

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450173

研究課題名(和文) 必須アミノ酸による食品有害細菌の増殖抑制効果：作用機構の解明と予測モデルの開発

研究課題名(英文) Control of pathogenic bacterial growth by using amino acid: Investigation of the working mechanism

研究代表者

小関 成樹 (Koseki, Shigenobu)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70414498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新たな微生物制御技術の開発を最終的な目的とし、D-トリプトファンによるE. coliの増殖抑制効果に関する基礎的な検討を行った結果、以下の3点を明らかにした。1) D-トリプトファンによるE. coliの増殖抑制効果は浸透圧ストレスのみによって誘導されるものでなく、NaCl濃度が重要な役割を果たしている。2) NaCl濃度、D-トリプトファン濃度を説明変数とする、E. coli増殖限界予測モデルを構築し、効果発現に必要な濃度条件の組み合わせを探索可能とした。3) D-トリプトファンの取り込みによってE. coliは死滅し、その死滅速度は温度依存性が明確で、増殖の至適温度付近で最大の死滅速度になる。

研究成果の概要(英文)：The present study firstly aimed at clarifying the effect of osmotic pressure induced by different osmolytes such as sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), and sucrose. Even at the same level of osmotic pressure, D-Tryptophan with NaCl significantly inhibited growth of Escherichia coli the most, compared with KCl and sucrose. Growth inhibition/no growth inhibition boundary conditions as a function of D-tryptophan and NaCl concentrations was clarified by a logistic regression model. The higher NaCl concentration, the lower D-tryptophan concentration was needed. Furthermore, we examined the effect of working temperature ranging from 15 to 46 °C on the bacterial growth inhibition induced by D-tryptophan. The higher the reaction temperature, the more rapidly viable E. coli numbers were decreased. The results obtained in the present study would significantly contribute to the development of a novel bacterial growth control strategy using D-tryptophan.

研究分野：食品微生物制御

キーワード：アミノ酸 適合溶質 非適合溶質 食塩 浸透圧ストレス 予測モデル

1. 研究開始当初の背景

食品の微生物学的な安全性は、人々が健康な生活をおくる上で欠かすことのできない最重要項目の一つである。近年では世界的にも消費者は安全性だけでなく、食品素材の持つ機能性・食感・香り等を保持した高品質な美味しい加工食品を望んでいる。すなわち、過度な殺菌処理による品質低下を最小限に抑えるための、最小加工食品が求められている。しかしながら、このような食品は従来製法の加工食品に比べ、微生物学的な安全性を安定的に確保することが難しいことから、必然的に消費期限を短く設定せざるを得ない。消費期限の短い食品は、短期間で消費が求められるが、必ずしも適切に流通・消費されないために、結果として大量の廃棄を生み出す食品ロスの一要因として世界中で大きな社会問題になっている。これらの問題を解決するためには、加工プロセスの高度化・最適化だけでなく、加工処理後の微生物学的な安全性を安定化させ、短期間の期限設定による不必要な廃棄を減少させるための加工食品の設計上の工夫が求められている。設計上の工夫として、少量の添加で食品品質に悪影響を与えず、細菌増殖を抑制する物質、とりわけ食品素材に注目して、活用方法を検討する必要がある。

2. 研究の目的 アミノ酸添加によって誘導される細菌の増殖抑制効果を利用して、食品の安全性確保を向上させるとともに、不要な食品廃棄を減少させるために、微生物学的な安定性を増大させ、日持ち期間の延長を目指す。本申請研究では作用メカニズムを解明したうえで、効果的・効率的な利用方法を確立し、食品製造工程への適用方法を明らかにする。さらに、種々の条件下での最適な利用方法を提示可能とする数理予測モデルを構築して、実用化へ向けた情報提供を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

対象とする細菌には *Escherichia coli* ATCC 25922 株を用い以下の項目について検討した。

(1) 浸透圧ストレスが D-トリプトファンによる *E. coli* の増殖抑制に及ぼす影響の解明

Peptone Yeast Glucose (PYG) 培地を基礎培地として、種々の塩化ナトリウム、塩化カリウム、ショ糖濃度を用いて調整することで種々の浸透圧を有する環境を作成し、*E. coli* を接種して増殖挙動を検討した。PYG 培地の浸透圧を 2.5MPa、3.4MPa、および 4.2MPa の 3 条件に上記の 3 種類の溶質を用いてそれぞれ調整した。各物質にて浸透圧調製した PYG 培地に D-トリプトファンを 40 mM 添加して 25°C における *E. coli* の増殖抑制効果を検討した。96 穴マイクロプレートの各ウェルに、各条件の試料培地を 180 μ L ずつ分注した後、*E. coli* 液を 20 μ L ずつ接種した。調製したマイクロプレートを 25°C に設定したマイクロ

