

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580216

研究課題名（和文） 抗リステリア性ペプチドによる食品の安全性確保に関する研究

研究課題名（英文） Study of food biopreservation using anti-listerial peptides to ensure food safety

研究代表者

山崎 浩司 (YAMAZAKI KOJI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：40250500

研究成果の概要(和文)：

リステリア菌による食中毒を防止するため、抗リステリア性ペプチドを利用した食品保存に関する研究を行った。乳酸桿菌 *C.maltaromaticum* CS526 株のバクテリオシン Piscicocin CS526 産生が pH によって制御されていること、細菌細胞への抗リステリア性ペプチドの吸着特性を利用した効率的な簡易 1 ステップ精製法を開発した。さらに、抗リステリア性ペプチド産生 *C.maltaromaticum* FS-B 株の培養発酵粉末を利用した食品におけるリステリア菌の効果的な制御法を確立した。

研究成果の概要(英文)：

This study was undertaken to establish a new technology, using anti-listerial peptides, to ensure food safety. Production of an anti-listerial peptide, piscicocin CS526, produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CS526 was regulated with environmental pH. A simple one-step isolation method, based on the adsorption-desorption property to bacterial cells, was developed for piscicocin CS526. A freeze-dried bioactive fermented powder with anti-listerial peptide produced by *C.maltaromaticum* FS-B was effective for the control of *L.monocytogenes* in a food model at refrigeration and frozen temperature, suggesting that the fermented powder will be a powerful tool to ensure food safety against *L.monocytogenes* contamination in foods such as ready-to-eat products.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野:農学

科研費の分科・細目:水産学・水産化学

キーワード:食品微生物,食品保蔵,リステリア菌,バイオプリザベーション

## 1. 研究開始当初の背景

リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) は、死亡率の極めて高い(最高 48%)大規模なヒトのリステリア症を引き起こす食中毒原因菌として、世界的に食品衛生上、最も重要視されている細菌のひとつである。欧米では毎年、本菌による食中毒事故が発生し、また加工食品から多数検出さ

れ、食品リコールの対象となりその経済的損失は極めて大きい。

日本では、現在まで本菌による食中毒が発生していないため、欧米諸国と比較してリステリア菌に対する関心は依然として低い。そこで申請者はまず、日本で流通する水産食品のリステリア菌汚染状況を調べ、欧米と同頻度に汚染され

ていることを明らかにした (Yamazaki *et al.*, *Fisheries Sci.*, 66, 1193-1195, 2000)。非加熱状態で摂食する機会の多い水産食品では、諸外国の例のようにリステリア菌による集団食中毒の発生も危惧されるため、リステリア菌の動態解明と食習慣に適合した制御法の確立が急務と考え、これまでに以下のような結果を得てきた。(1)海水中でリステリア菌は培養できないが活着している状態(VNC)となり得ること、(2)水産発酵食品でのリステリア菌は、共存微生物の種類によって生存性が変化すること、(3)水産食品からリステリア菌に対して特異的に抗菌効果を発揮する乳酸菌を分離、その抗菌物質の一次構造の決定、抗菌作用機構の解明、さらに (4)リステリア菌を含む食品変敗菌制御にペプチド性抗菌物質が有効であること。以上、リステリア菌の食品中での制御に申請者が見出した新規抗菌ペプチドの利用が有望であることを明らかにしてきたが、その実用化にあたっては乳酸菌の産生する抗菌ペプチドの効率的な生産と精製法の開発、さらに対象食品に適した使用法の確立が欠かせない。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が分離した乳酸菌株 (*Carnobacterium maltaromaticum* CS526 株, FS-B 株および *Pediococcus pentosaceus* Iz.3.13 株)の抗リステリア性抗菌ペプチドの最適産生条件、産生制御機構および細菌細胞吸着・脱離機構を明らかにした後、これを基にした抗リステリア性ペプチドの効率的な精製・生産システムを構築し、食品、特に水産食品中におけるリステリア菌の効果的な制御法を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1)供試菌株

バクテリオシン産生菌には *C. maltaromaticum* CS526 株 (Piscicocin CS526 産生株)、抗菌活性指標菌に *L.monocytogenes* IID581 株を用い、Tryptic soy broth (TSB)または Tryptic soy agar (TSA)で 30℃培養したものを使用した。

### (2)バクテリオシン活性の測定

バクテリオシン活性は、寒天ウェル拡散法 (Tagg *et al.*,1971)を改変して行った。

### (3)バクテリオシン産生に及ぼす pH の影響

1M HCl または 1M NaOH を用いて任意の pH(pH5.0, 6.0, 7.0, 8.0)に調整した 0.5%酵母エキス添加 TSB 培地 (TSBYE) に *C.maltaromaticum* CS526 株の新鮮培養菌液を 1% (v/v)となるよう接種し PH-Micro (アクアベース)およびペリスタポンプ(SJ-1211L,アトー)を用いて培地中に 5M NaOH を送液しながら pH を一定に保持して 20℃で攪拌培養(40rpm)した。また、5M HCl または 5M NaOH を用いて

