

日本食品保蔵科学会誌

VOL. 40 NO. 5

会 長	高井 陸雄	副 会 長	太田 英明	小宮山美弘	早坂 薫
編集委員長	太田 英明				
編 集 委 員	石田 裕	稲熊 隆博	井上 茂孝	今堀 義洋	竹永 章生
	津久井亜紀夫	東尾 久雄	古庄 律	松田 茂樹	

<報 文>

- 発芽大豆中のプロテアーゼの特徴と豆乳タンパク質への作用について (233)
 / 金内 誠・畑中咲子・下山田真
 落合孝次・高橋義洋・津志田藤二郎

- 炊飯器での保温中に米飯を変敗させる細菌の推定 (241)
 / 入澤友啓・辻井良政・岡 大貴
 野口治子・内野昌孝・高野克己

<講 座>

- 身近な野菜・果物～その起源から生産・消費まで (27) タ マ ネ ギ (247)
 / 室 崇人

- HACCP教育講座 (7) 青果物/カット青果物に関わる衛生管理法の国際的動向 (251)
 / 泉 秀実

<文献抄録> (257)

<本会記事> (258)

<会 告> (259)

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 40 NO. 5 (2014)

<Article> (Japanese)

- Characterization of Germinated Proteolysis Enzymes and its Reaction to Soy Milk Protein
KANAUCHI Makoto, HATANAKA Sakiko, SHIMOYAMADA Makoto,
OCHIAI Koji, TAKAHASHI Yoshihiro and TSUSHIDA Tojiro (233)

- Estimation of Bacteria in Spoiled Cooked Rice
IRISAWA Tomohiro, TSUJII Yosimasa, OKA Daiki,
NOGUCHI Haruko, UCHINO Masataka and TAKANO Katsumi (241)

<Serialization Lecture> (Japanese)

- Onion
MURO Takato (247)

- International Status of Food Safety Program on Fresh and Fresh-cut Produce
IZUMI Hidemi (251)

発芽大豆中のプロテアーゼの特徴と 豆乳タンパク質への作用について

金内 誠^{*1§}・畑中咲子^{*1*2}・下山田真^{*1}
落合孝次^{*3}・高橋義洋^{*4}・津志田藤二郎^{*1}

* 1 宮城大学食産業学部

* 2 宮城県産業技術総合センター

* 3 シードライフテック

* 4 (株)小倉屋柳本

Characterization of Germinated Proteolysis Enzymes and its Reaction to Soy Milk Protein

KANAUCHI Makoto^{*1§}, HATANAKA Sakiko^{*1*2}, SHIMOYAMADA Makoto^{*1},
OCHIAI Koji^{*3}, TAKAHASHI Yoshihiro^{*4} and TSUSHIDA Tojiro^{*1}

* 1 Department of Management, Miyagi University, 2-2-1 Hatatate Taihaku-ku Sendai, Miyagi 982-0215

* 2 Industrial Technology Institute, Miyagi Prefectural Government,
2-2 Akedoori Izumi-ku Sendai, Miyagi 981-3206

* 3 SEEDLIFE Tech Inc., Nagahama Bio Incubation Center-#13 1281-8 Tamura, Nagahama-city, Shiga 526-0829

* 4 Ogurayayanagimoto co., Ltd., 4-9-21 Mikageduka-cho Higashinada-ku, Kobe 658-0044

Proteolytic enzymes are important to modify the processing characteristic of soybeans and have been utilized for the production of soybean-derived foods-e.g., miso and soy sauce. Proteolytic enzymes produced in the cotyledons of soybean seeds during germination are used to modify the characteristics of processed foods. The optimum conditions for protease production during germination were determined and the characteristics of these proteases were described. The soybean variety Ohtsuru produced high levels of a semi-alkaline proteolytic enzyme under conditions of 20% CO₂ and 25°C. The protease was purified using cation-exchange and size-exclusion chromatography. The monomeric protein had a mass of 84.9 kDa. The optimum pH and temperature for this protein were pH8.0 and 30°C, respectively, and the protein was stable at pH7.0-10.0 and 4-30°C. The proteolytic enzyme was activated by magnesium, zinc, and manganese ions and was inhibited by copper and mercury ions, EDTA, and EGTA. However, the enzyme was not inhibited by trypsin inhibitor. The enzyme cleaved substrates by endo-type proteolysis and cleaved the α -, α' -, and β -subunits of the soy protein β -conglycinin. The enzyme was able to modify the characteristics of soybean during their production. Moreover, it digested a major allergen protein, Gly m Bd60K, which is an α -subunit of beta-conglycinin.

(Received Mar. 19, 2014 ; Accepted Jun. 11, 2014)

Key words : proteolytic enzyme, soybean, germination, soy milk, β -conglycinin
タンパク質分解酵素, 大豆, 発芽, 豆乳, β コングリシニン

大豆はタンパク質に恵まれ、栄養機能である一次機能を有するだけでなく、嗜好・食感機能である二次機能にも優れている。そのため日本では、醤油や味噌、納豆、

豆乳、豆腐などの加工食材の原料として、古来より利用されてきた¹⁾。近年では、大豆の健康性機能・生体調節機能である第三次機能も注目され、特に、血中内の脂質

* 1 〒982-0215 宮城県仙台市太白区旗立 2-2-1

§ Corresponding author, E-mail: kanauchi@myu.ac.jp

* 2 〒981-3206 宮城県仙台市泉区明通 2 丁目 2 番地

* 3 〒526-0829 滋賀県長浜市1281-8 長浜バイオ大学インキュベーションセンター #13

* 4 〒658-0044 兵庫県神戸市東灘区御影塚町 4-9-21

代謝を改善する機能を持つことから機能性食材として利用されている^{2)~4)}。

しかし、大豆は組織が硬く、食材として加工しにくいという問題点がある。そのため、強力な酵素を含蓄する麹による長期間の発酵・熟成やさまざまなタンパク分解酵素剤が利用されてきた。酵素製剤の起源は*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoproteolyticus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus sojae*, *Mucor pusillus*, *Streptomyces griseus*などの微生物やパパイヤ(*Carica papaya*)、パイナップル(*Ananas comosus*)⁵⁾、小麦などの植物である⁶⁾。

ところで、大豆は浸漬し、発芽させると短期間に大豆の胚のタンパク質を分解する。これは、それ自身が強力なタンパク質分解酵素・プロテアーゼを生産し、発芽時に蓄えているタンパク質を分解し、エネルギーとして使うためである。このように、発芽させることで、酵素製剤を使うことなく大豆加工時の分解促進や物性改良ができると考えられる。しかし、大豆の発芽中のプロテアーゼについての報告は少なく、MORITAら⁷⁾が、「毛振」という品種中の種子中に存在する潜在的セリンプロテアーゼの報告とQi⁸⁾によるProtease C 1が β -コングリシニンの α -、 α' -サブユニットを分解する報告のみである。

さらに、非加熱大豆に含まれる消化酵素阻害物質トリプシンインヒビター⁹⁾やレクチン¹⁰⁾の一部は発芽中に阻害活性が弱くなることが報告されている¹¹⁾。しかし、発芽時に生産されたタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）に対しての阻害の有無に関する検討はない。

本研究では、大豆発芽時に生産されるプロテアーゼに着目し、その発芽プロテアーゼ生成にかかわる諸条件とプロテアーゼの特徴を明らかにした。これにより、大豆タンパク質の加工特性を改善することを目的とする。

特に発芽中には、雰囲気中の二酸化炭素(CO₂)増加により発芽は促進される¹²⁾。そこで、CO₂濃度と発芽プロテアーゼの関係と温度条件について検討する。

実験方法

1. 発芽処理方法

大豆(オオツル 滋賀県産 2011年度収穫)100 gを、1%次亜塩酸カルシウム溶液30分に浸漬し、洗浄・殺菌した。滅菌水で洗浄後、8時間滅菌水に浸漬させ、排水後、16時間放置し、再び、24時間滅菌水に浸漬させた。さらに、排水し、72時間放置した。これらの操作はすべて無菌で行い、容器は滅菌した500ml容三角フラスコに綿栓したものをを用い、温度は各々15, 25, 30℃で行った¹³⁾。また、CO₂条件の調整は、5~20%および無調整とし、CO₂インキュベータ(IT-300; ヤマト科学)を用いて行った。

2. 酵素液の抽出

発芽させた大豆種子に、50mMホウ酸-NaOH緩衝液(pH8.0)を加え、ラボレタリー・ブレンダー(WARING

社; 7011HS)で5分間磨砕抽出した。その後、4℃で、2時間放置し、10,000 × gで、10分間の遠心分離(himac CR-21G II; 日立工機社)し、上澄み液を粗酵素液とした。

3. 酵素活性

FTC 活性法¹⁴⁾(Pierce Fluorescent Protease Assay Kit, Cat.# 23266; Thermo scientific製)を用いて行った。すなわち、FTC (Fluorescein thiocarbamoyl) 標識カゼイン(0.5mg/ml)を50mMリン酸-クエン酸緩衝液(pH3.0~8.0)、または50mMホウ酸-NaOH緩衝液(pH8.0~10.0)で、500倍に希釈したFTC基質(100 μ l)に、プロテアーゼサンプルを、20 μ lを加え、40℃で、30分間反応させた。励起波長485nm/蛍光波長538nmを蛍光プレートリーダー(TECAN GENios, Tecan Group Ltd.)で測定した。対照としてプロテアーゼサンプルの代わりに、トリプシン(キット添付)溶液も同様に活性を測定した。

1 Uに相当する活性は、1 mgのTrypsinによって1分に分解されるFTP量とした。

4. ペプチダーゼ活性

ペプチダーゼ活性は、benzyloxycarbonyl-glutamyl-tyrosine (Cat.# C0257; Sigma-Aldrich)を50mMホウ酸-NaOH緩衝液(pH8.0)に0.5mMとなるように溶解させ、基質溶液とした。基質溶液(1 ml)に0.5mlのサンプル溶液を加え、30℃で、30分間反応させた¹⁵⁾。1Uは、pH8.0で基質から分解されたチロシンのmM数をもって示した。

5. 酵素タンパク質の測定

酵素タンパク質の測定はBradford法¹⁶⁾に従った。すなわち、1.0mlのサンプル溶液に、0.5mlのCoomassie Brilliant Blue 溶液(0.1 g Coomassie Brilliant Blue G (Cat.# B0770; Sigma-Aldrich)を50ml, 95%エタノールと100ml phosphoric acidに溶解させ、200mlに定容)を加え、攪拌後に分光光度計(V-630; 日本分光)により、595nmを測定した。検量線は牛血清アルブミン(Cat.# 05482; Sigma-Aldrich)を用い、10~100 μ g/mlの範囲で測定した。

6. 硫酸アンモニウム沈殿

粗酵素液に微粉末に砕いた硫酸アンモニウムを、30~40%飽和となるよう添加し、塩析させた。これを10,000 × g, 30分遠心分離した。沈殿したタンパク質は、50mMホウ酸-NaOH緩衝液(pH8.0)に溶解させた。これを透析チューブ(12~14kDa, Cat.# 2-316-03; アズワン社)に入れ、外液を2 lの50mMホウ酸-NaOH緩衝液(pH8.0)として4℃で、1晩透析した。

7. イオン交換クロマトグラフィー

粗酵素液のイオン交換クロマトグラフィーは、CM gel (Macro-Prep support, Bio-Rad Laboratories, Inc., Ca. USA)をカラム(25mm×300mm)に充填し、行った。また、溶出は0~1.0M NaClを含む50mMリン酸-クエン

酸緩衝液 (pH6.5) によるリニアグラジエントによって行った。溶出液の流速は1.5ml/minとし、各フラクションは4.0mlとした。

8. ゲル濾過クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーで得られた活性画分は、80%飽和の硫酸アンモニウムによって塩析後、10,000×gで、30分遠心分離した。この沈殿を1.0mlの50mMホウ酸-NaOH緩衝液 (pH8.0) に再溶解後、ゲルろ過クロマトグラフィー (10mm×350mm, P-100gel, Bio-Rad Laboratories, Inc., Ca. USA) に供試した。溶出溶媒は50mMホウ酸-NaOH緩衝液 (pH8.0) を用い、流速は0.15ml/min、各フラクションは2.0mlとした。

9. 金属イオンおよび阻害剤に対する影響

各種金属イオンとしてKCl, NaCl, MgSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, CoSO₄, FeCl₂, Iodoacetamide (Cat.# I1149; Sigma-Aldrich), CaCl₂, HgCl₂を用い、また、阻害剤としてEGTA (Cat.# 346-01312; 和光純薬), EDTA (Cat.# 345-01865; 和光純薬), Azide, sodium azide (Cat.# 195-11092; 和光純薬) を用いた。これらを最終濃度1.0mMとなるよう、反応液に添加し、酵素活性を測定した。

10. プロテアーゼの至適pHおよび至適温度

0.1Mリン酸-クエン酸緩衝液 (pH3.0~8.0), または0.1Mホウ酸-NaOH緩衝液 (pH8.0~10.0) を用いて、酵素液のpHを調製し、至適pHを測定した。また、恒温水槽を用い、反応系を15℃から70℃として至適温度を測定した。なお、酵素液は反応前に10分間予熱した。

11. プロテアーゼのpH安定性および温度安定性

酵素液 (0.1ml) に0.1Mリン酸-クエン酸緩衝液 (pH 3.0~8.0), または0.1Mホウ酸-NaOH緩衝液 (pH8.0~10.0) 0.1mlを加え、4℃, 60分間放置した。また、酵素液 (0.1ml) に0.1mlの0.1Mホウ酸-NaOH緩衝液 (pH8.0) 加え、酵素液のpHを調製し、恒温水槽を用い、15℃から70℃, 60分間放置した。活性測定は、これら酵素液 (0.02ml) を0.1mlのFTC溶液 (0.1Mホウ酸-NaOH緩衝液, pH8.0に溶解) に添加し、30℃, 30分間反応させ、活性測定を行った。

12. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

酵素タンパク質はLAEMMLI (1970)¹⁷⁾に従い、12.5%均一ゲル (e-pagel, Cat.# 2331820; アトー製) を用い、20mAの定電流で泳動させた。分子量測定のため、SDS-PAGEスタンダード (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いた。泳動後、Coomassie Brilliant Blue染色液 (AE-1340 Ez Stain Aqua, アトー製) にてゲルを染色した。分子量マーカーSDS-PAGEスタンダード (Cat.# 161-0317; Bio-Rad, myosin, 200 kDa; β -glucosidase, 116.25 kDa; phosphorylase B, 97.4 kDa; serum albumin, 66.2 kDa; ovalbumin, 45.0 kDa; carbonic anhydrase 31.0 kDa; trypsin inhibitor, 21.5 kDa; lysozyme, 14.4 kDa; aprotinin, 6.5 kDa) を用いた。

13. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定

酵素タンパク質の分子量の測定は定法によった¹⁸⁾。すなわち、Blue dextran (Cat.# D4772; Sigma-Aldrich) および分子量スタンダード (Sigma-Aldrich, α -Chymotrypsinogen A from bovine pancreas, Cat.# C4879, 25.6kDa; albumin from egg, Cat.# A7641, 45.0kDa; Bovine Serum Albumin, Cat.# A2153, 66.0 kDa; Lactoferrin bovine milk, Cat.# L9507, 87.0 kDa) を単独で、あるいはこれらの混合物を前述したゲル濾過クロマトグラフィー法により分画し、溶出量と分子量から、サンプルの分子量を算出した。

14. 発芽プロテアーゼのトリプシンインヒビターによる阻害

トリプシンインヒビター (Cat.# T9128; Sigma-Aldrich) は、5mUのトリプシンが50%阻害 (最終濃度400 μ g/ml) するようFTC (Fluorescein thiocarbamoyl, 0.5mg/ml)-緩衝液 (50mMホウ酸-NaOH緩衝液, pH 8.0) 溶液に添加した。酵素液として、トリプシン (Cat.# 20233; Thermo Scientific, TPCK Trypsin) と精製した酵素液を5 (mU/ml) となるようにこの溶液に添加し、活性を測定した。対照はトリプシン無添加とした。

活性は、トリプシンインヒビター無添加のトリプシンの活性を100%とした相対活性で示した。

実験結果および考察

大豆種子の発芽中のプロテアーゼ活性をFig. 1に示した。一般的にタンパク質は特有の等電点をもち、特にプロテアーゼに関しては、酵素タンパク質と基質タンパク質の双方に等電点をもち、pH条件によって活性が異なると考えられる。そこで、異なる発芽温度

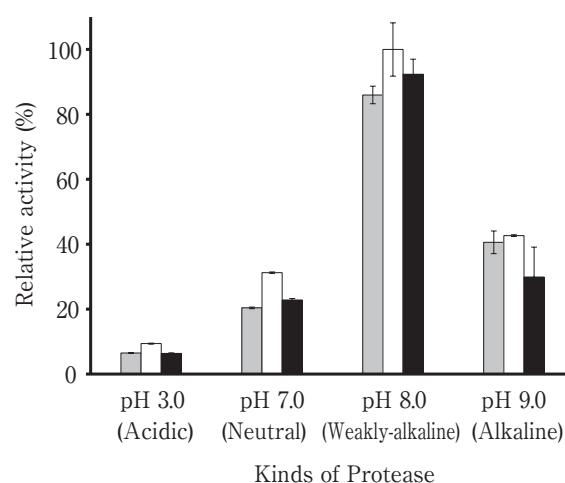


Fig. 1 Protease activity in soybean seedlings germinated at various temperatures, under acidic, neutral, weakly alkaline, and alkaline conditions

Protease activity was assessed under acidic (pH 3.0), neutral (pH 7.0), weakly alkaline (pH 8.0), and alkaline (pH 9.0) conditions. Soybeans were germinated at 15℃, 25℃, and 30℃. ■15℃, □25℃, ■30℃

条件での酸性 (pH3.0), 中性 (pH7.0), 弱アルカリ性 (pH8.0), アルカリ性 (pH9.0) プロテアーゼを検討した。発芽温度を15~30℃にて検討したところ, 各プロテアーゼの活性は発芽温度25℃が高く, 特に弱アルカリ性 (pH8.0) プロテアーゼが高かった。15℃でも, 弱アルカリ性 (pH8.0) プロテアーゼが高かったが, 25℃に比べ, 80%程度であった。30℃では, 25℃と同等の活性で, それは約90%以上であった。しかし, pH9.0のアルカリ性プロテアーゼは15℃より30℃で発芽させたほうが低い活性であった。ASANO¹⁹⁾は, 発芽大豆よりセリンプロテアーゼを単離精製し, 至適温度は40℃で, 酸性域に至適pHをもつと報告した。さらにMORITA⁷⁾やGUO²⁰⁾らは, 大豆のタンパク質分解酵素は中性・アルカリで働くセリンプロテアーゼであると報告しており, 本結果でのpH8.0の弱アルカリ性が高いことと一致した。よって, 今後は, 発芽によるプロテアーゼ高生産条件として, 25℃で発芽させた弱アルカリ性 (pH8.0) プロテアーゼを検討することとした。

次に雰囲気中のCO₂濃度を変え, 酸性, 中性, 弱アルカリ性, アルカリ性の各プロテアーゼ活性を検討した。結果はFig. 2に示した。

その結果, CO₂濃度20%の条件で発芽させた弱アルカリ性 (pH8.0) プロテアーゼが高かった。これはFig. 1に示した結果と同様であった。この活性を100%とする相対活性で示すと, CO₂濃度20%の条件で発芽させたもののpH9.0のアルカリ性プロテアーゼは57%であった。一番低いものはCO₂濃度5%の条件で発芽させたもののpH3.0の酸性プロテアーゼであった。つまり, CO₂濃度が低い条件はプロテアーゼ活性が低く, CO₂濃度が高い条件では活性が高かった。一般的に高CO₂条件下で, 幼

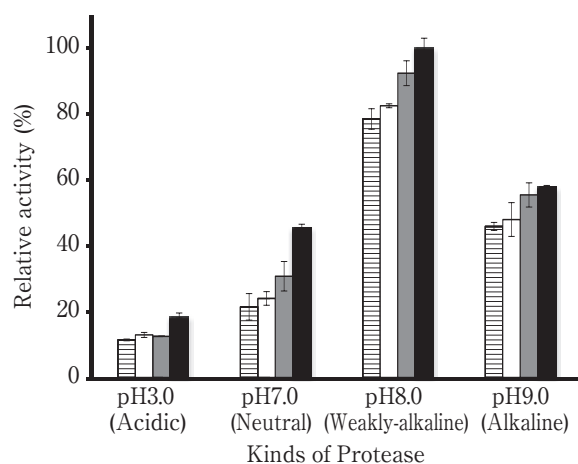


Fig. 2 Protease activity in soybean seedlings germinated at various carbon dioxide concentrations, under acidic, neutral, weakly alkaline, and alkaline conditions

Acidic, neutral, weakly alkaline, and alkaline conditions were as described in Fig.1 Soybeans were germinated in a CO₂ incubator adjusted to 5~20% CO₂.

■ 5% CO₂, □ 10% CO₂, ▨ 15% CO₂, ■ 20% CO₂

根などは増殖を促進されるとしている²¹⁾。本実験においても, 観察したところ, CO₂濃度20%の条件下で発芽させた幼根が長く伸びていた。増殖が活発になりプロテアーゼの活性も高くなったと考えられた。よって, 20% CO₂, 25℃の条件下で, pH8.0のアルカリプロテアーゼが最も生産されていると考えられた。

さらに, 本プロテアーゼ酵素の酵素化学的性質を明らかにするために, 精製を行った。まず, 硫酸沈殿画分後, イオン交換クロマトグラフィーによって生成の検討を行った。陽イオン交換樹脂 (CM樹脂) にてNaCl濃度は約0.3Mにて, 溶出した (Fig. 3)。また, 活性画分をゲルろ過クロマトグラフィーに供した結果, フラクシオンナンバー 4 および 5 に活性の大きなタンパク質のピークが得られた (Fig. 4)。この画分を生成タンパクとした。この精製酵素タンパク質の分子量はSDS-PAGEで84.9kDaであり (Fig. 5a), ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出時間からのタンパク質量を算出した。その結果をFig. 5 bに示した。その結果, 本酵素ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出時間と緩衝液の溶出量から算出したところ分子量76~90kDaのタンパク質であった。さらに, SDS-PAGEによる分子量の推定とゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の推定との値が近似であることより, モノマーのタンパク質であることが推察された。GUO²⁰⁾は大豆遊離細胞の培養物からserine proteaseを生産させ, 精製・単離した結果, 分子量90.0kDaのプロテアーゼであることを報告している。本報では84.9kDaと非常に近いものであった。

次に本酵素の至適pHと至適温度について検討した。結果をFig. 6aおよび6 bに示した。その結果, 本酵素の至適pHは8.0あった。分子量に近いGUO²⁰⁾の報告のプロテアーゼでは, 至適pH範囲が5.5~8.5と広いことも報

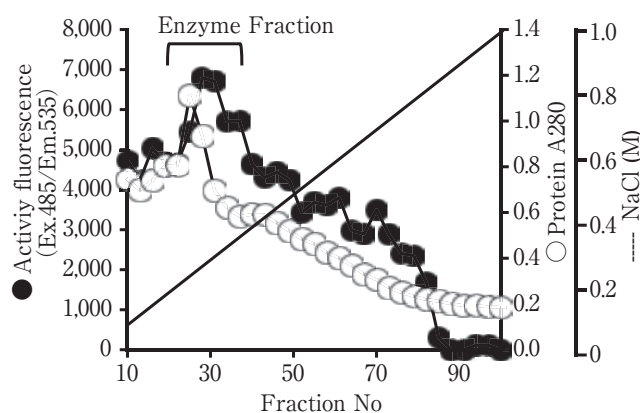


Fig. 3 Cation-exchange chromatography of the soybean seedling protease

Gel, CM Gel (Macro-prep, Bio-Rad, CA, USA); flow rate, 1.5 ml/min; fraction volume, 4.0 ml; elution buffer, 50 mM phosphate-citric acid buffer (pH 6.5); NaCl 0~1.0 M linear gradient.

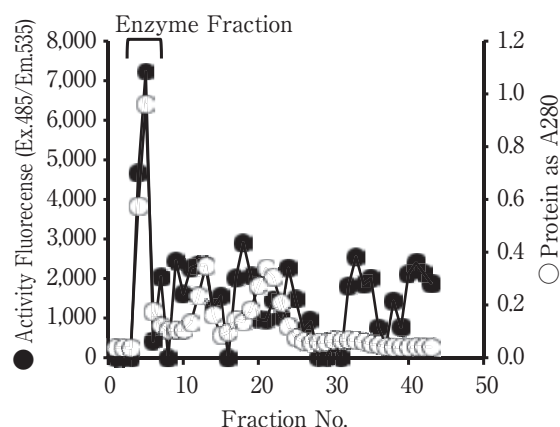


Fig. 4 Size-exclusion chromatography of the soybean seedling protease

Gel, P-100 Gel (Bio-Gel, Bio-Rad; exclusion limit 100 kDa); gel bed, 67.5ml; flow rate, 0.15ml/min; fraction volume, 2.0 ml; elution buffer, 50 mM borate-NaOH buffer (pH 8.0).

