

機関番号：23803

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700733

研究課題名(和文) 食中毒菌の産生する不快臭増強成分の探索とそれを利用した食中毒菌検出法の開発

研究課題名(英文) The development of novel control method for preventing food-poisoning with precursors of malodors metabolized by food-poisoning bacteria

研究代表者

島村 裕子 (SHIMAMURA YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：60452025

研究成果の概要(和文)：食中毒菌が産生する固有の不快臭を用い、簡易・迅速に食中毒菌の有無を判定できる微生物検査法の確立を目的として、黄色ブドウ球菌が産生する不快臭の前駆体の探索及び本菌がその不快臭の前駆体を代謝することによって生じる臭気物質の同定・定量を行った。黄色ブドウ球菌が産生する不快臭の前駆体は、L-leucine (Leu)、L-tyrosine (Tyr)、及び L-methionine (Met) であった。前駆体により生じる臭気物質として Leu 由来の isovaleric acid、2-hydroxy-4-methylpentanoic acid 及び Tyr 由来の 2-phenylpropanoic acid を同定した。不快臭の前駆体は、本菌の増殖と毒素の産生には影響を及ぼさなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the peculiar malodors produced by food-poisoning bacteria, *Staphylococcus aureus*, and to develop the novel control method for preventing food-poisoning using these malodors. L-leucine (Leu), L-tyrosine (Tyr), and L-methionine (Met) were revealed as the precursors of malodors metabolized by *S. aureus*. Isovaleric acid, 2-phenylpropanoic acid (derived from Leu) and 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid (derived from Tyr) were identified as the main contributors to the malodors produced by *S. aureus*. These precursors of malodors had no effect on the bacterial growth and the production of staphylococcal enterotoxin A.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：食品衛生学、食品微生物学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国の衛生環境は改善されているが、黄色ブドウ球菌や腸管出血性大腸菌 O-111 等による食中毒が未だに多発し、大きな社会問題となっている。これまでに食品中における食中毒菌の高感度測定法や迅速検出法に関して、いくつか報告されているが、

それらの方法を個人経営店で実施することは設備的、知識的に困難である。したがって、特別な研究設備を使用しない簡易微生物検査法を確立することは重要である。

食中毒を起こす食中毒菌の多くは、不快臭の発生前に食中毒を起こすのに十分な菌数になるため、食中毒菌の存在に気付かず喫

食してしまうことから食中毒が起こる。つまり、食中毒菌が発症する菌数に達していながら、食品の外見上で、著しい変化を伴わないことが多いことから、臭いや見かけで判断することが困難である。しかし、培地中で黄色ブドウ球菌を増殖させた場合、 10^6 CFU/mL以下であっても、硫化水素、メチルメルカプタンなどの不快臭が生じることが確認されている。

口臭の原因や足の臭いの発生に細菌が関与しており、環境の変化に対応して、揮発性化合物を発生する。黄色ブドウ球菌においては、ヒトの副鼻腔洞粘液中の揮発性化合物や足の裏の「靴下がムレたような」強烈な悪臭物質であるイソ吉草酸などの揮発性脂肪酸が、本菌の代謝を介して生成されることが明らかにされている。しかし、食中毒菌の代謝産物由来の不快臭に関する詳細な報告は少なく、食品への関与については検討されていない。また、食中毒の発生の未然防止を目的とした研究は数多くあるが、食中毒菌の臭いを利用して菌の生増殖を判定する研究については報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、食中毒菌由来の固有の不快臭の産生を増強する前駆体の探索及びそれを利用した微生物検査法を確立するために研究を行った。食品にあらかじめ不快臭の前駆物質を添加することで、食中毒菌が存在した場合、不快臭が生じることから、菌の増殖が判定できる。このように食中毒菌由来の固有の不快臭の前駆体を利用することにより、特別な研究設備や機器等を使用せず、簡易・迅速に食中毒菌の有無を判定できる方法を提案し、食品の加工貯蔵における安全性確保の一助となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌における不快臭の前駆体のスクリーニング

食品中で菌が増殖した際に不快臭を発生するのに必要な前駆体物質を検索するために、培地に含まれるアミノ酸に着目し、各種アミノ酸の中から不快臭の前駆体のスクリーニングを行った。不快臭がほぼ産生されない培地として、Davis培地に対して1%のBHI液体培地を加えたものを用いた。以後、この培地を基礎培地とした。各種アミノ酸を基礎培地で溶解し、メンブレンフィルターを用いてろ過滅菌した。各種アミノ酸溶液を基礎培地に0.2~1.0 g/mLの終濃度となるように添加し、アミノ酸添加基礎培地を調製した。

Staphylococcus aureus FDA209PをBHI液体培地(3 mL)で一晩培養したシード培養液30 μ LをBHI液体培地(3 mL)に接種し、37°Cで16時間振盪培養(本培養)した。

本培養液をPBSで洗浄し、 10^2 ~ 10^3 CFU/mLになるようにアミノ酸添加基礎培地(2 mL)に菌を添加した。ネガティブコントロールとしてMQ水(0.2 mL)、ポジティブコントロールとしてBHI培地(0.2 mL)を用いた。37°Cで静置培養し、12、24及び48時間後の菌の不快臭を6段階臭気強度尺度を用いて評価した。菌の生育度は、濁度(OD 660 nm)を測定することにより評価した。

(2) 不快臭の前駆体の精製及び同定

① 不快臭の前駆体の精製

BHI培地中に含まれる不快臭の前駆体を特定するために、BHI培地を酢酸エチルで抽出し、水層と有機層のどちらに不快臭の前駆体が存在するか検討した。その結果、水層中に不快臭の前駆体が確認されたため、BHI培地中に含まれるタンパク質加水分解物であるBacto tryptone (BT)に着目し、BTに含まれる不快臭の前駆体の分離・精製を行った。

BT 10 gを50 mLのMQ水に溶解し、酢酸エチル50 mLで3回抽出した。得られた水層50 mLをDowex 50W x 8 (H⁺型、 ϕ 10 mm x 100 mm)に供し、MQ水、1N NH₃水溶液各々100 mLで溶出した。NH₃溶出画分に不快臭の前駆体が認められたので、この画分についてエバポレーターでNH₃を除去した後、20 mLの60%エタノールに溶解して4°Cで一晩放置した。得られた沈殿物を5 mL MQ水に溶解し、2.5 mLずつMicricrystalline cellulose (ϕ 25 mm x 160 mm)に供し、3 mLずつフラクションコレクターを用いて分取した。Fraction 1~26はエタノール:水=63:37、Fraction 27~50はエタノール:水=47:53で展開した。Fraction 51以降はエタノール:水=23:77でカラムボリューム分を流した。得られた全ての画分の抽出液において、基礎培地に添加し、黄色ブドウ球菌を接種して37°Cで24時間培養後、生じる不快臭を確認することにより、不快臭の前駆体を評価した。

② 不快臭の前駆体の同定

セルロースカラムクロマトグラフィー後の不快臭前駆体が含まれるピークを分取HPLCを用いて分取し、得られたF8 Peak 1、F8 Peak 3について、セルロースプレート(TLC plate Cellulose F, Merck)を用いて展開溶媒(n-ブタノール:酢酸:水=4:1:1)で展開し、ニンヒドリン、アニリンフタレートを用いて呈色反応を行った。さらに、LC/MSを用いて物質を同定した。

(3) 不快臭に寄与する臭気物質の同定・定量

本菌の不快臭を増強させる前駆体の組み合わせと添加量について、最も臭気の強くなる条件を検討した。不快臭の前駆体より生じ

た臭気物質について、GC 及び GC/MS を用いて同定、定量を行った。

① 不快臭の前駆体の組み合わせ及び濃度の影響

添加する不快臭の前駆体の組み合わせと濃度を変えて、最も臭気の強くなる条件を検討した。各不快臭の前駆体溶液をそれぞれろ過滅菌し、適宜滅菌 MQ 水で希釈し、その 1/10 量を基礎培地に添加した（最終濃度：3~200 mg/mL）。コントロールとして滅菌 MQ 水を用いた。

② GC 及び GC/MS による臭気物質の同定

不快臭の前駆体を含む培地で培養した培養液をエーテル抽出、及び TMS 誘導体化し、GC 及び GC/MS 分析を行い、臭気物質の同定を行った。

③ 同定した臭気物質の閾値の決定

同定した臭気物質の標品を 0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100 ppm となるように MQ 水で希釈した。いずれも 0.00001 ppm から順に 100 ppm まで臭いを嗅ぎ、初めて臭いを感じた濃度をその臭気物質の閾値とした。

④ 同定した臭気物質の相乗効果の検討

培養液中に実際に含まれていた濃度を用いて、臭気物質単独での臭気を確認後、臭気の相乗効果を検討した。

(4) 不快臭の前駆体が菌の増殖と毒素産生に及ぼす影響

① 不快臭の前駆体が菌の増殖に及ぼす影響

不快臭の前駆体を含む培地で培養した培養液を PBS で 10^5 倍希釈し、100 μ L をマンニット食塩寒天平板培地に塗布した。37°C、48 時間静置培養後、コロニーをカウントした。不快臭の前駆体を含まない基礎培地で培養したものと菌数を比較した。

② 不快臭の前駆体が毒素産生に及ぼす影響

不快臭の前駆体を含む培地で培養した培養液中の毒素 (staphylococcal enterotoxin A; SEA) 産生量を Western blot 法を用いて検出した。不快臭の前駆体を含まない基礎培地で培養したものと SEA 産生量を比較した。

4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌における不快臭の前駆体のスクリーニング

アミノ酸を添加することによって不快臭は生じたが、BHI 培地中で培養したときほど強い不快臭は生じなかった。そこで、BHI 培地中に含まれる不快臭の前駆体を特定するために、BHI 培地からその前駆体物質の分

離・同定を行った。

(2) 不快臭の前駆体の精製

各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、セルロースカラムクロマトグラフィー後のフラクション 8 (F8) Peak 1, F8 Peak 3 に不快臭の前駆体が含まれていることを確認した。さらに分取 HPLC を用いて精製した後、TLC 及び LC/MS を用いて物質の同定を行った結果、F8 Peak 3 は L-leucine (Leu) 及び L-tyrosine (Tyr)、F8 Peak 1 は L-methionine (Met) と同定した。BT 10 g からの各画分の収量は、F8 Peak 1 で 130 mg、F8 Peak 3 で 244.4 mg であった。

(3) 不快臭の前駆体由来の不快臭に寄与する臭気物質の同定・定量

① アミノ酸の組み合わせ及び濃度の影響

Leu 5.0 mg/mL + Tyr 0.03 mg/mL の条件で強い不快臭が生じた。この条件下で Met を追加し、最も不快臭がする濃度を検討した結果、Leu 5.0 mg/mL + Tyr 0.03 mg/mL + Met 5.0 mg/mL で最も強い不快臭が生じた。最も特徴的なムレ臭 + 納豆の様の臭気を生じた Leu 5.0 mg/mL + Tyr 0.03 mg/mL の条件で、不快臭に寄与する臭気物質の同定・定量を行った。

② GC、GC/MS による臭気物質の同定

Leu 由来の不快臭に寄与する臭気物質として isovaleric acid (IA) 及び 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid (2H4M) を同定した (図 1)。培養液中の IA 及び 2H4M の含量は 0.02 ppm、84.5 ppm であった。また、Tyr 由来の不快臭に寄与する臭気物質として 2-phenylpropanoic acid (2PPA) を同定した (図 1)。培養液中の 2PPA の含量は 0.84 ppm であった。

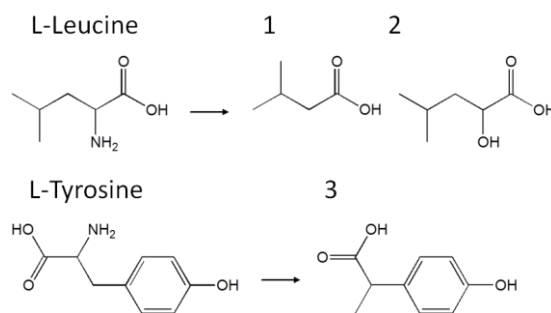


図 1. 黄色ブドウ球菌における不快臭の前駆体由来の臭気物質

1. Isovaleric acid
2. 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid
3. 2-phenylpropanoic acid

③ 臭気物質の閾値の決定

各臭気物質の閾値を表1に示した。培養液中に含まれた濃度 (IA ; 0.02 ppm, 2H4M ; 84.5 ppm, 2PPA ; 0.84 ppm) で各臭気物質単独の臭気の確認を行った結果、IA は不快臭を感じる濃度であったが、2H4M、2PPA はどちらも単独ではほぼ臭気を感じなかった。

表 1. 同定した臭気物質の臭気の特徴及び臭気閾値

Odor compound	Odor note	Threshold (ppm)
Isovaleric acid	Cheesy, musty smell	0.000078
2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid	Goat-like odor	100
2-Phenylpropanoic acid	Sour, irritating odor	0.0001

④ 臭気物質の相乗効果の検討

臭気物質の組み合わせによる臭気の強度変化を表2に示した。臭気物質単独では臭気が弱い、臭気物質を組み合わせることによって臭気が強くなった。この結果から、臭気物質の組み合わせによる臭気の相乗効果があると考えられた。

表 2. 同定した臭気物質の臭気の相乗効果

	Odor intensity
Isovaleric acid	+
Isovaleric acid+2H4M	++
Isovaleric acid+2PPA	++
Isovaleric acid+2H4M+2PPA	+++

Isovaleric acid を基準 (+) として、臭気強度が弱ければ (-)、強ければ (++)、さらに強ければ (+++) とした。

(4) 不快臭の前駆体が菌の増殖と毒素産生に及ぼす影響

菌数測定及び Western blot の結果より、不快臭前駆体である Leu 及び Tyr は菌の増殖及び毒素産生に影響を及ぼさないことを確認した。

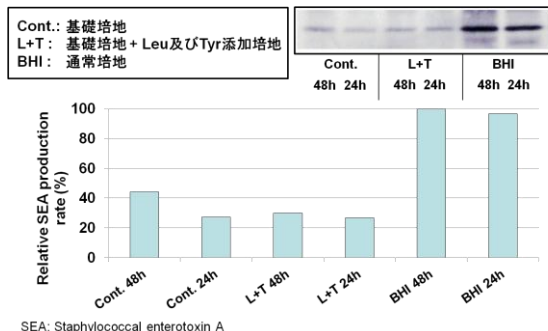


図 2. 不快臭の前駆体は毒素産生に影響を及ぼさない

本研究より、食中毒菌である黄色ブドウ球菌は、Leu 及び Tyr を代謝することによって不快臭を生じることが明らかとなった (図 3)。今後、食品に対する Leu 及び Tyr の添加方法等の検討を行うことで、食中毒菌の有無を判定するための特別な設備を必要としない微生物検査法を確立することが可能となる。また、複数の微生物において、不快臭の前駆体を代謝することによって産生されるその菌に特異的な臭気物質を明らかにすることができれば、GC 及び GCMS 等の分析機器を用いて、簡易・迅速的に食中毒菌を同定することも可能となる。

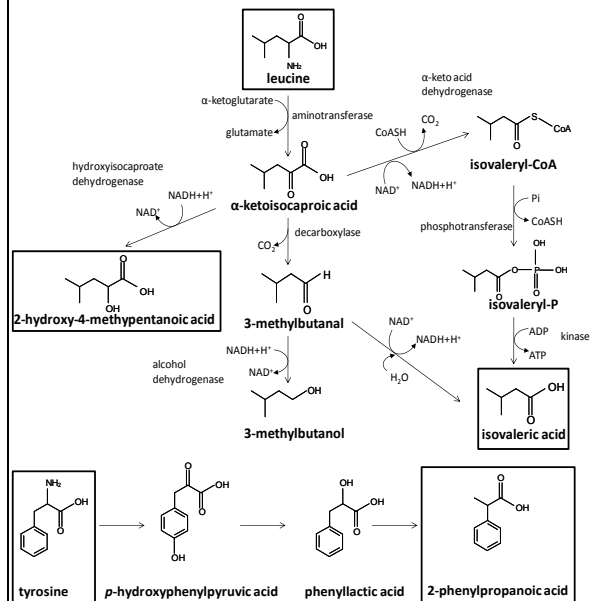


図 3. 黄色ブドウ球菌によって産生される臭気物質の生成経路

5. 主な発表論文等 [学会発表] (計 2 件)

① 島村 裕子、村田 容常、黄色ブドウ球菌の迅速簡易検出のための、本菌により産生される不快臭成分の同定、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日 (東京)

② 島村 裕子、村田 容常、黄色ブドウ球菌の培養中に生じる不快臭の前駆体の同定、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 裕子 (SHIMAMURA YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：60452025