

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02148

研究課題名(和文)細菌細胞の乾燥によるガラス転移：物性研究から解明する静菌と殺菌の制御メカニズム

研究課題名(英文) Glass transition of bacterial cells induced by desiccation stress: Investigation of physical properties of bacterial cells for clarifying the mechanism of bacterial stability and inactivation

研究代表者

小関 成樹 (Koseki, Shigenobu)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：70414498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥操作は、微生物が利用できる食品中の遊離水分を減らすことにより、微生物の代謝活動を抑制する。しかし、乾燥食品に由来する食中毒事故は世界中で多発している。水分活性の低い食品では細菌の活動を維持することが難しいことは広く知られているが、細菌細胞が低水分活性環境下で生き残る理由は明らかになっていない。低水分活性ストレスに対する病食中毒細菌細胞の環境ストレス耐性の原因を明らかにするために、本研究では従来の生化学的アプローチではなく、細菌細胞の物理的特性の変化であるガラス転移現象に焦点を当て各種の検討を行い、乾燥状態における微生物の安定性に及ぼすガラス転移の影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食中毒細菌の乾燥環境下でのストレス耐性獲得の要因として、ガラス転移現象による細菌細胞のガラス化に注目した。ガラス転移現象とは、温度や水分含量の変化に伴い、物質内の分子運動性が上昇/低下することで生じる状態変化のことである。すなわち、細菌細胞を物質粒子として捉え、乾燥環境下で細菌細胞がガラス化している、との仮説を立てた。本研究では、ガラス転移現象が生じる温度であるガラス転移温度を測定することで細菌細胞のガラス転移現象の発生を検討し、乾燥環境下での細菌のストレス耐性獲得の要因を解明することで、乾燥食品を原因とする食中毒事故の対策へと繋がられる。

研究成果の概要(英文)：Drying is one of the effective techniques of food preservation and it is widely used in the world for long period of time. Dry stress suppresses microbial metabolic activity by reducing free water in foods that is available for microorganisms. In particular, bacteria are known that it is difficult to keep activity in low water activity (aw) foods, although foodborne illness caused by dried foods have been occurring worldwide. The reason why bacterial cells survive under low aw environment has not been unclear. To clarify the cause of resistance of pathogenic bacterial cells to low aw stress, this study focused on glass transition phenomenon, which is changes in physical properties of bacterial cells, instead of conventional biochemical approaches.

研究分野：食品工学

キーワード：ガラス転移 乾燥 水分活性 食中毒細菌

1. 研究開始当初の背景

乾燥した食品、例えばナッツ類、チョコレート、ハードチーズ、小麦粉など、を原因とする食中毒事故が世界的に後を絶たない状況が続いている。これらの食品は一般に水分活性 (Water activity, a_w) の低い ($a_w < 0.90$) 食品であり、食中毒の原因となる細菌は増殖できないため、微生物増殖を許容する高 a_w の食品とは異なり、微生物的な衛生管理はあまり重要視されてこなかった。しかし、現実には低 a_w の乾燥した食品を原因とする食中毒事故が多発している。このことは、ある種の食中毒細菌が乾燥食品環境下においても死なずに生き続けていること意味している。実際に、多数の研究報告において長期間にわたり、食中毒細菌が乾燥環境において生残し続けることが示されており、2年以上もの長い期間、生残し続けるデータも示されている。申請者もこれまでに、サルモネラ属菌と腸管出血性大腸菌が乾燥環境下において、1年間以上の長期間にわたり、生残し続けることを実験によって確認している。これまでに申請者は乾燥条件における病原菌の生存特性として、以下の3点を明らかにしてきた。

(1) 乾燥 (低 a_w) 条件における食中毒細菌の死滅挙動の傾向は、 a_w の高低レベル ($0.22 < a_w < 0.75$) には依存しない。

(2) 一定以上の高 a_w 条件 ($a_w \geq 0.90$) では死滅速度が増大し、速やかに死滅する (図 1)。

(3) 細菌の増殖を抑制する低 a_w 条件 ($a_w < 0.90$) 下では、 a_w の高低レベルによらず保存温度の上昇に伴い死滅速度が増大し、逆に 5°C 保存といった冷蔵保存ではほとんど死滅しない。

