Bacillus subtilis芽胞の発育・生存に対する香辛料精油成分の加熱処理・ガンマ線照射との複合による制御効果とその特性解析

称号及び氏名	博士(工学)　阪井　俊夫
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 31 日
論文名	「*Bacillus subtilis* 芽胞の発育・生存に対する香辛料精油成分の加熱処理・ガンマ線照射との複合による制御効果とその特性解析」
論文審査委員	主査　古田　雅一 副査　松浦　寛人 副査　宮丸　広幸 副査　田中　良晴

論文要旨

香辛料には微生物の増殖を抑制する効果があることが知られている。しかし、香辛料自身も細菌などの微生物(主に芽胞形成菌)に汚染されているため、香辛料を食品添加物として用いる場合には、香辛料粉末 1 g あたりの芽胞数を 1,000 個以下に抑えなければならない。細菌芽胞は殺菌ストレスに抵抗性であり、殺菌処理後も生存した場合食品中で腐敗を起こす恐れがある。しかし、細菌芽胞が殺菌処理後にどの程度の損傷状態で生存し、食品中でどのように回復・発育し、栄養増殖に至るかについての知見は十分に得られていない。現在、我が国においては香辛料の殺菌には過熱水蒸気が一般的に利用されており、一方海外では放射線殺菌の利用が拡大している。またこれらの処理の併用による相乗効果も既に報告されている。本研究は香辛料を汚染する芽胞形成菌の代表として *Bacillus subtilis* 芽胞を対象とし、芽胞の発育特性に対する香辛料精油成分の作用機作を解明すると共に、加熱およびガンマ線照射を複合させることで、芽胞をより効果的に抑制する手法の構築を目指すことを目的とした。

第 1 章では、食品の安全性や香辛料に対する殺菌処理の重要性と、香辛料精油成分の抗菌性、そして *Bacillus* 属芽胞の微生物学的特徴について概説した。

第 2 章では、食品を模した固体系における芽胞の発育に対する香辛料粉末と加熱処理およびガンマ線の複合による発育抑制効果について調べるため、寒天培地に香辛料粉末を混合した培養環境を構築し、上記の処理を行った後に *Bacillus subtilis* ATCC6633 株の芽胞に

対する効果について検討した。この検討では、固体中での芽胞発育時の代謝熱を定量的評価に基づく熱測定法を採用した。そして、微生物の代謝熱の測定データから、栄養増殖開始速度の変化（増殖速度定数比）と栄養増殖の遅延（増殖遅延時間比）を求めた。

生残芽胞数が約半数となるように *B. subtilis* 芽胞を加熱処理またはガンマ線照射し、Trypticase Soy Agar（以下、TSA）と滅菌したパプリカ, トウガラシ, 黒コショウ, セージ, オレガノ, タイム粉末とそれぞれ混合し、培養した。その結果、加熱処理済み芽胞とパプリカまたはトウガラシ粉末を混合した場合、粉末添加量の増加に応じて増殖速度定数比と増殖遅延時間比共に未処理芽胞の場合よりも低下したことから、相乗効果の発現を示唆する結果となった。一方、黒コショウ粉末を用いた場合は加熱した芽胞との混合による相乗効果は認められなかった。ガンマ線照射芽胞と各香辛料粉末を混合した場合にはどの香辛料粉末でも複合効果は得られなかった。また、セージ, オレガノ, タイム粉末については加熱処理やガンマ線照射を施さずとも発育を完全に阻害した。これらの結果から、各香辛料の精油成分が *B. subtilis* 芽胞の発育抑制に対し、異なる作用様式をもつと推察した。

芽胞の発育には複数の段階があり、発芽過程、発芽後成長過程、栄養増殖過程の 3 つに大きく分けられる。これらのうち、熱測定法によって検出できるのは代謝熱が発生する栄養増殖過程であり、上記の殺菌作用の詳細な機構を明らかにするためには、発芽や発芽後成長の過程で起こり得る抑制についての検討の必要性を見出した。

第 3 章では、上記の芽胞の発芽過程に着目し、更に前章の香辛料精油成分から最も発育抑制効果が高かったオレガノ、タイムにそれぞれに主要な精油成分として含まれる carvacrol、thymol、そしてトウガラシの精油成分の capsaicin を選び、それぞれが発芽過程に与える影響について比較した。

B. subtilis 芽胞の構造は最外層に芽胞殻、その内側に外膜、コルテックス層、内膜、そして中心部のコアという層状構造を有する。コア中の dipicolinic acid（以下、DPA）とコルテックスによるコア中の水分の脱水効果が、芽胞に基盤的な耐性を付与している。芽胞が休眠を解除し、発芽する際は内膜に存在する発芽レセプターと外部環境中の発芽誘導剤が結合することにより発芽が開始され、DPA をコアから放出し、水分を取り込む。続いてコア内のタンパク質や DNA などの機能成分が活性化する。この過程で芽胞の光屈折性が変化し、芽胞懸濁液の濁度が低下するという特徴があるため、これを利用してその変化をモニターすることで発芽過程を解析できる。*B. subtilis* 芽胞には L-alanine 発芽系と AGFK（L-asparagine, D-glucose, D-fructose, K^+の混合物）発芽系が存在し、発芽レセプターGerA は L-alanine を、発芽レセプターGerB, GerK は AGFK を発芽トリガー物質としており、いずれかの発芽誘導剤を含む溶液内ではそれぞれ対応する発芽過程のみを誘導することができる。まず、Trypticase Soy Broth（以下、TSB）培地に carvacrol、thymol、capsaicin を添加し、*B. subtilis* 168 野生株芽胞を添加して発芽させ、その後の OD_{600} 値による濁度低下から、濁度低下速度（発芽速度）を求めて発芽抑制の評価に用いた。capsaicin の場合は高濃度でも抑制しなかったが、carvacrol と thymol は濃度の上昇に応じて発芽を抑制した。加えて、carvacrol と thymol は互いに構造異性体である

にも関わらず、thymol は carvacrol よりも低濃度で発芽を抑制したことから、両者は発芽系に対して異なる作用様式をもつと推察した。

次に、GerA, GerB, GerK をそれぞれ 1 種類のみもつ発芽レセプター欠損変異株を用い、L-alanine 発芽溶液と AGFK 発芽溶液中における、carvacrol と thymol の発芽抑制効果を調べた。この検討では発芽速度を 50%抑制する濃度として IC_{50} を定義し、この値によって抑制効果を比較した、その結果、L-alanine 系の場合では野生株、GerA 単独保持株ともに carvacrol と thymol の IC_{50} に差は見られなかった。一方、AGFK 発芽の場合は、野生株と GerK 単独保持株の IC_{50} が前述の TSB の場合よりも低下したが、carvacrol と thymol の IC_{50} の差は同様に表れた。GerB 単独保持株はどの濃度でも明確な発芽反応を示さなかった。また、濁度低下の進行が芽胞コアからの DPA 流出パターンによく対応したことから、carvacrol と thymol は発芽過程初期を抑制すると推察した。更に、AGFK 発芽溶液中の D-glucose と D-fructose の濃度を増加させた時、野生株に対する carvacrol の発芽抑制効果が低下し、thymol の効果は低下しなかったことから、carvacrol と thymol の IC_{50} の差は物性の違いに加えて、発芽環境中の糖類の濃度が関与していることが示唆された。

第 4 章では、芽胞の発芽に対する加熱処理とガンマ照射の影響について調べた。まず *B. subtilis*168 野生株芽胞を 70～95 ºC, 5～30 分の範囲で加熱し、前章の実験と同様の手法で L-alanine および AGFK 発芽溶液中で濁度低下速度に与える影響を評価した。その結果、L-alanine 発芽溶液中では、85℃・10 分以上の処理で発芽速度が低下し始めたが、最終的にほぼ全ての芽胞が発芽した。一方、AGFK 発芽溶液中では、L-alanine 発芽溶液の場合よりも高温の 90℃・10 分または 95℃・5 分処理で発芽速度がピークとなり、発芽率も非加熱芽胞より上昇した。しかし、それ以上の加熱処理時間では発芽速度が低下し、発芽が不完全な状態に留まる芽胞も観察された。以上の結果から、*B. subtilis* 芽胞の発芽系は加熱処理により活性化される最適条件が存在し、L-alanine 発芽系と AGFK 発芽系で温度依存性が異なることがわかった。ガンマ線照射芽胞については、照射線量が 2, 4, 6, 8 kGy のいずれの場合においても発芽反応は抑制されなかった。この結果から、ガンマ線は発芽反応の進行に関わる部位には損傷を与えないことが推察された。

第 5 章では、芽胞の発芽後成長以降の発育過程に対して、第 3 章で発芽抑制効果が強く現れた thymol を選び、加熱処理またはガンマ線照射との複合処理の発育過程に及ぼす影響について調べた。芽胞に発芽処理を行い、発芽済みの芽胞を thymol を含む TSB 中に接種し、発芽後成長の時間を比較したところ、thymol の添加濃度の増加に応じて発育遅延が増大した。更に、加熱処理を行ってから発芽させた芽胞を用いて thymol を含む TSB 中で培養した場合、thymol 単独処理時と比較して発育遅延が明確に増大した。これらの結果から、thymol が発芽後成長段階に作用していることに加え、加熱処理との複合によって相乗的な抑制効果が得られることが示された。一方、ガンマ線照射芽胞を用いて同様の実験を行った場合は、thymol との複合処理による発育遅延の増幅が確認できなかった。これらの結果は、第 2 章における熱測定の結果をサポートするものであった。

以上より、carvacrol と thymol は *B. subtilis* 芽胞の発芽を抑制する効果があり、特に thymol については発芽後成長も抑制することが分かった。更に、芽胞の加熱処理においても発芽過程に抑制効果があることが見出され、これらを複合することで発育遅延が増大し、より高い抑制効果を得られた。本研究成果は精油成分をはじめとする様々な抗菌剤や加熱処理・ガンマ線照射など殺菌法を複合させ、芽胞の効率的殺菌を目指すための作用特性評価の指針となり、本研究で得られた知見を利用し、より高い芽胞制御技術の構築に役立てることが期待できる。

審査結果の要旨

香辛料には抗菌成分が含まれるのにかかわらず香辛料自身も微生物（主に芽胞形成菌）に汚染されていることから殺菌が必須である。しかし、殺菌処理後の香辛料の生残菌が食品中でどのように回復・発育し、栄養増殖に至るかについての知見は十分に得られていない。本研究は香辛料の主要な汚染菌 *Bacillus subtilis* の芽胞を対象とし、芽胞の発育特性に対する香辛料精油成分の作用機構を解明すると共に、加熱およびガンマ線照射を複合させることで、芽胞をより効果的に抑制する手法の構築を目的とし、以下の成果を得ている。

1）加熱及びガンマ線殺菌を施した *B. subtilis* 芽胞を滅菌済み香辛料と共に寒天培地に添加し、発育時の代謝熱を指標とした熱測定法により検討した結果、オレガノ、タイムは単独で顕著な発育抑制効果を示し、パプリカ、トウガラシはガンマ線照射芽胞には相加効果、加熱処理済み芽胞には添加量に応じた相乗効果を示すことを見出した。

2）*B. subtilis* 芽胞の発芽誘導剤、L-alanine、AGFK（L-asparagine, D-glucose, D-fructose, K^+の混合物）と発芽レセプターとの結合過程に注目し、発芽欠損株を用いた香辛料の精油成分 carvacrol、thymol、capsaicin の発芽抑制効果の比較検討及び発芽に際して芽胞から放出されるジピコリン酸の定量的評価から、互いに構造異性体の関係にある carvacrol と thymol は発芽初期に濃度依存的に発芽を抑制し、thymol は carvacrol よりも低濃度で効果を発揮することを見出した。さらに異なる発芽レセプター欠損変異株による検討から、L-alanine 発芽誘導系に比べ、AGFK 発芽誘導系は発芽レセプターの種類に応じて抑制効果が異なること、発芽溶液中の D-glucose と D-fructose が carvacrol に対して thymol よりも強く影響することを見出した。

3）*B. subtilis* 芽胞の加熱処理とガンマ線処理により，芽胞の発芽系に与える影響は異なり、加熱処理の場合、軽微な場合は発芽活性化が生じ、L-alanine 発芽系と AGFK 発芽系で温度依存性が異なること、ガンマ線照射芽胞においては発芽反応は抑制されないことから

ガンマ線は発芽反応の進行に関わる部位には損傷を与えないことが推察された。さらにthymol の複合処理において thymol は発芽後成長段階にも作用し、加えて加熱処理との複合によって相乗的な抑制効果が得られることが示された。

以上の研究結果は精油成分をはじめとする様々な抗菌剤や加熱処理・ガンマ線照射など殺菌法を複合させ、芽胞の効率的殺菌を目指すためのシステム化の基礎となり、食品製造工程の衛生管理に義務づけられた HACCP（危害分析重要管理点）の導入における指針となると期待できる。