プレートリーダー (BIO-RAD Laboratories 製 iMark) に設置し、10 分毎に 120 時間 595 nm における吸光度を自動的に連続測定し、増殖挙動とした。

(2) NaCl および D-トリプトファン濃度を環境要因とする *E. coli* の増殖限界予測モデルの開発

PYG 培地を基礎培地として、NaCl 濃度 (2 - 5 %w/v)、D-トリプトファン濃度 (0 - 40 mM) の種々の組み合わせ条件の培地を作成し、(1) で調製した *E. coli* を接種して 25°C における増殖挙動を前述 (2) と同様に検討した。120 時間培養後における吸光度変化が 0.05 以上の場合に増殖と判定し、それ以下では非増殖と判定した。

同一の実験を 5 回反復して行い、増殖抑制/増殖を判定した結果を、二値変数に対する多変量解析手法の一つであるロジスティック回帰分析により、NaCl 濃度と D-トリプトファン濃度を説明変数として数理モデル化した。

(3) D-トリプトファンによる *E. coli* の増殖抑制効果の温度依存性

PYG 培地を基礎培地として、NaCl 濃度を 3.0%、5.0% の 2 段階とし、D-トリプトファン濃度 40 mM 環境下において、15°C、25°C、37°C、43°C、および 46°C の 5 段階における *E. coli* の増殖抑制効果を検討した。5 日間の培養期間中の *E. coli* の生菌数を Tryptic Soy Ager を用いた寒天平板表面塗抹法にて、毎日計測した。

4. 研究成果

(1) 浸透圧ストレスが D-トリプトファンによる *E. coli* の増殖抑制に及ぼす影響の解明

NaCl によって浸透圧調製をした場合には 2.4MPa 以上の浸透圧条件下で、D-トリプトファンの添加により *E. coli* の増殖を完全に抑制できた (図.1)。

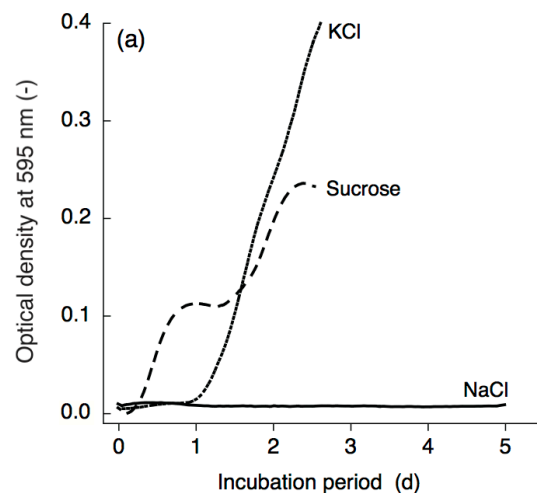


図1 浸透圧 2.4 MPa における D-トリプトファンによる増殖抑制効果の違い

一方で、同一の浸透圧条件下においても、KCl およびショ糖によって浸透圧調製した場合には、D-トリプトファン添加による *E. coli* の増殖抑制効果が顕著ではなかった。特にショ糖では4.2MPaの高浸透圧条件下においても、*E. coli* の増殖を完全に抑制できなかった。

この結果は、D-トリプトファンの作用が浸透圧のみに依存していないことを示していた。同一浸透圧条件において、NaCl で浸透圧調製した場合にのみ、高い増殖抑制効果を示したことから、浸透圧上昇に伴い細菌の生体膜の Na⁺ポンプが作動して⁵⁾、それに伴い D-トリプトファンを細胞質内に取り込み、増殖抑制効果を発現していると考えられる。今後、より詳細に作用機序を解明するためには、生体膜の Na⁺ポンプの活性を支持する遺伝子発現量等の解析が必要である。

(2) NaCl および D-トリプトファン濃度を環境要因とする *E. coli* の増殖限界予測モデルの開発

実験結果を増殖抑制 (○) / 増殖 (×) として評価し、NaCl 濃度と D-トリプトファン濃度との関係を図 2 に示した。D-トリプトファン濃度が 40 mM の際は NaCl 濃度が 2.6% 以上、NaCl 濃度 5.0% の際は D-トリプトファン濃度が 25 mM 以上であれば *E. coli* の増殖を完全に抑制した。