告している。本酵素はこの既知のものとは異なり、広い至適pHではなかった。至適pHを100%とした相対活性で、pH7.5では68%, pH7.0では40%であった。また、至適温度は30℃で、15℃, 50℃では40%ほどしか活性がなく、低温・高温では活性が低いことも明らかとなった。

また、pH安定性および温度安定性について検討した。結果をFig. 7aおよび7bに示した。pH安定性はpH 7 - 10で、90%以上の残存活性を有していた。しかし、pH 6.0では50%, pH5.0では20%の残存率まで低下した。一方、温度安定性に関し、4~30℃までは非常に安定し、90%以上の残存活性を有していた。しかし、50℃では、約50%以下まで低下した。60℃では38%, 70℃では完全に失活した。一般的な植物プロテアーゼのフィチンやパパインは、常圧50~80℃では非常に安定性が高いとされている²²⁾。本酵素と他の植物酵素との耐熱性の違いや耐熱を保つためのアミノ酸配列の違いなどを明らかに

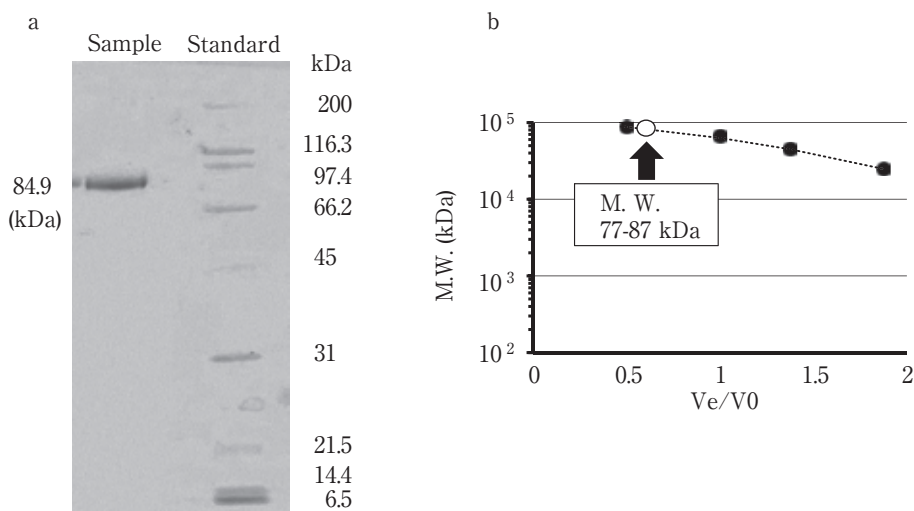


Fig. 5 The molecular weight of the soybean seedling protease determined by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (a) and size-exclusion chromatography (b)

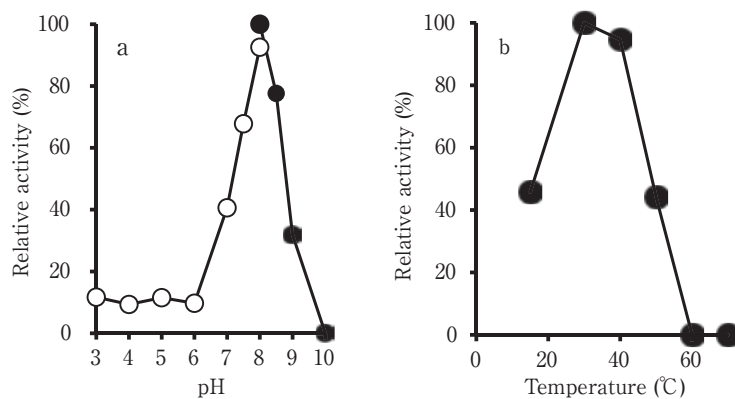


Fig. 6 Optimum pH and temperature of the soybean seedling protease

The pH was adjusted using 0.1 M phosphate-citric acid buffer (pH 3.0~8.0, ○) and 0.1 M borate-NaOH buffer (pH 8.0~10.0, ●) (a). The enzyme was assayed in 0.1 M borate-NaOH buffer (pH 8.0) at 15~70℃ (b).

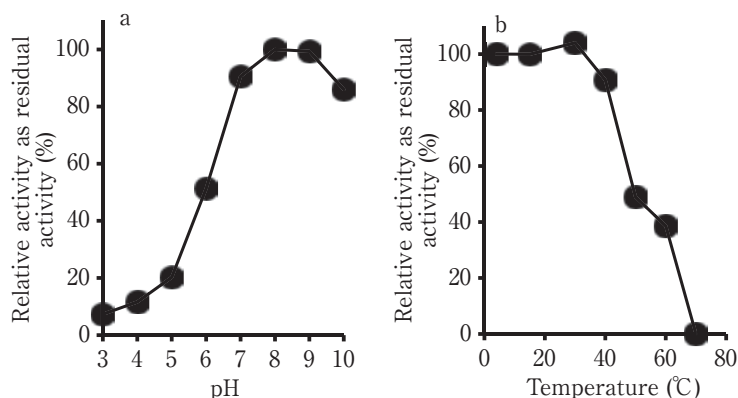


Fig. 7 Stability of the soybean seedling protease at various pH and temperature conditions

The enzyme (0.1mℓ) was added to 0.1mℓ of 0.1 M phosphate-citric acid buffer (pH 3.0~8.0) and 0.1 M borate-NaOH buffer (pH 8.0~10.0) for 60 min at 4°C (a). The protease activity of the enzyme (0.4mℓ) assayed at pH 8.0. The enzyme (0.1mℓ), with the pH adjusted to 8.0, was kept at 15~70°C for 60 min (b).

するために、プロテインシーケンサーなどの検討が必要と思われた。

金属イオンを添加し、金属イオンの影響を検討した結果はTable 1に示した。本酵素は Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} によって活性が賦活され、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、EDTA、EGTAによって阻害された。これより金属プロテアーゼであることが推察された。

本酵素のexo型（ペプチダーゼ）、endo型の活性を比

較したところ、endo型の活性が10倍以上高かった（データ未提示）。また、本発芽プロテアーゼによる大豆タンパク質の分解の状態をSDS-PAGEで確認した。その結果、endo型にみられるような急激な分子量の低下がみられた。特に β コングリシニンのサブユニット α 、 α' サブユニットが作用を受け、2時間後で分解が確認された。 β サブユニットは、緩やかに分解していた。一方、グリシニンの酸性サブユニットが消失していた(Fig. 8)。Kimら²³⁾は大豆発芽中のタンパク質の消化について検討した。その結果、 β -コングリシニンの α と α' サブユニットは分解されていると報告されている。また、 β サブユニット

Table 1 The inhibition of seedling soy bean protease by metals and inhibitors

metals and inhibitors (1mM*)	Relative Activity (%)
Non	100.0
NaCl	103.9
KCl	98.1
MgSO ₄	133.7
ZnSO ₄	120.4
CuSO ₄	9.9
CoSO ₄	59.9
FeCl ₂	66.9
HgCl ₂	0.0
CaCl ₂	90.2
MnSO ₄	111.5
Iodoacetamide	88.3
Azid	58.4
EDTA	19.9
EGTA	28.1

Azide, sodium azide EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid EGTA, O,O-bis (2-aminoethyl) ethylene-glycol-N, N, N', N'-tetra-acetic acid.

*Final concentration

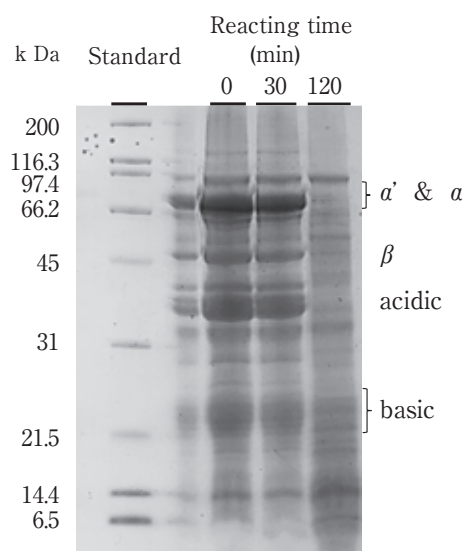


Fig. 8 SDS-PAGE of soy milk protein digested with the soy germination protease

Soy milk protein was extracted using 0.1 M borate-NaOH buffer and digested by the protease for 0~2h at 30°C.

の分解は緩やかに行われているとされ、本結果とも一致した。また、グリシニンの酸性サブユニットでも同様に、分解されていた。このように、発芽中の分解酵素として本酵素が関与することが推察された。一方、MORITAら⁷⁾は、同じ至適pHをもつプロテアーゼでも、 β -コングリシニンは消化しないことを報告している。MORITAら⁷⁾が用いたのは7Sグロブリンの α' -サブユニットを欠失した「毛振」、本実験では、タンパク質が多い品種である「エンレイ」を親品種とし、育種された「オオツル」を用いた。そこで、今後はこれら系統や品種間でのプロテアーゼ活性の違いや、タンパク質量とプロテアーゼ活性に相関があるかも検討が必要であると推察された。

さらに、トリプシンインヒビター (TI) によるプロテアーゼ活性の阻害について検討した (Fig. 9)。基質であるFTC溶液に、5 (mU/ml) のトリプシン活性に対して50%阻害するようにトリプシンインヒビターを加え、トリプシンと精製酵素の活性が共に5 mU/mlとなるように調製し、活性を検討した。トリプシンインヒビター無添加を対照とし、相対活性100%で示した。

その結果、トリプシンインヒビターは、トリプシン活性に対して約50%の阻害を示したのに対して、本酵素はほとんど活性阻害がみられなかった。Fig. 8の豆乳のSDS-PAGEの結果では、20kDa付近のトリプシンインヒビターと考えられるバンドの消失までは、確認できなかった。今後は、本酵素によるTI活性とトリプシンインヒビタータンパク分解について詳細に検討予定である。

一般的な大豆アレルゲンのGly m Bd30K, Gly m Bd28K, Gly m Bd60Kが存在し、これらの多くは、7Sグロブリンに存在する。特に、Gly m Bd60Kは α サブユニットである。これまで、WUら²⁰⁾は、発芽によって、これらアレルゲンタンパク質が消失することを報告している。

発芽により生成された本酵素は、限定的な作用・分解を起こすことより大豆の加工特性の改良に利用されるだ

けでなく、効率的に大豆のアレルゲンの消失の可能もあると考えられた。今後はこれらタンパク質のタンパク分解による消去について、酵素結合免疫吸着法 (ELISA法) を利用した分析法にて測定を行い、本酵素の食品利用を検討する予定である。

要 約

- ① 大豆「オオツル」品種の発芽プロテアーゼは、CO₂濃度が20%で、25℃条件下で発芽させたときに、弱アルカリ性 (pH8.0) プロテアーゼを生産した。
- ② 本プロテアーゼを陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーでの精製の結果、84.9KDaのモノマー酵素タンパクが得られた。
- ③ 本酵素の至適pHは8.0、至適温度は30℃であった。pH安定性はpH 7～10で、90%以上の残存活性を有していた。温度安定性に関し、4～30℃まで安定し、90%以上の残存活性を有していた。
- ④ 本酵素はMg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺によって活性が賦活され、Cu²⁺、Hg²⁺、EDTA、EGTAによって阻害された。これより金属プロテアーゼであることが推察された。さらにトリプシンインヒビターによる阻害は認められなかった。
- ⑤ 本発芽プロテアーゼの分解様式は、endo型で、特に、 β コングリシニンのサブユニット α 、 α' サブユニット、 β サブユニットに作用した。発芽工程により、大豆タンパク質の限定的な作用・分解により加工特性の改良やアレルゲンの低減が可能であると考えられた。

文 献

- 1) ENDRES, J. G.: Soy Protein Products: Characteristics, Nutritional Aspects, and Utilization, (AOCS press, Champaign) Illinois, p.12 (2001)
- 2) POTTER, S. M.: Soy protein and serum lipids, *Curr. Opin. Lipidol.*, 7, 260～264 (1996)
- 3) CARROLL, K. K.: Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein, *J. Am. Diet Assoc.*, 91, 820～827 (1991)
- 4) ANDERSON, J. W., JOHNSTONE, B. M. and COOK-NEWELL, M. E.: Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids, *N. Engl. J. Med.*, 333, 276～282 (1995)
- 5) 日本化学会編: 化学便覧第5版 (応用編, 丸善東京), p.265 (1995)
- 6) 都甲 潔・内田亨弘監修: 食品・医薬品の味覚修飾技術 (シーエムシー出版, 東京), p.126 (2007)
- 7) MORITA, S., FUKASE, M., HOSHINO, K., FUKUDA, Y., YAMAGUCHI, M. and MORITA, Y.: A Serine Protease in Soybean Seeds That Acts Specifically on the Native α Subunit of β -Conglycinin, *Plant and cell*

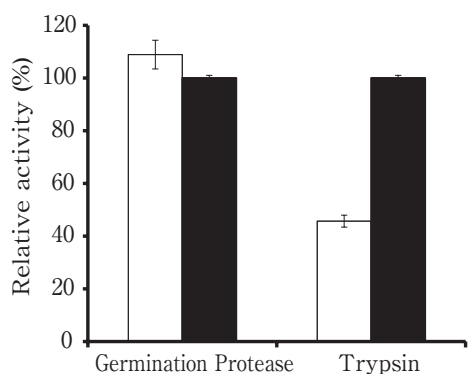


Fig. 9 Effect of trypsin inhibitor on protease activity

Two proteases were adjusted to approximately 5 mU and combined with diluted trypsin inhibitor at a concentration that inhibited trypsin activity by approximately 50%. □, with trypsin inhibitor; ■, without trypsin inhibitor.

- physiology*, **35**, 1049~1056 (1994)
- 8) QI, X., WILSON, K. A. and TAN-WILSON, A. L.: Characterization of the major protease involved in the soybean 0 - conglycinin storage protein mobilization, *Plant Physiol.*, **99**, 725~733 (1992)
- 9) WESTFALL, E. J. and HAGUE, S. M.: The nutritive quality and trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures, *J. Nutr.*, **35**, 374~380 (1948)
- 10) VRIES, J. D.: in Food Safety and Toxicity (CRC Press Boca Raton, Florida), p. 40 (1996)
- 11) MCGRAIN, A. K., CHEN, J. C., KARL, A., WILSON, K. A. and WILSON, A. L.: Degradation of trypsin inhibitors during soybean germination, *Phytochemistry*, **28**, 1013~1017 (1989)
- 12) GRABLE, A. R. and DANIELSON, R. E.: Influence of CO₂ on Growth of Corn and Soybean Seedlings, *Soil Sci. Soc. Ame. J.*, **29**, 233~238 (1965)
- 13) HOY, J. L., MACAULEY, B. J. and FINCHER, G. B.: Cellulases of plant and microbial origin in germinating barley, *J. Inst. Brew.*, **87**, 77~780 (1981)
- 14) TWINING, S. S.: Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes., *Anal. Biochem.*, **143**, 30~34 (1984)
- 15) ICHISHIMA, E.: Purification and characterization of a new type of acid carboxypeptidase from *Aspergillus*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **258**, 274~288 (1972)
- 16) BRADFORD, M. M.: Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248~254 (1976)
- 17) LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680~685 (1970)
- 18) WHITAKER, J. R.: Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration of Sephadex, *Anal. Chem.*, **35**, 1950~195 (1963)
- 19) ASANO, M., SUZUKI, S., KAWAI, M., MIWA, T. and SHIBAI, H.: Characterization of novel cysteine proteases from germinating cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], *J. Biochem.*, **126**, 296~301 (1999)
- 20) GUO, Z. J., LAMB, C. and DIXON, R. A.: A serine protease from suspension-cultured soybean cells, *Phytochemistry*, **47**, 547~553 (1998)
- 21) GRABLE, A. R. and DANIELSON, R. E.: Influence of CO₂ on Growth of Corn and Soybean Seedlings, *Soil Sci. Soc. Ame. J.*, **29**, 233~238 (1965)
- 22) KATSAROS, G. I., KATAPODIS, P. and TAOUKIS, P. S.: High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain, *J. Food Engineer.*, **91**, 42~48 (2009)
- 23) KIM, H. T., CHOI, U. K., RYU, H. S., LEE, S. J., and KWON, O. S.: Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth, *Biochem Biophys Acta.*, **1814**, 1178~1187 (2011)
- 24) WU, Y. M., GUAN, R. X., LIU, Z. X., LI, R. Z., CHANG, R. Z. and QIU, L. J.: Synthesis and Degradation of the Major Allergens in Developing and Germinating Soybean Seed, *J. Integrative Plant Biol.*, **54**: 4~14 (2012)
- (平成26年3月19日受付, 平成26年6月11日受理)

炊飯器での保温中に米飯を変敗させる細菌の推定

入澤友啓*§・辻井良政*・岡 大貴*
野口治子*・内野昌孝*・高野克己*

* 東京農業大学応用生物科学部

Estimation of Bacteria in Spoiled Cooked Rice

IRISAWA Tomohiro*§, TSUJII Yosimasa*, OKA Daiki*,
NOGUUCHI Haruko*, UCHINO Masataka* and TAKANO Katsumi*

* Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Spoilage of cooked rice occurred as a result of heat insulation. The cooked rice had an off-flavor that was caused by spoilage. This phenomenon is thought to be caused by microorganisms. Therefore, in this study, we attempted to isolate the contaminating microorganisms from cooked rice and identify them by using polymerase chain reaction (PCR) and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). No microorganisms were detected in normal cooked rice; however, microorganisms were detected at 4.6×10^6 cfu/g in rice spoiled by 72h of heat insulation. The isolates were able to grow at 60~65°C on the cooked rice, and they produced an off-flavor. Based on phylogenetic analysis, the isolates were identified as members of the genus *Geobacillus*, and were closely related to *Geobacillus thermoleovorans*. Contaminating microorganisms in the cooked rice were identified by PCR using bacterial universal primers and *G. thermoleovorans* was only detected using PCR-DGGE. These results suggest that *G. thermoleovorans* was the contaminating microorganism in the spoiled cooked rice and produced the off-flavor.

(Received Feb. 17, 2014 ; Accepted Jul. 16, 2014)

Key words : cooked rice, thermal insulation, spoilage, thermophilic, *Geobacillus*

米飯, 保温, 変敗, 好熱性細菌, *Geobacillus*

炊飯は、現在では電気炊飯器が主流となっている。電気炊飯器は1950年代に登場し、その後1960年には保温機能が開発され、米飯を移し替える手間を省き、炊飯から保温の一台二役の電気炊飯器となった。この保温機能により、米飯は温かく、おいしい状態を維持できるようになった。

しかし、保温機能の向上により長時間の保温が可能となった反面、それに伴う異臭や変敗が問題視されるようになってきた。米飯およびその加工食品の汚染の主たる原因として、*Bacillus*属細菌や*Clostridium*属細菌に関する報告が多く、中でも*B. cereus*など食中毒に関与する細菌についての報告が特に多い^{1)~6)}。これまでは弁当のような容器包装米飯などの加工製品に関する変敗だけが問題視されてきた。そこで炊飯器での保温中においてもこのような変敗が生じる原因を考えた場合、微生物的要因による可能性が高いと考えられた。

これまでに米飯保温時に生じる変敗について松下ら⁷⁾が報告している。ガス炊飯器を用いて炊飯し、その後、60℃にて保温をすると5時間後から細菌の繁殖が確認された。さらに、変敗を引き起こす原因細菌が*B. stearotheophilus*（現在は再分類され*Geobacillus stearotheophilus*）であると結論づけている。

以上の背景からも電気炊飯器での保温中に生じる変敗についても細菌によるものであると推測された。そこで、本研究では炊飯器での保温中に変敗した米飯を材料に培養法と分子生物学的手法を用いて、細菌の関与を明らかにすることを目的として研究を行った。

試料および実験方法

1. 供試炊飯器・試料米および炊飯・保温条件

同じ機種炊飯器を複数機体用いて保温試験を行い、常に保温中に変敗が生じる炊飯器 (Spoilage rice cooker,

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

§ Corresponding author, E-mail: sawa37@hotmail.com

SR)と変敗が生じない炊飯器 (Normal rice cooker, NR) の二種を選抜した。炊飯および保温は炊飯器に搭載されている通常炊飯および保温機能を使用した。試料米として富山県産コシヒカリを使用した。なお、炊き上がり直後の米飯に関しては、官能試験を行い喫食に問題がないことを確認した (データ未掲載)。

2. 保温時間による菌数変化

供試炊飯器 (SRおよびNR) と試料米を用いて通常炊飯し、炊飯直後を 0 時間目とし、以降24時間毎に米飯を採取して保温72時間までの米飯中の菌数変化を測定した。採取した米飯0.5 g に生理食塩水4.5 mlを加え、十分に攪拌した。攪拌後、生理食塩水にて段階希釈を行った。この希釈液を培地に接種し、60℃で3日間培養した。分離培地として、0.6% gellan gum含有GS培地 (1.0 lにつき1.0 g MgSO₄, 2.0 g yeast extract, 10 g polypeptone を溶解後、NaOHにてpH7.0に調整。121℃15分間、オートクレーブ滅菌)を用いた。培養後、出現したコロニー数を数えた。また、保温24時間目の試料について炊飯器釜内の米飯を上層、中層、下層に3分画し、それぞれの画分の菌数分布を調べた。

3. 変敗原因細菌の残存場所の推定

保温24時間後と炊飯釜および内蓋を洗浄・乾燥後の2つの時点で変敗原因細菌の残存性確認実験を行った。なお、拭き取り地点は炊飯器内部のうち、炊飯釜、内蓋 (表面・裏面)、パッキンとその隙間、水蒸気口など計16か所を選択した。まず、滅菌綿棒にて各試験箇所を拭き取った。それをGS液体培地に懸濁し、50℃にて3日間培養した。培養後に培地に濁りがみられ、生育が確認されたものを陽性と判断した。

4. 変敗原因細菌の分離

変敗を起こす炊飯器SRより、細菌の分離を直接分離法にて試みた。SRを用いて炊飯後に保温し、継時的 (0, 24, 48, 72時間) に米飯を採取した。培地や培養条件は上記2.に準じて行った。培地上に出現したコロニーを釣菌し、0.6% gellan gum含有GS培地 (GSG培地)を用いて純粋分離を行った。分離した菌株についてグラム染色し顕微鏡にて形態観察を行った。分離菌株は10%グリセロール溶液に懸濁後、-80℃にて保存した。

5. 16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析

分離菌株20株について16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った。分離菌株からのDNA抽出はZHUらの方法⁸⁾に従って行った。各遺伝子の増幅に用いたプ

ライマーと増幅条件、シーケンス解析および系統解析はIRISAWAらの方法⁹⁾に従った。

6. PCR-DGGE法による変敗原因細菌の検出

変敗原因菌について培養法による検出に加えてDNAレベルでの検出を行った。まず、上記2.と同様に供試炊飯器 (SRおよびNR) と試料米を用いて通常炊飯を行った。炊飯終了直後を 0 時間目とし、24時間毎に米飯を採取した。米飯は保温72時間まで採取をした。採取した試料1.0 g に対して1.0 mlの純水を加え、よく攪拌し、4℃にて1時間静置した。この上澄液を分取し、0.1 g の乾熱滅菌したガラスビーズとともにBugCrasher (TAITEC) にて菌体を破碎した。以後は、フェノール・クロロホルム法にてDNA抽出を行った。一般細菌を対象としてTable 1 に示したプライマーセットを用いてPCR法にて検出を行った¹⁰⁾。反応液25 μl (5.0 μl 5× PrimeSTAR[®] buffer, 2.0 μl dNTP Mixture, 0.5 μl each primer, 0.25 μl TaKaRa PrimeSTAR[®], 1.0 μl 鋳型DNA, 15.75 μl dH₂O) を用いて、PCR反応 (94℃ for 5 min, 94℃ for 1 min*, 63℃ for 1 min, 72℃ for 1 min, go to *35 times, 72℃ for 5 min, 4℃ forever) を行った。アガロース電気泳動により増幅が確認されたPCR産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE) 法に供した。DCode universal mutation detection system (Bio-Rad) を用い、アクリルアミド濃度8.0%, 変性剤濃度勾配は35%から50%となるように調製した (100%変性剤は7 M尿素と40%formamideを含む)。電気泳動は40V, 30分, 60℃の予備泳動後に60V, 12.5時間, 60℃の条件で本泳動を行った。電気泳動後、アクリルアミドゲルはSYBR[®] Green I nucleic acid gel stain (Lonza) 溶液中で30分間の染色を行った。染色後、Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad) により検出した。検出されたバンドを切り出し、PCRによる再増幅を行った。さらに、PCR産物を用いて、1-5と同様の方法でシーケンス解析を行った。

7. モデル試験による米飯変敗の再現実験

スクリーキャップ付き試薬ビンに未汚染米飯20 g を分取し、10³ spore/g になるように分離菌株の芽胞を接種した。これを60, 70, 80℃にて保温し、接種直後から12時間おきに72時間後まで米飯を0.5 g 分取した。分取した米飯を用いて上記2.と同様の方法にて培養を行い、出現したコロニー数を測定した。なお、米飯に接種した芽胞はスポア実験マニュアル¹¹⁾に従って調製した。

Table 1 PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Target microorganisms	Reference
U968GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCC CCAACGCGAAGAACCTTAC	Bacteria	8
R-1401	CGGTGTGTACAAGACCC	Bacteria	8

実験結果および考察

1. 保温時間による菌数変化

保温時間による菌数の経時的变化をFig. 1に示した。NRでは、保温を72時間継続しても菌数は検出限界以下 ($<1.0 \times 10^1$) であった。一方、SRでは0時間後で菌数は 3.6×10^2 colony form unite (cfu)/gであり、24時間後には 1.6×10^4 cfu/gと保温開始時の約100倍に達していた。さらに保温を継続することにより菌数は増加し、72時間後には 4.6×10^6 cfu/gにまで増加した。また、細菌の分布を検討したところ、上層部、中層部および低層部の菌数はそれぞれ 3.3×10^5 cfu/g, 1.3×10^4 cfu/gおよび 3.3×10^3 cfu/gであった。最も生菌数が多かったのが上層部であったことから、変敗の原因となる細菌は好気性である可能性が示唆された。変敗が繰り返し起るSRからのみ、細菌の存在が確認されたことから、変敗に関与している可能性が高いと考えられた。

2. 変敗原因細菌の残存場所の推定

保温時の変敗は繰り返し生じることから、炊飯器内のいずれかの箇所に変敗原因細菌が残存している可能性が予想された。そこで、炊飯器の内部の拭き取り試験を行った。保温時には16か所中11か所から細菌が検出された。また、洗浄後も16か所中10か所から細菌が検出された。特に内蓋のパッキンやその隙間などから高頻度に検出された。これらの部位は保温時に水蒸気が凝縮した水分が特に溜まりやすい部分であった。通常の洗浄ではこれらの細菌を除去することは難しいと考えられた。米飯は100℃以上で炊き上げることからほぼすべての細菌は死滅してしまうことから、耐熱性芽胞細菌が関与していることが考えられた。耐熱性芽胞であれば、洗浄や炊飯時の熱では死滅せず、休眠することが可能である。つまり、炊飯後の保温中に芽胞が発芽し、栄養細胞へと変化するため、変敗が繰り返し生じると考えられた。

3. 変敗原因細菌の分離

変敗が確認された米飯から細菌の分離を試みると培地上にコロニーが確認された。この中から保温時間 (0, 24, 48, 72時間) ごとに5株釣菌し、計20菌株について純粋分離し、保存を行った。全分離菌株を顕微鏡にて観察をしたところ、全菌株はグラム陰性桿菌で芽胞を形成していた。このことから変敗の原因菌は好熱性の芽胞形成細菌であることが示唆された。

4. 16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統解析

分離菌株の16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析より得られた塩基配列を用いて、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 2)。すべての分離菌株は系統的に *Geobacillus* 属に属することが明らかになった。また、各配列についてEMBL/GenBank/DDBKのデータベースにて相同性検索をしたところ、*Geobacillus thermoleovorans*^{(12), (13)} と99%以上の相同性を示した。*Geobacillus* 属細菌は *Bacillus* 属から再分類された一属であり、一般的にはグラム陽性を示す。しかし、菌種によってはグラム陰性と同じ色に染色されることがある。*G. thermoleovorans* もグラム陰性に染色されることがあることから、前述のように分離菌株がグラム陰性と判定された結果と一致した。*Geobacillus* 属細菌は耐熱性芽胞を形成する、好熱性細菌であり、食品製造においてフラットサワー菌と呼ばれている^{(14), (15)}。この細菌は芽胞の耐熱性が高いことから、レトルト殺菌で完全に殺菌ができない。そのため、容器詰食品や飲料を加熱販売する際に特別な注意が必要とされている。

5. PCR-DGGE法による変敗原因細菌の検出

一般細菌を検出するプライマーセットにてPCRを行ったところ、増幅が確認された (Fig. 3)。このPCR産物をDGGEに供し、菌叢をモニタリングした。その結果、保温0時間目には細菌は検出されなかった。しかし、保温24時間目になるとバンドが複数確認され、これらのシー

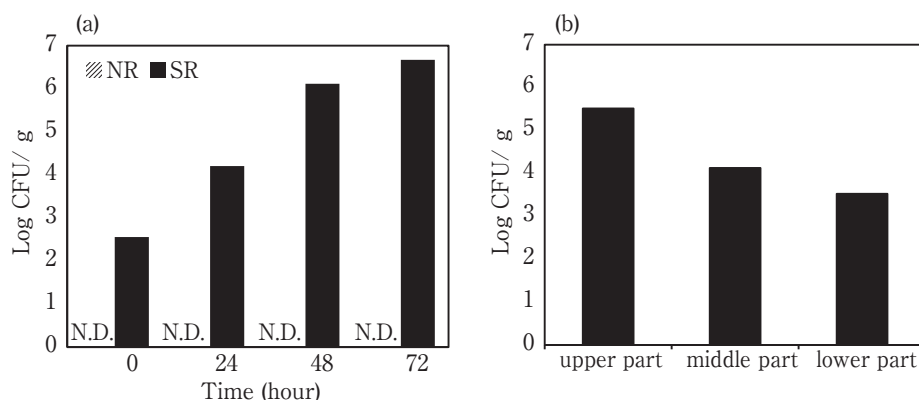


Fig. 1 Comparison of the number of cells during heat insulating (a) and distribution of contaminated bacteria in the cooked rice (b)

NR; normal rice cooker, SR; spoilage rice cooker.

*N.D. : Not Determined

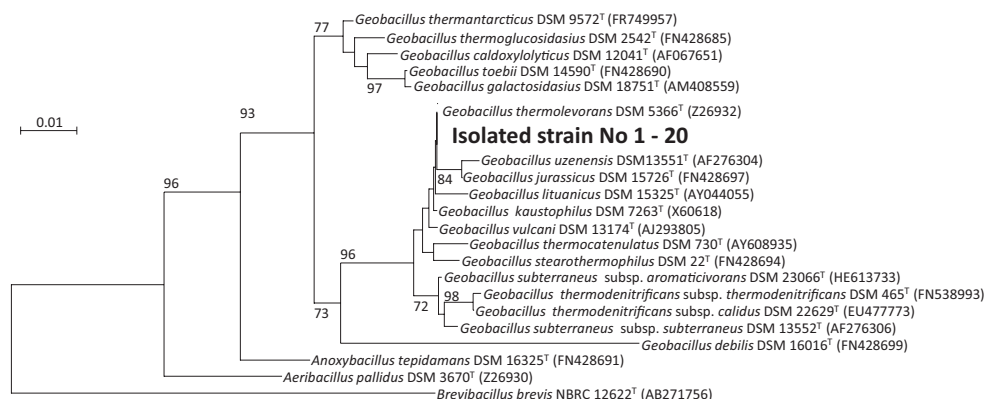


Fig. 2 Phylogenetic relationship of the isolates and closely related species based on 16S rRNA gene

The tree was constructed by neighbour-joining method. *Brevibacillus brevis* NBRC 12622^T was used as an outgroup. Bootstrap percentages above 70% are given at branching points. Bar indicates 1.0 % sequence divergence.

