

| | |
|----------|--|
| 氏名 | 片瀬 満 かたせ みつる |
| 学位(専攻分野) | 博士 (工学) |
| 学位記番号 | 博乙第192号 |
| 学位授与の日付 | 平成26年9月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科・専攻 | 工芸科学研究科 生命物質科学専攻 |
| 学位論文題目 | 大豆加工食品における微生物迅速評価法の検討 |
| 審査委員 | (主査)教授 竹谷 茂 教授 亀井加恵子 教授 伊藤雅信 准教授 井沢真吾 |

論文内容の要旨

豆乳を始めとした大豆加工食品の消費量は年々増加傾向にあり、安全安心な製品を供給することは食品メーカーの責務である。そのため、最終製品の微生物検査は信頼性が高く簡便で迅速であることが望まれる。標的の微生物種をコロニーとして形成させる従来の培養法は培地調製の手間がかかる、経験が必要や培養時間が長いなどの様々な問題点がある。近年、多くの微生物迅速評価法が開発されているが、食品成分による阻害が導入の障壁となっている。そこで本研究では大豆加工食品中の微生物数及び微生物種を正確に迅速に評価できる手法としてフィルター染色法による迅速計測、MALDI-TOF MSを用いた直接同定、自動生菌数測定装置の導入を検討した。

1章 等電点沈殿と自動LED計数装置による大豆加工食品中の大腸菌群数の迅速計測

微生物数の迅速測定法としてフィルター染色法があるが、豆乳や分離大豆蛋白質溶液などのコロイド状食品では、フィルターの目詰まりや染色阻害などの理由でそのままでは適用できない。大豆蛋白質を等電点沈殿により除去し、清澄な溶液とすることでフィルター染色法が可能となった。得られた清澄溶液中に標準菌を接種し、自動LED計数装置(バイオプローラ)とプレート培養法で細菌数を計測したところ、両者で良好な相関が見られた。またバイオプローラ法での検出は 10^2 乃至 10^3 CFU/ml以上で可能であった。豆乳に10 CFU/mlの大腸菌群を接種し、6時間の増菌培養を実施した後、本法で計測することで大腸菌群の増殖を観察することができた。以上の結果から、本法は豆乳や分離大豆蛋白質中の大腸菌群の迅速計測に有用であると考えられた。一方、本法では蛍光染色試薬に微生物種の選択性がなく、標的の微生物増殖を確定するための同定試験を行う必要がある。

2章 大豆加工食品中の微生物のMALDI-TOF MSを用いた直接同定

近年、微生物を迅速、簡便に同定する手法として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)を用いて菌体のリボソーム蛋白質を測定し、そのスペクトルパターンから識別する方法が検討されている。しかしこの分析では平板培地で1日以上培養したコロニーが必要である。汚染食品中の細菌を回収し、直接測定できれば分析時間を大幅に短縮できる。そこで大豆加工食品中の微生物を直接同定する方法の検討を試みた。豆乳に代表的な汚染菌を接種した試験結果から、同定可能な菌体量は概ね 10^8 CFU/ml以上であった。市販製品を増菌処理(35°C、8h~24h)して一定数に達した検体から菌体を調製し、MALDI-TOF MS

法では直接菌体を、16SrDNA 塩基配列法では一度平板培地で培養したコロニーを分析した。その結果、食品中に微生物数が一定量ある場合、夾雜物を除去して菌体を回収することにより、優先的に増殖した微生物種を直接同定できることが示唆された。一方、油脂成分を多く含む場合にバックグラウンドピークが大きくなり同定が阻害されることが課題となった。

3章 MALDI-TOF MS による大豆加工食品中の大腸菌群の迅速同定

本検討では、油脂成分の多い大豆加工食品中の大腸菌群を同定するための新規手法を検討した。食品中に油分が多い場合に界面活性剤による菌体洗浄を実施することで同定精度を改善することができた。油分を添加した豆乳に大腸菌群を接種した試験結果から、同定可能な菌体量は概ね 10^7 CFU/ml 以上であった。また菌数が少ない場合 (10^1 CFU/ml) においても 1 晩 (37°Cで 18h) 培養することにより同定可能であった。本方法を用いることによって油分の多い大豆加工食品においても、製品中に含まれる大腸菌群を直接同定することが可能となった。

4章 自動生菌数測定装置「TEMPO」による微生物検査自動化

製品の出荷判定において、省力化の検討も重要な課題である。自動生菌数測定装置「TEMPO」は MPN 法を原理とした国際標準法として認知されている微生物試験システムである。ここでは、大豆加工食品の微生物試験法として本法の適用可能性を判断することを目的とした。妥当性確認試験として、従来の平板培養法による測定結果と「TEMPO」による測定結果の比較を実施した。比較試験は大豆加工食品（分離大豆蛋白質等）に標準微生物株を接種して実施した。（測定項目：一般生菌数、大腸菌群数、腸内細菌科菌群数 他）また、豆腐等の市販大豆加工製品中の一般生菌数試験についても行った。その結果、本法は全ての接種試験において従来法と高い相関（相関係数： $r > 0.95$ ）を示し、大豆加工食品中の微生物数の簡便な試験法として有効と考えられた。また、実際の製品検査や市販製品においても同等の性能が確認され、本法の適用の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は大豆加工食品中に含まれる汚染微生物数や種類の迅速かつ正確な検査方法の開発を目指したものである。大豆加工食品の消費量は年々増加しているが、食品業界では安全で安心な製品を供給することに大きな努力を払っている。そのなかで、最終製品の微生物検査には信頼性が高く簡便で迅速であることが要求されている。従来の微生物の培養法は長時間の培養が必要であるなど様々な問題点がある。近年、様々な微生物迅速検定法が開発されているが、食品によっては検出阻害成分が含まれているため、適用範囲が非常に限られた。そこで本研究第 1 章では、大豆加工食品中の微生物数を正確かつ迅速に評価するために、等電点沈殿によって大豆蛋白質を除去し、清澄溶液を分離した。これをフィルター染色した後、自動 LED 計数装置を用いて大豆加工食品中の大腸菌群数を迅速に計測する方法を開発した。本法は従来の培養法と比較して、効率的であり良好な精度を得ることを確認した。第 2 章では、微生物種の同定について検討した。第 1 章での自動 LED 計数装置を用いた方法には微生物種の選択性がないので、標的の微生物増殖を確定するための同定試験を行う必要があった。そこで、大豆ホエーを試料とする MALDI-TOF MS 解析法を検討したところ、直接同定が可能であることを見出した。また、従来法との比較やブラインドテストなどを通じて、高い精度と再現性、簡便性を持つことを明らかにした。従来は、菌の単離や培養などの前処理が必要であったが、等電点沈殿と MALDI-TOF MS の組み合わせによ

って、大豆加工食品試料からの直接測定が可能になり、分析時間が大幅に短縮された。さらに第3章では、食品中の油分が直接分析を妨げる問題を取り上げ、界面活性剤を用いた菌体洗浄によって同定精度が飛躍的に改善することを明らかにした。一方、第4章では、MPN法を原理とした国際標準法の一つとして認知されている自動生菌数測定装置「TEMPO」を用いて、大豆加工食品に対する微生物検査自動化を試みている。豆腐等の市販大豆加工製品に対する検討を行ったところ、TEMPOを用いた全ての検査結果は従来法と高い相関を示し、大豆加工食品中の微生物検査法として十分な精度と高い効率を有することを明らかにした。この結果は、大豆加工食品企業における実際の製品検査においても、TEMPOが十分実用に足ることを示した。これらの一連の研究は、食品事業の中で微生物検査を迅速に判断できる微生物管理システムを高度化し、より安全な製品作りの手助けになることは間違いない。また、これからの大豆加工製品の安全、安心の保証に確実に貢献すると判断した。

以上の研究の成果は、申請者が筆頭著者の3編を含む下記の国際学術雑誌4編に掲載されている。

1. High-throughput identification of coliforms in processed soybean products using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. M. Katase & K. Tsumura. *Food Science and Technology Research* (2014) in press.
2. Rapid enumeration of viable bacterial cells in processed soy products using an automated cell counting system. M. Katase, S. Tsuboi & K. Tsumura. *Food Control* (2013) 32, 501-504.
3. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria in processed soybean products. Y. Furukawa, M. Katase & K. Tsumura. *Journal of Food Research* (2013) 2, 104-109.
4. Enumeration of micro-organisms in processed soy products with an automated most probable number method compared with standard plate method. M. Katase & K. Tsumura. *Letters in Applied Microbiology* (2011) 53, 539-545.