

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05477

研究課題名(和文)細菌由来の揮発性化合物を指標とする食品危害細菌検出法の開発

研究課題名(英文) Detection of foodborne pathogens by using volatile organic compounds released from them as indices

研究代表者

小林 弘司 (KOBAYASHI, HIROSHI)

福岡女子大学・国際文理学部・准教授

研究者番号：00610255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌が産生する揮発性物質(におい)を指標として、食品衛生上重要な細菌を簡易迅速にスクリーニング検査する方法を確立した。細菌由来揮発性化合物(MVCs)を電子嗅覚システムを用いて分析した結果、最適化された条件下では純粋系においては属、種まで判別できるものがあること、さらに牛乳やカット野菜といった食品試料を用いても、衛生指標となる細菌(黄色ブドウ球菌、大腸菌群、病原大腸菌)の存在の有無が判別できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品の細菌検査は、培養法、イムノクロマト法、PCR法など、増菌培養液から菌体(核酸、タンパク質)を取り出して検出する方法が多く用いられている。これらは確実・高感度である一方、培養液を取り出す際の液の飛び散りなど、食品工場においては汚染リスクになる問題があった。本研究で確立した検出法は、測定対象が培養液中の菌体ではなく、菌体が産生した揮発性化合物であるため、培養液を取り出すリスクはない。また、固相マイクロ抽出(SPME)法を用いることで、揮発性成分の濃縮が簡便になるため、簡易・迅速な食中毒細菌の検出が可能になった。

研究成果の概要(英文)：A simple and rapid screening method for foodborne bacteria using volatile compounds (odor) produced by bacteria as an indicator was established. The analysis of microbial volatile compounds (MVCs) was performed using an electronic olfactory system. Under optimized conditions, some bacteria could be identified as genera or species in pure systems. The system was also applicable for the detection of foodborne bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, or pathogenic *Escherichia coli*) in milk and ready-to-eat vegetables.

研究分野：食品衛生

キーワード：食中毒細菌 MVCs 簡易迅速検査

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食品の食中毒細菌検出法は、培養法、イムノクロマト法、PCR法など、増菌培養液から菌体(核酸、タンパク質)を取り出して検出する原理のものが多い。一方で、細菌を培養すると様々な気体も発生する。これまでに発生した二酸化炭素を指標とする検出法が製品化されているが、産生される揮発性物質(MVCs)を検出対象とした検査法は確立されていない。菌体を測定対象とする細菌検出法は高感度であるが、培養液を取り出す際の液の飛び散りなど汚染のリスクを伴う。さらに、培養法には長時間要すること、PCR法では実験操作に熟練の技術を要することが考えられる。本研究で確立を目指す検出法は、測定対象が培養液中の菌体ではなく、菌体が産生した揮発性化合物であるため、固相マイクロ抽出(SPME)法といった液体では不可能であった簡易・高感度な濃縮が可能となり、高感度な食品危害細菌の検出が可能になると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は高速GCを基盤とした電子嗅覚システムを用いて、食品衛生上重要な細菌の特異的MVCsを分析し、これを指標としたスクリーニング法を構築することを目的とする。さらに、属や種に特異的なMVCsについては、データベースを作成する。

### 3. 研究の方法

本研究は、1)使用する培地の最適化、2)揮発性化合物の捕集条件の最適化、3)最適化された条件下での各種細菌のMVCsパターン解析、4)食品検査への応用を検討した。

本研究室が保有する34菌株について、様々な液体培地に接種し37°Cにて一晚培養し、産生されたMVCsは種々の条件下で固相マイクロ抽出(SPME)法により捕集し、超高速GCシステム(電子嗅覚ノーズHeracles)に供した。超高速GCではMXT-5・MXT-WAXカラム(並列配置)を用いた。なお、高速GCでは、40から250まで1.5/sで昇温分析を行った。得られた細菌のクロマトグラムの中で、識別指数の高いピークを選び、主成分分析による群分けを行い、培地および捕集条件を最適化した。さらに、食品からのスクリーニング検査の例として、牛乳とカット野菜など常在細菌存在下でも本法が応用可能か検討を行った。

### 4. 研究成果

種々の増菌用液体培地を検討した結果、検出されたピークパターンが多彩であったTryptic soy broth(TSB)を測定用培地として決定した。また、大腸菌または黄色ブドウ球菌の純粋培養におけるMVCsのファイバーへの吸着温度(37°C、60°Cおよび80°C)を検討した結果、大腸菌では吸着温度が高いほど細菌特有のピークは大腸菌で大きくなる一方、培地特有のピークは大腸菌および黄色ブドウ球菌の両方で大きくなった。各吸着温度における主成分分析結果により、どの吸着温度でも菌種の識別力には有意な差はないことが明らかとなった。本研究では細菌由来揮発性化合物を測定対象とするため、培地成分の影響が小さい方が望ましいと考え、最適な吸着温度は37°Cとした。

次に、純粋培養系における細菌の属によるMVCsの違いを検討し、MVCsによる属の推定が可能かについて検討を行った。大腸菌群5属、18株のMVCsの主成分分析を行ったところ、*Escherichia*属と*Enterobacter*属と*Klebsiella*属-*Serratia*属-*Citrobacter*属の3つのグループに分けられた。よって、*Escherichia*属と*Enterobacter*属は属の判別が可能であったが、*Klebsiella*属、*Serratia*属、*Citrobacter*属の判別は難しかった。GC-MSを用いて大腸菌および黄色ブドウ球菌のMVCsの同定を行った結果、3-メチル-1-ブタノールが共通して検出され、大腸菌からはインドール、1-ドデカノールが、黄色ブドウ球菌からはDL-2-メチル酪酸エチルが特異的に検出された。さらに、大腸菌について菌株の違いによるMVCsについて検討した。非病原大腸菌3株、病原大腸菌1株のMVCsを測定した結果、非病原大腸菌の菌株間ではMVCは類似していたが、病原大腸菌と非病原大腸菌では異なっていた。主成分分析のローディングプロット解析により、非病原大腸菌に特異的なMVCsはなく、有意に強いMVCsも少なかったが、病原大腸菌では、特異的なMVCsと非病原大腸菌に比べて有意に高いMVCsが複数存在した。これらは新規に2-Heptanone、2-Nonanone、1-オクタノールと2'-アミノアセトフェノン、デカン酸エチルであることを同定した。これらの化合物を指標とすることで病原大腸菌のスクリーニングが可能になると期待された。また、これらの生成量は対数増殖期に最大になり、定常期以降は減少したため、培養時間を考慮した測定が重要になると考えられた。

また、MVCsを指標としたスクリーニング検査法により食品試料(牛乳)から大腸菌群、あるいは黄色ブドウ球菌の検出が可能かを検討した結果、どの製造会社の牛乳においても牛乳培養物のMVCs分析により大腸菌群の有無、さらに黄色ブドウ球菌の存在の有無が判別可能であることが示された。食品の測定で得られたクロマトグラムと、純粋培養系における測定で得られたクロマトグラムの比較を行った結果、3-メチル-1-ブタノール、DL-2-メチル酪酸エチル、インドールは純粋培養および牛乳培養物から検出されたため、これらの揮発性物質を指標とする検出法が開発できることが期待された。さらに、市販カット野菜を試料した場合でも、本法により、E.

coli 陰性のカット野菜、E.coli 陽性のカット野菜、さらには *E.coli* 0157 で 汚染されたカット野菜の判別が可能であった。このため、本検査法は夾雑菌の多い非加熱食品へも応用可能であることが示された。

以上、本研究の成果により、MVCs を解析することで、簡易迅速高感度な食品衛生上重要な細菌のスクリーニングが可能になることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 弘司、阿部 萌瑛、太田 香穂、南 育子、石川 洋哉
2. 発表標題 Development of Bacteria Screening Method by Using Microbial Volatile Compounds
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 洋哉  (ISHIKAWA Hiroya)  (00325490)	福岡女子大学・国際文理学部・教授    (27103)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------