

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500681

研究課題名（和文）

色素生成細菌を用いた新たな温度管理センサーの開発

研究課題名（英文） Development of a new temperature control sensor with a pigment-producing bacteria

研究代表者

藤川 浩 (FUJIKAWA HIROSHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：90456252

研究成果の概要（和文）：

食品安全に関する最も安全で有効な手段である低温管理のため、新たに発見した青色色素生成細菌を用いたバイオ温度センサー開発を行った。本菌は特殊な寒天平板上で10℃以上の温度でのみ色素を生成した。各種定常温度での色素生成量を数学モデルを使って解析し、さらに変動温度下での生成量を予測できた。将来、この微生物の青色色素産生は生鮮食品あるいは臨床材料の低温管理のためのセンサーとして応用が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We studied for development of a temperature sensor with a microorganism that produces a deep blue pigment to maintain the low temperature control of food. The bacterium could produce the blue pigment on an agar plate that was prepared specifically for the pigment production at over 10°C. We measured the pigment production by the bacterium at constant temperatures and predicted the production at dynamic temperature patterns with a mathematical model. A biosensor applied with the bacterium would be useable to fresh food and clinical materials for confirmation of cold storage during the distribution process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,500,000	750,000	3,250,000
21年度	500,000	150,000	650,000
22年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：食品衛生学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食品衛生、青色色素、温度管理、数学モデル、細菌、温度センサー

## 1. 研究開始当初の背景

病原大腸菌 O157 に汚染された食肉・野菜による食中毒事件、牛肉の BSE 問題、さらに消費期限を過ぎた生菓子の販売など、食品の安全性を脅かす事件は国内で絶えず起き、国民は食品に対する不安を常に持っている。特に、微生物による食中毒事件は全体の大部分を占め、また食品の腐敗による事故も後を立たない。このような微生物による食品事故

を防ぐため、食品およびその原料中で微生物を増やさないことが衛生管理上非常に重要である。一方で、消費者は安全性の不安から添加物、防腐剤などが入った食品を避ける傾向が最近特に強まっている。

このような状況下で、微生物増殖を抑えるために最も有効かつ実用可能な方法として物理的手法、中でも温度管理がある。すなわち、食品の製造から消費に至る過程でいかに

食品を低温で保つかが微生物管理上非常に重要である。

また、野菜・果物、魚介類を材料とする生鮮食品では味、風味、食感などの食品本来のおいしさを保ち、食品の持つ栄養素をできる限り保持することが求められている。つまり、一般に食品の品質をできる限り保つにも、最も効果的な方法もやはり温度管理である。

このように食品の製造・流通過程において温度管理は非常に重要であるにもかかわらず、実際の温度管理はどれほど守られているであろうか。食品の製造、保管、輸送、販売はそれぞれ異なる業者、団体が管理していることが多い。そのため、食品の一貫した温度管理は非常に困難であり、食品の温度履歴も明確にトレースバックできる例はまれであろう。この過程のどこか一カ所でも温度管理が不相当で製品が高温に曝されると、そこで微生物が増殖してしまう。その後の過程で再び低温に戻されても、一度増えた微生物は減少しない。

もし、食品の温度履歴がわかれば消費者が食べる前に、それが微生物学的に安全かどうかを推測できる。食品が真夏に冷蔵保管される前に屋外に出され、ある時間高温に暴露されるケースはまれではない。その場合、食品の温度履歴が得られれば、その処分を決定する大きな情報となる。

食品の温度履歴を測定する方法は物理的、化学的、生物学的手法の3つに分類される。物理学的手法の一例として、食品の表面あるいは内部に温度センサーを装着し、連続的に自動温度計で測定するものがある。化学的手法としては、ある色調のシート状センサーを食品包材の表面に装着し、その色調の変化から温度履歴（高温暴露）を知るものがある。微生物学的な手法としては、微生物（酵母）の浮遊液の入ったビニールパウチの中を食品包材表面に装着し、微生物増殖によってパウチ内に生じた気体を検出するものがある。