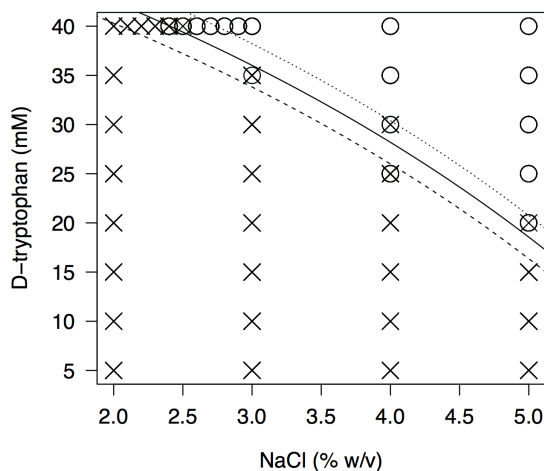


図 2 NaCl 濃度と D-トリプトファン濃度の組み合わせによる *E. coli* の増殖抑制効果
○：増殖抑制，×：増殖

ロジスティック回帰分析の結果より、増殖確率の変化が示され、境界条件を見出すことができた。これにより、*E. coli* 増殖抑制に必要な D-トリプトファン濃度と NaCl 濃度との組み合わせを容易に設定可能とした。両物質濃度の組み合わせによって増殖抑制効果が劇的に変化するが、これは *E. coli* が一定以上の浸透圧ストレスと NaCl 濃度に応答して、迅速に周囲の D-トリプトファンを取り込むことが原因と考えられる

(3) D-トリプトファンによる *E. coli* の増殖

抑制効果の温度依存性

図 3 に生菌数の対数変化量の経時変化を示した。D-トリプトファン添加条件では、NaCl 濃度および保存温度によらず、*E. coli* の増殖を完全に抑制することが確認された。特に保存温度 25°C 以上では、NaCl 濃度 3.0% 環境下では 43°C で 5 日目に、46°C で 3 日目に *E. coli* は検出限界以下にまで減少した。

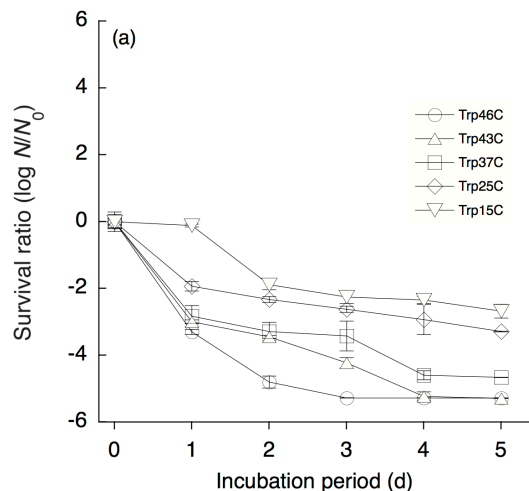


図 3 NaCl 濃度 3.0%、D-トリプトファン濃度 40 mM における *E. coli* の生残に及ぼす保存温度の影響 ○：46°C，△：43°C，□：37°C，◇：25°C，×：15°C

また、NaCl 濃度 5.0% 条件では、46°C において 3 日目から *E. coli* は検出限界以下にまで減少した。

一方、D-トリプトファンを添加しない条件下においては、NaCl 濃度 3.0% では保存温度による増殖速度に差はあるがいずれの温度においても *E. coli* は増殖した。NaCl 濃度 5.0% 条件において、25°C および 37°C では *E. coli* は増殖したが、15°C、43°C と 46°C では増殖しなかった。

これらの結果は、温度上昇に伴い *E. coli* の代謝活性が高まることによって、D-トリプトファンの細胞内への取り込みも活発になり、増殖抑制効果も高まったものと考えられる。*E. coli* の代謝活性が最も高まる 37°C から 43°C の温度帯よりも 46°C の死滅速度が高いことに関しては、NaCl による浸透圧ストレス、D-トリプトファンの取り込みに加えて温度ストレスが加わり、相乗効果によって *E. coli* を死滅させる効果となり、43°C よりも高い効果を発揮したと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Koseki, S., Nakamura, N. and Shiina, T. Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 by

D-Tryptophan as an Incompatible Solute. *Journal of Food Protection*, 査読有, 78, 819–824 (2015).
doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-374

[学会発表] (計 3 件)

①Kan, K., Koseki, S. D-Tryptophan acts as an incompatible solute: Effect of growth inhibition of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*, 29th EFFoST International Conference 2015, 10-12 November 2015, Athens (Greece).

②管快斗, 長谷川真弓, 川村周三, 小関成樹. 細菌のストレス応答機構の活用: アミノ酸添加による大腸菌の増殖抑制効果, 農業食料工学会 2015 年年次大会, 2015 年 9 月 16~18 日, 岩手大学 (岩手県, 盛岡市)

③管快斗, 川村周三, 小関成樹. 細菌のストレス応答機構の活用: アミノ酸添加による大腸菌の増殖抑制効果, 農業食料工学会 2016 年年次大会, 2016 年 5 月 28~29 日, 京都大学 (京都府, 京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 成樹 (KOSEKI, Shigenobu)
北海道大学大学院 農学研究院・准教授
研究者番号: 70414498

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: