfone) を使用した。

- ・乳酸水溶液

乳酸として所定の濃度 (w/w) となるように純水と混合し, フィルター滅菌システムを用いて滅菌し, 使用するまで常温で保存した。

- ・トリプトソーヤブイヨン (以下, TSB)

日水製薬株式会社 (東京, 日本) (以下日水製薬) 製を使用した。純水 500 ml に TSB 15g を溶解後, 10 ml ずつ試験管に分注し, オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) した。使用するまで常温で保存した。

- ・酵母エキス (以下, YE)

Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) 製を使用した。

- ・ 0.6% YE 加 TSB (以下 TSBYE)

純水 500 ml に TSB 15g 及び YE 3.0 g を溶解後, 10 ml ずつ試験管に分注し, オートクレーブ滅菌した。室温まで冷却した後, 使用するまで常温で保存した。

- ・トリプトソーヤ寒天培地 (以下, TSA)

日水製薬製を使用した。純水 500 ml に TSA 20 g を溶解後, オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後, 直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し, 固化するまで静置した。使用するまで常温で保存した。

- ・ 0.6% YE 加 TSA (以下, TSAYE)

純水 500 ml に TSA 20 g, YE 3.0 g を溶解後, オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後, 直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に

分注し、固化するまで静置した。使用するまで常温で保存した。

- ・グリセリン

和光純薬製特級を使用した。

- ・20%グリセリン加 TSB

純水 400 ml に TSB 15 g 及びグリセリン 100 g を溶解後、オートクレーブ滅菌した。室温まで冷却し使用するまで常温で保存した。

- ・乳酸培地溶液

乳酸として 50% (w/w) 濃度となるように加温溶解した TSBYE と混合した後、フィルター滅菌し、使用するまで常温で保存した。これと予め調製しオートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) した TSBYE と無菌的に混合し、各濃度 (w/w) の乳酸培地溶液を作製した。

- ・50 ml シリンジ

テルモ株式会社 (東京, 日本) 製を使用した。

- ・シリンジ用フィルター

Sartorius stedim biotech (Goettingen, Germany) 製 (0.2 μm , hydrophilic) を 50 ml シリンジに装着して使用した。

3.2.3. 供試菌株の培養

- 1) 供試菌株を凍結保存チューブから、チューブ内の菌液全体が解凍するのを避けながら、滅菌した白金線 (熱いまま) で凍結した菌液の一部に触れ、10 ml の TSBYE に懸濁した。
- 2) 37°C で一晩培養した。
- 3) 新しい TSBYE に対して 1/1000 倍量の培養液を添加した。
- 4) 37°C で 18 時間培養を行い、実験に供試した。

3.2.4. 供試菌株の保存

- 1) 継代培養した培養液に 20% となるようにグリセロールを無菌的に添加し、混和した。
- 2) 1.5 ml チューブに 0.5 ml ずつ分注し、-45°C で凍結保存した。

3.2.5. 乳酸処理

- 1) ゼロタイム用サンプルとして培養液をボルテックスミキサーで十分に混合した後、10 μ l 採取した。
- 2) 残りの培養液を 12,000 \times g, 2 分, 25°C で遠心分離した。
- 3) 上清を棄てた。
- 4) 予め 25°C に恒温しておいた既定の濃度の乳酸水溶液または乳酸培地溶液の一部を傾瀉した。
- 5) 蓋の裏側に溶液が付かないように注意しながら, ボルテックスミキサーで菌塊が完全に溶解するまで十分に混合した。
- 6) タイマーを起動し, すぐさま残りの乳酸水溶液または乳酸培地溶液を添加した。
- 7) 同様に蓋の裏側に溶液が付かないように用手法で十分に混合した。
- 8) 25°C 水浴中にチューブを静置した。
- 9) 既定時間経過毎にサンプルを採取した。
- 10) 採取したサンプルを TSBYE で適宜希釈した。
- 11) 100 μ l ずつ TSAYE に塗抹した。
- 12) 37°C, 48 時間培養した。
- 13) コロニー数を計数し, 菌数を算出した。
- 14) 必要に応じて統計解析を行った。

3.2.6. 統計解析

統計解析は, Tukey-Kramer 法で分散分析 (一元配置) および多重比較検定を行った。

3.3. 結果

3.3.1. 乳酸水溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長

乳酸水溶液中での各濃度におけるリステリア モノサイトゲネスの消長を観察した。Lm19115 は 0.5%では 5 分後から有意に菌数は減少し ($P < 0.05$) (Fig. 9A), 10 分後で初発菌数と比較して 1.2 Log CFU/ml 減少した。1.0%では 3 分後から有意に菌数は減少し ($P < 0.01$), 10 分後で初発菌数と比較して 2.8 Log CFU/ml 減少した。2.0%では 1 分後から有意に菌数は減少し ($P < 0.01$), 5 分後で初発菌数と比較して 5.0 Log CFU/ml 減少した。3.0%では 1 分後に菌数は 3.5 Log CFU/ml と有意に減少した ($P < 0.01$)。5.0%では, 1 分後には検出できなかった。

Lm471 は 0.5%では 10 分後に有意に菌数は減少し ($P < 0.01$) (Fig. 9B), 10 分後で初発菌数と比較して 1.2 Log CFU/ml 減少した。1.0%では 1 分後から有意に菌数は減少し ($P < 0.05$), 10 分後で初発菌数と比較して 3.0 Log CFU/ml 減少した。同様に 2.0%でも 1 分後から有意に菌数は減少し ($P < 0.01$), 5 分後で初発菌数と比較して 4.2 Log CFU/ml 減少した。3.0%では 3 分後に初発菌数と比較して 5.3 Log CFU/ml 減少した ($P < 0.01$)。5.0%では, 1 分後に初発菌数と比較して 5.9 Log CFU/ml と有意に減少した ($P < 0.01$)。

Lm19115, Lm471 どちらに対しても, 乳酸は濃度依存的に強い殺菌効果を示した。しかしながら, Lm19115 と Lm471 の間で乳酸による殺菌効果には差があり, Lm471 の方が耐性は高い傾向にあった。さらに今回の試験では乳酸が直接 Lm に接触できる水溶液中での試験あったが, 実際の食品においては有機物などの夾雑物が存在する。それ故, 有機物存在下での乳酸の殺菌効果検証が必要であり, 菌株間で殺菌効果に差が観られたことから, 他の菌株についても乳酸の効果を精査する必要性があると考えた。

3.3.2. 野生株の乳酸耐性

各野生株を 2.0%乳酸培地溶液で 30 分処理した際の菌数の減少を Table 9 に示した。指標として用いた Lm19115 は 2.0%乳酸培地溶液, 30 分の処理で 2.04 Log CFU/ml 菌数が減少した。これに対して, 2 Log CFU/ml 以上菌数が減少したもの

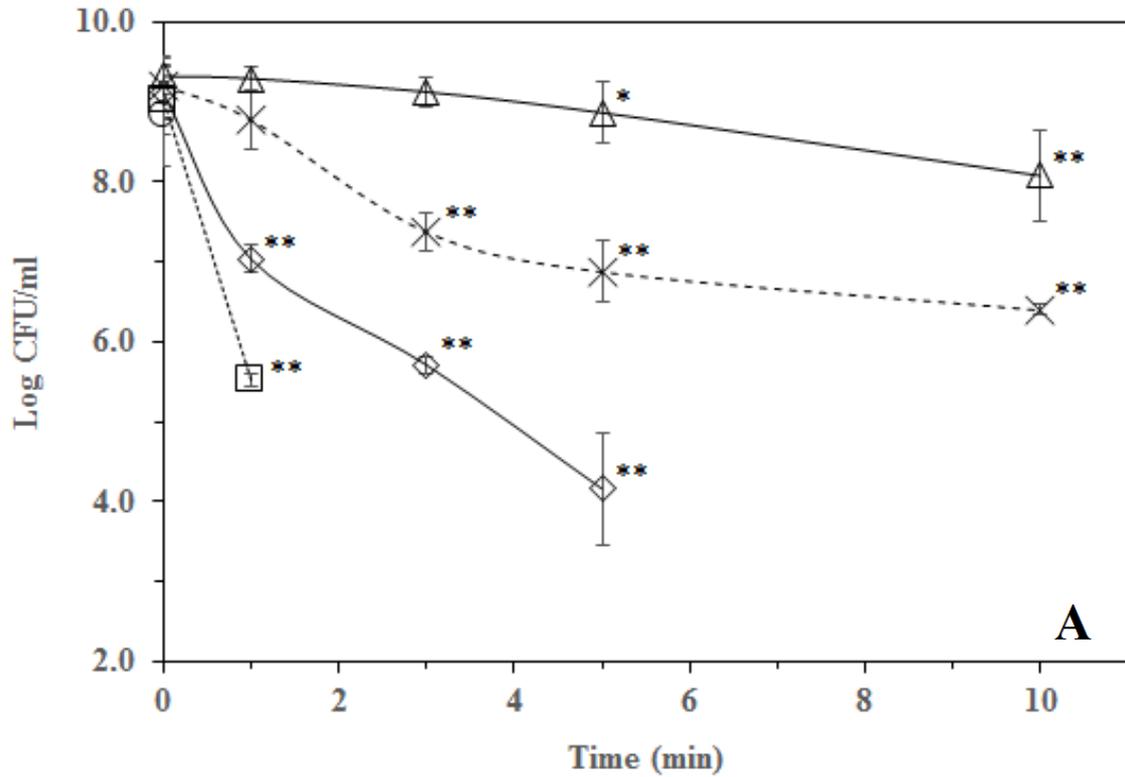


Fig. 9A. 乳酸水溶液中 (25°C) での各濃度における Lm19115 の消長. 0.5% (△), 1.0% (×), 2.0% (◇), 3.0% (□), 5.0% (○). 縦軸は菌数を横軸は乳酸処理時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を表している (n=3). それぞれの濃度で 0 分と比較して有意差があったものに*を付した. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

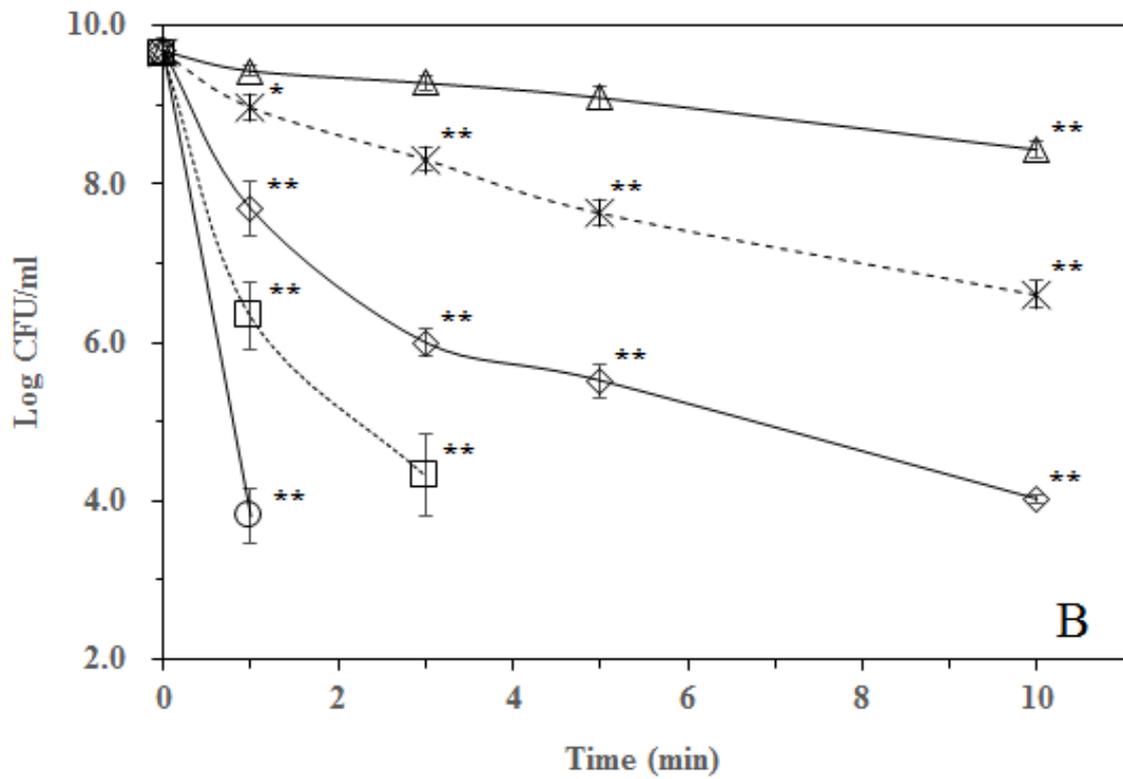


Fig. 9B. 乳酸水溶液中 (25°C) での各濃度における Lm471 の消長. 0.5% (△), 1.0% (×), 2.0% (◇), 3.0% (□), 5.0% (○). 縦軸は菌数を横軸は乳酸処理時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を表している (n=3). それぞれの濃度で 0 分と比較して有意差があったものに*を付した. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

Table 9. 2.0%乳酸培地溶液 30 分処理による菌数の減少.

No.	株名	分離年月日	分離原	血清型	減少菌数 (Log)
1	a04 (20-6)	2002.08.02	水産加工場	1/2a	-2.32
2	a07 (40-1)	2002.09.10	水産加工場	3a	-2.51
3	a48 (33c-1)	2003.10.29	水産加工場	3b	-1.68
4	b045	1999.09.06	スモークサーモンマリネ	1/2a	-1.64
5	a40 (8-3)	1999.09.17	水産加工場	3a	-1.28
6	a11 (8-3)	2002.11.06	水産加工場	1/2b	-1.75
7	c10 (0308c084)	2003.08	塩漬けたらこ	1/2b	-1.45
8	a06 (16-2)	2002.09.10	水産加工場	1/2b	-1.40
9	b118	2000.09.17	スモークサーモンマリネ	1/2a	-0.78
10	c08 (0308c082)	2003.08	スモークサーモン	1/2b	-0.60
11	e08 (10-1)	2014.07.24	浅漬け漬物加工場	3a	-1.97
12	b057	1999.10.14	スモークサーモン	4b	-0.17
13	b001	1999.08.23	スモークサーモン	1/2a	-1.96
14	c01 (0307c050)	2003.07	辛子明太子	1/2a	-1.56
15	c15 (0309c109)	2003.08	辛子明太子	3a	-2.07
16	g01	2015.01.24	浅漬け漬物加工場	1/2a	-0.77
Cont.	ATCC 19115	-	-	4b	-2.04

は供試 16 株中 3 株で、初発菌数と比較して最大 2.51 Log CFU/ml 減少した。一方、30 分処理による減少が 1 Log CFU/ml 以下だったものは、供試 16 株中 4 株で、No. 12 b057 株は 0.17 Log CFU/ml の減少に止まり、乳酸に対して最も強い耐性を示した。

以降の試験では、Lm19115 と耐性に最も差があった b057 株を使用することとした。

3.3.3. 乳酸培地溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長

乳酸培地溶液中での各濃度におけるリステリア モノサイトゲネスの消長を観察した (Fig. 10)。乳酸 0.5% では、供試菌株全てで 60 分の処理で有意な減少は観られなかった ($P > 0.05$) (Fig. 10A)。乳酸 1.0% では、5 つの供試菌株の内、Lm7644 のみ 60 分後に初発菌数と比較して有意に減少した ($P < 0.01$) (Fig. 10B)。乳酸 2.0% では、全ての供試菌株で有意な菌数の減少が確認された ($P < 0.01$) (Fig. 10C)。Lm19115 は、5 分後から菌数が有意に減少した。Lmb057 では 60 分後に有意な菌数の減少が確認された。Lm471 では、30 分後から菌数が有意に減少した。Lm7644 では、5 分後から有意な菌数の減少が確認された。Lm15313 でも 5 分後から有意な菌数の減少が確認された。乳酸 3.0% でも全ての供試菌株で有意な菌数の減少が確認された ($P < 0.01$) (Fig. 10D)。Lm19115 は、1 分後から菌数が有意に減少した。Lmb057 では 10 分後に有意な菌数の減少が確認された。Lm471 では、5 分後から菌数が有意に減少した。Lm7644 では、5 分後から有意な菌数の減少が確認された。Lm15313 は 1 分後から有意な菌数の減少が確認された。乳酸 5.0% では、5 つの供試菌株の内、4 株で 1 分後に菌数が有意に減少した ($P < 0.01$) (Fig. 10E)。Lmb057 では 5 分後に有意差が認められた。

全ての菌株で濃度依存的に乳酸による殺菌効果が確認された。菌株により効果に差はあるものの、3.0% 以上では 10 分以内に全ての菌株で有意に菌数が減少した。

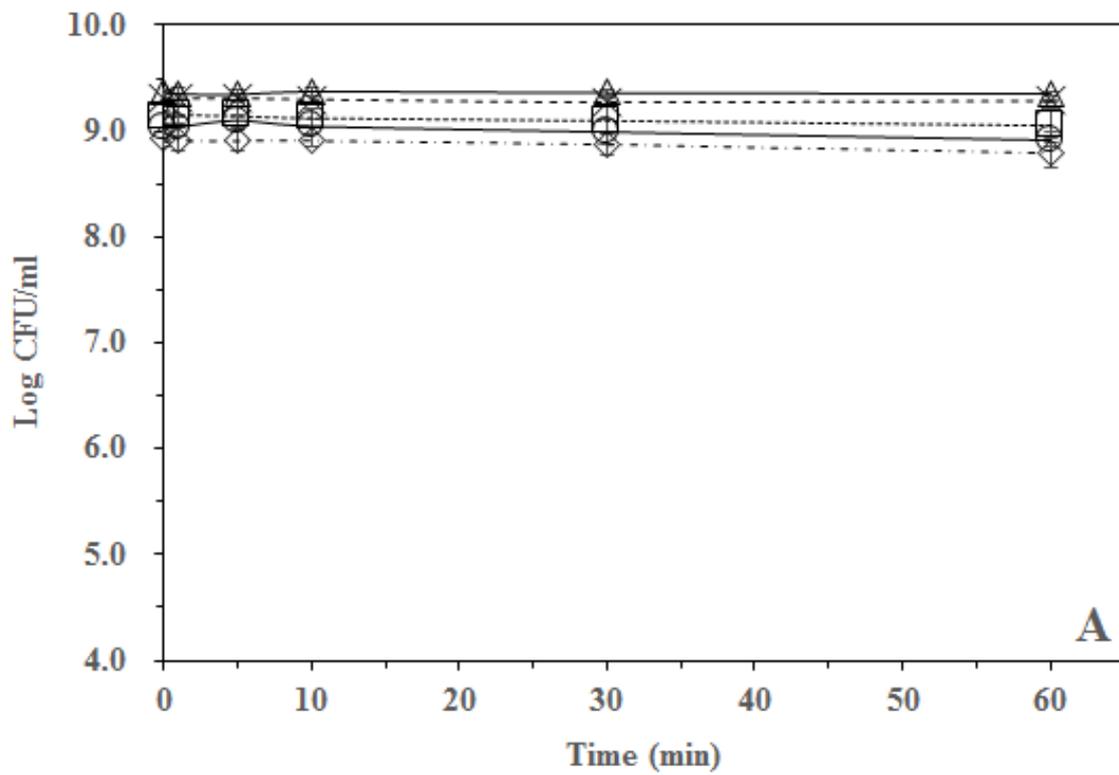


Fig. 10A. 0.5%乳酸培地溶液中のリステリア モノサイトゲネスの消長を観察した. Lm19115 (○), Lm7644 (□), Lm15313 (◇), Lm471 (×), Lmb057 (△) で, 縦軸は菌数を横軸は乳酸処理時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を示している (n=3).

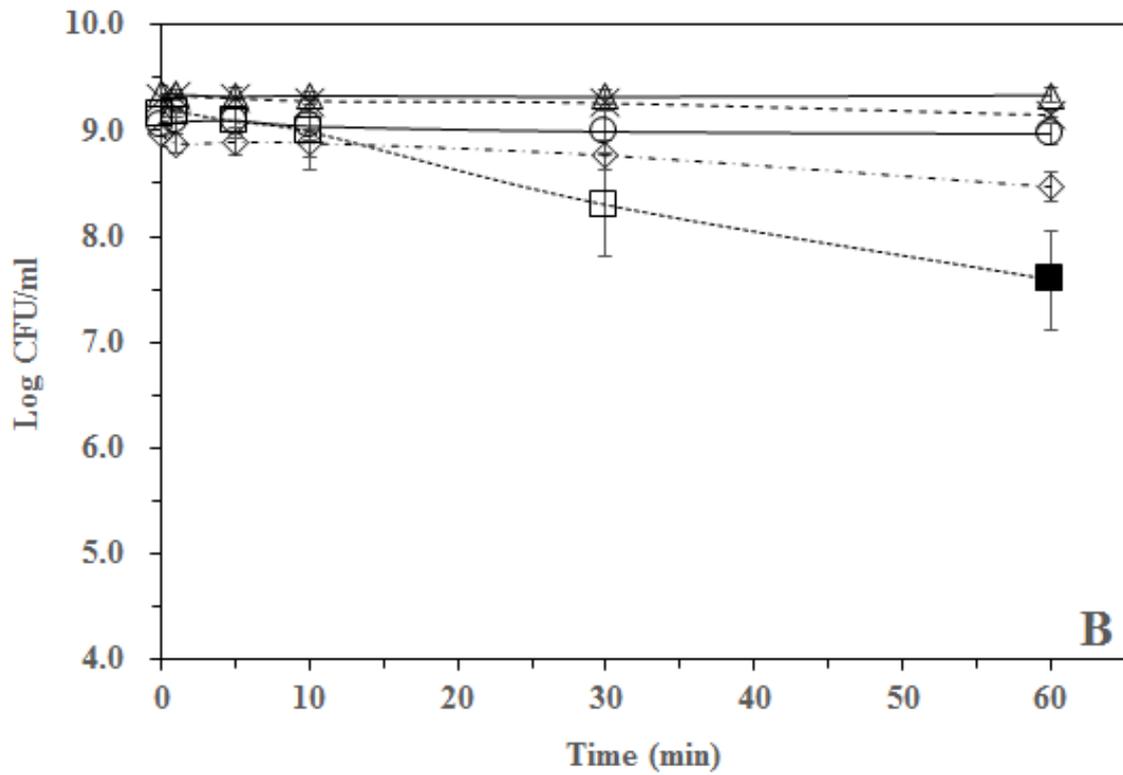


Fig. 10B. 1.0%乳酸培地溶液中のリステリア モノサイトゲネスの消長を観察した。Lm19115 (○), Lm7644 (□), Lm15313 (◇), Lm471 (×), Lmb057 (△) で、縦軸は菌数を横軸は乳酸処理時間をそれぞれ表している。エラーバーは標準偏差を示している (n=3)。塗り潰されたシンボルは 0 分と比較して菌数に有意な差が表れた点を表している ($P < 0.01$)。

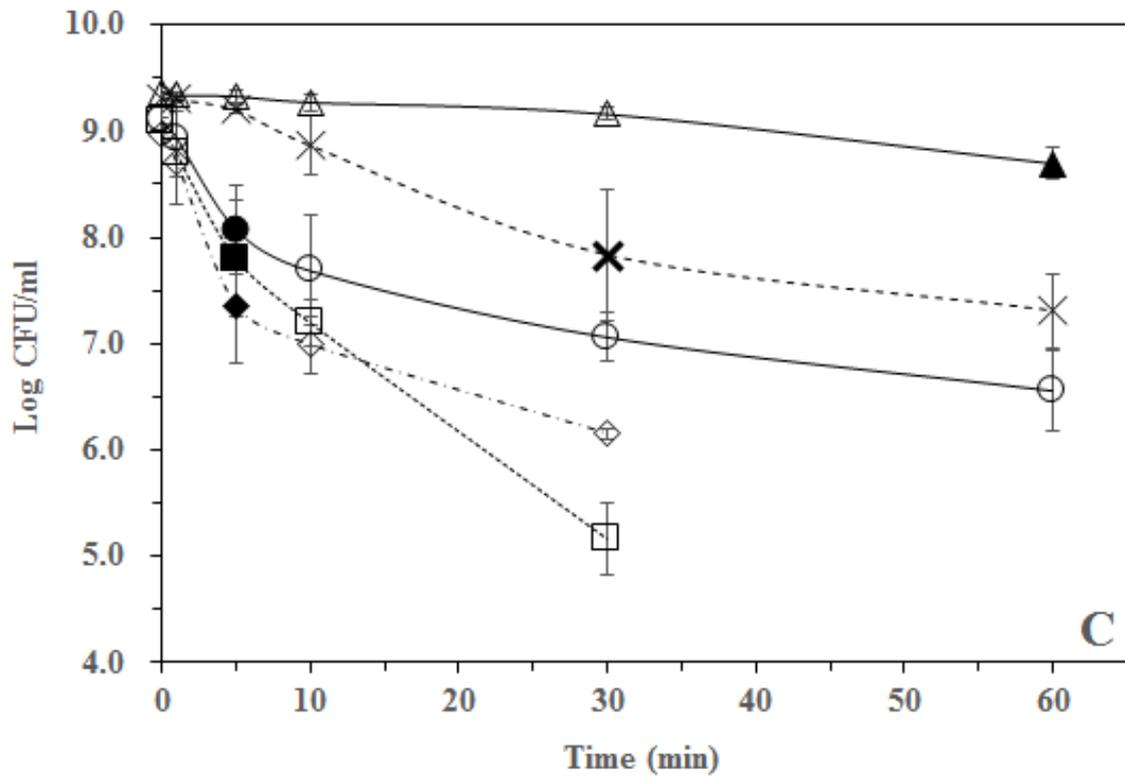


Fig. 10C. 2.0%乳酸培地溶液中のリステリア モノサイトゲネスの消長を観察した. Lm19115 (○), Lm7644 (□), Lm15313 (◇), Lm471 (×), Lmb057 (△) で, 縦軸は菌数を横軸は乳酸処理時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を示している (n=3). 塗り潰された, または太線のシンボルは0分と比較して菌数に有意な差が表れた点を表している ($P < 0.01$).

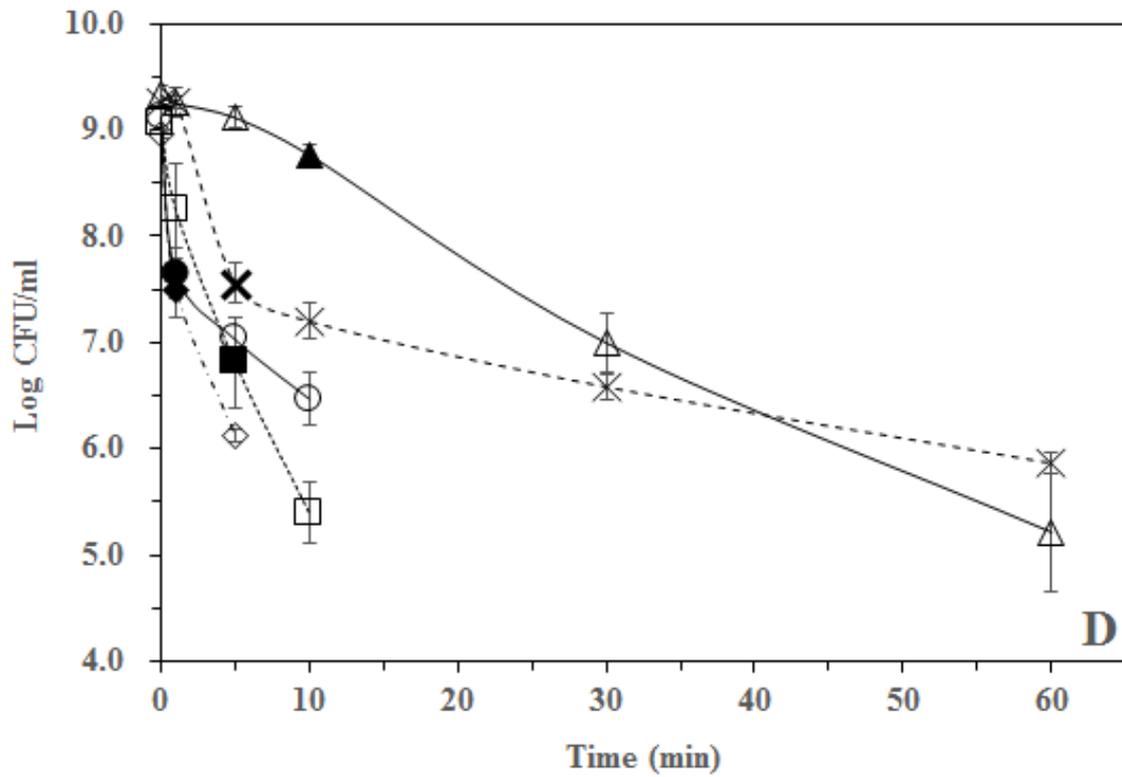


Fig. 10D. 3.0%乳酸培地溶液中のリステリア モノサイトゲネスの消長を観察した. Lm19115 (○), Lm7644 (□), Lm15313 (◇), Lm471 (×), Lmb057 (△) で, 縦軸は菌数を横軸は乳酸処理時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を示している (n=3). 塗り潰された, または太線のシンボルは 0 分と比較して菌数に有意な差が表れた点を表している ($P < 0.01$).

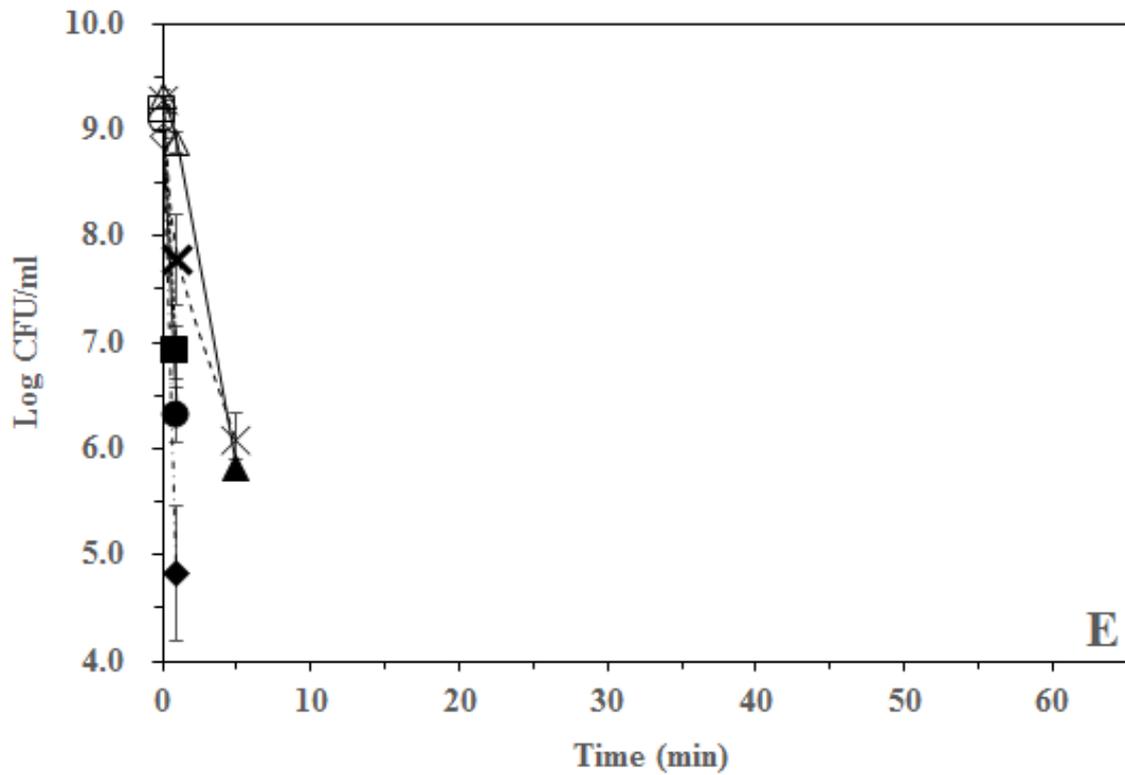


Fig. 10E. 5.0%乳酸培地溶液中のリステリア モノサイトゲネスの消長を観察した. Lm19115 (○), Lm7644 (□), Lm15313 (◇), Lm471 (×), Lmb057 (△) で, 縦軸は菌数を横軸は乳酸処理時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を示している (n=3). 塗り潰された, または太線のシンボルは0分と比較して菌数に有意な差が表れた点を表している ($P < 0.01$).

3.4. 考察

3.4.1. 乳酸水溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長

結果より、乳酸処理によりリステリア モノサイトゲネスの菌数を減少させることができることが改めて確認された。殺菌効果は濃度が上がるにつれ高くなり、10 分以内という短時間で効果が認められた。特に 2.0%以上の濃度では、1 分で 1 Log CFU/ml 以上の殺菌効果が確認された。

3.4.2. 野生株の乳酸耐性

乳酸の効果は株により異なること、標準菌株より野生株の方が乳酸に対する耐性が強い傾向にあることが示唆された。供試菌株の中には、1/2a, 1/2b, 3a, 3b, 4b の血清型があったが、血清型に依存した耐性傾向、また、検出由来による特定の傾向は今回の試験では観られなかった。

3.4.3. 乳酸培地溶液中でのリステリア モノサイトゲネスの消長

水溶液中での試験結果と比較して、有機物を含む培地では明らかに乳酸の殺菌効果は減弱した。Lm19115, Lm471 どちらにおいても同様の傾向が確認された。これらの結果は、食品の裂け目や窪み、食品製造現場にある加工機器に付着した残渣に潜むリステリア モノサイトゲネス、つまりは有機物の中に存在するリステリア モノサイトゲネスに対して乳酸の効果は大きく減弱する可能性を示している。0.5%および 1.0%乳酸培地溶液では、ほとんどの株で有意な菌数の減少は観られず、2.0%以上でも株により効果に差が観られた。これまでに食塩、酸、熱などもリステリア モノサイトゲネスの株によって効果が異なることが報告されている (Faleiro et al., 2003; Francis and O'Beirne, 2005; Luden et al., 2008; Schirmer et al., 2014; Sorqvist, 1994)。今回の結果は、リステリア モノサイトゲネスを殺菌するためには少なくとも 2.0%以上、10 分程度の比較的短時間での効果を期待する場合は 3.0%以上の濃度が必要であることが示された。2%以上という濃度は、“EU regulations concerning the use of LA to reduce microbiological surface contamination on bovine carcasses” (Official Journal of the European Union, 2013) に示されている牛枝肉洗浄に使用する際に要求される乳酸の最低濃度と一致する。

3.5. 小括

より安全性を高める目的で、乳酸による殺菌効果を検証した。結果、3%以上の濃度であれば有機物の存在下でも短時間での殺菌効果があることが示された。生ハム迅速製法の前処理として、この乳酸処理を適用することで一層製品の安全性が担保されることが期待される。

結果で示された通り、株によって乳酸の効果は異なる。それ故、乳酸処理を適用する場合には製造現場、使用原料などを考慮し、実際にコンタミネーションを起こし得るリステリア モノサイトゲネス株に対しての効果検証を踏まえ、適切な濃度あるいは時間を設定する必要があると考えられる。

第4章

乳酸処理による *L. monocytogenes* の耐熱性増強

4.1. はじめに

第3章において、リステリア モノサイトゲネスの株により感受性に差はあるものの、乳酸を用いて殺菌できることが示された。一方で、酸処理後の Lm のリスクについて様々な報告がある。Skandamis ら (2008) は Lm を pH 5.0 (塩酸で調整) で 1 または 1.5 時間処理すると pH 3.5 (乳酸で調整) や 57°C の加熱に対する耐性がそれぞれ上がることを報告している。同様の結果が他にも報告されている (Davis ら, 1996 ; O'Driscoll ら, 1996 ; Phan-Thanh ら, 2000)。しかしこれらは、酸処理を 1-2 時間ほど行った際の影響であって、例えば数秒から数分の短い時間の影響については報告が無い。そこで本章では、食品製造現場での使用を想定して、短時間の乳酸処理におけるリスクを調査することとした。また、生ハムが含まれる食品衛生法の非加熱食肉製品は、“その中心部の温度を 63°C で 30 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法による加熱殺菌を行っていない食肉製品”と定義されており、乾燥または燻煙工程においては 50°C 以上の加熱が認められていること、原料肉からリステリア モノサイトゲネスのリスクを完全に排除しようとした場合に、乳酸で処理した後に原料肉表面を加熱することが想定されることから、今回の試験では短時間、乳酸処理を行い、その後の熱処理におけるリステリア モノサイトゲネスの耐熱性を評価した。さらに、食品製造現場では一般的に乳酸処理後に次の工程まで待機時間がある場合がある。その故、乳酸処理後の時間がリステリア モノサイトゲネスの耐熱性に与える影響を評価した。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 供試菌株

- ・リステリア モノサイトゲネス ATCC19115 4b (以下, Lm19115)
Amrican Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) より購入した.
- ・リステリア モノサイトゲネス b057 4b (以下, Lmb057)
大阪健康安全基盤研究所 中村 寛海先生より分与頂いたスモークサーモンより分離された菌株である.

4.2.2. 培地, 試薬等

- ・乳酸
和光純薬工業株式会社 (以下, 和光純薬) (大阪, 日本) 製の食品添加物規格 (90%乳酸) を使用した.
- ・トリプトソーヤブイヨン (以下, TSB)
日水製薬株式会社. (日水製薬) (東京, 日本) 製を使用した. 純水 500 ml に TSB 15g を溶解後, 10 ml ずつ試験管に分注し, オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) した. 使用するまで常温で保存した.
- ・酵母エキス (以下, YE)
Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) 製を使用した.
- ・0.6% YE 添加 TSB (以下, TSBYE)
純水 500 ml に TSB 15g 及び YE 3.0 g を溶解後, 10 ml ずつ試験管に分注し, オートクレーブ滅菌した. 室温まで冷却した後, 使用するまで常温で保存した.
- ・トリプトソーヤ寒天培地 (以下, TSA)
日水製薬製を使用した. 純水 500 ml に TSA 20 g を溶解後, オートクレーブ滅菌した. 約 50°C に冷却後, 直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し, 固化するまで静置した. 使用するまで常温で保存した.
- ・0.6%YE 添加 TSA (以下, TSAYE)
純水 500 ml に TSA 20 g, YE 3.0 g を溶解後, オートクレーブ滅菌した. 約

50°C に冷却後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し、固化するまで静置した。使用するまで常温で保存した。

- 1%乳酸培地溶液

乳酸として 50% (w/w) 濃度となるように加温溶解した TSBYE と混合した後、フィルター滅菌し、使用するまで常温で保存した。これと予め調製しオートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) した TSBYE と無菌的に混合し、1%濃度 (w/w) の乳酸培地溶液を作製した。

- 50 ml シリンジ

テルモ株式会社 (東京, 日本) 製を使用した。

- シリンジ用フィルター

Sartorius stedim biotech (Goettingen, Germany) 製 (0.2 μm , hydrophilic) を 50 ml シリンジに装着して使用した。

4.2.3. 供試菌株の培養

- 1) 供試菌株を凍結保存チューブから、チューブ内の菌液全体が解凍するのを避けながら、滅菌した白金線 (熱いまま) で凍結した菌液の一部に触れ、10 ml の TSBYE に懸濁した。
- 2) 37°C で一晩培養した。
- 3) 50 ml チューブに入れた新しい TSBYE 20 ml に培養液 20 μl を添加した。
- 4) 37°C で 18 時間培養を行い、実験に供試した。

4.2.4. 供試菌株の保存

- 1) 継代培養した培養液に 20% となるようにグリセロールを無菌的に添加し、混和した。
- 2) 1.5 ml チューブに 0.5 ml ずつ分注し、-45°C で凍結保存した。

4.2.5. 乳酸処理

- 1) 培養液を 12,000 \times g, 2 分, 25°C で遠心分離した。
- 2) 上清を捨てた。
- 3) 予め 25°C に恒温しておいた 1%乳酸培地溶液 20 ml の内、約 5 ml を傾瀉

した。

- 4) 蓋の裏側に溶液が付かないように注意しながら、ボルテックスミキサーで十分に混和した。菌塊が完全に溶解するまで十分に混合した。
- 5) タイマーを起動し、すぐさま残りの乳酸培地溶液を添加し同じく蓋の裏側に溶液が付かないように用手法で十分に混合した。
- 6) 25°C の水浴中に 1 分静置した。
- 7) 12,000×g, 2 分, 25°C で遠心分離した。
- 8) 上清を除去した。
- 9) 25°C に恒温しておいた TSBYE 20 ml の内, 約 5 ml を傾瀉した。
- 10) 蓋の裏側に溶液が付かないように注意しながら、ボルテックスミキサーで十分に混和した。菌塊が完全に溶解するまで十分に混合した。
- 11) タイマーを起動し、すぐさま残りの TSBYE 溶液を添加し同じく蓋の裏側に溶液が付かないように用手法で十分に混合した。
- 12) 25°C の水浴中に所定の時間 (0~360 分) 静置した。
- 13) ゼロタイムの菌数測定用に 10 µl を採取した。
- 14) 12,000×g, 2 分, 25°C で遠心分離した。
- 15) 上清を除去した。
- 16) 対照として、乳酸を含まない TSBYE で同様の手順で実験を行った。

4.2.6. 加熱処理

- 1) 予め 55°C に恒温しておいた TSBYE 20 ml の内, 約 5 ml を傾瀉した。
- 2) 蓋の裏側に溶液が付かないように注意しながら、ボルテックスミキサーで十分に混和した。菌塊が完全に溶解するまで十分に混合した。
- 3) タイマーを起動し、すぐさま残りの乳酸培地溶液を添加し同じく蓋の裏側に溶液が付かないように用手法で十分に混合した。
- 4) 55°C の湯浴中に静置した。
- 5) 所定の時間 (10, 20, 30 分) 毎にサンプリングを行った。

4.2.7. 統計解析

加熱処理における Lm の消長について有意差検定を行った。Tukey-Kramer 法で分散分析（一元配置または二元配置）および多重比較検定を行った。

4.3. 結果

乳酸処理によるリステリア モノサイトゲネスの熱耐性の変化

Lm19115 について、対照群は 55°C、30 分の加熱で 0.90 CFU/ml 菌数が減少した (Fig. 11A)。乳酸処理後直ぐに加熱処理を開始した 0 min 群は、30 分の加熱で 2.42 CFU/ml 菌数が減少した。一方、25°C で 60 min、120 min、360 min の各静置時間を設けた群は、それぞれ 0.52, 0.30, 0.42 CFU/ml の減少に止まった。対照群と 0 min 群、60 min 群は、加熱前と加熱 30 分後の菌数に統計的に有意な差があった (60 min 群 : $P < 0.05$, 対照群および 0 min 群 : $P < 0.01$)。しかしながら、120 min 群および 360 min 群においては加熱前と加熱 30 分後の菌数の間に有意な差は無かった ($P > 0.05$)。それぞれの加熱 D_{55} 値は、対照群 : 34.4 分, 0 min 群 : 12.0 分, 60 min 群 : 58.8 分, 120 min 群 : 107.5 分, 360 min 群 : 77.5 分であり、対照群の D 値と比較すると 0 min 群 : 0.3 倍, 60 min 群 : 1.7 倍, 120 min 群 : 3.1 倍, 360 min 群 : 2.3 倍であった。乳酸処理後 120 min 静置した群において Lm19115 の熱耐性は最大となった。

Lmb057 について、対照群は 55°C、30 分の加熱で加熱前の菌数と比較して 0.45 CFU/ml 減少した (Fig. 11B)。乳酸処理後直ぐに加熱処理を開始した 0 min 群は、30 分の加熱で加熱前の菌数と比較して 0.57 CFU/ml 減少した。一方、25°C で 30 min、60 min、90 min の各静置時間を設けた群は、それぞれ 0.24, 0.43, 0.48 CFU/ml の減少であった。対照群と 0 min 群、60 min 群、90 min 群において加熱前の菌数に対する加熱 30 分後の菌数の減少は、統計的にも有意な差であった ($P < 0.01$)。しかしながら、30 min 群においては加熱前の菌数と加熱 30 分後の菌数の間に有意な差は無かった ($P > 0.05$)。それぞれの加熱 D_{55} 値は、対照群 : 65.8 分, 0 min 群 : 52.1 分, 30 min 群 : 126.6 分, 60 min 群 : 70.9 分, 90 min 群 : 62.9 分であり、対照群の D 値と比較すると、それぞれ 0.8 倍, 1.9 倍, 1.0 倍, 1.0 倍であった。乳酸処理後 30 min 静置した群で Lm057 の熱耐性は最大となった。

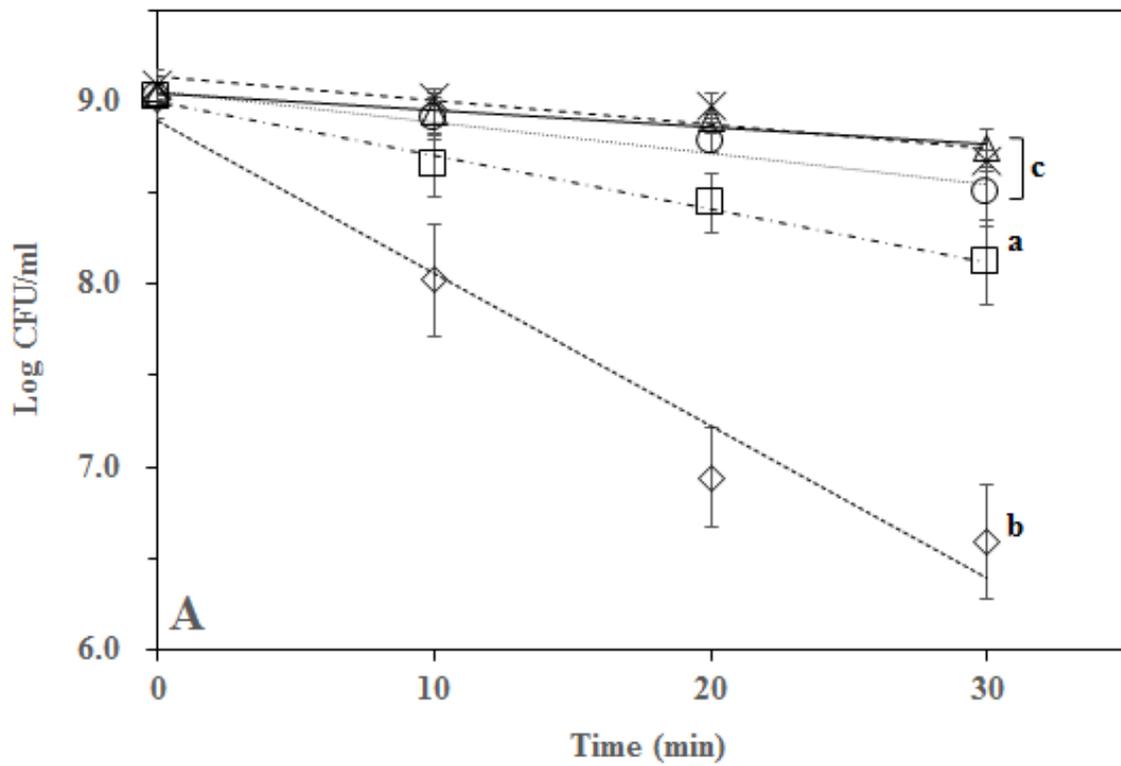


Fig. 11A. 乳酸処理による Lm19115 の熱耐性の変化 (55°C). 対照群 (□), 乳酸処理後, 25°C で静置した時間 0 min 群 (◇), 60 min 群, (○) 120 min 群 (△), 360 min 群 (×). 縦軸は菌数を横軸は加熱時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を表している (n=3). アルファベットの違いはそれぞれの群間で有意差があることを示している ($P < 0.01$).

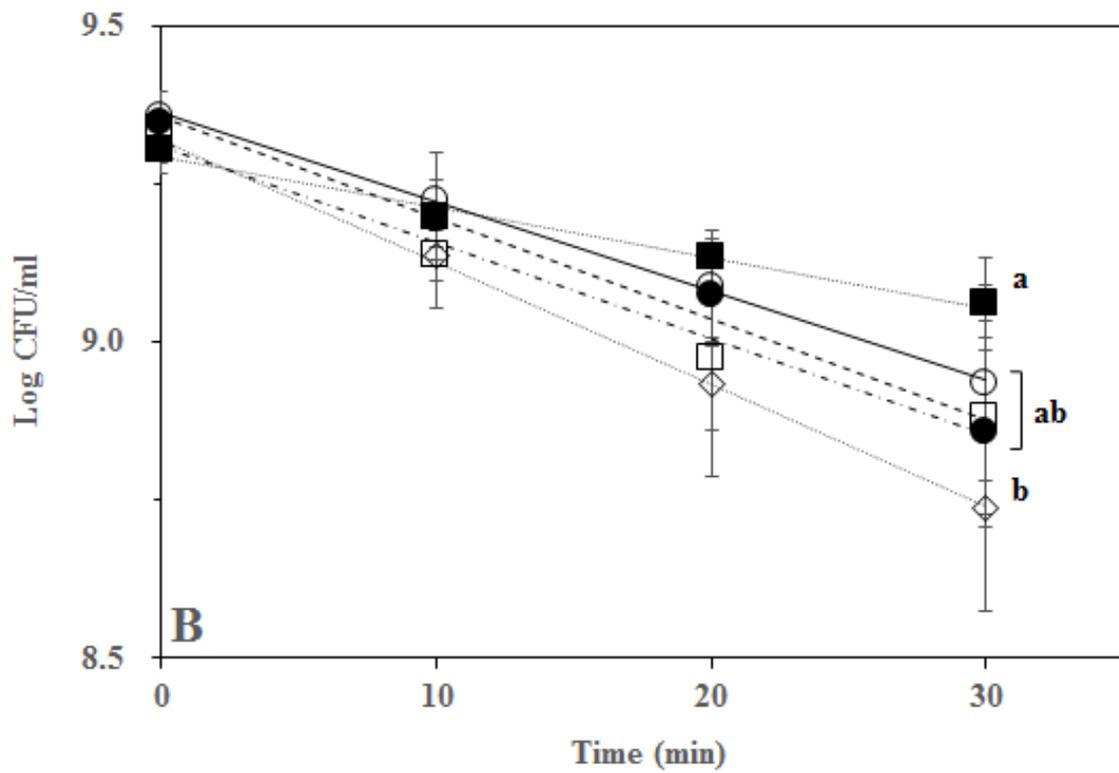


Fig. 11B. 乳酸処理による Lmb057 の熱耐性の変化 (55°C). 対照 (□), 乳酸処理後, 25°C で静置した時間 0 min 群 (◇), 30 min 群, (■) 60 min 群 (○), 90 min 群 (●). 縦軸は菌数を横軸は加熱時間をそれぞれ表している. エラーバーは標準偏差を表している (n=3). アルファベットの違いはそれぞれの群間で有意差があることを示している ($P < 0.01$).

4.4. 考察

乳酸処理によるリステリア モノサイトゲネスの熱耐性の変化

乳酸処理後に加熱試験を実施し、リステリア モノサイトゲネスの耐熱性を調べた。食品製造現場での待ち時間を想定し、乳酸処理後から加熱を開始するまでの25°C保存を設けた。これまでの報告で、酸処理した肉の表面のpHは、低温であっても時間によって上昇することが示されている (Anderson and Marshall, 1990; Gonzalez-Fandos and Dominguez, 2006; van Netten et al., 1997)。これを考慮して、今回の試験では新しい培地に溶媒を交換してから加熱試験を行った。

その結果、Lm19115では乳酸処理後直ぐに加熱を行ったものは、対照群と比較してD値が約1/3に短縮し、乳酸処理と加熱処理の相乗効果が観察された。乳酸処理と加熱処理の間に時間を空けたものは対照群と比較してD値が有意に延長し、最大約3倍となった。その効果は360 min時間を空けたものでも観られた。しかしながら、データは示していないが乳酸処理後の静置を25°Cではなく、4°Cで実施した場合はD値の延長は観られなかった。この乳酸処理直後に加熱処理を行うとD値が短くなり、時間をおくとD値が延長するという傾向は、Lmb057においても確認された。

以上のことから、食品製造過程における工程間の待機時間は、乳酸処理されたリステリア モノサイトゲネスの耐熱性を増強させ、耐性を獲得したリステリア モノサイトゲネスは通常想定される加熱処理では死滅せず、製品や製造環境中に固着する可能性が危惧される (Nakamura et al., 2013)。一方で、待機時間中低温で保持した場合は耐熱性が増強しなかったことから、工程中の温度管理は非常に重要であることが改めて示された。

4.5. 小括

乳酸処理後に熱処理を行うことは、一定数乳酸処理により菌数を減らし、熱処理によってもまた、一定数菌数を減らすという足し算的な効果が予想されたが、実際には加熱処理を行うタイミングにより効果が異なった。乳酸処理後すぐに加熱処理を行うと相乗効果が生まれ、加熱処理だけを行う場合と比較してD値

を約 1/3 にすることができた一方、時間を空けてから加熱を行った場合には反対に D 値が約 3 倍長くなる場合があることが示された。これは、工程間の待機時間をなくすことは単に微生物に回復・増殖する時間を与えないということだけでなく、処理効果を増強させる可能性を示唆している。逆に時間を空けることは菌が回復し、元の性質に戻るのではなく、より耐性が強化されることを示唆している。

リステリア モノサイトゲネスは、弱い酸 (pH 5.0 程度) に 1 時間程度曝されると、その後の酸処理や熱処理に耐性を示し、その耐性は 1, 2 時間程度で消滅することが知られていたが、今回の試験では、やや強い酸 (pH, 約 3.5) ではあったが処理時間は僅か 1 分、新しい培地に交換されるまでの時間を含めても約 4 分であり、25°C 静置 360 分でも熱耐性の増強は維持されていた。これらのことから、今回の知見はリステリア モノサイトゲネスのストレス耐性に理解を深める上で非常に興味深い結果であると考えられる。

第 5 章

乳酸処理による *L. monocytogenes* 耐熱性増強機構の解明

5.1. はじめに

第4章において、リステリア モノサイトゲネスは短時間の乳酸処理後にある程度の時間をおくと、続いて行う加熱処理に対して耐性を示すことが分かった。本章においては、その加熱耐性増強の機構について遺伝子レベルでの解明を目的とした。

Heat shock protein (以下 HSP) は、細菌が突然の温度上昇に曝された際に合成が促進されるタンパク質で、heat shock genes (以下 HSGs) によりコードされている (Neidhardt ら, 1984)。中でも Class I HSGs である *dnaJ*, *dnaK*, *grpE*, *groEL* および *groES* がコードするタンパク質は、分子シャペロンとして細胞質に存在し、heat shock 時だけでなく、細菌の増殖過程においても他のタンパク質が凝集することや不適切に折りたたまれることを防ぎ、タンパク質の安定化に機能している (Selby ら, 2011)。Class I HSGs は2つのオペロンから成り、1つは *hrcA*, *grpE*, *dnaK*, *dnaJ* が位置するオペロンで、もう1つは *groEL* および *groES* があるオペロンである。Class I HSGs は抑制因子 HrcA によって制御されている (Hanawa ら, 2000, Wiegert と Schumann, 2003)。Class III HSGs である *clpE* と *clpB* は、熱ストレス応答において耐性強化の役割を果たしている (Chastanet ら, 2004 ; de Oliveira ら, 2011 ; Nair ら, 2000)。

シグマ因子 SigB は、グラム陽性菌の RNA ポリメラーゼホロ酵素のサブユニットで、そのレギュロンはリステリア モノサイトゲネスで 130 遺伝子程度あり、様々なストレス応答に関わっていることがこれまでに報告されている (Guldimann ら, 2016)。Ferreira ら (2001) は、酸耐性はストレス応答の主要な調節因子である SigB が関係していることを示し、Abram ら (2008) は SigB に制御されている lmo2748 のタンパク質が浸透圧耐性に働いていること、同じく Lmo0796, Lmo0913, Lmo2391 が酸ストレス耐性に関与していることを報告している。Ait-Ouazzou ら (2012) は、pH 5.5 および 7.0 においてリステリア モノサイトゲネスの *sigB* 欠損株は耐熱性が野生株に比べて 2.5 倍弱くなったとしており、Palmer ら (2009) は、抗菌ペプチドであるナイシンと SpdC に対する応答に SigB が関与していることを示している。Zhang ら (2011) は、胆汁酸塩に曝され

た条件下でリステリア モノサイトゲネスが生残するために *sigB* が重要な働きをしていることを報告している。

RNA sequencing (以下, RNA-seq) は次世代シーケンサーを使用して RNA の発現量を網羅的かつ迅速に解析する手法である。次世代シーケンサーは 2007 年に開発された。原理的には従来のキャピラリー電気泳動を用いたサンガー法に似ているが、大量並列に処理を行える所が大きな違いである。2003 年に終了したヒトゲノムプロジェクトはサンガーシーケンスを用いて行われたが、13 年の歳月と約 3,000 億円の費用が投じられた。次世代シーケンサーを使用すると、ヒト全ゲノム解析を約 7 日間、15 万円程でできると言われている (上田, 2015)。

RNA-seq は、様々な分野で用いられているが、リステリア モノサイトゲネスについても殺菌剤に対するストレス応答や生育条件の評価・解析などに用いられている (Casey ら, 2014 ; Lobel と Herskovits, 2016 ; Oliver ら, 2009 ; Tang ら, 2015)。

以上の報告に鑑み、今回のリステリア モノサイトゲネスの乳酸処理による耐熱性増強についても Class I および Class III の HSGs や SigB に制御されている遺伝子の関与があるのではないかと考えられる。そこで、そのメカニズムを遺伝子レベルで解析する為、網羅的遺伝子発現解析が可能な RNA-seq および定量リアルタイム PCR を使用した。

5.2. 材料および方法

5.2.1. 供試菌株

- ・リステリア モノサイトゲネス ATCC19115 4b (以下, Lm19115)
American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) より購入した。
- ・リステリア モノサイトゲネス b057 4b (以下, Lmb057)
大阪健康安全基盤研究所 中村 寛海先生より分与頂いたスモークサーモンより分離された菌株である。

5.2.2. 培地, 試薬等

- ・乳酸
和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) (以下, 和光純薬) 製の食品添加物規格 (90%乳酸) を使用した。
- ・50 ml シリンジ
テルモ株式会社 (東京, 日本) 製を使用した。
- ・シリンジ用フィルター
Sartorius stedim biotech (Goettingen, Germany) 製 (0.2 μm , hydrophilic) を 50 ml シリンジに装着して使用した。
- ・1%乳酸 TSBYE 溶液
乳酸として 50% (w/w) 濃度となるように加温溶解した TSBYE と混合した後, フィルター滅菌し, 使用するまで常温で保存した。これと予め調製しオートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) した TSBYE と無菌的に混合し, 1%濃度 (w/w) の乳酸培地溶液を作製した。使用まで常温で保存した。
- ・トリプトソーヤブイヨン (以下, TSB)
日水製薬株式会社. (東京, 日本) (以下日水製薬) 製を使用した。純水 500 ml に TSB 15g を溶解後, 10 ml ずつ試験管に分注し, オートクレーブ滅菌した。使用まで常温で保存した。
- ・酵母エキス (以下, YE)
Becton, Dickinson and Company (BD) (Franklin Lakes, NJ, USA) 製を使用

した。使用まで常温で保存した。

- ・ 0.6% YE 加 TSB (以下, TSBYE)

純水 500 ml に TSB 15g 及び YE 3.0 g を溶解後, 10 ml ずつ試験管に分注し, オートクレーブ滅菌した。室温まで冷却した後, 使用するまで常温で保存した。

- ・ トリプトソーヤ寒天培地 (以下, TSA)

日水製薬製を使用した。純水 500 ml に TSA 20 g を溶解後, オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後, 直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し, 固化するまで静置した。使用するまで常温で保存した。

- ・ 0.6% YE 加 TSA (以下, TSAYE)

純水 500 ml に TSA 20 g, YE 3.0 g を溶解後, オートクレーブ滅菌した。約 50°C に冷却後, 直径 90 mm のプラスチックシャーレに約 20 ml ずつ無菌的に分注し, 固化するまで静置した。使用するまで常温で保存した。

- ・ グリセリン

和光純薬製特級を使用した。

- ・ 20%グリセリン加 TSB

純水 400 ml に TSB 15 g 及びグリセリン 100 g を溶解後, オートクレーブ滅菌した。室温まで冷却し使用するまで常温で保存した。

- ・ リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)

和光純薬製特級を使用した。使用するまで常温で保存した。

- ・ 水酸化ナトリウム (以下, NaOH)

和光純薬製特級を使用した。使用するまで常温で保存した。

- ・ 1N NaOH 水溶液

NaOH 8g に純水 200 ml を加え, 溶解させた。使用まで常温で保存した。

- ・ 塩化ナトリウム (以下, NaCl)

和光純薬製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- ・ リン酸緩衝生理食塩水 (以下, PBS)

リン酸二水素カリウム 34.0 g を純水 500 ml に溶解後, 1N NaOH 水溶液を約 175 ml 添加して pH を 7.2 に調整し, 純水で 1000 ml にメスアップした。オートクレーブ滅菌し, 室温まで冷却した。これを原液とし, 使用時に純水で 800 倍に希釈したものに 0.85% となるように NaCl を添加し, オートクレーブ滅菌

した。使用まで常温で保存した。

- RNAprotect Bacteria Reagent

QIAGEN GmbH (Hilden, Germany) (以下, QIAGEN) 製を使用した。使用まで常温で保存した。

- RNAprotect Bacteria Reagent 溶液

RNAprotect Bacteria Reagent と PBS を 2 : 1 で混合して使用した。使用直前に調製した。

- 2-Amino-2-Hydroxymethyl-1, 3-propanediol 999 (以下, Tris)

和光純薬製生化学用を使用した。使用まで常温で保存した。

- 塩酸 (以下, HCl)

和光純薬製特級を使用した。使用まで常温で保存した。

- DEPC 処理水

ニッポン・ジーン株式会社 (東京, 日本) (以下, ニッポン・ジーン) 製遺伝子工学研究用を使用した。使用まで常温で保存した。

- 1000 mM Tris-HCl

Tris 6.1 g を DEPC 処理水 30 ml に溶解後, HCl で pH 8.0 に調整した。その後 50 ml にメスアップした。使用まで常温で保存した。

- 0.5 M EDTA (pH8.0)

ニッポン・ジーン製遺伝子工学研究用を使用した。使用まで常温で保存した。

- TE

1000 mM Tris-HCl 0.5 ml (終濃度 10 mM), 0.5 M EDTA 0.1 ml (終濃度 1 mM) を DEPC 処理水 49.4 ml に溶解させた。使用まで常温で保存した。

- Lysozyme, from egg white

和光純薬製細胞生物学用を使用した。使用まで冷蔵 (10°C 以下) で保存した。

- 100 mg/ml リゾチーム溶液

Lysozyme, from egg white を TE で 100 mg/ml となるように溶解させた。使用まで -45°C で凍結保存した。

- Sepasol-RNA I Super G (以下, セパゾール)

ナカライテスク株式会社 (京都, 日本) より購入した。使用まで冷蔵 (10°C

以下) で保存した.

- ・クロロホルム

和光純薬製特級を使用した. 使用まで常温で保存した.

- ・2-プロパノール

和光純薬製特級を使用した. 使用まで常温で保存した.

- ・イソアミルアルコール

和光純薬製特級を使用した. 使用まで常温で保存した.

- ・Cetyltrimethyl ammonium bromide (以下, CTAB)

CALBIOCHEM (San Diego, CA, USA) 製分子生物学用を使用した. 使用まで常温で保存した.

- ・10% CTAB-0.7 M NaCl

DEPC 処理水 30 ml に NaCl 1.64 g を溶解させた. CTAB 4 g を添加し, 加温溶解させた後, DEPC 処理水で 40 ml にメスアップした. 使用まで常温で保存した.

- ・5 M NaCl

NaCl 14.61 g を DEPC treated water 50 ml に溶解させた. 使用まで常温で保存した.

- ・クロロホルム - イソアミルアルコール (24 : 1) 溶液

クロロホルムとイソアミルアルコールを 24 : 1 で混合した. 使用まで常温で保存した.

- ・酢酸ナトリウム (以下, NaOAc)

和光純薬製分子生物学用を使用した. 使用まで常温で保存した.

- ・3M NaOAc

12.3 g を RNase-free water 40 ml に溶解させ, 50 ml にメスアップした後, 使用まで常温で保存した.

- ・グリコーゲン

MP Biomedicals, LLC. (Santa Ana, CA, USA) 製を使用した. 使用まで冷蔵 (4°C) で保存した.

- ・グリコーゲン水溶液

RNase-free water で濃度約 20 mg/ml に調整した.

- RNeasy Mini Kit
QIAGEN 製を使用した。使用まで常温で保存した。
- Quantitect Reverse Transcription Kit
QIAGEN 製を使用した。使用まで-20°C で保存した。
- Power SYBR Green PCR Master Mix
Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) 製を使用した。使用まで-20°C で保存した。
- μ ltraAmp PCR plate (以下, 96 well プレート)
Sorenson Bioscience, Inc. (Salt Lake City, UT, USA) 製を使用した。使用まで常温で保存した。
- 96well プレート用シール
EXCEL Scientific (Wrightwood, CA, USA) 製 ThermalSeal RT を使用した。
- 核酸濃度および純度測定装置
Thermo SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) 製 NANODROP 2000 Spectro-photometer (以下, NANODROP) を使用した。
- PCR (Polymerase chain reaction) 装置
タカラバイオ株式会社 (草津, 滋賀, 日本) 製 Thermal Cycler Dice Touch model TP350 を使用した。
- Real time PCR 装置
Applied Biosystems 製 StepOnePlus Real Time PCR System を使用した。
- 1 ml シリンジ
テルモ株式会社製を使用した。
- シリンジ用ニードル
テルモ株式会社製 26G \times 1/2" (0.45 \times 13 mm) を使用した。
- DNase
QIAGEN 製 DNaseIを使用した。使用まで 4°C で保存した。

5.2.3. 供試菌株の培養

- 1) 供試菌株を凍結保存チューブから、チューブ内の菌液全体が解凍するのを避けながら、滅菌した白金線 (熱いまま) で凍結した菌液の一部に触れ 10

ml の TSBYE に懸濁した。

- 2) 37°C で一晚培養後、50 ml チューブに入れた新しい TSBYE 20 ml に培養液 20 μ l を添加した。
- 3) 37°C で 18 時間培養を行い、実験に供試した。

5.2.4. 供試菌株の保存

- 1) 継代培養した培養液に 20% となるようにグリセロールを無菌的に添加し、混和した。
- 2) 1.5 ml チューブに 0.5 ml ずつ分注し、-45°C で凍結保存した。

5.2.5. 乳酸処理

- 1) 培養液を 12,000 \times g, 2 分, 25°C で遠心分離した。
- 2) 上清を捨てた。
- 3) 予め 25°C に恒温しておいた TSBYE 又は 1%乳酸培地溶液 20 ml の内、約 5 ml を傾瀉した。
- 4) 蓋の裏側に溶液が付かないように注意しながら、ボルテックスミキサーで十分に混和した。菌塊が完全に溶解するまで十分に混合した。
- 5) タイマーを起動し、すぐさま残りの乳酸培地溶液を添加し同じく蓋の裏側に溶液が付かないように用手法で十分に混合した。
- 6) 25°C の水浴中に 1 分静置した。
- 7) 12,000 \times g, 2 分, 25°C で遠心分離した。
- 8) 上清を除去した。
- 9) 静置時間 (10~240 分) を設けるものは 25°C に恒温しておいた TSBYE 20 ml の内、約 5 ml を傾瀉し、蓋の裏側に溶液が付かないように注意しながら、ボルテックスミキサーで十分に混和した。菌塊が完全に溶解するまで十分に混合した。
- 10) タイマーを起動し、すぐさま残りの TSBYE 溶液を添加し同じく蓋の裏側に溶液が付かないように用手法で十分に混合した。
- 11) 25°C の水浴中に所定の時間静置した。
- 12) 12,000 \times g, 2 分, 25°C で遠心分離した。

- 13) 上清を除去した.
- 14) RNA の分解を抑制する RNAProtect Bacteria Reagent 溶液を 6 ml 添加した.
- 15) ボルテックスミキサーで混和した.
- 16) 25°C の水浴中に 5 分静置した.
- 17) 5,000×g, 5 分, 25°C で遠心分離した.
- 18) 上清を棄て, RNA 抽出を行うまで-45°C にて凍結保存した.
- 19) 対照は, 乳酸を含まない TSBYE で同様の手順で実験を行った.

5.2.6. RNA 抽出

- 1) 100 mg/ml リゾチーム溶液を 1 ml 添加した.
- 2) ボルテックスミキサーで十分に混和した.
- 3) 37°C の湯浴で 10 分恒温した.
- 4) 2 ml チューブに全量を移した.
- 5) 10,000 × g, 5 分, 25°C で遠心分離した.
- 6) 上清を除去した.
- 7) 予め 50°C に恒温しておいたセパゾールを 1 ml 添加した.
- 8) ピペッティングにより沈殿をできるだけ細かく分散させた.
- 9) 50°C の湯浴で 10 分恒温した.
- 10) ピペッティングを行って, 沈殿を完全に溶解させた.
- 11) 50°C の湯浴で更に 30 分恒温した.
- 12) 再度ピペッティングを行い, そのまま 5 分室温に静置した.
- 13) 200 μl のクロロホルムを加えた.
- 14) 白濁するまでボルテックスミキサーで十分に混和した.
- 15) 室温に 3 分静置した.
- 16) 12,000 × g, 15 分, 4°C で遠心分離した.
- 17) 新しい 2 ml チューブに 500 μl の 2-プロパノールと水層を添加した.
- 18) ボルテックスミキサーで十分に混和した.
- 19) 室温に 10 分静置した.
- 20) 12,000 × g, 10 分, 4°C で遠心分離した.

- 21) 上清を除去した.
- 22) DEPC 処理水 600 μ l, 5 M NaCl 100 μ l, 予め 65°C に恒温しておいた 10% CTAB-0.7 M NaCl 80 μ l を添加した.
- 23) ボルテックスミキサーで十分に混和した.
- 24) 65°C で 10 分恒温した.
- 25) クロロホルム - イソアミルアルコール (24 : 1) 溶液を 700 μ l 添加した.
- 26) 白濁するまで十分にボルテックスミキサーで混和した.
- 27) 12,000 \times g, 10 分, 4°C で遠心分離した.
- 28) 新しい 2 ml チューブに 500 μ l の 2-プロパノールと水層を添加した.
- 29) ボルテックスミキサーで十分に混和した.
- 30) 室温に 10 分静置した.
- 31) 以下 RNeasy Mini Kit を使用した. コレクションチューブにスピнкаラムをセットした.
- 32) 溶液を 550 μ l ずつスピнкаラムに添加した.
- 33) チューブの蓋を閉めて, 10,000 \times g, 30 秒, 4°C で遠心分離した.
- 34) コレクションチューブに溜まった溶液を棄てた.
- 35) これを繰り返し, 溶液を全てスピнкаラムに通した.
- 36) 700 μ l の Buffer RW1 をスピнкаラムに添加した.
- 37) 蓋を閉め, 10,000 \times g, 30 秒, 4°C で遠心分離した.
- 38) スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブにセットした.
- 39) 500 μ l の Buffer RPE をスピнкаラムに添加した.
- 40) 蓋を閉め, 10,000 \times g, 30 秒, 4°C で遠心分離した.
- 41) コレクションチューブに溜まった溶液を棄てた.
- 42) 500 μ l の Buffer RPE をスピнкаラムに添加した.
- 43) 蓋を閉め, 10,000 \times g, 2 分, 4°C で遠心分離した.
- 44) スピнкаラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブにセットした.
- 45) 30 μ l の RNase free water を直接スピнкаラムのメンブレンに添加した.
- 46) チューブの蓋を閉めて, 10,000 \times g, 1 分, 4°C で遠心分離した.
- 47) NANODROP で RNA の濃度及び純度を測定した.
- 48) 純度が低い場合はエタノール沈殿を行った.

5.2.7. RNA 濃度測定

- 1) NANODROP を起動した.
- 2) RNeasy Mini Kit の RNase-free water を 1 μ l 測定台座の測定部位中心に滴下した.
- 3) アームを下ろし, Blank として測定した.
- 4) 測定が終了したことを確認し, アームを上げ純水を含ませたラボペーパーで測定部位及びアームに付いた溶液を拭き取った.
- 5) ピペッティングで十分に混合したサンプルを 1 μ l 測定部位に滴下した.
- 6) アームを下ろし, “Measure” ボタンをクリックし測定した.
- 7) 測定が終了したことを確認し, アームを上げ純水を含ませたラボペーパーで測定部位及びアームに付いた溶液を拭き取った.
- 8) サンプルが複数の場合は同様の操作を繰り返した.

5.2.8. エタノール沈殿

- 1) RNA 水溶液の 1/10 倍量 (約 3 μ l) の 3M NaOAc を添加した.
- 2) 20 mg/ml グリコーゲン水溶液 1 μ l を共沈剤として添加した.
- 3) 予め-45°C に冷却しておいた 99.5%エタノールを溶液の 2 倍量 (約 60 μ l) 添加した.
- 4) ボルテックスミキサーで混合した.
- 5) 20,000 \times g, 15 分, 4°C で遠心分離した.
- 6) 上清を傾瀉で除いた.
- 7) 同じく予め-45°C に冷却しておいた 70%エタノールを 1 ml 添加した.
- 8) ボルテックスミキサーで十分に混合した.
- 9) 20,000 \times g, 10 分, 4°C で遠心分離した.
- 10) 上清をピペットで丁寧に除いた.
- 11) RNase-free water に溶解させた.

5.2.9. Reverse transcription

- 1) 濃度を測定した RNA を RNase-free water で適宜希釈してから実験に供試した.

- 2) PCR 用 200 μ l チューブに Quantitect Reverse Transcription Kit の 7 \times gDNA Wipeout Buffer と RNA サンプルを氷上で混合した.

試薬	用量 / 1 チューブ	終濃度
7 \times gDNA Wipeout Buffer	2.0 μ l	1 \times
RNA template	X μ l	500 ng
RNase-free water	14 μ l にメスアップ	-

- 3) ボルテックスマキサー十分に混合し, スピンドウンした.
 4) チューブを PCR 装置にセットした.
 5) 以下のプログラムでゲノム DNA 除去反応を行った.

ステップ	温度	時間	サイクル数
反応	42 $^{\circ}$ C	150 秒	1

- 6) 反応後のチューブに以下の試薬を氷上で添加した.

試薬	用量 / 1 チューブ	終濃度
Quantiscript Reverse Transcriptase	1.0 μ l	-
5 \times Quantiscript RT Buffer	4.0 μ l	1 \times
RT Prime Mix	1.0 μ l	-
reacted solution	14.0 μ l	-
合計	20.0 μ l	-

- 7) ボルテックスマキサー十分に混合し, スピンドウンした.
 8) チューブを PCR 装置にセットした.
 9) 以下のプログラムで逆転写反応を行った.

ステップ	温度	時間	サイクル数
逆転写	42°C	15 分	1
酵素不活性化	95°C	3 分	1
冷却	4°C	-	1

10) 作製した cDNA は、必要に応じて nuclease-free water で希釈した後、定量リアルタイム PCR に供試するまで -45°C で保存した。

5.2.10. 定量リアルタイム PCR

- 1) 前項で作製した cDNA 溶液を Power SYBR Green PCR Master Mix と以下の組成で 96 well プレートに氷上で混合した。
- 2) プライマーは Table 10 に示したものを使用した。

試薬	用量 / 1 チューブ	終濃度
Power SYBR Green PCR Master Mix (ROX) (2×)	12.5 µl	1×
nuclease-free water	5.5 µl	-
cDNA solution	1.0 µl	25 ng
2.5 µM プライマー Forward	3.0 µl	300 nM
Reverse	3.0 µl	300 nM
合計	25.0 µl	-

- 3) プレートに蓋をするように 96well プレート用シールを貼り付けプレートを密閉した。
- 4) プレートを遠心分離機にセットし、3,000×g, 4°C でスピンドウンした。
- 5) Real time PCR 装置にプレートをセットし、以下のプログラムで定量リアルタイム PCR を行った。

ステップ	温度	時間	サイクル数
変性	95°C	10 分	1
変性	94°C	15 秒	40
アニーリング	59°C	30 秒	
伸長	72°C	30 秒	
融解曲線	95°C	15 秒	1
	60°C	60 秒	1
	95°C	15 秒	1

Table 10. 定量リアルタイム PCR で使用したプライマー.

遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー	生成物塩基長 (base pair)
16S rRNA	AGCGTGGGGAGCAAACA	AGCACTAAGGGGCGGAAAC	91
<i>dnaJ</i>	TCAGGTGTTGTCCCTGGTTT	CCCAAGACAAGGTAGCGATTT	147
<i>dnaK</i>	TTGAAACCAACGACAGAAGGTG	CAGTAGCAGTATTAGAAGGCGGAGA	85
<i>grpE</i>	TGGGCGTATAACCCGATCTT	CTGTCGGCGAACAATTTGAC	131
<i>groEL</i>	GTGATGACTTGTCCGCCTGT	CGTGAAAGCTCCTGGTTTTG	81
<i>groES</i>	TCCTTCATACGTCACTTCTGTTCC	TTGTTGCAGTCGGTTCAGGT	119
<i>clpB</i>	CGTCGAGTTCACTTGGCATC	CAGCAGCGAGTCTTTCTAATCGT	126
<i>clpE</i>	CGATTGTGCGGTATTCTTTTAGTG	CGATTGTTGGGGCAGGTT	123

5.2.11. 統計解析

各 HSGs の発現量の変化について有意差検定を行った。Tukey-Kramer 法で分散分析（一元配置）および多重比較検定を行った。

5.2.12. DNase 処理

- 1) 1 ml シリンジに 26G ニードルを取り付けた。
- 2) 添付の RNase-free water 550 μ l を DNase I に添加した。
- 3) 転倒混和で DNase を十分に溶解させた（ボルテックスミキサーは使用してはならない）。
- 4) 1.5 ml チューブに DNase I 溶液を分注し、4°C に保存した。
- 5) RNA 水溶液に添付の Buffer RDD 10 μ l と 2.5 μ l の DNase I 溶液を添加し、RNase-free water を加え総量を 100 μ l とした。
- 6) ピペッティングで優しく混合した。
- 7) 室温（20~25°C）に 10 分静置した。
- 8) 350 μ l の Buffer RLT を添加した。
- 9) ボルテックスミキサーで十分に混合した。
- 10) 250 μ l のエタノール（96~100%）を添加した。
- 11) ボルテックスミキサーで十分に混合した。
- 12) RNeasy Mini spin column を 2 ml のコレクションチューブにセットし、上記の処理溶液（700 μ l）を全量添加した。
- 13) スピнкаラムの蓋を閉じ、10,000 \times g, 30 秒, 25°C で遠心分離した。
- 14) コレクションチューブに溜まった溶液を棄てた。
- 15) 500 μ l の Buffer RPE をスピнкаラムに添加した。
- 16) 蓋を閉じ、10,000 \times g, 30 秒, 25°C で遠心分離した。
- 17) コレクションチューブに溜まった溶液を棄てた。
- 18) 500 μ l の Buffer RPE をスピнкаラムに添加した。
- 19) 蓋を閉じ、10,000 \times g, 2 分, 25°C で遠心分離した。
- 20) コレクションチューブに溜まった溶液を棄てた。
- 21) 20,000 \times g, 1 分, 25°C で遠心分離した。
- 22) スピнкаラムを 1.5 ml チューブにセットした。

- 23) 50 μ l の RNase-free water をスピンカラムに添加した.
- 24) 蓋を閉じ, 10,000 \times g, 1分, 25°C で遠心分離した.
- 25) NANODROP で RNA の濃度及び純度を測定した.

5.2.13. RNA-seq

RNA-seq は株式会社マクロジェン・ジャパン (京都, 日本) に実施を委託した.

- 1) nuclease-free の 2 ml スクリューキャップチューブに入れた total RNA 凍結サンプルをドライアイス梱包でマクロジェンに送付した.
- 2) Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologie, Santa Clara, CA, USA) を用いて RNA Integrity Number (以下, RIN) 値を測定した.
- 3) RIN 値が 7 以上であることを確認した.
- 4) Ribo-Zero rRNA Removal (Bacteria) Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) を用いて rRNA を除去した.
- 5) cDNA ライブラリーを TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina Inc.) を使用して作製した.
- 6) cDNA ライブラリーの塩基配列を次世代シーケンサー Illumina HiSeq2000 (Illumina Inc.) を用いて解析した.
- 7) 100 ペアエンドで解析を実施した.
- 8) 読まれた配列 (sequenced raw reads) の品質チェックを FastQC v0.10.0 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いて実施した.
- 9) 全リードの品質, 塩基の総量, リードの総量, GC (%) および基本的な統計データを算出した.
- 10) 質の低いリード, アダプター配列, DNA の混入, PCR バイアスなどを Trimmomatic 0.32 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) を用いて除いた (トリミング).
- 11) トリミングしたリードをリファレンスゲノム (*L. monocytogenes* serotype 4b str. CLIP 80459: GCF_000026705.1) 上に Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) を用いてマッピングした.
- 12) RPKM (Fragments Per Kilobase of CDS per Million Mapped reads) 値を使って正規化と遺伝子発現レベルの定量化を行った.

- 13) 遺伝子発現差解析は Cufflinks の G option (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) を使用して行った.
- 14) *L. monocytogenes* EGD-e の遺伝子 (lmo genes) 情報との比較は, NCBI (National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のヌクレオチドデータベース (Clip80459: NC_012488.1, EGD-e: NC_003210.1), タンパク質データベース Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の配列解析ソフト ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-j.html>) を使用して行った.

5.3. 結果

5.3.1. 乳酸処理による HSGs の発現亢進

乳酸処理後静置時間の相違による Lm19115 HSGs 発現量の変化

Lm19115 について, 乳酸処理後 25°C に静置した時間により遺伝子発現に変化があるかどうかを定量リアルタイム PCR で確認した (Table 11). 全ての遺伝子で発現量が 60 分辺りで最大となり, その後減弱して行く傾向が観られた.

dnaJ について, 60 分の乳酸処理後 TSBYE 中静置で発現量が 2.2 倍となり, 240 分には減弱した. 対照と比較するとこの変化に有意差は無かった ($P > 0.05$) が, 10 分と 60 分の間には有意な差が確認された ($P < 0.05$).

dnaK について, 静置時間 60 分で遺伝子発現が最大となり, 240 分には減弱したが, 対照と比較してこの変化に有意差は無かった ($P > 0.05$).

grpE について, 静置時間 60 分で発現量が 2.6 倍となったが 240 分には減弱した. 対照と比較してこの変化に有意差は無かった ($P > 0.05$). 0 分と 240 分に対しては 60 分と有意差があった ($P < 0.05$).

groEL について, 90 分の乳酸処理後 TSBYE 中静置で発現量が 1.6 倍となり, 240 分には減弱した. 対照と比較してこの変化に有意差は無かった ($P > 0.05$).

groES について, 30 分の乳酸処理後 TSBYE 中静置で発現量が 1.9 倍となり, 240 分には減弱した. 対照と比較してこの変化に有意差は無かった ($P > 0.05$).

clpB について, 乳酸処理後 TSBYE 中で静置することにより 10 分から発現上昇の傾向が観られ, 60 分で 11.5 倍となり, 240 分には減弱した. 60 分は対照と

比較して有意差が確認された ($P < 0.01$). 60分は0, 10および240分に対しても有意差があった ($P < 0.01$).

clpE について, 乳酸処理後 TSBYE 中で静置することにより 10分から発現上昇の傾向が観られ, 60分で21.0倍となった. 30分から90分にかけて対照に対して有意差が確認された ($P < 0.01$) が, 240分では減弱した. 60分は対照, 0, 10, 120および240分に対して有意差があった ($P < 0.01$). 30分についても対照, 0および240分に対して有意差があった ($P < 0.05$, 0分に対してのみ $P < 0.01$). 90分も0および240分に対して有意差があった (0分に対して $P < 0.01$, 240分に対しては $P < 0.05$).

乳酸処理後静置時間の相違による Lmb057 HSGs 発現量の変化

Lmb057 について, 乳酸処理後 25°C に静置した時間により遺伝子発現に変化があるかどうかを定量リアルタイム PCR で確認した (Table 12). 全ての遺伝子で発現量が10分辺りで最大となり, その後減弱して行く傾向が観られた. 特に120分で大きく減弱する傾向にあった.

dnaJ について, 乳酸処理後 TSBYE 中で静置することにより 30分で発現量が8.7倍になったが対照と比較して有意差はなかった ($P > 0.05$).

dnaK について, 乳酸処理後 TSBYE 中静置10分で発現量が対照と比較して有意に上昇し3.1倍になった ($P < 0.01$). 以降, 発現量は減少した.

grpE について, 乳酸処理後 TSBYE 中静置10分で対照と比較して発現量が最大となり, その後, 減弱した. 10分は, 対照との間に有意差はなかった ($P > 0.05$) が, 対照以外とは有意差があった ($P < 0.01$).

groEL について, 乳酸処理後 TSBYE 中静置10分で対照と比較して発現量が最大となり, その後, 減弱した. この変化には有意な差があった ($P < 0.01$).

groES について, 乳酸処理後 TSBYE 中静置10分で対照と比較して発現量が最大となり, その後, 減弱した. 10分と対照の間に有意差は無かった ($P > 0.05$) が, 0および30-120分の減少は, 対照と比較して有意差があった ($P < 0.01$). *clpB* について, 乳酸処理後 TSBYE 中静置10分で発現量が対照と比較して有意に上昇し, 最大となった ($P < 0.05$). 0および30-120分に対しても有意差が

Table 11. Lm19115 における乳酸処理後静置時間の違いによる HSGs 発現量の変化

遺伝子名	対照	乳酸処理後静置時間 (分)						
		0	10	30	60	90	120	240
<i>dnaJ</i>	1 ^{ab}	1.1 ± 0.2 ^{ab}	-1.4 ± 0.2 ^a	2.0 ± 0.7 ^{ab}	2.2 ± 0.3 ^b	1.5 ± 0.2 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^{ab}	-1.0 ± 0.1 ^{ab}
<i>dnaK</i>	1	-1.1 ± 0.1	-1.3 ± 0.2	2.4 ± 0.7	2.7 ± 0.4	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.7	-1.1 ± 0.1
<i>grpE</i>	1 ^{ab}	-1.2 ± 0.1 ^a	-1.1 ± 0.2 ^{ab}	2.4 ± 0.3 ^{ab}	2.6 ± 0.6 ^b	2.4 ± 0.3 ^{ab}	2.3 ± 0.6 ^{ab}	-1.2 ± 0.1 ^a
<i>groEL</i>	1	1.1 ± 0.2	-1.7 ± 0.1	-1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.3	-1.2 ± 0.1
<i>groES</i>	1	1.2 ± 0.2	-1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.5	-1.2 ± 0.2
<i>clpB</i>	1 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	1.9 ± 0.3 ^a	6.6 ± 2.0 ^{ab}	11.5 ± 2.6 ^b	7.0 ± 1.5 ^{ab}	6.7 ± 1.2 ^{ab}	1.8 ± 0.1 ^a
<i>clpE</i>	1 ^a	-1.3 ± 0.1 ^a	4.8 ± 0.4 ^{ab}	13.2 ± 3.6 ^{bc}	21.0 ± 4.0 ^c	13.9 ± 2.0 ^{bc}	8.1 ± 0.6 ^{ab}	1.7 ± 0.3 ^a

時間 (分) は乳酸処理後 TSBYE 中 (25°C) に保持した時間を表している。数値は平均値±標準誤差である。値に付したアルファベットの違いは、各行においてそれぞれ有意差があることを示している ($P < 0.05$)。

観られた ($P < 0.01$). 0 および 60 - 120 分の減少は対照と比較して有意差があった ($P < 0.01$, 60 分のみ $P < 0.05$).

clpE について, 乳酸処理後 TSBYE 中静置 10 分で発現量が対照と比較して最大となったが, この変化に有意差は確認されなかった ($P > 0.05$). 一方で 0 および 30 - 120 分に対しては有意差が観られた ($P < 0.01$). 90 分と 120 分の減少は, 対照と比較して有意であった (90 分 : $P < 0.05$, 120 分 : $P < 0.01$).

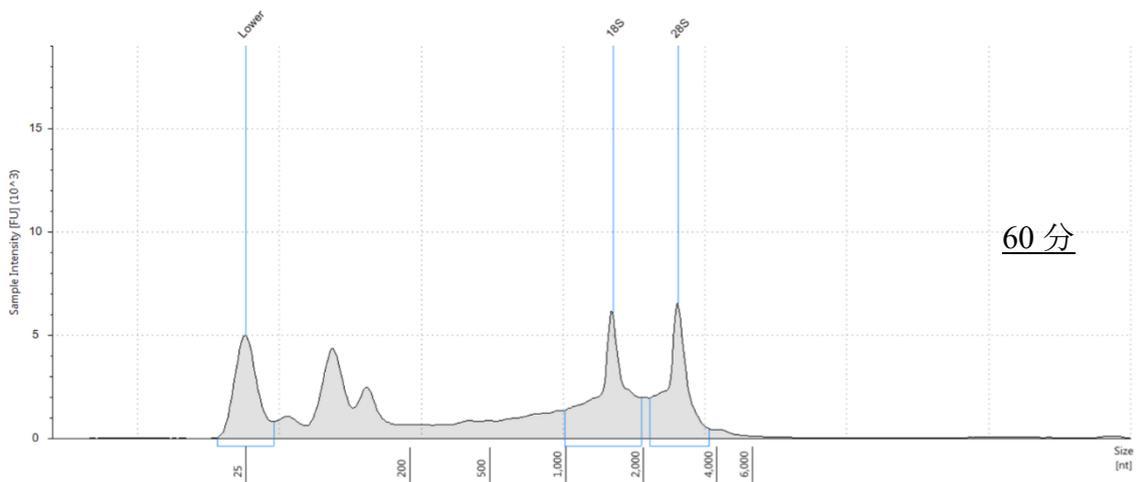
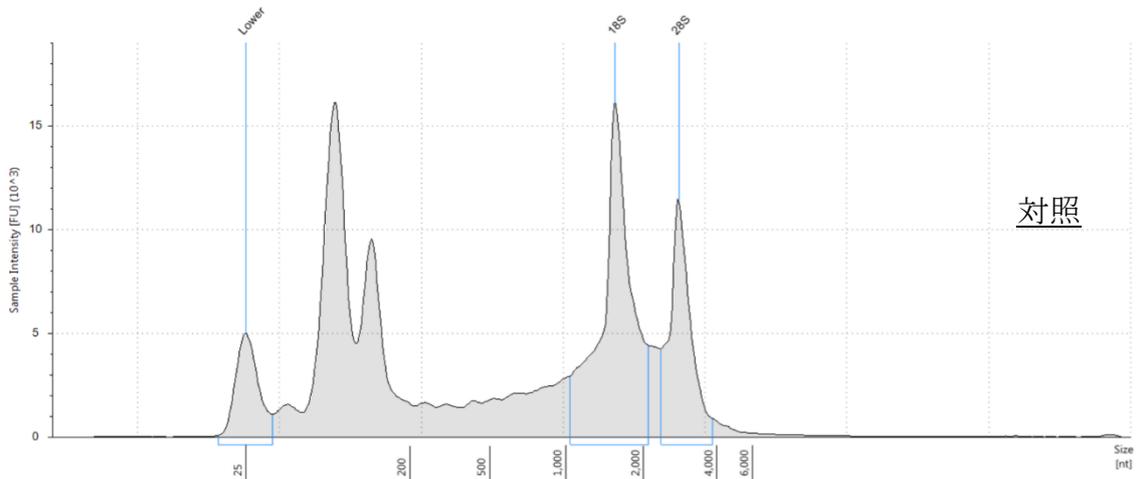
5.3.2. 乳酸処理による遺伝子発現変化の網羅解析

RNA-seq は, Lm19115 の熱耐性に関与する *clpB*, *clpE* 以外の遺伝子を同定する為に実施した. 解析に用いた RNA サンプルの RIN 値は 7 以上で問題の無いものであった (Fig. 12). 乳酸処理後 60 分時間をおいたものと乳酸処理をしないコントロールサンプルを用いて遺伝子発現差解析を行った. その結果, 合計 2,782 遺伝子がリファレンスゲノム (*L. monocytogenes* serotype 4b str. CLIP 80459: GCF_000026705.1) 上にマッピングされた. その内, 1,580 遺伝子がコントロールに対して 2.0 倍以上の発現差を示し, 875 遺伝子が発現上昇, 705 遺伝子の発現が減少していた. 発現が減少した遺伝子の中には SigB に制御される遺伝子群が含まれていた (Table 13). 一方で, 発現が上昇した 875 遺伝子から, 23 個の耐熱性との関与が示唆されている遺伝子が見つかった. 3 つの class III HS 遺伝子 (*ctsR*, *mcsB* と *clpP*), 11 個の SOS 応答や DNA 修復に関与するタンパク, そして 9 つのリステリア モノサイトゲネスが高温に曝された際に必要であることが示唆されている遺伝子である (Table 13).

Table 12. Lmb057 における乳酸処理後静置時間の違いによる HSGs 発現量の変化

遺伝子名	対照	乳酸処理後静置時間 (分)					
		0	10	30	60	90	120
<i>dnaJ</i>	1	1.1 ± 0.6	8.5 ± 3.5	8.7 ± 1.6	4.9 ± 2.1	3.8 ± 0.8	1.2 ± 0.1
<i>dnaK</i>	1	-3.8 ± 0.1	3.1 ± 0.7 ^a	-1.3 ± 0.1	-1.8 ± 0.2	-3.3 ± 0.0	-11.1 ± 0.0
<i>grpE</i>	1 ^{ab}	-12.2 ± 0.0 ^a	1.8 ± 0.5 ^b	-1.9 ± 0.1 ^a	-3.2 ± 0.1 ^a	-6.1 ± 0.0 ^a	-18.0 ± 0.0 ^a
<i>groEL</i>	1	-2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.5 ^a	-1.4 ± 0.2	-1.5 ± 0.1	-3.4 ± 0.0	-6.8 ± 0.1
<i>groES</i>	1	-7.9 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.3	-3.2 ± 0.1 ^a	-3.5 ± 0.1 ^a	-6.0 ± 0.1 ^a	-11.6 ± 0.1 ^a
<i>clpB</i>	1 ^a	-7.1 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.3 ^c	-2.2 ± 0.1 ^{ab}	-3.1 ± 0.1 ^b	-8.2 ± 0.0 ^b	-27.0 ± 0.0 ^b
<i>clpE</i>	1 ^{ac}	-4.0 ± 0.1 ^{ab}	1.6 ± 0.3 ^c	-3.0 ± 0.1 ^{ab}	-2.5 ± 0.3 ^{ab}	-13.0 ± 0.0 ^b	-110.0 ± 0.0 ^b

時間 (分) は乳酸処理後 TSBYE 中 (25°C) に保持した時間を表している。数値は平均値±標準誤差である。値に付したアルファベットの違いは、各行においてそれぞれ有意差があることを示している ($P < 0.05$)。



サンプル名	濃度 (ng/μl)	容量 (μl)	総量 (μg)	RIN
対照	347.84	13	4.52	7.9
60分	134.84	33	4.45	7.2

Fig. 12. RNA-seq 供試サンプル品質チェックの結果. 右下はゲノム DNA が混入した場合のグラフ. 機器の仕様上 18S, 28S と結果が表示されるが, 今回の様な細菌の場合は 16S と 23S のことである.

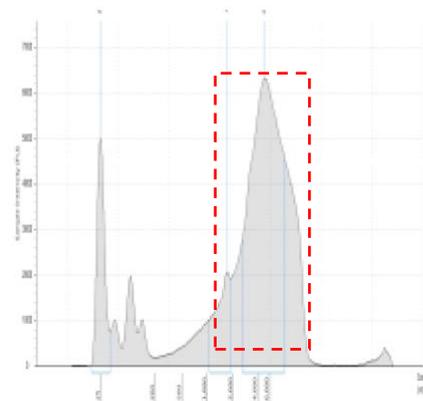


Table 13. Lm19115 における乳酸処理後 60 分の回復時間を与えたものと対照の遺伝子発現差解析.

Gene locus	EGD-e locus	gene designation	protein ID	Description of product	Fold-change
ClassIII heat-shock genes					
LM4B_RS01225	lmo0229	<i>ctsR</i>	WP_003726421.1	CtsR family transcriptional regulator	2.4
LM4B_RS01235	lmo0231	<i>mcsB</i>	WP_003726423.1	protein arginine kinase	2.1
LM4B_RS12415	lmo2468	<i>clpP</i>	WP_003722600.1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	11.7
ClassII stress genes (SigB regulated)					
LM4B_RS01055	lmo0211	<i>ctc</i>	WP_003722740.1	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	-3.3
LM4B_RS03955	lmo0781		WP_003721898.1	Similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID	-34.9
LM4B_RS03960	lmo0782		WP_003724495.1	PTS mannose/fructose/sorbose transporter subunit IIC	-23.5
LM4B_RS03965	lmo0783		WP_003721900.1	PTS fructose transporter subunit IIB	-21.1
LM4B_RS04025	lmo0794		WP_003726297.1	hypothetical protein	-2.4
LM4B_RS04465	lmo0880		WP_012681191.1	peptidoglycan linked protein (LPXTG)	-2.3
LM4B_RS04650	lmo0911		WP_003724838.1	hypothetical protein	-4.1
LM4B_RS04870	lmo0956		WP_003726858.1	Similar to N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25)	-8.5
LM4B_RS04875	lmo0957	<i>nagB</i>	WP_003727073.1	glucosamine-6-phosphate deaminase	-5.9

LM4B_RS04880	lmo0958		WP_003722779.1	GntR family transcriptional regulator	-5.9
LM4B_RS07155	lmo1425	<i>opuCD</i>	WP_003725369.1	amino acid ABC transporter permease	-37.7
LM4B_RS07160	lmo1426	<i>opuCC</i>	WP_003721931.1	carnitine transport-binding protein OpuCC	-19.5
LM4B_RS07165	lmo1427	<i>opuCB</i>	WP_003725370.1	carnitine transport permease OpuCB	-10.4
LM4B_RS07170	lmo1428	<i>opuCA</i>	WP_003725371.1	glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein	-3.6
LM4B_RS07720	lmo1538	<i>glpK</i>	WP_003726648.1	glycerol kinase	-10.6
LM4B_RS07930	lmo1580		WP_003725993.1	universal stress protein UspA	-69.6
LM4B_RS08640	lmo1694		WP_003728261.1	epimerase	-4.1
LM4B_RS09605	lmo1883		WP_003728270.1	chitinase	-2.5
LM4B_RS10550	lmo2067		WP_003728858.1	choloylglycine hydrolase	-4.0
LM4B_RS12005	lmo2386		WP_003722412.1	membrane protein	3.9
LM4B_RS12070	lmo2398	<i>ltrC</i>	WP_003725592.1	phosphatidylglycerophosphatase A	-5.7
LM4B_RS12930	lmo2572		WP_003726114.1	diacylglycerol kinase	-14.0
LM4B_RS13110	lmo2602		WP_003730782.1	methyltransferase	-40.6
SOS response and DNA repair					
LM4B_RS00810	lmo0158		WP_012681021.1	sugar phosphate phosphatase	2.6
LM4B_RS06545	lmo1302	<i>lexA</i>	WP_003723438.1	LexA repressor	4.0
LM4B_RS07020	lmo1398	<i>recA</i>	WP_003725961.1	DNA recombination/repair protein RecA	4.9
LM4B_RS10040	lmo1975	<i>dinB</i>	WP_003725867.1	DNA polymerase IV	3.3

LM4B_RS12515	lmo2488	<i>uvrA</i>	WP_003725420.1	excinuclease ABC subunit A	2.3
LM4B_RS12520	lmo2489	<i>uvrB</i>	WP_003725421.1	UvrABC system protein B	2.2
LM4B_RS13505	lmo2675		WP_003724982.1	hypothetical protein	-8.9
LM4B_RS13510	lmo2676		WP_003724983.1	type VI secretion protein ImpB	-5.9
LM4B_RS14280	lmo2828		WP_003727591.1	hypothetical protein	-3.1
LM4B_RS03040	lmo0588		WP_003725898.1	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	2.1
LM4B_RS04730	lmo0928		WP_003724850.1	DNA-3-methyladenine glycosylase	3.4
LM4B_RS06180	lmo1234	<i>uvrC</i>	WP_003726544.1	UvrABC system protein C	2.4
LM4B_RS06870	lmo1368	<i>recN</i>	WP_003738883.1	DNA repair protein RecN	-2.2
LM4B_RS07275	lmo1449	<i>nfo</i>	WP_012681296.1	endonuclease	2.5
LM4B_RS12690	lmo2523		WP_003727895.1	single-strand-binding protein	2.7
Genes of putative heat resistance related					
LM4B_RS00010	lmo0002	<i>dnaN</i>	WP_003725616.1	DNA polymerase III subunit beta	8.0
LM4B_RS01105	lmo0220	<i>ftsH</i>	WP_012681032.1	cell division protein FtsH	4.7
LM4B_RS01120	lmo0223	<i>cysK</i>	WP_003725748.1	cysteine synthase A	2.7
LM4B_RS07280	lmo1450	<i>cshB</i>	WP_003721956.1	DEAD/DEAH box family ATP-dependent RNA helicase	3.4
LM4B_RS07465	lmo1487		WP_003726533.1	phosphohydrolase	6.3
LM4B_RS07505	lmo1495		WP_003734326.1	hypothetical protein	2.3

LM4B_RS07510	lmo1496	<i>greA</i>	WP_003722004.1	transcription elongation factor GreA	4.7
LM4B_RS08315	lmo1657	<i>tsf</i>	WP_003726264.1	elongation factor Ts	5.3
LM4B_RS10440	lmo2045		WP_003726129.1	hypothetical protein	5.6
LM4B_RS12675	lmo2520	<i>menC</i>	WP_003727896.1	o-succinylbenzoate synthase	4.3

値が+2 倍以上であったものを太字で示した。

その他の遺伝子については, Supplementary table. 1 に掲載した。

5.4. 考察

5.4.1. 乳酸処理による HSGs の発現亢進

前章で行った加熱試験は、乳酸処理とその後の工程の間にある待機時間に焦点を当てて試験を行った。その結果、リステリア モノサイトゲネスの耐熱性は、待機時間に依存して変化することが分かった。それ故、遺伝子レベルでこの耐熱性増強の機構を調査することとした。今回は、耐熱性に直接影響を与える HSP について、その遺伝子である HSGs 発現量の変化を定量リアルタイム PCR で評価した。

Lm19115 において、*dnaJ*, *dnaK*, *grpE*, *groEL* そして *groES* の発現量は対照と比較して有意な上昇が観られなかった。一方で、*clpB* および *clpE* の発現量は、対照と比較して有意な上昇が観察された。この結果は、Lm19115 の耐熱性増強に ClpB, ClpE が関与していることを示唆している。ClpE と ClpB は同じ HSP100 ファミリー Clp ATPase で、CtsR により遺伝子発現が調節されており、ストレス条件下での生存や増殖に必要なタンパク質であるとの報告がある (Nair et al., 2000)。さらに *clpB*, *clpE* は熱ショック応答時に発現されることが報告されており (van der Veen et al., 2007), *clpB* を欠損したリステリア モノサイトゲネスの変異株は、55°C で 20 分加熱すると野生株と比較して 1000 倍減少したことも示されている (van der Veen et al., 2009)。

Lmb057 について、遺伝子発現は 10 分において 0 分と比較して高値であり、*dnaJ* 以外は有意差も認められた。このことは、55°C 加熱試験で 0 min 群と比較して 30 min 群の D 値は高値であったことを支持するものと考えられる。*dnaK*, *groEL*, *clpB* について、10 分の遺伝子発現は対照と比較しても有意に高値であった。この結果は、乳酸処理後 TSBYE 中で 30 分の静置時間を設けた Lmb057 の 55°C における耐熱性が、対照と同等以上であったことを支持している。

Lm19115 と Lmb057 の遺伝子発現上昇が観察された時間の違いは、Lmb057 が乳酸と加熱に対して高い耐性を持っていたことから、元々それぞれが有していた感受性の差による違いと推察される。

5.4.2. 乳酸処理による遺伝子の発現変化の網羅解析

RNA-seq により発現上昇が確認された class III HS 遺伝子について、CtsR は *clpP*, *clpC* そして *clpE* の抑制因子として知られている (Nair et al., 2000). CtsR の活性化は、Clp ATPase の遺伝子発現が負に制御されることを示唆するが、*clpP* の発現は 11.7 倍に上昇した. ClpP はプロテアーゼとして、損傷したり不適切に折りたたまれたりしたタンパク質を分解し菌体内の恒常性維持に働いている. ClpP 欠損変異体は、熱、塩、酸化ストレス条件に対して野生株よりも感受性が高くなることが *Streptococcus agalactiae* で報告されている (Nair et al., 2003). McsB により異常タンパク質のアルギニン残基がリン酸化されると、ClpC により ClpP に運ばれ、その異常タンパク質は分解されることが示されている (Trentini et al., 2016). その上、McsB は CtsR の抑制因子であることが知られている (Tao et al., 2012). これらの事実は、今回の試験における Lm19115 の耐熱性増強に *clpP* と *mcsB* の発現上昇が関与していることを示唆している.

Table 13 に示したシグマ因子、SigB により制御される class II ストレス遺伝子は、過去の報告では 48°C, 3 分の熱処理によって発現が上昇したことが示されている (van der Veen et al., 2007). 多くの報告が SigB が耐熱性において重要な因子であることを報告している (Ait-Ouazzou et al., 2012; Somolinos et al., 2010; van Schaik et al., 2004; Volker et al., 1999). しかしながら、今回の結果では SigB に調節される遺伝子の発現は 1 つを除いて上昇しなかったか、もしくは減少した. このことから Lm19115 の耐熱性増強は、SigB による HS 応答とは異なる機構によるものである可能性が示唆された. Ait-Ouazzou ら (2012) は、リステリア モノサイトゲネスにおいて、pH 4.0 では SigB がなくても耐熱性は減少しなかったが、pH 7.0 と 5.5 では耐熱性が減少したことを報告している. この結果は、低 pH では SigB に依存しない何らかの物質を介して耐熱性を支える機構が存在することを示している. Ferreira ら (2001) は、pH 4.5, 1 時間の酸刺激が *sigB* 欠損株においても顕著な耐酸性を付与するとしている. さらにこの報告は、リステリア モノサイトゲネスの耐酸性を付与する SigB 依存の機構と pH 依存の機構の両方が存在することを示唆している. 今回の試験では、その乳酸刺激により pH 依存の機構が働いて Lm19115 の耐熱性を増強させたのかもしれない.

SOS 応答の機能は、DNA の修復と合成である. リステリア モノサイトゲネ

スの SOS 応答レギュロンは、29 の遺伝子からなる。RecA は、SOS 応答の活性化因子として知られており、ストレス耐性に重要な因子であると報告されている (van der Veen et al., 2010)。その研究で、RecA 欠損変異体は、熱、H₂O₂、酸ストレスに対して野生株より耐性が弱くなることが示されている。変異株は 55°C、1 時間の熱処理に対して約 1000 倍、野生株より菌数が減少した。よって、RecA と RecA により活性化される SOS 応答因子は、ストレス環境下での生存に重要な役割を果たしていると報告している。今回の試験では、RecA を含む SOS 応答と DNA 修復に関係する 11 の遺伝子の発現が上昇した (Table 13)。その内の 4 つの遺伝子、*recA*、*dinB*、*uvrA*、*uvrB* は、HS 処理でも発現が上昇することが過去の報告で示されている (van der Veen et al., 2007)。これらの結果は、*recA*、*dinB*、*uvrA*、*uvrB* 遺伝子が Lm19115 の耐熱性の上昇に関与していることを示唆している。Table 13 に示した他の遺伝子についても細菌のストレス耐性を支持することが報告されている。DnaN は DNA ポリメラーゼ III のサブユニットで DNA の修復に寄与する (Villarroya et al., 1998)。Agoston ら (2009) は、DnaN が 60°C で発現上昇することを確認している。van der Veen ら (2009) は、lmo0220、lmo1487、lmo1495、lmo2045、lmo2520 遺伝子の欠損株が、55°C 熱ストレス条件下で野生株に比べて著しく感受性が高くなることを報告している。lmo1487 遺伝子欠損株は、55°C、20 分の熱処理後におよそ 1000 倍、野生株より菌数が減少した。lmo0223 はシステイン合成酵素 A をコードする遺伝子、lmo1496 は転写伸長因子 GreA をコードする遺伝子、lmo1657 は伸長因子 Ts をコードする遺伝子で、55°C の熱処理により発現が上昇することが報告されている (Guevara et al., 2015)。GreA は RNA ポリメラーゼ伸長複合体に必須の因子である。Li ら (2012) は、*Escherichia coli* において、熱刺激によるタンパク質の凝集抑制や変性タンパク質のリフォールディング促進に GreA の付加的シャペロン機能が働いたことを報告している。lmo1450 (*cshA*) 変異株では、42.5°C に対する熱感受性が高くなった (Markkula et al., 2012)。

RNA-seq 解析により、様々なタンパク質が Lm19115 の耐熱性の増強に関与していることが示唆された。しかしながら、そのタンパク質には一般的に耐熱性を支持することが知られている class II HSP は含まれないと推測される。耐熱性増強に関与するタンパク質は、いくつかのシャペロンと SOS タンパク質そして

Table 13 (genes of putative heat resistance related) に示したリステリア モノサイトゲネスが増殖できない温度で発現が促進される耐熱性因子ではないかと考えられる。しかしながら、これらの結果は、遺伝子の転写レベルの結果であって、タンパク質の発現レベルの結果ではない。このことから、今後の課題として、今回の結果から Lm19115 の耐熱性獲得の候補因子であることが示唆された遺伝子のタンパク質が本当に関与しているかどうかを検証する必要があると考える。また、Lm19115 の試験によって得られた結果が、他のリステリア モノサイトゲネス株についても普遍的な現象であるかどうかも調査する必要がある。

5.5. 小括

乳酸による耐熱性の増強機構を解明するために遺伝子レベルでの試験を行った。定量リアルタイム PCR, RNA-seq の結果、一部の HSP, SOS タンパクあるいはリステリア モノサイトゲネスが高温に曝された際に身を守るために必要な遺伝子が乳酸処理により惹起されることが示唆された。一方で今回の試験では SigB に制御される遺伝子群の発現上昇が観られなかったことから、これまでに知られているストレス耐性増強機構とは異なる機構により、耐熱性が増強したことが示唆される。

実験に供試した株の 1 つであるリステリア モノサイトゲネス b057 株は元々酸耐性、熱耐性の強い株であったことから、今回示された遺伝子の発現量をこの株と比較することで、リステリア モノサイトゲネスがいかにして環境中で生き残り、食品製造現場に固着するかを明らかにするきっかけの 1 つになるかもしれない。

総括

清涼飲料水や食肉製品などは食品衛生法により安全性を担保するため細かく基準が定められ、基準に則った製法により製造されている。非加熱食肉製品は 1982 年に規格基準が告示されて以降、30 年以上が経過しているが本件の様な迅速製法の提案は類を見ない。それ故、画期的な変法と言える。

第 1 章において生ハムの迅速製法は、従来製法と遜色無い安全な製法であることを示した。食肉製品と関係の深い危害微生物が従来製法と同様、工程中で増殖することなく、むしろ減少することが明らかになり、水分活性なども従来製法と同等の値とできる上、より迅速に目標値に到達させることが可能であった。これは危害微生物が増殖する機会が従来製法と比較して圧倒的に短いことを意味している。しかしながら、従来製法に比べて工程に要する時間が 1/20 以下に短縮されるため、製品として包装されるまでに減少する菌の絶対数は小さくなった。包装後も減少し続けることが確認されたが、加工前の原料肉が清浄なものであることが強く望まれた。

第 2 章において迅速製法に使用する原料肉が衛生的に管理された清浄なものであることを示した。各衛生指標菌数の分布が広くなく、変則的に高値を示す検体も無かったこと、腸内容物の汚染指標である大腸菌・大腸菌群の値も低値であったこと、危害微生物についてもほとんどが検出限界以下であり、僅かに検出されたリステリアモノサイトゲネスも一般的な汚染率よりも低値であったことがこれを支持している。

第 3 章では、僅かではあるが汚染の可能性のあるリステリアモノサイトゲネスのリスクを低減するために乳酸による殺菌効果を検証した。結果、有機物の存在下でも 3%以上の濃度があれば 10 分以内に有意にリステリアモノサイトゲネスの菌数を減少させることができると分かった。原料肉を乳酸処理することにより、迅速製法で製造される生ハムの安全性はさらに高まると期待される。

第 4 章で、乳酸処理後、不適切な温度で長時間放置された後加熱を行うと想定通りの殺菌効果が得られない可能性があることを示した。逆に言えば、適切な温度または時間管理がなされていれば想定通り、あるいは想定以上の殺菌効果が得られることを示したと言える。例え製造に掛かる時間が短い迅速製法であったとしても、HACCPなどで言う所の一般的衛生管理プログラム（PRP あるいは PP）の履行は非常に重要であることを再認識させる結果であった。

第 5 章では、第 4 章で見出されたリステリアモノサイトゲネスの耐熱性増強機構

について遺伝子レベルでの解明を試みた。リステリア モノサイトゲネスはそもそも幅広い温度、pH あるいは水分活性で生育できる上、heat shock などにより急激な環境変化にも適応できることから、生残性が他の微生物より高く、それ故、食品へのコンタミネーションや製造現場への固着が起きていると考えられているからである。その結果、ストレス耐性で主要な役割を担うとされている Sigma factor B に制御される遺伝子群によるものではない、複合的な別の機構によるものであることが示唆された。この機構がどのようなものであるかを明らかにするためには今後の研究成果を待たねばならない。

本研究によって、非加熱食肉製品の迅速製法が安全な生ハムを提供し得ること、さらなる安全性確保のためのハードル・テクノロジーを応用した乳酸と加熱併用の可能性、全工程を通じた低温保存の重要性が示された。一方、その工程に破綻があった場合、リステリア モノサイトゲネスが、これまでに知られていなかった機構によりストレス耐性を増強する可能性を示し、HACCP および一般的衛生管理プログラム履行の重要性を明らかにした。この研究が今後の食品製造法あるいは微生物制御技術発展につながり、より安全で新規性のある食品製造へ向けて創意工夫の門戸が開かれる規制緩和の端緒となれば幸いである。

参考文献

- 1) Abram, F., Starr, E., Karatzas, K.A.G., Matlawska-Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., Boor, K.J., Connally, D., O'Byrne, C.P., 2008. Identification of components of the Sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6848-6858.
- 2) Agoston, R., Soni, K., Jesudhasan, P.R., Russell, W.K., Mohacsi-Farkas, C., Pillai, S.D., 2009. Differential expression of proteins in *Listeria monocytogenes* under thermotolerance-inducing, heat shock, and prolonged heat shock conditions. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1133-1140.
- 3) Ahamad, N., Marth, E.H., 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35 degrees C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *J. Food Prot.* 52, 688-695.
- 4) Ait-Ouazzou, A., Manas, P., Condon, S., Pagan, R., Garcia-Gonzalo, D., 2012. Role of general stress-response alternative sigma factors σ^S (RpoS) and σ^B (SigB) in bacterial heat resistance as a function of treatment medium pH. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 358-364.
- 5) Anderson, M.E., Marshall, R.T., 1990. Reducing microbial populations on beef tissues concentration and temperature of lactic acid. *J. Food Saf.* 10, 181-190.
- 6) Barker, C., Park, S.F., 2001. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1594-1600.
- 7) Barkley, J.S., Gosciminski, M., Miller, A., 2016. Whole genome sequencing detection of ongoing *Listeria* contamination at a restaurant, Rhode Island, USA, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1474-1476.
- 8) Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food Prot.* 56, 474-484.
- 9) Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., Phillips, J.G., Smith, J.L., 1994. Nonthermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* 59, 179-188.

- 10) Buchanan, R.L., Solberg, M., 1972. Interaction of sodium-nitrate, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. J. Food Sci. 37, 81-85.
- 11) Buchanan, R.L., Stahl, H.G., Whiting, R.C., 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52, 844-851.
- 12) Byelashov, O.A., Daskalov, H., Geornaras, I., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C., Sofos, J.N., 2010. Reduction of *Listeria monocytogenes* on frankfurters treated with lactic acid solutions of various temperatures. Food Microbiol. 27, 783-790.
- 13) Canadian Food Inspection Agency. *Listeria* investigation and recall_2008. Available at: http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2009-eng.php. (2009.04 last accessed).
- 14) Carlier, V., Augustin, J.C., Rozier, J., 1996. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* (Phagovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340): D- and z-values in ham. J. Food Prot. 59, 588-591.
- 15) Casey, A., Fox, E.M., Schmitz-Esser, S., Coffey, A., McAuliffe, O., Jordan, K., 2014. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to biocide stress reveals a multi-system response involving cell wall synthesis, sugar uptake, and motility. Front. Microbiol. 5, 68.
- 16) Castellani, A.G., Niven, C.F., 1955. Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. Appl. Microbiol. 3, 154-159.
- 17) CDC (Centers for Disease Control), 1985. Leads from the MMWR. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese—California. JAMA (J. Am. Med. Assoc.) 34, 357-359.
- 18) Chastanet, A., Derre, I., Nair, S., Msadek, T., 2004. *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. J. Bacteriol. 186, 1165-1174.
- 19) Codex Alimentarius Commission. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61 – 2007. Available at:

http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10740/CXG_061e.pdf.
(2017. 02 last accessed).

- 20) Davis, M.J., Coote, P.J., Obyrne, C.P., 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology-(UK)* 142, 2975-2982.
- 21) Dedaza, M.S.T., Villegas, Y., Martinez, A., 1991. Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 333-337.
- 22) de Noordhout, C.M., Devleeschauwer, B., Angulo, J.F., Verbeke, G., Haagsma J., Kirk M., Havelaar A., Speybroeck N., 2014. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 14, 1073-1082.
- 23) de Oliveira, N.E.M., Abranches, J., Gaca, A.O., Laport, M.S., Damaso, C.R., Bastos, M.D.D., Lemos, J.A., Giambiagi-DeMarval, M., 2011. *clpB*, a class III heat-shock gene regulated by CtsR, is involved in thermotolerance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Microbiology-(UK)* 157, 665-656.
- 24) Donnelly, C.W., Briggs, E.H., 1986. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J. Food Prot.* 49, 994-998.
- 25) Doyle, M.P., Schoeni, J.L., 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 855-856.
- 26) Faleiro, M.L., Andrew, P.W., Power, D., 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 207-216.
- 27) Fang, C.S., Post, L.S., Solberg, M., 1985. Antimicrobial effect and disappearance of sodium nitrite in *Staphylococcus aureus* cultures. *J. Food Sci.* 50, 1412-1416.
- 28) Farber, J.M., 2000. Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 247-

- 251.
- 29) Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476-511.
 - 30) Farber, J.M., Sanders, G.W., Dunfield, S., Prescott, R., 1989. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9, 181-183.
 - 31) Ferreira, A., O'Byrne, C.P., Boor, K.J., 2001. Role of σ^B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4454-4457.
 - 32) Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, M.J., 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J. Food Prot.* 77, 150-170.
 - 33) Fleming, D.W., Cochi, S.L., Macdonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L., 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312, 404-407.
 - 34) Foegeding, P.M., Leasor, S.B., 1990. Heat-resistance and growth of *Listeria monocytogenes* in liquid whole egg. *J. Food Prot.* 53, 9-14.
 - 35) Francis, G.A., O'Beirne, D., 2005. Variation among strains of *Listeria monocytogenes*: differences in survival on packaged vegetables and in response to heat and acid conditions. *Food Control* 16, 687-694.
 - 36) Ghafir, Y. and Daube, G., 2008. Comparison of swabbing and destructive methods for microbiological pig carcass sampling. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 322-326.
 - 37) Gibson, A.M., Roberts, T.A., 1986. The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* in a laboratory medium. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 183-194.
 - 38) Gilchrist, J.E., Campbell, J.E., Donnelly, C.B., Peeler, J.T., Delaney, J.M., 1973. Spiral plate method for bacterial determination. *Appl. Microbiol.* 25, 244-252.

- 39) Gilchrist, J.E., Donnelly, C.B., Peeler, J.T., Campbell, J.E., 1977. Collaborative study comparing spiral plate and aerobic plate count methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60, 807-812.
- 40) Gonzalez-Fandos, E., Dominguez, J.L., 2006. Efficacy of lactic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1331-1339.
- 41) Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., Salvat, G., Veit, P., 1998. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *J. Infect. Dis.* 177, 155-160.
- 42) Gray, M.L., Killinge, A.H., 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30, 309-382.
- 43) Guevara, L., Antolinos, V., Palop, A., Periago, P.M., 2015. Impact of moderate heat, carvacrol, and thymol treatments on the viability, injury, and stress response of *Listeria monocytogenes*. *Biomed Res. Int.* 548930.
- 44) Guldimann, C., Boor, K.J., Wiedmann, M., Guariglia-Oropeza, V., 2016. Resilience in the face of uncertainty: sigma factor B fine tunes gene expression to support homeostasis in gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4456-4469.
- 45) Hanawa, T., Kai, M., Kamiya, S., Yamamoto, T., 2000. Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress Chaperones* 5, 21-29.
- 46) Hew, C.M., Hajmeer, M.N., Farver, T.B., Glover, J.M., Cliver, D.O., 2005. Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in chorizos. *J. Food Prot.* 68, 2039-2046.
- 47) Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P., Fraser, D.W., 1986. An outbreak of type-4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from 8 Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146, 520-524.
- 48) ICMSF編. 春日 文子, 小久保彌太郎, 島原 義臣 監訳, 2013. 食品安全管理における微生物学的検査.
- 49) Kallipolitis, B.H., Ingmer, H., 2001. *Listeria monocytogenes* response

- regulators important for stress tolerance and pathogenesis. FEMS Microbiol. Lett. 204, 111-115.
- 50) 加藤 恵一, 長谷部 豊, 中根 正人, 村山 壮徳. 非加熱食肉製品の製造方法及び非加熱食肉製品. 公開特許公報 特開2008-99561.
- 51) Koo, O.K., Baker, C.A., Kim, H.J., Park, S.H., Ricke, S.C., 2016. Metagenomic assessment of the microbial diversity in ground pork products from markets in the North Central Region of South Korea. J. Environ. Sci. Health B 51, 622-627.
- 52) 公益財団法人 日本食肉消費総合センター, 2013. 食肉のすべてが分かるQ&A. <http://www.jmi.or.jp/common/download.php/教えて！食肉の流通・加工.pdf?id=Nzg4>. (2017.12. last accessed) .
- 53) 公益社団法人 日本食品衛生協会, 2004. 食品衛生検査指針 微生物編.
- 54) 公益社団法人 日本食品衛生協会, 2015. 食品衛生検査指針 微生物編.
- 55) 公益社団法人 日本薬学会, 2000. 衛生試験法・注解.
- 56) 厚生労働省, 1959. 食品衛生法 食品, 添加物等の規格基準 食肉製品 <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenshu/0000071198.pdf>. (2017.03 last accessed) .
- 57) 厚生労働省通知, 2015. 食安発0729第4号 食品, 添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について.
- 58) 厚生労働省通知, 2006. 食安監発第1102004号 腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について.
- 59) 厚生労働省通知, 1993. 衛乳第54号 食品衛生法施行規則及び食品, 添加物等の規格基準の一部改正について.
- 60) Laksanalamai, P., Joseph, L.A., Silk, B.J., Burall, L.S., Tarr, C.L., Gerner-Smidt, P., Datta, A.R., 2012. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with Cantaloupe in US. PloS One 7, e42448.
- 61) Lattuada, C.P., and Dey, B.P., 1998. Physical examination of meat and poultry

products, p. 2.3–2.4. In USDA/FSIS Microbiology laboratory guidebook, 3rd ed. Available at: <http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab/Mlgchp2.pdf>. (2009.04 last accessed).

- 62) Lassen, S.G., Ethelberg, S., Bjorkman, J.T., Jensen, T., Sorensen, G., Jensen, A.K., Muller, L., Nielsen, E.M., Molbak, K., 2016. Two listeria outbreaks caused by smoked fish consumption-using whole-genome sequencing for outbreak investigations. *Clin. Microbiol. Infec.* 21, 620-624.
- 63) Lechowich, R.V., Evans, J.B., Niven, C.F., 1956. Effect of curing ingredients and procedures on the survival and growth of Staphylococci in and on cured meats. *Appl. Microbiol.* 4, 360-363.
- 64) Li, K., Jiang, T.Y., Yu, B., Wang, L.M., Gao, C., Ma, C.Q., Xu, P., Ma, Y.H., 2012. Transcription elongation factor GreA has functional chaperone activity. *PLoS One* 7, e47521.
- 65) Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A., Broome, C.V., 1988. Epidemic Listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* 319, 823-828.
- 66) Lobel, L., Herskovits, A.A., 2016. Systems level analyses reveal multiple regulatory activities of CodY controlling metabolism, motility and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Genet.* 12, e1005870.
- 67) Lunden, J., Tolvanen, R., Korkeala, H., 2008. Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 276-280.
- 68) Markkula, A., Lindstrom, M., Johansson, P., Bjorkroth, J., Korkeala, H., 2012. Roles of four putative DEAD-box RNA helicase genes in growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e under heat, pH, osmotic, ethanol, and oxidative stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6875-6882.
- 69) McClure, P.J., Kelly, T.M., Roberts, T.A., 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 77-91.

- 70) Nair, S., Derre, I., Msadek, T., Gaillot, O., Berche, P., 2000. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35, 800-811.
- 71) Nair, S., Poyart, C., Beretti, J.L., Veiga-Fernandes, H., Berche, P., Trieu-Cuot, P., 2003. Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. *Microbiology-(UK)* 149, 407-417.
- 72) Nakamura, H., Tokuda, Y., Sono, A., Koyama, T., Ogasawara, J., Hase, A., Haruki, K., Nishikawa, Y., 2006. Molecular typing to trace *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish to a contamination source in a processing plant. *J. Food Prot.* 69, 835-841.
- 73) Nakamura, H., Hatanaka, M., Ochi, K., Nagao, M., Ogasawara, J., Hase, A., Kitase, T., Haruki, K., Nishikawa, Y., 2004. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 323-328.
- 74) Nakamura, H., Takakura, K.I., Sone, Y., Itano, Y., Nishikawa, Y., 2013. Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J. Food Prot.* 76, 1179-1186.
- 75) Neidhardt, F.C., Vanbogelen, R.A., Vaughn, V., 1984. The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18, 295-329.
- 76) Odriscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1693-1698.
- 77) Official Journal of the European Union, 2013. COMMISSION REGULATION (EU) No 101/2013: concerning the use of lactic acid to reduce microbiological surface contamination on bovine carcasses. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:034:0001:0003:EN:PDF> (2016.12. last accessed).
- 78) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., Igimi, S., 2004. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 131-140.
- 79) Oliver, H.F., Orsi, R.H., Ponnala, L., Keich, U., Wang, W., Sun, Q.,

- Cartinhour, S.W., Filiatrault, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2009. Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. *BMC Genomics* 10, 641.
- 80) 尾上 洋一, 新戸 理恵, 寺西 大, 古川 一郎, 長谷川 幸江, 丸山 務, 2002. 加熱及び凍結損傷黄色ブドウ球菌検出のための選択分離培地の検討. *食衛誌*. 43, 239-242.
- 81) Orsi, H.R. and Wiedmann, M., 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5273–5287.
- 82) Outbreak News Today, 2017. South Africa Listeriosis outbreak: Cases top 600 this year. <http://outbreaknewstoday.com/south-africa-listeriosis-outbreak-cases-top-600-year-71626/> (2017.12. last accessed).
- 83) Palmer, M.E., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2009. σ^B and σ^L Contribute to *Listeria monocytogenes* 10403S response to the antimicrobial peptides SdpC and Nisin. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1057-1065.
- 84) Pelroy, G., Peterson, M., Paranjpye, R., Almond, J., Eklund, M., 1994. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold process (smoked) salmon by sodium nitrite and packaging method. *J. Food Prot.* 57, 114-119.
- 85) Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Alige, S., 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 121-126.
- 86) Radoshevich, L. and Cossart, P., 2018. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 32–46.
- 87) Rice, K.M., Pierson, M.D., 1982. Inhibition of *Salmonella* by sodium nitrite and potassium sorbate in frankfurters. *J. Food Sci.* 47, 1615-1617.
- 88) Schirmer, B.C.T., Heir, E., Lindstedt, B.A., Moretro, T., Langsrud, S., 2014. Use of used vs. fresh cheese brines and the effect of pH and salt concentration on the survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Res.* 81, 113-119.
- 89) Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V.,

- Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., 1983. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308, 203-206.
- 90) Selby, K., Lindstrom, M., Somervuo, P., Heap, J.T., Minton, N.P., Korkeala, H., 2011. Important role of class I heat shock genes *hrcA* and *dnaK* in the heat shock response and the response to pH and NaCl stress of group I *Clostridium botulinum* strain ATCC 3502. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2823-2830.
- 91) Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25, 294-303.
- 92) Somolinos, M., Espina, L., Pagan, R., Garcia, D., 2010. *sigB* absence decreased *Listeria monocytogenes* EGD-e heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 32-38.
- 93) Sorqvist, S., 1994. Heat-resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 383-388.
- 94) Stephan, R., Althaus, D., Kiefer, S., Lehner, A., Hatz, C., Schmutz, C., Jost, M., Gerber, N., Baumgartner, A., Hachler, H., Mausezahl-Feuz, M., 2015. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: a nationwide outbreak in Switzerland, 2013-2014. *Food Control* 57, 14-17.
- 95) Tang, S.L., Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Boor, K.J., Bergholz, T.M., 2015. Transcriptomic analysis of the adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth on vacuum-packed cold smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6812-6824.
- 96) Tao, L., Chattoraj, P., Biswas, I., 2012. CtsR regulation in *mcsAB*-deficient gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 194, 1361-1368.
- 97) Thomas, M.K., Vriezen, R., Farber, J.M., Currie, A., Schlech, W., Fazil, A., 2015. Economic cost of a *Listeria monocytogenes* outbreak in Canada, 2008. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 966-971.
- 98) Trentini, D.B., Suskiewicz, M.J., Heuck, A., Kurzbauer, R., Deszcz, L., Mechtler, K., Clausen, T., 2016. Arginine phosphorylation marks proteins for

- degradation by a Clp protease. *Nature* 539, 48-53.
- 99) 上田 宏生, 2015. 次世代シーケンサを用いたゲノム情報解析のためのITインフラ. *Intec tech. J.* 15, 82-87.
- 100) USDA-FSIS, 2016. FSIS directive 7120. 1, revision 38: safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bab10e09-ae0a-483b-8be8-809a1f051d4c/7120.1.pdf?MOD=AJPERES> (2016.12 last accessed).
- 101) Utratna, M., Shaw, I., Starr, E., O'Byrne, C.P., 2011. Rapid, transient, and proportional activation of σ^B in response to osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7841-7845.
- 102) van der Veen, S., Abee, T., de Vos, W.M., Wells-Bennik, M.H.J., 2009. Genome-wide screen for *Listeria monocytogenes* genes important for growth at high temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.* 295, 195-203.
- 103) van der Veen, S., Hain, T., Wouters, J.A., Hossain, H., de Vos, W.M., Abee, T., Chakraborty, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2007. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology-(UK)* 153, 3593-3607.
- 104) van der Veen, S., van Schalkwijk, S., Molenaar, D., de Vos, W.M., Abee, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2010. The SOS response of *Listeria monocytogenes* is involved in stress resistance and mutagenesis. *Microbiology-(UK)* 156, 374-384.
- 105) van Schaik, W., Tempelaars, M.H., Wouters, J.A., de Vos, W.M., Abee, T., 2004. The alternative sigma factor σ^B of *Bacillus cereus*: response to stress and role in heat adaptation. *J. Bacteriol.* 186, 316-325.
- 106) van Netten, P., Valentijn, A., Mossel, D.A.A., HuisintVeld, J.H.J., 1997. Fate of low temperature and acid-adapted *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* that contaminate lactic acid decontaminated meat during chill storage. *J. Appl. Microbiol.* 82, 769-779.
- 107) Villarroya, M., Perez-Roger, I., Macian, F., Armengod, M.E., 1998. Stationary phase induction of *dnaN* and *recF*, two genes of *Escherichia coli* involved in DNA replication and repair. *Embo J.* 17, 1829-1837.

- 108) Volker, U., Maul, B., Hecker, M., 1999. Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181, 3942-3948.
- 109) 和田 正道, 斎藤 文一, 武政 次郎, 真野 覚, 水谷 宏, 五十嵐 英夫, 小沼 博隆, 1987. 食品の細菌数測定法としてのスパイラル・プレーティング法の評価. 食衛誌. 28, 311-316.
- 110) Schlech, W.F.III, Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King S.H., Nicholls E.S., Broome C.V., 1983. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308, 203-206.
- 111) Wemmenhove, E., van Valenberg, H.J.F., Zwietering, M.H., van Hooijdonk, T.C.M., Wells-Bennik, M.H.J., 2016. Minimal inhibitory concentrations of undissociated lactic, acetic, citric and propionic acid for *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to cheese. Food Microbiol. 58, 63-67.
- 112) Wiegert, T., and Schumann, W., 2003. Analysis of a DNA-binding motif of the *Bacillus subtilis* HrcA repressor protein. FEMS Microbiol. Lett. 223, 101-106.
- 113) Yoon, Y., Geornaras, I., Scanga, J.A., Belk, K.E., Smith, G.C., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2011. Probabilistic models for the prediction of target growth interfaces of *Listeria monocytogenes* on ham and turkey breast products. J. Food Sci. 76, M450-455.
- 114) Zhang, Q.A., Feng, Y.Y., Deng, L.F., Feng, F.F., Wang, L., Zhou, Q.C., Luo, Q., 2011. SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. Int. J. Food Microbiol. 145, 238-243.

Supplementary table 1. RNA-seq による遺伝子発現差解析結果.

Locus_Tag	Protein_ID	Product	Fold change	E-Value
LM4B_RS02535	WP_025206549.1	shikimate dehydrogenase	28.67	4.00E-90
LM4B_RS05130	WP_003726553.1	hypothetical protein	23.56	2.00E-49
LM4B_RS02540	WP_012681113.1	3-dehydroquinase	18.33	2.00E-95
LM4B_RS07420	WP_010958902.1	MerR family transcriptional regulator	18.07	2.00E-22
LM4B_RS14425	WP_003725801.1	hypothetical protein	16.76	1.00E-109
LM4B_RS14420	WP_003718062.1	50S ribosomal protein L34	16.24	2.00E-20
LM4B_RS13405	WP_003720973.1	30S ribosomal protein S12	15.85	5.00E-79
LM4B_RS06850	WP_003719639.1	cold-shock protein CspA	14.28	2.00E-35
LM4B_RS05235	WP_003722652.1	hypothetical protein	13.35	9.00E-44
LM4B_RS06255	WP_003726046.1	hypothetical protein	12.28	3.00E-54
LM4B_RS12415	WP_003722600.1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	11.73	1.00E-104
LM4B_RS05930	WP_003740570.1	hypothetical protein	11.56	2.00E-117
LM4B_RS05230	WP_003722651.1	ribonuclease J	11.23	0
LM4B_RS06300	WP_003723553.1	hypothetical protein	11.12	1.00E-25
LM4B_RS11375	WP_003723354.1	hypothetical protein	10.90	1.00E-59
LM4B_RS12115	WP_003725599.1	hypothetical protein	10.76	7.00E-71

LM4B_RS04390	WP_003724798.1	DEAD/DEAH box helicase (cshA)	10.57	0
LM4B_RS13860	WP_003725037.1	cyclic nucleotide-binding protein	10.22	1.00E-150
LM4B_RS07250	WP_003727435.1	foldase	10.09	9.00E-20
LM4B_RS13710	WP_012681471.1	cell wall surface anchor protein	9.93	0.044
LM4B_RS03090	WP_003727258.1	biotin transporter BioY	9.93	1.00E-105
LM4B_RS05090	WP_003727046.1	membrane protein	9.89	0
LM4B_RS09395	WP_003726599.1	hypothetical protein	9.88	4.00E-38
LM4B_RS02305	WP_010958737.1	transcriptional regulator	9.48	5.00E-104
LM4B_RS11165	WP_012681406.1	SrtB family sortase	9.34	6.00E-157
LM4B_RS00015	WP_003725617.1	MATE family efflux transporter	9.33	6.00E-52
LM4B_RS12535	WP_003727904.1	membrane protein	9.07	1.00E-56
LM4B_RS05940	WP_003721583.1	carboxysome shell protein	9.05	5.00E-123
LM4B_RS09405	WP_003726601.1	RNA pseudouridine synthase	8.75	1.00E-102
LM4B_RS09110	WP_003720098.1	50S ribosomal protein L35	8.46	3.00E-22
LM4B_RS01115	WP_012681033.1	molecular chaperone Hsp33 (hslO)	8.38	2.00E-113
LM4B_RS05100	WP_003743818.1	hypothetical protein	8.37	3.00E-35
LM4B_RS13910	WP_003725306.1	glycosyl transferase	8.35	9.00E-24
LM4B_RS00945	WP_003718261.1	hypothetical protein	8.28	7.00E-54

LM4B_RS02530	WP_003725702.1	2%2C4-dienoyl-CoA reductase	8.14	2.00E-70
LM4B_RS06785	WP_003722478.1	rhodanese-like domain-containing protein	7.99	4.00E-76
LM4B_RS00010	WP_003725616.1	DNA polymerase III subunit beta (dnaN)	7.96	8.00E-153
LM4B_RS13905	WP_003725305.1	membrane protein	7.92	0
LM4B_RS05935	WP_003721582.1	ethanolamine utilization protein EutN	7.92	6.00E-47
LM4B_RS05655	WP_012681240.1	ABC transporter ATP-binding protein	7.92	1.00E-48
LM4B_RS12305	WP_003726176.1	transcriptional activator	7.89	2.00E-04
LM4B_RS11565	WP_003720638.1	DNA methyltransferase	7.87	8.00E-69
LM4B_RS11160	WP_003724598.1	hypothetical protein	7.83	9.00E-104
LM4B_RS08320	WP_003723971.1	30S ribosomal protein S2	7.82	5.00E-124
LM4B_RS07255	WP_003721950.1	transcriptional repressor	7.74	2.00E-58
LM4B_RS05925	WP_003721580.1	phosphate propanoyltransferase	7.69	3.00E-148
LM4B_RS05425	WP_003725573.1	hypothetical protein	7.66	3.00E-59
LM4B_RS03085	WP_003723403.1	Crp/Fnr family transcriptional regulator	7.64	1.00E-167
LM4B_RS10750	WP_003724531.1	hypothetical protein	7.53	7.00E-39
LM4B_RS06650	WP_003722455.1	50S ribosomal protein L7ae	7.44	8.00E-31
LM4B_RS13895	WP_012681473.1	ABC transporter ATP-binding protein	7.39	2.00E-132
LM4B_RS04405	WP_003724801.1	transcriptional regulator	7.38	3.00E-117

LM4B_RS11775	WP_012681428.1	membrane protein	7.35	0
LM4B_RS05920	WP_003724718.1	hypothetical protein	7.33	6.00E-148
LM4B_RS11185	WP_003727848.1	hypothetical protein	7.32	0
LM4B_RS05175	WP_003734321.1	glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	7.25	0
LM4B_RS06790	WP_003726159.1	hypothetical protein	7.17	1.00E-29
LM4B_RS08985	WP_003728226.1	hypothetical protein	7.15	4.00E-43
LM4B_RS07875	WP_003725695.1	membrane protein FxsA	7.13	4.00E-88
LM4B_RS13685	WP_003722069.1	hypothetical protein	7.06	1.00E-19
LM4B_RS13690	WP_003725005.1	hypothetical protein	6.98	4.00E-153
LM4B_RS10650	WP_003731371.1	transcriptional regulator	6.96	0
LM4B_RS08755	WP_012681333.1	transcription regulator	6.89	6.00E-14
LM4B_RS12530	WP_003725423.1	hydrolase	6.89	2.00E-152
LM4B_RS01100	WP_003740381.1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	6.80	7.00E-95
LM4B_RS07460	WP_003727422.1	ribosome silencing factor RsfS	6.79	4.00E-79
LM4B_RS07415	WP_003726028.1	hypothetical protein	6.76	0
LM4B_RS12815	WP_003726356.1	50S ribosomal protein L31 type B	6.73	4.00E-45
LM4B_RS14355	WP_003727580.1	hypothetical protein	6.72	0
LM4B_RS02345	WP_003725181.1	hypothetical protein	6.67	3.00E-06

LM4B_RS02490	WP_003721271.1	heme-degrading monooxygenase	6.66	2.00E-84
LM4B_RS08125	WP_003727357.1	MarR family transcriptional regulator	6.64	2.00E-11
LM4B_RS05180	WP_012681210.1	PTS glucose transporter subunit IIA	6.62	1.00E-35
LM4B_RS04235	WP_003721401.1	phosphate-starvation-inducible protein PsiE	6.58	4.00E-32
LM4B_RS02960	WP_003727269.1	hypothetical protein	6.50	0
LM4B_RS08990	WP_003720075.1	transcriptional regulator	6.48	1.00E-65
LM4B_RS01320	WP_003718336.1	50S ribosomal protein L11	6.41	4.00E-72
LM4B_RS04395	WP_015084667.1	hypothetical protein	6.41	-
LM4B_RS07465	WP_003726533.1	phosphohydrolase (lmo1487)	6.30	1.00E-124
LM4B_RS05505	WP_003724629.1	CDP-glycerol--glycerophosphate glycerophosphotransferase	6.30	0
LM4B_RS06575	WP_003726669.1	chromosome partitioning protein ParB	6.25	3.00E-41
LM4B_RS13705	WP_003725008.1	hypothetical protein	6.23	0
LM4B_RS05955	WP_003734691.1	AraC family transcriptional regulator	6.21	2.00E-14
LM4B_RS02910	WP_003725464.1	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	6.20	2.00E-34
LM4B_RS12670	WP_003727897.1	undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase	6.19	3.00E-75
LM4B_RS13980	WP_003725318.1	membrane protein	6.19	5.00E-140
LM4B_RS00745	WP_003726467.1	hypothetical protein	6.18	2.00E-51
LM4B_RS07475	WP_012681299.1	RNA-binding protein	6.12	5.00E-59

LM4B_RS07245	WP_003725386.1	branched-chain amino acid ABC transporter	6.07	8.00E-57
LM4B_RS10000	WP_003727984.1	iron-dicitrate ABC transporter ATP-binding protein	6.06	2.00E-106
LM4B_RS01260	WP_012681034.1	2-C-methyl-D-erythritol 2%2C4-cyclodiphosphate synthase	6.05	3.00E-62
LM4B_RS04400	WP_003724800.1	membrane protein	6.04	7.00E-110
LM4B_RS05225	WP_003725541.1	LytR family transcriptional regulator	5.98	8.00E-32
LM4B_RS06565	WP_003726667.1	hypothetical protein	5.97	6.00E-14
LM4B_RS06645	WP_003726536.1	hypothetical protein	5.96	5.00E-63
LM4B_RS01555	WP_003724221.1	DNA-binding response regulator	5.96	8.00E-121
LM4B_RS04350	WP_012681188.1	LacI family transcriptional regulator	5.95	1.00E-25
LM4B_RS11685	WP_012681423.1	cysteine ABC transporter permease	5.88	7.00E-42
LM4B_RS07440	WP_003731172.1	competence protein ComEC	5.88	0
LM4B_RS10805	WP_003728349.1	membrane protein	5.86	2.00E-166
LM4B_RS03160	WP_003740469.1	MarR family transcriptional regulator	5.86	5.00E-23
LM4B_RS02190	WP_003722966.1	transcriptional regulator	5.85	3.00E-39
LM4B_RS04785	WP_012681198.1	protein-tyrosine-phosphatase	5.82	4.00E-39
LM4B_RS07260	WP_003740994.1	metal ABC transporter permease	5.77	7.00E-161
LM4B_RS00750	WP_003726468.1	hypothetical protein	5.75	2.00E-101
LM4B_RS14400	WP_003725799.1	ASCH domain-containing protein	5.73	2.00E-111

