

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-8041

(P2014-8041A)

(43) 公開日 平成26年1月20日(2014.1.20)

(51) Int.Cl.
C12Q 1/02 (2006.01)

F1
C12Q 1/02

テーマコード (参考)
4B063

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2012-148514 (P2012-148514)
(22) 出願日 平成24年7月2日 (2012.7.2)

(71) 出願人 591079487
広島県
広島県広島市中区基町10番52号
(74) 代理人 100088155
弁理士 長谷川 芳樹
(74) 代理人 100126653
弁理士 木元 克輔
(72) 発明者 重田 有仁
広島県広島市南区比治山本町12-70
広島県立総合技術研究所 食品工業技術セ
ンター内
(72) 発明者 青山 康司
広島県広島市南区比治山本町12-70
広島県立総合技術研究所 食品工業技術セ
ンター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 孢子への物質導入方法

(57) 【要約】

【課題】短時間に、広範囲の属種の孢子に対して適用可能な、孢子への物質導入方法及びこれを用いた発芽活性のある孢子の数の測定方法の提供。

【解決手段】対象となる孢子に対して5 ~ 70 の温度下で、1秒~60分間、10MPa~400MPaで加圧する加圧処理工程と、上記孢子と、上記孢子に導入する物質とを混合する物質混合工程と、を備え、上記物質混合工程は、上記加圧処理工程の前であっても後であってもよい、孢子への物質導入方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象となる孢子に対して 5 ~ 70 の温度下で、1 秒 ~ 60 分間、10 MPa ~ 400 MPa で加圧する加圧処理工程と、

前記孢子と、前記孢子に導入する物質とを混合する物質混合工程と、

を備え、前記物質混合工程は、前記加圧処理工程の前であっても後であってもよい、孢子への物質導入方法。

【請求項 2】

前記物質が、色素、タンパク質、オリゴヌクレオチド、プラスミド、放射性同位体を含む化合物、又は、イオンである、請求項 1 に記載の物質導入方法。

10

【請求項 3】

前記孢子に対する発芽誘導物質の存在下で、前記加圧処理工程を行う、請求項 1 又は 2 に記載の物質導入方法。

【請求項 4】

前記加圧処理工程の後に、前記孢子を大気圧下、5 ~ 70 の温度下で、1 ~ 60 分間保持する大気圧処理工程を更に備える、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の物質導入方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の物質導入方法によって、マーカーとなる前記物質を対象となる孢子に導入する工程を備える、発芽活性のある孢子の測定方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、孢子への物質導入方法、及びこれを用いた発芽活性のある孢子の測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

バチルス属及びクロストリジウム属等の芽胞菌、並びに、アスペルギルス属及びペニシリウム属等のカビ等が形成する孢子は、耐熱性、耐薬品性、耐乾燥性等が高く、殺菌が困難である。そのため、食品製造業、医薬品製造業等において、上記孢子による汚染がしばしば問題となる。

30

【0003】

食品、医薬品等の製造においては、製品、中間製品、原料又は製造環境等に存在する孢子の数（以下、孢子数という場合がある）をモニタリングし、製品の殺菌及び製造環境の洗浄が適切になされていること、並びに、原料が孢子等によって過度に汚染されていないこと等が確認されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2006 - 174751 号公報

40

【特許文献 2】特開 2007 - 209223 号公報

【特許文献 3】特開平 6 - 165667 号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】西賢司、加藤良、富田守、「バチルス属芽胞の圧力による活性化と殺菌」、日本食品科学工学会 41 p.542-549 1994

【非特許文献 2】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), p.101-105. 2005

50

【非特許文献3】J. G. CLOUSTON AND PAMELA A. WILLS, "Initiation of Germination and Inactivation of *Bacillus pumilus* Spores by Hydrostatic Pressure", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Feb. 1969, p.684-690

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

通常、孢子数のモニタリングは、培地を用いて孢子を培養し、培養した孢子によって形成したコロニーの数を確認する培養法で行われている。孢子の培養には長時間を要するため、培養法においては、結果が判明するまでに2~14日間の期間が必要となる。したがって、モニタリングの結果、製品が孢子によって汚染されている等の異常が発覚した場合、結果が判明する期間の分だけ洗浄、殺菌等の改善措置の対応が遅れるということから、より迅速な孢子数の測定方法の開発が望まれている。

10

【0007】

特許文献1では、以下のような方法によって孢子数を計測することが開示されている。まず、液体培地で2時間培養、又は2~25で6時間~20時間静置することによって固い外壁を有する孢子を発芽させて、固い外壁がない栄養細胞に変化させる。その後、蛍光色素で上記栄養細胞を染色して、染色された栄養細胞をカウントすることによって孢子数を測定する。さらに、特許文献1では、孢子に60~100のヒートショック処理を施して発芽させた後に蛍光色素によって栄養細胞を染色してカウントすることで孢子数を測定する方法が開示されている。

20

【0008】

しかしながら、試料にはどのような属種の微生物が含まれているか不明であるため、特許文献1に記載の液体培地で孢子を培養する方法では、様々な属種の孢子を選択的に栄養細胞に変化させることは困難となる傾向がある。液体培地に添加する抗菌物質等の選択が適切でない場合、孢子が発芽せず、栄養細胞に変化しない可能性がある。また、この方法では、孢子を発芽させるには数時間という時間を要するため、測定に時間を要するだけでなく、試料に含まれる孢子及び孢子以外の微生物が増殖して、正確な孢子数及び微生物数が測定できなくなる傾向がある。

【0009】

さらに、ヒートショック処理は発芽誘導効果が低いため、多くの場合ヒートショック処理を施しただけでは速やかに発芽が誘導されず、蛍光色素を孢子の内部に導入して正確な孢子数を測定することは困難となる傾向がある。

30

【0010】

一方、特許文献1及び2では孢子にアラニン等の発芽誘導物質を添加して発芽させ、栄養細胞に変化させることが開示されている。特許文献1では、その後、蛍光色素によって栄養細胞を染色して孢子数を測定している。また、特許文献2では、その後、栄養細胞を溶解して遺伝子抽出及び遺伝子分析を行っている。

【0011】

しかしながら、アラニン等の発芽誘導物質についても発芽誘導効果が低く、又、孢子の属種によって各発芽誘導物質の効果が異なるため、どのような属種の孢子が含まれているか分からない試料中の孢子数を測定する場合、適切な発芽誘導物質を選択することが困難となる傾向がある。

40

【0012】

加圧することによって孢子の発芽が誘導されることも知られている。発芽した孢子は、外壁を失うことで耐熱性、耐薬品性等を喪失して容易に殺菌可能となることから、加圧による孢子の発芽を利用した殺菌方法が報告されている(非特許文献1~3)。

【0013】

しかしながら、孢子に加圧するのは孢子の殺菌を目的とすることから、加圧することによる孢子及びその他の微生物の生死は考慮されておらず、また、発芽によって孢子の内部に物質を導入するという試みもない。

50

【0014】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、短時間に、広範囲の属種の胞子に対して適用可能な、胞子への物質導入方法及びこれを用いた発芽活性のある胞子の数の測定方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、対象となる胞子に対して5 ~ 70 の温度下で、1秒 ~ 60分間、10 MPa ~ 400 MPaで加圧する加圧処理工程と、

上記胞子と、上記胞子に導入する物質とを混合する物質混合工程と、
を備え、上記物質混合工程は、上記加圧処理工程の前であっても後であってもよい、胞子への物質導入方法を提供する。

10

【0016】

このような加圧の圧力及び温度条件であれば、広範囲の属種の胞子の物質透過性を短時間に向上させ、目的の物質を胞子の内部に導入することができる。すなわち、圧力と温度とを適切に設定することで様々な属種の胞子の発芽を短時間で効率的に誘導でき、胞子の内部への物質導入効果が著しく向上する。

【0017】

上記物質は、色素、タンパク質、オリゴヌクレオチド、プラスミド、放射性同位体を含む化合物、又は、イオンであることが好ましい。

【0018】

上記物質導入方法は、胞子に対する発芽誘導物質の存在下で、加圧処理工程を行うことが好ましい。発芽誘導物質の存在下で加圧処理を行うことによって、胞子の発芽率が更に向上し、物質導入効果も更に向上する。

20

【0019】

上記物質導入方法は、上記加圧処理工程の後に、上記胞子を大気圧下、5 ~ 70 の温度下で、1 ~ 60分間保持する大気圧処理工程を更に備えることが好ましい。これにより、胞子の発芽率が更に高まり、物質導入効果も更に向上する。

【0020】

また、本発明は、上記物質導入方法によって、マーカーとなる物質を対象となる胞子に導入する工程を備える、発芽活性のある胞子の測定方法を提供する。

30

【0021】

このような方法によれば、広範囲の属種の胞子の内部に、マーカーとなる物質を短時間に導入し、発芽活性のある胞子の数を測定することができる。本発明において発芽活性のある胞子は、生きている胞子のみであるため、殺菌処理済みの食品等において、死滅した胞子の数ではなく、流通過程において発育し得る生きている残存胞子数のみを測定できる。

【発明の効果】

【0022】

本発明によれば、短時間に、広範囲の属種の胞子に対して適用可能な、胞子への物質導入方法及びこれを用いた発芽活性のある胞子の数の測定方法の提供が可能である。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本実施形態に係る加圧加熱装置の模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0025】

本実施形態に係る胞子への物質導入方法は、対象となる胞子に対して5 ~ 70 の温度下で、1秒 ~ 60分間、10 ~ 400 MPaで加圧する加圧処理工程と、上記胞子と、

50

上記孢子に導入する物質とを混合する物質混合工程と、を備える。上記物質混合工程は、上記加圧処理工程の前であっても後であってもよい。上述のような加圧処理を孢子に施すことによって、孢子内部への蛍光色素等の物質の透過性を向上させることが可能になる。

【0026】

本実施形態に係る孢子とは、食品又は自然環境に存在する一般的な芽胞菌又はカビが生成する孢子を意味する。上記孢子としては、例えば、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 及びバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属 (*Bacillus*)、パエニバチルス・ポリミクサ (*Paenibacillus polymyxa*)、パエニバチルス・マセランズ (*Paenibacillus macerans*) 及びパエニバチルス・アルベイ (*Paenibacillus alvei*) 等のパエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、ゲオバチルス・ステアロサーモフラス (*Geobacillus stearothermophilus*) 等のゲオバチルス属 (*Geobacillus*)、及び、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*) 及びクロストリジウム・パーFRINGENS (*Clostridium perfringens*) 等のクロストリジウム属 (*Clostridium*) 等の芽胞菌が生成する孢子、並びに、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等のアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 及びペニシリウム・デジタータム (*Penicillium digitatum*) 等のペニシリウム属 (*Penicillium*) 等のカビが生成する孢子が挙げられる。上記孢子は、そのまま用いてもよいが、適当な緩衝溶液等に懸濁させた状態で用いることが好ましい。

10

【0027】

本実施形態に係る加圧処理工程において、加圧処理の温度は、5 ~ 70 である。装置のコスト低減、加圧処理による孢子の不活性化防止等の点から、温度は5 ~ 50 であることが好ましく、30 ~ 50 であることがより好ましい。温度が5 未満であると孢子の発芽を促すことが十分にできない結果、物質導入効果(物質透過性)が不十分となる傾向がある。温度が70 を超えると比較的耐性の低い孢子が一部死滅する傾向がある。

20

【0028】

本実施形態に係る加圧処理工程において、加圧処理の圧力は、10 MPa ~ 400 MPa であり、10 MPa ~ 200 MPa であることが好ましく、50 MPa ~ 100 MPa であることがより好ましい。圧力をこのような範囲とし、温度を上述の範囲とすることによって、広範囲の属種の孢子を短時間に効果的に発芽させることが可能になる。その結果、孢子の外壁の物質透過性が向上し、孢子の内部に目的の物質を容易に導入できる。圧力が10 MPa 未満であると孢子の発芽を促すことが十分にできない結果、物質導入効果(物質透過性)が不十分となる傾向がある。圧力が400 MPa を超えると比較的耐性の低い孢子が一部死滅する傾向がある。加圧の方法としては、例えば、静水圧、並びに、ガス圧、油圧等の媒体を介する圧力を用いる方法が挙げられ、静水圧を用いる方法が好ましい。加圧の方式は、例えばバッチ式、半バッチ式及び連続式が挙げられる。遠心処理によって加圧してもよい。

30

【0029】

本実施形態に係る加圧処理工程において、加圧処理の時間は、1秒 ~ 60分間であり、1分 ~ 60分間であることが好ましく、1分 ~ 15分間であることがより好ましい。時間が60分を超えると一部の孢子が死滅する傾向があり、迅速性が低下する傾向がある。

40

【0030】

本実施形態に係る加圧処理工程は、例えば図1に示される装置を用いて行われる。図1は、本実施形態に係る加圧加熱装置の模式図である。この加圧加熱装置10は、加圧処理する試料を入れる耐圧容器1と、耐圧容器1の内部の温度を制御するヒーター2と、耐圧容器1の内部の圧力を制御する加圧ポンプ3と、耐圧容器1の内部の温度をモニターする温度センサー4と、耐圧容器1の内部の圧力をモニターする圧力計5とを備えている。耐圧容器1は、例えば内径が100mmの円筒状の密閉容器であって壁厚寸法は150mmに設定されている。ヒーター2は、例えば、耐圧容器1の内部の温度を90 まで上昇させることができるとともに、耐圧容器1の内部を任意の温度に設定することができる。加

50

圧ポンプ3は、例えば、耐圧容器1の内部を500MPaまで任意の圧力に調節することができる。さらに、温度センサー4によって耐圧容器1の内部の温度を、圧力計5によって耐圧容器1の内部の圧力を検出して表示する。

【0031】

加圧処理は例えば以下の様に行われる。まず、耐圧容器1の内部に、柔軟性のある容器に胞子を含む試料液を密封したものを入れる。次に、この耐圧容器1の内部に清水を満たし、静水圧によって加圧処理を行う。胞子を充填する容器は、ポリエチレン製、フッ素樹脂製等の種々の素材を用いることができる。また、少なくとも充填する容器の一部が可塑性を有していればその形状及び密封方式は特に限定されない。

【0032】

本実施形態に係る物質混合工程における胞子に混合する物質は、胞子以外の通常の細胞の内部に浸透する物質であれば特に制限されない。上記物質としては、例えば、蛍光色素等の色素、抗体等のタンパク質、オリゴヌクレオチド、プラスミド、及び、放射性同位体を含む化合物が挙げられる。放射性標識されていない K^+ 、 Ca^{2+} 等のイオンも挙げられる。

【0033】

蛍光色素としては、例えば、DAPI、Propidium Iodide、Acridine Orange、SYBR Green、Hoechst 33342、TOTO-1、CFDA、Calcein-AM、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、ローダミン6G、ローダミングリーン(商標)、ローダミンレッド(商標)、オレゴングリーン(登録商標)488、テキサスレッド(登録商標)、ボディパイ(登録商標)(FL、R6G、TMR、TR及び630/650)、Cy(登録商標)(2、3、5及び7)、並びに、Alexa Fluor(登録商標)(350、405、430、488、532、546、555、568、594、633、647、680、700及び750)が挙げられる。

【0034】

タンパク質及びオリゴヌクレオチドは、そのまま用いてもよいし、上記色素で標識されたものを用いてもよい。オリゴヌクレオチドとしては、例えば、EUB338等のFISH法に用いられるプローブ、並びに、Taqmanプローブ、Hybprobe及びQ primer等のRT-PCRに用いられるプローブが挙げられる。プラスミドとしては、GFP等の標識タンパク質をコードした遺伝子を有するプラスミド等が挙げられる。放射性同位元素としては、例えば、トリチウム、 ^{14}C 、 ^{40}K 、 ^{131}I 等が挙げられる。

【0035】

胞子と、上記物質とを混合する方法としては、特に制限はないが、例えば、緩衝溶液に上記胞子が懸濁している試料液において、上記物質を混合する方法が挙げられる。この場合、上記物質を試料液に添加する時期は、加圧処理工程の前であってもよいし、加圧処理工程の後であってもよい。加圧処理工程の前に上記物質を試料液に添加することで、加圧による発芽と、胞子への物質導入とを同時に行うことが可能である。一般に加圧には溶質を対象物に含侵させる作用があるため、上記物質が加圧、加熱に安定であれば、加圧処理工程の前に上記物質を試料液に添加することで胞子への物質導入効果を高めることができる。一方、上記物質が加圧、加熱に不安定な場合は、加圧処理工程の後に物質を試料液に添加することが好ましい。

【0036】

本実施形態において、耐熱性の胞子のみを対象とするのであれば加圧処理工程の前又は加圧処理工程の後にヒートショック処理を行ってもよい。

【0037】

本実施形態に係る胞子への物質導入方法は、発芽誘導物質の存在下で、加圧処理工程を行うことが好ましい。発芽誘導物質を添加した後に加圧処理を行うことで、胞子の物質導入効果を更に向上させることができる。上記発芽誘導物質は、例えば、アラニン及びアス

10

20

30

40

50

パラギン等のアミノ酸、グルコース及びフラクトース等の糖、並びに、カリウム等の金属イオンが挙げられる。発芽誘導物質の濃度は発芽を誘導する濃度であれば特に制限はないが、例えば10mM等が挙げられる。また、発芽誘導物質を併用することで孢子への物質導入効果が高まるため、加圧処理工程時の圧力及び時間を低減できる。

【0038】

本実施形態に係る孢子への物質導入方法は、上記加圧処理工程の後に、上記孢子を大気圧下、5～70の温度下で、1～60分間保持する大気圧処理工程を更に備えることが好ましい。孢子の物質導入効果を更に向上させることができる。これは、加圧処理によって代謝経路が活性化された孢子が、大気圧下に戻しても発芽が進行する為である。また、大気圧処理工程を備えることで、本実施形態に係る孢子への物質導入方法における処理時間を低減できる傾向がある。上記大気圧処理工程は、特に発芽誘導物質の存在下で加圧処理工程を行った場合に効果が高い。大気圧処理工程において、保持温度は5～70であり、保持時間は1分～60分間であることが好ましく、保持温度は25～50であり、保持時間は1分～15分であることがより好ましい。この条件であれば、発芽がより短時間で進行するため、発芽した孢子及び孢子以外の微生物の増殖をさらに抑制できる傾向がある。さらに、加圧処理工程において50～70の温度によって発芽した孢子が部分的に死滅することを抑制することができる。上記保持時間が1分未満であると孢子の物質導入効果が低下する傾向がある。上記保持時間が60分を超えると孢子及び孢子以外の微生物が増殖する傾向がある。保持温度が5未満であると発芽促進効果が低下する傾向がある。保持温度が70を超えると耐熱性の低い孢子が一部死滅する傾向がある。

10

20

【0039】

以上に述べたように、本実施形態に係る孢子への物質導入方法によれば、特定の圧力と温度を負荷することで、広範囲の属種の孢子に対して、目的の物質を短時間に効率よく導入することが可能になる。

【0040】

次に、本実施形態に係る発芽活性のある孢子の測定方法について説明する。本実施形態に係る発芽活性のある孢子の測定方法は、上記孢子への物質導入方法によって、マーカーとなる物質を対象となる孢子に導入する工程を備える。

【0041】

このような工程を備えることで、発芽活性を有する孢子、すなわち生きている孢子のみにマーカーとなる物質を導入することが可能になる。その結果、短時間で、生きている孢子と死滅している孢子とを区別することが可能になる。また、加圧には微生物の増殖を阻害する作用があることから、マーカーとなる物質を孢子に導入する過程において、孢子及びその他の微生物が増殖することがない。そのため、増殖による測定誤差を防ぐことができる。マーカーは、1種類を単独で使用してもよいし、複数種類を組み合わせて使用してもよい。複数種類のマーカーを用いる場合、各マーカーの発芽による導入効率の違いを利用して孢子数を求めてもよい。

30

【0042】

本実施形態に係る発芽活性のある孢子の測定方法において、加圧処理の条件は、本実施形態に係る孢子への物質導入方法における加圧処理工程の条件がそのまま適用されるが、温度が5～50であり、圧力が10MPa～200MPaであることがより好ましい。このような条件であれば、孢子に比べて耐熱性又は耐圧性の低い栄養細胞形態などの微生物に対する影響が少なく、孢子数及び孢子以外の微生物数の測定の誤差要因が低減される傾向がある。一方、200MPa以上の圧力は孢子に対し殺菌作用を示す場合もあるが、発芽初期に活性化されるエステラーゼ活性により発色するCFDAなどの色素を用いれば、発芽した孢子が圧力によって一部死滅しても染色することは可能であるため、必要であれば200MPa以上の圧力をかけてもよい。

40

【0043】

孢子にマーカーとなる物質を添加する時期(物質混合工程)は、加圧処理工程の前であっても、加圧処理工程の後であってもよいが、加圧処理工程の後であることが好ましい。

50

マーカーとなる物質の加熱又は加圧による劣化が抑制できる傾向がある。一方、胞子と共に胞子以外の微生物も測定する場合は、胞子にマーカーとなる物質を添加する時期は、加圧処理工程の前であることが好ましい。

【0044】

本実施形態に係る発芽活性のある胞子の測定方法において、発芽活性のある胞子を検出する方法は、特に制限されない。マーカーとなる物質が蛍光色素である場合、例えば、フローサイトメーター方式、メンブランろ過方式及びCCDカメラを利用した方法が挙げられる。利用できる蛍光色素としては上述した色素が例として挙げられる。また、発芽による蛍光色素の透過性向上を利用し、加圧処理工程の前及び加圧処理工程の後に胞子を蛍光染色し、加圧処理工程の前後の染色率の増加量を比較して菌数を求める方法も挙げられる。本実施形態に係る発芽活性のある胞子の測定方法は胞子の内部に試薬を導入するものであれば、PCRを利用した方法など蛍光染色法以外の方法であっても構わない。

10

【0045】

以上、本発明の実施形態について説明したが、本発明は上記実施形態に限定されるものではない。例えば、本発明に係る胞子への物質導入方法は、放射性同位体を含む化合物及び蛍光色素等の導入による胞子の細胞内構造の解析、プラスミド導入による胞子の遺伝子改変、並びに、PCRによる胞子の検出及び定量に利用することが可能である。

【実施例】

【0046】

次に、本発明を、以下の実施例によって更に詳しく説明する。ただし、これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

20

【0047】

検討1：胞子数の迅速測定における加圧処理の効果（圧力条件）

B. subtilis (IAM 12118)の胞子を0.1~400MPa、40、15分間の条件で加圧処理した後に蛍光染色法で胞子数を求めた際の結果を表1に示す。すなわち、 10^6 CFU/mlの濃度になるようB. subtilis (IAM 12118)の胞子を1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、ポリエチレン製の袋に無菌的に密封充填した。胞子の懸濁液が充填されたポリエチレン製の袋を、図1に示す加圧加熱装置（光高圧機器（株）製）に入れて加圧処理した。加圧処理が施された胞子の懸濁液を無菌的に反応容器に移した。続いて、 $150\mu\text{g/ml}$ の濃度となるよう6-Carboxyfluorescein diacetate:CFDA (Sigma-Aldrich社製)溶液を上記反応容器に添加し、25℃で10分間反応させて発芽した胞子を染色した。染色した胞子の懸濁液を13mm、孔径0.2 μm のポリカーボネート製メンブランフィルター（アドバンテック東洋（株）製）でろ過した。1000倍の倍率でメンブラン上の蛍光染色された胞子を落射型蛍光顕微鏡（オリンパス（株）製）で観察した。観察した視野の中から20視野を無作為に選んで蛍光染色された胞子を計数した。蛍光染色法における胞子数は以下の式に従って算出した。

30

蛍光染色された胞子数 (cells/mL) = (1視野当たりの蛍光染色された胞子数の平均値) × (メンブランフィルターのろ過面積) / (1視野当たりの面積) / (染色した胞子の懸濁液のろ過量) …… [1]

40

また、蛍光染色法で使用した胞子の懸濁液について培養法でも胞子数を求め、蛍光染色法の結果と比較した。培養法は以下の方法により行った。すなわち、胞子の懸濁液を70℃で、20分間加熱した後、適宜希釈して標準寒天培地（日水製薬（株）製）を用いて混積平板で35℃、48時間の条件で培養し、形成されたコロニーを計数した。培養法における胞子数は以下の式に従って算出した。

胞子数 (CFU/mL) = (コロニー数の平均値) × (希釈倍率) …… [2]

【0048】

【表 1】

		L o g ₁₀ (胞子数)	
培養法		5 . 9	
染色法	0 . 1 M P a	検出不可	
	1 0 M P a	4 . 5	
	5 0 M P a	5 . 2	
	1 0 0 M P a	5 . 5	
	2 0 0 M P a	5 . 4	
	3 0 0 M P a	5 . 2	
	4 0 0 M P a	5 . 2	

10

【 0 0 4 9 】

表 1 に示されるように、1 0 ~ 4 0 0 M P a、特に 5 0 ~ 4 0 0 M P a の加圧処理によって胞子を発芽させることができ、その後、蛍光染色法によって胞子数が測定できることが分かった。一方、0 . 1 M P a で処理したものは胞子が染色されず、胞子数を測定することができなかった。なお、2 0 0 M P a 以上の圧力であっても胞子数にはあまり変化がなかった。

【 0 0 5 0 】

検討 2 : 胞子数の迅速測定における加圧処理の効果 (温度条件)

20

B . s u b t i l i s (I A M 1 2 1 1 8) の胞子を 1 0 0 M P a、1 0 ~ 7 0、1 5 分間の条件で加圧処理したこと以外は検討 1 と同様の方法で染色された胞子を計数した。併せて、検討 1 と同様の培養法によって胞子数を求めた。これらの結果を表 2 に示す。なお、蛍光染色法及び培養法による胞子数は、上述した式 [1] 及び式 [2] によって算出した。

【 0 0 5 1 】

【表 2】

		L o g ₁₀ (胞子数)	
培養法		5 . 9	
染色法	5 °C	4 . 4	
	2 5 °C	5 . 6	
	4 0 °C	5 . 5	
	5 5 °C	5 . 7	
	7 0 °C	4 . 6	

30

【 0 0 5 2 】

表 2 に示されるように、5 ~ 7 0、特に 2 5 ~ 5 5 の温度において効率的に胞子を発芽させることができ、その後、蛍光染色法によって胞子数が測定できることが分かった。

【 0 0 5 3 】

40

検討 3 : 胞子数の迅速測定における加圧処理の効果 (処理時間)

B . s u b t i l i s (I A M 1 2 1 1 8) の胞子を 1 0 0 M P a、4 0、1 ~ 6 0 分間の条件で加圧処理したこと以外は検討 1 と同様の方法で染色された胞子を計数した。併せて、検討 1 と同様の培養法によって胞子数を求めた。これらの結果を表 3 に示す。なお、蛍光染色法及び培養法による胞子数は、上述した式 [1] 及び式 [2] によって算出した。

【 0 0 5 4 】

【表 3】

		Log ₁₀ (孢子数)
培養法		5.9
染色法	1 分	5.0
	15 分	5.6
	30 分	5.5
	60 分	5.6

10

【0055】

表 3 に示されるように、1 ~ 60 分間の処理時間において孢子を発芽させることができ、その後、蛍光染色法によって孢子数が測定できることが分かった。

【0056】

検討 4：様々な属種の孢子の迅速測定における加圧処理の効果

孢子として、様々な属種の孢子を用いたこと、及び 100 MPa、40、15 分間の条件で加圧処理したこと以外は、検討 1 と同様の方法で染色された孢子を計数した。併せて、検討 1 と同様の培養法によって孢子数を求めた。これらの結果を表 4 に示す。なお、蛍光染色法及び培養法による孢子数は、上述した式 [1] 及び式 [2] によって算出した。

20

【0057】

【表 4】

	Log ₁₀ (孢子数)	
	培養法	染色法
<i>Bacillus cereus</i> (日本缶詰協会 1501)	5.7	5.3
<i>Paenibacillus polymyxa</i> (IAM 13419)	5.9	5.5
<i>Bacillus licheniformis</i> (IAM 13417)	5.9	5.6
<i>Paenibacillus macerans</i> (NBRC 15307)	5.8	5.8
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (NBRC 13737)	5.8	5.8
<i>Bacillus coagulans</i> (NBRC 3557)	6.4	5.5
<i>Bacillus brevis</i> (NBRC 15304)	5.8	5.3
<i>Bacillus lentus</i> (NBRC 16444)	5.9	5.5
<i>Bacillus circulans</i> (NBRC 13626)	5.9	5.4
<i>Paenibacillus alvei</i> (NBRC 3343)	4.9	6.0
<i>Bacillus atrophaeus</i> (NBRC 15539)	6.0	5.4
<i>Bacillus megaterium</i> (NBRC 15308)	6.0	5.3
<i>Bacillus pumilus</i> (IAM 12469)	5.7	5.6
<i>Aspergillus</i> 属 (食品より分離)	4.6	3.5

30

40

【0058】

表 4 に示されるように、加圧処理によって広範囲の属種の孢子について、蛍光染色法により、短時間で孢子数を測定できることが分かった。

【0059】

検討 5：発芽誘導物質の併用効果

食材から分離した孢子 (16 s rDNA による遺伝子同定結果：*Bacillus pumilus*) を約 10^6 CFU/ml の濃度になるように 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、L-Ala を添加せずに、又は、10 mM となるよう添加した後に、50 MPa、40、5 分間の条件で加圧処理した。その後、蛍光染色法によって、

50

染色された胞子を計数した。また、上記胞子の懸濁液に L - A l a を 10 m M と なる よう 添 加 し て 大 気 圧 下 (0 . 1 M P a) で 40 、 15 分 間 の 条 件 で 処 理 し た 。 併 せ て 、 検 討 1 と 同 様 の 培 養 法 で 胞 子 数 を 求 め た 。 そ の 後 、 蛍 光 染 色 法 に よ っ て 、 染 色 さ れ た 胞 子 を 計 数 し た 。 こ れ ら の 結 果 を 表 5 に 示 し た 。 な お 、 蛍 光 染 色 法 及 び 培 養 法 に よ る 胞 子 数 は 、 上 述 し た 式 [1] 及 び 式 [2] に よ っ て 算 出 し た 。

【 0 0 6 0 】

【 表 5 】

		L o g ₁₀ (胞 子 数)
培 養 法		5 . 5
	5 0 M P a 、 5 分 間	4 . 6
染 色 法	5 0 M P a 、 5 分 間 (A l a 添 加)	5 . 1
	0 . 1 M P a 、 1 5 分 間 (A l a 添 加)	4 . 3

10

【 0 0 6 1 】

表 5 に 示 さ れ る よ う に 、 発 芽 誘 導 物 質 で あ る L - A l a の 添 加 に よ り 、 加 圧 処 理 に よ る 蛍 光 色 素 の 導 入 効 果 を よ り 高 め 、 胞 子 数 の 測 定 値 を よ り 正 確 に で き る こ と が わ か っ た 。 ま た 、 発 芽 誘 導 物 質 の 存 在 下 で 、 加 圧 処 理 を 行 う こ と で 加 圧 処 理 に お け る 圧 力 を 低 減 し 、 処 理 時 間 を 短 縮 で き る こ と が 分 か っ た 。

20

【 0 0 6 2 】

食 材 か ら 分 離 し た 胞 子 (1 6 s R D N A に よ る 遺 伝 子 同 定 結 果 : B a c i l l u s p u m i l u s) を 約 1 0 ⁶ C F U / m l の 濃 度 に な る よ う に 1 / 1 5 M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 7 . 0) に 懸 濁 し 、 L - A l a を 1 0 m M と なる よう 添 加 し た 後 に 、 5 0 M P a 、 4 0 、 5 分 間 の 条 件 で 加 圧 処 理 し た 。 加 圧 処 理 し た 懸 濁 液 の 一 部 は 、 大 気 圧 下 で 4 0 、 3 0 分 間 の 条 件 で 保 持 し た 。 そ の 後 、 蛍 光 染 色 法 に よ っ て 、 染 色 さ れ た 胞 子 を 計 数 し た 。 併 せ て 、 検 討 1 と 同 様 の 培 養 法 で 胞 子 数 を 求 め た 。 こ れ ら の 結 果 を 表 6 に 示 す 。

【 0 0 6 3 】

【 表 6 】

		L o g ₁₀ (胞 子 数)
培 養 法		5 . 5
	5 0 M P a 、 5 分 間 (A l a 添 加)	5 . 1
染 色 法	5 0 M P a 、 5 分 間 (A l a 添 加)	5 . 3
	+ 大 気 圧 下 保 持	

30

【 0 0 6 4 】

表 6 に 示 さ れ る よ う に 、 加 圧 処 理 を し た 後 に 大 気 圧 下 で 保 持 す る こ と に よ っ て 蛍 光 試 薬 の 導 入 効 果 を さ ら に 高 め ら れ る こ と が 分 か っ た 。 ま た 、 大 気 圧 下 で 保 持 す る 工 程 (大 気 圧 処 理 工 程) を 付 加 す る こ と に よ っ て 、 加 圧 処 理 に お け る 圧 力 を 低 減 し 、 処 理 時 間 を 短 縮 で き る こ と が 分 か っ た 。

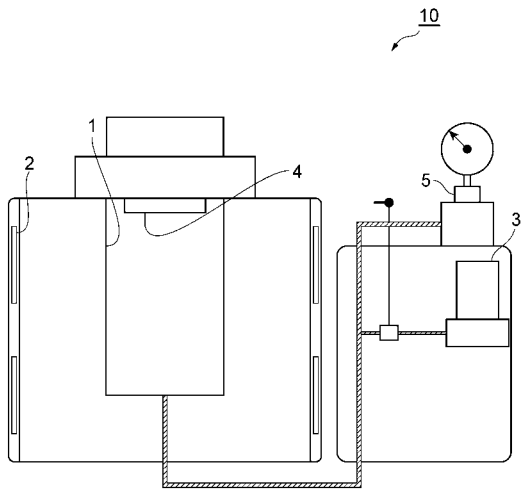
40

【 符 号 の 説 明 】

【 0 0 6 5 】

1 ... 耐 圧 容 器 、 2 ... ヒ ー タ ー 、 3 ... 加 圧 ポ ンプ 、 4 ... 温 度 セ ン サ ー 、 5 ... 圧 力 計 。

【 図 1 】



フロントページの続き

(72)発明者 杉原 正洋

広島県広島市中区基町10番52号 広島県立総合技術研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ06 QR66 QS36 QS40 QX02