TSBYE(pH8.0)の培養 pH を培養途中で変化させながら 20℃で攪拌培養した。経時的に培養液を採取し、濁度(OD660nm)、pH および遠心分離後の上清を加熱(80℃,15 分間)した試料の抗菌活性を上述の方法で測定した。

### (4)細菌細胞に対する Piscicocin CS526 吸着および脱離率の測定

各種細菌の新鮮培養菌体を、*C.maltaromaticum* CS526 株の加熱培養上清に懸濁後、任意の温度で任意の時間静置後、再度 80℃, 15 分間加熱し、その上清の抗菌活性を測定し、初期加熱培養上清の抗菌活性量に対する残存活性量を求め、吸着率を比較した。また、脱離率は、あらかじめ Piscicocin CS526 粗抽出液に各種細菌細胞を懸濁し、Piscicocin CS526 を吸着させた後、各種回収液で 30℃, 30 分間細胞を洗浄し Piscicocin CS526 を回収後、その上清の抗菌活性を測定値から算出した。

### (5) *C.maltaromaticum* FS-B 株を用いた食品中での *L.monocytogenes* 制御

#### ① *C.maltaromaticum* FS-B 株発酵粉末調製用培地の検討および発酵粉末の調製

FS-B 株新鮮培養菌液を 6 種類の発酵培地に接種し、25℃で培養しながら経時的に OD660nm と培養上清の抗菌活性を寒天ウェル拡散改変法で測定した。なお、活性指標菌には *L.grayi* ATCC25401 株を使用した。

発酵粉末の調製は、FS-B 株新鮮培養菌液を酵母エキス-シュクロース培地 (YS 培地)に接種し、25℃, 12 時間培養後、加熱処理(80℃, 20 分間)を施し、菌体を殺菌した。これを凍結乾燥して粉末化した。

#### ②発酵粉末と有機酸複合系の *L.monocytogenes* に対する発育阻止効果の検証

1~5%の発酵粉末を添加した TSBYE 培地に各種有機酸を所定の濃度となるよう添加し、これに *L.monocytogenes* を接種した。これを 30℃, 24 時間培養した後、肉眼的に発育の有無を確認し、最少発育阻止濃度 (MIC) を決定した。

#### ③ミートパテにおける *L.monocytogenes* の発育に及ぼす発酵粉末-有機酸複合系の影響

挽肉(牛:豚=7:3)に発酵粉末を 1%(w/w)、フィチン酸を 0.1, 0.25 または 0.5%(v/w)となるよう添加し、これに *L.monocytogenes* IID579 株, IID581 株および ATCC19114 株の等量混合菌液を接種し、スタマッカーでよく混合した。この混合挽肉をアルミシャーレに 10g ずつ採取し、オーブンレンジで 180℃, 2 分間加熱した。加熱済みの挽肉をスタマックバッグに移し、4℃または -20℃で 1 週間保存した。保存中、経時的に試料を取り出し、0.1%ペプトン水で希釈・混合後、挽肉中の *L.monocytogenes* 生菌数 PALCAM 平板培地を用いた表面塗抹法(30℃, 48 時間)で

計数した。なお、-20℃で凍結した試料は 20℃、30 分間解凍し、試験に供した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Piscicocin CS526 産生に及ぼす初発培養 pH の影響

初発 pH6.0 および 7.0 に調整した TSBYE で 20℃にて培養したところ、*C.maltaromaticum* CS526 株の発育とともに Piscicocin CS526 活性が上昇し、対数増殖期後期の培養 16 時間後に最大活性 34,171 AU/ml および 51,257AU/ml となり、その後抗菌活性は低下した。一方、初発 pH8.0 で培養した場合、*C.maltaromaticum* CS526 株の発育は良好であったが、Piscicocin CS526 の最大活性は著しく低く、培養 24 時間で 20,249AU/ml に留まった。初発 pH5.0 の場合には *C.maltaromaticum* CS526 株の発育は極めて遅く、Piscicocin CS526 の最大活性 2,278 AU/ml と低かった。本実験における Piscicocin CS526 の最大活性を示した時の pH を見ると、初発 pH6.0,7.0,8.0 のいずれにおいても活性が明瞭に認められたのは pH6.0 付近であった。したがって、*C.maltaromaticum* CS526 株の Piscicocin CS526 産生が初発 pH だけでなく、培養中の培地 pH に影響を受けている可能性が強く示唆された。

