



Title	乳・乳製品中の好気性芽胞菌に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	大久保, 慈輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7095号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77997
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshiaki_okubo_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士 （農学）

氏名 大 久 保 慈 輝

学 位 論 文 題 名

乳・乳製品中の好気性芽胞菌に関する研究

無菌の LL (long-life) 製品を除き、乳・乳製品中には芽胞菌などが残存する可能性がある。しかし、残存したとしても、与えられた流通温度で賞味期限内に危害となるレベルにまで増殖しなければ、食としての安全性は保たれる。乳・乳製品中に残存する好気性芽胞菌のうち、*Paenibacillus* 属や *Bacillus cereus* に代表される低温性芽胞菌は生乳中に存在し、HTST (high-temperature short-time) 殺菌など弱い殺菌条件では死滅せず、冷蔵流通中に増殖して、製品の腐敗や風味欠陥を引き起こす。一方、*Anoxybacillus flavithermus* や *Geobacillus stearothermophilus* に代表される高温性芽胞菌は生乳中には少ないが、主に粉乳製造ラインで増殖し、工場の衛生性の一般的な指標と考えられている。

本研究では、乳・乳製品の微生物学的品質の向上につながる技術開発、基礎データの取得を目的に、*Paenibacillus* 属芽胞の選択的計測法の開発、*B. cereus* 芽胞の生乳における分布、および高耐熱性株に着目した UHT (ultra-high-temperature) 牛乳の微生物学的安全性の評価、乳・乳製品中の *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* 芽胞の特異的検出法の開発を行った。

1. β -ガラクトシダーゼ活性を選択基準とした簡便なメンブランフィルター法による生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞数レベルの評価

Paenibacillus 属は低温性芽胞菌で、HTST 牛乳の品質に影響を及ぼす。しかし、生乳中の芽胞数レベルは極めて低く、適当な測定方法が今のところ存在しない。生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞を測定するメンブランフィルター法の開発検討を行なった結果、 β -ガラクトシダーゼ活性と低温での培養条件を組み合わせることで、効率的に芽胞を計測することができた。本分析法を用いて北海道十勝地域 6 地区の生乳における *Paenibacillus* 属芽胞の分布を 1 年間調査した結果、芽胞数レベルは年間を通じて生乳 100 mL あたり 0-10 個であり、地区間、季節間で有意差は認められなかった。本調査により、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルが初めて明らかとなった。

2. 北海道の生乳中の *Bacillus cereus* およびその低温性株の芽胞数レベルの季節変動および菌株多様性の評価

Bacillus cereus も *Paenibacillus* 属と同様に HTST 牛乳の品質に悪影響を及ぼす。メンブランフィルター法を用いて北海道の 2 地域の乳業工場の生乳における *B. cereus* 芽胞数レベルを 1 年間調査した結果、生乳中の芽胞数は年間を通して $1-10^2$ spores L⁻¹ であり、夏、秋に有意に高かった。一方、低温性株の割合も低く、芽胞数レベルは季節間で有意な差は見られなかった。北海道における生乳中の *B. cereus* およびその低温性株の芽胞数レベルは海外に比べて低いことが示され、HTST 牛乳の微生物学的安全性は、芽胞数レベルの低い生乳を使用すると同時に、適切な賞味期限を設定し、10℃ 以下での温度管理を行なうことで、事実上確保できると考えられた。Multiple-locus variable-number tandem repeat (MLVA) 解析から、生乳中の *B. cereus* は菌株多様性が高いことが示されたが、10 株以上で構成される MLVA グループが夏、秋に見られ、特定の汚染源が存在することが示唆された。本調査により、日本国内における生乳中の *B. cereus* 芽胞の分布レベルが初めて明らかとなった。

3. 乳業環境中の高耐熱性 *Bacillus cereus* の分布から評価した 120 °C 2 秒殺菌 UHT 牛乳の微生物学的安全性

日本の UHT 牛乳は、120–130 °C で 2 秒殺菌し、10 °C 以下でチルド流通するものが大半を占める。このような殺菌条件では *Bacillus cereus* の芽胞を完全には不活性化することはできない。120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳の微生物学的安全性を評価するため、特に UHT 殺菌でも残存する可能性がある高耐熱性 *B. cereus* (120 °C 2 秒の加熱処理で約 3 桁以内の減少を示す株と定義) の乳業環境における分布を調査した。乳業環境から分離した *B. cereus* 200 株の耐熱性試験の結果、牛乳製造環境由来の 4 株のみが高耐熱性を示し、高耐熱性株が牛乳製造環境に存在することが明らかとなった。高耐熱株は 4 株すべてが 10 °C では増殖できないが、12 °C では増殖した。一方、任意に選抜した生乳由来の耐熱性の低い株 4 株は 10 °C で良好に増殖した。一般に *B. cereus* は 10 °C で良好な増殖性を示すが、高耐熱性株は 10 °C での増殖性がないことが示された。よって、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳においては、特に牛乳製造環境由来の *B. cereus* による汚染をなくし、適切に設定した賞味期限内 10 °C 以下に保つことで、微生物学的安全性を確保することができる。本調査は乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布を網羅的に調査した初めての報告である。

4. リアルタイム PCR による乳製品中の *Anoxybacillus flavithermus* および *Geobacillus stearothermophilus* 芽胞の種特異的計測法

高温性芽胞菌である *Anoxybacillus flavithermus* および *Geobacillus stearothermophilus* は、特に粉乳製造ラインで容易に増殖するため、工場の衛生管理上重要である。しかし、これら 2 菌種を特異的かつ迅速に定量する方法は今のところ報告されていない。そこで、乳製品中の *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞を測定するリアルタイム PCR 分析法の開発を検討した。stage 0 sporulation protein A 遺伝子 (*spo0A*) の塩基配列からそれぞれの菌種に特異的なプライマー対を設計し、エチジウムモノアジド (EMA) 処理により、栄養細胞由来の DNA の増幅を抑制することで、芽胞のみを定量することができた。また、クリームにおいては、プロテイナーゼ K 処理を行なうことで芽胞を精度よく定量することができた。本分析法は定量能力に優れており、芽胞数と高い直線性 ($r^2=0.99$)、広い定量範囲 (10^1 – 10^6 spores mL⁻¹) を有していた。本分析法は乳、脱脂乳、クリーム中の芽胞の定量に適用可能で、乳製品中の芽胞を 2.5 時間以内で定量することができる。

以上により、今まで測定できなかった生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞の検出法、および製造工程をリアルタイムでモニタリングできる高温性芽胞菌の測定方法を開発した。また、低温性芽胞菌の生乳における分布を明らかにし、生乳の衛生管理の指標となる基礎データを取得することができた。本論文で得られた分析技術や基礎データは、生乳の衛生管理、乳製品製造ラインでの芽胞菌の増殖の抑制に寄与し、乳・乳製品の微生物学的品質のさらなる向上につながるが大いに期待される。