LM4B_RS08405	WP_003727323.1	adhesin	5.70	0
LM4B_RS10655	WP_003728358.1	multidrug efflux MATE transporter FepA	5.65	3.00E-108
LM4B_RS05135	WP_003719227.1	hypothetical protein	5.65	4.00E-49
LM4B_RS11170	WP_003734379.1	iron ABC transporter ATP-binding protein	5.63	1.00E-89
LM4B_RS10440	WP_003726129.1	hypothetical protein (lmo2045)	5.58	-
LM4B_RS10565	WP_003728317.1	CAAX amino protease	5.56	9.00E-123
LM4B_RS03765	WP_003724462.1	hypothetical protein	5.55	4.00E-74
LM4B_RS00935	WP_003725504.1	ribonuclease M5	5.55	5.00E-121
LM4B_RS09175	WP_003720111.1	30S ribosomal protein S16	5.53	1.00E-43
LM4B_RS09085	WP_003740600.1	hypothetical protein	5.52	2.00E-76
LM4B_RS14025	WP_012681478.1	membrane protein	5.51	0
LM4B_RS10975	WP_003724566.1	GntR family transcriptional regulator (yvoA)	5.51	1.00E-26
LM4B_RS03315	WP_003734449.1	amino acid permease	5.50	3.00E-142
LM4B_RS14335	WP_003725788.1	ABC transporter substrate-binding protein	5.46	1.00E-174
LM4B_RS07240	WP_003731380.1	branched-chain amino acid permease	5.46	1.00E-63
LM4B_RS13400	WP_003722012.1	30S ribosomal protein S7	5.43	6.00E-96
LM4B_RS04810	WP_003722764.1	hypothetical protein	5.41	2.00E-71
LM4B_RS01090	WP_003718298.1	hypothetical protein	5.39	2.00E-89

LM4B_RS04805	WP_003719147.1	DNA starvation/stationary phase protection protein	5.38	1.00E-110
LM4B_RS06555	WP_003726567.1	hypothetical protein	5.38	5.00E-46
LM4B_RS02695	WP_012681122.1	type I restriction endonuclease subunit S	5.36	5.00E-12
LM4B_RS11115	WP_012681401.1	acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase	5.36	0
LM4B_RS05470	WP_010958841.1	membrane protein	5.33	0
LM4B_RS02205	WP_012681088.1	hypothetical protein	5.31	5.00E-100
LM4B_RS10810	WP_003724616.1	GNAT family acetyltransferase	5.29	3.00E-29
LM4B_RS11560	WP_003730858.1	GNAT family acetyltransferase	5.28	0
LM4B_RS08315	WP_003726264.1	elongation factor Ts	5.27	5.00E-134
LM4B_RS06365	WP_003731300.1	hypothetical protein	5.26	2.00E-128
LM4B_RS03760	WP_003727187.1	hypothetical protein	5.24	3.00E-113
LM4B_RS14040	WP_003727621.1	hypothetical protein	5.23	2.00E-112
LM4B_RS07095	WP_003725358.1	peptidoglycan-binding protein	5.21	0
LM4B_RS11555	WP_003726808.1	PTS beta-glucoside transporter subunit IIA	5.21	5.00E-10
LM4B_RS08150	WP_003726739.1	acid phosphatase	5.21	4.00E-148
LM4B_RS14020	WP_003730733.1	ABC transporter ATP-binding protein	5.16	3.00E-40
LM4B_RS06415	WP_003727517.1	DNA topoisomerase I	5.10	0
LM4B_RS12280	WP_003727931.1	membrane protein	5.08	8.00E-83

LM4B_RS14175	WP_003734208.1	hypothetical protein	5.08	5.00E-81
LM4B_RS02195	WP_003728112.1	hypothetical protein	5.08	1.00E-61
LM4B_RS12665	WP_003726230.1	transcriptional regulator	5.07	4.00E-36
LM4B_RS03325	WP_003721764.1	hypothetical protein	5.07	5.00E-61
LM4B_RS04790	WP_012681199.1	hypothetical protein	5.07	1.00E-176
LM4B_RS12705	WP_003727894.1	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	5.05	0
LM4B_RS02945	WP_003725471.1	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	5.03	7.00E-80
LM4B_RS12635	WP_003734490.1	competence protein ComFC	5.02	5.00E-146
LM4B_RS03200	WP_003724363.1	DUF1398 domain-containing protein	4.99	5.00E-87
LM4B_RS11190	WP_012681408.1	heme uptake protein IsdC	4.98	2.00E-130
LM4B_RS09170	WP_003728421.1	KH domain-containing protein	4.98	8.00E-46
LM4B_RS07020	WP_003725961.1	DNA recombination/repair protein RecA	4.93	0
LM4B_RS10465	WP_003726134.1	thiamine ABC transporter permease	4.91	0
LM4B_RS06495	WP_003726657.1	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	4.91	7.00E-47
LM4B_RS07605	WP_003726726.1	Rrf2 family transcriptional regulator	4.90	6.00E-95
LM4B_RS03810	WP_012681166.1	hypothetical protein	4.89	1.00E-101
LM4B_RS00960	WP_003722721.1	pur operon repressor	4.89	2.00E-14
LM4B_RS13005	WP_003728386.1	multidrug transporter	4.86	6.00E-138

LM4B_RS05170	WP_003722879.1	glycine/betaine ABC transporter permease	4.86	6.00E-176
LM4B_RS11300	WP_012681410.1	haloacid dehalogenase	4.85	4.00E-46
LM4B_RS03245	WP_012681144.1	amidase	4.84	9.00E-20
LM4B_RS02365	WP_003725186.1	transglutaminase	4.83	3.00E-103
LM4B_RS02935	WP_003725469.1	histidinol dehydrogenase	4.82	6.00E-168
LM4B_RS00695	WP_003724959.1	diguanylate phosphodiesterase	4.81	2.00E-162
LM4B_RS08400	WP_003726086.1	membrane protein insertion efficiency factor YidD	4.79	4.00E-62
LM4B_RS08100	WP_003741245.1	hypothetical protein	4.77	5.00E-39
LM4B_RS07525	WP_012581292.1	hypothetical protein	4.72	0
LM4B_RS05460	WP_012681220.1	major teichoic acid biosynthesis protein C	4.70	0
LM4B_RS07510	WP_003722004.1	transcription elongation factor GreA	4.69	2.00E-45
LM4B_RS02905	WP_003725463.1	phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	4.69	2.00E-18
LM4B_RS00060	WP_003743309.1	phosphomevalonate kinase	4.69	2.00E-07
LM4B_RS10495	WP_003740730.1	hypothetical protein	4.68	0
LM4B_RS01105	WP_012681032.1	cell division protein FtsH	4.67	0
LM4B_RS08705	WP_003726640.1	hypothetical protein	4.67	1.00E-44
LM4B_RS10435	WP_012681387.1	ABC transporter substrate-binding protein	4.67	4.00E-84
LM4B_RS02915	WP_003725465.1	imidazole glycerol phosphate synthase cyclase subunit	4.67	4.00E-109

LM4B_RS10910	WP_003727869.1	cAMP-binding protein	4.65	1.00E-163
LM4B_RS12585	WP_003734491.1	membrane protein	4.64	0
LM4B_RS12650	WP_003722647.1	DNA-binding response regulator	4.63	8.00E-54
LM4B_RS12525	WP_003727905.1	hypothetical protein	4.62	3.00E-37
LM4B_RS00800	WP_003725479.1	cyclic nucleotide-binding protein	4.60	8.00E-164
LM4B_RS06260	WP_003726047.1	RNA helicase	4.58	0
LM4B_RS02920	WP_003725466.1	1-(5-phosphoribosyl)-5-((5-phosphoribosylamino)methylideneamino)imidazole-4-carboxamide isomerase	4.58	9.00E-99
LM4B_RS07870	WP_003725694.1	membrane protein	4.57	3.00E-67
LM4B_RS00975	WP_003725507.1	ABC transporter permease	4.57	6.00E-65
LM4B_RS14360	WP_003725792.1	GNAT family acetyltransferase	4.57	2.00E-37
LM4B_RS12640	WP_003726226.1	competence protein ComF	4.57	8.00E-119
LM4B_RS06860	WP_003726253.1	rRNA methyltransferase	4.56	0
LM4B_RS01870	WP_003724290.1	hypothetical protein	4.54	1.00E-70
LM4B_RS00355	WP_003724888.1	type VII secretion protein EssB	4.54	0
LM4B_RS11780	WP_003723817.1	Rrf2 family transcriptional regulator	4.53	4.00E-107
LM4B_RS11425	WP_003725914.1	LysR family transcriptional regulator (yybE)	4.53	7.00E-40
LM4B_RS12285	WP_003727930.1	hypothetical protein	4.52	0

LM4B_RS04070	WP_003726666.1	hypothetical protein	4.52	4.00E-112
LM4B_RS08120	WP_003727358.1	multidrug MFS transporter	4.50	6.00E-129
LM4B_RS02275	WP_012681095.1	hypothetical protein	4.50	4.00E-59
LM4B_RS03370	WP_003724396.1	membrane protein	4.49	5.00E-121
LM4B_RS06265	WP_003726048.1	hypothetical protein	4.48	2.00E-58
LM4B_RS09900	WP_003725931.1	peptidoglycan-binding protein LysM	4.48	1.00E-40
LM4B_RS06685	WP_003726541.1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	4.46	0
LM4B_RS08310	WP_003726263.1	hypothetical protein	4.44	-
LM4B_RS11935	WP_003728413.1	aspartate kinase	4.44	0
LM4B_RS01110	WP_003725746.1	type III pantothenate kinase	4.43	2.00E-114
LM4B_RS04075	WP_003727151.1	hypothetical protein	4.42	4.00E-88
LM4B_RS00020	WP_010958651.1	RNA-binding protein	4.41	3.00E-44
LM4B_RS01080	WP_003722745.1	hypothetical protein	4.40	4.00E-57
LM4B_RS03165	WP_003724356.1	NADPH:quinone reductase	4.39	4.00E-100
LM4B_RS12145	WP_003727944.1	hypothetical protein	4.39	0
LM4B_RS01340	WP_012681036.1	16S RNA G1207 methylase RsmC	4.37	1.00E-142
LM4B_RS01325	WP_003726838.1	50S ribosomal protein L1	4.36	6.00E-115
LM4B_RS08390	WP_003727325.1	hypothetical protein	4.35	7.00E-51

LM4B_RS05465	WP_003724621.1	glycosyl transferase	4.33	4.00E-120
LM4B_RS09270	WP_003720131.1	50S ribosomal protein L28	4.33	1.00E-25
LM4B_RS13800	WP_003725025.1	phosphosugar-binding protein	4.32	2.00E-10
LM4B_RS12675	WP_003727896.1	o-succinylbenzoate synthase (menC)	4.31	0
LM4B_RS00755	WP_003726469.1	hypothetical protein	4.31	3.00E-52
LM4B_RS10745	WP_010959009.1	ferrous iron transport protein B	4.30	0
LM4B_RS11740	WP_012681425.1	hypothetical protein	4.27	8.00E-13
LM4B_RS05405	WP_003725571.1	inositol monophosphatase	4.27	1.00E-70
LM4B_RS05945	WP_003721584.1	ethanolamine utilization protein EutH	4.26	0
LM4B_RS04255	WP_003724771.1	MarR family transcriptional regulator	4.25	1.00E-19
LM4B_RS02370	WP_003734634.1	hypothetical protein	4.25	0
LM4B_RS05440	WP_003734744.1	ABC transporter substrate-binding protein	4.24	3.00E-173
LM4B_RS01715	WP_031627585.1	hypothetical protein	4.22	8.00E-167
LM4B_RS09190	WP_003726327.1	protein-tyrosine-phosphatase	4.22	2.00E-43
LM4B_RS02510	WP_003725728.1	nitroreductase	4.21	2.00E-133
LM4B_RS11175	WP_012681407.1	ABC transporter permease (isdF)	4.21	7.00E-100
LM4B_RS09115	WP_003728428.1	translation initiation factor IF-3	4.18	3.00E-88
LM4B_RS04705	WP_003721490.1	type I pantothenate kinase	4.18	7.00E-98

LM4B_RS14365	WP_012681490.1	MFS transporter	4.18	3.00E-51
LM4B_RS09655	WP_003728019.1	penicillin-binding protein	4.17	0
LM4B_RS11345	WP_003720598.1	hypothetical protein	4.16	7.00E-64
LM4B_RS08105	WP_003726711.1	hypothetical protein	4.16	2.00E-111
LM4B_RS02130	WP_003724334.1	hypothetical protein	4.15	4.00E-92
LM4B_RS13775	WP_003725021.1	Fis family transcriptional regulator	4.15	0
LM4B_RS11020	WP_003727862.1	flavodoxin	4.15	2.00E-07
LM4B_RS03470	WP_012681155.1	hypothetical protein	4.13	-
LM4B_RS07435	WP_003726527.1	DNA polymerase III subunit delta	4.13	0
LM4B_RS00740	WP_012681016.1	hypothetical protein	4.13	5.00E-151
LM4B_RS02925	WP_003725467.1	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	4.12	3.00E-53
LM4B_RS14170	WP_003727610.1	hypothetical protein	4.12	1.00E-77
LM4B_RS13890	WP_003725043.1	para-aminobenzoate synthase component I	4.12	0
LM4B_RS00055	WP_003741301.1	diphosphomevalonate decarboxylase	4.09	3.00E-44
LM4B_RS07740	WP_012681305.1	50S ribosomal protein L21	4.07	2.00E-40
LM4B_RS12680	WP_003726762.1	acetylglucosaminyl diphosphoundecaprenol acetyl-beta-D-mannosaminyltransferase	4.06	7.00E-52
LM4B_RS06810	WP_012681282.1	acetyl-CoA carboxylase%2C biotin carboxyl carrier protein	4.05	6.00E-37
LM4B_RS04095	WP_003721373.1	spermidine/putrescine ABC transporter permease	4.04	3.00E-45

LM4B_RS14405	WP_003725800.1	protein jag	4.04	7.00E-140
LM4B_RS09410	WP_003726602.1	lipoprotein signal peptidase	4.04	2.00E-86
LM4B_RS06545	WP_003723438.1	LexA repressor	4.03	2.00E-98
LM4B_RS00460	WP_003724921.1	cyclic nucleotide-binding protein	4.01	1.00E-163
LM4B_RS04305	WP_012681185.1	amidase	3.99	1.00E-118
LM4B_RS05905	WP_012681254.1	ethanolamine utilization protein	3.99	2.00E-93
LM4B_RS12590	WP_003722636.1	cardiolipin synthase	3.97	0
LM4B_RS14410	WP_003723726.1	membrane protein (yidC, lmo2854)	3.96	4.00E-155
LM4B_RS14330	WP_003725787.1	sugar ABC transporter permease	3.96	2.00E-145
LM4B_RS12395	WP_003741138.1	hypothetical protein	3.93	4.00E-88
LM4B_RS11455	WP_003725919.1	membrane protein	3.92	0
LM4B_RS09160	WP_003724050.1	hypothetical protein	3.91	6.00E-77
LM4B_RS05245	WP_012681212.1	LacI family transcriptional regulator	3.90	1.00E-30
LM4B_RS09335	WP_003725661.1	hypothetical protein	3.88	0
LM4B_RS02610	WP_012681116.1	galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	3.88	1.00E-67
LM4B_RS00025	WP_003723768.1	DNA recombination protein RecF	3.88	7.00E-146
LM4B_RS12005	WP_003722412.1	membrane protein	3.88	1.00E-105
LM4B_RS09915	WP_003740630.1	ferredoxin	3.87	4.00E-05

LM4B_RS02325	WP_003728099.1	hypothetical protein	3.86	9.00E-116
LM4B_RS00070	WP_012681000.1	cell wall surface anchor protein	3.85	0.002
LM4B_RS01265	WP_003728082.1	glutamate--tRNA ligase	3.83	0
LM4B_RS09805	WP_003726518.1	hypothetical protein	3.83	0
LM4B_RS07860	WP_003727385.1	isocitrate dehydrogenase (NADP(+))	3.82	0
LM4B_RS03940	WP_003721894.1	hypothetical protein	3.82	1.00E-86
LM4B_RS07480	WP_012681300.1	shikimate dehydrogenase	3.81	1.00E-76
LM4B_RS13760	WP_003725018.1	hypothetical protein	3.80	2.00E-93
LM4B_RS07715	WP_003724114.1	GTPase ObgE	3.79	0
LM4B_RS05125	WP_003730936.1	aminotransferase A	3.78	0
LM4B_RS02940	WP_003725470.1	ATP phosphoribosyltransferase	3.77	1.00E-94
LM4B_RS08850	WP_003722212.1	LysR family transcriptional regulator (gltC)	3.77	0
LM4B_RS05085	WP_003727047.1	hypothetical protein	3.76	2.00E-108
LM4B_RS05500	WP_003724628.1	glycosyl transferase	3.75	1.00E-12
LM4B_RS07265	WP_003725389.1	zinc ABC transporter ATP-binding protein	3.74	7.00E-83
LM4B_RS00925	WP_003740372.1	hydrolase TatD	3.73	1.00E-115
LM4B_RS03825	WP_003724474.1	hypothetical protein	3.73	8.00E-147
LM4B_RS08115	WP_003726713.1	phosphotransferase	3.71	0

LM4B_RS07820	WP_003723242.1	GTP-binding protein	3.71	2.00E-97
LM4B_RS00795	WP_012681019.1	zinc ABC transporter permease	3.70	9.00E-40
LM4B_RS06640	WP_012681276.1	transcription termination/antitermination protein NusA	3.70	5.00E-146
LM4B_RS09075	WP_003731775.1	phosphohydrolase	3.69	1.00E-117
LM4B_RS06830	WP_003734505.1	bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase /5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase (fold, lmo1360)	3.69	2.00E-112
LM4B_RS08110	WP_003727359.1	tRNA (guanosine(46)-N7)-methyltransferase TrmB	3.69	3.00E-98
LM4B_RS11180	WP_003730873.1	heme ABC transporter substrate-binding protein IsdE	3.68	8.00E-07
LM4B_RS04840	WP_003726344.1	hypothetical protein	3.68	0
LM4B_RS13765	WP_003725019.1	MATE family efflux transporter	3.67	9.00E-57
LM4B_RS05475	WP_003724623.1	glycosyl transferase	3.67	1.00E-38
LM4B_RS01085	WP_003722746.1	cell division protein DIVIC	3.67	8.00E-54
LM4B_RS04230	WP_012681181.1	peptidoglycan-binding protein	3.67	3.00E-26
LM4B_RS13900	WP_003725304.1	multidrug ABC transporter permease	3.65	3.00E-132
LM4B_RS06135	WP_003724750.1	transcriptional regulator	3.65	5.00E-12
LM4B_RS11260	WP_003724615.1	MarR family transcriptional regulator	3.65	4.00E-35
LM4B_RS09595	WP_003728271.1	5'-3' exonuclease	3.65	3.00E-91
LM4B_RS00735	WP_003728921.1	hypothetical protein	3.65	4.00E-62

LM4B_RS03915	WP_003724490.1	GntR family transcriptional regulator	3.65	7.00E-08
LM4B_RS00940	WP_003731190.1	ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	3.65	3.00E-118
LM4B_RS13255	WP_003727695.1	50S ribosomal protein L4	3.64	9.00E-92
LM4B_RS01865	WP_003724289.1	PTS fructose transporter subunit IIBC	3.64	8.00E-128
LM4B_RS11195	WP_003724605.1	hypothetical protein	3.63	1.00E-54
LM4B_RS11445	WP_003725917.1	MFS transporter	3.63	7.00E-61
LM4B_RS04290	WP_003734280.1	excinuclease ABC subunit C	3.61	0
LM4B_RS12370	WP_003727920.1	central glycolytic genes regulator	3.60	3.00E-116
LM4B_RS07805	WP_003725682.1	uroporphyrinogen-III synthase	3.60	1.00E-17
LM4B_RS10720	WP_012681397.1	GntR family transcriptional regulator	3.60	1.00E-117
LM4B_RS13265	WP_003720954.1	30S ribosomal protein S10	3.60	5.00E-63
LM4B_RS01675	WP_012681056.1	cell wall surface anchor protein	3.60	6.00E-04
LM4B_RS01435	WP_003731072.1	internalin	3.59	0
LM4B_RS01410	WP_012681042.1	hypothetical protein	3.58	1.00E-14
LM4B_RS11695	WP_012681424.1	acetyltransferase	3.57	0.019
LM4B_RS08155	WP_003726740.1	cell division protein	3.56	2.00E-142
LM4B_RS11690	WP_003725119.1	amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	3.56	3.00E-25
LM4B_RS05890	WP_003721574.1	ethanolamine ammonia lyase large subunit	3.56	0

LM4B_RS13995	WP_012681477.1	bifunctional glutamate--cysteine ligase/glutathione synthetase	3.55	2.00E-52
LM4B_RS06295	WP_003726054.1	hypothetical protein	3.55	0
LM4B_RS14185	WP_003734206.1	hypothetical protein	3.55	1.00E-40
LM4B_RS11680	WP_012681422.1	cysteine ABC transporter permease	3.53	1.00E-40
LM4B_RS09510	WP_003723418.1	hemolysin D	3.53	6.00E-81
LM4B_RS05095	WP_003730934.1	phytoene dehydrogenase	3.53	1.00E-64
LM4B_RS06360	WP_003727523.1	hypothetical protein	3.53	2.00E-111
LM4B_RS05165	WP_003727041.1	glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein	3.53	0
LM4B_RS01300	WP_003728079.1	50S ribosomal protein L33	3.52	5.00E-13
LM4B_RS12540	WP_003725425.1	transcriptional regulator	3.52	3.00E-24
LM4B_RS02375	WP_003721242.1	magnesium chelatase	3.52	0
LM4B_RS10575	WP_003722329.1	transcriptional regulator	3.52	3.00E-150
LM4B_RS07185	WP_003725374.1	heme ABC transporter ATP-binding protein	3.52	0
LM4B_RS00345	WP_003724887.1	type VII secretion protein EssA	3.52	2.00E-50
LM4B_RS12845	WP_003726362.1	glycosyl transferase family 1	3.51	3.00E-98
LM4B_RS04125	WP_003721379.1	hypothetical protein	3.51	2.00E-59
LM4B_RS01740	WP_009917930.1	hypothetical protein	3.51	2.00E-57
LM4B_RS07470	WP_003727421.1	nicotinate-nicotinamide nucleotide adenyltransferase	3.50	1.00E-59

LM4B_RS05410	WP_003722695.1	GTP-binding protein	3.50	0
LM4B_RS03820	WP_003734914.1	Crp/Fnr family transcriptional regulator	3.50	4.00E-05
LM4B_RS07030	WP_009918755.1	phosphinothricin N-acetyltransferase	3.49	1.00E-14
LM4B_RS08745	WP_012681332.1	hypothetical protein	3.49	2.00E-137
LM4B_RS04735	WP_003724851.1	class A sortase	3.49	2.00E-27
LM4B_RS06245	WP_003726044.1	hypothetical protein	3.49	7.00E-94
LM4B_RS09105	WP_003720097.1	50S ribosomal protein L20	3.49	2.00E-33
LM4B_RS12660	WP_003742943.1	GNAT family acetyltransferase	3.49	4.00E-13
LM4B_RS08930	WP_009928225.1	RNA methyltransferase	3.48	0
LM4B_RS08270	WP_003727338.1	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	3.48	3.00E-144
LM4B_RS04100	WP_003721374.1	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	3.48	2.00E-72
LM4B_RS13270	WP_003726731.1	energy-coupling factor transporter protein EcfT 1	3.47	1.00E-89
LM4B_RS02605	WP_003725716.1	ribulose-phosphate 3-epimerase	3.47	4.00E-71
LM4B_RS00030	WP_003723769.1	DNA gyrase subunit B	3.47	0
LM4B_RS00595	WP_003740365.1	diguanylate phosphodiesterase	3.46	8.00E-167
LM4B_RS13595	WP_003722052.1	hypothetical protein	3.46	4.00E-72
LM4B_RS01585	WP_003722913.1	23S rRNA (pseudouridine(1915)-N(3))-methyltransferase RlmH	3.45	2.00E-105
LM4B_RS00830	WP_003728187.1	DNA polymerase III subunit delta'	3.44	6.00E-66

LM4B_RS06380	WP_003723886.1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	3.43	0
LM4B_RS12840	WP_009917757.1	glycosyl transferase	3.41	1.00E-109
LM4B_RS03800	WP_012681164.1	ABC transporter permease	3.40	7.00E-135
LM4B_RS01420	WP_003728064.1	hypothetical protein	3.40	-
LM4B_RS02600	WP_003725715.1	hypothetical protein	3.40	2.00E-92
LM4B_RS07515	WP_003725973.1	uridine kinase	3.40	5.00E-70
LM4B_RS04730	WP_003724850.1	DNA-3-methyladenine glycosylase	3.39	3.00E-34
LM4B_RS02565	WP_003721282.1	hypothetical protein (UPF0291 protein lmo0496)	3.39	2.00E-45
LM4B_RS07280	WP_003721956.1	DEAD/DEAH box family ATP-dependent RNA helicase (cshB, lmo1450)	3.37	2.00E-175
LM4B_RS13395	WP_003724965.1	elongation factor G	3.37	0
LM4B_RS03485	WP_003724414.1	motility gene repressor MogR	3.37	0
LM4B_RS13085	WP_003727703.1	50S ribosomal protein L13	3.37	8.00E-74
LM4B_RS11675	WP_003725116.1	arginine ABC transporter ATP-binding protein	3.36	2.00E-94
LM4B_RS12310	WP_003723350.1	SsrA-binding protein	3.36	5.00E-79
LM4B_RS04820	WP_003722767.1	hypothetical protein	3.36	2.00E-46
LM4B_RS06580	WP_003727499.1	phosphoadenosine phosphosulfate sulfurtransferase	3.35	0
LM4B_RS07670	WP_003726595.1	hypothetical protein	3.35	4.00E-66
LM4B_RS06155	WP_003726938.1	cell division protein ZapA	3.34	1.00E-53

LM4B_RS06355	WP_003727524.1	transcriptional regulator	3.33	4.00E-44
LM4B_RS06570	WP_003726668.1	SAM-dependent methyltransferase	3.32	0
LM4B_RS07535	WP_003722010.1	hypothetical protein	3.32	5.00E-51
LM4B_RS03310	WP_003724385.1	sulfatase	3.32	6.00E-72
LM4B_RS04145	WP_003727142.1	hypothetical protein	3.31	1.00E-44
LM4B_RS13700	WP_012681470.1	gluconate kinase	3.31	3.00E-128
LM4B_RS14305	WP_012681489.1	glycosyl hydrolase family 65	3.31	0
LM4B_RS05220	WP_003730938.1	membrane protein	3.31	0
LM4B_RS10040	WP_003725867.1	DNA polymerase IV	3.31	0
LM4B_RS09735	WP_003726315.1	nucleotide pyrophosphohydrolase	3.30	5.00E-65
LM4B_RS06375	WP_003723884.1	trigger factor	3.29	3.00E-159
LM4B_RS11960	WP_003728411.1	MFS transporter	3.28	1.00E-87
LM4B_RS07335	WP_003742161.1	hypothetical protein	3.28	2.00E-114
LM4B_RS08625	WP_009917514.1	dUTPase	3.27	1.00E-36
LM4B_RS12655	WP_003727898.1	YigZ family protein	3.27	1.00E-151
LM4B_RS07040	WP_003744056.1	hypothetical protein	3.27	3.00E-63
LM4B_RS03795	WP_009928906.1	ABC transporter ATP-binding protein	3.27	2.00E-27
LM4B_RS06405	WP_003727519.1	ribonuclease HII	3.26	1.00E-60

LM4B_RS11490	WP_012681415.1	hypothetical protein	3.26	3.00E-154
LM4B_RS12015	WP_003734932.1	nucleotide-binding domain-containing protein	3.25	3.00E-128
LM4B_RS05420	WP_003734828.1	hypothetical protein	3.24	2.00E-50
LM4B_RS10740	WP_003722363.1	iron transporter FeoA	3.24	3.00E-49
LM4B_RS00860	WP_003725491.1	transition state regulator Abh	3.24	2.00E-31
LM4B_RS00700	WP_003728204.1	inosine 5-monophosphate dehydrogenase	3.24	0
LM4B_RS07455	WP_003726531.1	SAM-dependent methyltransferase	3.23	3.00E-166
LM4B_RS02930	WP_003725468.1	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	3.23	5.00E-92
LM4B_RS04835	WP_003727076.1	AI-2E family transporter	3.23	0
LM4B_RS01935	WP_012681072.1	GntR family transcriptional regulator	3.23	2.00E-51
LM4B_RS13735	WP_003725013.1	tRNA-specific adenosine deaminase	3.23	1.00E-64
LM4B_RS01415	WP_012681043.1	hypothetical protein	3.22	3.00E-09
LM4B_RS12490	WP_003722615.1	HPr kinase/phosphorylase	3.22	2.00E-139
LM4B_RS06795	WP_012681281.1	membrane protein	3.22	0
LM4B_RS06595	WP_003723449.1	UMP kinase	3.21	3.00E-112
LM4B_RS09985	WP_003727987.1	iron ABC transporter	3.20	1.00E-70
LM4B_RS00560	WP_003724936.1	hypothetical protein	3.20	1.00E-85
LM4B_RS11230	WP_003724610.1	peptide ABC transporter permease	3.19	3.00E-61

LM4B_RS11025	WP_003724573.1	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	3.19	2.00E-45
LM4B_RS03460	WP_003724410.1	ABC transporter permease (yadH)	3.19	6.00E-116
LM4B_RS13275	WP_003727692.1	1%2C4-dihydroxy-2-naphthoate polyprenyltransferase	3.19	2.00E-06
LM4B_RS01350	WP_003724186.1	transcriptional regulator	3.18	2.00E-72
LM4B_RS00475	WP_003721714.1	ATP synthase F0 subunit C	3.18	7.00E-30
LM4B_RS01485	WP_003724209.1	GNAT family acetyltransferase	3.18	0.005
LM4B_RS12195	WP_003725611.1	hypothetical protein	3.18	6.00E-84
LM4B_RS00350	WP_003721683.1	hypothetical protein	3.17	6.00E-54
LM4B_RS06160	WP_003726937.1	colicin V biosynthesis protein	3.17	3.00E-114
LM4B_RS06635	WP_003726418.1	ribosome maturation factor	3.17	8.00E-108
LM4B_RS09515	WP_003725819.1	hypothetical protein	3.17	5.00E-139
LM4B_RS01405		hypothetical protein	3.16	1.00E-71
LM4B_RS11340	WP_003723834.1	protein hit	3.15	4.00E-100
LM4B_RS07630	WP_003727402.1	histidine--tRNA ligase	3.15	1.00E-177
LM4B_RS00545	WP_003724933.1	transcriptional regulator	3.14	5.00E-09
LM4B_RS11155	WP_003727852.1	peptidoglycan-binding protein	3.13	0
LM4B_RS04850	WP_003734308.1	membrane protein	3.12	5.00E-86
LM4B_RS12020	WP_003734933.1	hypothetical protein	3.12	0

LM4B_RS06760	WP_003726154.1	general secretion pathway protein	3.11	7.00E-22
LM4B_RS11080	WP_003724582.1	cyclic nucleotide-binding protein	3.09	1.00E-162
LM4B_RS13675	WP_003722067.1	hypothetical protein	3.09	2.00E-28
LM4B_RS11905	WP_003722394.1	DNA mismatch repair protein MutT	3.09	1.00E-93
LM4B_RS09710	WP_003730823.1	thioredoxin	3.08	7.00E-05
LM4B_RS11575	WP_003727813.1	haloacid dehalogenase	3.08	0
LM4B_RS00465	WP_012681010.1	hypothetical protein	3.08	0
LM4B_RS02030	WP_003728130.1	uracil-DNA glycosylase	3.06	3.00E-80
LM4B_RS08030	WP_012681314.1	catabolite control protein A	3.06	5.00E-150
LM4B_RS09080	WP_003740599.1	ABC transporter ATPase	3.06	1.00E-70
LM4B_RS09580	WP_012681359.1	transcriptional regulator MntR	3.05	5.00E-65
LM4B_RS10985	WP_003724568.1	LysR family transcriptional regulator (GBAA_5406)	3.05	1.00E-48
LM4B_RS05915	WP_003719393.1	carboxysome shell protein	3.04	1.00E-31
LM4B_RS07215	WP_003725380.1	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	3.04	3.00E-157
LM4B_RS03145	WP_003724352.1	rhodanese	3.04	4.00E-65
LM4B_RS07035	WP_003721906.1	metallophosphoesterase	3.04	0
LM4B_RS08980	WP_003728227.1	hypothetical protein	3.04	2.00E-83
LM4B_RS03260	WP_010958779.1	SAM-dependent methyltransferase	3.03	3.00E-18

LM4B_RS13280	WP_003726729.1	thiamine biosynthesis protein ApbE	3.03	0
LM4B_RS11735	WP_003725128.1	glucosamine-6-phosphate isomerase	3.02	5.00E-49
LM4B_RS07115	WP_003734585.1	MFS transporter	3.02	0
LM4B_RS10100	WP_003725876.1	2-isopropylmalate synthase	3.02	0
LM4B_RS06920	WP_003727467.1	two-component sensor histidine kinase (arlS, lisK, lmo1378)	3.02	1.00E-81
LM4B_RS11255	WP_003722322.1	Organic hydroperoxide resistance protein 2	3.01	2.00E-88
LM4B_RS12100	WP_003727947.1	permease	3.01	1.00E-163
LM4B_RS11090	WP_003727860.1	hypothetical protein	3.00	6.00E-40
LM4B_RS07485	WP_003730140.1	ribosome biogenesis GTPase YqeH	3.00	0
LM4B_RS13920	WP_012681474.1	acyl esterase	2.98	4.00E-51
LM4B_RS02635	WP_014929401.1	GMP synthase	2.98	1.00E-34
LM4B_RS01145	WP_003728446.1	lysine--tRNA ligase	2.96	0
LM4B_RS10635	WP_012681394.1	aminoglycoside phosphotransferase	2.96	3.00E-48
LM4B_RS11205	WP_003724607.1	competence protein CoiA	2.96	0
LM4B_RS12765	WP_003723470.1	uracil phosphoribosyltransferase	2.96	2.00E-101
LM4B_RS08630	WP_003726281.1	hypothetical protein	2.95	2.00E-53
LM4B_RS11010	WP_003722275.1	hypothetical protein	2.95	1.00E-53
LM4B_RS01310	WP_003726896.1	transcription termination/antitermination protein NusG	2.95	4.00E-76

LM4B_RS05480	WP_003724624.1	hypothetical protein	2.95	0
LM4B_RS07710	WP_012681304.1	prephenate dehydratase	2.95	1.00E-77
LM4B_RS00500	WP_003731586.1	hypothetical protein	2.94	7.00E-05
LM4B_RS07425	WP_003726525.1	elongation factor 4	2.94	0
LM4B_RS12955	WP_003731609.1	hypothetical protein	2.94	0
LM4B_RS08600	WP_003723874.1	membrane protein (lmo1686, ygaE)	2.92	0
LM4B_RS03410	WP_012681151.1	cell wall surface anchor protein	2.92	2.00E-56
LM4B_RS04015	WP_012681174.1	hydrolase	2.91	7.00E-21
LM4B_RS13250	WP_003720948.1	50S ribosomal protein L23	2.91	2.00E-36
LM4B_RS07735	WP_003726867.1	hypothetical protein	2.91	6.00E-70
LM4B_RS02080	WP_012681079.1	GntR family transcriptional regulator	2.91	1.00E-05
LM4B_RS02765	WP_003721327.1	hypothetical protein	2.91	1.00E-55
LM4B_RS03250	WP_003727238.1	haloacid dehalogenase	2.91	6.00E-16
LM4B_RS00005	WP_012680999.1	chromosomal replication initiator protein DnaA	2.91	0
LM4B_RS01305	WP_003726895.1	preprotein translocase subunit SecE	2.91	-
LM4B_RS10700	WP_003724523.1	PTS galactitol transporter subunit IIC	2.90	1.00E-57
LM4B_RS09795	WP_003726516.1	membrane protein	2.89	6.00E-132
LM4B_RS00815	WP_012681022.1	peptidoglycan-binding protein	2.89	0

LM4B_RS01075	WP_009928603.1	hypothetical protein	2.89	1.00E-94
LM4B_RS03480	WP_003721793.1	hypothetical protein	2.89	1.00E-44
LM4B_RS06475	WP_003727509.1	DNA topoisomerase IV subunit A	2.89	0
LM4B_RS01565	WP_003728050.1	transcriptional regulator	2.88	0
LM4B_RS04825	WP_003726341.1	transporter	2.88	1.00E-73
LM4B_RS07680	WP_003723534.1	tRNA guanosine(34) transglycosylase Tgt	2.88	0
LM4B_RS09125	WP_003728425.1	50S ribosomal protein L19	2.87	3.00E-63
LM4B_RS11705	WP_003734801.1	LysR family transcriptional regulator (CHY_0059)	2.87	8.00E-29
LM4B_RS05080	WP_012681208.1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit (clpE)	2.87	0
LM4B_RS03475	WP_003721792.1	membrane protein (lmo0672)	2.86	2.00E-72
LM4B_RS00470	WP_003728367.1	hypothetical protein	2.86	0
LM4B_RS08940	WP_003725530.1	diacylglycerol kinase	2.86	0
LM4B_RS07865	WP_003725693.1	citrate synthase	2.85	7.00E-91
LM4B_RS06145	WP_003724752.1	uracil-DNA glycosylase	2.85	3.00E-97
LM4B_RS13670	WP_003727657.1	DUF3188 domain-containing protein	2.85	3.00E-34
LM4B_RS12695	WP_003723457.1	beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	2.84	5.00E-50
LM4B_RS05895	WP_003724715.1	ethanolamine ammonia-lyase light chain	2.83	2.00E-67
LM4B_RS00730	WP_003726462.1	hypothetical protein	2.83	5.00E-61

LM4B_RS14105	WP_003727617.1	hypothetical protein	2.83	2.00E-64
LM4B_RS08785	WP_003726706.1	helicase	2.82	0
LM4B_RS14205	WP_003725842.1	DUF4918 domain-containing protein	2.82	2.00E-174
LM4B_RS13650	WP_003722062.1	recombination protein RecR	2.81	8.00E-142
LM4B_RS09980	WP_003728777.1	transcriptional repressor	2.81	3.00E-79
LM4B_RS02775	WP_003725440.1	LacI family transcriptional regulator	2.81	3.00E-67
LM4B_RS05295	WP_003725552.1	molybdenum ABC transporter permease	2.81	3.00E-23
LM4B_RS12390	WP_003727916.1	TetR family transcriptional regulator	2.80	1.00E-09
LM4B_RS06270	WP_003726049.1	DNA mismatch repair protein MutT	2.80	3.00E-34
LM4B_RS10570	WP_003731353.1	hypothetical protein	2.80	2.00E-12
LM4B_RS09920	WP_012681371.1	cell wall surface anchor protein	2.80	5.00E-53
LM4B_RS02020	WP_003723100.1	hypothetical protein	2.79	5.00E-70
LM4B_RS00495	WP_003724927.1	ATP synthase subunit beta	2.79	2.00E-149
LM4B_RS03435	WP_003721781.1	hypothetical protein	2.79	3.00E-50
LM4B_RS00760	WP_003726470.1	hypothetical protein	2.79	2.00E-48
LM4B_RS00540	WP_003724932.1	pyruvyl transferase	2.78	0
LM4B_RS07210	WP_012681294.1	aspartate kinase	2.78	1.00E-156
LM4B_RS02245	WP_012681092.1	LysR family transcriptional regulator (VC_1617)	2.78	6.00E-20

LM4B_RS00065	WP_003725626.1	hypothetical protein	2.78	2.00E-15
LM4B_RS00505	WP_003724929.1	hypothetical protein	2.76	9.00E-114
LM4B_RS01545	WP_003728052.1	metal ABC transporter substrate-binding protein	2.76	3.00E-93
LM4B_RS04130	WP_012681176.1	hypothetical protein	2.76	1.00E-84
LM4B_RS05695	WP_012681247.1	hypothetical protein	2.76	9.00E-58
LM4B_RS13830	WP_003734225.1	hypothetical protein	2.75	0
LM4B_RS05345	WP_003731548.1	hypothetical protein	2.75	2.00E-129
LM4B_RS11485	WP_003725924.1	hypothetical protein	2.75	0.006
LM4B_RS07120	WP_012681293.1	pyrophosphatase	2.75	2.00E-132
LM4B_RS03455	WP_012681153.1	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	2.74	7.00E-162
LM4B_RS10090	WP_003723150.1	acetolactate synthase small subunit	2.74	3.00E-66
LM4B_RS08210	WP_003726651.1	hypothetical protein	2.74	5.00E-100
LM4B_RS12425	WP_003734496.1	cell surface protein	2.74	0
LM4B_RS13000	WP_003726482.1	DNA-directed RNA polymerase subunit delta	2.74	0
LM4B_RS05120	WP_003726551.1	oxidoreductase	2.73	2.00E-84
LM4B_RS06945	WP_012681285.1	type 2 isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	2.73	3.00E-51
LM4B_RS07355	WP_003726015.1	endoribonuclease YbeY	2.73	7.00E-112
LM4B_RS08460	WP_012681328.1	MFS transporter	2.73	2.00E-104

LM4B_RS04225	WP_003724766.1	diguanylate phosphodiesterase	2.73	0
LM4B_RS12755	WP_003727889.1	hypothetical protein	2.73	-
LM4B_RS13075	WP_012681458.1	DUF4969 domain-containing protein	2.72	1.00E-150
LM4B_RS10520	WP_003726498.1	hypothetical protein	2.72	2.00E-143
LM4B_RS00050	WP_003727571.1	mevalonate kinase	2.72	0
LM4B_RS01120	WP_003725748.1	cysteine synthase A	2.72	3.00E-147
LM4B_RS05400	WP_003725570.1	hypothetical protein	2.71	5.00E-149
LM4B_RS11335	WP_003726247.1	ABC transporter ATP-binding protein	2.71	4.00E-113
LM4B_RS12645	WP_003726227.1	hypothetical protein	2.70	0
LM4B_RS11910	WP_010959034.1	general stress protein	2.70	1.00E-77
LM4B_RS01495	WP_003724211.1	competence protein ComEC	2.70	0
LM4B_RS11495	WP_003730861.1	glyoxal reductase	2.70	6.00E-92
LM4B_RS00850	WP_003725489.1	hypothetical protein	2.70	2.00E-59
LM4B_RS14390	WP_003725797.1	sugar transporter	2.70	5.00E-16
LM4B_RS10530	WP_003723946.1	hypothetical protein	2.70	8.00E-39
LM4B_RS11350	WP_003727836.1	membrane protein	2.69	8.00E-113
LM4B_RS08345	WP_003727332.1	RpiR family transcriptional regulator	2.69	1.00E-34
LM4B_RS13665	WP_003722065.1	hypothetical protein	2.69	3.00E-89

LM4B_RS08035	WP_003727368.1	bifunctional 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase/chorismate mutase	2.69	8.00E-177
LM4B_RS02590	WP_003725713.1	sugar isomerase	2.68	3.00E-39
LM4B_RS06230	WP_012681266.1	cell wall surface anchor protein	2.68	0
LM4B_RS12760	WP_003727888.1	UDP-N-acetyl glucosamine 2-epimerase	2.68	7.00E-179
LM4B_RS01385	WP_003723045.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	2.67	0
LM4B_RS04090	WP_012681175.1	spermidine/putrescine ABC transporter permease	2.67	7.00E-49
LM4B_RS00075	WP_003725628.1	autolysin	2.67	4.00E-38
LM4B_RS10350	WP_003728337.1	TetR family transcriptional regulator	2.67	0.001
LM4B_RS09800	WP_003726517.1	hypothetical protein	2.67	2.00E-129
LM4B_RS04475	WP_012681192.1	hypothetical protein	2.67	3.00E-109
LM4B_RS03510	WP_003721799.1	flagellar biosynthesis protein FlhB	2.67	0
LM4B_RS08160	WP_003727352.1	cell division protein	2.67	1.00E-134
LM4B_RS07775	WP_003725676.1	hypothetical protein	2.67	2.00E-155
LM4B_RS12690	WP_003727895.1	single-strand-binding protein	2.67	6.00E-29
LM4B_RS13935	WP_003722118.1	IMP dehydrogenase	2.66	0
LM4B_RS13770	WP_003725020.1	MarR family transcriptional regulator	2.66	3.00E-22
LM4B_RS06590	WP_003727498.1	hypothetical protein	2.66	2.00E-89
LM4B_RS11235	WP_003724611.1	peptide ABC transporter permease	2.65	2.00E-76

LM4B_RS12870	WP_003728401.1	DNA-directed RNA polymerase subunit delta	2.65	-
LM4B_RS03285	WP_003724380.1	transcriptional regulator	2.64	0.001
LM4B_RS00780	WP_012681018.1	peptide ABC transporter substrate-binding protein	2.64	2.00E-137
LM4B_RS05660	WP_012681241.1	ABC transporter ATP-binding protein	2.63	3.00E-56
LM4B_RS14150	WP_012681483.1	ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	2.62	3.00E-159
LM4B_RS08720	WP_003728253.1	flavodoxin	2.62	6.00E-12
LM4B_RS12170	WP_012681438.1	two-component sensor histidine kinase (vanS)	2.62	1.00E-78
LM4B_RS08695	WP_003726638.1	deoxyadenosine kinase	2.61	5.00E-41
LM4B_RS00550	WP_003742434.1	hypothetical protein	2.61	4.00E-61
LM4B_RS10280	WP_003725771.1	cysteine desulfurase	2.61	1.00E-97
LM4B_RS14325	WP_003764660.1	sugar ABC transporter permease	2.61	1.00E-154
LM4B_RS00825	WP_003725484.1	sulfate transporter	2.60	0
LM4B_RS04585	WP_003721468.1	hypothetical protein	2.59	1.00E-75
LM4B_RS03875	WP_003724483.1	lipoate--protein ligase A	2.59	1.00E-122
LM4B_RS14320	WP_003727584.1	alcohol dehydrogenase	2.59	0
LM4B_RS05190	WP_003730937.1	DNA-binding protein	2.58	0
LM4B_RS04845	WP_003726345.1	hypothetical protein	2.58	0
LM4B_RS07360	WP_003726016.1	HDIG domain-containing protein	2.58	0

LM4B_RS01540	WP_012681049.1	methionine ABC transporter ATP-binding protein	2.57	5.00E-114
LM4B_RS08305	WP_003726262.1	antibiotic resistance protein VanZ	2.57	3.00E-119
LM4B_RS01500	WP_003731066.1	haloacid dehalogenase	2.56	4.00E-36
LM4B_RS01065	WP_003725738.1	peptidyl-tRNA hydrolase	2.56	3.00E-75
LM4B_RS02970	WP_003726767.1	6-phospho-beta-glucosidase	2.55	2.00E-85
LM4B_RS10075	WP_003734410.1	GNAT family acetyltransferase	2.55	2.00E-126
LM4B_RS02355	WP_003728097.1	membrane protein	2.55	1.00E-144
LM4B_RS11085	WP_003740772.1	cyclic nucleotide-binding protein	2.55	2.00E-160
LM4B_RS00810	WP_012681021.1	sugar phosphate phosphatase (Imo0158)	2.55	1.00E-78
LM4B_RS03185	WP_003724360.1	DUF5067 domain-containing protein	2.54	2.00E-89
LM4B_RS06385	WP_003726393.1	signal peptidase I	2.54	6.00E-27
LM4B_RS07410	WP_012681297.1	coproporphyrinogen III oxidase	2.53	1.00E-126
LM4B_RS04005	WP_003731239.1	aminoacyl-tRNA deacylase	2.53	4.00E-109
LM4B_RS05150	WP_003727042.1	2%2C3%2C4%2C5-tetrahydropyridine-2%2C6-dicarboxylate N-acetyltransferase	2.52	1.00E-91
LM4B_RS01480	WP_003724208.1	sugar phosphate phosphatase	2.52	2.00E-102
LM4B_RS13415	WP_012681462.1	GNAT family acetyltransferase	2.52	2.00E-42
LM4B_RS06605	WP_003727497.1	isoprenyl transferase	2.51	1.00E-100
LM4B_RS08960	WP_003728229.1	hypothetical protein	2.51	0

LM4B_RS08375	WP_003723256.1	membrane protein (lmo1665)	2.51	1.00E-53
LM4B_RS06955	WP_003727465.1	membrane protein (lmo1385)	2.51	2.00E-175
LM4B_RS12410	WP_012681449.1	chitinase and chitin-binding protein	2.51	0
LM4B_RS09600	WP_012681360.1	30S ribosomal protein S14	2.51	9.00E-26
LM4B_RS05690	WP_012681246.1	hypothetical protein	2.51	4.00E-106
LM4B_RS02805	WP_003725445.1	ABC transporter substrate-binding protein	2.50	2.00E-19
LM4B_RS07200	WP_003725377.1	ribonuclease J	2.50	0
LM4B_RS10045	WP_003725868.1	oxidoreductase	2.50	4.00E-74
LM4B_RS02015	WP_003724312.1	hypothetical protein	2.50	3.00E-87
LM4B_RS08915	WP_003725525.1	hypothetical protein	2.50	1.00E-115
LM4B_RS03135	WP_003724350.1	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	2.49	8.00E-165
LM4B_RS10755	WP_003724532.1	ser/threonine protein phosphatase	2.49	0
LM4B_RS12950	WP_043993240.1	hydrolase	2.49	5.00E-19
LM4B_RS13235	WP_003727697.1	50S ribosomal protein L22	2.49	1.00E-60
LM4B_RS12160	WP_003725604.1	methionine import ATP-binding protein MetN 2	2.48	3.00E-151
LM4B_RS08900	WP_003722222.1	DNA-binding response regulator	2.48	3.00E-70
LM4B_RS12475	WP_003725413.1	acetyltransferase	2.48	4.00E-47
LM4B_RS14050	WP_003722138.1	GTP-binding protein YchF	2.48	0

LM4B_RS06390	WP_003726394.1	signal peptidase I	2.47	5.00E-20
LM4B_RS07275	WP_012681296.1	endonuclease	2.47	7.00E-166
LM4B_RS05910	WP_012681255.1	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)	2.47	5.00E-119
LM4B_RS02500	WP_012681112.1	hypothetical protein	2.47	0
LM4B_RS07490	WP_003722000.1	haloacid dehalogenase	2.47	5.00E-109
LM4B_RS01990	WP_003728136.1	DeoR family transcriptional regulator	2.47	9.00E-31
LM4B_RS02525	WP_003725701.1	LysR family transcriptional regulator (gltC)	2.47	7.00E-37
LM4B_RS04420	WP_003727117.1	MarR family transcriptional regulator	2.47	1.00E-67
LM4B_RS05185	WP_003726433.1	copper homeostasis protein CutC	2.47	3.00E-161
LM4B_RS02455	WP_012681109.1	HD domain-containing protein	2.46	0
LM4B_RS08875	WP_003728237.1	amino acid ABC transporter permease	2.46	1.00E-35
LM4B_RS08285	WP_012681322.1	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	2.45	0
LM4B_RS09465	WP_003725812.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (yodJ)	2.45	5.00E-62
LM4B_RS06485	WP_009917681.1	internalin	2.45	0
LM4B_RS03950	WP_003721896.1	hypothetical protein	2.45	3.00E-106
LM4B_RS07810	WP_003725683.1	hydroxymethylbilane synthase	2.44	4.00E-108
LM4B_RS09180	WP_003728420.1	hypothetical protein	2.44	0
LM4B_RS02210	WP_012681089.1	hydrolase	2.44	6.00E-55

LM4B_RS10445	WP_012681388.1	2-dehydropantoate 2-reductase	2.44	8.00E-47
LM4B_RS09400	WP_003726600.1	sulfate transporter	2.43	8.00E-179
LM4B_RS12155	WP_003725603.1	ABC transporter permease (GBAA_5221)	2.43	9.00E-53
LM4B_RS09995	WP_012681372.1	hypothetical protein	2.43	4.00E-48
LM4B_RS03255	WP_003724376.1	Rrf2 family transcriptional regulator	2.43	2.00E-94
LM4B_RS08165	WP_003726796.1	membrane protein	2.43	2.00E-92
LM4B_RS14140	WP_012582275.1	oxidoreductase	2.42	1.00E-33
LM4B_RS00180		hypothetical protein	2.42	1.00E-106
LM4B_RS05115	WP_003726550.1	membrane protein	2.42	5.00E-177
LM4B_RS10345	WP_012681383.1	SAM-dependent methyltransferase	2.42	8.00E-167
LM4B_RS12460	WP_003725411.1	UDP-glucose 4-epimerase GalE	2.42	2.00E-149
LM4B_RS13145	WP_003720928.1	50S ribosomal protein L36	2.42	3.00E-20
LM4B_RS10660	WP_003724516.1	TetR family transcriptional regulator	2.42	6.00E-28
LM4B_RS01225	WP_003726421.1	hypothetical protein (ctsR)	2.42	1.00E-37
LM4B_RS00480	WP_014928998.1	hypothetical protein	2.41	-
LM4B_RS13020		tRNA-Asn	2.41	-
LM4B_RS06180	WP_003726544.1	UvrABC system protein C	2.41	0
LM4B_RS07530	WP_003727417.1	alkaline phosphatase	2.41	8.00E-152

LM4B_RS11290	WP_012681409.1	chaperone protein ClpB	2.40	0
LM4B_RS06835	WP_003727476.1	exodeoxyribonuclease 7 large subunit	2.40	2.00E-119
LM4B_RS07365	WP_003726017.1	phosphate starvation protein PhoH	2.39	0
LM4B_RS11110	WP_003724587.1	MFS transporter	2.39	8.00E-31
LM4B_RS02135	WP_012681085.1	hypothetical protein	2.39	3.00E-28
LM4B_RS00185	WP_012681001.1	hypothetical protein	2.38	2.00E-149
LM4B_RS13885	WP_003727636.1	glutamine amidotransferase	2.38	3.00E-58
LM4B_RS04010	WP_003726294.1	DUF5105 domain-containing protein	2.38	5.00E-116
LM4B_RS06600	WP_003723450.1	ribosome recycling factor	2.37	3.00E-58
LM4B_RS02850	WP_003727280.1	cell surface protein	2.37	1.00E-67
LM4B_RS10275	WP_003727955.1	transcriptional regulator	2.36	2.00E-117
LM4B_RS04795	WP_012681200.1	hypothetical protein	2.35	0
LM4B_RS06225	WP_003726038.1	hypothetical protein	2.35	5.00E-84
LM4B_RS02260	WP_003725159.1	hypothetical protein	2.35	6.00E-98
LM4B_RS04140	WP_003727143.1	hypothetical protein	2.34	2.00E-99
LM4B_RS11145	WP_012681404.1	cell surface protein	2.34	0
LM4B_RS14345	WP_003725790.1	LacI family transcriptional regulator	2.34	4.00E-135
LM4B_RS13985	WP_003725319.1	permease	2.34	0

LM4B_RS07560	WP_003725980.1	macrolide ABC transporter permease	2.34	2.00E-04
LM4B_RS02645	WP_003725724.1	MarR family transcriptional regulator	2.33	1.00E-37
LM4B_RS03790	WP_003724467.1	GntR family transcriptional regulator (yhcF)	2.33	2.00E-25
LM4B_RS12060	WP_012681434.1	cell wall anchor	2.33	0
LM4B_RS00080	WP_003734189.1	autolysin	2.33	1.00E-16
LM4B_RS07100	WP_012681291.1	3-ketoacyl-CoA thiolase	2.32	8.00E-140
LM4B_RS00870	WP_003725492.1	hypothetical protein	2.32	0
LM4B_RS07270	WP_003727434.1	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	2.32	1.00E-49
LM4B_RS02270	WP_003734612.1	hypothetical protein	2.32	8.00E-113
LM4B_RS10140	WP_003724140.1	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase	2.32	2.00E-71
LM4B_RS00855	WP_031287402.1	rRNA (cytidine-2'-O-)-methyltransferase	2.31	4.00E-112
LM4B_RS00600	WP_003724944.1	cAMP-binding protein	2.31	3.00E-132
LM4B_RS07505	WP_003734326.1	hypothetical protein (lmo1495)	2.31	6.00E-100
LM4B_RS13645	WP_003725002.1	hypothetical protein	2.31	9.00E-40
LM4B_RS04165	WP_003726372.1	GNAT family acetyltransferase	2.31	2.00E-18
LM4B_RS07190	WP_003725375.1	hypothetical protein	2.31	4.00E-125
LM4B_RS11670	WP_003725115.1	hypothetical protein	2.31	0
LM4B_RS06765	WP_003726155.1	general secretion pathway protein GspE	2.30	4.00E-47

LM4B_RS14180	WP_003734207.1	hypothetical protein	2.30	1.00E-41
LM4B_RS06840	WP_003722489.1	exodeoxyribonuclease 7 small subunit	2.30	2.00E-14
LM4B_RS11380	WP_003727831.1	hypothetical protein	2.29	0
LM4B_RS05510	WP_003734750.1	hypothetical protein	2.29	2.00E-87
LM4B_RS01920	WP_012681071.1	NUDIX hydrolase	2.29	3.00E-21
LM4B_RS11420	WP_003727828.1	membrane protein	2.29	0
LM4B_RS12515	WP_003725420.1	excinuclease ABC subunit A	2.29	0
LM4B_RS08920	WP_003725526.1	shikimate kinase	2.29	1.00E-30
LM4B_RS03105	WP_012681140.1	cell surface protein	2.29	0
LM4B_RS00485	WP_003728365.1	ATP synthase subunit alpha 1	2.29	2.00E-130
LM4B_RS07205	WP_003725378.1	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	2.29	2.00E-100
LM4B_RS10605	WP_003724506.1	tRNA threonylcarbamoyladenine biosynthesis protein TsaE	2.28	2.00E-105
LM4B_RS01535	WP_003722903.1	ABC transporter permease (Imo0283)	2.28	1.00E-45
LM4B_RS00340	WP_012681005.1	type VII secretion protein EsaA	2.28	0
LM4B_RS01880	WP_003724292.1	hypothetical protein	2.28	6.00E-45
LM4B_RS08660	WP_003734658.1	alanine acetyltransferase	2.27	2.00E-25
LM4B_RS12795	WP_003726352.1	thymidine kinase	2.27	6.00E-61
LM4B_RS09165	WP_003731780.1	gamma-glutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase	2.27	3.00E-174

LM4B_RS14240	WP_003727598.1	AraC family transcriptional regulator	2.27	1.00E-09
LM4B_RS00885	WP_009928092.1	methionine--tRNA ligase	2.27	0
LM4B_RS11440	WP_003727826.1	shikimate 5-dehydrogenase	2.27	7.00E-74
LM4B_RS10430	WP_045135943.1	MFS transporter	2.27	0
LM4B_RS10025	WP_003725864.1	ADP-ribose pyrophosphatase	2.27	7.00E-69
LM4B_RS14220	WP_003734203.1	MFS transporter	2.26	1.00E-22
LM4B_RS14415	WP_003723727.1	ribonuclease P protein component	2.26	1.00E-42
LM4B_RS12185	WP_003725609.1	thiol reductase thioredoxin	2.26	2.00E-07
LM4B_RS02085	WP_014952531.1	membrane protein	2.26	7.00E-137
LM4B_RS00970	WP_003722723.1	peptide ABC transporter ATP-binding protein (lmo0194)	2.26	5.00E-83
LM4B_RS09750	WP_012681366.1	hypothetical protein	2.26	0
LM4B_RS04000	WP_012681173.1	phenazine biosynthesis protein PhzF	2.26	4.00E-152
LM4B_RS04270	WP_012681184.1	cell wall surface anchor protein	2.26	1.00E-68
LM4B_RS06730	WP_012681279.1	hypothetical protein	2.26	0
LM4B_RS10995	WP_003724570.1	membrane protein	2.25	4.00E-128
LM4B_RS10065	WP_003727979.1	hypothetical protein	2.24	-
LM4B_RS12085	WP_012681435.1	haloacid dehalogenase	2.24	1.00E-108
LM4B_RS11295	WP_003726240.1	membrane protein	2.24	3.00E-76

LM4B_RS02995	WP_003727267.1	hypothetical protein	2.24	3.00E-53
LM4B_RS04515	WP_003721457.1	anti-sigma factor B antagonist (rsbS)	2.24	7.00E-43
LM4B_RS06755	WP_003727484.1	competence protein ComG	2.24	-
LM4B_RS09305	WP_010958956.1	methionyl-tRNA formyltransferase	2.23	1.00E-106
LM4B_RS12820	WP_003734485.1	cell wall teichoic acid glycosylation protein gtcA	2.23	1.00E-103
LM4B_RS07565	WP_003725981.1	DNA-binding response regulator	2.23	1.00E-59
LM4B_RS06700	WP_003740295.1	hypothetical protein	2.23	1.00E-66
LM4B_RS11730	WP_003727724.1	membrane protein	2.23	9.00E-94
LM4B_RS01505	WP_012681047.1	oxidoreductase	2.23	2.00E-38
LM4B_RS08220	WP_003726653.1	ABC transporter permease	2.23	0
LM4B_RS03130	WP_003724169.1	MarR family transcriptional regulator	2.23	3.00E-12
LM4B_RS12520	WP_003725421.1	UvrABC system protein B	2.23	0
LM4B_RS02200	WP_003722968.1	phage repressor protein	2.23	2.00E-67
LM4B_RS04035	WP_003727154.1	polyisoprenoid-binding protein	2.23	2.00E-123
LM4B_RS09905	WP_003734414.1	ATP-dependent DNA helicase (recQ)	2.22	5.00E-114
LM4B_RS10410	WP_003728331.1	penicillin-binding protein 2B	2.22	0
LM4B_RS04760		tRNA-Gly	2.22	-
LM4B_RS05255	WP_003727033.1	transketolase	2.22	2.00E-76

LM4B_RS01710	WP_014654173.1	hypothetical protein	2.20	0
LM4B_RS05950	WP_003724722.1	ethanolamine utilization protein EutQ	2.20	9.00E-101
LM4B_RS05375	WP_003725567.1	hypothetical protein	2.20	5.00E-71
LM4B_RS00875	WP_010958682.1	peptidoglycan-binding protein	2.19	1.00E-20
LM4B_RS08655	WP_003734659.1	cation diffusion facilitator transporter	2.19	6.00E-15
LM4B_RS13260	WP_003726733.1	50S ribosomal protein L3	2.19	3.00E-120
LM4B_RS04275	WP_003724774.1	hypothetical protein	2.19	3.00E-13
LM4B_RS06610	WP_003727496.1	phosphatidate cytidylyltransferase	2.19	2.00E-42
LM4B_RS13655	WP_003722063.1	hypothetical protein	2.18	3.00E-48
LM4B_RS14160	WP_012681484.1	hypothetical protein	2.18	3.00E-83
LM4B_RS10110	WP_003725878.1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	2.18	0
LM4B_RS10145	WP_003727973.1	DNA-directed RNA polymerase sigma-70 factor	2.18	2.00E-130
LM4B_RS08300	WP_003726261.1	hypothetical protein	2.18	2.00E-117
LM4B_RS00105	WP_003727566.1	capsular polysaccharide biosynthesis protein	2.18	0
LM4B_RS10070	WP_003727978.1	hypothetical protein	2.18	1.00E-112
LM4B_RS05540	WP_003724636.1	GMP synthetase (guaA, lmo1096)	2.18	0
LM4B_RS01465	WP_003734543.1	hypothetical protein	2.18	0
LM4B_RS12455	WP_003731210.1	galactose mutarotase	2.17	2.00E-66

LM4B_RS03110	WP_003726747.1	GNAT family acetyltransferase	2.17	2.00E-37
LM4B_RS01875	WP_003724291.1	D-beta-hydroxybutyrate permease	2.17	4.00E-26
LM4B_RS07615	WP_012681302.1	nitrogen regulatory PII	2.17	1.00E-25
LM4B_RS08095	WP_003723577.1	hypothetical protein	2.17	3.00E-62
LM4B_RS13285	WP_003727691.1	FMN-binding domain-containing protein	2.17	1.00E-178
LM4B_RS11535	WP_003723655.1	membrane protein (lmo2255)	2.16	1.00E-41
LM4B_RS06470	WP_003727510.1	DNA topoisomerase IV subunit B	2.16	0
LM4B_RS12700	WP_012681450.1	rod shape-determining protein	2.16	0
LM4B_RS14030	WP_003725327.1	bacteriocin	2.15	4.00E-91
LM4B_RS02215	WP_003725150.1	sugar transporter	2.15	6.00E-165
LM4B_RS01560	WP_003724222.1	PAS domain-containing sensor histidine kinase	2.15	0
LM4B_RS10610	WP_012681393.1	hypothetical protein	2.15	0
LM4B_RS11515	WP_003726784.1	peptide ABC transporter ATP-binding protein	2.15	8.00E-106
LM4B_RS01590	WP_003724226.1	LysR family transcriptional regulator (czcR)	2.15	3.00E-23
LM4B_RS10415	WP_003723754.1	cell division protein FtsL	2.14	2.00E-65
LM4B_RS13630	WP_003734234.1	haloacid dehalogenase	2.14	1.00E-49
LM4B_RS07000	WP_003727459.1	3-ketoacyl-ACP reductase	2.14	3.00E-60
LM4B_RS01575	WP_003722911.1	metallo-hydrolase	2.14	2.00E-123

LM4B_RS09635	WP_003722998.1	cell cycle protein GpsB	2.14	1.00E-58
LM4B_RS02595	WP_003721289.1	PTS sugar transporter subunit IIA	2.14	7.00E-12
LM4B_RS07555	WP_003725979.1	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	2.14	4.00E-41
LM4B_RS09495	WP_003728281.1	hypothetical protein	2.13	1.00E-143
LM4B_RS09975	WP_003725943.1	tyrosine recombinase XerD	2.13	1.00E-89
LM4B_RS13070	WP_012681457.1	hypothetical protein	2.13	2.00E-30
LM4B_RS09155	WP_012681345.1	ribosome maturation factor RimM	2.13	4.00E-118
LM4B_RS10105	WP_003730810.1	3-isopropylmalate dehydrogenase	2.13	4.00E-146
LM4B_RS09825	WP_003726522.1	chorismate mutase	2.13	7.00E-30
LM4B_RS06925	WP_003722505.1	OxaA precursor	2.12	1.00E-152
LM4B_RS04490	WP_003721452.1	holo-ACP synthase	2.12	2.00E-27
LM4B_RS11700	WP_003727730.1	FMN reductase (NADPH)	2.12	3.00E-102
LM4B_RS02155	WP_003724338.1	hypothetical protein	2.12	4.00E-84
LM4B_RS10095	WP_003727977.1	ketol-acid reductoisomerase	2.11	8.00E-169
LM4B_RS12295	WP_003726173.1	hypothetical protein	2.11	0
LM4B_RS02845	WP_012681128.1	hypothetical protein	2.11	0
LM4B_RS02900	WP_003725462.1	glutamate dehydrogenase	2.11	0
LM4B_RS03125	WP_003727255.1	MATE family efflux transporter	2.11	0

LM4B_RS06290	WP_003726053.1	hypothetical protein	2.11	5.00E-24
LM4B_RS04105	WP_003730081.1	carbonic anhydrase	2.11	4.00E-177
LM4B_RS02350	WP_003721237.1	membrane protein (lmo0449)	2.10	5.00E-173
LM4B_RS01250	WP_003726425.1	hypothetical protein	2.10	0
LM4B_RS11525	WP_003727817.1	haloacid dehalogenase	2.10	1.00E-43
LM4B_RS01235	WP_003726423.1	protein arginine kinase (mcsB, lmo0232)	2.10	3.00E-115
LM4B_RS06515	WP_003726659.1	GTPase HflX	2.09	0
LM4B_RS06940	WP_012681284.1	hypothetical protein	2.09	5.00E-61
LM4B_RS11075	WP_003724581.1	AraC family transcriptional regulator	2.09	4.00E-20
LM4B_RS14090	WP_003730728.1	chromosome partitioning protein ParB	2.09	2.00E-98
LM4B_RS02380	WP_003740428.1	hypothetical protein	2.08	0
LM4B_RS05450	WP_003726883.1	teichoic acids export ATP-binding protein TagH	2.08	4.00E-114
LM4B_RS05215	WP_012681211.1	membrane protein	2.08	0
LM4B_RS05300	WP_003725553.1	molybdate ABC transporter substrate-binding protein	2.08	6.00E-39
LM4B_RS08435	WP_003723268.1	1%2C4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase	2.08	2.00E-19
LM4B_RS04970	WP_012681204.1	ribose-5-phosphate isomerase	2.08	5.00E-65
LM4B_RS07780	WP_003725677.1	type IV leader peptidase	2.08	5.00E-06
LM4B_RS03040	WP_003725898.1	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	2.08	9.00E-96

LM4B_RS01295	WP_003728080.1	RNA polymerase factor sigma-70 (sigH, Imp0243)	2.08	4.00E-61
LM4B_RS06540	WP_003726565.1	GNAT family acetyltransferase	2.08	1.00E-39
LM4B_RS01955	WP_003724301.1	hypothetical protein	2.08	1.00E-39
LM4B_RS12855	WP_003727871.1	diacylglycerol kinase	2.08	0
LM4B_RS06210	WP_003726034.1	phosphodiesterase	2.07	1.00E-48
LM4B_RS14250	WP_003727596.1	hypothetical protein	2.07	9.00E-58
LM4B_RS02620	WP_003725719.1	PTS galactitol transporter subunit IIC	2.07	3.00E-81
LM4B_RS09640	WP_003726811.1	hypothetical protein	2.07	8.00E-129
LM4B_RS08620	WP_003728262.1	membrane protein	2.06	0
LM4B_RS08925	WP_003725527.1	hypothetical protein	2.06	2.00E-132
LM4B_RS09310	WP_012681350.1	primosomal protein N'	2.06	0
LM4B_RS05035	WP_012681206.1	peptide chain release factor 3	2.06	3.00E-150
LM4B_RS10455	WP_009917664.1	DNA-binding protein	2.06	2.00E-119
LM4B_RS06660	WP_003726538.1	hypothetical protein	2.06	5.00E-58
LM4B_RS12095	WP_012681436.1	ser/threonine protein phosphatase	2.05	2.00E-21
LM4B_RS11265	WP_003727843.1	beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	2.05	0
LM4B_RS05350	WP_003725563.1	peptide deformylase	2.05	6.00E-75
LM4B_RS08395	WP_003726085.1	nucleoside triphosphatase YtkD	2.05	2.00E-24

LM4B_RS00715	WP_003724033.1	peptide ABC transporter substrate-binding protein	2.05	8.00E-54
LM4B_RS03280		hypothetical protein	2.04	-
LM4B_RS10890		tRNA-Thr	2.04	-
LM4B_RS02495	WP_003740440.1	hypothetical protein	2.04	1.00E-36
LM4B_RS12830	WP_003734483.1	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	2.04	0
LM4B_RS14155	WP_003725834.1	hypothetical protein	2.03	7.00E-58
LM4B_RS07520	WP_003725974.1	O-methyltransferase	2.03	1.00E-57
LM4B_RS01625	WP_003724232.1	PTS sugar transporter subunit IIA	2.03	0.013
LM4B_RS05160	WP_003740536.1	mechanosensitive ion channel protein	2.03	0
LM4B_RS06150	WP_003726939.1	ribonuclease HIII	2.03	1.00E-106
LM4B_RS13245	WP_003727696.1	50S ribosomal protein L2	2.03	2.00E-174
LM4B_RS12000	WP_003725580.1	thioesterase	2.03	2.00E-40
LM4B_RS09505	WP_003725818.1	hypothetical protein	2.03	0
LM4B_RS11955	WP_003726864.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2.03	3.00E-45
LM4B_RS06915	WP_003719652.1	DNA-binding response regulator	2.02	2.00E-81
LM4B_RS04220	WP_012681179.1	transcriptional regulator	2.02	-
LM4B_RS14255	WP_003727595.1	hypothetical protein	2.02	0
LM4B_RS14045	WP_012681479.1	hypothetical protein	2.02	-

LM4B_RS04280	WP_003724775.1	reactive intermediate/imine deaminase	2.01	2.00E-34
LM4B_RS04485	WP_003724814.1	protoporphyrinogen oxidase	2.01	1.00E-112
LM4B_RS10930	WP_003722259.1	PTS fructose subfamily%2C IIC component subfamily	2.01	8.00E-61
LM4B_RS07600	WP_012681301.1	recombinase RarA	2.01	0
LM4B_RS08750	WP_003726625.1	methyltransferase	2.01	5.00E-143
LM4B_RS10085	WP_012681373.1	acetolactate synthase%2C large subunit%2C biosynthetic type	2.01	0
LM4B_RS05495	WP_010958842.1	ribitol-5-phosphate dehydrogenase	2.01	2.00E-17
LM4B_RS09755	WP_003726318.1	diguanylate cyclase	2.01	0
LM4B_RS09950	WP_003725939.1	SMC-Scp complex subunit ScpB	2.01	3.00E-53
LM4B_RS10475	WP_003728323.1	phosphopantetheine adenylyltransferase	2.01	6.00E-55
LM4B_RS02315	WP_023546353.1	Listeria nuclear targeted protein A	2.00	6.00E-121
LM4B_RS04300	WP_003724779.1	peptide ABC transporter ATP-binding protein (lmo0848)	2.00	2.00E-105
LM4B_RS12150	WP_003725602.1	methionine ABC transporter substrate-binding protein	2.00	0
LM4B_RS05395	WP_003722692.1	transporter	2.00	2.00E-112
LM4B_RS06825	WP_003722486.1	N utilization substance protein B	2.00	9.00E-24
LM4B_RS04175	WP_003726374.1	dipicolinate synthase	2.00	3.00E-22
LM4B_RS12210	WP_012681440.1	iron ABC transporter ATP-binding protein	-2.00	6.00E-70
LM4B_RS13180	WP_003739848.1	50S ribosomal protein L18	-2.01	3.00E-55