##### (2) Piscicocin CS526 産生に及ぼす培養 pH の影響

培養 pH が 6.0,7.0 および 8.0 一定となるように調整しながら培養した結果、Piscicocin CS526 の最大活性は pH6.0 で 26,577AU/ml であったものが、pH7.0 および 8.0 では 10,125 および 6,750AU/ml と減少した。その後、pH8.0 培養のもので培養 12 時間後に pH8.0 から pH6.0 へ培養 pH を急激に変化させると pH シフト直後から Piscicocin CS526 活性が上昇しはじめ 20,249AU/ml まで増加した。一方、培養 20 時間後に pH を再度 6.0 から 8.0 に変化させると、それに伴い抗菌活性は低下し、再度 pH8.0 から 6.0 へ変化させると pH 変化直後に活性の上昇が認められることを見出した。さらに、この抗菌活性の上昇に Piscicocin CS526 産生菌の細胞表面からのバクテリオシン脱離が関与しないことも明らかとし、*C.maltaromaticum* CS526 株の Piscicocin CS526 産生が pH によって制御されていることを見出した。

##### (3) Piscicocin CS526 の細菌細胞への吸着および回収方法の検討

Piscicocin CS526 の各種細菌細胞 (*L.monocytogenes* IID581 株, *Enterococcus hirae* JCM8729 株, *C.maltaromaticum* JCM5348 株, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* JCM1134 株) への吸着条件を検討した結果、30℃、30 分間の条件で吸着量は最大となった。次に吸着さ

せた菌体からの脱離法について検討を行ったところ、界面活性剤 Tween 80, Triton X-100 および CHAPS 溶液 (0.1%) で菌体を洗浄したところ、いずれの吸着菌においても安定した回収率が得られ、特に Tween 80 溶液では回収率が 20~30% 前後と最も高かった。しかし、Tween 20, Tween 40 および Tween 60 溶液では Tween80 溶液よりも総じて低く、また各種無機塩溶液、pH シフト法 (Yang et. al., 1992) においても回収率は低く、Tween 80 溶液が回収液として適していることが明らかとなった。次に、この Tween 80 を用いた新しいバクテリオシンの簡易精製法を Piscicocin CS526 に適用したところ、既報のカラムクロマトグラフィーを複数使用した精製法と比較して、精製度は約 70%、回収率は 10 倍以上となり、電気泳動的に単一な成分として単離されていることを証明した。また、この細菌細胞への吸着・脱離特性を利用した精製法は、加熱死菌を使用した場合にも同様の精製度と回収率で行えることも明らかにした。したがって、本研究において Piscicocin CS526 の安全かつ簡易で効率的な精製のための基本的な手法が確立できた。

##### (4) *C.maltaromaticum* FS-B 株を用いた食品中の *L.monocytogenes* の制御

食品に *C.maltaromaticum* FS-B 株の産生する抗リステリア性ペプチドを適用するには本菌株の発酵液を粉末化し、添加することが最適と考え、まず食品への添加可能な培地を検討した。MRS 培地をベースとし、種々の培地の検討を行った結果、食品添加物用酵母エキス (アロマイルド) およびシュクロースのみの培地が、非常に安価で安定した抗菌活性の得られる培地であることを見出した。この培地で調製した発酵粉末の抗菌活性は 115,000AU/g と極めて高力価であった。次に、この発酵粉末の低温下および凍結下における *L.monocytogenes* への影響を検討し、4℃において発酵粉末の添加によって *L.monocytogenes* の生菌数が著しく減少させることのできることを、また凍結下においても発酵粉末非添加区と比較して、添加することで生菌数を少なくすることのできることを明らかとし、*C.maltaromaticum* FS-B 株発酵粉末がコールドチェーンにおいても有効なハードルとなる可能性が示唆された。

さらに、発酵粉末の添加量を少なくするために有機酸との併用効果について検討し、それらの最少発育阻止濃度 (MIC) 値から *C.maltaromaticum* FS-B 株発酵粉末と相乗効果のある有機酸の選定を行った。その結果、種々の有機酸との間で複合効果が確認され、特にクエン酸とフィチン酸でその効果の高いことを見出した。

最後に、実際の食品中で発酵粉末-フィチン酸複合系の有効性を検証するため、ミートパテをモデルとして確認した。多くの加工肉食品では加熱処理が前提とされているため、生肉に発酵

粉末およびフィチン酸を添加し、これを *L.monocytogenes* で汚染した後、加熱処理を行った。その結果、発酵粉末添加区の加熱直後の *L.monocytogenes* の生菌数は発酵粉末非添加の場合と比較して減少し、さらにフィチン酸の濃度依存的に減少量は大きくなった。その後、4℃で保存すると *L.monocytogenes* の生菌数は発酵粉末添加区でさらに減少し、1%発酵粉末+0.25%フィチン酸複合系では4日目に検出限界未満(<1.7LogCFU/g)に達した。一方、発酵粉末非添加区ではわずかな生菌数の増加が見られた。また、凍結保存においても、すべての複合系で発酵粉末非添加区の場合より、添加区で生菌数が少なかった。したがって、実際の食品においても *C.maltaromaticum* FS-B 株の産生する抗リステリア性バクテリオシン含有発酵粉末-フィチン酸複合系の抗菌力が十分に発揮し、*L.monocytogenes* の発育を制御できることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Bagenda, D.K., K.Yamazaki, and Y.Kawai : Assessing and enhancing the antimicrobial effect of nisin in soy-seasoned salmon *Oncorhynchus keta* roe using a *Pediococcus pentosaceus* fermentate and pectin, *Fisheries Science*, 76, 査読有, 395-401(2010).
- ② Kobayashi, T., K.Yamazaki, D.K. Bagenda, and Y. Kawai: Influence of medium components and growth conditions on Pediocin Iz.3.13 production by *Pediococcus pentosaceus* Iz.3.13, isolated from Japanese traditional fermented seafood, *Bulletin of Fisheries Science, Hokkaido University*, 査読無, 60, 5-12 (2010).
- ③ Bagenda, D.K., K.Hayashi, K.Yamazaki, and Y. Kawai : Characterization of antibacterial substances (ABS) produced by *Pediococcus pentosaceus* Iz.3.13 isolated from Japanese fermented marine food, *Fisheries Science*, 査読有, 74, 439-448 (2008).

[学会発表] (計 10 件)

- ① 勝間田涼, 山崎浩司, 川合祐史: バクテリオシン産生 *Carnobacterium maltaromaticum* FS-B 株の発酵粉末を用いたリステリア菌の制御, 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学(東京都品川区)(2011.3.28) (震災の影響により口頭発表・ポスター発表は中止されたが、講演要旨集の刊行をもって本大会における発表として取り扱うこととなった)
- ② Yamazaki, K., Kobayashi, T, Bagenda, D.K. and Kawai, Y. : Synergistic inhibition of *L. monocytogenes* by a combination of nisin, sucrose fatty acid esters and citric acid, The

13<sup>th</sup> International Symposium on the “Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources (Gangneung, Korea), Abstract No.34 (Poster)(2010.6.4).

- ③ 佐久間涼, 小林哲也, 山崎浩司, 川合祐史 : *Carnobacterium maltaromaticum* の産生する piscicocin CS526 産生に及ぼす培養温度および培養 pH の影響, 第 30 回日本食品微生物学会学術総会, タワーホール船堀(東京都江戸川区)(2009.10.8).
- ④ 小林哲也, 勝間田涼, 佐久間涼, 山崎浩司, 川合祐史 : リステリア菌の発育に及ぼすナイシンと乳化剤の複合効果, 第 30 回日本食品微生物学会学術総会, タワーホール船堀(東京都江戸川区)(東京)(2009.10.8).
- ⑤ Bagenda, D.K., K.Yamazaki, Y.Kawai : Agar enhances pediocin production in broth and reduces degradation in a soy-seasoned salmon roe food model, IAFP (Texas, U.S.A.) (2009.7.13).
- ⑥ Bagenda, D.K., K.Yamazaki, Y.Kawai : Preservation of antimicrobial activity of bacteriocins in temperature-abused ready-to-eat salmon roe using soy-seasoning and pectin. The IFT Annual Meeting (Anahaim, U.S.A.), Abstract 011-02 (2009.6.7).
- ⑦ 勝間田涼, 小林哲也, 山崎浩司, 川合祐史: ホッケすり身由来抗リステリア性 FS-B 株の同定とその抗菌特性, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学(東京都品川区)(2009.3.29).
- ⑧ Bagenda, D.K., K.Yamazaki, and Y.Kawai : Supplementing soy-seasoning with pectin, nisin and a *Pediococcus* fermentate, reduces processing waste and inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in seasoned roe without affecting palatability, IAFP's Third European Symposium on Food Safety, Lisbon, Portugal (2008.11.3).
- ⑨ Bagenda, D.K., K.Yamazaki, Y.Kawai, T.Sato, M.Yajima : A pectin-bacteriocin coating protects soy-seasoned roe against *Listeria monocytogenes* under temperature abuse conditions, 第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 講演要旨集 C05, 広島国際会議場(広島市)(2008.11.12).
- ⑩ 小林哲也, Bagenda D.Kasujja., 山崎浩司, 川合祐史: *Pediococcus pentosaceus* Iz.3.13 の産生するバクテリオシンの最適産生条件, 日本食品科学工学会第 55 回大会, 講演要旨集 3Gp, 京都大学(京都市)(2008.9.7).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 浩司 (YAMAZAKI KOJI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号:40250500

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし