



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（農学）

氏名 大久保 慈輝

審査担当者 主査 教授 横田 篤
副査 教授 小林 泰男
副査 教授 玖村 朗人

学位論文題名

乳・乳製品中の好気性芽胞菌に関する研究

本論文は、和文 95 頁、図 7、表 15、6 章からなり、参考文献 4 編が添えられている。

乳・乳製品中には芽胞菌が残存するが、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、食の安全は保たれる。乳・乳製品に影響を及ぼす好気性芽胞菌は、牛乳において冷蔵中に増殖する *Paenibacillus* 属や *Bacillus cereus* などの低温性芽胞菌、粉乳製造中にラインで増殖する *Anoxybacillus flavithermus* や *Geobacillus stearothermophilus* などの高温性芽胞菌に大別される。

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、以下の検討を行なった。

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

生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルは低く、適当な測定方法が存在しない。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の組み合わせにより、芽胞を効率的に計測できた。北海道十勝地域 6 地区の生乳中の分布を調査した結果、芽胞数レベルは年間を通じて 100 mL あたり 0-10 個であり、地区間、季節間で有意差はなかった。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

B. cereus も生乳中の芽胞数レベルは低い、日本での報告はない。メンブランフィルター法を用いて北海道 2 地域の乳業工場の生乳中の芽胞数レベルを調査した結果、年間を通して低い芽胞数レベル ($1-10^2$ spores L⁻¹) であり、夏、秋に有意に高かった。低温性

株の割合も低かったが、季節間で差はなかった。北海道の生乳中の *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た。分離した約 1000 株を対象に菌株タイピングを行なったところ、高い菌株多様性が認められた一方で、10 株以上で構成されるグループが夏、秋に見られ、特定の汚染源の存在が示唆された。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

120 °C 2 秒殺菌の UHT (ultra-high-temperature) 牛乳の微生物学的安全性を評価するため、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。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。また、一般に *B. cereus* は 10 °C で良好に増殖するが、高耐熱性株は 10 °C での増殖性がなく、12 °C では増殖することが示された。よって、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳においては、特に牛乳製造環境からの汚染をなくし、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ものと結論された。

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

A. flavithermus および *G. stearothermophilus* は工場の衛生管理上重要であるが、これらの芽胞を特異的かつ迅速に定量する方法は報告されていない。リアルタイム分析法の開発を検討した結果、spo0A 遺伝子の塩基配列から特異的なプライマー対を設計し、エチジウムモノアジド処理により、栄養細胞由来の DNA の増幅を抑制することで、芽胞のみを定量できた。クリームにおいては、プロテインナーゼ K 処理により芽胞を精度よく定量できた。本分析法は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) を有しており、乳、脱脂乳、クリーム中の芽胞を 2.5 時間以内で定量することができる実用性を有していた。

以上、生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞の検出法、および製造工程中の高温性芽胞菌の測定方法を開発した。また、生乳中の低温性芽胞菌の分布を明らかにし、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向上につながる研究成果である。

よって、審査員一同は、大久保慈輝が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。