

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350094

研究課題名(和文) 乳化剤とカーボネーション処理を用いた細菌孢子殺菌技術の確立

研究課題名(英文) Inactivation of bacterial spores using emulsifier and carbonation treatment

研究代表者

野間 誠司(Noma, Seiji)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：40392071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：過去に、Monoglycerol monocaprato (MC10) と加熱下でのカーボネーション処理(CH)の併用により、Bacillus属細菌孢子を効率的に殺菌可能であることを明らかにした。本研究は本知見の深化と利用を目的として行い、以下の3点を明らかにした。1. グリセリン鎖長、脂肪酸鎖長が短いMC10が特にCHの殺菌効果を増加させる。2. 孢子の耐性には孢子形成条件や発芽が関与する。3. MC10とCHの併用処理後に再度加熱処理を行うことにより著しい殺菌効果(5.5桁以上)が得られる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that carbonation treatment (CH) effectively inactivates bacterial spores in the presence of monoglycerol monocaprato (MC10). In this study, the following three investigations were performed. 1. The influence of six types of glycerol fatty acids (2 mM) on the inactivation effect of CH was compared. Among the glycerol fatty acids tested, MC10 induced the highest inactivation effect against Bacillus subtilis spores. 2. The factors affecting the inactivation effect were estimated. Heat activation of spores did not alter their resistance to CH with MC10. It is suggested that the spores that survived after CH with MC10 did not have genetically high resistance to CH with MC10. CH with MC10 induced germination of spores, confirmed by enhanced release of dipicolinic acid and loss of refractility. 3. To increase the inactivation effect, CH was followed by treatment with HT2, which induced approximately 5 log units of inactivation in the presence of MC10.

研究分野：食品製造工学

キーワード：殺菌 乳化剤 細菌孢子 二酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

Bacillus 属細菌胞子は、熱や圧力、エタノールなど様々な物理的・化学的処理に対して高い耐性を示す。したがって殺菌が非常に困難であり、しばしば加工食品の腐敗を引き起こす。現状では胞子の殺菌にレトルト処理(121、5-10 分の加熱処理)が採用されているが、食品の品質を大きく損なう点に問題がある。一方で、胞子の増殖抑制(静菌)を目的に、乳化剤グリセリン脂肪酸エステルやシヨ糖脂肪酸エステルの添加も行われている。

「カーボネーション処理」とは、液体食品に二酸化炭素(CO₂)を加圧下で溶解させる処理を指す。処理中にCO₂の溶解に伴って生じるH⁺(CO₂ + H₂O → H₂CO₃ → HCO₃⁻ + H⁺)により液体食品のpHが低下するが、処理後に穏和な加熱等によってCO₂を除去することにより処理前と同等まで戻る。したがって食品の品質に与える影響は小さい。申請者は、Monoglycerol monocapratoeのような疎水性の高いグリセリン脂肪酸エステルと加熱下でのカーボネーション処理の併用により、*Bacillus subtilis*、*B. coagulans*、*Geobacillus stearothermophilus* 胞子を劇的に殺菌(約1/10⁴)できることを見出した(Klangpetch *et al.*, 2013; Nakai *et al.*, 2014)。

2. 研究の目的

本研究では、1. 各種乳化剤とCH処理を併用したときの殺菌効果、2. その効果に影響を及ぼす因子を明らかにする。また、3. 乳化剤とCHの併用効果をより向上させるための間欠処理を検討する。これらを通して乳化剤とCH処理を利用した新しい胞子滅菌技術の基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

Bacillus subtilis MGNA-A001 を使用した。

(2) 胞子懸濁液の調製

B. subtilis を普通栄養培地(Nutrient agar, NA, Difco)に塗布し、30℃で3日間培養した。胞子の形成は位相差顕微鏡観察により確認した。形成した胞子を集め、滅菌蒸留水と遠心分離により3回洗浄した。これをPercoll plus (GE healthcare)を用いた密度勾配遠心に供して胞子を精製した後、再度滅菌蒸留水と遠心分離により3回洗浄し、Nutrient broth (NB, Difco)もしくは水(間欠処理の場合のみ)に懸濁したものを胞子懸濁液とした。

