

学 位 論 文 題 名

酸性食品から分離した有芽胞好酸性菌の微生物学的特性と
その制御に関する研究

学位論文内容の要旨

人間の生命および健康維持に必要な栄養成分を含有している食品は、微生物にとっても優れた培地となるため、保存中に腐敗や変敗が引き起こされる。そのため多種多様な食品の微生物制御法が考案されてきた。その中で加熱殺菌法は、最も安全、簡便かつ経済的な方法として多くの食品に利用されている。しかし、加熱殺菌法は、必ずしも完璧な微生物制御法とは言い難く、缶詰食品の変質および変敗事故は跡を絶たないのが現状である。

缶詰食品の変敗は、一般に耐熱性有芽胞細菌の残存に起因するが、酸性食品（pH 4.6 未満）では、増殖または発芽可能な細菌が限定されると共に芽胞の耐熱性も弱くなるため、低酸性食品（pH 4.6 以上）に比して比較的緩和な殺菌条件が採用されている。酸性食品の変敗原因菌には、耐熱性の強い *Bacillus coagulans* が重要視されているが、近年、これとは異なる正露丸様臭のする変敗酸性缶詰が発見され、その変敗への関与が示唆される細菌が分離された。同様な変敗例は米国においても報告されているため、製造物責任法および HACCP 方式が導入された現在、食品の安全性を向上させるために、これら変敗事故の原因究明とその制御法の確立は極めて重要な問題となっている。

そこで本研究では、この新規な変敗形式を惹起する酸性食品変敗菌の微生物学

的特性を調べると共に、その効率的な制御法、迅速同定および検出法を検討した。

第一章では、変敗酸性食品由来の細菌4株 (AB-1, 2, 4 および 5 株) の発育特性、同定およびその細胞特性を検討した。分離菌株は発育 pH 域が pH 2.5 ~ 5.8, 発育温度域が 25 ~ 60 °C で、既知のフラットサワー菌 *B. coagulans* とは明らかに異なること、またこれら分離菌株を酸性食品に再接種すると、2 ~ 3 日後に異臭が感じられたことから、本分離菌株を新しいタイプの酸性食品変敗菌と推定した。そこで、分離菌4株の一般性状、DNA-DNA 相同性および 16S rDNA 塩基配列を決定し、種レベルでの同定を行った。その結果、分離菌株は全てグラム陽性有芽胞桿菌で、細胞中に ω -シクロヘキシル脂肪酸 (ω -cyc FA) を 90 % 前後保有し、G+C 含量が 52.2~53.0%, 発育 pH 域が酸性域のみであること、また類縁菌株との DNA-DNA 相同性、16SrDNA 塩基配列の相同性とその系統解析および RAPD-PCR 産物の電気泳動パターンの類似性から、AB-1, 2, 4 株を *Alicyclobacillus acidoterrestris* に、また AB-5 株を *A. acidoterrestris* の亜種と同定した。

次に、これらの酸性食品変敗菌の代表株に AB-1 株を選び、*Alicyclobacillus* 属に特有な ω -cyc FA 生成量と培養条件との関係を検討した。その結果、pH が至適発育 pH から外れた時、または培養温度が上昇した場合に同脂肪酸量が増加した。この環境 pH の変化に伴う増加は厳しい環境に適応するための自己防御現象を、また培養温度の上昇に伴う増加は、飽和脂肪酸である同脂肪酸が高温域での細胞膜流動性の保持に関与している可能性を示唆する結果であった。

さらに、これら分離菌株の代表株としての AB-1 株の酸性適応能を解明するため、まず細胞壁成分と好酸性との関係を検討した。しかし、AB-1 株のプロトプラスト安定性が中性域よりも酸性域で安定していたことから、酸性適応能には細胞

壁成分の関与は少ないものと判断した。一方、細胞膜成分と好酸性との関係では、細胞膜結合型 H^+ -ATPase の性質が、AB-1 株とその酸感受性変異株 NeoR1 株 (最低発育 pH が親株より 1 pH 単位高い株) を比較すると、NeoR1 株で、 H^+ -ATPase の至適 pH 範囲が中性側に 1 pH 単位変動していたことから、*A. acidoterrestris* の酸性適応能要因の一つに H^+ -ATPase の酸性安定性を推察した。