また一方で、申請者らの報告以外にこれまでに多くの研究者が低 a_w 食品中において加熱殺菌の効果が低下、すなわち殺菌が難しくなることを報告している。他方、近年の消費者の健康志向によって、プロバイオティクスが注目され乳酸菌等の有用細菌を生きたまま長期間保存可能とする技術開発が求められている。特に、常温での保存性を高めることが期待されているが、乳酸菌等は乾燥・常温状態での死滅が速いことが課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では上述の学術的な背景から以下の3点の問題を明らかにすることを目指した。

(1) なぜ、低水分活性食品中で食中毒細菌は長期間生き延びることができ、高水分活性条件下では死滅が速くなるのか？逆に乳酸菌はなぜ長期間生き延びることができないのか？

(2) なぜ、低水分活性条件下で保存中の食中毒細菌は室温以上で死滅が加速するのか？

(3) なぜ、低水分活性食品中では食中毒細菌の加熱殺菌の効果が低くなるのか？

生物の生命活動 (代謝=諸々の化学反応) には水が不可欠である。乾燥状態ではそれが成立しなくなるため、生物は死滅する。それにもかかわらず、一部の細菌は乾燥状態でも生きながらえることができる。なぜか？この問いに学術的な答えを見出すには、従来この研究分野には無かった新しい着想として、細菌細胞を一つの物質粒子として捉え、乾燥状態における細菌細胞の物理状態に目を向けることが重要と我々は考えた。

3. 研究の方法

細菌の細胞内部を、様々な成分から構成される混合溶液として物理化学的に捉えると、水分含量の低下によって細胞内部の粘性は上昇し、やがてガラス状態になると考えられる。ガラス状態とは液体の様に分子配列が乱れたまま、分子運動性 (主に並進運動) が凍結し、見かけ上固体になった状態である。細胞がガラス状態に陥ることで、細胞内は活動時と同じ物理状態 (溶液状態) のまま、固化する。換言すると、細胞は生きた状態のまま、時間だけが停止する。このため、細菌は静菌状態として長きに渡り生きながらえることが可能になると考えられる。生物のガラス化による死滅回避は特定の極限環境生物 (クマムシ、ネムリユスリカなど) も利用している。これらの生物は、大気が乾燥し始めると体内に高濃度の適合溶質 (トレハロースなど) を蓄積させ、率先してガラス状態に陥る。また、生体細胞 (精子、卵子など) の凍結保存では、細胞内に凍結保護物質を導入し、細胞内での氷結晶生成を防ぎつつ温度を低下させ、最終的にガラス化させる操作が行われている。細胞が生きた状態で長期間安定化するための必須条件がガラス状態と考えられる。

乾燥に伴う物質のガラス化機構はガラス転移温度 (T_g) によって特徴付けられる。 T_g はガラス状態とラバー状態 (分子運動性が回復した状態) とを隔てる温度であり、水分含量の低下と共に上昇する。これは、可塑剤として作用する水分子が減少するためである。 T_g の水分含量依存性は T_g 曲線と呼ばれる (図 1)。この T_g 曲線によって、これまで低水分系食品で観察されてきた様々な微生物の生育/死滅挙動が説明できるようになると期待される。例えば、乾燥に伴う細菌のガラス化現象を T_g 曲線上で考えると、細菌の水分含量が T_g 曲線を跨ぐまで低下したときガラス化することが分かる (図 1-a)。また、乾燥状態の細菌は耐熱性が向上することが知られているが、これは水分含量の低下によって T_g が上昇したためであり、細菌は高温条件においてもガラス状態を維持することが要因と考えられる。この様な環境で加熱殺菌を行うには T_g 曲線を跨ぐまで温

度を上昇させる（ラバー状態にする）必要がある（図1-b）。 T_g 曲線は固形分の組成に依存する。例えば T_g 曲線が低ければ（図1-c），更に低い水分含量まで乾燥しなければガラス化しない。細菌種毎の乾燥耐性の相違は T_g 曲線の相違として理解される。