これらの手法にはそれぞれ長所、短所がある。物理的センサーでは精確な温度履歴はわかるが、それは直接、微生物増殖予測に結びつかず、何らかの変換が必要となる。また、化学センサーでは色調の変化なので肉眼で識別しやすいが、やはり直接、微生物増殖予測には結びつかない。酵母を用いた生物センサーは微生物増殖を反映しているが、小さな気泡であるため、識別しにくい。そこで、微生物を使って直接その増殖が反映し、かつ非常に識別しやすい温度センサーの開発が望まれてきた。

## 2. 研究の目的

最近、私達は濃い青紫色の色素を生成する細菌を発見した。この細菌はおよそ10℃以下の低温域では増殖はするが、色素生成はし

ない。色素生成が起こるためには10℃以上の温度にある時間以上暴露される必要がある。したがって、この細菌をある温度条件に保存した場合、色素生成が起きていれば10℃以上の温度である時間保存されていたことを示す。これはまさに10℃以下で低温流通されているはずの生鮮食品がそれ以上の不適当な温度にある時間暴露されたかを測定するための、非常に判定しやすい温度センサーとなることを示している。しかも本菌自体が低温で増殖できる細菌であるため、低温による細胞の活性低下がない。

したがって、本研究課題として、この細菌の生成する色素がどのような温度条件下で生成されるかを調べた。具体的には、本菌の本色素生成に適した（温度以外の栄養成分、水素イオン濃度などの）環境条件を最初に検討した。同時に、色素生成量の測定方法を確立した。次に、その環境条件下で本菌を各種温度で保存し、その間に生成される色素量を測定した。すなわち、保存温度と時間によって本菌の色素生成がどのように影響を受けるか、その特性を解析した。さらに、定常温度での生成量から変動温度での生成量を数学モデルを使って予測した。

## 3. 研究の方法

(1) 上述した細菌の色素生成に最適な（温度以外の）環境条件を確立させた。すなわち、どのような栄養成分、水素イオン濃度 pH、酸素濃度などの環境条件が色素生成に最も適しているかを調べた。栄養成分としては糖、たんぱく質などを検討した。酸素濃度は密封容器内および開放系の容器での色素生成を比較した。

(2) 色彩色差計および分光光度計を用いて青紫色の定量方法を検討した。色彩色差計では直接培地上の色素を解析でき、分光光度計では色素生成した培地からの抽出液の色調を解析し、両者を比較した。

(3) 対象微生物の同定をその各種生化学的性状および遺伝子学配列を解析して行なった。

(4) 本色素の物性（安定性）を調べた。すなわち、本細菌を大量に培養し、アセトンで色素を抽出、精製し、その試料について pH、熱に対する安定性を調べた。

(5) 色素生成に調整した寒天平板（4m l、直径 35mm シャーレ）上で、各種温度においてどのようにこの細菌が増殖し、どの程度の青紫色素量を生成するかを測定した。すなわち、各種の定常温度下（0℃–30℃）で保存中の本菌の色素生成量を経時的に測定して、色素が確認されるまでの時間およびその後の生成量を解析した。同時にこの細菌の生菌数も標準寒天平板を用いて測定した。

(6) 初期菌数によって保存中の色素生成量にどの程度の影響があるかを検討した。

(7)変動させた温度下で本色素がどの程度の青紫色素量を生成するかを解析した。すなわち、プログラム式インキュベーターを用いて、各種の変動温度下で本菌の色素生成量を経時的に測定した。上記で得られた定常温度下での色素生成データを解析して、どのような温度履歴で暴露された場合、どの程度の色素が生成されるかを予測する数学モデル開発を検討した。

これまで私たちは変種温度下での微生物増殖予測モデルを開発してきた。本モデルは各種温度条件下で非常に高い精度の増殖予測ができ、さらに微生物代謝産物(黄色ブドウ球菌エンテロトキシン)の生成量も予測できた。この予測手法がこの色素生成にも適用できるかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1)濃青色色素生成細菌の色素生成条件を検討した。すなわち、本菌の色素生成に最適な培地条件を各種のタンパク源、炭素源、さらに水素イオン濃度について調べた結果、Trypticase soy brothをタンパク源、ブドウ糖を炭素源とし、pH5.6に調整した寒天平板培地が最適であった。さらにグリセリンを加えることによって色素の安定性が増加することが明らかとなった。このようにして、本色素生成に最適な培地条件が確立した。

(2)色素生成量は寒天平板の色調変化を色彩色差計によって測定する方法の方が寒天培地から色素を抽出してその吸光度を測定する手法よりも非常に迅速で簡便に定量できることが判明した。以後この測定法で生成量を測定した。

(3)対象微生物の同定を行い、その性状を解析した。すなわち、グラム染色試験を行い、各種生化学的性状を調べ、さらに遺伝子解析を行った結果から、本菌は *Pantoea agglomerans* と同定された。この菌種で青色色素を生成する菌株はまだ報告がなく、本研究株はこれまでにない新たな変異株であることが明らかとなった。また、本株は増殖に酸素が必要であり、10度以下の低温でも増殖できる低温細菌であった。

(4)本色素の物性を検討した。すなわち、本色素を培養した培地からアセトンで抽出し、細胞を除去した試料を作成した。その吸収スペクトルを測定した結果、570nm付近で最大吸収が認められた。また、各種溶媒への溶解性を調べた結果、本色素は水溶性であった。しかし、水溶液中でやや不安定で、時間とともに青色は消失した。また熱にも不安定であった。

これらの結果から、本色素はこれまで報告例のない、新しい青紫色素であることが明らかとなった。

(5)青色色素を生成する *P. agglomerans* 株に

ついてその色素生成に最適な寒天平板培地を用いて、各種定常温度下での色素生成量を時間的に検討した。その結果、図1に示すように寒天平板培地に本菌(約 8.5 log CFU/plate)を接種した結果、8℃では菌の増殖は認められたが、青色色素は生成されなかった。10℃以上で青色色素生成がみられた。また、温度暴露初期は色素生成が認められず、あるタイムラグの後、急激な生成がみられた。最大値に達した後は徐々に色調は減少していったが、肉眼的にはかなり長時間青色色素は確認できた。

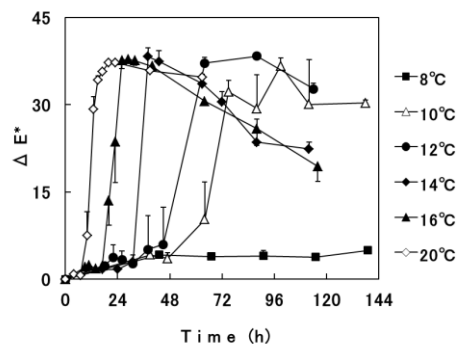


図1. 各種温度下での *P. agglomerans* 青色色素生成能。

色素生成量は色調度で表した。

図1に示したように、保存温度が高いほど色素生成の急激な上昇時期は早まったが、その上昇速度は大きな差がなかった。30℃でも色素生成はみられたが、35℃ではほとんどみられなかった。青色色素生成がみられなかった場合、本菌は黄色コロニーに成長した。

(6)各種の接種菌数(9.33, 8.55, 7.88, and 7.25 log CFU/plate)における色素生成を検討した結果、接種菌数が高いほど、色素生成は早く認められたが、最も多い菌数9.33 log CFU/plateでは全く青色色素は生成されず、黄色コロニーとなった。また、青色色素生成後の最大到達菌数は約10 log CFU/plateで、菌数増加自体は小さかった。

(7)上述した各種定常温度での色素生成量から数学モデルを用いて変動温度での色素生成量を推定した結果、良好な結果が得られた。

以上の結果から、本菌株の各種温度での色素生成特性を用いた温度センサーの開発に関する多くの知見が得られた。

#### 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)

1. H. Fujikawa and R. Akimoto. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans*

and its production characteristics at various temperatures. Applied and Environmental Microbiology 査読有 77 巻 2011 172-178

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 藤川浩、秋本遼 色素生成菌による新しい温度センサーの開発 日本食品衛生学会 2009 年 5 月 14 日 東京中央会館
2. 藤川浩、秋本遼 各種温度下での *Pantoea agglomerans* による青色色素産生性 日本食品衛生学会 2010 年 5 月 14 日 東京中央会館
3. 藤川浩、秋本遼 青色色素生成細菌を用いた温度履歴計の開発 日本食品工学会 2010 年 8 月 4 日 東京海洋大学

〔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 :

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

藤川 浩 (FUJIKAWA HIROSHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号 : 9 0 4 5 6 2 5 2

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :