

圧力により誘導される *Bacillus subtilis* 芽胞の発芽・死滅挙動

重田有仁・青山康司・岡崎 尚

Bacillus subtilis spore germination and inactivation behaviors induced by hydrostatic pressure

Yujin Shigeta, Yasushi Aoyama and Takashi Okazaki

A detailed study was conducted to investigate the effects of pressure, temperature and nutrition on *B. subtilis* spore germination and inactivation induced by hydrostatic pressure of 100 MPa or below.

Pressure-induced germination was more significant in phosphate butter than in glucose broth at 20-60 Mpa; the difference between the two media tended to decrease in accordance with the pressure increase. The optimal temperature for pressure-induced germination in phosphate buffer tended to be higher than in glucose broth. The *B. subtilis* spores germinated with 3.0-5.0 log-cycles at 20-100 MPa, 30-70°C in glucose broth, and at 3.0-4.6 log-cycles at 80-100MPa, 40-70°C in phosphate buffer. These results indicate the possibility of using pressure-induced germination for sterilization.

Germination and inactivation behaviors of *Bacillus subtilis* induced by hydrostatic pressure

殺菌工程は食品の安全性や日持ちを確保する上で極めて重要な工程である。芽胞菌の形成する芽胞は耐熱性が高く、殺菌するためにはレトルト処理等の高温加熱が必要となる。これらの高温加熱処理は食品の品質を劣化させることから、著者らは100MPa以下の圧力と緩やかな加熱による芽胞の発芽現象を利用した新規殺菌技術を提案してきた¹⁾²⁾。本技術は100MPa以下の圧力により芽胞の発芽を誘導した後、60~80°Cといった低温加熱処理によって殺菌するもので、比較的緩やかな条件（低圧・低温）での殺菌が可能となる。圧力による芽胞の殺菌技術は古くから研究されている^{3)~5)}が、多くは100MPa以上の超高压を利用したもので、100MPa以下の圧力域における発芽現象については殆ど報告例がない⁶⁾⁷⁾。本報告では圧力による芽胞の発芽を食品の殺菌に利用することを目的とし、100MPa以下の圧力により誘導される *Bacillus subtilis* 芽胞の発芽、死滅に対する圧力、温度、栄養成分の影響について詳細に検討した。

1. 実験方法

(1) 供試菌および芽胞の調製方法

B. subtilis (日本缶詰協会 No.1403) の芽胞懸濁液をグルコースブロス培地 (pH 7.0) に接種し、35°Cで24h培養した。培養液を普通寒天培地プレート (日本製薬株式会社製) に塗布し、35°Cで5日間培養して芽胞を形成させた。グルコースブロス培地の組成を表1に示す。顕微鏡観察により芽胞形成を確認した後、蒸留水で培地表面を洗浄することにより芽胞を回収した。回収した芽胞は遠心分離 (1,400 × g, 4°C, 10分間) を3回繰り返すことにより洗浄し、最終的に1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁して

使用時まで-80°Cで冷凍保存した。

(2) 圧力処理装置

芽胞の圧力処理 (静水压処理) は、加圧媒体に水を使用し、圧力処理装置 (光高压機器株式会社製) を用いて行った。装置は室温~80°C, 常圧~300MPaの範囲で処理が可能で、直径100mm × 高さ300mmの処理チャンバーを有する。処理チャンバーの加熱はチャンバー周囲のリボンヒーター (600W) を備えた加熱ジャケットにより行い、チャンバー本体の温度を基に温度制御 (±0.5°C) を行った。圧力はHeise社製の圧力ゲージ (Model-CC) を用いて調整した。

(3) 圧力処理

圧力処理の手順を図1に示す。フレキシブルパウチに充填した8mlのリン酸緩衝液 (pH 7.0) に芽胞懸濁液 (約2 × 10⁶ CFU/ml) を接種し、初発芽胞数 (N₀) を測定した。また、栄養成分を含む食品のモデルとしてグルコースブロス培地 (pH 7.0) を使用し、同様に芽胞を懸濁して処理を行った。以降ではリン酸緩衝液に懸濁した芽胞をS P B (spores suspended in phosphate buffer), グルコースブロス培地に懸濁した芽胞をS G B (spores suspended in glucose broth) と表記することとした。圧力処理装置を

表1 グルコースブロス培地の組成

成分	濃度 (g/L)
Dried Yeast Extract-S (日本製薬株式会社)	3
LAB-LEMCO powder (Oxoid)	3
Bacto-pepton (Difco-Laboratories)	10
NaCl (和光純薬工業)	5
D (+)-glucose (和光純薬工業)	5

用いて所定の条件 (0.1~100MPa, 30~80℃, 0~60min) で処理した後, 残存生菌数 (N_1) を標準寒天培地を用いて35℃, 48h 培養することにより測定した. また, 圧力処理後の試料を80℃, 10min 加熱した後, 標準寒天培地を用いて35℃, 48h 培養し, 発育してきたコロニー数を残存芽胞数 (N_2) として測定した. 芽胞の発芽過程において耐熱性の喪失は早期に発生する過程である⁸⁾. 本試験では, 圧力処理後の加熱処理 (80℃, 10min) により死滅した芽胞を発芽芽胞, 残存芽胞を未発芽芽胞とみなすこととした. 圧力処理による発芽度および死滅度は以下の式により求めた⁹⁾.

$$\text{発芽度} = \text{初発芽胞数} (N_0) / \text{残存芽胞数} (N_2)$$

$$\text{死滅度} = \text{初発芽胞数} (N_0) / \text{残存生菌数} (N_1)$$

フレキシブルパウチにglucose broth (pH 7.0), リン酸緩衝液(pH 7.0)を充填

芽胞懸濁液を摂取 (約 2.0×10^6 CFU/ml)

1 mlを採取

80℃, 10分間加熱

初発芽胞数 (N_0)を測定

圧力処理 (0.1~100 MPa, 30~80℃, 60 分間)

1 mlを採取

80℃, 10分間加熱

残存芽胞数 (N_2)測定

1 mlを採取

残存生菌数 (N_1)を測定

図1 圧力処理手順

2. 実験結果および考察

(1) 圧力による *B.sutilis* 芽胞の発芽に対する圧力, 温度の影響

SPB, SGB を0.1~100MPa, 30~80℃, 60min 処理した際の発芽度を図2, 3に示す. 大気圧下 (0.1MPa) において, SPBはいずれの条件でも殆ど発芽せず, また, SGBは40℃ 処理したもののみ2.0オーダーの発芽が観察された. 圧力処理により芽胞の発芽度は著しく増加し, SPB, SGBは100MPa, 40~50℃の圧力処理により4.2~5.0オーダーの発芽が観察された. また, SPB, SGB共に大気圧下では発芽しない60℃以上の高温域においても発芽が観察された.