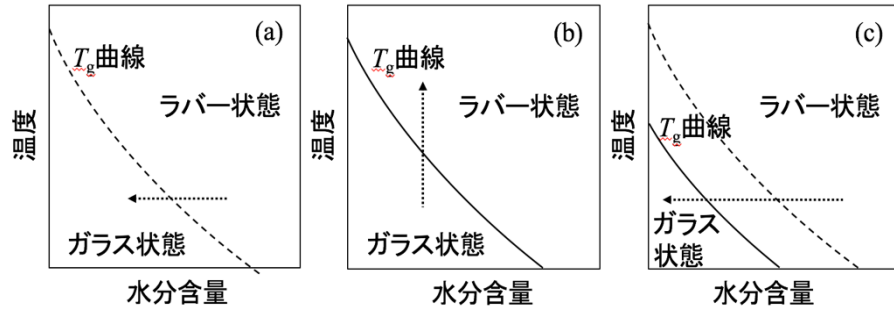


Fig. 1 Schematic diagram of relationship between moisture content and temperature

非晶質材料の T_g 曲線は構成成分によって変化させることができる。一般に、 T_g の高い成分（硬化剤）を混合すると T_g 曲線は上昇し、 T_g の低い成分（可塑剤）を混合すると T_g 曲線は低下する。細菌の T_g 曲線を上昇させることができれば、より高い温度および水分環境でガラス化させることが可能になるため、有用細菌（乳酸菌など）の安定性向上が期待される。一方、 T_g 曲線を低下させることができれば、より低い温度および水分環境でラバー状態にさせることが可能になるため、食中毒細菌における殺菌効率の向上が期待される。多成分系での T_g は物理化学分野や高分子科学分野などで培われたモデルを利用することで、各種構成成分単体での T_g データから、ある程度予測することもできる。この様に、乾燥状態の細菌を非晶質固体とみなし、それを T_g 曲線によって特徴付けることで、従来の微生物学分野にはなかった新たなアプローチに基づく微生物制御が可能になると期待される。

そこで我々は、微生物細胞のガラス転移温度 (T_g) を決定するための測定手法の確立を目指した。一般に、非晶質材料の T_g 測定には示差走査熱量計 (DSC) が利用される。DSC 曲線上において、ガラス転移はベースラインの吸熱シフトとして捉えることが可能であり、 T_g はその開始点から決定される。しかし、組成が複雑な多成分系試料（実在する固体食品など）を対象とした場合、ガラス転移に伴う吸熱シフトの変化幅が小さい、幅広い緩和時間分布のために吸熱シフトがブロードになりシフトが不明瞭となる、様々な熱応答が連続的に現れた結果、ガラス転移に伴う熱応答が覆い隠される、などの理由により、 T_g を決定できないことが多い。このような場合、試料の巨視的なガラス転移を力学的に捉える手段が有用である。本申請研究の分担者である川井は、ガラス転移に伴う力学的性質の変化を簡便に捉えるための方法として、市販のレオメータに温度制御装置を取り付けた昇温レオロジー測定法を構築し、従来は捉えることが困難であった組成が複雑な乾燥食品（クッキーなど）のガラス転移特性の解明に成功した。試料調製や測定条件等を慎重に検討した上で、本研究を進めていくことで、世界で初めて細菌細胞の T_g 曲線を発表することができるかと期待される。

昇温レオロジー測定法 (TRA: Thermal rheological analysis) とは、レオメータに温度制御装置を取り付けることで試料に荷重を加えつつ等速昇温を可能とした測定法である。この測定法により、示差走査熱量測定 (DSC: Differential scanning calorimetry) といった従来の T_g 測定では困難であった多様な成分から構成される複合物質の T_g 決定が可能となった。以下に昇温レオロジー測定システムの概略図を示す (Fig. 2)。本実験では、測定サンプルに加える初期圧力を 5 MPa とし、初期温度 10°C から 3°C/min での昇温操作を行った。そして、ガラス状態からラバー状態へと変化した際の温度であるガラス転移温度を測定した。

