

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08022

研究課題名(和文) 難培養種の動態解析による収穫後農産物の微生物学的品質評価

研究課題名(英文) Dynamic analysis of VBNCs for the quality evaluation of postharvest agricultural produces

研究代表者

濱中 大介 (HAMANAKA, DAISUKE)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：60399095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食品の安全性や品質に影響を及ぼす微生物群の動態および増殖の特徴について、殺菌や保存条件の違いとの関連を検証した。死滅に至らない亜致死レベルの加熱や高圧等ストレス履歴を有する微生物は、そのバイオフィーム形成の特徴が無処理とは異なることが明らかとなった。またストレスによって受けたダメージは部位あるいは関連する生体高分子が異なる可能性が示唆された。保存中農産物に存在する微生物叢は、産地の違いのみならず、保存条件の違いによっても変化する傾向が認められた。しかしながら、品質の変動と直接的な相関を見出すまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品の保存性や安全性の正確な把握は、食の安全の確保ならびに食品ロスの低減にも大きく貢献するものである。これまでの評価法は、正常生育が可能な微生物群を中心として一般的な培養条件で確認が可能となったものを対象とするのが一般的である。しかしながらこれらの方法では保存性や安全性を実際よりも高く見積もってしまう危険性を有している。本研究では、正常生育が不可能な微生物群を対象として、その増殖の特徴や抗生物質を用い、保存性・安全性を可能な限り正確に評価したことに産業的および学術的意義を有しているものである。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of microbial flora and growth affecting food safety and quality were examined in relation to different sterilization and storage conditions. It was revealed that microorganisms having a history of being subjected to stresses such as sublethal levels of heating and high pressure that do not result in death have characteristics of biofilm formation that are different from those of untreated cells. It was also suggested that the damages caused by stress may differ in the site or related biopolymer of cell. The microbial flora existing in the agricultural products during storage tended to vary due to the difference not only in the place of harvest but also in the storage conditions. However, it has not been possible to find a direct correlation with quality fluctuations of agricultural produces.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：保存 殺菌 損傷 品質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

収穫後農産物や食品製造における微生物学的な品質および安全性は、世界各国で発生している食中毒事故や腐敗による廃棄物量の増大への対策、さらには近年の本邦産農産物の輸出促進政策の早期目標達成や安全性を確保するための HACCP の段階的な義務化といった社会的背景から、ますますその重要性は高まっている。微生物制御では、付けない、増やさない、殺す、という基本三原則の確実な実施が重要であるが、これまでに研究代表者は、農産物の表面殺菌方法の確立や、腐敗原因となる微生物が形成するバイオフィルムの増殖特徴の把握と評価、ならびに除去法の確立について検討してきた。しかしながらこれらの研究で得られた結果から明らかになった課題は、不安定な増殖挙動を示す微生物群や通常の培地を用いた正常生育が困難である微生物群、いわゆる VBNC (Viable But Non Culturable) の存在が、安定した結果の取得を阻害していると考えられた。VBNC についてはその正常が不明確なものも多い。たとえば殺菌処理後に生残した微生物の多くは損傷した状態で存在するが、一般的な培養条件でこれらを全て把握するのは極めて難しい。そのため、食品の殺菌処理では、その効果を実際よりも高く見積もってしまい、保存性や安全性を正確に評価することが困難となっている。このような難培養性の微生物を正確に把握し、保存性や安全性を高度に担保するデータの蓄積が重要である。

### 2. 研究の目的

申請者らが取り組んだ本研究では、通常生育が困難である微生物に関して、保存中の増殖特性を明らかにするとともに、農産物においては、存在する微生物叢をより詳しく明らかにすることで、食品の保存性および安全性をより詳しく明らかにすることを目的とした。具体的には、致死レベルに至らない物理的処理(加熱、高圧)を施した微生物の増殖特性、農産物保存時の存在微生物の把握に関して比較検討を行った。

### 3. 研究の方法

加熱処理および高圧処理が細菌の増殖およびバイオフィルムの形成能に及ぼす影響については、*Pseudomonas fluorescens* および *Escherichia coli* を用いた。-80 のグリセロールストックから解凍後、トリプチケースソイブロスにて 30 ・ 24 時間培養を 2 回繰り返した。培養液を遠心分離と滅菌蒸留水への再懸濁を繰り返して洗浄し、細胞懸濁液を調製した。これに対して 40 ~ 80 ・ 10 秒間の加熱処理、あるいは 50 ~ 200MPa ・ 30 ・ 30 分の圧力処理を実施し、この懸濁液をポリスチレン製マイクロタイタープレートに分注し、内壁に形成されるバイオフィルム量をクリスタルバイオレット染色とマイクロプレートリーダーによって測定される吸光度によって評価した。また、バイオフィルムに含まれる細胞数についても平板培養法によって評価した。

高圧処理における損傷菌の把握については、細菌芽胞(*Bacillus cereus*)における抗生物質を用いた二重培養法を用いて評価した。無傷の細胞は、微量の抗生物質の存在でも増殖に影響が無いが、殺菌等処理によってダメージを受け、正常生育が不可能となった損傷菌は、僅かな抗生物質の存在でも増殖が著しく阻害される。この出現微生物数の差は殺菌等処理によって生じる損傷の有無に起因するものであるため、この特性を利用して損傷菌の特徴を評価した。用いた抗生物質はクロラムフェニコール、リファンピシン、ペニシリンとした。これらはタンパク質、RNA、ペプチドグリカンの合成阻害等に関連する抗生物質であるため、微生物がどのような損傷を受けているのかに関して、その特徴を大まかに把握することができる。

保存中農産物に存在する微生物の把握については、鹿児島県産のレタスを用いた異なる保存温度における比較評価に加えて、宮崎産および北海道産のイチゴを用いた、電界発生装置を付帯させた冷蔵庫によって実施した保存試験とし、それらに存在する微生物叢を比較した。微生物遺伝子を抽出し、16S-rDNA 領域のプライマーを用いて PCR によって増幅させた遺伝子配列をシーケンサによって読み取り、データベースとのマッチング解析によって属種を判定した。

### 4. 研究成果

異なる温度による短時間加熱処理を経た *P. fluorescens* が形成するバイオフィルム量は 40 ~ 60°C では無処理と差異は認められなかった一方、70°C では 1.7 程度となり、大きなバイオフィルムを形成することが明らかになった。処理温度を 80°C とした場合、無処理と比較して 2 分の 1 以下まで形成量が極端に低下した。しかしながら、生菌数については、70 および 80°C 処理ともに無処理と同程度の生残が確認できた。この結果は、*P. fluorescens* に対して 70°C ・ 10 秒程度の加熱はバイオフィルム形成を促進する一方、80°C 程度では形成能を失うことを示すものである。*E. coli* に対する圧力処理に関しては、無処理と比較して 50 ~ 150MPa では有意差は認められなかったが、200MPa ではバイオフィルム形成量の減少が確認された。一方、バイオフィルムを形成した菌の生菌数は、圧力処理値の違いによる有意差は認められなかったことから、200MPa 程度の圧力では *E. coli* の殺菌はできないものの、バイオフィルム形成能を失うことを示すものである。これらのことから、短時間の物理的処理によって、バイオフィルムの形成制御機構に関連する生体高分子の機能発現を変化させた可能性が示唆された。

圧力処理した場合に発生した損傷菌の評価では、図 1 に示すように圧力値 50MPa の高圧処理により、クロラムフェニコールに対する感受性の増加が見られた。圧力値を 100MPa まで上昇させると、リファンピシン、ペニシリンに対しても感受性が高まることが明らかとなったことから、損傷部位において、圧力に対する感受性には差があると考えられた。この要因として、圧力値の

上昇に伴い徐々に損傷する部分と損傷の発生に、ある閾値以上の圧力値を必要とする部分が混在している可能性が示唆された。また、抗生物質を含まない培地を用いて増殖程度を確認したところ、高圧処理履歴を有するものと、無処理の場合の間に大きな差は無く、ともに同様の速度で増殖することが可能であったことから、増殖に必須な部位あるいは関連する生体高分子については非常に高い耐性を有するか、あるいは損傷を免れていたと推察される(図2)。

農産物の保存中における微生物叢の分析では、レタスの保存試験においては、保存前は土壌由来の芽胞形成菌や *Pseudomonas* をはじめとした一般的な細菌が多く見られたが、保存期間の延長に伴って乳酸菌や大腸菌群が多く認められ、低酸素・高二酸化炭素条件が影響していることが示唆された。また、レタスの品質については、保存温度が高くなると激しい褐変が認められたが、褐変の有無における微生物叢の変化については、明確な差は認められなかった。電界の有無あるいは産地の違いに関する比較評価では、存在する細菌群が異なる傾向を示した。宮崎産のイチゴにおいては、電界条件ではガンマプロテオバクテリアを中心としてエウイングラ属やセラチア属が多く存在していたが、単純保存では、コサコニア属、ハフニア属が多く検出された。その他は乳酸菌であるワイセラ属が共通して検出された。また、北海道産のイチゴについては、電界条件下では、カートバクテリウム属やシュードモナス属が検出された一方、単純保存では酵母やカビが多く検出された。宮崎と北海道では気温が 20 程度の差があったため、存在する微生物叢には違いがあることは試験実施前でも予想できたが、電界の有無によっても差が生じたことは興味深い結果である。保存後果実の内容成分品質には大きな違いは認められなかったが、表面色にはやや差がみられた。この差が電界の有無によるものか、存在微生物の違いによるものかについては明確な解析はできなかったことから今後も引き続き検証を重ねる必要がある。