発芽に対する圧力の影響について検討した結果, SPB,

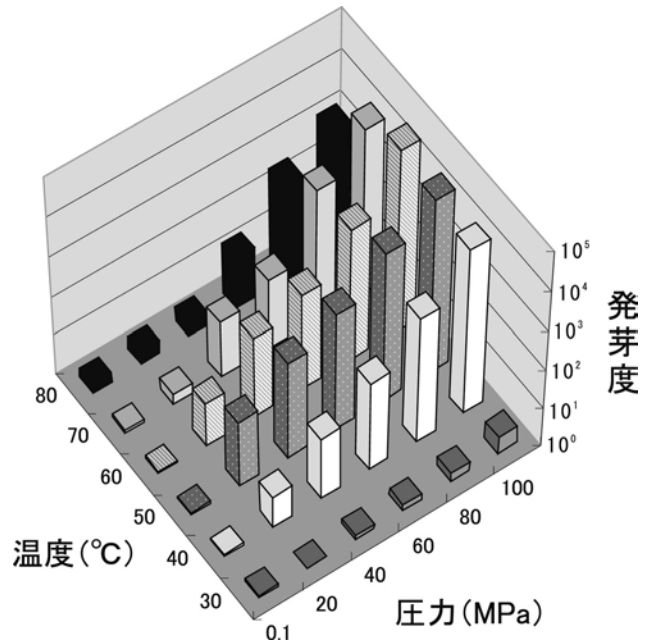


図2 リン酸緩衝液懸濁芽胞の発芽度

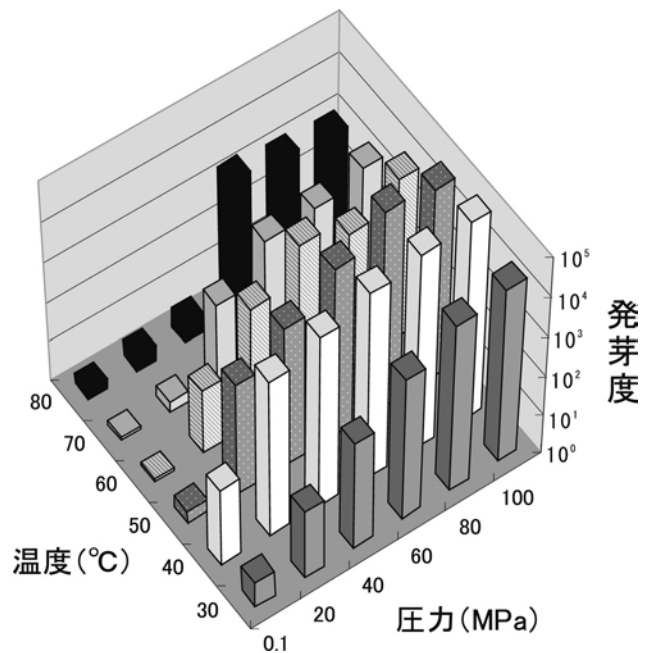


図3 グルコースブロス培地懸濁芽胞の発芽度

SGB共に圧力が高くなるに従い発芽度が高くなる傾向が認められ, 特にSPBは圧力に応じて直線的に発芽度が高くなる傾向があった. 一方, SGBは低圧域 (20~40MPa) においてSPBよりも発芽度が高く, 3.0~4.4オーダーの発芽が観察されたが, 圧力の増加にともなって両者の差は小さくなり, 高压域 (80~100MPa) における発芽度はSPBとほぼ同等となった.

温度の影響について検討した結果, SPBはSGBよりも高温域で発芽する傾向が認められ, 20~100MPaにおける発芽最適温度はSPBは50℃近傍, SGBは40℃近傍であっ

た。また、SGBはSPBでは殆ど発芽が認められなかった30℃においても圧力に応じて発芽度が増加し、100MPaで4.4オーダーの発芽が観察された。

芽胞の発芽にはアミノ酸や糖などの発芽誘導物質が必要であることが知られている¹⁰⁾。発芽誘導物質による大気圧下での *B.subtilis* の発芽最適温度は40℃付近で¹¹⁾、本試験におけるSGBの発芽最適温度帯と一致している。また、Wuytuckら¹²⁾は100MPaの圧力による芽胞の発芽経路は発芽誘導物質であるL-アラニンやAGFK (L-alanine, glucose, fructose, potassium) により誘導される発芽経路と一部重複することを示唆している。以上のことから、SGBがSPBよりも発芽度が高くなった原因はグルコースブロス培地に含まれるこれらの発芽誘導物質によるものと推察された。また、L-アラニンは100MPa以下の圧力域においては発芽を誘導するが、200MPaの圧力域ではその効果は失われるといった報告があり⁶⁾、本試験においても圧力が高くなるに従いSPBとSGBの発芽度の差が小さくなる傾向が認められた。図には示していないが、200MPa、40℃処理のSPB、SGBの発芽度はほぼ一致しており、これらの報告と一致していた。

(2) 圧力による *B.subtilis* 芽胞の死滅に対する圧力、温度の影響

0.1~100MPa、30~80℃、60min処理したSPB、SGBの死滅度を図4、5に示す。SPB、SGB共に40℃以下ではいずれの圧力においても殆ど死滅しなかった。50℃以上から死滅が観察され始め、60℃以上ではいずれの圧力においても死滅度と発芽度が一致する傾向が認められた。

芽胞は耐圧性、耐熱性が高いことから¹³⁾¹⁴⁾、20~100MPa、50~80℃といった比較的緩やかな条件で芽胞が直接死滅することは考えにくい。40℃以下では死滅が起らず、60℃以上で発芽度と死滅度が一致すること、また、発芽した芽胞は耐熱性が低下することから、本試験における芽胞の死滅は、一旦圧力によって発芽した芽胞が加熱によって死滅したものと推察された。また、50℃ではSGBよりもSPBにおいて死滅度が高くなる傾向が認められた。微生物の加熱殺菌において、糖やでんぷん等の成分は保護的に作用する場合がある¹⁵⁾。グルコースブロス培地に含まれるこれらの成分が、発芽芽胞を死滅から保護した可能性が考えられた。

100MPa以下の圧力域における *B.subtilis* 芽胞の発芽・死滅挙動について検討した結果、リン酸緩衝液およびグルコースブロス培地に懸濁した芽胞は、80~100MPa、40~70℃処理により3~5オーダーの発芽を誘導できることが明らかとなった。また、特にグルコースブロス培地のような栄養成分を含む環境においては、20~60MPaといった低圧域においても発芽が誘導されることが分かった。以上の結果より、圧力により誘導される芽胞の発芽が食品の殺菌に応用できる可能性が示唆された。

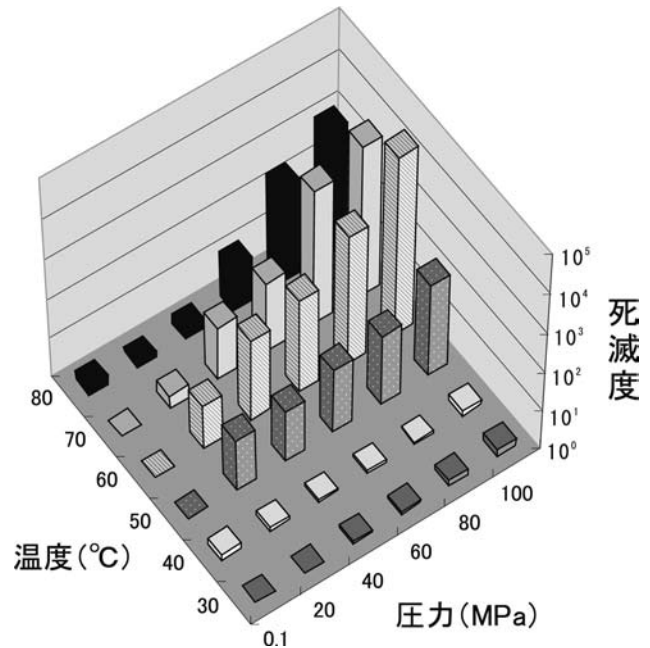


図4 リン酸緩衝液懸濁芽胞の死滅率

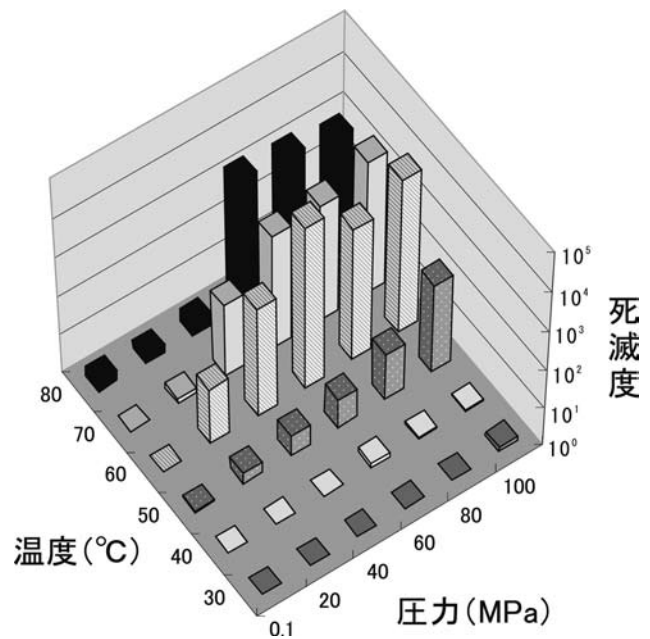


図5 グルコースブロス培地懸濁芽胞の死滅度

文 献

- 1) Aoyama, Y., Shigeta, Y., Okazaki, T., Hagura, Y. and Suzuki, K., Germination and Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores under Combined Conditions of Hydrostatic Pressure and Medium Temperature. *Food Sci. Technol. Res.*, **11** (1), 101-105 (2005).
- 2) Shigeta, Y., Aoyama, Y., Okazaki, T., Hagura, Y. and Suzuki, K., Hydrostatic pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus* spores in the presence and the absence Nutrients. *Food Sci. Technol. Res.*, **13** (3), 193-196 (2007).

- 3) Clouston, J.G. and Wills, P.A., Kinetics of Initiation of Germination of *Bacillus pumilus* Spores by Hydrostatic Pressure. *J. Bacteriol.*, **103**, 140-143 (1970).
- 4) Okazaki, T., Kakugawa, K., Yoneda, T. and Suzuki, K., Inactivation behavior of heat-resistant bacterial spores by thermal treatments combined with high pressure. *Food Sci. Technol. Res.* **6** (3), 204-207 (2000).
- 5) Sojika, B. and Ludwig, B., Pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Pharmaz. Ind.* **56**, 660-663 (1994).
- 6) Gould, G.W., Sale, A. J.H., Initiation of Germination of Bacterial Spores by Hydrostatic Pressure. *J. gen. Microbiol.*, **60**, 335-346 (1970).
- 7) Sale, A. H. J., Gould, G. W. and Hamilton, W. A., Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 323-334 (1970).
- 8) Opstal, I. V., Bagamboula, C.F., Vanmuysen, S.C. M., Wuytack, E. Y. and Michiels, C. W., Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. *Int. J. Food Microbiol.* **92** (2), 227-234 (2004).
- 9) 近藤雅臣, 渡部一仁, 「スポア実験マニュアル」, 第1版, 近藤雅臣, 渡部一仁編, (技報堂出版, 東京), pp.73-87 (1995).
- 10) Hyatt, M.T. and Levison, H.S., Effect of sugars and other carbon compounds on germination and postgerminative development of *Bacillus megaterium* spores. *J. Bacteriol.*, **88**, 1403-1415 (1964).
- 11) Sneath, P.H.A., Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 2," ed by Sneath, P. H. A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. pp. 1104-1207 (1986).
- 12) Wuytack, E.Y., Boven, S. and Michiels, C.W., Comparative Study of Pressure-Induced Germination of *Bacillus subtilis* Spores at Low and High Pressures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (9), 3220-3224 (1998).
- 13) Larson, W.P., Hartzell, T.B. and Diehl, H.S., The effect of high pressures on bacteria. *J. Infect. Dis.* **22**, 271-279 (1918).
- 14) Nakayama, A., Yano, Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M. and Sakai, K., Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3897-3900 (1996).
- 15) 清水潮, 横山理雄, 「レトルト食品の基礎と応用」, 第1版, (幸書房), pp.71-73 (1995).