(3) 加圧カーボネーション処理(CH)、加熱処理(HT)、間欠処理

CHは、恒温水槽中で所定の温度に加温した実験用耐圧容器中(Noma *et al.*, 2011)に胞子懸濁液を入れ、二酸化炭素を導入することにより行った。処理条件は5 MPa、80℃、15-30 minとした。HTは、所定の温度に設定した恒

温水槽に、試験管に入れた胞子懸濁液を浸漬することにより行った。間欠処理はCH後の胞子懸濁液を30 min以内にHTに供すことにより行った。

(4) 生菌数評価

NAを用いた平板培養法により行った。

(5) 乳化剤

表1に使用した乳化剤とその特徴等を示す。これらは太陽化学株式会社様よりご恵与いただいた。これらを胞子懸濁液に添加した。

表1. 使用したグリセリン脂肪酸エステル

	略称	分子量	HLB*
モノグリセリン カプリン酸エステル	MC10	246	6.5
モノグリセリン ラウリン酸エステル	MC12	274	5.3
モノグリセリン ステアリン酸エステル	MC18	358	4.1
ジグリセリン ラウリン酸エステル	DC12	348	8.5
デカグリセリン カプリル酸エステル	DeC8	876	16.1
デカグリセリン ラウリン酸エステル	DeC12	932	14.7

*Hydrophile Lipophile Balance

(6) ジピコリン酸(DPA)の定量

処理後の胞子懸濁液を遠心分離し、上清中のDPA濃度を塩化テルビウムを用いて測定した(Shibata *et al.*, 1993)。

(7) DAPI染色

定法により染色し、蛍光顕微鏡により観察した(Noma *et al.*, 2011)。

4. 研究成果

(1) 乳化剤がCHの殺菌効果に及ぼす影響

表1に示す各種乳化剤を2 mMで添加した時のCHの殺菌効果を調べた。その結果、脂肪酸およびグリセリンの鎖長が最も短いMC10において最も高い殺菌効果が得られ、これらの鎖長が長くなるのに伴って殺菌効果が減少する傾向が認められた(data not shown)。過去に、乳化剤の静菌作用は脂肪酸鎖長が10前後の時に高いことが報告されている(中山ら, 2003)。したがって、CHにより胞子の性状が変化し、乳化剤の静菌作用が見かけ上殺菌作用にまで向上した可能性が考えられた。

(2) 殺菌効果に影響を及ぼす因子の検討

細菌胞子は非致死的な加熱処理によって活性化され、発芽しやすい状態になる。そこで、非致死的な加熱処理(加熱活性化、80℃、10 min)の有無がCH(5 MPa、80℃、30 min)とMC10(1 mM)の併用殺菌効果に及ぼす影響を調べた(図1)。その結果、CHにおいて

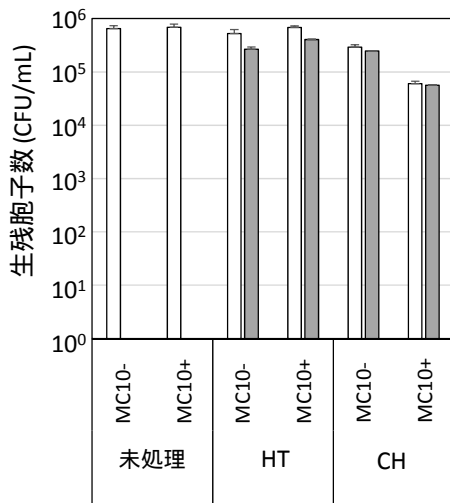


図1. 非致死的な加熱処理(加熱活性化)の有無がCHとMC10の併用殺菌効果に及ぼす影響。加熱活性化あり(■)、なし(□)

は殺菌効果に違いは認められず、加熱活性化は殺菌効果に影響を及ぼさないことが明らかになった。

CH(5 MPa、80、30 min)とMC10(2 mM)の併用処理後に生残した孢子に対して再度同様の併用処理を行った(図2a)。その結果、2度目後にはほとんど殺菌効果が認められなかった。したがって、併用処理後に生残する孢子が本処理に対して高い耐性を有すると考えられた。次に、生残した孢子をNAに塗布し、再度孢子を形成させ、CHとMC10の併用処理に供した。その結果、通常の孢子と同等の耐性を示した(図2b)。この結果から、併用処理後に生残する孢子は遺伝的に高い耐性を有しているのではないと推察された。

孢子形成培地の組成が孢子の耐性に及ぼす影響を調べた。その結果、NA、modified G

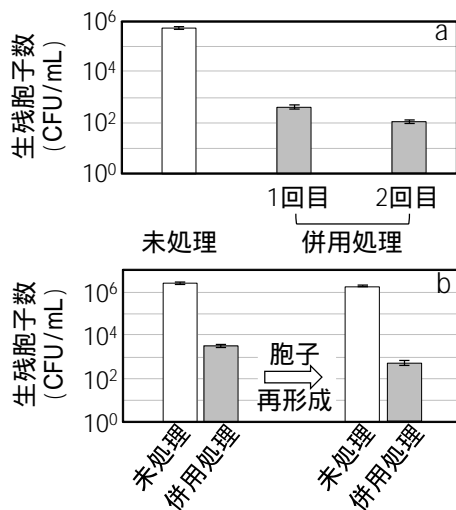


図2. 併用処理(CHとMC10(2 mM))の繰り返しが生残孢子数に及ぼす影響(a)。併用処理(CHとMC10(2 mM))で生残した孢子から再度調製した孢子を同様の併用処理に供した時の生残菌数(b)。

培地 (Stewart and Halvorson, 1953)、Schaeffer孢子形成培地 (Schaeffer *et al.*, 1965) でそれぞれ異なる耐性を示す孢子が形成された (data not shown)。

(3) 間欠処理

殺菌効果

CH(80、5 MPa、10 min)後に、HT₂(90、10 min)を行った時(CH-HT₂)の殺菌効果をMC10(2 mM)もしくはMC12(1.8 mM)存在下、非存在下で調べた。比較としてCHおよびHT₂単独処理の殺菌効果も調べた(図3)。その結果、乳化剤非存在下ではCH単独、HT₂単独、CH-HT₂の殺菌効果はそれぞれ0.5、2、2.3桁であったが、MC10およびMC12存在下ではこれらがそれぞれ増加し、特にCH-HT₂では5.5桁以上(初発孢子の完全殺菌)に向上した。これらの結果から、これらの乳化剤存在下ではCHによる孢子の耐熱性が顕著に低下し、CH-HT₂により高い殺菌効果が得られることが明らかになった。

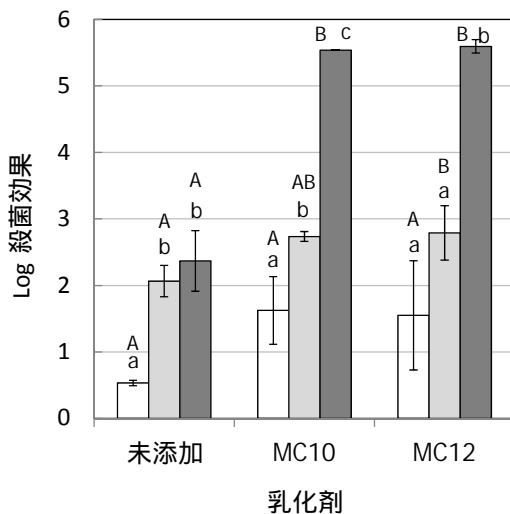


図3. CH(□)、HT₂(■)、CH-HT₂(■)の殺菌効果。図中の異なる小文字、大文字はそれぞれ同じ乳化剤、同じ処理間に有意差があることを示す。

CH-HT₂の殺菌効果に対する加圧や加熱の寄与

CHでは処理中に加圧と加熱を伴う。そこで、CHと同条件の加熱(HT₁, 80、10 min)後にHT₂(HT₁-HT₂)、加圧加熱(HPT, 80、10 min、窒素ガスで5 MPa)後にHT₂(HPT-HT₂)を行った。また比較として、これらをそれぞれ単独で行った場合の殺菌効果も調べた(図4)。その結果、MC10未添加においてはHT₁単独、HPT単独およびHT₁-HT₂のいずれもほとんど殺菌効果を示さず、HPT-HT₂のみで2.3桁の殺菌効果が得られた。一方MC10およびMC12存在下では、これらの殺菌効果がそれぞれ増加した。これらの結果からこれらの乳化剤はHT₁-HT₂およびHPT-HT₂の殺菌効果を顕著に増加させる作用があることが示された。しかし、HT₁-HT₂

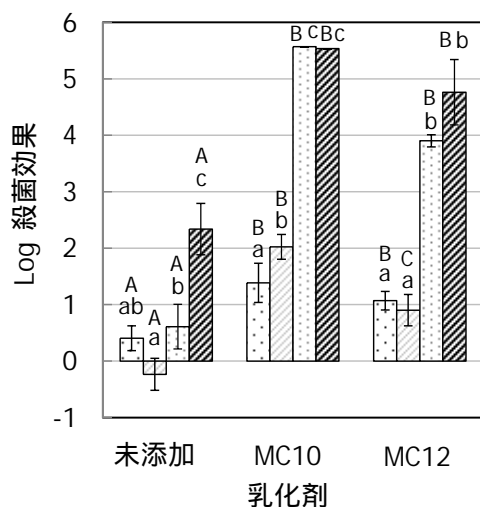


図4. HT₁ (□), HPT (▨), HT₁-HT₂ (▤), HPT-HT₂ (▥)の殺菌効果。図中の異なる小文字、大文字はそれぞれ同じ乳化剤、同じ処理間に有意差があることを示す。

と HPT-HT₂ で得られた殺菌効果が同等であり、どちらの寄与が大きいか判断できなかった。そこで、HT₂の時間を10から5minに短縮してMC10存在下での殺菌効果を比較した。また同時に、CH-HT₂の殺菌効果も調べた (data not shown)。その結果、殺菌効果はCH-HT₂ > HPT-HT₂ > HT₁-HT₂となった。すなわち、pH低下、加圧、加熱の全てを含む場合に最も殺菌効果が大きく、pH低下が欠けると殺菌効果が低下し、pH低下と加圧の両方がない場合はさらに低下した。したがって、pH低下、加圧、加熱のいずれもが関与してMC10とCHの併用処理の高い殺菌効果を生じていると考えられた。

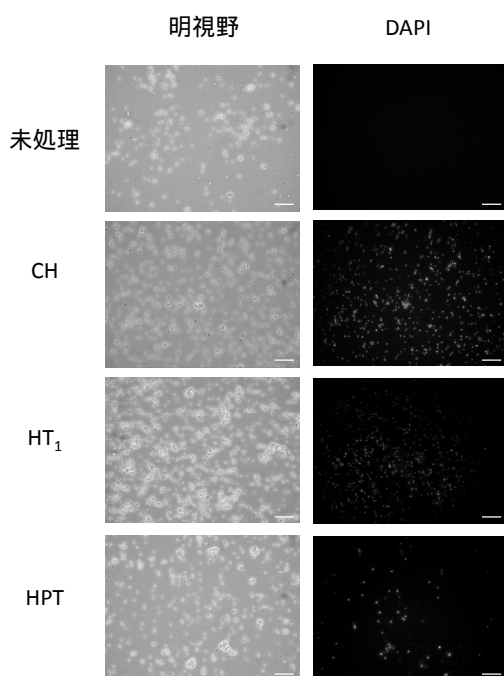


図5. MC10存在下のCH, HT₁, HPTに供した胞子のDAPI染色性。スケールバーは10 μmを示す。

MC10とCH, HT₁, HPTの併用が胞子のDAPI染色性に及ぼす影響

胞子が発芽すると色素染色性が増加する。そこで、MC10存在下のCH, HT₁, HPTに供した胞子のDAPI染色性を調べた (図5)。その結果、CHと併用した場合に最も染色性が増加していた。したがって、MC10存在下でのCHでは発芽様の現象が生じているため、耐熱性も低下しており、CH-HT₂において高い殺菌効果が得られたと考えられた。