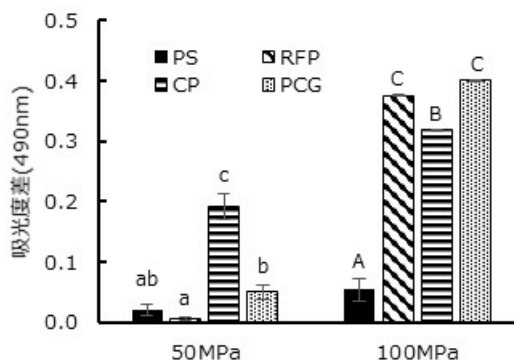


図1 高圧損傷した微生物の増殖に及ぼす抗生物質の影響  
PS: 生理食塩水、RFP: リファンピシン  
CP: クロラムフェニコール、PCG: ペニシリン

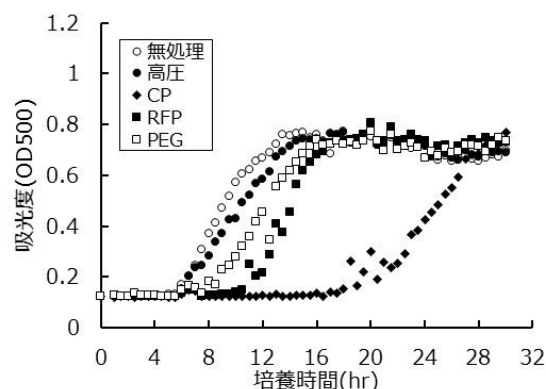


図2 高圧損傷した微生物の増殖に及ぼす抗生物質の影響  
RFP: リファンピシン CP: クロラムフェニコール、PCG: ペニシリン

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 濱中大介	4. 巻 59
2. 論文標題 静水圧と電解還元水による細菌芽胞の耐熱性低下処理技	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 油空圧技術	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Morita, M. Naka, A. Tomomatsu, K. Arimura, Y. Kamitani, D. Hamanaka	4. 巻 3
2. 論文標題 Evaluation injury characteristics of Bacillus spores by combination of hydrostatic pressure with alkaline electrolyzed water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Food Science and Agricultural Technology	6. 最初と最後の頁 184-187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Hamanaka, Yuka Watanabe	4. 巻 -
2. 論文標題 Combining effect of sodium hypochlorite with fine-bubbled water on the removal of bacterial biofilm	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of International Conference of Agricultural and Biological Engineering 2017	6. 最初と最後の頁 65-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Naka, Yusuke Mamitsuka, Kyohei Arimura, Yoshinori Kamitani, Daisuke Hamanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Reduction of heat resistance of Bacillus spores by the combination of hydrostatic pressure with alkaline electrolyzed water	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of International Conference of Agricultural and Biological Engineering 2017	6. 最初と最後の頁 68-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 藤村美希, 渡部由香, 濱中大介
2. 発表標題 電場環境が農産物の保存効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第72回農業食料工学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱中大介
2. 発表標題 農産物・食品の殺菌技術と品質保証技術に関する知見
3. 学会等名 農業食料工学会2018年度フーテックフォーラムシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Hamanaka
2. 発表標題 High hydrostatic pressure treatment for ensuring food safety and quality
3. 学会等名 The 4th Joint Symposium by Six Universities in Japan and Thailand; Basic and Applied Studies of Plant Natural Products for Agriculture and Human Health (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Hamanaka
2. 発表標題 Inactivation and Injury of Bacterial Spores by Hydrostatic High Pressure and Its Application to Food Industry
3. 学会等名 International Conference of Agriculture and Agro-Industry, ICAA12018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱中大介、黒岩千咲、安永円理子、中本義範、渡部由香
2. 発表標題 次亜塩素酸ナトリウムを用いたバイオフィーム除去処理に及ぼす微細気泡水の併用効果
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第44回年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Hamanaka, Yuka Watanabe
2. 発表標題 Combining effect of sodium hypochlorite with fine-bubbled water on the removal of bacterial biofilm
3. 学会等名 The International Conference on Agricultural & Bio-system Engineering 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久原大雅、森田晃樹、濱中大介
2. 発表標題 高圧を主体とした総菜の消費期限延長処理法の検討
3. 学会等名 第73回農業食料工学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎晃介、森田晃樹、渡部由香、濱中大介
2. 発表標題 大腸菌のバイオフィーム形成に影響を及ぼす要因の検討
3. 学会等名 第73回農業食料工学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kishore, R.R., D. Hamanaka
2 . 発表標題 Effect of high voltage electric field on the shelf life of mini tomato fruits
3 . 学会等名 2019 International Joint Conference on JSAM, SASJ and 13th CIGR6 Technical Symposium ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 N. Jaisue, S. Setha, D. Hamanaka and M. Naradisorn
2 . 発表標題 Impact of low electric field on physicochemical properties and antioxidant activity of persimmon
3 . 学会等名 2019 International Joint Conference on JSAM, SASJ and 13th CIGR6 Technical Symposium ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 K. Morita, T. Kuhara, Y. Kamitani, D. Hamanaka
2 . 発表標題 Evaluation growth characteristics of bacterial spores combine treatment with high hydrostatic pressure and alkaline electrolyzed water
3 . 学会等名 2019 International Joint Conference on JSAM, SASJ and 13th CIGR6 Technical Symposium ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 P. Jarungjitaree, M. Naradisorn, D. Hamanaka, S. Setha
2 . 発表標題 Combination of high pressure processing and heat treatment on quality and antioxidant activity of fresh-cut persimmon
3 . 学会等名 2019 International Joint Conference on JSAM, SASJ and 13th CIGR6 Technical Symposium ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 D. Hamanaka, K. Morita, T. Kuhara, K. Arimura, Y. Kamitani
2. 発表標題 Application of the high hydrostatic pressure-based treatment as an alternative for food retort processing
3. 学会等名 2019 International Joint Conference on JSAM, SASJ and 13th CIGR6 Technical Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 濱中大介他、農業食料工学会編集	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 440
3. 書名 ポストハーベスト工学辞典	

〔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	渡部 由香  (WATANABE YUKA)  (70244267)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授   (17701)	
研究分担者	池永 誠  (IKENAGA MAKOTO)  (70511822)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授   (17701)	