ISSN 2186-7941

東洋食品工業短期大学紀要

第 1 号

BULLETIN
OF
TOYO COLLEGE OF FOOD TECHNOLOGY
No. 1

平 成 24 年
（2012）

東洋食品工業短期大学

発刊の辞

本学では、東洋罐詰専修学校時代の 1950 年から、東洋食品研究所と合同で研究報告書を発行してきた。2010 年に東洋食品研究所が公益財団法人と認可されたことを契機に、互いに独立して研究活動報告を行うことにした。

折しも昨年は、本学は短期大学に昇格してから 50 周年を迎えた。これを記念して、ここに東洋食品工業短期大学紀要を発刊する。

今後、本学が、百年、二百年と発展していく礎として、本紀要をご支援いただくようお願い申し上げる。

東洋食品工業短期大学
包装食品工学科長　竹之内　健

Announcement of Publication

In collaboration with Toyo Institute of Food Technology, Toyo College of Food Technology started publishing research reports in 1950, when the college was at the period of Toyo Canning Vocational School. When Toyo Institute of Food Technology was approved as public interest incorporated foundation in 2010, the two institutes decided to publish the research reports independently of each other.

Last year, Toyo College of Food Technology celebrates the 50th anniversary since the switchover from the vocational school to the college. We hereby start publishing Bulletin of Toyo College of Food Technology in order to commemorate this anniversary.

We hope that this Bulletin would be a source of our college's continuous development over hundreds of years, and we would be grateful to readers and authors for all their supports.

Ken Takenouchi, Dean
Toyo College of Food Technology

東洋食品工業短期大学紀要

第　1　号

目　次

【寄稿論説】

本学における食業人教育の意義

三原和俊 …… 1

【研究報告】

Effect of Anaerobic Atmosphere on Acetate Ester Biosynthesis and Alcohol Acyltransferase Activity in Bananas

Sumithra K. Wendakoon …… 4

【短報】

好熱性細菌 *Geobacillus stearothermophilus* のミスマッチ DNA 認識タンパク質の同定

松永藤彦，境晶子，望月聖也，南光輔，稲津早紀子 …… 9

食品の衛生的取り扱いと微生物制御に関する授業研究

―おにぎりを用いた学生実験の提案―

稲津早紀子，松永藤彦 …… 16

【総説】

極限環境下におけるヒトと微生物の攻防

松永藤彦 …… 22

発表記録（2010 年～ 2011 年） …… 27

BULLETIN
OF
TOYO COLLEGE OF FOOD TECHNOLOGY
No. 1

CONTENTS

【Special article】

Significance of educating "Shoku-Gyo-Jin", or food manufacturing professionals in Toyo College of Food Technology

Kazutoshi Mihara 1

【Research Article】

Effect of Anaerobic Atmosphere on Acetate Ester Biosynthesis and Alcohol Acyltransferase Activity in Bananas

Sumithra K. Wendakoon 4

【Research Note】

Identification of DNA mismatch recognition proteins in the thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*

Fujihiko Matsunaga, Akiko Sakai, Seiya Mochizuki, Kousuke Minami, Sakiko Inatsu 9

Study on teaching hygienic conditions and bacterial control in food production
—Proposal of a student experiment using the onigiri (rice ball) —

Sakiko Inatsu, Fujihiko Matsunaga 16

【Review Article】

Battle between human and microorganisms under extreme environment

Fujihiko Matsunaga 22

Publications and Presentations 27

【寄稿論説】

本学における食業人教育の意義

三原　和俊*

本学の創設者である高碕は，中身の見えない包装食品の製造に対し，心の正しい技術者が必要であるという教育信念を抱いていた．本学は創設以来，その教育信念の実践に努めてきた．

今日，包装食品を取り巻く環境は，種々の課題を有している状況にあるが，本学の教育信念である食業人という言葉が持つ意義について考察した．

キーワード：食業人，包装食品，高碕達之助

本学は包装食品につき，最適な食品製造技術及び充填・密封・殺菌プロセスの単位操作の理論修得と実際技術を併せ修め，包装食品加工の学理と技術の教授･研究を通して，安全で安心，かつ高品質な包装食品を社会に提供することで，人類の福祉と産業の発展に寄与することを目的とした国内唯一の高等教育機関である．

建学以来一貫して，創設者の教育信念である「中身の見えない容器詰食品の製造にこそ，心の正しい技術者が必要である」ことを標榜し，教育を行ってきたが，この創設者の考え方は，缶詰産業に携わる多くの企業人に共有され，包装食品技術者にとって欠かせない資質となり，本学では，2007 年に缶詰製造学科から包装食品工学科に名称変更するに伴い，この精神を「食業人」という言葉に託したが，この言葉の持つ意義につき，本学紀要の創刊に当たり，考察したい．

東洋食品工業短期大学は，日本の缶詰業界の発展に多大なる貢献を果たした故高碕達之助（東洋製罐株式会社創立者）の，缶詰産業に携わる技術者への強い思い，志を具現化した大学であり，1938（昭和 13 ）年 4 月に故高碕達之助が財団法人東洋罐詰専修学校を創設したことに端を発している．

創設者自ら，企業の缶詰製造技術者として第一歩を踏み出し，さらに缶詰製造技術を究めるためにメキシコ，アメリカに渡り，その中で缶詰産業の健全な発展のためには，製缶事業と缶詰製造事業との分離が必要との認識に至り，帰国後，製缶事業を日本に興し，日本の缶詰産業の育成に努め，自らも缶詰時報にミカン缶詰白濁に関する一考察を記し，うずら卵缶詰製造技術につき，昭和 29 年に特許登録するなど実践的な経営者でもあった．

昭和初期，農水産製品輸出の約 6 割を占め，生糸，茶等の明治以来の製品を凌駕して農水産缶詰がわが国の重要な輸出製品となったが，欧米諸国の缶詰業界の視察を通じて，我が国の缶詰技術の未熟さを痛感し，日本の缶詰の品質向上が業界として避けて通れない課題であり，缶詰製造の基礎技術を科学的側面から分析，研究し，技術向上を図るとともに，急速に拡大・発展する缶詰産業の技術者不足に対し，缶詰事業を通して社会に奉仕し，国益を伸張することを念願していた創設者は，製缶事業の経営者という立場を離れ，缶詰技術者を養成するため，本学を創設するに至った．

この創設者の思いを，本学では「誠実と勤労の精神を根底においた人格教育」を建学の精神に，「理論と実際技術を併せ修め，勤労を尊ぶ優秀な技術者を育成する」を教育理念に，「食品の加工，貯蔵法の学理及び技術の教授ならびに研究を行い，教養高く実践性に富む有為な人材を育成し，人類の福祉と，産業の発展に寄与する」を教育目的として，缶詰業界に実践的な中堅技術者を送り出してきた．

創設者が追求した「中身の見えない容器詰食品の製造にこそ，心の正しい技術者が必要である」という教育信念を表す「正」しいという字には，“一”線で“止”めるという強い意志，即ちある一線を越えたらその行為により，食品へ悪影響を及ぼす場合，その一線を越さないことを“実践”できる，創設者が“食業人”として求めたあるべき姿が浮かび上がってくる．

実践は座学と異なり，言葉で理解できないものを行為で学ぶものであり，ある一線を越えることで起きる現象を身体で覚え，座学で学んだ知識を実際の行為に活かす教育であり，本学の教育の根幹とも言える．

さて「食業人」の“食”の字源は，人が良くなるという通説や，又は字が成立した時代は人を食したという物騒な説もあるが，下の字はキ（キュウ）という器の象形，上の人に似た字はフタからの会意文字で，食器に盛られた「たべもの」を，やわらかくして食べることが語源という説に従えば，食は容器と大変深い関係のある言葉と言える．

*連絡先, E-mail: kazutoshi_mihara@shokuken.or.jp

一方,「食業人」の“業”の字源は，吊り鐘に似た楽器を吊り下げる歯型模様の木製の装飾台を象る，転じてこれを作る仕事，さらに一定の目的がある行い，何らかの意図を持ってなすことを業と言い，仏法では梵語でカルマ：行為又は行為による影響力も含めて業（ごう）を意味するが，自ら成した行為の果報は自らが受ける自業自得となる.

まさに「食する業」とは，生きるために地球上の他の生命の命を器に包み，食することに深く関わり，または他の人への命を支える因果応報を営むことであり，自らの食の行為の影響に責任をとり，未来に良因となる行為，善業に昇華する必要がある.

すなわち,“食業”とは一瞬の目先の刹那的な行為ではなく，まだ見えていない人の食に対して，命の責任を負うことであり，それ故，安全な食べ物をつくる心の正しさが問われる業となる.

生命の基本原理は，自己保存と自己増殖及び自己独立性に尽きるが,「衣食足りて礼節を知る」ということわざのうち，衣は外部環境に対し自らの周囲に拡大した内部環境でもあり，自己独立性にも繋がるが，食は自己保存と自己増殖を司り，自分以外の外部への生命との繋がりを担う，単に自ら生きるだけでなく，他人とも共生することで，人間社会の礼節とも深く関わる重要な役割を担っていることを示唆している.

食べることが人の命に繋がり，食が命なら，食に携わる食業人は，ものづくりの基本である，良いものを安く，早く提供するだけでなく,食べものの安全を追求することで，人の命を保証するプロフェショナルな力量，行為が求められる.

職業には，生活を保持し，生計をたてるための「生業」と，その職に携わる者がしなければならない，各人がそれぞれの立場で力を尽くしてなすべき務め，責任となる「職分」とが相互に絡み合うが，自らつくった食を目の届く範囲内で供する飲食業と異なり，包装食品では見えないところで食されることにより，包装食品の職分のあるべき姿となる食業人を強く意識することが重要となる.

食を学び，人間を磨き，食業人としての力を養い，しっかりとした実践的な「食業人」を世の中に輩出すべく熱い思いで，座学に実習・演習・実験等の体験を通じて学ぶ教育を積極的に組み合わせて取り組んできたのが本学の教育の特徴でもある.

教育がルソー以来の，知識の伝授より，体験・経験を通して人間として学ぶ教育を基盤とする方向から，教育の成果が評価しやすい学力偏重の教育方向へと変わってきたと言える．その結果，実践知より座学知を重視する座学中心主義へと教育が偏る危惧が指摘されて久しくなる．本学は創設者の強い思いに基づき，座学を通じて知識を学ぶとともに,座学で学んだ知識を検証できる実践教育に建学以来，力を注いできた.

従来，教育は知育，徳育，体育が中心となるが，人として生きる上で食することが，豊かな人間性を育む上で欠かせないという認識で，心が若い，柔軟な時期に身体的，精神的，社会的に健全な人材育成を図ることが大切であり，本学の食業人教育は，それを大学教育の場に反映させた教育と言える.

缶詰は近代科学の発展に伴う産物であるが，1665年イギリスのフックが作った，複式顕微鏡による小さな生物の観察やボイルの脱気技術，1804年のニコラ・アペールによる瓶詰法，1811年のピーター・デユランによる缶詰法，1873年のパストゥールによる加熱殺菌と腐敗防止法の発見，その翌年の高圧殺菌法の発明，ぶりきの製造，そして1896年米アムス兄弟による缶蓋密封材の液状ラバー塗布技術，1897年ジュリアス・フレチンガーの二重巻締法の発明等によるサニタリー缶をつくる生産技術，高分子材料開発等の多様な技術，知識が，より安全な缶詰を裏付けることとなった.

つまり発明から1世紀ほどの間は，缶詰原理は良く解明できず，また製造技術も未熟ではあったが，実践的な経験と確かな腕を持つ技能者，職人等により，ひたすら安全に食を包むことが，缶詰食品の安全を保証していたことになる.

包装食品は，包むことで外界との遮断が可能となり，食の価値の損失を長期間損なわないことが実現でき，包むと食は単独の存在ではなく,まさに包食同源であると言える.

食の本来の姿と異なる形態で保存する伝統的保存食品とは異なり，たべものそのものの形態を長期保存させたいという，1万年前の農業革命以来の人類の長い夢は，約200年前に出現した缶詰技術の実現で可能となり，近年に出現した冷蔵・冷凍食品が物流，家庭に普及するまで，保存食品の究極の姿であり，常温保存ができるという特性も考えると，これからも今後に出現する保存食品技術の基盤となる基幹保存技術でもある.

この缶詰技術に端を発した包装食品は，技術と技量，座学と実践，どれ1つ欠けても，安全な包装食品を創り出すことができないことを肝に銘じておく必要があり，創設者の強い思いを“食業人”という言葉に託し，これからの包装食品産業の第一線で自ら率先して，安全で安心で美味しい包装食品を創り出す食業人を育成することが，本学の使命であると考え，これからも教育・研究の分野で，大学環境の質向上に努めていきたく，関係者の変わらぬ本学へのご支援をお願いし，本学紀要創刊号の挨拶としたい.

Significance of educating “Shoku-Gyo-Jin”, or food manufacturing professionals in Toyo College of Food Technology

Kazutoshi Mihara*

Tatsunosuke Takasaki, the founder of Toyo College of Food Technology (TCFT), had a philosophy about educating food manufacturing professionals in canning industry that honesty is requisite for engineers working in canning industry because the inside of canned foods is invisible.

Since its foundation, TCFT has endeavored to realize his educational philosophy.

Here I introduce the term “Shoku-Gyo-Jin”, or food manufacturing professionals to describe significance of our educational belief. In this paper, education of “Shoku-Gyo-Jin” is discussed in consideration of current issues surrounding packaged foods.

Key words: Shoku-Gyo-Jin, packaged food, Tatsunosuke Takasaki

*Corresponding author, E-mail: kazutoshi_mihara@shokuken.or.jp

【Research Article】

Effect of Anaerobic Atmosphere on Acetate Ester Biosynthesis and Alcohol Acyltransferase Activity in Bananas

Sumithra K. Wendakoon*

Aroma is an important contributor to the quality of fruits. The effects of anaerobic condition on the production of volatile compounds including acetate esters, and the activity of alcohol acyltransferase (AAT) in bananas were investigated. Incubation of the pulp in less than 1% O_2 resulted in a significant reduction in the formation of acetate esters. Regardless of the presence of a higher level of endogenous and exogenous alcohols in the pulp under anaeorobic conditions, the production of acetate esters decreased. When pyruvate, isobutyl alcohol, and methyl hexanoate were added to the pulp, lower acetate ester production was detected under anaerobic conditions than in aerobic storage. When yellow ripened bananas were exposed to short-term anaerobic conditions (12, 24, and 48h), higher levels of ethanol and acetaldehyde were detected. Immediately after releasing the fruit from the anaerobic atmosphere, isobutyl acetate and isoamyl acetate were decreased but recovered later. The increase in AAT activity was slightly lower under anaerobically treated fruits than untreated fruit. However, the lower activity in treated samples was sufficient for the ester production in bananas. The results suggest that acetate esters cannot be produced without oxygen due to inhibition of production of acetyl CoA derived from pyruvate via mitochondria and beta-oxidation of long-chain fatty acids.

Key words: Anaerobic condition, acetate esters, acetyl CoA, alcohol acyltransferase (AAT)

Introduction

Volatile compounds are responsible for fruit aroma that influences consumer acceptability, and contribute to the characteristic flavor of fresh fruits. Fruit aroma is a complex of a large number of volatile compounds such as alcohols, aldehydes, terpenes, sulfur-containing compounds, and esters. Among them, esters are the predominant aroma volatiles in most fruits. Bananas are one of the world's most important food crops, which is a sugar-rich and easily digested food. Bananas mainly produce volatile esters, such as isobutyl acetate, and isoamyl acetate, which contribute to the characteristic aroma of the fruit. Esters are formed by esterification of low molecular alcohols and carboxylic acids. Gilliver and Nursten[1] and Ueda and Ogata[2] reported that the acid moiety of acetate esters was formed from acetyl CoA, activated form of acetate in banana fruit. Acetyl CoA and alcohol are then converted to acetate esters by alcohol acyltransferase (AAT), which has been identified and partially purified in ripened bananas[3].

During the postharvest period, the quality of fruits, especially aroma is easily lost due to postharvest handling. The most common way to maintain good quality during transport or storage is to seal the fruits in polyethylene bags and keep them under desirable temperature. However, the production of volatile compounds often fluctuates when fruits are sealed in plastic film bags. For this reason, consumers sometimes recognize off-flavors, such as alcohol, when the fruits are unpacked. To improve postharvest quality, it is important to study aroma production in bananas under low oxygen or anaerobic conditions.

In this article the author wishes to discuss and review the published data including author's research data on acetate ester biosynthesis, production of other volatile compounds and alcohol acetyltransferase activity under anaerobic conditions in banana fruit.

*Corresponding author, E-mail: sumithra_wendakoon@shokuken.or.jp

Acetate ester biosynthesis in banana fruit pulp

Acetate esters such as isobutyl acetate and isoamyl acetate which gives banana-like aroma to the fruit, are formed by esterification of acetyl CoA and alcohols, which are derived from amino acids. Generally, acetyl CoA is formed from different sources, such as pyruvate and fatty acids in higher plants. Pyruvate, formed from glycolysis, is converted to acetyl CoA by pyruvate dehydrogenase in mitochondria. However, acetyl CoA itself cannot directly pass through the mitochondrial membrane. Therefore, mitochondrial acetyl CoA is hydrolyzed to acetate by acetyl CoA hydrolase, which is present in mitochondria and then leaks out from the mitochondria. Continuously, acetate is converted to acetyl CoA by acetyl CoA synthetase present in the cytosol[4] since acetate can't be reacted with AAT[2]. It has been reported that acid moiety of acetate esters was mainly derived from pyruvate via acetate in bananas (cv Cavendish) although a small amount of acetyl CoA was formed from citrate, which is formed in the tricarboxylic acid cycle in mitochondria[5]. Some of cytosolic acetyl CoAs in banana fruit maybe derived from acetaldehyde by aldehyde oxidase[6].

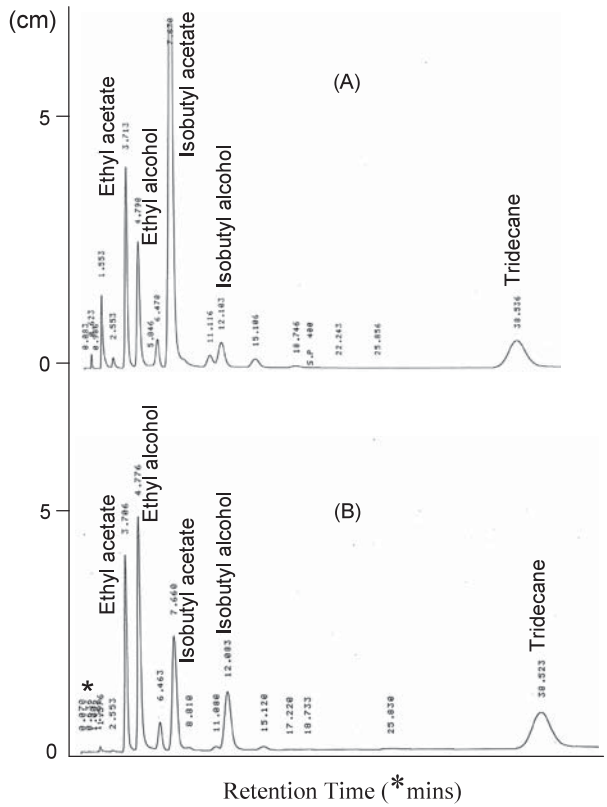

Fig. 1　Gas chromatogram of the formation of isobutyl acetate in banana pulp resulting from the addition of isobutyl alcohol under aerobic (A) and anaerobic (B) conditions. Tridecane was used as an internal standard.

Production of acetate esters under low oxygen concentrations

During the postharvest period, the quality of bananas is easily lost because the fruit becomes highly perishable after the initiation of the ripening process. The most common way to maintain good quality during transport or storage is to seal the fruit in polyethylene bags. However, when bananas are packaged with polyethylene bags, the fruits are subjected to be at risk of encountering anaerobic conditions during storage or transport. As a result, banana-like esters can be suppressed and off-flavor could be produced in the fruit.

In the author's research, to elucidate the effects of low oxygen or anaerobic conditions on acetate ester biosynthesis, ripened banana pulp was used. When banana pulp was incubated under various concentrations of oxygen, less than 1% oxygen caused a significant reduction in the production of acetate esters[7]. Regardless of the presence of a large amount endogenous ethanol and the remaining exogenous isobutyl alcohol after complete anaerobic incubation with the pulp, the production of acetate esters decreased (**Fig. 1**). To determine the relation between pyruvic acid and acetate ester formation under anaerobic conditions, banana pulp was incubated with sodium pyruvate and isobutyl alcohol for 4hrs. As shown in **Fig. 2**, the production of isobutyl acetate was lower than that of incubated under air. The reduction of acetate esters under anaerobic conditions suggested that pyruvate may not pass into mitochondria and that the metabolites, such as acetate, do not leak out from mitochondria. The formation of acetyl CoA, derived from beta-oxidation was also studied. Lower levels of esters such as ethyl acetate, butyl acetate, ethyl butyrate and methyl butyrate, were detected when banana pulp was incubated with methyl hexanoate under anaerobic conditions than that of under aerobic conditions due to suppression of beta-oxidation under anaerobic conditions. To determine the effect of short-term anaerobic conditions on the production of aroma volatiles and the activity of AAT during the postharvest period, yellow, ripened (yellow with green tips) bunches of bananas were treated with nitrogen gas for 12, 24, and 48h at 20 ℃ [8]. Large amount of ethanol and acetaldehyde were produced in anaerobically stored bananas due to anaerobic fermentation. The concentration of ethanol was higher than that of acetaldehyde in the treated fruits, since acetaldehyde is an intermediate compound and ethanol is an end product of the anaerobic pathway.

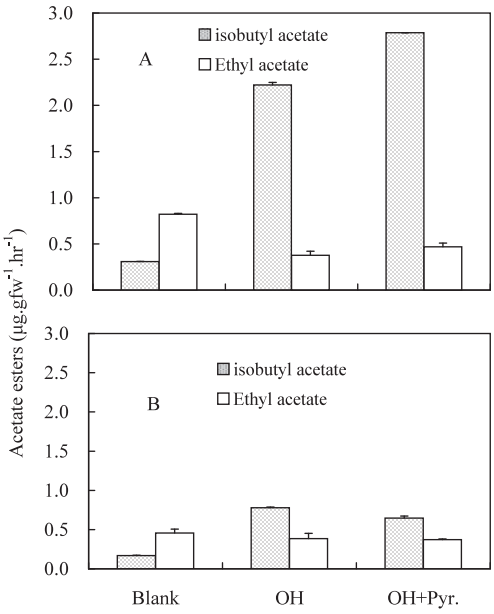

Fig. 2 Acetate ester formation in banana pulp resulting from the addition of sodium pyruvate (Pyr.) and isobutyl alcohol (OH) under aerobic (A) and anaerobic (B) conditions. Error bars represents SE (n=3). fw, fresh weight.

Furthermore, the author elucidated that the production of isobutyl acetate and isoamyl acetate was reduced markedly in 24h and 48h nitrogen treated bananas just after removing the fruits from the anaerobic conditions but recovered 1day later. After long-term CA storage of apples, aroma production was suppressed by CA storage and the greatest reduction was found under the condition of 1% O_2 and 3% CO_2[9].

Effect of anaerobic conditions on alcohol acyltransferase activity

The first AAT enzyme characterized in fruits was reported by Harada et al.[3] in banana pulp. And they also reported that the enzyme activity first appeared at the yellow-green stage and peaked at the full yellow stage of bananas. The enzyme, only active on acetyl CoA, was later identified in apple[10] while another AAT enzyme, active with different acyl CoAs, was purified and characterized from strawberries[11]. The gene expression for the enzyme has been detected at the onset of ester biosynthesis in banana fruit[12]. A number of studies have reported that the importance of AAT as a key enzyme in aroma biosynthesis in many fruits. Ke D. et al[13] have reported that the reduced AAT activity by CA treatments was a major reason for the decreased concentrations of isopropyl acetate, propyl acetate, and butyl acetate in strawberries. The effect of short-term anaerobic conditions on AAT activity in bananas was investigated for the first time by Wendakoon et al.,[8]. The AAT activity was increased in both anaerobically and aerobically stored banana fruits, and during the latter part of the storage, AAT activity was slightly lower in anaerobically stored fruits than in the untreated fruits (**Fig. 3**). However, there was no significant difference in acetate ester production between anaerobically and aerobically stored bananas at the latter part of the storage[8]. Therefore, the author's results indicated that anaerobically treated bananas for a short-term had sufficient AAT activity for the production of esters at the end of the storage.

In spite of presence of sufficient AAT activity in anaerobically stored bananas at early stage of the storage (**Fig. 3**), significantly low concentrations of isobutyl acetate and isoamyl acetate were detected just after removing the fruit from the anaerobic condition[8]. It implied that the substrates of the AAT were not adequate for the production of acetate esters under anaerobic conditions.

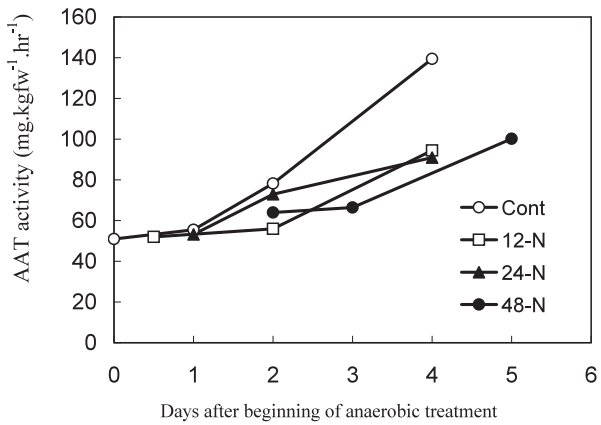

Fig. 3 Changes in AAT activity in yellow, ripened bananas after nitrogen treatments (12, 24, and 48h) during storage. The enzyme activity was measured by GC, in terms of isobutyl acetate formation.

Conclusion

The results from the author's study clearly show that the formation of acetate esters is inhibited by anaerobic conditions because acetyl CoA, acid moiety of acetate esters, which is derived from pyruvate via mitochondria and beta-oxidation of long-chain fatty acids cannot be produced without oxygen (**Fig. 4**). The results further demonstrated that when bananas are exposed to anaerobic conditions for a short-period (12～48h), the

aroma balance is disturbed and off-flavor will develop due to the production of higher levels of ethanol and acetaldehyde in the fruit. However, the activity of AAT is not significantly affected by short-term anaerobic atmosphere in bananas. The data obtained from this research provided significant and helpful information for the keeping quality of bananas, especially the production of volatile compounds, during the postharvest-period.

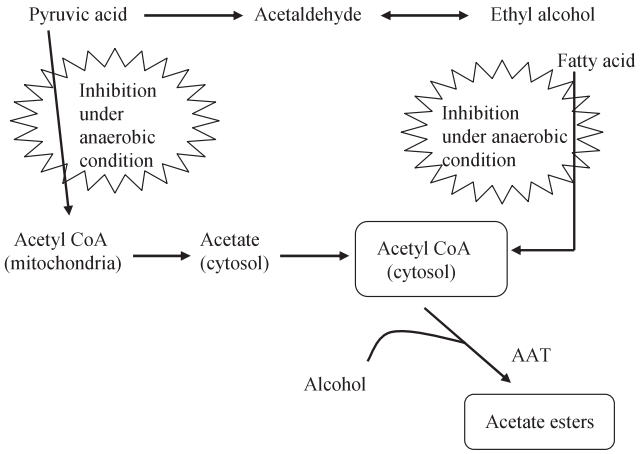

Fig. 4　Proposed pathways for acetate ester biosynthesis and its inhibition under anaerobic conditions in banana pulp. AAT, alcohol acetyltransferase.

References

1）1. Gilliver P. J. and Nursten H. E. The source of the acyl moiety in the biosynthesis of volatile banana esters. *J. Sci. Food Agric.* **1976**, 27, 152–158.

2）Ueda Y. and Ogata, K. Coenzyme A-dependent esterification of alcohols and acids in separated cells of banana pulp and its homogenate. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **1977**, 24, 624–630.

3）Harada M, Ueda Y and Iwata T, Purification and some properties of alcohol acetyltransferase from banana fruit. *Plant Cell Physiol* **1985**, 26: 1067–1074.

4）Wendakoon S. K., Ueda Y., Imahori Y. and Tomimasu Y. Presence of Acetyl-CoA Synthetase in ripened bananas. *Food Preservation Science.* **2005**, 31, 75–80.

5）Wendakoon S. K., Ueda Y., Imahori Y. and Ishimaru M. Pathway of acetate ester formation in banana fruit pulp. *Food Preservation Science.* **2004**, 30, 17–21.

6）Wendakoon S.K., **2004**. Ester biosynthesis under aerobic and anaerobic conditions and its relative enzymes in bananas（*Musa sapientum* L.）Thesis, ph.D.

7）Wendakoon S. K., Ueda Y., Imahori Y. and Ishimaru M. Inhibition of acetate ester biosynthesis in banana（*Musa sapientum* L.）fruit pulp under anaerobic conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 1615–1620.

8）Wendakoon S.K., Ueda Y., Imahori Y. and Ishimaru M. Effect of short-term anaerobic conditions on the production of volatiles, activity of alcohol acetyltransferase and other quality traits of ripened bananas. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86, 1475–1480.

9）Brackmann A., Streif J. and Bangerth F. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apple after long-term controlled atmosphere storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1993**, 118, 243–247.

10）Fellman J.K., Mattheis J.P., Matinson D.S. and Bostic. Assay of acetyl CoA alcohol transfersre in Delicious apples, *HortSci*, **1991**, 26,152–161.

11）Perez A.G., Sanz C., and Olias J.M. 1993. Partial purification and some properties of alcohol acyteltransferase from strawberry fruits. *J Agric Food Chem*, **1993**, 41, 1462–1466.

12）Jayanty S, Song J, Rubinstein N.M, Chong A and Beaudry R.M, Temporal relationship between ester biosynthesis and ripening events bananas. *J Amer Soc Hort Sci* **2002**, 127: 998–1005.

13）Ke D., Zhou L., Kader A. A. 1994. Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1994**, 119, 971–975.

嫌気状態がバナナ果実の酢酸エステル生成およびアルコールアシルトランスフェラーゼ活性におよぼす影響

ウェンダコーン　S. K.*

香りは果物の品質を決める重要な要素である．嫌気状態がバナナ果実の揮発性成分の生成および AAT 活性におよぼす影響について調査した．酸素濃度が１％以下ではバナナ果実の酢酸エステル生成が極めて低かった．果肉細胞内外のアルコールの存在にもかかわらず，嫌気状態ではバナナ果実の酢酸エステル生成が低下した．バナナ果実にピルビン酸，イソブチルアルコール．脂質を添加すると，嫌気状態でのエステル生成は好気状態と比べて低かった．熟したバナナ果実を短時間の嫌気状態に貯蔵すると，多量のエタノールやアセトアルデヒドが生成された．嫌気状態から解放直後のバナナではイソブチルアセテートおよびイソアミルアセテート生成が低かったが，貯蔵後期になるとこれらのエステル生成が回復した．嫌気状態で貯蔵したバナナ果実の AAT 活性は，好気状態で貯蔵した果実と比べてわずかに低かった．しかし，この AAT 活性はエステル生成

に十分であると考えられる．本研究結果から，酸素がない状態では，ピルビン酸や脂質からのアセチル CoA の供給が阻害されるため，酢酸エステルが生成されないことが明らかになった．

キーワード：嫌気状態，酢酸エステル，アセチル CoA，AAT

* 連絡先 , E-mail: sumithra_wendakoon@shokuken.or.jp

【短　報】

好熱性細菌 *Geobacillus stearothermophilus* のミスマッチ DNA 認識タンパク質の同定

松永　藤彦*，境　晶子[1]，望月　聖也
南　光輔，稲津早紀子

生物には，DNA 複製のエラーや種々のストレスによる DNA 損傷を修復する様々なシステムが備わっている．*Geobacillus stearothermophilus* は，芽胞形成型好熱性真正細菌である．この菌は，容器詰食品・飲料の加温販売における変敗原因菌として知られている．高温環境下の DNA 修復システムを明らかにするため，G/T, G/U ミスマッチ DNA あるいは A/U ペアー DNA に特異的に結合するタンパク質を探索した．その結果，G/T ミスマッチおよび G/U ミスマッチ DNA に特異的に結合するタンパク質を発見した．これらのタンパク質を質量分析により同定したところ，G/T ミスマッチ DNA 結合タンパク質は MutS，G/U ミスマッチ DNA 結合タンパク質は UvrA と同定された．これらのタンパク質はゲノム DNA にミスマッチ DNA が形成されたとき最初に損傷を認識し，修復をスタートするタンパク質であると考えられる．

キーワード：*Geobacillus stearothermophilus*，ミスマッチ DNA，DNA 修復，MutS，UvrA

緒言

生物にとって遺伝情報の保持複製は極めて重要な意味を持つ．生物はゲノム DNA を安定に保持するために様々なシステムをもつことが分かってきている．例えば，ゲノム DNA を複製する際に生じる複製エラーや塩基の脱アミノ化によって生じるミスマッチ DNA は，そのままにしておくと遺伝情報の変異につながるが，これらの損傷を認識し修復する様々なシステムのあることが分かってきている．また，紫外線や化学物質によって生じる様々な DNA 損傷を修復するシステムの存在も明らかとなってきている[1) 2)]．

Geobacillus stearothermophilus は，芽胞を形成する好熱性真正細菌である．この菌は，容器詰食品・飲料を加温販売する際の変敗原因菌（いわゆるフラットサワー菌）として知られている．芽胞の耐熱性が非常に高いためレトルト殺菌等で完全に殺菌できないことがあり，その場合，*G. stearothermophilus* の至適生育温度と加温販売温度が一致するため（55 ℃前後），微生物制御には特別な注意が必要である[3) 4)]．*G. stearothermophilus* は高温環境下で生育するため，物理化学的要因による DNA 損傷を受けやすいと考えられる．とくに，5-メチルシトシンの脱アミノ化によるチミンへの変異やシトシンの脱メチル化によるウラシルへの変異がおこりやすい可能性がある．この変異によって G/T ミスマッチや G/U ミスマッチが生じる．そのため，高温環境下で生存している *G. stearothermophius* にはこれら DNA 修復を行なうタンパク質が存在すると考えられる．

高温や紫外線，化学物質や活性酸素などのストレスによって微生物の栄養細胞は損傷菌と呼ばれる状態になり，通常の培養では検出されないが死滅しているわけでもない“viable but non-culturable”な状態になる．このような細胞は通常の方法では検出できないため，食品製造の微生物管理で問題を引き起こす可能性がある．また，損傷菌の状態から回復した細胞はそのストレスに対して耐性を増すこともしられている[5)]．包装食品を汚染している *G. stearothermophilus* は，加熱殺菌による高温ストレスを受ける．したがって，高温環境下におけるこの菌の生育のメカニズム，特に様々なストレスに対する耐性や修復メカニズムを調べることは重要な意義を持つ．しかしながら，この菌においてどのような DNA 修復システムが備わっているのかまだほとんど分かっていないため，本報告では *G. stearothermophius* におけるミスマッチ DNA 損傷を修復するタンパク質の同定を行なった．

材料と方法

細胞培養

菌株は，*Geobacillus stearothermophilus* ATCC12980 を使用した．細胞培養は TYG 培地（1 % Tryptone，0.5 % Yeast extract，0.2 % K_2HPO_4，pH 7.2）を用い，55 ℃・好気条件で行った．

細胞抽出液の調製

*　連絡先, E-mail: fujihiko_matsunaga@shokuken.or.jp
[1]大阪医科大学医学部化学教室

後期対数増殖期の細胞培養液を回収し，PBS（137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4）で洗浄の後，ソニケーションバッファー（5 mM HEPES, pH7.0, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM DTT）に懸濁し，細胞を超音波破砕した（5 watt, 4 min）．さらに，遠心（16,000 x g，20 min，4 ℃）を行い上清を採取し，これを細胞抽出液とした．

合成ミスマッチ DNA の調製

実験に用いた合成 DNA の配列は以下の通りである．各 DNA は 5' 末端にリンカー配列 GATC をもつ．

MIS1：5'-G A T C G T A C C A G T A T C G G C-3'
MIS2：5'-G A T C G C C G A T A C T G G T A C-3'
MIS3：5'-G A T C G T A C C A G U A T C G G C-3'
MIS4：5'-G A T C G C C G A T G C T G G T A C-3'

これら 4 種の合成 DNA の組み合わせにより，正常 DNA あるいはミスマッチ塩基対を含む DNA ができる（**Fig. 1**）．組み合わせは以下の通りである：正常 DNA（MIS1+MIS2），G/T ミスマッチ（MIS1+MIS4），G/U ミスマッチ（MIS3+MIS4），A/U ペア（MIS2+MIS3）．

DNA セファロースの調製

各 DNA は T4 Polynucleotide kinase（NEB）による末端のリン酸化ののち，T4 DNA Ligase（NEB）を用いて多重連結を行なった．各酵素反応は製造元の指示に従った．連結させた合成 DNA は活性化セファロース樹脂（GE healthcare）に結合させた（**Fig. 1**）．セファロースと DNA のカップリング反応は製造元の指示に従った．

ミスマッチ DNA 修復タンパク質の分離

正常 DNA またはミスマッチ DNA を結合した DNA セファロースをカラムに充填した（アフィニティーカラム）．アフィニティーカラムを結合バッファー（25 mM HEPES, pH7.0, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM DTT）で平衡化させた後，細胞抽出液をアフィニティーカラムに通し，DNA セファロースと結合反応を行った．セファロースの 10 倍量の結合バッファーで洗浄を行った後，セファロースの 2.5 倍量の溶出バッファー（25 mM HEPES, pH7.0, 15 mM $MgCl_2$, 1 M NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM DTT）によって DNA に結合したタンパク質を溶出した．実験は独立して調製した 2 つの細胞抽出液を用いて行ない，再現性を確認した．各カラムには細胞 1 g 分の細胞抽出液を等量使用した．

SDS-PAGE による DNA 結合タンパク質の展開

DNA セファロースに結合したタンパク質を SDS-PAGE sample clean-up kit（GE healthcare）を用い濃縮した．得られた試料を常法に従い，SDS-PAGE 法で展開した．タンパク質の検出はクマシーブリリアントブルー染色によって行なった．泳動に際しては微量のタンパク質を濃縮する過程で回収効率に変動があること，また最終的なタンパク質量が限られていることから試料のタンパク質濃度は測定しておらず，全量をアプライした．ミスマッチ DNA のアフィニティカラムに対する特異性が明確かつ，再現性良く観察されたタンパク質を質量分析に供与した．

ミスマッチ DNA 修復タンパク質の質量分析

電気泳動後のゲルから特徴的なバンドを選択し，ゲルから各バンドをピッキングした．ピッキングした各ゲル片は脱色後，還元液（10 mM DTT，25 mM Ammonium hydrogen carbonate）を加えて，56 ℃で 45 分間反応させた．洗浄後アルキル化液（55 mM 2-iodoacetamide, 25 mM Ammonium hydrogen carbonate）で 30 分間，-SH 基のアルキル化を行った後，ゲル片にトリプシン溶液

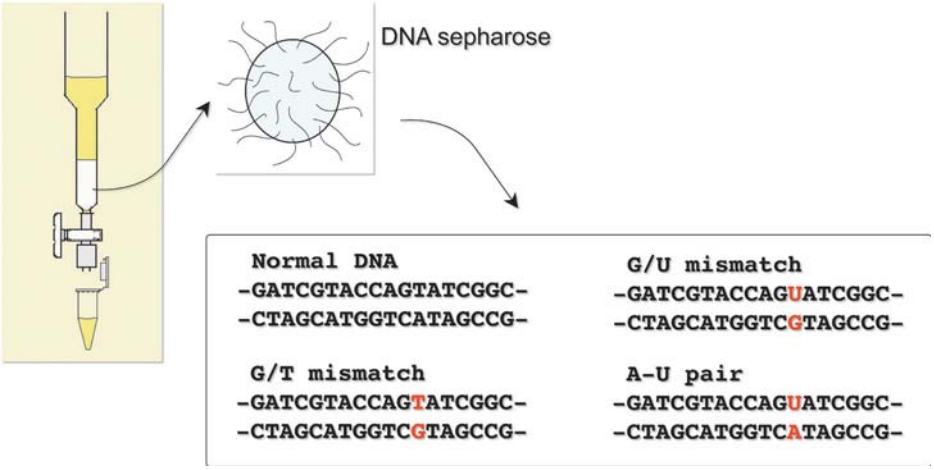

Fig. 1 Schematic presentation of DNA-affinity column. Column was filled with DNA-sepharose beads. DNA was covalently attached to the sepharose beads. Cell extract was poured into the affinity column and proteins specifically bound to the DNA-sepharose was eluted by 1M NaCl. Sequences for normal DNA, G/T mismatch-, G/U mismatch-, or A/U pair-containing DNA are also indicated.

（20 ng/μL，25 mM Ammonium hydrogen carbonate）を加えて，37 ℃で一晩静置し分解した．次に，トリプシン分解によって生成したペプチドを溶出し，質量分析装置（MALDI-TOF, Bruker Daltonics）で分析した．

結果

DNA 修復タンパク質の探索

後期対数増殖期にある菌体を超音波で破砕し細胞抽出液を調製した．この細胞抽出液を正常 DNA（コントロール），あるいは G/T ミスマッチ，G/U ミスマッチ，A/U ペアを含む DNA を結合したアフィニティーカラム（**Fig. 1**）と反応させ，正常でない塩基対を特異的に認識するタンパク質を探索した．

正常 DNA と G/T ミスマッチ DNA に結合したタンパク質をそれぞれ電気泳動によって展開し染色したところ，いずれの DNA を用いた場合も複数のバンドが検出された（**Fig. 2**）．両者のバンドパターンを比較したところ，正常 DNA のサンプルでは薄いバンドだが，G/T ミスマッチ DNA のサンプルにおいて強い染色強度を示すものがあった（**Fig. 2**, Band2）．同様に，G/U ミスマッチ DNA あるいは A/U ペア DNA に結合したタンパク質を正常 DNA と結合したタンパク質と比較したところ，G/U ミスマッチ DNA でも他の DNA では見られない別のバンドを確認することができた（**Fig. 2**, Band3）．A/U ペア DNA を用いた場合は，明確に特異的と判断されかつ再現性良く現れるバンドは検出できなかった．

これらの結果から，*G. stearothermophilus* は G/T ミスマッチと G/U ミスマッチを特異的に認識するタンパク質を少なくとも 1 つずつ発現していることが分かった．

質量分析によるタンパク質の同定

アフィニティーカラムで分離されたミスマッチ DNA に特異的に結合するタンパク質を同定するため，G/T ミスマッチと G/U ミスマッチそれぞれで特異的に確認されたバンド（**Fig. 2**, Band2, Band3）を質量分析装置に供与した．また，比較のため，正常 DNA を含み，すべての DNA で共通に確認されたバンド（**Fig. 2**, Band1）も分析した．質量分析は MALDI-TOF 方式で行い，同定は PMF 法および MS/MS 法を用いた．その結果，正常 DNA に結合したタンパク質は DNA polymerase I（**Fig. 3A**, **Table 1**），G/T ミスマッチ DNA に特異的に結合したタンパク質は DNA mismatch repair protein MutS（**Fig. 3B**, **Table 1**），G/U ミスマッチ DNA に特異的に結合したタンパク質は Excinuclease UvrA と同定された（**Fig. 3C**, **Table 1**）．いずれの場合も十分に高いスコアを示しており，同定の確度に問題は無いと考えられた．ただし，*G. stearothermophilus* のゲノム DNA は解読されていないため, DNA polymerase I 以外は同属近縁種のデータを用いた．

以上の結果から，アフィニティーカラムにはミスマッチ DNA の有無にかかわらず DNA polymerase I が結合しており，G/T ミスマッチは MutS タンパク質が，G/U ミスマッチは UvrA タンパク質が特異的に認識していることが明らかとなった．

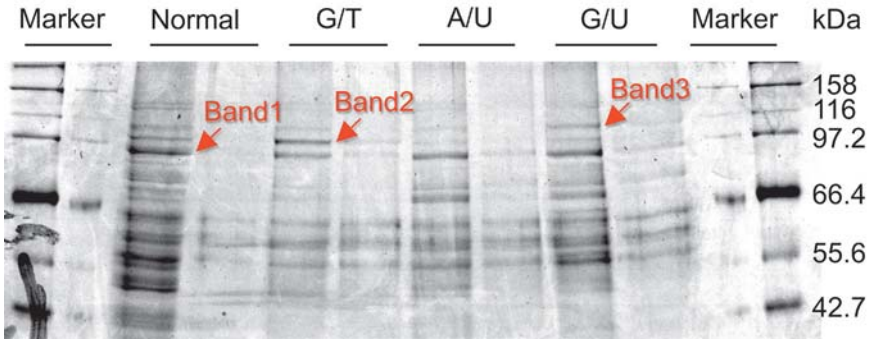

Fig. 2　SDS-PAGE analysis of eluates from normal DNA, G/T mismatch, G/U mismatch, and A/U pair DNA affinity column. Each eluate has two lanes that came from two different dilutions of the same sample. Both ends of the gel are molecular size marker. Mw for the size marker is indicated on the rightmost. Band1, band that was commonly observed; Band2, band that was intense in G/T mismatch sample; Band3, band that was intense in G/U mismatch.

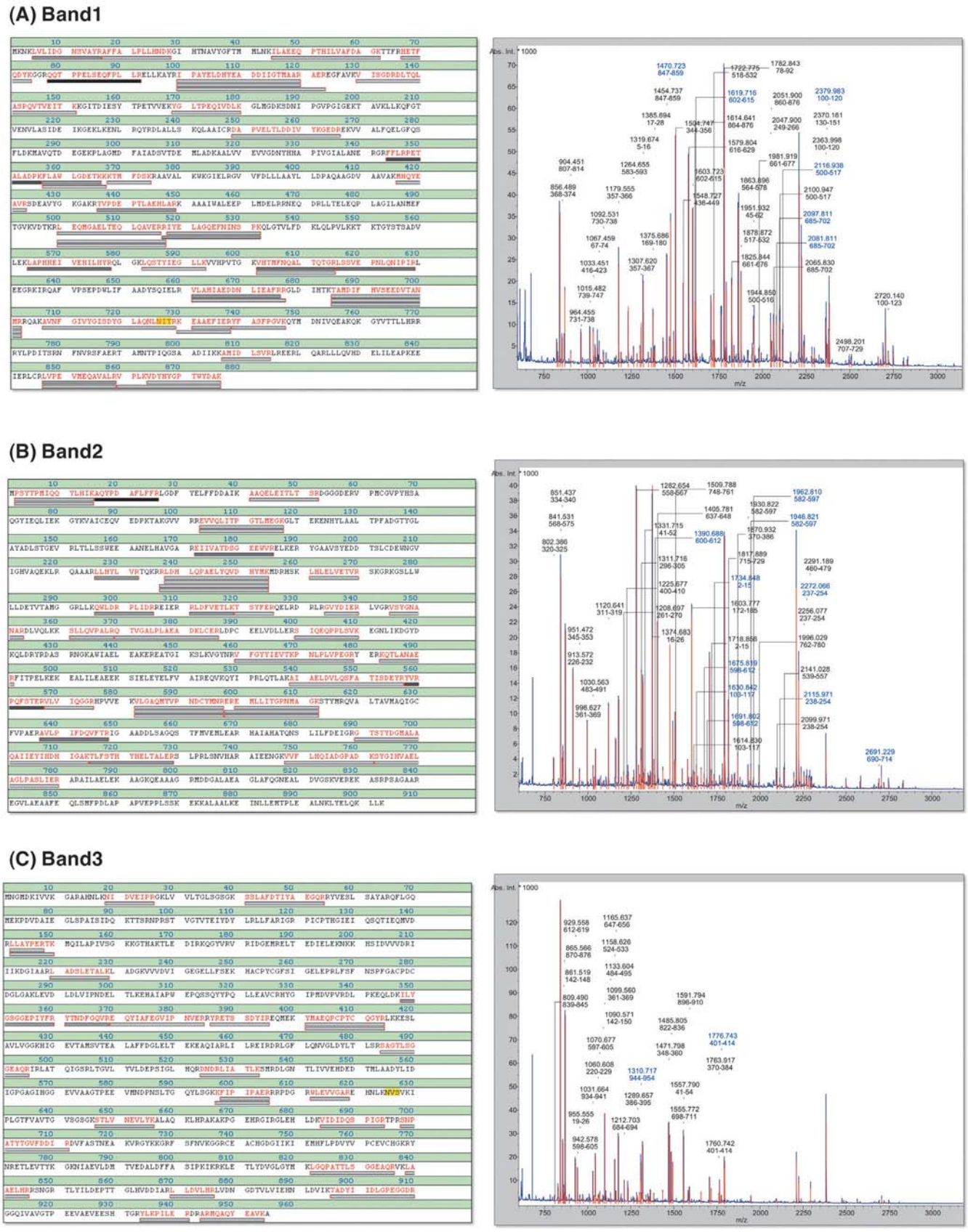

Fig. 3 MALDI-TOF MS analysis. Band1, Band2, Band3 found in SDS-PAGE analysis (Fig. 2) were analyzed by PMF-MS/MS methods. PMF peak pattern (right) and sequence coverage pattern (left) are indicated for each band.

Table 1　Summary of MALDI-TOF analysis

Sample ID	gi number[a]	Annotation[b]	Mass (Da)	pI	PMF score	PMF&LIFT score
Band1	806281	DNA polymerase I	98665	5.65	281	338
Band2	221089894	DNA mismatch repair protein MutS	101735	5.50	171	365
Band3	56421620	excinuclease ABC subunit A	106502	5.85	118	224

a. NCBI gene identification number

b. MutS and UvrA are identified by using *Geobacillus* sp. Y412MC61 and *Geobacillus kaustophilus* HTA426 sequence data, respectively.

考察

本研究ではG/Tミスマッチ，G/Uミスマッチ，A/Uペアを含む合成DNAに対するアフィニティーカラムを用い，それぞれに特異的に結合するタンパク質を*G. stearothermophilus*の細胞抽出液から探索した．正常DNAを含めて，全てのDNAで共通に確認されたタンパク質はDNA polymerase Ⅰと同定された．本研究で用いた実験系では，セファロースのDNA末端等にDNA polymeraseⅠが結合したため，全てのDNAに共通のバンドとして確認できたと考えられる．

G/TミスマッチDNAに結合していたタンパク質は，DNA mismatch repair protein MutSと同定された．このタンパク質は大腸菌やヒトにも存在し，大腸菌やヒトではG/TミスマッチDNAを修復する際に，最初にミスマッチを認識するタンパク質であることが分かっている[1) 2)]．MutSがG/Tミスマッチ塩基対に結合すると，ひきつづきDNA修復を行なう他のタンパク質を呼び寄せることなどが知られている．今回の結果では，G/Tミスマッチに特異的に結合していたことが確認されたので，大腸菌やヒトで知られているのと同様に*G. stearothermophilus*でもMutSが最初にG/Tミスマッチを認識し，他の修復タンパク質を呼び寄せ修復をスタートすることが示唆された．また，*G. stearothermophilus*ではVsr endonucleaseがG/Tミスマッチを認識するとの報告があり[6)]，この酵素とMutSは別系統の修復システムなのか，あるいは協同しているのか明らかにする必要がある．

Fig. 4は，G/Tミスマッチを修復する中温菌のMutS（*Bacillus subtilis, Escherichia coli*）と*G. stearothermophilus*の近縁種*G. kaustophilus*のMutSとを用い，アミノ酸配列を比較したものである．3つのアミノ酸配列は相同性が

```
G.kaustophilus  YIHDHIGAKTLFSTHYHELTALERSLPRLSNVHARAIEENGKVVFLHQIADGPADKSYGI 758
B.subtilis      YVHDHIGAKTLFSTHYHELTVLEDKLPQLKNVHVRAEEYNGTVVFLHQIKEGAADKSYGI 761
E.coli          NLANKIKALTLFATHYFELTQLPEKMEGVANVHLDALEHGDTIAFMHSVQDGAASKSYGL 773
                 : ::* * ***:***.*** *  .:  : ***  * * ...:.*:*.: :*.*.****:

G.kaustophilus  HVAELAGLPASLIERARAILAELEKAAGKQEAAAGRMDDGALAEAGLAFQGNEALDVGSK 818
B.subtilis      HVAQLAELPGDLIARAQDILKELEHSGNKPEVPVQ————————————————KPQ 799
E.coli          AVAALAGVPKEVIKRARQKLRELESISPNAAAT-————————————————Q 807
                 ** ** :* .:* **:  * ***  . :  ..                        :

G.kaustophilus  VEREKASRPSAGAAREGVLAEAAFEQLSMFPDLAPAPVEPPLSSKEKKALAALKEINLLE 878
B.subtilis      VKEEPA————————————QLSFFDEAEKPAETPKLSKKEKQVIDAFKSLNILD 840
E.coli          VDGTQMS————————————LLSVPEETSP——————————AVEALENLDPDS 836
                *.                      **.  :                .: *::.::  .

G.kaustophilus  MTPLEALNKLYELQKLLK 896
B.subtilis      MTPLEAMNEMYKLQKKLH 858
E.coli          LTPRQALEWIYRLKSLV- 853
                :** :*:: :*.*:. :
```

Fig. 4　Multiple sequence alignment of MutS proteins in *Geobacillus kaustophilus, Bacillus subtillis,* and *Escherichia coli*. Only the region close to C-terminal end is shown. Alignment was performed by using ClustalW2.

高く，機能ドメインもよく保存されていた．しかし，*G. kaustophilus* MutS の C 末端近には，*B. subtilis* や *E. coli* では存在しないアミノ酸配列が存在している．この領域は大腸菌の MutS 結晶構造では 3 次元構造の明らかにされていない部分である[7]．*G. kaustophilus* や *G. stearothermophilus* MutS の C 末端部分がどのような構造をとり，どのような生理的機能をもつのか非常に興味深い．

G/U ミスマッチ DNA に特異的に結合するタンパク質は Excinuclease UvrA と同定された．このタンパク質は UvrABC 複合体において，損傷部位の認識を行なうタンパク質である[1)2)]．UV 損傷時のヌクレオチド除去修復において鍵となるタンパク質であるが，今回の結果から，*G. stearothermophilus* においては，G/U ミスマッチにも特異的に結合し修復を行う働きがあると示唆される．UvrA タンパク質はバルキーな構造をもつ異常 DNA を認識することで知られる．*G. stearothermophilus* UvrA も G/U ミスマッチによる異常な構造を認識し，結合した可能性がある．*G. stearothermophilus* UvrA の結晶構造は明らかになっているが[8]，細胞内での機能は分かっておらず，本研究の結果により UvrA の機能理解が一歩すすんだ．

本研究では，今までわかっていなかった *G. stearothermophilus* におけるミスマッチ DNA 認識タンパク質を同定した．加熱殺菌や生育に必要な高温条件下では，シトシンや 5-メチルシトシンの脱アミノ化によるミスマッチ DNA が多数発生していると考えられ，この修復機構を理解することは *G. stearothermophilus* の微生物制御に重要な意味を持つ．そのためには，本研究で同定したタンパク質を発端として遺伝学や *in vitro* の再構築系の実験を行うことでミスマッチ DNA 修復機構の詳細を解明する必要がある．

謝辞

本研究を遂行するにあたり，松永は東洋食品工業短期大学研究費（#08-06, #09-08）から，境は科研費（基盤 C 一般＃ 11-082）からサポートを受けた．

参考文献

1）DNA repair and Mutagenesis, 2nd edition. Errol C. Friedberg, Graham C. Walker, Wolfram Siede, Richard D. Wood, Roger A. Schultz, and Tom Ellenberger.（2006）ASM press
2）Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. Rihito Morita, Shuhei Nakane, Atsuhiro Shimada, Masao Inoue, Hitoshi Iino, Taisuke Wakamatsu, Kenji Fukui, Noriko Nakagawa, Ryoji Masui, and Seiki Kuramitsu. Journal of Nucleic Acids（2010）vol. 2010 Article ID 179594
3）缶詰食品と微生物．田中光幸．日本缶詰協会
4）容器詰食品の加熱殺菌（理論および応用）第 3 版．（1993）松田典彦，藤原忠．日本缶詰協会
5）微生物のストレス損傷とこれからの食品衛生 土戸哲明 食品と開発．（2010）vol.45(1):4-6
6）Repair of hydrolytic DNA deamination damage in thermophilic bacteria: cloning and characterization of a Vsr endonuclease homolog from *Bacillus stearothermophilus*. Martin Laging, Eric Lindner, Hans-Joachim Fritz, Wilfried Kramer. Nucleic Acids Research（2003）vol. 31:1913-1920
7）The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G.T mismatch Meindert H. Lamers, Anastassis Perrakis, Jacqueline H. Enzlin, Herrie H. K. Winterwerp, Niels de Wind & Titia K. Sixma. Nature（2000）407:711-717
8）Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* UvrA provides insight into ATP-modulated dimerization, UvrB interaction, and DNA binding. Danaya Pakotiprapha, Yoshihiko Inuzuka, Brian R Bowman, Geri F Moolenaar, Nora Goosen, David Jeruzalmi, Gregory L Verdine. Molecular Cell（2008）vol. 29:122-133

Identification of DNA mismatch recognition proteins in the thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*

Fujihiko Matsunaga*, Akiko Sakai, Seiya Mochizuk, Kousuke Minami, Sakiko Inatsu

Extremophiles are thought to have damage-tolerance/repair system that allows them to resist harsh environmental stresses. *Geobacillus stearothermophilus* is a thermophilic bacterium that grows at around 55°C. It forms endospore that survives extremely high temperature. Due to the heat resistance, *G. stearothermphilus* causes spoilage of processed foods and drinks. Regulating growth of this bacterium, therefore, is an important goal in food processing. However, damage- tolerance/repair system of this bacterium is not fully understood.

Here we studied damage repair system of *G. stearothermphilus*. Cell extract of this bacterium was passed through a column on which mismatch DNA is fixed. Proteins bound to the mismatch-DNA column were analyzed by SDS-PAGE and compared with proteins bound to normal DNA. The analysis identified proteins specifically bind to G/T or G/U mismatch DNA. Mass Spectrometry analysis of these proteins indicated that G/T DNA was bound by mismatch-recognition protein MutS, and G/U

DNA was bound by UvrA, a subunit of UvrABC endonuclease. These proteins are likely to be the primary actors that recognize these mismatch DNA produced at high temperature.

Key words: Geobacillus stearothermophilus, mismatch DNA, DNA repair, MutS, UvrA

*Corresponding author, E-mail: fujihiko_matsunaga@shokuken.or.jp

【短　報】

食品の衛生的取り扱いと微生物制御に関する授業研究
―おにぎりを用いた学生実験の提案―

稲津　早紀子*，松永　藤彦

おにぎりを用いて食品の衛生的取り扱いと微生物制御に関する学生実験の確立をめざした．本実験では「手指の常在菌」「衛生的な作業」「抗菌作用による微生物制御」「保存条件による微生物制御」という４つの学習ポイントを掲げた．そして「手指の常在菌」「衛生的な作業」については手袋の有無，「抗菌作用による微生物制御」については梅干しの有無によって検証し，「保存条件による微生物制御」については冷蔵庫と室温保存で効果を比較検討したところ，明確かつ容易に微生物制御効果が確認できた．日常生活に密着した内容のため，印象に残りやすく細菌の特徴や食品の取り扱いにはどのような点を注意すればよいのかということを体系的に理解する手助けになり，教育効果が向上すると考えられる．

キーワード：おにぎり，*staphylococcus*，微生物制御，抗菌効果，梅干し，細菌叢，保蔵温度

はじめに

食品衛生学の分野で細菌性食中毒は最も重要な問題の一つである．食中毒は，食品の変質や食品中の有害物質によって起きることもあるが，多くは環境中に生息する病原性微生物が食品を汚染することによって起こる．人体にもたくさんの微生物が存在している．例えば，人の手には数えきれないほどの微生物が付着している．中でも，食品衛生上問題となる黄色ブドウ球菌は健康な人の鼻腔，皮膚や手指からも 20 ～ 40% の頻度で検出される[1]．そのため，家庭や手作業の多い食品製造現場では，手指を介して汚染が広がり，食中毒発生の原因となる恐れがある．従って，微生物の分布や汚染経路を理解し，食品の衛生的な取り扱いを学ぶことは重要な意義を持つ．

微生物の増殖は制御することができる．例えば食品を加熱する，乾燥させる，冷蔵庫保存するといった食品の保存方法の検討や，お酢や梅干しといった抗菌作用をもつものをうまく利用することで，微生物の増殖抑制は可能となる．微生物の特性を知り，増殖を制御することも安全に食品を扱っていくうえで重要なことである．

通常，食品衛生実験等ではパームスタンプ法や拭き取りによる ATP 検査を用いて[2]，手指の汚染と洗浄効果について学ぶ。しかしこの方法では，食品の取り扱いや微生物による食品汚染の制御までを体系的に体感することができない．

そこで今回，我々はおにぎりを用いて，食品の衛生的な取り扱いと微生物制御について理解を深めることができる学生実験をデザインした．学生実験をデザインするにあたり，

1. 技術的に簡便であり，再現性がよいこと．
2. 限られた実験時間内で終了するものであること．
3. 感染などの危険性が少ないこと．
4. 日常生活に密着しており，学生の興味を引きつけるものであること．
5. 応用，発展させやすいものであること．

の５点に留意した．

Table 1 に大まかな実験の流れと検証内容および方法を示す．実験は３日間で完結する．１日目のおにぎり作成では，手袋の有無により手指の常在菌の検証および衛生的な作業効果の検証を行う．さらにおにぎりへの梅干し混ぜ込みの有無により，抗菌作用による微生物制御の検証を行う．作成したおにぎりは，室温（25 ℃）または冷蔵庫（4 ℃）で一晩保存し，保存条件による微生物制御の効果を検証する．そして２日目にブドウ球菌検出培地におにぎりから調製したサンプルを散布し，一晩培養した後３日目にブドウ球菌による汚染度を検証する．

材料および方法

検査区は Table 2 に示すとおりである．作成・保存するおにぎりの条件は，作成時の手袋の有無，梅干しの有無，保存条件の違いによって「手袋なし・梅干しなし・室温保存」「手袋なし・梅干しなし・冷蔵庫保存」「手袋なし・梅干しあり・室温保存」「手袋なし・梅干しあり・冷蔵庫保存」「手袋あり・梅干しなし・室温保存」「手袋あり・梅干しなし・冷蔵庫保存」「手袋あり・梅干しあり・室温保存」「手袋あ

*連絡先, E-mail: sakiko_inatsu@shokuken.or.jp

Table 1　Experimental schedule, inspection points and methods

Schedule	Contents of experiments	Inspection points	Inspection methods
1st day	Make onigiris	Bacterial flora on fingers	With or without gloves
		Hygienic conditions	
		Bacterial control by antimicrobial action	With or without umeboshi
	Storage onigiris	Bacterial control by storage temperature	Cool storage (4℃) or room temperature (25℃)
2nd, 3rd day	Incubation and observation of bacterial colony	Contamination by *Staphylococcus*	Inoculation in a selective medium

Table 2　Inspection classification

	Without umeboshi	With umeboshi
With gloves	Room temperature (25℃)	Room temperature (25℃)
	Cool storage (4℃)	Cool strage (4℃)
Without gloves	Room temperature (25℃)	Room temperature (25℃)
	Cool storage (4℃)	Cool strage (4℃)

り・梅干しあり・冷蔵庫保存」の合計８種類となり，８個のおにぎりが必要となる．

ここでは１班２人で実験を行う場合に使用する材料および方法を記載する．手袋ありの検査内容（「手袋あり・梅干しなし・室温保存」「手袋あり・梅干しなし・冷蔵庫保存」「手袋あり・梅干しあり・室温保存」「手袋あり・梅干しあり・冷蔵庫保存」の合計４種類）については，１班で１セット準備しサンプルを共有し，残りの手袋なしの検査内容については１人ずつ自分のサンプルを用意する．

材料

米（２合），梅干し（６個），マンニット食塩寒天平板培地（MERCK）（12 枚），9 mL 生理食塩水入りボトル（36 本），炊いた米を入れるボール（１つ），水道水を貯めるボール（２つ），しゃもじ（１本），薬さじ，割り箸，サランラップ，滅菌済みナイロン手袋（１組），滅菌済みストマッカーポリ袋（12 枚），滅菌済みスポイト（24 本），コンラッジ棒（２本），70％アルコール，電子天秤，炊飯器，冷蔵庫，培養器，オートクレーブ

方法

1．おにぎりの作成（**Fig. 1**）

米を炊き，アルコール消毒したボールに移した．サランラップをかけ落下菌による汚染を防ぎつつ手で握れるくらいまで冷ました．アルコール消毒したしゃもじで適量米を取り，おにぎりを握り，サランラップで軽く包んだ．手袋なしのおにぎりは，手指を洗わず，ボールに貯めた水道水で手指をぬらしながら握った．この時ボールは個人専用とし，共用を避けた．手袋ありのおにぎりは，殺菌済みの使い捨てナイロン手袋を利用し，手袋を水に濡らさず手袋表面への汚染を避けながら作成した．また，おにぎりは梅干しの影響が及ばないように梅干しなしのおにぎりから握っ

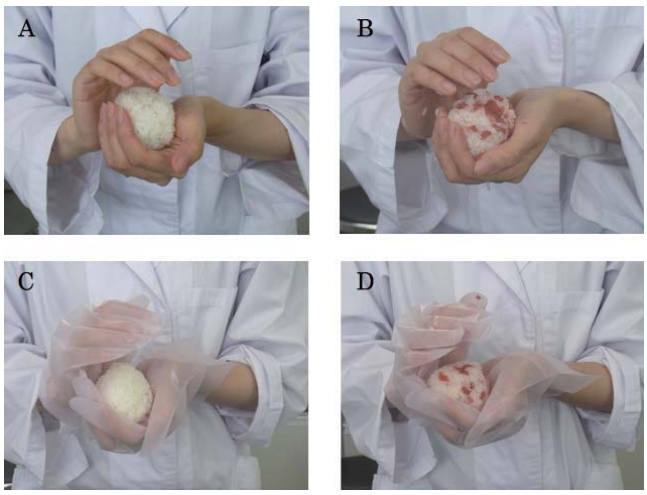

Fig. 1　How to make an onigiri
As it would appear, make onigiris with hands. In case of adding umeboshi, make an onigiri by mixing rice and crumbled umeboshi. (A) without gloves and umeboshi. (B) mix rice and umeboshi without gloves. (C) with gloves and without umeboshi. (D) mix rice and umeboshi with gloves.

た．梅干しを混ぜ込む場合はおにぎり１つに梅干し１粒を用い，種を取り薬さじで梅果肉を細かく砕きおにぎり全体に混ぜ込むようにした．作業で使用するものはあらかじめアルコール消毒する，作業中の会話は慎むなどして手指の常在菌以外の微生物混入を極力避け，しゃもじ等の器具類を介して学生間で常在菌が交叉汚染しないように注意を払った．

2．保存

１で作成したおにぎりを室温（25 ℃）または冷蔵庫（4 ℃）で一晩保存した．冬場に実験を行う場合，室温が低いので培養器を使用する．

3．培養および出現した菌の検証

おにぎりを一晩保存した後，それぞれのおにぎりから2g ずつ米粒を採取し，滅菌済みストマッカーポリ袋に入れた．梅干し入りのおにぎりからの採取では，梅干しが極力入らないようにする．そこに 9 mL の生理食塩水入りボトル２本分（18 mL）を加え，米粒がばらばらになる程度まで手で軽くほぐし 10 倍希釈液を作成した（**Fig. 2**）．次に，滅菌済みスポイトを用いて 10 倍希釈液から 1 mL 採取し，9 mL 生理食塩水入りボトルに加え 100 倍希釈液を作成した．8 種類のおにぎりそれぞれの 100 倍希釈液を作成し，滅菌済みスポイトを用いてマンニット食塩寒天平板培地に 0.25 mL ずつ滴下した．希釈液をコンラッジ棒で塗り広げ，37 ℃で一晩好気培養した．翌日，寒天平板培地上に増殖した細菌数とその様子を観察した（**Fig. 3**）．細菌数はおにぎり１g あたりの CFU で評価した．

結果

以下に学生実験で得られた結果例を示す．

Fig. 2　Suspension of grains of rice. Grains of rice are suspended in saline so that grains are separated apart.

Fig. 3　Colonies of *Staphylococcus* on the selective medium. The color around coagulase-positive *Staphylococcus* becomes yellow. On the other hand, the color around coagulase-negative *Staphylococcus* stays magenta.

1．手袋ありの場合（**Table 3**）

手袋ありのおにぎりは１班で１セット準備し共通サンプルとした．「手袋あり・梅干しなし・室温保存」では，ブドウ球菌が 1.2×10^4 CFU/g 検出された．一方，「手袋あり・梅干しなし・冷蔵庫保存」，「手袋あり・梅干しあり・室温保存」，「手袋あり・梅干しあり・冷蔵庫保存」ではブドウ球菌のコロニーは検出されず，検出限界（4.0×10^2 CFU/g）未満であった．

2．手袋なし学生Ａの場合（**Table 4**）

「手袋なし･梅干しなし･室温保存」では，ブドウ球菌が 6.8×10^5 CFU/g 検出された．一方，「手袋なし・梅干しなし・冷蔵庫保存」，「手袋なし・梅干しあり・室温保存」，「手袋なし・梅干しあり・冷蔵庫保存」ではブドウ球菌は検出されなかった．

3．手袋なし学生Ｂの場合（**Table 5**）

「手袋なし･梅干しなし･室温保存」では，ブドウ球菌が 4.2×10^5 CFU/g 検出された．一方，「手袋なし・梅干しなし・冷蔵庫保存」，「手袋なし・梅干しあり・室温保存」，「手袋なし・梅干しあり・冷蔵庫保存」ではブドウ球菌は検出されなかった．

Table 3　Bacterial count with gloves（CFU/g）

		Without umeboshi	With umeboshi
With gloves	25℃	1.2×10^4	$<4.0\times10^2$
	4℃	$<4.0\times10^2$	$<4.0\times10^2$

Table 4　Representative result（Student A）（CFU/g）

		Without umeboshi	With umeboshi
Without gloves	25℃	6.8×10^5	$<4.0\times10^2$
	4℃	$<4.0\times10^2$	$<4.0\times10^2$

Table 5　Representative result（Student B）（CFU/g）

		Without umeboshi	With umeboshi
Without gloves	25℃	4.2×10^5	$<4.0\times10^2$
	4℃	$<4.0\times10^2$	$<4.0\times10^2$

考察

はじめに学生実験をデザインするに当たり５つのポイントに留意した．この点について考察する．

1．技術的に簡便であり，再現性がよいこと．

Fig. 4 は，手袋の有無によって生じるおにぎりに含まれるブドウ球菌数の差を比較した図である．梅干しは混ぜ込まず，室温で保存した場合の結果を載せた．手袋なしでは，学生Ａの場合 6.8×10^5 CFU/g，学生Ｂの場合 4.2×10^5 CFU/g に達するが，手袋をすることで 1.2×10^4 CFU/g まで減少することがわかる．**Fig. 5** は，梅干しによる抗菌効果をブドウ球菌数で比較した図である．他の条件は手袋なし・室温保存であるが，おにぎりに梅干しを混ぜ込むことによりブドウ球菌を抑制できることが明確にわかる．最後に，**Fig. 6** は，室温保存と冷蔵庫保存でのブドウ球菌数を比較した図である．他の条件は手袋なし・梅干しなしであるが，冷蔵庫で保存することによりブドウ球菌を抑制できることがわかる．このように，本実験では「手指の常在菌」「衛生的な作業」「抗菌作用による微生物制御」「保存条件による微生物制御」という４つの学習ポイントが容易かつ明確に結果として現れる．本実験は本学で３年間にわたり実施しているが，初めて微生物実験を行う学生が実施しても再現性が高い．従って，本実験は学習効果の高い実

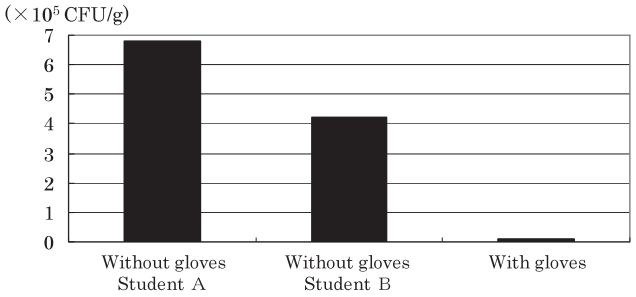

Fig. 4　Comparison of number of bacteria with or without gloves.（Other conditions：without umeboshi and stored at room temperature）

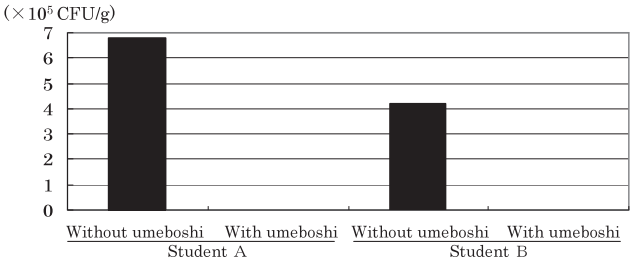

Fig. 5　Comparison of number of bacteria with or without umeboshi.（Other conditions：without gloves and stored at room temperature）

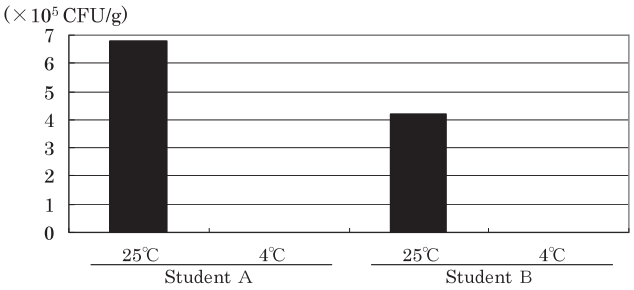

Fig. 6　Comparison of number of bacteria between storage at room temperature and at 4℃．（Other conditions：without gloves and without umeboshi）

験デザインであると言える.

2. 限られた実験時間内で終了するものであること.
結果が現れるまでに3日を要するものの，各作業日とも3時間程度で十分に収まる.

3. 感染などの危険性が少ないこと.
本実験では常在菌を用いて効果を検証しているため学生の健康状態に問題がなければ感染の危険性はほとんどない．ただし，皮膚に傷や火傷のある人，免疫力が低下している人はブドウ球菌感染症にかかりやすいので注意が必要である.

4. 日常生活に密着しており，学生の興味を引きつけるものであること.
黄色ブドウ球菌は人の手指や皮膚に存在する最も身近な食中毒菌の一つである．そのため，原因食品としておにぎりがよく取り上げられる．実際に総菜屋や自家製おにぎりから黄色ブドウ球菌が検出されることがあり[3,4] 問題意識を喚起しやすい．また，梅干しには抗菌作用があり，おにぎりやお弁当の中に入れると腐敗菌の増殖を抑える効果があるということは多くの学生が知っている．今回の実験はこれらのことを踏まえた上でデザインした.
食品衛生学では多くの食中毒菌について学ぶため，このように日常生活に密着した材料や方法を用いて実験内容を設定すると印象に残りやすく，細菌の特徴やなぜ注意しなければいけないのか，どのように注意すればよいのかということを体系的に理解する手助けにもなると考える.

5. 応用，発展させやすいものであること.
マンニット食塩寒天平板培地では表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌をコロニーの色で識別することはできるが，コアグラーゼ検査などを用いるとより正確に識別することができる．また，エンテロトキシンの遺伝子を標的としたPCR検査を追加することもできる．このように，表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌の性質の違いに踏み込んだ授業展開が可能である．また使用する平板寒天培地の種類によって，ブドウ球菌以外の一般生菌や大腸菌群についても検討することができる[5]．食品衛生実験では手指の洗浄効果を良く取り入れるが，こういった実験と関連させることによって学習効果も向上すると考えられる.

一連の食品衛生実験終了時に履修学生を対象にアンケートを実施したところ，印象に残った，実際におにぎりをにぎり手指の菌を検出したことで手洗いや衛生面に気をつけるようになった，という感想が見られた．学生が興味を持って取り組め，かつ結果が明確にわかる学生実験をデザインすることで，高い教育効果が得られたと考えられる.

要約

おにぎりを用いて食品の衛生的取り扱いと微生物制御に関する学生実験の確立をめざした．本実験では「手指の常在菌」「衛生的な作業」「抗菌作用による微生物制御」「保存条件による微生物制御」という4つの学習ポイントを掲げた．そして「手指の常在菌」「衛生的な作業」については手袋の有無，「抗菌作用による微生物制御」については梅干しの有無によって検証し，「保存条件による微生物制御」については冷蔵庫と室温保存で効果を比較検討したところ，明確かつ容易に微生物制御効果が確認できた．日常生活に密着した内容のため，印象に残りやすく細菌の特徴や食品の取り扱いにはどのような点を注意すればよいのかということを体系的に理解する手助けになり，教育効果が向上すると考えられる.

参考文献

1）垣花シゲ，植村恵美子，岩永正明：病棟看護婦の鼻腔内細菌叢について．環境感染，13(4)，234-237，1998
2）細菌数の指標としてATP検査を用いた場合の手洗い技術上達に関する教育効果．名古屋女子大学紀要．vol51. 53-58，2005
3）食品の衛生状態に関する研究(I)おにぎりの保存における細菌の検出．大阪教育大学紀要．vol.38(2) 223-230，1989
4）市販おにぎりの細菌汚染および保存による細菌の挙動．実践女子大学 生活科学部紀要．vol. 46 15-21，2009
5）「衛生試験法・注解 2005」，日本薬学会編，金原出版株式会社，pp.74-102，2005

Study on teaching hygienic conditions and bacterial control in food production —Proposal of a student experiment using the onigiri（rice ball）—

Sakiko Inatsu* and Fujihiko Matsunaga

We have designed a new experiment for students to learn hygienic conditions and bacterial control in food production using the onigiri (rice ball). Here we have set out four leaning points: effect of (1) bacterial flora of worker's palm, (2) hygienic conditions, (3) antibacterial agent, (4) storage temperature, on conservation of foods. Effect of bacterial flora and hygienic

conditions were examined by the presence or absence of the glove. And effect of antibacterial agent was examined by producing onigiri with or without umeboshi (pickled plum). Additionally, we have compared storage temperature of onigiri at 4°C or at room temperature. These experiments were very simple and they clearly indicated the effects of bacterial control by the factors mentioned above. As onigiri is one of the most popular food in home cooking, this experiment impress students the importance of hygienic conditions. This experiment also helps students to learn characteristics of bacteria. We conclude that our experimental design presented here has a high educational effect

Key words: onigiri, *staphylococcus*, bacterial control, antibacterial agent (umeboshi), bacterial flora, storage temperature

*Corresponding author, E-mail: sakiko_inatsu@shokuken.or.jp

【総　説】

極限環境下におけるヒトと微生物の攻防

松永　藤彦*

容器詰食品の製造においては加熱殺菌のような，微生物にとっての「極限環境」を課すことで微生物制御が行われている．しかし，この地球上には極限環境に対する耐性を備えた，あるいは極限環境を積極的に好んで生きる微生物が存在する．本稿では，極端な環境下でも生存可能な微生物（極限環境微生物）が存在することを紹介し，容器詰食品の内部は微生物制御を行うヒトと，これら極限環境微生物とのせめぎあいの場であることを見ていく．

キーワード：極限環境微生物，包装食品，微生物制御，殺菌

容器詰食品をめぐるヒトと微生物の攻防

缶詰やレトルト食品に代表されるような容器詰食品は長期保存が可能であるという特徴を持つ．この特徴は，容器の密封性と内部の殺菌に依存している．食中毒や変敗の原因となる微生物を殺菌しなければ，安全な容器詰食品を製造することは出来ない．日本の食品衛生法には，容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準として次のような文言が書かれている．

「pH が 4.6 を超え，かつ，水分活性が 0.94 を超える容器包装詰加圧加熱殺菌食品にあっては，中心部の温度を 120 ℃で 4 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で殺菌する」

「pH が 4.6 を超え，かつ，水分活性が 0.94 を超える」というのは，ボツリヌス菌が生育する可能性のある条件である．この場合，完全にボツリヌス菌を殺菌するために，「中心部の温度を 120 ℃で 4 分間」以上の効力で殺菌する必要がある．つまり，食品衛生法のこの文言が意味するところは，ボツリヌス菌が生育する可能性のある包装食品ではボツリヌス菌が死滅するような条件で加熱殺菌しなくてはならないということである．もちろん，殺菌はボツリヌス菌だけを考えれば良いわけではない．それ以外にも食中毒や変敗を引き起こす微生物は多数存在し，それらの微生物が増殖する可能性があれば有効な方法で殺菌しなければならない．

この食品衛生法の文言には pH や水分活性，温度というキーワードが織り込まれている．食中毒や変敗原因微生物の微生物制御は，このような環境要因を「極限」に振り，それに微生物が耐えられなくなることを利用している．そして，食中毒や変敗で問題になるのは，しばしば極限環境に抵抗を示す微生物たちが原因である．本稿では，これをヒトと極限環境微生物の攻防と見立てる．普段はあまり意識されていない微生物の並外れた能力を見ていくことで，包装食品の安全性について一般の食品微生物学とは少し異なった視点を提供したい．

極限環境に生きる微生物たち

20 世紀も終盤に入り，生き物が持つ DNA の中身を直接研究する事が可能になった．1970 年代後半，アメリカのカール・ウーズは，それまで大腸菌やサルモネラ菌，ボツリヌス菌などと同じ真正細菌だと思われていたある種の微生物たちが，真正細菌とは違う生物であると気がついた．もちろん酵母やカビ，ヒトの様な真核生物とも異なる[1]．ウーズが見つけた新たな微生物たちはアーキア（Archaea, 古細菌）とよばれている．現在，生物はまず，真核生物，真正細菌，そしてアーキアの三つのグループに分類されている．アーキアに特徴的なのは，「極限環境」を好んで生きているものが多いことである．また，真正細菌や真核生物の中にも極限環境を好むものがいる．極限環境に対する抵抗性を持つ微生物となるとその数は更に増える．生物の 3 つのグループ全てにおいて，このような生物が存在する．極限環境といっても色々あるのだが，本稿では低酸素状態，水分活性，放射線，pH，そして温度をみていく．容器詰食品の製造に際し，ヒトはこれらの条件を極端にする，すなわち極限環境を用いることで微生物制御を行っている．しかし，必ずしもすべての微生物にとってそれが「極限」とは限らないのだという例をみていく．

酸素

ヒトを含め，多くの生物にとって酸素は必要不可欠な物質である．微生物にしても，生育に酸素を絶対必要とするものがたくさん存在する．このような微生物は酸素を用いた呼吸反応を行いエネルギーを産生しており，好気性微生物とよばれる．好気性の微生物に対しては，酸素量を制御

*連絡先, E-mail: fujihiko_matsunaga@shokuken.or.jp

すれば生育を制御できる．例えば，お菓子類の包装容器内に酸素吸収剤と表示された小袋が入っていることがある．酸素吸収剤によって包装内の酸素を低濃度に保つと，好気性微生物の生育を抑えることができる．このような低酸素状態による微生物制御が有効な典型例がカビ類である．しかし他方で，酸素をむしろ嫌う微生物（嫌気性微生物）や，酸素があってもなくても生きていける微生物がいる（通性嫌気性微生物）．酸素が存在しない状態で生きることができる微生物は特殊な存在なのだろうか？

オーストラリアのシャーク湾にはストロマトライトと呼ばれる構造物が存在する．これは，シアノバクテリアという光合成を行う真正細菌が，海中の堆積物とあわさって特徴的な構造を形成したものである．このストロマトライトは化石としても見つかる．ストロマトライトの化石を顕微鏡で観察すると，シアノバクテリアによく似た細胞が見つかる．化石の年代測定からシアノバクテリアによく似た微生物は，約27億年前に地球上に誕生したことが分かる．そして，この微生物が地球上ではじめて光合成を行い酸素を産生した生物だと考えられている．つまり，この微生物が誕生した約27億年前より昔は，地球上に酸素は欠乏していたと考えられる．地球上に生物（微生物）が誕生したのは約37億年前といわれており，シアノバクテリアの誕生までおよそ10億年のあいだ，微生物は酸素なしで生きてきたことになる．そのことを考えれば，微生物の中に酸素のない状態で生育できるものがいるのは全く珍しいことではない．実際，たくさん存在する．真空パックや酸素吸収剤をもちいたり，あるいは缶詰の内部を脱気したりして低酸素の環境をつくるとカビなどの好気性微生物の増殖を防ぐことができる．しかし，ボツリヌス菌などの嫌気性微生物にとってはむしろ好ましい環境だし，通性嫌気性微生物も平気で生育する環境なのだ．

水分活性

水は生命にとって欠くことのできない分子である．食品微生物学においては，微生物が利用できる水の程度を示す指標として水分活性を用いる．純水の水分活性は1.00で水分活性が低くなるほと微生物の生育が阻害されるが，その程度は微生物によって異なる．日本の食品衛生法では，容器詰食品の水分活性が0.94より大きいか小さいかで殺菌条件が変わってくる．水分活性が0.94という値は，ボツリヌス菌が生育可能かどうか，その限界の水分活性値を基準としている（**Table 1**）．多くの微生物は水分活性が高くないと生育できないため，水分活性を下げれば増殖を抑制できる．水分活性を下げるには，塩濃度や糖度を上げる方法がある．塩辛やジャムの保存性がよいことを思い浮かべると良い．

さて，海水の塩濃度は約3.5％で水分活性は0.98程度である．ところが，この地球上には海水よりもずっと塩濃度の高い水が存在する．たとえばイスラエルの死海は総塩濃度が30%にもなり，水分活性は0.7を切る低い値を示す．この値は塩辛やジャムよりもずっと低く，このような環境では水分活性が低すぎて通常の微生物は生きていけない．しかし，このような高塩濃度の環境を好んで生きる微生物，好塩菌が存在する．また，一見水分がないように見えるカメラのレンズに生きるカビ，あるいはシリコンウエハースに生えるカビも存在する．このように，極めて低い水分活性でも元気に生きる微生物は多数存在する．身近なところでは，人間の皮膚や鼻腔に棲みついているブドウ球菌も水分活性が0.86までなら生育可能である（**Table 1**）．

このように，人間の想像力からすれば十分に極限環境と言える低い水分活性であっても生育可能な微生物は存在する．食品保存において水分活性は重要な微生物制御の要因であるが，このような極限環境に強い微生物が存在することも忘れてはならない．

放射線

次に，視点を変えて放射線について見てみたい．日本では放射線（ガンマ線）による食品の殺菌は許可されていないが，海外では実際に利用されている．ガンマ線を微生物に照射すると細胞内で活性酸素が発生しDNAの2重鎖切断やタンパク質の損傷を引き起こし，殺菌効果を発揮する．

ガンマ線を微生物に照射し，生菌数が37％に減少するのにどれだけの線量が必要だったか（D_{37}）を調べると[2]，大腸菌（*Escherichia coli*）のような普通の微生物は数十グレイ程度の放射線でどんどん死滅していく．しかし，*Deinococcus radiodurans*は7,000 Gyあてないとそこまで死滅しない．この微生物は，アメリカでガンマ線照射による殺菌を研究していて見つかった[3]．普通の微生物ならば死ぬはずの強いガンマ線を照射した肉の缶詰で変敗がおこり，それがきっかけで分離された菌である．また，ラドン

Table 1　Optimal growth temperature, and lower limit of pH and water activity (Aw) that permit growth of various microorganisms

Name	Optimal temperature	Lower pH limit	Lower Aw limit
Escherichia coli	37°C	4.5	0.94
Salmonella	37°C	5.5	0.94
Staphylococcus aureus	35°C	4.8	0.86
Clostridium botulinum (type A, B)	35°C	4.7	0.94
Bacillus cereus	35°C	5.0	0.93

含有量の高い温泉から分離された *Rubrobacter radiodurans* は更に高い放射線耐性を示し，D_{37}=16,000Gy である．このように，放射線に対して非常に高い耐性を持った微生物が存在する．このような微生物は，放射線照射により損傷を受けた DNA などを修復する優れた機能を持っていると考えられる．ヒトの場合 D_{37}=4 Gy であることを考えると，まさに極限の環境下でも生き延びることができる微生物と言える．

pH

容器詰食品の殺菌にあたっては，先に述べたように食品の pH と水分活性が重要である．pH が 4.6 より高くかつ水分活性が 0.94 より高い場合は食品衛生法により中心温度が 120 ℃で 4 分間と同等かそれ以上の殺菌が必要となる．水分活性についてはすでに述べたが，pH についてもボツリヌス菌が増殖できる限界の pH 値が基準となっている（**Table 1**）．ボツリヌス菌と同様に，一般に食中毒や変敗原因菌は pH が低下し酸性度が上がると生育できなくなる．また，低 pH で生育できる微生物は多くが加熱に弱い．したがって，pH の低い果実関連製品では 100 ℃以下の湯につけるなど，低温殺菌と呼ばれる殺菌方法がとられる．しかし，そのような酸性度の高い極限環境でも抵抗性を示す微生物，あるいは酸性環境を好み旺盛に増殖する微生物が存在する．

ヒトの胃は空腹時に pH が 1 ぐらいまで下がる．長らくこのような環境に微生物はいないと考えられていたが，いまでは多くの人の胃にピロリ菌（*Helicobacter pylori*）がすんでいることが分かっている．ピロリ菌は尿素を分解してアンモニアを作り胃酸を中和することができるので，胃の中でも生存可能なのだ．このように，酸性環境に適応した微生物が存在する．

酸性環境は胃の中だけではない．温泉地によくある「地獄」，これもまた非常に pH が低い場所である（**Fig. 1**）．このような場所からも様々な微生物を見つけることが出来る．好酸性菌と呼ばれる微生物だ．例えば，温泉地から分離されたサルフォロバス菌（*Sulfolobus* sp.）を培養する培地では，pH をわざわざ 3.1 に下げて培養する．

また，好酸性菌は自然界に存在するだけでなく，容器詰食品を汚染し変敗問題を引き起こすこともある．*Alicyclobacillus acidoterrestris* などの好酸性菌（**Fig. 2**）は，果汁関連の酸性度が高い容器詰食品（飲料）を汚染し異臭の原因となることが知られている．*Alicyclobacillus* の仲間はもともと酸性度の高い温泉地から発見された微生物である[4]．極限環境と容器詰食品の内部環境は意外なほど似ていることがあるのだ．

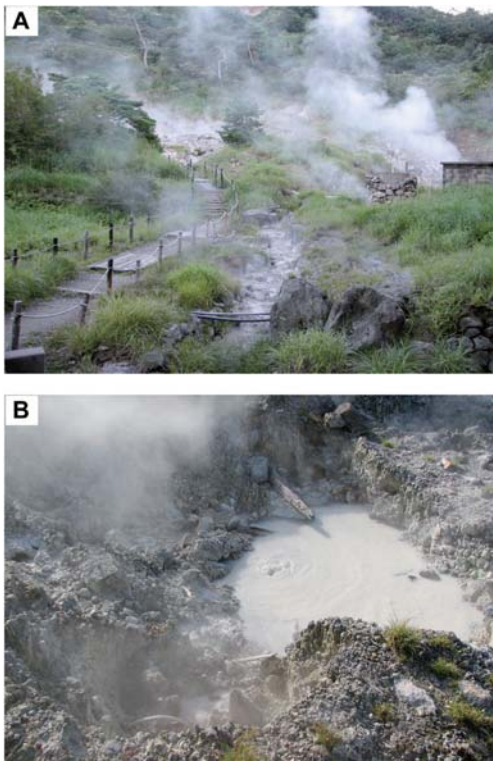

Fig. 1 （A）Picture showing Komatsu-Jigoku, a volcanic place in Oita prefecture, Japan.（B）This place is an example of extreme environment rich in hot acidic water. Acidophiles and thermophiles can be isolated from such water.

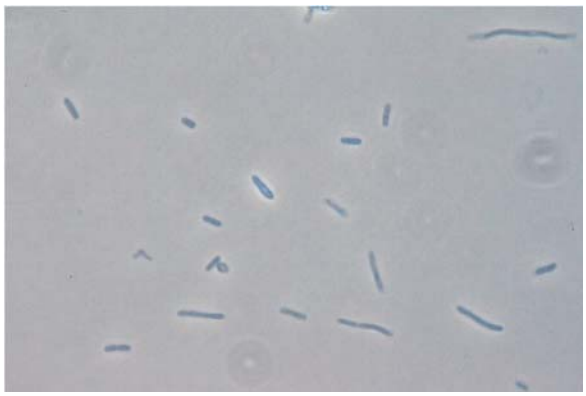

Fig. 2 An example of thermophilic acidophilic bacilli（TAB）isolated from plant nectar（Matsunaga *et al. unpublished*）. This type of bacteria can contaminate acidic drinks to cause off-flavor. Picture was taken by phase contrast microscope.

温度

最後に，温度という視点で極限環境を見ていく．食品の低温保存は家庭でも日常的に行われている．低温環境下では微生物の生命活動が極端に低下することを利用した保存方法である．しかし，低温を好んで生きる微生物も存在する．好冷菌あるいは低温菌と呼ばれる微生物である．好冷菌は一般の微生物が好む温度では増殖せず，10 ℃から零

下数度の範囲で増殖する．地球上には冷たい環境も色々あり，高山や極地でも微生物が存在し増殖している．

細菌の中には芽胞と呼ばれる耐熱性の高い構造に形態変化するものがおり，ボツリヌス菌もその一つである．容器詰食品ではボツリヌス菌を最も恐れるが，これは地球上で最も強力な毒素を産生するからだけではなく，ボツリヌス菌が芽胞を形成するため耐熱性が高いからだ．ボツリヌス菌の芽胞を殺菌し安全な容器詰食品を製造するには，中心温度が 120 ℃で 4 分以上の強い加熱が必要で，レトルト殺菌などの手法が用いられる．芽胞を形成する細菌は容器詰食品の主要変敗原因微生物であり，容器詰食品が芽胞によって汚染されている可能性がある場合，その芽胞をいかに殺菌するかが重要な課題となる．芽胞は耐熱性が高いだけでなく，紫外線や化学薬品にも耐性を示し構造も堅固である．芽胞形成する細菌からしてみれば自然界は様々なストレスに満ちており，自らを守る手段として進化してきた結果の一つが芽胞であると言える．

熱に対して抵抗を示すというよりは，熱が好きな微生物もいる．典型的な高温環境としては温泉地（**Fig. 1**）や海底の熱水鉱床があげられる．このような場所には好熱菌あるいは高温菌とよばれる微生物が棲息している．好熱菌は，常温では増殖を停止し休眠状態にあるが，温度が高く増殖に適していると活発に増殖する．増殖至適温度は 60 ℃前後のものから 100 ℃前後のものまで様々である．このような好熱菌の中には容器詰食品を汚染し，加熱殺菌を逃れ変敗を引き起こすものがある．例えば，*Geobacillus stearothermophilus* は好熱性である上に芽胞も形成する，強い耐熱性を備えた生物である（**Fig. 3**）．冬期に飲料等を加温販売する際の温度は *G. stearothermophilus* の増殖至適温度に近い（55 ℃前後）．そのため，加熱殺菌で死ななかった芽胞が発芽し，通常の細胞に戻り増殖すると変敗事故をおこす．これも，極限に生きる微生物が容器詰食品で問題を引き起こす一例である．そして，この微生物の仲間も温泉地から見つかるのだ．

余談だが，好熱性の微生物は産業の役にも立っている．例えば，いま例に挙げた *G. stearothermophilus* は好熱菌であるので産生するタンパク質は高温に対する耐性がある．高温で行う PCR（人工的な DNA 増幅反応）に用いる DNA 複製酵素として *G. stearothermophilus* のタンパク質が活躍している．

ここまでは極限環境下に生きる微生物を中心に見てきた．しかし，そもそも微生物は一般に，温度変化に適応する能力を持っている．細胞が急に高温環境下におかれたり，あるいは逆に低温環境におかれたりするとタンパク質や核酸の構造変化が誘発され生命活動に悪影響が出る．ところが，このような温度ストレスに対して，細胞内では熱ショックタンパク質やコールドショックタンパク質と呼ばれるタンパク質が産生され，温度変化によっておこるタンパク質や核酸の構造変化を修復したり予防したりする．更に，一度温度ストレスにさらされると，しばらくはストレス応答タンパク質が産生され続け，細胞は通常よりも温度ストレスに対する耐性のあがった状態になることも分かっている．

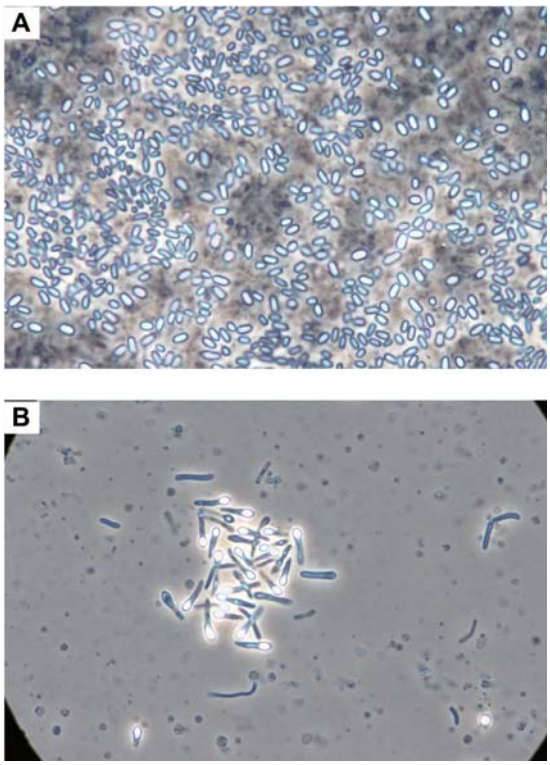

Fig. 3　(A) Phase contrast microscopic image showing spores of *Geobacillus stearothermophilus*. (B) Rod-shaped cells are vegetative cells and round bright particles are spores. Some vegetative cells are in the process of forming spores inside.

多くの微生物は熱に弱いので，食品製造において加熱は非常に有用な殺菌方法である．しかし，ヒトが想像もしないような極限環境下でも元気に生きている，あるいは耐性を備えた微生物が存在するという事実は頭のすみにおいておいた方がよい．

進化し続ける微生物たち

最後に，進化について 2 点言及したい．DNA に書かれた遺伝情報はコピーされて次の世代に受け継がれるが，その正確性は 100% ではないということ．そして，生命の歴史は微生物から始まり，そのむかし微生物はすべて好熱性だったということである．

細胞が分裂するとき，2 つの細胞に DNA をコピーし分配する必要がある．このとき，コピーの正確性は 100% ではなく，一定の頻度で間違いを犯すことが分かっている．その頻度は，1 回細胞が分裂するにあたって，一塩基あたり 10^{-10} から 10^{-9} である[5]．微生物細胞の DNA はおよそ 10^{6} オーダーの塩基対からできている．したがって，1,000 から 10,000 回細胞分裂すれば 1 箇所複製の間違いが起こると考えられる．微生物の細胞分裂はとても速く，速いものでは 30 分もかからず 1 回分裂する．そして，微生物の

場合，DNA の複製ミスにより遺伝子が書き変えられると遺伝形質に影響しやすい．つまり，微生物は自らの姿を少しずつ変え続けており，その速度は他の生物よりも速いと考えられる．

本稿の冒頭で生き物の系統関係を調べる研究について述べたが，同様の研究から生命の起源に近いと思われる微生物は好熱菌であることが分かってきた[6]．生物はもともと熱い環境が好きだった可能性が強く示唆される．実際，遺伝子の中身を先祖型に書き換えると耐熱性が上昇するという実験結果も得られている[7) 8)]．容器詰食品製造において最も重要な殺菌方法が加熱処理なのだから皮肉なものだ．進化の結果，現在の地球環境に適応して多くの微生物の耐熱性が弱まった．しかし，先に述べた様に微生物の進化は今も続いている．耐熱性が弱まった微生物が再び熱に対して，あるいはその他の極限環境に対して耐性を高めてもおかしくない．

おわりに

本稿では極限環境に生きる微生物を，容器詰食品における微生物制御技術と絡めてみてきた．また，進化の側面から微生物のもつ特徴についても述べた．ニコラ・アッペールがフランスで容器詰食品の製造法を出版して 200 年以上たち，容器詰食品の製造技術は長足の進歩を遂げた．しかし，生命には 37 億年の歴史がある．微生物はずっと昔，地球が極限環境だった頃から生きてきて，そのあいだ進化を続けてきた．そして，これからも進化を続ける．極限環境を課すことで容器詰食品の微生物対策をとっている我々もまた，常に進歩が求められるのだ．

参考文献

1）Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Carl R. Woese, George E. Fox. Proceedings of the National Academy of Sciences USA（1977）vol.74: 5088–5090

2）極限環境微生物；放射線耐性細菌の放射線耐性機構．齋藤剛．Viva Origino（2007）vol.35: 85–92

3）Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. A.W. Anderson, H. C. Nordan, R. F. Cain, G. Parrish, and D. Duggan. Food Technology（1956）vol.10: 575–578.

4）*Bacillus acidocaldarius* sp.nov., an Acidophilic Thermophilic Spore-forming Bacterium. G.Darland and T. D. Brock. Journal of General Microbiology（1971）vol.67: 9–15

5）Rates of spontaneous mutation. John W. Drake, Brian Charlesworth, Deborah Charlesworth and James F. Crow. Genetics（1998）vol.148: 1667–1686

6）Bacterial evolution. Carl R Woese. Microbiological Review（1987）vol.51: 221–271

7）Ancestral Residues Stabilizing 3-Isopropylmalate Dehydrogenase of an Extreme Thermophile: Experimental Evidence Supporting the Thermophilic Common Ancestor Hypothesis. Junichi Miyazaki, Shuichi Nakaya, Toshiharu Suzuki, Masatada Tamakoshi, Tairo Oshima and Akihiko Yamagishi. The Journal of Biochemistry（2001）vol. 129: 777–782

8）Palaeotemperature trend for Precambrian life inferred from resurrected proteins. Eric A Gaucher, Sridhar Govindarajan, Omjoy K Ganesh. Nature（2008）vol.451: 704–707

Battle between human and microorganisms under extreme environment

Fujihiko Matsunaga*

When we produce packaged foods, we regulate growth of microorganisms by treating them under “extreme environments”, such as heat, UV, or low pH. However, there are many microorganisms that show high resistance to such extreme conditions. Some even “loves” those environments. In this paper, I introduce such extremophiles that could survive sterilization process or harsh conditions utilized in production of packaged foods. Inside packaged foods is a “battle” between human and extremophiles.

Key words: extremophiles, packaged foods, microbial control, sterilization

*Corresponding author, E-mail: fujihiko_matsunaga@shokuken.or.jp

発表記録（2010 年～ 2011 年）

下線太字は東洋食品工業短期大学教員を示す

外部発表（論文・総説等）2010年

Akita M., Adachi A., Takemura K., Yamagami T., **Matsunaga F**. and Ishino Y. Cdc6/Orc1 from *Pyrococcus furiosus* may act as the origin recognition protein and Mcm helicase recruiter. Genes to Cells, 15, 537-552, 2010.（論文）

Inoue T., Iyota H. and Nishimura N. Prediction method for drying time of wet porous material in humid hot air and superheated steam. Drying Technology, 28(5), 608-614, 2010.（論文）

Izumi H., **Wendakoon S.K**., Okumura R. and Murakami Y. Microbiological quality of fresh-cut cabbage treated with disinfectant and stored in active MAP. Acta Horticulturae ISHS, 875, 303-310, 2010.（論文）

Katoh K., Iyota H., **Inoue T**. and Tsujino T. Volume of a liquid drop detaching from a sphere. Heat Transfer Asian Research, 39(6), 396-409, 2010.（論文）

Matsunaga F., Takemura K., Akita M., Adachi A., Yamagami T. and Ishino Y. Localized melting of duplex DNA by Cdc6/Orc1 at the DNA replication origin in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Extremophiles, 14(1), 21-31, 2010.（論文）

Nagata K., **Inatsu S**., Tanaka. M., Sato H., Kouva T., Taniguchi M. and Fukuda Y. The bifidogenic growth stimulator inhibits the growth and respiration of *Helicobacter pylori*. Helicobacter ISSN. 15, 422-429, 2010.（論文）

Wendakoon S.K., Matsuo H., Yamamoto H. and Izumi H. Effects of high pressure treatment on microbiological and organoleptic quality of fresh-cut vegetables. Acta Horticulturae ISHS, 875, 297-302, 2010.（論文）

奈賀俊人．PETボトル詰柑橘果汁の光増感オフフレーバー．におい・かおり環境学会誌．41(4)，240-245，2010.（総説）

奈賀俊人，隅谷栄伸．透明容器詰柑橘果汁における光劣化異臭に与えるクロロフィルとpHの影響．公益財団法人　東洋食品研究所　研究報告書，28，39-45，2010.（論文）

外部発表（学会発表）2010年

Wendakoon S.K. Effect of temperature on antioxidant activity of reconstituted orange juice in cans and plastic bottles during storage. 日本園芸学会, 2010.

朝賀昌志，**末兼幸子**，松元冨美代，中川真妃，平谷実香，手東瞳．黒豆甘煮缶瓶詰のレトルト殺菌における色調変化について．日本缶詰協会主催第59回技術大会，2010.

朝賀昌志，**末兼幸子**，**奈賀俊人**，下田満哉．白桃缶詰での褐変を伴ったオフフレーバーにおける標品による再現．日本食品科学工学会第57回大会，2010.

稲津早紀子，長田久美子，田中守，福田能啓．ビフィズス菌増殖促進物質，DHNAによる*Helicobacter pylori*の特異的増殖阻害について．第83回日本細菌学会総会，2010.

井上保，伊與田浩志，一色翔悟．湿潤材料の温度測定による高温用広域湿度センサの開発（測定精度と応答性の向上）．日本機械学会2010年度年次大会，2010.

遠藤　明，三島　慎一郎，神山　和則．黒ボク土農耕地における間隙水中の硝酸態窒素濃度および浸透流出量の推定．農業農村工学会全国大会，2010

ウェンダコーンS.K.，石丸　恵，上田悦範. バナナ果実（cv. Senorita）のアルコール代謝系がエステル生成に及ぼす影響. 日本食品保蔵科学会，2010.

北原貴志，**井上 保**，伊與田浩志，西村伸也．湿潤材料の温度測定による高温用広域湿度センサの開発（感湿部表面の水分保持性能の向上）．日本機械学会2010年度年次大会，2010.

後藤隆子，**末兼幸子**，加藤竜浩．ギンナンドライパックの製造および保存にともなう成分変化．日本食品保蔵科学会，2010.

外部発表（学会発表）2011年

Inatsu S., Nagata K., Tanaka. M., Sato H., and FukudaY. The bifidogenic growth stimulator inhibits the growth and respiration of *Helicobacter pylori*. International Union of Microbiological Societies. 2011 Congress.

Inoue T. and Iyota H. Effects of porosity and pore size distribution on capillary water transfer in porous media. Proc. of 7th Asia-Pacific Drying Conference, Tianjin, China.2011.

Matsunaga F., Sakai A., Mochizuki S., Minami K. and **Inatsu S**. Identification of DNA-mismatch proteins in the thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. International Union of Microbiological Societies. 2011 Congress.

Wendakoon S.K., Horie T. and Izumi H. Ester production and alcohol acyltransferase activity in fresh-cut melon during storage. American Society for Horticultural Science, Hawaii, USA. 2011.

朝賀昌志，**末兼幸子**，**奈賀俊人**，下田満哉．白桃と黄桃缶詰におけるオイル様オフフレーバー発生の比較. 日本食品科学工学会，2011.

ウェンダコーンS.K.，石丸　恵，上田悦範．バナナ果実（cv. Senorita）におけるアミノ酸からアルコール残酸基の供給経路の解明．日本食品保蔵科学会，2011.

奈賀俊人，辻本和栄，**後藤隆子**，**末兼幸子**，**朝賀昌志**，三宅一嘉，森田尚文．韃靼米蕎麦を用いた発芽に関わる成分変化. 日本食品科学工学会第58回大会，2011.

東洋食品工業短期大学紀要委員（五十音順）
朝賀　昌志、井上　保、ウェンダコーン スミトラ、竹之内　健、奈賀　俊人

東洋食品工業短期大学紀要　第１号

平成 24 年（2012）３月発行　　非売品

発行者　東洋食品工業短期大学
古賀　守
〒666-0026
兵庫県川西市南花屋敷４丁目 23 番２号
ＴＥＬ　（072）759－4221
ＦＡＸ　（072）758－6959

印刷所　和泉出版印刷株式会社
〒594-0083
大阪府和泉市池上町４丁目２番 21 号