<引用文献>

- W. Klangpetch, T. Nakai, S. Noma, N. Igura, M. Shimoda, Combined effects of carbonation with heating and fatty acid esters on inactivation and growth inhibition of various *Bacillus* spores, *Journal of Food Protection*, 76, 2013, 1568-1574
- T. Nakai, S. Tani, W. Klangpetch, S. Noma, N. Igura, M. Shimoda, The effect of combined treatment with carbonation, heating, and monoglycerol fatty acid esters on the inactivation and growth inhibition of *Geobacillus stearothermophilus* spores, *Food Science and Technology Research*, 20, 2014, 273-277
- S. Noma, N. Yamashita, W. Klangpetch, N. Igura, M. Shimoda, Effects of carbonation with heating on germination of *Bacillus subtilis* spores, *Food Science and Technology Research*, 17, 2011, 523-527
- H. Shibata, S. Adachi, Y. Hirose, M. Ike, I. Tani, T. Hashimoto, Role of calcium in biphasic germination of *Bacillus cereus* T spores sensitized to lysozyme, *Microbiology and Immunology*, 37, 1993, 187-194
- 中山素一、藤本章人、樋口彰、渡辺誠、貞苅季代子、飯尾雅嘉、宮本敬久、畜肉エキスにおける脂肪酸エステル類の抗菌効果、*日本食品科学工学会誌*、50巻、2003、537-545
- B.T. Stewart, H.O. Halvorson, Studies on the spores of aerobic bacteria I.: The occurrence of alanine racemase, *Journal of Bacteriology*, 65, 1953, 160-166
- P. Schaeffer, J. Millet, J-P. Aubert, Catabolic repression of bacterial sporulation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54, 1965, 704-711

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

- S. Noma, S. Tani, T. Nakai, N. Igura, M. Shimoda, Enhanced inactivation of *Bacillus subtilis* spore by carbonation with heating in the presence of monoglycerol-caprate, *Food Science and Technology Research*, 査読有、Vol. 21, No. 5, 2015, pp. s745-749, DOI: <http://doi.org/10.3136/fstr.20.273>

Y. Tominaga, Z. Qiuyue, S. Noma, N. Igura, M. Shimoda, Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by heat treatment after carbonation in the presence of monoglycerol fatty acid esters, Food Science and Technology Research 査読有、掲載決定済み。

野間 誠司 (NOMA, Seiji)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号：40392071

[学会発表](計 6件)

富永有紀子、朱秋月、野間誠司、井倉則之、下田満哉、林信行、カーボネーションとモノグリセリンカプリン酸エステル併用処理による *Bacillus subtilis* 胞子の制御、公益財団法人日本食品科学工学会第 63 回大会、2016 年 08 月 25-27 日、名城大学(愛知県名古屋市)

廣門里奈、谷三郎、野間誠司、井倉則之、下田満哉、林信行、モノグリセリンカプリン酸エステルとカーボネーション併用処理による *Bacillus subtilis* 胞子の殺菌機構に関する研究、公益財団法人日本食品科学工学会第 63 回大会、2016 年 08 月 25-27 日、名城大学(愛知県名古屋市)

富永有紀子、朱秋月、野間誠司、井倉則之、下田満哉、林信行、カーボネーションとグリセリン脂肪酸エステルを利用した間欠処理による *Bacillus subtilis* 胞子の殺菌、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 07 月 2 日、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

廣門里奈、谷三郎、野間誠司、井倉則之、下田満哉、林信行、乳化剤とカーボネーション併用処理による *Bacillus subtilis* 胞子の殺菌に関する研究、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 07 月 2 日、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

朱秋月、野間誠司、井倉則之、下田満哉、乳化剤とカーボネーション処理を併用した *Bacillus subtilis* 芽胞の間欠殺菌に関する研究、平成 27 年度(公社)日本食品科学工学会西日本支部および(公社)日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、2015 年 10 月 30-31 日、沖縄県市町村自治会館(沖縄県那覇市)

谷三郎、野間誠司、井倉則之、下田満哉、カーボネーションと脂肪酸エステル併用した *Bacillus subtilis* 芽胞の殺菌機構の検討、平成 27 年度(公社)日本食品科学工学会西日本支部および(公社)日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、2015 年 10 月 30-31 日、沖縄県市町村自治会館(沖縄県那覇市)

6. 研究組織
(1)研究代表者