LM4B_RS00205	WP_003730694.1	LacI family transcriptional regulator	-2.01	9.00E-46
LM4B_RS09290	WP_003725653.1	serine/threonine protein kinase	-2.01	0
LM4B_RS14275	WP_003734200.1	MarR family transcriptional regulator	-2.02	3.00E-08
LM4B_RS10875	WP_003724552.1	hypothetical protein	-2.02	2.00E-38
LM4B_RS13170	WP_003720933.1	50S ribosomal protein L30	-2.03	8.00E-21
LM4B_RS06710	WP_003726146.1	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	-2.03	1.00E-30
LM4B_RS12565	WP_003725428.1	phosphate ABC transporter permease subunit PstC	-2.03	2.00E-86
LM4B_RS11150	WP_012681405.1	cell surface protein	-2.04	0
LM4B_RS11635	WP_012681420.1	aminopeptidase C	-2.04	3.00E-114
LM4B_RS03010	WP_003743672.1	peptidoglycan-binding protein LysM	-2.04	1.00E-131
LM4B_RS01610	WP_003724230.1	PTS lactose transporter subunit IIC	-2.04	3.00E-68
LM4B_RS01945	WP_012681074.1	PTS cellobiose transporter subunit IIC	-2.04	2.00E-64
LM4B_RS11930	WP_014929787.1	PTS sugar transporter subunit IIB	-2.06	7.00E-24
LM4B_RS08730	WP_003728251.1	MFS transporter	-2.06	2.00E-40
LM4B_RS09010	WP_003726210.1	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	-2.06	7.00E-152
LM4B_RS09610	WP_003724078.1	xanthine permease	-2.07	3.00E-108
LM4B_RS02955	WP_003727270.1	methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase	-2.07	1.00E-16
LM4B_RS05305	WP_012681216.1	molybdopterin molybdenumtransferase MoeA	-2.07	6.00E-70

LM4B_RS01510	WP_003724214.1	sugar ABC transporter ATP-binding protein	-2.08	3.00E-170
LM4B_RS06440	WP_003726695.1	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY	-2.08	2.00E-129
LM4B_RS10035	WP_003725866.1	tellurite resistance protein TelA	-2.08	0
LM4B_RS03070	WP_009928426.1	homoserine O-acetyltransferase	-2.08	2.00E-116
LM4B_RS11795	WP_003733650.1	transcriptional regulator	-2.09	-
LM4B_RS07575	WP_003727413.1	hypothetical protein	-2.09	0
LM4B_RS08010	WP_003762477.1	30S ribosomal protein S4	-2.09	4.00E-95
LM4B_RS03300	WP_003724383.1	membrane protein	-2.09	1.00E-148
LM4B_RS08495		tRNA-Phe	-2.10	-
LM4B_RS09005	WP_003731569.1	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	-2.10	8.00E-55
LM4B_RS11835		tRNA-Phe	-2.11	-
LM4B_RS12165	WP_003725605.1	hypothetical protein	-2.11	1.00E-35
LM4B_RS08810	WP_003726708.1	LacI family transcriptional regulator	-2.11	1.00E-40
LM4B_RS05780	WP_012681251.1	propanediol dehydratase large subunit	-2.11	-
LM4B_RS09285	WP_003728298.1	ribosome small subunit-dependent GTPase A	-2.12	0
LM4B_RS03350	WP_012681146.1	GNAT family acetyltransferase	-2.12	4.00E-16
LM4B_RS05840	WP_003724705.1	aldehyde dehydrogenase	-2.12	5.00E-115
LM4B_RS12120	WP_003722438.1	Fe-S cluster assembly protein SufB	-2.12	0

LM4B_RS00590	WP_003728216.1	lipase	-2.13	0
LM4B_RS12500	WP_003725417.1	PspC family transcriptional regulator (Imo2485)	-2.13	4.00E-18
LM4B_RS01335	WP_003726839.1	50S ribosomal protein L7/L12	-2.13	3.00E-30
LM4B_RS09200	WP_003728307.1	DNA-binding protein	-2.13	2.00E-72
LM4B_RS08420	WP_003727322.1	2-succinyl-6-hydroxy-2%2C4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase	-2.13	0
LM4B_RS02340	WP_003725180.1	transcriptional regulator	-2.13	8.00E-40
LM4B_RS12275	WP_003727932.1	hypothetical protein	-2.13	9.00E-113
LM4B_RS03335	WP_003724389.1	GntR family transcriptional regulator	-2.13	1.00E-11
LM4B_RS13040		tRNA-Ile	-2.13	-
LM4B_RS02435	WP_012681108.1	transposase	-2.13	-
LM4B_RS13755	WP_003725017.1	GNAT family acetyltransferase	-2.14	5.00E-108
LM4B_RS02000	WP_003724309.1	5-deoxy-glucuronate isomerase	-2.15	0
LM4B_RS13730	WP_003722078.1	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	-2.15	0
LM4B_RS02755	WP_003725438.1	GGDEF domain-containing protein	-2.16	0
LM4B_RS03340	WP_012681145.1	phage infection protein	-2.17	0
LM4B_RS01825	WP_003724281.1	dihydroxyacetone kinase	-2.17	5.00E-62
LM4B_RS08070	WP_003726511.1	tRNA-binding protein	-2.17	3.00E-143
LM4B_RS08500		tRNA-Asp	-2.18	-

LM4B_RS02290	WP_012681098.1	PBS lyase	-2.19	2.00E-120
LM4B_RS10840	WP_003724546.1	hypothetical protein	-2.20	3.00E-170
LM4B_RS02170	WP_003724341.1	hypothetical protein	-2.21	2.00E-83
LM4B_RS09340	WP_003725662.1	short chain dehydrogenase	-2.21	7.00E-134
LM4B_RS11970	WP_003722405.1	cation:proton antiporter	-2.21	2.00E-55
LM4B_RS03365	WP_003727224.1	serine/threonine protein phosphatase	-2.21	1.00E-34
LM4B_RS06105	WP_003721617.1	hypothetical protein	-2.22	2.00E-79
LM4B_RS02640	WP_003725723.1	hypothetical protein	-2.22	3.00E-80
LM4B_RS06885	WP_003726257.1	dihydrolipoyl dehydrogenase	-2.22	3.00E-100
LM4B_RS06170	WP_003726543.1	endonuclease MutS2	-2.23	0
LM4B_RS09665	WP_003728018.1	endonuclease III	-2.24	8.00E-106
LM4B_RS02070	WP_003724320.1	hypothetical protein	-2.24	7.00E-46
LM4B_RS08065	WP_012681316.1	cell division protein FtsK	-2.24	0
LM4B_RS08885	WP_014654279.1	adenine deaminase	-2.24	2.00E-164
LM4B_RS06870	WP_003738883.1	DNA repair protein RecN	-2.24	0
LM4B_RS08450	WP_003726095.1	cystathionine beta-lyase	-2.25	2.00E-110
LM4B_RS02745	WP_003727288.1	glycosyl transferase family 2	-2.26	9.00E-25
LM4B_RS09275	WP_003725650.1	thiamine pyrophosphokinase	-2.26	8.00E-55

LM4B_RS03050	WP_014654206.1	hypothetical protein (lmo0590)	-2.26	0
LM4B_RS00920	WP_003725501.1	glucohydrolase	-2.26	0
LM4B_RS03560	WP_003724426.1	chemotaxis protein CheV	-2.28	1.00E-89
LM4B_RS12355	WP_003726581.1	triose-phosphate isomerase	-2.29	1.00E-82
LM4B_RS13835	WP_003725032.1	NAD-dependent protein deacetylase	-2.29	3.00E-38
LM4B_RS05995	WP_003724731.1	cobalt-precorrin-4 C(11)-methyltransferase	-2.29	1.00E-77
LM4B_RS10390	WP_003728333.1	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	-2.29	1.00E-141
LM4B_RS13530	WP_003724987.1	potassium-transporting ATPase C chain	-2.29	2.00E-31
LM4B_RS10770	WP_003724535.1	alpha/beta hydrolase	-2.29	0
LM4B_RS02005	WP_003734601.1	5-dehydro-2-deoxygluconokinase	-2.30	0
LM4B_RS08830	WP_003725512.1	sugar ABC transporter permease	-2.30	2.00E-46
LM4B_RS07910	WP_003727381.1	hypothetical protein	-2.30	0
LM4B_RS07770	WP_003727393.1	rod shape-determining protein	-2.31	3.00E-178
LM4B_RS11850		tRNA-Val	-2.31	-
LM4B_RS06020	WP_012681257.1	sirohydrochlorin cobaltochelataase	-2.32	9.00E-90
LM4B_RS09865	WP_003720260.1	transcriptional regulator	-2.32	3.00E-33
LM4B_RS04565		tRNA-Asn	-2.33	-

LM4B_RS04465	WP_012681191.1	peptidoglycan linked protein (LPXTG) (lmo0880)	-2.34	0
LM4B_RS04385	WP_012681189.1	phosphomannomutase	-2.34	1.00E-140
LM4B_RS05285	WP_012681215.1	molybdenum cofactor guanylyltransferase	-2.34	1.00E-05
LM4B_RS08075	WP_003727363.1	hypothetical protein	-2.34	8.00E-177
LM4B_RS09235	WP_003723870.1	phosphate acyltransferase	-2.35	1.00E-141
LM4B_RS04685	WP_003734299.1	PTS fructose transporter subunit IIA	-2.36	0
LM4B_RS03035	WP_012681137.1	hypothetical protein	-2.36	0
LM4B_RS03020	WP_003725894.1	AI-2E family transporter	-2.37	0
LM4B_RS11980	WP_003728409.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit D	-2.38	0
LM4B_RS01025	WP_012681030.1	phospholipase C	-2.39	2.00E-60
LM4B_RS11060	WP_003730881.1	trehalose utilization protein ThuA	-2.40	0
LM4B_RS07795	WP_003725680.1	glutamate-1-semialdehyde 2%2C1-aminomutase	-2.40	0
LM4B_RS13605	WP_012681468.1	decarboxylase (lmo2694)	-2.40	4.00E-15
LM4B_RS00200	WP_003724866.1	hydrolase	-2.40	1.00E-29
LM4B_RS01015	WP_012681028.1	zinc metalloproteinase	-2.40	3.00E-29
LM4B_RS09225	WP_003723867.1	beta-ketoacyl-ACP reductase	-2.40	3.00E-100
LM4B_RS02470	WP_003735640.1	TetR family transcriptional regulator	-2.40	3.00E-134
LM4B_RS03345	WP_003731019.1	GntR family transcriptional regulator (hypR)	-2.41	1.00E-10

LM4B_RS14100	WP_003725337.1	transcriptional regulator	-2.42	2.00E-170
LM4B_RS04025	WP_003726297.1	hypothetical protein (Imo0794)	-2.42	6.00E-150
LM4B_RS00440		tRNA-Lys	-2.42	-
LM4B_RS12445	WP_003722606.1	RNase adaptor protein RapZ	-2.43	0
LM4B_RS02225	WP_003725152.1	PTS mannose transporter subunit IIAB	-2.43	2.00E-30
LM4B_RS06630	WP_012681275.1	PolC-type DNA polymerase III	-2.43	0
LM4B_RS14290	WP_003725779.1	thiol reductase thioredoxin	-2.44	4.00E-16
LM4B_RS03730	WP_003724456.1	chemotaxis protein	-2.44	3.00E-82
LM4B_RS05825	WP_003724702.1	microcompartment protein PduM	-2.44	3.00E-110
LM4B_RS03670	WP_003721832.1	flagellar basal body rod protein FlgC	-2.45	3.00E-39
LM4B_RS11385	WP_003725907.1	class II fumarate hydratase	-2.45	0
LM4B_RS03225	WP_003727246.1	hypothetical protein	-2.46	9.00E-04
LM4B_RS03415	WP_003724402.1	DNA-binding protein	-2.47	3.00E-32
LM4B_RS06060	WP_003721608.1	membrane protein	-2.47	1.00E-91
LM4B_RS09605	WP_003728270.1	chitinase (Imo1883)	-2.47	0
LM4B_RS07905	WP_003726611.1	oligoribonuclease	-2.47	0
LM4B_RS14010	WP_003727625.1	transcription antiterminator	-2.48	6.00E-82
LM4B_RS01635	WP_009917357.1	hypothetical protein	-2.48	2.00E-127

LM4B_RS10360	WP_003724066.1	hypothetical protein	-2.48	9.00E-63
LM4B_RS13925	WP_012681475.1	DNA topoisomerase III	-2.48	0
LM4B_RS04600		tRNA-Glu	-2.49	-
LM4B_RS09675	WP_003726759.1	asparagine--tRNA ligase	-2.50	9.00E-175
LM4B_RS03275	WP_003724379.1	hypothetical protein	-2.50	7.00E-23
LM4B_RS12605	WP_003722639.1	cell division protein FtsX	-2.51	2.00E-105
LM4B_RS03635	WP_010958790.1	hypothetical protein	-2.51	2.00E-95
LM4B_RS04160	WP_003726378.1	hypothetical protein	-2.51	0
LM4B_RS08175	WP_003726798.1	tryptophan synthase subunit beta	-2.52	0
LM4B_RS04900	WP_003722783.1	membrane protein (lemA)	-2.52	6.00E-118
LM4B_RS11810		tRNA-Gly	-2.53	-
LM4B_RS02750	WP_003734860.1	glycosyl transferase	-2.53	0
LM4B_RS04060	WP_003726664.1	GTP pyrophosphokinase	-2.53	2.00E-151
LM4B_RS13815	WP_003734226.1	alpha-amylase	-2.55	3.00E-147
LM4B_RS05820	WP_012681252.1	ethanolamine utilization protein EutJ	-2.55	2.00E-58
LM4B_RS09230	WP_003729536.1	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	-2.55	2.00E-95
LM4B_RS06005	WP_003726949.1	precorrin-3B C(17)-methyltransferase	-2.55	2.00E-73
LM4B_RS07395	WP_003726023.1	molecular chaperone DnaK	-2.55	0

LM4B_RS14270	WP_003722185.1	MFS transporter	-2.56	3.00E-86
LM4B_RS04330	WP_003724784.1	QacE family quaternary ammonium compound efflux SMR transporter	-2.56	3.00E-23
LM4B_RS03860	WP_003734258.1	hypothetical protein	-2.57	3.00E-141
LM4B_RS13525	WP_003724986.1	two-component sensor histidine kinase	-2.57	3.00E-162
LM4B_RS11615	WP_003739618.1	transcriptional regulator	-2.58	5.00E-77
LM4B_RS11855		tRNA-Glu	-2.58	-
LM4B_RS13840	WP_012681472.1	hypothetical protein	-2.58	2.00E-67
LM4B_RS06690	WP_012681277.1	ribosome small subunit-dependent GTPase	-2.60	0
LM4B_RS03080	WP_003723402.1	membrane protein (lmo0596)	-2.61	4.00E-91
LM4B_RS06530	WP_003723435.1	type I glutamate--ammonia ligase	-2.61	0
LM4B_RS11650	WP_003725111.1	carbohydrate kinase	-2.62	2.00E-54
LM4B_RS08595	WP_003726276.1	glutamate-1-semialdehyde 2%2C1-aminomutase	-2.62	0
LM4B_RS04645	WP_003724837.1	membrane protein	-2.63	0
LM4B_RS03180	WP_003734461.1	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	-2.63	6.00E-65
LM4B_RS03005	WP_003734472.1	50S rRNA methyltransferase	-2.63	0
LM4B_RS12970	WP_003726476.1	ABC transporter permease	-2.64	1.00E-82
LM4B_RS09620	WP_003726589.1	peptidase M32	-2.65	0
LM4B_RS05770	WP_003719356.1	carboxysome shell protein	-2.65	7.00E-43

LM4B_RS13210	WP_003723686.1	50S ribosomal protein L14	-2.65	1.00E-59
LM4B_RS08205	WP_003726650.1	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	-2.65	0
LM4B_RS07300	WP_003721960.1	RNA polymerase sigma factor SigA	-2.65	2.00E-167
LM4B_RS01830	WP_003724282.1	D-beta-hydroxybutyrate permease	-2.66	1.00E-31
LM4B_RS14395	WP_003725798.1	AraC family transcriptional regulator	-2.67	4.00E-08
LM4B_RS05760	WP_003726970.1	alpha-ribazole phosphatase	-2.67	3.00E-19
LM4B_RS00510	WP_003728364.1	hypothetical protein	-2.67	2.00E-147
LM4B_RS07295	WP_003740996.1	SAM-dependent methyltransferase	-2.67	8.00E-165
LM4B_RS05020	WP_003730929.1	DUF3021 domain-containing protein	-2.67	9.00E-79
LM4B_RS07285	WP_003727433.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	-2.68	8.00E-144
LM4B_RS09020	WP_003731570.1	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurL	-2.69	0
LM4B_RS09205	WP_003726330.1	signal recognition particle-docking protein FtsY	-2.69	4.00E-166
LM4B_RS10385	WP_012681386.1	cell division protein FtsQ	-2.69	7.00E-161
LM4B_RS00910	WP_012681026.1	glycosyl hydrolase family 31	-2.69	1.00E-69
LM4B_RS12725	WP_003723463.1	ATP synthase subunit gamma	-2.70	1.00E-109
LM4B_RS03405	WP_003724400.1	transposase	-2.70	0.006
LM4B_RS09575	WP_003728274.1	formate--tetrahydrofolate ligase	-2.70	0
LM4B_RS14190	WP_003725839.1	tRNA uridine(34) 5-carboxymethylaminomethyl synthesis enzyme MnmG	-2.71	0

LM4B_RS05775	WP_003726968.1	microcompartment protein PduB	-2.71	4.00E-160
LM4B_RS08370	WP_003727328.1	S-adenosylmethionine synthase	-2.72	0
LM4B_RS04905	WP_003726181.1	zinc metalloprotease HtpX	-2.72	4.00E-58
LM4B_RS06075	WP_003724743.1	PadR family transcriptional regulator	-2.73	3.00E-27
LM4B_RS13515	WP_012681465.1	alpha/beta hydrolase	-2.73	0
LM4B_RS10665	WP_003722346.1	lipase	-2.73	0
LM4B_RS05715	WP_003721540.1	hypothetical protein	-2.73	8.00E-96
LM4B_RS05830	WP_003736331.1	ethanolamine utilization protein EutN	-2.73	9.00E-43
LM4B_RS11395	WP_003727829.1	ABC transporter ATP-binding protein	-2.74	1.00E-81
LM4B_RS01525	WP_003734545.1	cyclic nucleotide-binding protein	-2.74	3.00E-160
LM4B_RS04955	WP_003726188.1	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltB	-2.75	6.00E-32
LM4B_RS00330	WP_003724885.1	hypothetical protein	-2.75	9.00E-29
LM4B_RS12980	WP_003726478.1	DNA-binding response regulator	-2.76	3.00E-85
LM4B_RS02825	WP_003725449.1	hypothetical protein	-2.76	5.00E-84
LM4B_RS11050	WP_003724576.1	dehydrogenase	-2.76	2.00E-32
LM4B_RS06000	WP_003730977.1	cobalamin biosynthesis protein CbiG	-2.76	0
LM4B_RS01660	WP_003724249.1	hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase	-2.76	6.00E-64
LM4B_RS00985	WP_003722726.1	septation protein SpoVG (Imo0197)	-2.77	1.00E-52

LM4B_RS07110	WP_003727449.1	transporter	-2.77	9.00E-05
LM4B_RS13290	WP_003726299.1	NADH dehydrogenase	-2.77	6.00E-62
LM4B_RS09045	WP_012681343.1	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide synthase	-2.77	5.00E-134
LM4B_RS11710	WP_003727728.1	sodium/hydrogen exchanger family protein	-2.77	5.00E-60
LM4B_RS03440	WP_003727215.1	maltose O-acetyltransferase	-2.78	2.00E-71
LM4B_RS01665	WP_009929382.1	thiamine phosphate synthase	-2.78	4.00E-34
LM4B_RS03735	WP_003731042.1	hypothetical protein	-2.80	1.00E-176
LM4B_RS07145	WP_003725368.1	hypothetical protein	-2.80	0
LM4B_RS13355	WP_012681461.1	PTS fructose transporter subunit IIA	-2.80	8.00E-69
LM4B_RS00090	WP_003725631.1	cytochrome ubiquinol oxidase subunit I	-2.81	0
LM4B_RS11840		tRNA-Asp	-2.81	-
LM4B_RS11245	WP_003730871.1	membrane protein	-2.81	3.00E-72
LM4B_RS10970	WP_003744357.1	mannose-6-phosphate isomerase	-2.81	-
LM4B_RS05800	WP_003724698.1	glycerol dehydratase	-2.81	3.00E-78
LM4B_RS07225	WP_003725382.1	superoxide dismutase (Imo1439)	-2.83	2.00E-147
LM4B_RS14235	WP_010959112.1	amidohydrolase	-2.84	1.00E-69
LM4B_RS09280	WP_003725651.1	ribulose-phosphate 3-epimerase	-2.85	2.00E-103
LM4B_RS03355	WP_003724393.1	membrane protein	-2.85	2.00E-169

LM4B_RS02550	WP_012681114.1	hydrolase	-2.86	2.00E-114
LM4B_RS05795	WP_003734694.1	diol dehydratase reactivase subunit alpha	-2.86	-
LM4B_RS04320	WP_003724783.1	TetR family transcriptional regulator	-2.86	1.00E-19
LM4B_RS00915	WP_003734708.1	alpha-glucosidase	-2.86	2.00E-122
LM4B_RS06890	WP_010958893.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	-2.86	1.00E-58
LM4B_RS06445	WP_003726696.1	hypothetical protein	-2.87	3.00E-52
LM4B_RS05015	WP_003726676.1	LytR family transcriptional regulator	-2.89	3.00E-91
LM4B_RS02330	WP_012681104.1	penicillin-binding protein	-2.89	4.00E-148
LM4B_RS09000	WP_003731568.1	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	-2.89	0
LM4B_RS09385	WP_012681354.1	uracil transporter	-2.90	6.00E-97
LM4B_RS13475	WP_003727675.1	membrane protein (plectin)	-2.90	0
LM4B_RS04265	WP_003727129.1	hypothetical protein	-2.90	-
LM4B_RS09215	WP_003726332.1	ribonuclease 3	-2.91	6.00E-42
LM4B_RS12495	WP_003725416.1	membrane protein	-2.91	1.00E-43
LM4B_RS04630	WP_003724834.1	phosphoglycerate mutase	-2.91	8.00E-43
LM4B_RS01370	WP_003724189.1	alpha-glucosidase	-2.92	8.00E-124
LM4B_RS01355	WP_012681038.1	sugar ABC transporter substrate-binding protein	-2.93	1.00E-12
LM4B_RS01820	WP_003723201.1	hypothetical protein	-2.93	1.00E-75

LM4B_RS05875	WP_003740567.1	Fis family transcriptional regulator	-2.95	9.00E-44
LM4B_RS00895	WP_003722709.1	sugar ABC transporter permease	-2.95	8.00E-61
LM4B_RS13035		tRNA-Ala	-2.95	-
LM4B_RS10125	WP_003725880.1	alpha-acetolactate decarboxylase	-2.96	1.00E-81
LM4B_RS12965	WP_003728390.1	hemin ABC transporter ATP-binding protein	-2.96	9.00E-82
LM4B_RS04360	WP_003724790.1	sugar ABC transporter permease	-2.96	6.00E-38
LM4B_RS09460	WP_003723408.1	transcriptional regulator	-2.97	6.00E-64
LM4B_RS02815	WP_003725447.1	PTS sorbitol transporter subunit IIB	-2.99	0
LM4B_RS08170	WP_003726797.1	tryptophan synthase subunit alpha	-2.99	2.00E-80
LM4B_RS04590	WP_003727104.1	oligo-beta-mannoside permease IIC protein	-3.00	4.00E-79
LM4B_RS08045	WP_003723567.1	DUF948 domain containing protein (lmo1602)	-3.00	4.00E-64
LM4B_RS10670	WP_003724518.1	argininosuccinate synthase	-3.00	0
LM4B_RS07550	WP_003725978.1	alanine--tRNA ligase	-3.01	0
LM4B_RS03640	WP_003727197.1	flagellar hook protein FlgK	-3.01	0
LM4B_RS04550	WP_003724823.1	sodium-independent anion transporter	-3.02	4.00E-118
LM4B_RS14300	WP_003740335.1	glycerate kinase	-3.04	3.00E-90
LM4B_RS00950	WP_003725506.1	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase	-3.05	3.00E-93
LM4B_RS06805	WP_003722482.1	elongation factor P	-3.06	1.00E-98

LM4B_RS01600	WP_003724228.1	membrane protein	-3.07	8.00E-128
LM4B_RS00315	WP_003724881.1	50S ribosomal protein L9	-3.07	2.00E-56
LM4B_RS05785	WP_003724695.1	propanediol dehydratase medium subunit	-3.08	-
LM4B_RS05005	WP_003727058.1	aminopeptidase	-3.09	0
LM4B_RS06625	WP_012681274.1	proline--tRNA ligase	-3.09	0
LM4B_RS14130	WP_012681481.1	haloacid dehalogenase	-3.09	7.00E-46
LM4B_RS14125	WP_003725342.1	PTS mannitol transporter subunit IIA	-3.09	9.00E-27
LM4B_RS12730	WP_003727892.1	ATP synthase subunit alpha	-3.10	0
LM4B_RS14280	WP_003727591.1	hypothetical protein (lmo2828)	-3.11	2.00E-76
LM4B_RS07385	WP_003726021.1	ribosomal protein L11 methyltransferase	-3.11	2.00E-120
LM4B_RS08465		tRNA-Glu	-3.13	-
LM4B_RS08135	WP_012681317.1	dipeptidase PepV	-3.13	0
LM4B_RS12610	WP_003726222.1	cell division ATP-binding protein FtsE	-3.13	1.00E-114
LM4B_RS11640	WP_003725109.1	hypothetical protein	-3.13	2.00E-102
LM4B_RS12905	WP_003723615.1	hypothetical protein	-3.13	1.00E-33
LM4B_RS12345	WP_003726579.1	enolase	-3.13	0
LM4B_RS05805	WP_003724699.1	propanediol utilization protein PduK	-3.13	2.00E-83
LM4B_RS10545	WP_003740733.1	hypothetical protein	-3.14	1.00E-25

LM4B_RS00530	WP_003728363.1	hypothetical protein	-3.15	5.00E-82
LM4B_RS12350	WP_003726580.1	2%2C3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	-3.15	2.00E-180
LM4B_RS05990	WP_003724730.1	cobalt-precorrin-6Y C(15)-methyltransferase	-3.16	4.00E-26
LM4B_RS10845	WP_003722383.1	sugar ABC transporter permease	-3.16	7.00E-74
LM4B_RS10010	WP_003727983.1	TetR family transcriptional regulator	-3.16	2.00E-08
LM4B_RS05755	WP_003726971.1	adenosylcobinamide-GDP ribazoletransferase	-3.16	1.00E-27
LM4B_RS04055	WP_003726663.1	hypothetical protein	-3.17	4.00E-80
LM4B_RS04915	WP_003727070.1	adenylate cyclase	-3.18	5.00E-136
LM4B_RS05210	WP_003719245.1	potassium transporter Trk	-3.18	1.00E-150
LM4B_RS02820	WP_003725448.1	PTS sorbitol transporter subunit IIC	-3.20	9.00E-40
LM4B_RS06100	WP_003721616.1	23S rRNA methyltransferase	-3.22	3.00E-73
LM4B_RS13185	WP_003726442.1	50S ribosomal protein L6	-3.22	2.00E-76
LM4B_RS13805	WP_003725026.1	PTS fructose transporter subunit IIABC	-3.24	2.00E-62
LM4B_RS03400	WP_003727220.1	hypothetical protein	-3.25	-
LM4B_RS01995	WP_003728135.1	methylmalonate semialdehyde dehydrogenase [acylating]	-3.26	4.00E-152
LM4B_RS01950	WP_003723086.1	PTS sugar transporter subunit IIB	-3.26	2.00E-17
LM4B_RS10765	WP_012681398.1	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	-3.27	5.00E-71
LM4B_RS01470	WP_003724207.1	hypothetical protein	-3.28	5.00E-156

LM4B_RS04720	WP_003734004.1	TetR family transcriptional regulator	-3.29	4.00E-66
LM4B_RS05835	WP_012681253.1	ATP--cobalamin adenosyltransferase	-3.29	0
LM4B_RS03270	WP_003724378.1	hypothetical protein	-3.29	5.00E-141
LM4B_RS08770	WP_003726628.1	PTS mannose transporter subunit IIA	-3.31	5.00E-22
LM4B_RS14375	WP_003727578.1	rhamnulose-1-phosphate aldolase	-3.31	8.00E-97
LM4B_RS01055	WP_003722740.1	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	-3.31	4.00E-37
LM4B_RS05010	WP_003726675.1	glutathione peroxidase	-3.32	3.00E-56
LM4B_RS09050	WP_003726217.1	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase	-3.33	6.00E-71
LM4B_RS13165	WP_003723680.1	50S ribosomal protein L15	-3.33	3.00E-72
LM4B_RS10265	WP_003727956.1	isoleucine--tRNA ligase	-3.34	0
LM4B_RS05960	WP_003724724.1	membrane protein	-3.34	2.00E-100
LM4B_RS10830	WP_012681399.1	teichoic acid biosynthesis protein	-3.34	2.00E-08
LM4B_RS02230	WP_003722977.1	PTS fructose transporter subunit IIB	-3.34	2.00E-25
LM4B_RS11845		tRNA-Met	-3.37	-
LM4B_RS02830	WP_012681127.1	NAD(P)-dependent oxidoreductase	-3.37	0
LM4B_RS03025	WP_003725895.1	hypothetical protein	-3.38	5.00E-146
LM4B_RS05815	WP_003724700.1	propanediol utilization phosphotransacylase	-3.39	2.00E-148
LM4B_RS10450	WP_003726143.1	50S ribosomal protein L32	-3.41	1.00E-11

LM4B_RS13540	WP_003724989.1	potassium-transporting ATPase A chain	-3.41	6.00E-132
LM4B_RS00225	WP_003724871.1	sugar isomerase	-3.43	3.00E-12
LM4B_RS08380	WP_012681325.1	cell wall surface anchor protein	-3.45	0
LM4B_RS05980	WP_003724728.1	cobalt-precorrin-5B (C(1))-methyltransferase	-3.46	0
LM4B_RS03850	WP_003724478.1	glyoxalase	-3.47	2.00E-147
LM4B_RS01060	WP_003725737.1	GNAT family acetyltransferase	-3.48	0.002
LM4B_RS11125	WP_003727858.1	hypothetical protein	-3.49	0
LM4B_RS02810	WP_003725446.1	PTS sorbitol transporter subunit IIA	-3.49	2.00E-06
LM4B_RS13575	WP_003724992.1	magnesium-translocating P-type ATPase	-3.50	0
LM4B_RS01030	WP_003725733.1	hypothetical protein	-3.50	1.00E-71
LM4B_RS08445	WP_003727321.1	cystathionine beta-lyase	-3.51	1.00E-128
LM4B_RS07880	WP_003727384.1	pyruvate kinase	-3.51	0
LM4B_RS05810	WP_003719364.1	carboxysome shell protein	-3.53	1.00E-36
LM4B_RS09485	WP_003725815.1	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase	-3.53	1.00E-56
LM4B_RS00095	WP_003725632.1	cytochrome aa3 quinol oxidase subunit III	-3.54	5.00E-146
LM4B_RS06970	WP_003722514.1	CD4+ T-cell-stimulating antigen (tcsA, lmo1388)	-3.54	0
LM4B_RS11275	WP_003727842.1	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-3.54	1.00E-66
LM4B_RS09380	WP_003725670.1	aspartate carbamoyltransferase	-3.54	6.00E-110

LM4B_RS03000	WP_003740461.1	phospholipase	-3.56	2.00E-16
LM4B_RS10645	WP_012681395.1	cell wall surface anchor protein	-3.57	0
LM4B_RS09015	WP_012681342.1	amidophosphoribosyltransferase	-3.60	0
LM4B_RS11055	WP_003724577.1	xylose isomerase	-3.62	0
LM4B_RS14060	WP_012681480.1	beta-glucosidase	-3.62	1.00E-127
LM4B_RS07170	WP_003725371.1	glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein	-3.64	2.00E-100
LM4B_RS09250	WP_003728302.1	L-serine dehydratase%2C iron-sulfur-dependent subunit alpha	-3.65	8.00E-123
LM4B_RS01360	WP_003724188.1	sugar ABC transporter permease	-3.65	5.00E-68
LM4B_RS05315	WP_012681217.1	molybdopterin converting factor%2C subunit 2	-3.66	2.00E-31
LM4B_RS09965	WP_003725941.1	purine-nucleoside phosphorylase	-3.68	2.00E-121
LM4B_RS12225	WP_003726488.1	hypothetical protein	-3.68	2.00E-31
LM4B_RS08195	WP_003726782.1	glutamine amidotransferase	-3.69	1.00E-56
LM4B_RS09690	WP_003728014.1	ATP-dependent helicase DinG	-3.71	0
LM4B_RS07825	WP_003725686.1	threonine--tRNA ligase	-3.71	0
LM4B_RS01430	WP_012681044.1	internalin	-3.73	0
LM4B_RS10155	WP_003727972.1	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	-3.73	0
LM4B_RS00425	WP_003731431.1	6-O-methylguanine DNA methyltransferase	-3.75	1.00E-82
LM4B_RS10600	WP_003724505.1	tRNA threonylcarbamoyladenine biosynthesis protein TsaB	-3.75	8.00E-159

LM4B_RS00280	WP_003721669.1	30S ribosomal protein S18	-3.76	3.00E-35
LM4B_RS08725	WP_003728252.1	aminopeptidase	-3.79	3.00E-11
LM4B_RS02125	WP_003724333.1	transcriptional antiterminator	-3.79	0
LM4B_RS11530	WP_012681416.1	guanine permease	-3.79	2.00E-159
LM4B_RS06905	WP_003726752.1	peptidase M20	-3.80	3.00E-20
LM4B_RS02310	WP_012681101.1	NAD(P)-dependent oxidoreductase	-3.84	1.00E-173
LM4B_RS09245	WP_012681348.1	ATP-dependent DNA helicase RecG	-3.85	0
LM4B_RS13725	WP_003725012.1	cytochrome C nitrate reductase	-3.86	2.00E-97
LM4B_RS07370	WP_003741005.1	hypothetical protein	-3.86	2.00E-97
LM4B_RS09615	WP_012681361.1	xanthine phosphoribosyltransferase	-3.87	1.00E-73
LM4B_RS04115	WP_003726366.1	fructokinase	-3.87	4.00E-79
LM4B_RS02255	WP_003725158.1	oxidoreductase	-3.87	1.00E-66
LM4B_RS10955	WP_003724562.1	ABC transporter permease	-3.89	0
LM4B_RS09585	WP_003728273.1	cold-shock protein	-3.90	2.00E-28
LM4B_RS13590	WP_003734235.1	amidase	-3.93	3.00E-19
LM4B_RS12910	WP_003723616.1	hypothetical protein	-3.94	1.00E-69
LM4B_RS01365	WP_003723041.1	sugar ABC transporter permease	-3.94	6.00E-64
LM4B_RS11140	WP_003724594.1	membrane protein	-3.96	5.00E-76