第二章では、食品中における AB-1 株の芽胞および発芽後栄養細胞の制御法を確立するため、芽胞の性質、耐熱性および発芽後の増殖抑制法を検討した。AB-1 株芽胞の耐熱性は、 $D_{84^{\circ}C}$ = 約 76 分、 $D_{89^{\circ}C}$ = 約 10 分、 $D_{95^{\circ}C}$ = 約 1.4 分、 z 値 = 6.2 $^{\circ}C$ で、*B. subtilis* のそれに比較してそれほど高くなかった。しかし、一般的な芽胞形成菌で見られる芽胞浮遊液の pH 低下に伴う耐熱性の低下が見られないことは極めて特徴的であった。この要因を検討し、浮遊液 pH 変動に伴うジピコリン酸放出量および芽胞中の Ca^{2+} および Mn^{2+} 量の変化が、一般的な *Bacillus* 属細菌と比較して極めて少ないことを認め、特に AB-1 株の芽胞にはこれら金属イオンを強固に結合する特殊な機能が存在するため、浮遊液の pH 低下に伴う耐熱性の低下が見られないのではないかと推察した。

次に AB-1 株芽胞の耐熱性低下および発芽後栄養細胞の増殖抑制に有効な保存料を検討し、芽胞耐熱性の低下にはリゾチームが有効で、0.02% 添加で耐熱性が約 1/5 に、また実際の酸性食品でも 0.05% 添加で耐熱性が約 1/2 になることを明らかにした。発芽後の増殖抑制には、リゾチーム、プロタミン、 ϵ -ポリリジン、酢酸、ミリスチン酸、ショ糖モノパルミチン酸エステル、ペンタグリセリンジカプリン酸エステルおよびショ糖モノラウリン酸エステルが有効であることを示した。従って、本菌による変敗事故の根絶には、リゾチームと上述の保存料との併

用が最良と判断された。

第三章では、本変敗菌の来源と分子生物学的手法による迅速同定および検出法の検討を行った。来源は、一般の有芽胞細菌と同様に土壤、特に酸性土壤由来であることを明確にした。従って、本変敗菌は農産物を主または副原料とした食品で混入の可能性が高く、また製品の pH が酸性側に調整された場合に変敗の発生する可能性が十分考えられた。次に、本変敗菌の迅速同定および検出法の開発を試みた。まず、迅速同定を RAPD 法で行った。3 種類のプライマー Ba 10, F 61 および F 64 を用いた時に本変敗菌と他の細菌との識別が可能であった。さらに、迅速検出は RT-PCR 法で行った。本変敗菌 16S rDNA 塩基配列の V2 および V4 領域の種特異的配列をプライマーとし、2~3 cells/ml のような微量な菌体量でも 15 時間の増菌後に検出可能な高感度迅速検出法を確立した。また検出感度は、FHLP 濾過膜による菌体濃縮と RNA 特異吸着膜の併用で検出感度を向上させることができた。本研究で開発した迅速検出法は 24 時間以内に検査結果が得られるため、新自主衛生管理システムの HACCP 方式の主目標である微生物制御への迅速な対応が期待できると考える。

以上、本研究では、変敗酸性缶詰食品から分離した細菌が、新しいタイプの酸性食品変敗原因菌 *A. acidoterrestris* であることを明らかにし、その芽胞の耐熱特性から、少なくとも酸性食品の殺菌条件設定時における新しい指標菌の一つとして採用することを提起すると共に、缶詰食品中における制御法も確立した。さらに HACCP 方式に対応可能な迅速同定法および検出法についても検討を試み、実用化に向けた満足し得る結果を得た。これらの成果は、今後の酸性食品の微生物管理における貴重な知見になるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 信 濃 晴 雄
副 査 教 授 絵 面 良 男
副 査 教 授 猪 上 徳 雄

学位論文題名

酸性食品から分離した有芽胞好酸性菌の微生物学的特性と その制御に関する研究

缶詰食品の変敗は、一般に耐熱性有芽胞細菌の生残に起因するが、酸性食品では、増殖または発芽可能な細菌が限定され、また芽胞の耐熱性も弱くなるため、低酸性食品に比較して緩和な殺菌条件が採用されている。酸性食品の変敗原因菌には *Bacillus coagulans* が重要視されているが、近年、これとは異なる正露丸様臭のする酸性缶詰食品が発見され、その変敗への関与が示唆される細菌が分離された。同様な変敗例は米国においても報告されているため、製造物責任法の施行および HACCP 方式の導入が懸案となっている現在、食品の安全性を向上させるためにも、これら新しいタイプの変敗事故の原因究明とその制御法の確立は極めて重要である。