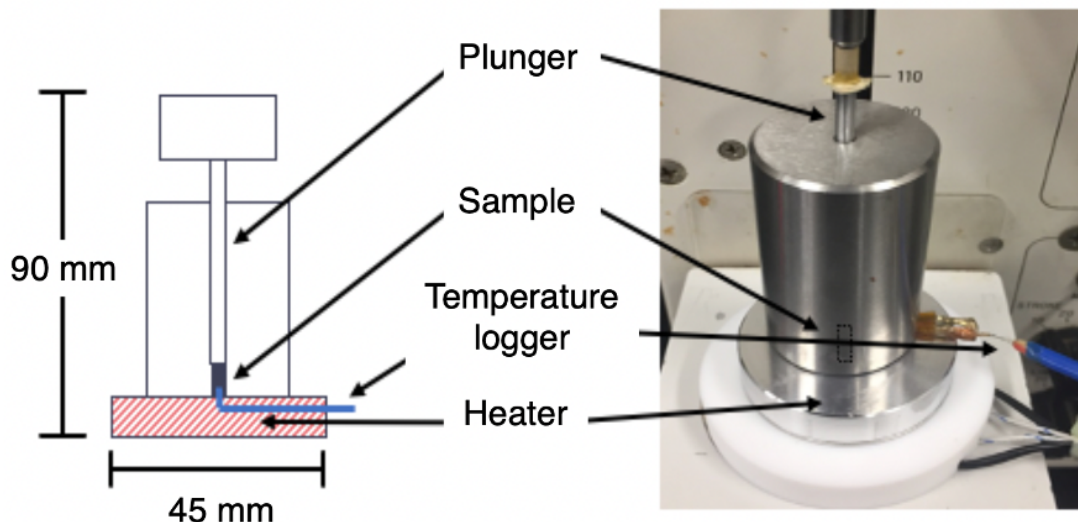


Fig. 2. Schematic diagram explaining the thermal rheological analysis (TRA)

4. 研究成果

(1) *Salmonella enterica* のガラス転移温度と耐熱性の関係解明

Salmonella enterica は、世界中のさまざまな乾燥食品で報告されている食品由来の病原菌である。低 a_w 環境下での乾燥食品中の *S. enterica* の生存の原因を明らかにするために、物質の状態変化であるガラス転移現象に焦点を当てた。新たに開発した熱レオロジー分析法を用いて、異なる水分活性条件下での5種類の *S. enterica* 血清型のガラス転移温度 (T_g) を明らかにした。低 a_w 条件 ($a_w < 0.75$) では、すべての *S. enterica* 血清型は、45~62°C などの比較的高い T_g を示した (Fig. 3)。これらの結果は、*S. enterica* が室温下あるいは乾燥食品条件下において、ガラス状態で存在する可能性を示唆した。さらに、さまざまな a_w 条件で乾燥調整した *S. enterica* の耐熱性を60°Cで10分間検討した結果、低 a_w 条件下での *S. enterica* がより高い耐熱性を示したことから、ガラス状態と耐熱性が互いに関連していることを明らかにした。これらの結果は、乾燥食品中の *S. enterica* の長期間に及ぶ生存を理解する基礎知見と言える。

(2) *Cronobacter sakazakii* のガラス転移温度の解明

Cronobacter sakazakii は、粉末乳児用調製粉乳を汚染する病原菌として世界中で広く知られている。しかし、低 a_w の粉末乳児用調製粉乳における *C. sakazakii* の汚染原因と長期間にわたる生存の理由は、これまで長い間不明であった。細菌細胞のガラス転移現象は、低 a_w 条件下での *C. sakazakii* の生存と関係がある可能性があるため、*C. sakazakii* の6菌株の T_g を明らかにした。検討した6菌株間において、*C. sakazakii* の T_g に有意差があることを示した。しかし、*C. sakazakii* の T_g は、菌株に関係なく、低 a_w 条件下 ($a_w < 0.57$) で35~60°Cの範囲で示した (Fig. 4)。このことは、*C. sakazakii* が室温以下において、ガラス状態で存在することを示唆していた。以上のように、乳児用調製粉乳での *C. sakazakii* の生存は、細菌細胞のガラス転移に起因する結果を示した。

(3) 保存中の生存率と耐熱性に及ぼす *Cronobacter sakazakii* の乾燥方法の影響

乾燥食品を製造するために様々な乾燥方法が食品産業界では用いられているが、乾燥細菌細胞の生存と耐熱性に対する乾燥方法の影響については、これまでに注目されることがなかった。しかし、食品業界にとって、低 a_w 条件下での保管中の細菌の生存に対する乾燥方法の影響を特定することは重要である。低 a_w 条件下での *C. sakazakii* の生存挙動を明らかにするために、風乾および凍結乾燥細菌細胞の T_g の比較と、貯蔵中の生存動態を検討した。*C. sakazakii* の T_g は乾燥方法に依存し、風乾した *C. sakazakii* は凍結乾燥細胞よりも高い T_g を示した。また、風乾した *C. sakazakii* 細胞は、凍結乾燥した細胞に比べ

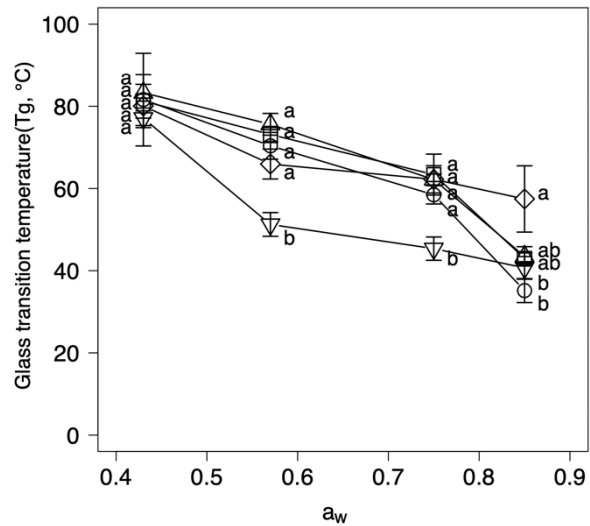


Fig. 3. Relationship between water activity (a_w) and observed glass transition temperature (T_g) of *Salmonella* Typhimurium (\circ), *S. Chester* (Δ), *S. Oranienburg* (\square), *S. Stanley* (∇), and *S. Enteritidis* (\diamond). Error bars represent standard error of the mean ($n = 3$). Different letters at the same water activity level among the five *S. enterica* serovars represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

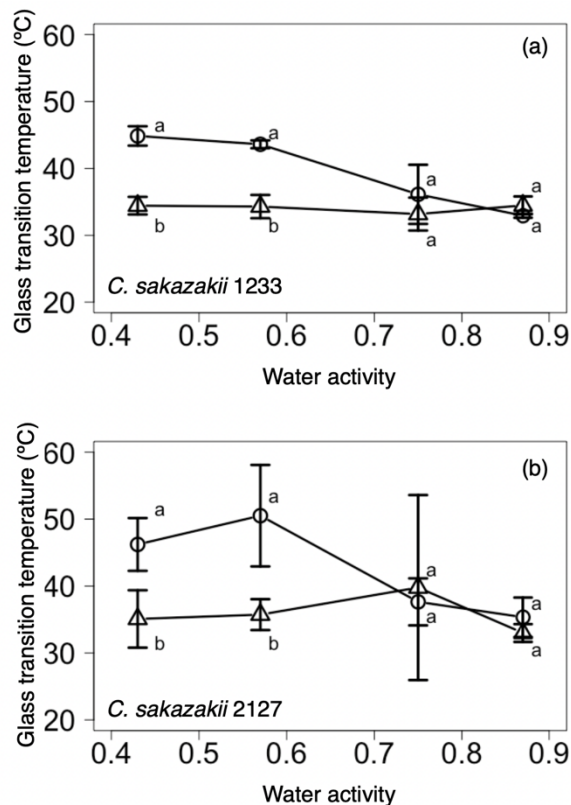


Fig. 4. Relationship between water activity (a_w) and observed glass transition temperature of air-dried (\circ) and freeze-dried (Δ) *Cronobacter sakazakii*. Results are expressed as means \pm standard deviations of three independent experiments. Values with different letters at the same sampling time between different conditions were significantly different ($P < 0.05$).

て、保存期間中の長期間の生存率が高かった。さらに、風乾した *C. sakazakii* 細胞は、40°Cでの保存中に凍結乾燥した細胞よりも高い生存率を示した。凍結乾燥した *C. sakazakii* の T_g (約 33°C) が室温程度と低いことことから、乾燥方法によって細菌細胞の T_g が変化して、乾燥食品の微生物食品の安全性を確保する上で重要な役割を果たす、といった学術的にも産業利用場においても重要な新たな知見を得た。

(4) 乾燥酵母の生物的な安定性に及ぼすガラス転移と水和の影響

乾燥酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は製パン業において広く用いられている素材ではあるが、その生物的な活性を維持するためにガラス転移がどのように影響しているのかを検討した。その結果、25°Cでガラス転移が生じる水分活性が極めて重要な役割を果たしており、その水分活性を境に、乾燥保存中の生物的な活性が大きく変化することを見出した (Fig. 5)。このことは乾燥酵母の生物的な活性を維持した状態で、製造流通、保管することに大きく貢献するものである。

<引用文献>

- ① Lee, K., Shoda, M., Kawai, K. & Koseki, S. Relationship between glass transition temperature, and desiccation and heat tolerance in *Salmonella enterica*. PLoS ONE 15, e0233638 (2020).
- ② Kawai, K., Sato, K., Lee, K. & Koseki, S. Effects of glass transition and hydration on the biological stability of dry yeast. J Food Sci (2021) doi:10.1111/1750-3841.15663.

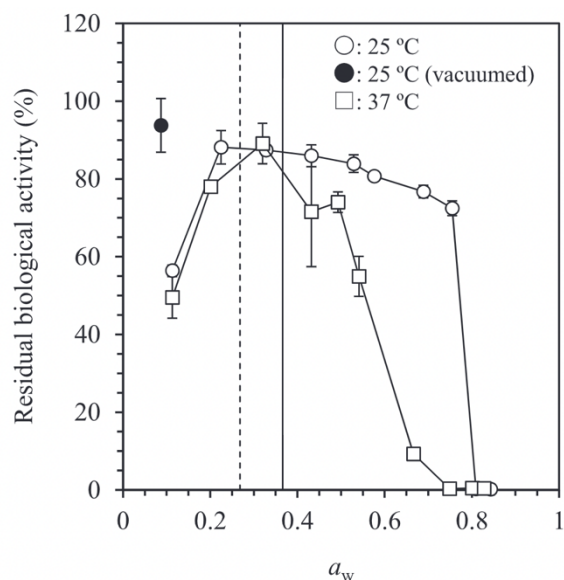


Fig 5. Effect of a_w on residual biological activity after storage at 25 °C and 37 °C. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3). Vertical solid and dotted lines indicate the a_w of yeast at 25 °C and 37 °C, respectively

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lee Kyeongmin, Shoda Masaki, Kawai Kiyoshi, Koseki Shigenobu	4. 巻 15
2. 論文標題 Relationship between glass transition temperature, and desiccation and heat tolerance in <i>Salmonella enterica</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0233638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Kiyoshi, Sato Kyoya, Lee Kyeongmin, Koseki Shigenobu	4. 巻 86
2. 論文標題 Effects of glass transition and hydration on the biological stability of dry yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 1343 ~ 1353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1750-3841.15663	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyeongmin Lee, and Shigenobu Koseki
2. 発表標題 Investigation of Relationship between Desiccation Tolerance of <i>Salmonella</i> and Glass transition temperature
3. 学会等名 2019 Annual Meeting, International Association for Food Protection（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小関成樹
2. 発表標題 乾燥環境下で生存する食中毒細菌の挙動
3. 学会等名 農芸化学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021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	川井 清司 (Kawai Kiyoshi) (00454140)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	

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
---------	---------