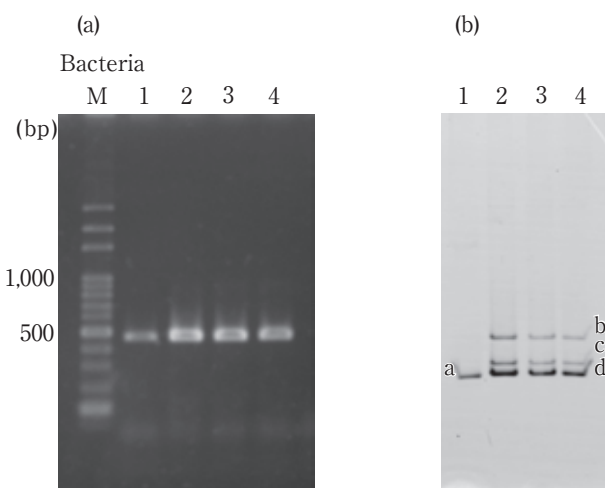


Fig. 3 Detection of contaminated microorganisms by PCR (a) and PCR-DDGE (b) method

Lane M, 100bp ladder ; 1, 0h heating insulating ; 2, 24h heating insulating ; 3, 48h heating insulating ; 4, 72h heating insulating. DGGE profile of PCR products of the cooked rice samples obtain with the bacterial universal primer set (U968 GC and R-1401). Labelled bands with letters a to d were identified to the following species : a, *Oryza sativa* ; b, c, d, *Geobacillus thermoleovorans*

クエンス解析およびデータベース上のデータとの相同性検索を行った結果、すべて*G. thermoleovorans*と99%以上の相同性を示した。この菌叢は保温72時間目においても菌叢に変化はなく安定したものであった。この結果は分離の結果を支持するものであった。なお、カビや酵母についてはPCR法にて検出されなかった（データ未掲載）。この結果より、*G. thermoleovorans*以外の微生物が変敗に関与した可能性は非常に低いと考えられた。

6. モデル試験による米飯変敗の再現実験

分離菌株が炊飯器内と同じ状況下で米飯を変敗させる

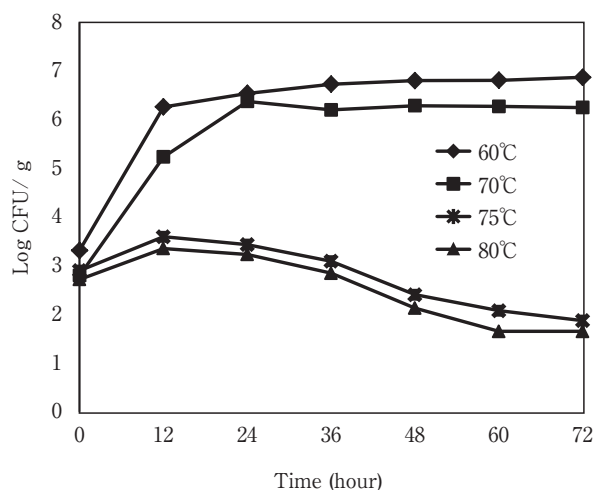


Fig. 4 Reproducibility of cooked rice deterioration by the model test

The spore of the used strain were inoculated to cooked rice and incubated at 60, 70, 75 and 80°C.

かをモデル試験にて確認した。変敗の原因となる細菌が生菌体として炊飯器内で生育していることは考えにくく、分離菌株が芽胞を形成することから本実験では培養菌体よりも芽胞を添加したほうが、より炊飯器での変敗に近い状況での再現ができると判断し、芽胞を接種後、経過を観察した。その結果、保温温度60°Cと70°Cで生菌数の増加が認められた (Fig. 4)。さらに米飯からの離水や異臭が確認され、炊飯器での変敗と同様の現象が確認された。*Bacillus*属細菌はデンプン含有する食品で増殖することにより離水現象を引き起こすことがある¹⁶⁾。今回の離水現象も同様に細菌が影響していると推察される。一方、75°Cと80°Cでは生菌数の増加や米飯からの離水は認められなかった。つまり、分離菌株が有する芽胞は保温時に発芽し、増殖することが示された。

本研究により、耐熱性芽胞を形成する好熱性細菌である *G. thermoleovorans* が米飯の変敗に関与していたことを明らかにした。これまで米飯をはじめとするデンプンを含む加工食品の汚染は、中温域 (30~37℃ 付近) で良好な生育を示す、*Bacillus* 属細菌によるものが多く報告されている。米飯保温中の変敗に関与する細菌としてこれまでに *B. stearothermophilus* が報告されているが *G. thermoleovorans* の報告例はこれが初めてとなる。

炊飯器への混入経路を明らかにするために、これまで *Geobacillus* 属細菌の分離報告例のある糠をはじめとして、精米後の白米などから分離を試みたが、分離には至らなかった (データ未掲載)。本研究により、*Geobacillus* 属細菌による米飯の変敗事例に関する知見を得ることができた。これらの知見が今後、食品業界における細菌汚染事故の対策に役立てられることを期待したい。

要 約

家庭用の炊飯器にて米飯を保温するとその過程で米飯から異臭がする事例が生じた。この原因が細菌によるものと考え、変敗原因細菌の特定を試みた。培養法にて原因細菌を分離したところ、炊飯器の保温温度である60℃で旺盛に生育する好熱性の細菌を分離した。これらは16 S rRNA遺伝子に基づく系統解析とEMBL/GenBank/DBJのデータベースを用いた相同性検索から *G. thermoleovorans* であると考えられた。さらにPCR-DGGE法を用いて変敗した米飯から遺伝子レベルでの細菌の検出を行った。その結果、培養法と同様に *Geobacillus* 属細菌が検出された。以上の結果より、炊飯器の保温環境という特殊な環境に好熱性芽胞形成細菌である *G. thermoleovorans* が混入し、変敗を引き起こすとともに *G. thermoleovorans* が形成する芽胞が炊飯器内に残存することにより繰り返し、変敗が起ること考えられた。

謝 辞 本研究を遂行するにあたりご協力頂いた、川口祐来氏、島田麻央氏 (東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科) をはじめ、関係の方々に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 好井久雄・金子安之・山口和夫：食品微生物学ハンドブック，技報堂出版，p.322 (1995)
- 2) 石田和夫：生米における *Bacillus cereus* の汚染実態と米飯での増殖，名古屋文理短期大学紀要，**13**，25~31 (1988)
- 3) OKAHISA, N., INATSU, Y., JUNEJA, V. K. and KAWAMOTO, S.: Evaluation and control of the risk of foodborne pathogens and spoilage bacteria present in Awa - Uirou, a sticky rice cake containing sweet red bean paste, *Foodborne Pathog Dis.* **5**, 351~359 (2008)
- 4) KASAI, Y., KIMURA, B., KAWASAKI, S., FUKAYA, T., SAKUMA, K. and FUJII, T.: Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere, *J. Food Prot.*, **68**, 1005~1011 (2005)
- 5) 小田隆弘：ブドウ球菌食中毒と原因物質，月刊 HACCP，**2** (3)，67~73 (1996)
- 6) 柳川義勢：セレウス菌食中毒，月刊 HACCP，**2** (7)，54~57 (1996)
- 7) 松下 功・尾山祥子・城野久美子：ガス加熱の特性を活かしたガス炊飯中の米飯の保存性，防菌防黴誌，**27**，495~503 (1999)
- 8) ZHU, H., QU, F. and ZHU, L. H.: Isolation of genomic DNAs from plants, fungi, and bacteria using benzyl chloride, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5279~5280 (1993)
- 9) IRISAWA, T. and OKADA, S.: *Lactobacillus sucicola* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (*Quercus* sp.) sap, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2662~2665 (2009)
- 10) HUWS, S. A., EDWARDS, J. E., KIM, E. J. and SCOLLAN, N. D.: Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. *J Microbiol Methods.*, **70**, 565~569 (2007)
- 11) 近藤雅臣・渡部一仁：スポア実験マニュアルー微生物の芽胞・胞子の基礎研究から応用までー，技報堂出版，p.22 (1995)
- 12) ZARILLA, K. and PERRY, J. J.: *Bacillus thermoleovorans* sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria, *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 258~264 (1987)
- 13) NAZINA, T. N., TOUROVA, T. P., POLTARAUS, A. B., NOVIKOVA, E. V., GRIGORYAN, A. A., IVANOVA, A. E., LYSENKO, A. M., PETRUNYAKA, V. V. OSIPOV, G. A., BELYAEV, S. S. and IVANOV, M. V.: Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 433~446 (2001)
- 14) CAMERON, E. J. and ESTY, J. R.: The examination of spoiled canned foods. 2. Classification of flat-sour

- spoilage organisms from non-acid foods, *J. Infect. Dis.*, **39**, 89~105 (1926)
- 15) FIELDS, M. L.: The flat sour bacteria, *Adv. Food Res.*, **18**, 163~217 (1970)
- 16) 内藤茂三: *Bacillus*属細菌による食品の変敗と防止技術, *SUNATEC e-Magazine*, **39**, 1~9 (2009)
(平成26年2月17日受付, 平成26年7月16日受理)
-