そこで本論文では、この新しいタイプの酸性食品変敗原因微生物の微生物学的特性を調べると共に、その効率的な制御法および HACCP 方式に活用できる迅速同定および検出法を検討している。

第一章では、変敗酸性食品由来の細菌 4 株の (AB-1, 2, 4 および 5 株) の発育特性、同定およびその細胞特性について詳細に検討している。分離菌株は全てグラム陽性有芽胞桿菌で、発育至適 pH および温度域が pH 2.5 ~ 5.8, 25 ~ 60 °C で、細胞中に ω -シクロヘキシル脂肪酸を 90 % 前後保有すること、また分子生物学的手法により類縁菌株との DNA-DNA および 16S rDNA 塩

基配列の相同性ならびに系統関係から、*A. acidoterrestris* と明確に同定し得る実験結果を示している。

次に新しいタイプの酸性食品変敗原因菌の代表株に AB-1 株を選び、その酸性適応能の解明を試み、AB-1 株のプロトプラスト安定性が中性域よりも酸性域で安定していたことから、酸性適応能には細胞壁成分の関与はないものと判断している。一方、細胞膜成分の一つである細胞膜結合型 H^+ -ATPase の性質は、AB-1 株とその酸感受性株（最低発育 pH が親株より 1 pH 単位高い変異株）を比較した場合、酸感受性株で、 H^+ -ATPase の至適 pH 範囲が中性側に 1 pH 単位変動することから、*A. acidoterrestris* の酸性適応能要因の一つに H^+ -ATPase の酸性安定性を推察している。

第二章では、食品中の AB-1 株芽胞および栄養細胞の制御法の確立を試みている。AB-1 株芽胞の耐熱性は、 $D_{90, c}$ 値が約 10 分であったが、芽胞浮遊液の pH 低下に伴う耐熱性の低下は見られないことを観察し、この要因を浮遊液 pH 変動に伴うジピコリン酸放出および芽胞中の Ca および Mn の置換が極めて少ないことを明らかにし、AB-1 株の芽胞にはこれら金属イオンを強固に結合する特殊な機能が存在するためと推察している。

次に AB-1 株芽胞の耐熱性低下および発芽後の栄養細胞の増殖抑制に有効な保存料を検討し、芽胞耐熱性の低下にリゾチームが、また発芽後の増殖抑制には、リゾチーム、プロタミン、 ϵ -ポリリジン、酢酸、ミリスチン酸、各種シヨ糖脂肪酸エステルが有効であることを明らかにしている。

第三章では、本変敗菌の来源の検討と分子生物学的手法による迅速同定および検出法の開発を行っている。来源は、一般の有芽胞細菌と同様に土壤由来で、特に酸性土壤由来であることを明らかにし、農産物を主または副原料に使用する食品では、混入の可能性を示唆している。次に、本変敗菌の迅速同定および検出法の開発を行っているが、まず、迅速同定は RAPD 法を採用し Ba10, F61 および F64 の 3 種類のプライマーを用いた時に本変敗菌と他の細菌との識別が可能であることを見出し、さらに迅速検出は、本変敗菌 16S rDNA 塩基配列の V2 および V4 領域の種特異的配列をプライマーと

し、初発菌数 2-3 cells/ml で検出可能な高感度迅速検出法を確立している。また検出感度は、FHLP 濾過膜による菌体濃縮と RNA 特異吸着膜の併用で夾雑物を除去することにより向上させることが出来るとしている。本研究で開発した迅速検出法は 24 時間以内に検査結果が得られるため、HACCP 方式の主目標である微生物制御への迅速な対応が期待できることを実験的に明示している。

以上、本論文では、変敗酸性缶詰食品から分離した細菌が、新しいタイプの酸性食品変敗原因菌 *A. acidoterrestris* であることを明らかにし、その芽胞の特性を調べ、本菌種も酸性食品殺菌条件設定時の新しい指標菌に加える必要性を提起すると共に、その制御法も確立している。さらに HACCP 方式に対応可能な迅速同定法および検出法についても検討を試み、満足し得る結果を得ている。これらの成果は、今後の酸性食品の微生物管理における貴重な知見であって、博士(水産学)の学位を授与されるに値するものと考えられる。