LM4B_RS12570	WP_003725429.1	phosphate ABC transporter substrate-binding protein	-3.97	3.00E-78
LM4B_RS02110	WP_003723112.1	PTS fructose transporter subunit IIB	-3.98	5.00E-18
LM4B_RS01455	WP_003724204.1	phosphoglycerate mutase	-3.98	5.00E-34
LM4B_RS06275	WP_003726050.1	hypothetical protein	-4.01	6.00E-51
LM4B_RS13520	WP_003724985.1	DNA-binding response regulator	-4.02	1.00E-51
LM4B_RS10725	WP_003728355.1	pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	-4.02	0
LM4B_RS10550	WP_003728858.1	choloylglycine hydrolase (Bile salt hydrolase, bsh)(lmo2067)	-4.03	1.00E-27
LM4B_RS10245	WP_041176734.1	alpha-mannosidase	-4.03	0
LM4B_RS04650	WP_003724838.1	hypothetical protein (lmo0911)	-4.05	2.00E-118
LM4B_RS00295	WP_003721672.1	accessory gene regulator D	-4.07	8.00E-29
LM4B_RS08640	WP_003728261.1	epimerase (lmo1694)	-4.08	0
LM4B_RS08180	WP_003727350.1	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	-4.08	3.00E-45
LM4B_RS13640	WP_003727659.1	glyoxal reductase	-4.09	2.00E-89
LM4B_RS11985	WP_003722408.1	cation:proton antiporter	-4.10	8.00E-83
LM4B_RS08185	WP_010958923.1	indole-3-glycerol-phosphate synthase	-4.11	3.00E-52
LM4B_RS01445	WP_003724202.1	transcriptional regulator	-4.11	7.00E-41
LM4B_RS11630	WP_003727734.1	DeoR family transcriptional regulator	-4.13	8.00E-84
LM4B_RS13940	WP_003725312.1	RNase III inhibitor	-4.13	3.00E-118

LM4B_RS00400	WP_009924108.1	hypothetical protein	-4.16	-
LM4B_RS09435	WP_003725806.1	manganese transport system ATP-binding protein MntB	-4.16	4.00E-84
LM4B_RS13680	WP_003730755.1	PTS cellobiose transporter subunit IIC	-4.20	2.00E-86
LM4B_RS10675	WP_003724519.1	argininosuccinate lyase	-4.20	0
LM4B_RS01040	WP_003725735.1	hypothetical protein	-4.22	7.00E-72
LM4B_RS06775	WP_003727482.1	glycine dehydrogenase	-4.29	0
LM4B_RS07075	WP_003740694.1	MFS transporter	-4.32	9.00E-127
LM4B_RS06895	WP_003727470.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	-4.35	6.00E-97
LM4B_RS04155	WP_003726371.1	magnesium-transporting ATPase	-4.37	0
LM4B_RS02865	WP_003725455.1	CBS domain-containing protein	-4.42	2.00E-148
LM4B_RS13875	WP_003725040.1	serine--tRNA ligase	-4.43	0
LM4B_RS10535	WP_003723947.1	large-conductance mechanosensitive channel	-4.43	6.00E-27
LM4B_RS02520	WP_003725700.1	ADP-ribose pyrophosphatase	-4.47	2.00E-15
LM4B_RS03120	WP_003726749.1	hypothetical protein	-4.49	5.00E-76
LM4B_RS01515	WP_003724215.1	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	-4.52	0
LM4B_RS08330	WP_003741268.1	transcriptional regulator	-4.52	3.00E-08
LM4B_RS13490	WP_003724979.1	AraC family transcriptional regulator	-4.53	3.00E-09
LM4B_RS10150	WP_012681374.1	PTS mannose transporter subunit IIA	-4.54	4.00E-27

LM4B_RS00085	WP_003725630.1	cytochrome aa3 quinol oxidase subunit II	-4.54	0
LM4B_RS04990	WP_003730925.1	glycosyl transferase family 8	-4.55	9.00E-124
LM4B_RS06110	WP_003721618.1	HxlR family transcriptional regulator	-4.58	1.00E-73
LM4B_RS08090	WP_003727361.1	peptidase M28	-4.64	6.00E-112
LM4B_RS11645	WP_003727733.1	pseudouridine-5'-phosphate glycosidase	-4.69	0
LM4B_RS00120	WP_003725637.1	GntR family transcriptional regulator (frlR)	-4.69	6.00E-18
LM4B_RS08085	WP_003727362.1	hypothetical protein	-4.71	2.00E-32
LM4B_RS11990	WP_003722409.1	cation:proton antiporter	-4.80	4.00E-58
LM4B_RS00300	WP_003721673.1	histidine kinase	-4.83	0
LM4B_RS13855	WP_003725036.1	fructose-6-phosphate aldolase	-4.83	6.00E-78
LM4B_RS06985	WP_003727462.1	branched-chain amino acid ABC transporter permease	-4.88	5.00E-53
LM4B_RS11995	WP_003731683.1	cation:proton antiporter	-4.89	1.00E-10
LM4B_RS08835	WP_003722209.1	sugar ABC transporter permease	-4.91	4.00E-61
LM4B_RS12235	WP_003726490.1	glutamate decarboxylase (Imo2434)	-4.91	2.00E-134
LM4B_RS00235	WP_003727554.1	amino acid:proton antiporter	-4.92	7.00E-72
LM4B_RS08995	WP_012681341.1	phosphoribosylamine--glycine ligase	-4.93	2.00E-163
LM4B_RS14210	WP_003734205.1	transcriptional regulator	-4.99	9.00E-07
LM4B_RS07315	WP_003721963.1	phosphotransferase	-5.01	0

LM4B_RS08825	WP_003725511.1	ABC transporter substrate-binding protein	-5.05	2.00E-15
LM4B_RS04960	WP_012681203.1	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase	-5.08	1.00E-58
LM4B_RS07150	WP_003721929.1	divalent metal cation transporter	-5.10	1.00E-106
LM4B_RS11625	WP_012681419.1	1-phosphofructokinase	-5.15	6.00E-45
LM4B_RS12720	WP_003723462.1	ATP synthase subunit beta	-5.15	0
LM4B_RS08190	WP_003726781.1	anthranilate phosphoribosyltransferase	-5.19	2.00E-116
LM4B_RS10730	WP_003724529.1	pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxT	-5.21	8.00E-46
LM4B_RS01050	WP_003722739.1	L-lactate dehydrogenase	-5.21	6.00E-82
LM4B_RS04945	WP_003726187.1	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD	-5.23	2.00E-83
LM4B_RS10965	WP_003724564.1	GntR family transcriptional regulator	-5.24	1.00E-157
LM4B_RS06770	WP_012681280.1	aminomethyltransferase	-5.33	5.00E-163
LM4B_RS03925	WP_003724492.1	diacylglycerol kinase	-5.34	0
LM4B_RS13870	WP_003725039.1	competence protein TfoX	-5.35	2.00E-52
LM4B_RS03990	WP_003727160.1	2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase	-5.37	1.00E-48
LM4B_RS12045	WP_003728403.1	disulfide oxidoreductase	-5.39	9.00E-74
LM4B_RS07790	WP_003725679.1	valine--tRNA ligase	-5.43	0
LM4B_RS07060	WP_003725352.1	formate acetyltransferase	-5.44	0
LM4B_RS13535	WP_015085181.1	potassium-transporting ATPase B chain	-5.45	0

LM4B_RS03230	WP_012681142.1	membrane protein	-5.46	0
LM4B_RS14370	WP_003725794.1	L-rhamnose mutarotase	-5.46	8.00E-73
LM4B_RS05310	WP_003725555.1	molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein MobB	-5.46	3.00E-21
LM4B_RS03295	WP_003727232.1	ATPase	-5.47	0
LM4B_RS00100	WP_003725633.1	cytochrome aa3 quinol oxidase subunit IV	-5.54	2.00E-60
LM4B_RS06780	WP_003731326.1	glycine dehydrogenase	-5.54	0
LM4B_RS01005	WP_003726703.1	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase	-5.64	6.00E-27
LM4B_RS00435	WP_003734164.1	2-hydroxyacid dehydrogenase	-5.65	2.00E-108
LM4B_RS12070	WP_003725592.1	phosphatidylglycerophosphatase A (lmo2398, ltrC)	-5.66	5.00E-108
LM4B_RS08325	WP_003726265.1	transcriptional regulator	-5.69	2.00E-05
LM4B_RS12040	WP_003725587.1	hypothetical protein	-5.72	1.00E-33
LM4B_RS03855	WP_012681167.1	phospholipase	-5.76	4.00E-139
LM4B_RS11470	WP_003725921.1	methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase	-5.77	4.00E-34
LM4B_RS05790	WP_003724696.1	propanediol dehydratase small subunit	-5.85	0.009
LM4B_RS04875	WP_003727073.1	glucosamine-6-phosphate deaminase (nagB)	-5.88	2.00E-87
LM4B_RS05055	WP_003732442.1	membrane protein	-5.90	2.00E-166
LM4B_RS08685	WP_003726636.1	RNA methyltransferase	-5.90	0
LM4B_RS09425	WP_003726605.1	manganese-binding lipoprotein MntA	-5.91	3.00E-114

LM4B_RS13510	WP_003724983.1	type VI secretion protein ImpB (lmo2676)	-5.92	0
LM4B_RS04880	WP_003722779.1	GntR family transcriptional regulator (lmo0958)	-5.94	6.00E-51
LM4B_RS13715	WP_003725010.1	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-5.96	1.00E-172
LM4B_RS12245	WP_003727937.1	transcription antiterminator BglG	-5.96	2.00E-80
LM4B_RS00395	WP_003724896.1	hypothetical protein	-5.96	0.06
LM4B_RS12715	WP_003723461.1	ATP synthase epsilon chain	-5.96	8.00E-31
LM4B_RS10185	WP_003730807.1	GntR family transcriptional regulator (frlR)	-5.97	1.00E-17
LM4B_RS02475	WP_003727311.1	oleate hydratase	-5.98	0
LM4B_RS06800	WP_003727480.1	peptidase M24	-6.01	2.00E-139
LM4B_RS12385	WP_012681448.1	membrane protein	-6.16	0
LM4B_RS07945	WP_003727378.1	2-Cys peroxiredoxin	-6.17	2.00E-53
LM4B_RS06900	WP_003727469.1	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	-6.21	3.00E-68
LM4B_RS11860		tRNA-Ser	-6.26	-
LM4B_RS13720	WP_003727652.1	thiol reductant ABC exporter subunit CydD	-6.26	0
LM4B_RS00220	WP_003724870.1	PTS beta-glucoside transporter subunit IIC	-6.27	3.00E-70
LM4B_RS10190	WP_003727966.1	NADP-dependent aryl-alcohol dehydrogenase	-6.30	6.00E-122
LM4B_RS10160	WP_003744264.1	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	-6.31	1.00E-13
LM4B_RS01450	WP_012681045.1	glyoxalase	-6.32	1.00E-80

LM4B_RS00305	WP_003721674.1	DNA-binding response regulator	-6.34	7.00E-33
LM4B_RS05355	WP_003727023.1	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha	-6.34	4.00E-65
LM4B_RS13880	WP_003725041.1	general stress protein (Imo2748)	-6.39	6.00E-97
LM4B_RS02665	WP_012681120.1	phosphoglycerate mutase	-6.39	3.00E-54
LM4B_RS11715	WP_003727727.1	amidohydrolase	-6.48	0
LM4B_RS04660	WP_009929451.1	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase	-6.48	4.00E-138
LM4B_RS14055	WP_003725330.1	PTS dihydroxyacetone transporter	-6.50	3.00E-15
LM4B_RS11280	WP_003740802.1	hypothetical protein	-6.55	4.00E-36
LM4B_RS13945	WP_003725313.1	ABC transporter ATP-binding protein	-6.57	4.00E-87
LM4B_RS07290	WP_003727432.1	Nif3-like dinuclear metal center hexameric protein	-6.58	0
LM4B_RS02050	WP_003740411.1	peptidase P60	-6.58	8.00E-150
LM4B_RS03305	WP_003724384.1	transaldolase	-6.59	1.00E-27
LM4B_RS13850	WP_003730742.1	hypothetical protein	-6.61	2.00E-84
LM4B_RS12940	WP_003731607.1	hypothetical protein	-6.61	6.00E-47
LM4B_RS08865	WP_003728238.1	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-6.63	2.00E-52
LM4B_RS09695	WP_003726616.1	aspartate 1-decarboxylase	-6.66	4.00E-52
LM4B_RS05320	WP_003725557.1	molybdopterin synthase sulfur carrier subunit	-6.70	4.00E-05
LM4B_RS03240	WP_003724373.1	hypothetical protein	-6.76	2.00E-57

LM4B_RS05365	WP_003725565.1	dihydrolipoamide acetyltransferase	-6.78	0
LM4B_RS12915	WP_003726111.1	peptide ABC transporter substrate-binding protein	-6.81	2.00E-129
LM4B_RS02105	WP_012681083.1	PTS fructose transporter subunit IIA	-6.82	4.00E-15
LM4B_RS02395	WP_003728092.1	hydantoinase subunit beta	-6.83	0
LM4B_RS09630	WP_003740620.1	hypothetical protein	-6.84	1.00E-64
LM4B_RS13470	WP_003724975.1	PTS sugar transporter subunit IIA	-6.84	0
LM4B_RS14295	WP_003725780.1	beta-phosphoglucomutase	-6.93	5.00E-62
LM4B_RS11865		tRNA-Asn	-6.95	-
LM4B_RS00265	WP_003724878.1	arginine deiminase	-6.95	2.00E-70
LM4B_RS02710	WP_003726689.1	6-phospho-beta-glucosidase	-7.08	4.00E-142
LM4B_RS05340	WP_012681218.1	molybdopterin biosynthesis protein MoeB	-7.09	0
LM4B_RS02390	WP_003728093.1	hypothetical protein	-7.19	0
LM4B_RS08440	WP_003726093.1	bifunctional homocysteine S-methyltransferase/methylenetetrahydrofolate reductase	-7.23	0
LM4B_RS04665	WP_003721482.1	PTS sugar transporter subunit IIB	-7.31	1.00E-05
LM4B_RS12255	WP_012681443.1	hypothetical protein	-7.31	5.00E-112
LM4B_RS13465	WP_003724974.1	PTS fructose transporter subunit IIA	-7.45	7.00E-08
LM4B_RS00685	WP_003724957.1	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-7.50	9.00E-43
LM4B_RS13425	WP_003724969.1	ribulose-phosphate 3-epimerase	-7.51	1.00E-71

LM4B_RS00905	WP_003725498.1	sugar ABC transporter substrate-binding protein	-7.55	5.00E-22
LM4B_RS08675	WP_003726634.1	hypothetical protein	-7.59	4.00E-81
LM4B_RS00680	WP_003728205.1	hypothetical protein	-7.68	3.00E-28
LM4B_RS08690	WP_012681330.1	osmotically inducible protein C	-7.75	5.00E-84
LM4B_RS13550	WP_003722040.1	PTS sugar transporter subunit IIB	-7.81	8.00E-16
LM4B_RS13780	WP_003725022.1	MerR family transcriptional regulator	-7.82	1.00E-41
LM4B_RS10695	WP_010959006.1	carbohydrate kinase	-7.82	1.00E-25
LM4B_RS02460	WP_012681110.1	hypothetical protein	-7.93	-
LM4B_RS00150	WP_010958655.1	copper homeostasis protein CutC	-7.96	2.00E-152
LM4B_RS08845	WP_012681336.1	glutamate synthase	-8.05	0
LM4B_RS00240	WP_003724874.1	agmatine deiminase	-8.07	0
LM4B_RS00665	WP_003724953.1	hypothetical protein	-8.07	5.00E-132
LM4B_RS00655	WP_003724952.1	minor structural protein	-8.15	-
LM4B_RS00660	WP_003721751.1	hypothetical protein	-8.16	5.00E-64
LM4B_RS14230	WP_003725847.1	quinolone resistance protein NorB	-8.18	1.00E-27
LM4B_RS04365	WP_003724791.1	sugar ABC transporter permease	-8.18	4.00E-30
LM4B_RS05725	WP_003726973.1	PduS protein	-8.18	0
LM4B_RS00620	WP_003724947.1	hypothetical protein	-8.18	2.00E-93

LM4B_RS13485	WP_003724978.1	glyoxalase	-8.21	5.00E-87
LM4B_RS13785	WP_003727647.1	cupin	-8.30	2.00E-99
LM4B_RS00230	WP_003724872.1	putrescine carbamoyltransferase	-8.41	6.00E-74
LM4B_RS04870	WP_003726858.1	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (Imo0956)	-8.51	6.00E-139
LM4B_RS00670	WP_003724954.1	hypothetical protein	-8.52	6.00E-108
LM4B_RS00320	WP_003721677.1	replicative DNA helicase	-8.52	0
LM4B_RS03565	WP_003724427.1	flagellin	-8.55	1.00E-53
LM4B_RS10900		tRNA-Gln	-8.55	-
LM4B_RS00675	WP_012681014.1	hypothetical protein	-8.65	4.00E-125
LM4B_RS03710	WP_003721840.1	PadR family transcriptional regulator	-8.66	9.00E-48
LM4B_RS02795	WP_003725443.1	tagatose 1%2C6-diphosphate aldolase	-8.68	7.00E-39
LM4B_RS04995	WP_003730926.1	ABC transporter permease	-8.69	2.00E-105
LM4B_RS12945	WP_003726117.1	cation transporter	-8.73	1.00E-97
LM4B_RS01020	WP_041176737.1	actin assembly-inducing protein	-8.74	0
LM4B_RS00125	WP_003730696.1	PTS fructose transporter subunit IIA	-8.79	1.00E-06
LM4B_RS09375	WP_041176733.1	dihydroorotase	-8.79	1.00E-112
LM4B_RS01810	WP_003728148.1	dihydroxyacetone kinase subunit DhaK	-8.81	1.00E-74
LM4B_RS02440	WP_003734772.1	hypothetical protein	-8.81	7.00E-144

LM4B_RS01815	WP_003723200.1	membrane protein (lmo0349)	-8.82	8.00E-67
LM4B_RS00565	WP_014654155.1	chitinase	-8.83	0
LM4B_RS13505	WP_003724982.1	hypothetical protein (lmo2675)	-8.90	8.00E-77
LM4B_RS03815	WP_003724472.1	hydrolase	-8.96	7.00E-30
LM4B_RS05985	WP_003724729.1	cobalt-precorrin-6Y C(5)-methyltransferase	-9.02	2.00E-17
LM4B_RS02515	WP_003730546.1	50S ribosomal protein L32	-9.06	3.00E-11
LM4B_RS10555	WP_003726503.1	molecular chaperone GroEL	-9.12	0
LM4B_RS08765	WP_003731093.1	outer surface protein	-9.14	0
LM4B_RS00635	WP_003721745.1	hypothetical protein	-9.15	7.00E-62
LM4B_RS01520	WP_012681048.1	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	-9.20	6.00E-134
LM4B_RS00630	WP_003721744.1	phage major tail protein%2C TP901-1 family	-9.24	5.00E-119
LM4B_RS00625	WP_003728212.1	DUF5072 domain-containing protein	-9.25	2.00E-86
LM4B_RS03930	WP_003724493.1	hypothetical protein	-9.25	1.00E-72
LM4B_RS12430	WP_003725406.1	NADPH dehydrogenase	-9.31	5.00E-123
LM4B_RS11605	WP_003740825.1	hypothetical protein	-9.31	1.00E-47
LM4B_RS10300	WP_003725775.1	transposase	-9.35	-
LM4B_RS11540	WP_003723656.1	protease	-9.40	5.00E-36
LM4B_RS08680	WP_003726635.1	FosX/FosE/FosI family fosfomycin resistance thiol transferase	-9.45	6.00E-04

LM4B_RS11620	WP_003725105.1	PTS fructose transporter subunit IIC	-9.50	7.00E-158
LM4B_RS00245	WP_003727553.1	carbamate kinase	-9.59	4.00E-84
LM4B_RS07325	WP_003727430.1	glycine--tRNA ligase subunit alpha	-9.72	2.00E-142
LM4B_RS12250	WP_003726493.1	extradiol dioxygenase	-9.73	2.00E-93
LM4B_RS00900	WP_003728178.1	sugar ABC transporter permease	-9.80	1.00E-68
LM4B_RS00650	WP_003724951.1	hypothetical protein	-9.88	0
LM4B_RS05325	WP_003725558.1	cyclic pyranopterin monophosphate synthase accessory protein	-9.93	6.00E-48
LM4B_RS00995	WP_003722728.1	ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	-10.05	7.00E-123
LM4B_RS09455	WP_003730836.1	ATPase P	-10.38	0
LM4B_RS00640	WP_003724949.1	hypothetical protein	-10.39	6.00E-91
LM4B_RS07165	WP_003725370.1	carnitine transport permease OpuCB	-10.40	5.00E-149
LM4B_RS05765	WP_003724692.1	transcriptional regulator	-10.46	1.00E-15
LM4B_RS13430	WP_012681464.1	transketolase	-10.50	0
LM4B_RS02035	WP_003741454.1	hypothetical protein	-10.56	7.00E-66
LM4B_RS07720	WP_003726648.1	glycerol kinase (glpK)	-10.57	0
LM4B_RS03360	WP_003721771.1	hypothetical protein	-10.84	3.00E-29
LM4B_RS07320	WP_003726011.1	glycine--tRNA ligase subunit beta	-10.87	3.00E-157
LM4B_RS00645	WP_003731178.1	membrane protein	-10.90	0

LM4B_RS10180	WP_003740646.1	GntR family transcriptional regulator (yvoA)	-10.91	3.00E-18
LM4B_RS10905		tRNA-Lys	-10.94	-
LM4B_RS08870	WP_003725518.1	polar amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-11.03	2.00E-62
LM4B_RS08840	WP_003725513.1	glutamate synthase subunit beta	-11.04	1.00E-171
LM4B_RS13480	WP_003724977.1	hypothetical protein	-11.43	6.00E-83
LM4B_RS04370	WP_003730892.1	trehalose-6-phosphate hydrolase	-11.47	5.00E-112
LM4B_RS04380	WP_003724794.1	glycosidase	-11.68	0
LM4B_RS00705	WP_003724961.1	hypothetical protein	-11.76	5.00E-53
LM4B_RS05740	WP_003726972.1	ethanolamine utilization protein EutP	-11.85	3.00E-13
LM4B_RS00615	WP_003724946.1	hypothetical protein	-11.97	5.00E-83
LM4B_RS05360	WP_003722680.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	-11.98	6.00E-96
LM4B_RS02010	WP_012681078.1	3D-(3%2C5/4)-trihydroxycyclohexane-1%2C2-dione acylhydrolase (deacylizing)	-12.14	0
LM4B_RS00990	WP_012681027.1	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase/glucosamine-1-phosphate acetyltransferase	-12.38	6.00E-145
LM4B_RS01640	WP_003734559.1	threonine aldolase	-12.44	1.00E-19
LM4B_RS05750	WP_003740563.1	adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide phosphate guanylyltransferase	-12.45	3.00E-44
LM4B_RS04200	WP_012681178.1	pyruvate:ferredoxin (flavodoxin) oxidoreductase	-12.61	0
LM4B_RS01800	WP_003728149.1	triose-phosphate isomerase	-12.69	5.00E-39

LM4B_RS01045	WP_003725736.1	hypothetical protein	-12.76	4.00E-162
LM4B_RS12935	WP_003726115.1	NADPH:quinone reductase	-12.83	3.00E-94
LM4B_RS12925	WP_003726113.1	amidase	-12.94	6.00E-85
LM4B_RS02115	WP_003723113.1	PTS fructose transporter subunit IIC	-12.94	7.00E-46
LM4B_RS12050	WP_041176736.1	hypothetical protein	-13.23	1.00E-39
LM4B_RS02120	WP_012681084.1	alpha-mannosidase	-13.40	2.00E-173
LM4B_RS13460	WP_003722023.1	PTS galactitol transporter subunit IIB	-13.48	2.00E-12
LM4B_RS05330	WP_003727027.1	cyclic pyranopterin monophosphate synthase	-13.51	2.00E-78
LM4B_RS00710	WP_003724964.1	GNAT family acetyltransferase	-13.52	9.00E-61
LM4B_RS13115	WP_003730781.1	acetamidase	-13.57	3.00E-53
LM4B_RS00290	WP_003727551.1	hypothetical protein	-13.83	4.00E-119
LM4B_RS09430	WP_003728286.1	manganese transport system membrane protein MntC	-13.84	1.00E-83
LM4B_RS11035	WP_003724574.1	hypothetical protein	-13.88	2.00E-76
LM4B_RS12930	WP_003726114.1	diacylglycerol kinase (lmo2572)	-14.02	2.00E-111
LM4B_RS10175	WP_003726575.1	PTS sugar transporter	-14.23	8.00E-17
LM4B_RS12920	WP_003726112.1	membrane protein (lmo2570)	-14.42	2.00E-142
LM4B_RS00520	WP_003724931.1	PTS mannose/fructose/sorbose transporter subunit IIC	-14.43	2.00E-35
LM4B_RS05370	WP_003725566.1	dihydrolipoyl dehydrogenase	-14.52	5.00E-109

LM4B_RS04670	WP_003724841.1	PTS cellobiose transporter subunit IIC	-14.67	4.00E-31
LM4B_RS01400	WP_003728068.1	6-phospho-beta-glucosidase	-14.77	0
LM4B_RS05745	WP_003724688.1	alpha-L-fucosidase	-14.94	1.00E-158
LM4B_RS10195	WP_010958979.1	acetolactate synthase	-14.95	0
LM4B_RS01790	WP_003723195.1	D-threitol dehydrogenase	-14.97	6.00E-91
LM4B_RS10165	WP_003723163.1	PTS mannose transporter subunit IID	-15.05	3.00E-64
LM4B_RS02465	WP_003727314.1	hypothetical protein	-15.18	2.00E-49
LM4B_RS01780	WP_012681067.1	transketolase	-15.47	0
LM4B_RS07725	WP_003727395.1	glycerol transporter	-15.48	4.00E-36
LM4B_RS12035	WP_012681433.1	NAD dependent epimerase/dehydratase (Imo2391)	-15.56	7.00E-144
LM4B_RS11325	WP_003730868.1	antibiotic biosynthesis monooxygenase	-15.71	1.00E-119
LM4B_RS00155	WP_003721643.1	PTS beta-glucoside transporter subunit EIIBCA	-15.71	0
LM4B_RS12995	WP_003728388.1	oxidoreductase	-15.77	0
LM4B_RS01805	WP_003724278.1	dihydroxyacetone kinase subunit L	-16.21	1.00E-44
LM4B_RS02985	WP_003725887.1	membrane protein	-16.55	6.00E-104
LM4B_RS04375	WP_003724793.1	hypothetical protein	-16.67	0
LM4B_RS09120	WP_014929691.1	internalin	-16.90	0
LM4B_RS13435	WP_003724971.1	ribulose-phosphate 3-epimerase	-17.11	1.00E-45

LM4B_RS05735	WP_003724686.1	propanediol utilization protein PduU	-17.44	2.00E-74
LM4B_RS03725	WP_010958795.1	pyruvate oxidase	-17.50	2.00E-126
LM4B_RS09770	WP_003726321.1	NADP-dependent malic enzyme	-17.69	2.00E-132
LM4B_RS01785	WP_003728151.1	fructose-6-phosphate aldolase	-17.78	2.00E-81
LM4B_RS01795	WP_003724276.1	ribose 5-phosphate isomerase B	-17.98	5.00E-38
LM4B_RS13350	WP_003726310.1	PTS sugar transporter subunit IIA	-18.07	2.00E-96
LM4B_RS00215	WP_012681002.1	endoglucanase	-18.17	0.002
LM4B_RS05335	WP_003727026.1	molybdenum cofactor biosynthesis protein	-18.22	1.00E-39
LM4B_RS01645	WP_012681054.1	PTS cellbiose transporter subunit IIC	-18.29	0
LM4B_RS13440	WP_003724972.1	ribose 5-phosphate isomerase B	-18.62	6.00E-47
LM4B_RS11410	WP_003725911.1	low molecular weight phosphatase family protein	-19.18	-
LM4B_RS07160	WP_003721931.1	carnitine transport-binding protein OpuCC	-19.45	1.00E-41
LM4B_RS13695		hypothetical protein	-19.50	-
LM4B_RS10170	WP_003726574.1	PTS sugar transporter	-19.66	1.00E-27
LM4B_RS09450	WP_003725809.1	heavy metal-binding protein	-19.74	6.00E-15
LM4B_RS00110	WP_003727565.1	6-phospho-beta-glucosidase	-19.84	0
LM4B_RS05730	WP_003719346.1	propanediol utilization: polyhedral bodies pduT	-19.92	8.00E-96
LM4B_RS11545	WP_003727816.1	hypothetical protein	-19.93	1.00E-70

LM4B_RS08340	WP_003726267.1	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	-20.15	2.00E-124
LM4B_RS12985	WP_003726479.1	formate dehydrogenase accessory protein FdhD	-20.23	9.00E-93
LM4B_RS11790	WP_003727714.1	glutamate decarboxylase (high similar to lmo2434)	-20.71	1.00E-141
LM4B_RS07920	WP_012681310.1	dipeptidase	-20.83	0
LM4B_RS03715	WP_003721841.1	hypothetical protein	-21.04	8.00E-57
LM4B_RS03965	WP_003721900.1	PTS fructose transporter subunit IIB (lmo0783)	-21.13	9.00E-71
LM4B_RS04680	WP_012681195.1	6-phospho-beta-glucosidase	-21.36	4.00E-149
LM4B_RS08335	WP_003731803.1	permease	-21.70	7.00E-72
LM4B_RS06500	WP_003723738.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-22.08	1.00E-68
LM4B_RS00515	WP_003721722.1	PTS mannose transporter subunit EIIAB	-22.76	0
LM4B_RS13610	WP_003727666.1	dihydroxyacetone kinase subunit DhaK (lmo2695)	-23.14	5.00E-98
LM4B_RS07065	WP_003721912.1	pyruvate formate-lyase-activating enzyme	-23.36	2.00E-78
LM4B_RS03960	WP_003724495.1	PTS mannose/fructose/sorbose transporter subunit IIC (lmo0782)	-23.46	2.00E-98
LM4B_RS13320	WP_003727687.1	hypothetical protein	-23.48	3.00E-172
LM4B_RS11130	WP_003724592.1	3-ketoacyl-ACP reductase	-24.08	2.00E-49
LM4B_RS12340	WP_003724168.1	hypothetical protein	-24.67	2.00E-32
LM4B_RS03970	WP_003721901.1	PTS mannose transporter subunit IID	-25.00	3.00E-39
LM4B_RS02040	WP_003723104.1	hypothetical protein	-25.13	4.00E-179

LM4B_RS00135	WP_003725640.1	PTS sorbose transporter subunit IIC	-25.32	3.00E-34
LM4B_RS00130	WP_003725639.1	PTS mannose transporter subunit IID	-25.56	4.00E-29
LM4B_RS13445	WP_003727677.1	sorbitol dehydrogenase	-26.33	5.00E-159
LM4B_RS13340	WP_003726308.1	PTS ascorbate transporter subunit IIC	-26.59	0
LM4B_RS00145	WP_003725641.1	hypothetical protein	-26.99	6.00E-165
LM4B_RS11045	WP_003722282.1	CsbD family protein	-27.05	7.00E-37
LM4B_RS13060	WP_009929083.1	2%2C5-diketo-D-gluconic acid reductase	-27.12	2.00E-68
LM4B_RS01440	WP_003724201.1	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	-28.31	4.00E-35
LM4B_RS02300	WP_012681100.1	internalin	-29.02	0
LM4B_RS02295	WP_012681099.1	internalin	-29.25	0
LM4B_RS02045	WP_003724315.1	hypothetical protein	-29.71	2.00E-90
LM4B_RS11785	WP_003727715.1	glutamate:gamma-aminobutyrate antiporter	-29.98	4.00E-179
LM4B_RS13620	WP_003724997.1	PTS-dependent dihydroxyacetone kinase phosphotransferase subunit DhaM	-31.13	1.00E-81
LM4B_RS13345	WP_003726309.1	PTS ascorbate transporter subunit IIB	-31.17	2.00E-07
LM4B_RS00210	WP_003734184.1	sugar kinase	-31.62	0
LM4B_RS13330	WP_003727686.1	creatinine amidohydrolase	-31.67	2.00E-22
LM4B_RS13325	WP_003726305.1	hypothetical protein	-31.72	1.00E-157
LM4B_RS13500	WP_003724981.1	ribose-5-phosphate isomerase	-32.13	8.00E-63

LM4B_RS13065	WP_003726061.1	MerR family transcriptional regulator	-32.50	3.00E-29
LM4B_RS13335	WP_003726307.1	phosphotriesterase	-32.76	8.00E-39
LM4B_RS02780	WP_012681126.1	6-phospho-beta-glucosidase	-32.89	2.00E-136
LM4B_RS00140	WP_003721640.1	PTS fructose transporter subunit IID	-33.71	1.00E-32
LM4B_RS12990	WP_003726480.1	hypothetical protein	-34.02	1.00E-90
LM4B_RS03955	WP_003721898.1	PTS mannose transporter subunit IID (lmo0781)	-34.92	3.00E-140
LM4B_RS13615	WP_012681469.1	dihydroxyacetone kinase subunit L (lmo2696)	-35.01	6.00E-42
LM4B_RS13455	WP_003722022.1	PTS galactitol transporter subunit IIC	-35.11	9.00E-90
LM4B_RS04855	WP_003726347.1	hypothetical protein	-35.84	2.00E-28
LM4B_RS13450	WP_003722021.1	galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	-36.99	4.00E-55
LM4B_RS13555	WP_003724990.1	PTS lactose transporter subunit IIC	-37.61	6.00E-58
LM4B_RS07155	WP_003725369.1	amino acid ABC transporter permease (lmo1425)	-37.68	2.00E-32
LM4B_RS01010	WP_003740376.1	listeriolysin O	-39.33	0
LM4B_RS13110	WP_003730782.1	methyltransferase (lmo2602)	-40.64	9.00E-42
LM4B_RS09780	WP_003723027.1	formate acetyltransferase	-48.35	0
LM4B_RS00525	WP_003721724.1	PTS mannose transporter subunit IID	-51.86	5.00E-80
LM4B_RS04675	WP_003727092.1	PTS lactose transporter subunit IIA	-54.82	8.00E-09
LM4B_RS13560	WP_003722042.1	PTS mannose transporter subunit IIA	-65.96	7.00E-17

LM4B_RS02655	WP_012681119.1	hypothetical protein (lmo2673 uspA)	-68.69	3.00E-32
LM4B_RS07930	WP_003725993.1	universal stress protein UspA (lmo1580)	-69.62	1.00E-54
LM4B_RS13495	WP_003724980.1	universal stress protein UspA	-85.23	2.00E-37

Fold change は 60 min の発現量／対照の発現量を示している． E-value は相同検索の結果の信用度を表している．

謝辞

研究全般に渡り格別なご指導，ご鞭撻そしてご高配を賜りました大阪市立大学大学院 生活科学研究科 西川 禎一教授に言葉では言い表せないほどの深謝の意を表します。私がここまで来ることができたのは先生の存在があってこそのものであります。研究だけでなく社会人としての考え方あるいは進み方など，多くのことを教えて頂きました。言葉のみならず行動あるいは背中でご教授頂いたことも少なくありません。私の人生に最も影響を与えた方と言っても過言ではないと思っています。感謝の気持ちは私のこれからの生き方を以て示したいと思います。いつの日にか先生に私が生徒であったことを誇りに思ってもらえる日が来れば，幸甚の至りです。

本研究の考察を深めるに当たり幅広い視点から貴重なアドバイスを賜りました本論文副査の大阪市立大学大学院 生活科学研究科 佐伯 茂教授，増田 俊哉教授に深く御礼申し上げます。先生方の的確なご助言により，本研究をより良い完成度の高いものにすることができました。

本研究について数多くのアドバイスを賜りました大阪市立大学大学院 生活科学研究科 中台（鹿毛） 枝里子准教授に深く感謝申し上げます。先生の研究室発足当初より様々なご指導を頂きました。また，子育てをしながら研究活動にも邁進される先生のお姿を見て，自分を奮起させる機会が何度もありました。

本研究の実施に当たり，*Listeria monocytogenes* 菌株をご提供頂きました大阪健康安全基盤研究所 微生物部 主任研究員 中村（板野） 寛海先生に感謝申し上げます。当研究室の先輩であり，国内屈指のリステリア研究者である先生には度々ご助言も賜りました。

本研究の実施に当たり，ご指導，ご鞭撻賜りました丸大食品株式会社 中央研究所 三明 清隆所長，杉山 雅昭顧問に深く感謝申し上げます。また，中央研究所，ハムソー事業本部商品企画課の皆様には多くのご助力頂きました。厚く御礼申し上げます。

環境健康科学研究室在校生，卒業生の皆様の存在，皆様と過ごした日々は私にとって一生の宝です。