

# 光学窓付き高圧容器による 細菌胞子の発芽の直接観察

浅田 祥司

## Direct Observation of the Germination of Bacterial Spores Using Optical-Glass-Equipped High-Pressure Apparatus

ASADA Shoji

**Abstract:** Works published on the application of high pressure for the preservation of foods and pharmaceuticals have so far been limited to the cases of spore suspensions before or after pressurization. In our previous report, we observed germination of bacterial spores both after and during pressurization. In order to get more detailed information on germination during pressurization, we developed a new apparatus and investigated the *in situ* germination of *Bacillus subtilis* spores under high-pressure conditions. Two important results were obtained using the apparatus in this study:

1. A lag-period was observed before *in situ* germination of *Bacillus subtilis* spores under high-pressure conditions;
2. The above lag-period was temperature-dependent.

The observed lag-period gives very important information for the application of high-pressure to food processing.

### はじめに

高圧による食品や医薬品の保存研究では、細菌胞子の不活性化が最大の問題である。何故なら、加熱殺菌、薬剤殺菌、放射線殺菌などと同様、高圧殺菌に対して最も強い抵抗性を示すのは細菌胞子だからである。高圧殺菌のもつ魅力を反映してか、この問題についての研究結果は多数報告されているが、すべて加圧処理の前後の場合に限られている。即ち、加圧処理を受ける前に、試料として供する細菌胞子の種類、調製方法、懸濁液の組成、前処理などを変えた場合、加圧処理後、細菌胞子の不活性化の程度はどのようになるのかという報告である。あるいは、加圧条件として、圧力、温度、時間、速度などを変えた場合、細菌胞子の不活性化はどのような影響を受けるのかという結果である。いずれの場合も、実験的に観察されたり、

分析されているのは、加圧処理前後の細菌胞子懸濁液であり、加圧中の生化学的变化、生理的挙動については全く情報が得られていない状況が続いている<sup>1)</sup>。したがって、高圧殺菌の処理条件、操作条件を合理的かつ効果的に決めるのは極めて難しい現状と言える。

そこで、このような現状を打破するため、今回、光学窓付き高圧容器を新たに設計・製作し、圧力で誘起される様々な現象をリアルタイムで観察することを試みた。本稿では、この光学窓付き高圧容器の概要と、それによって得られた興味ある幾つかの結果を述べることにする。

### 実験方法

#### 1. 供試菌

本研究で供試菌としたのは、*Bacillus subtilis* 168 *trpC* 2 であり、その胞子懸濁液は土戸らの方法<sup>2)</sup>によ

って調製した。

## 2. 光学窓付き高圧容器

今回、新たに設計・製作し、本研究に使用した光学窓付き高圧容器の全体の概略図を Fig. 1 に、光学窓の詳細図を Fig. 2 に示した。

細菌胞子の発芽は、胞子浮遊液の濁度（吸光度）の低下を伴って進行することが知られている。そのため、胞子懸濁液の吸光度の低下を調べることで、胞子の発芽率を求めることが可能である<sup>1)</sup>。

これまでの、シール付きのプラスチックチューブに試料を入れ、高圧容器内で圧力処理した後、胞子の吸光度を測定していた。しかしながら、この方法では、加圧中の吸光度の時間的変化を知ることは不可能であった。圧力により誘起される種々の発芽現象を詳細に観察するためには、高圧下でのその場観察が特に有用である。本実験では、圧力により誘起される発芽現象

を吸光度の変化で調べるため、新たに光学窓を備えた高圧容器を製作した。

製作した光学窓付き高圧容器は、SUS 316 製で二つのサファイア製の光学窓を備えている。大きさは、100 mm×100 mm×110 mm で紫外可視分光光度計 (SIMADZU UVmini 1240) の試料室に収まるように設計した。容器の耐圧は、70 MPa である。試料温度の制御は、高圧容器に恒温水を循環させることによって行い、容器中央部に挿入された熱電対により温度を測定した。加圧は、純水を圧力媒体とし、電動プランジャーポンプ (日本精密科学 NS-P-321) を用いて行った。圧力測定には、歪ゲージ式圧力センサーを使用した。圧力および温度のデータは、デジタルマルチメーターを介して、コンピューターに取り込むようにした。パイレックスガラス製の平底試験管 (内径 13 mm (肉厚 1 mm), 高さ 45 mm, 内容積約 6 cm<sup>3</sup>) に試料を満たし、O-リングを備えたフリーピストンを試験

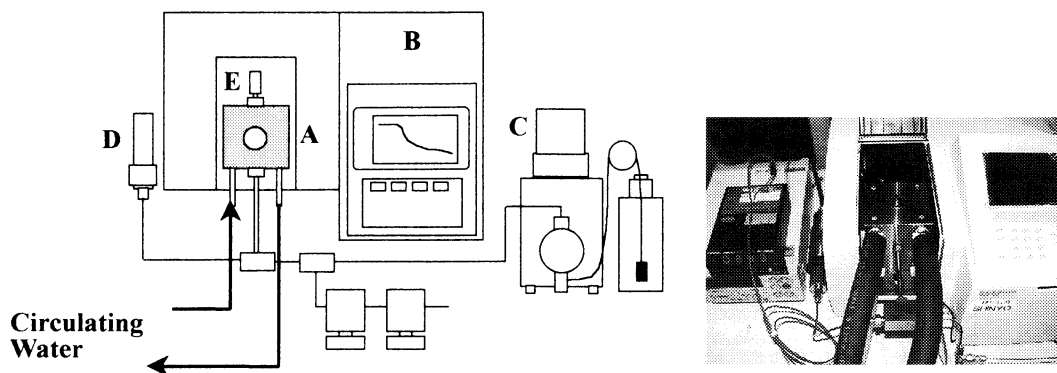


Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus

- A: High-pressure optical cell  
 B: UV/Visible spectrophotometer (SIMADZU Co., Model UV-1240 mini)  
 C: Plunger pump      D: Pressure gauge      E: Thermo couple (Type K)

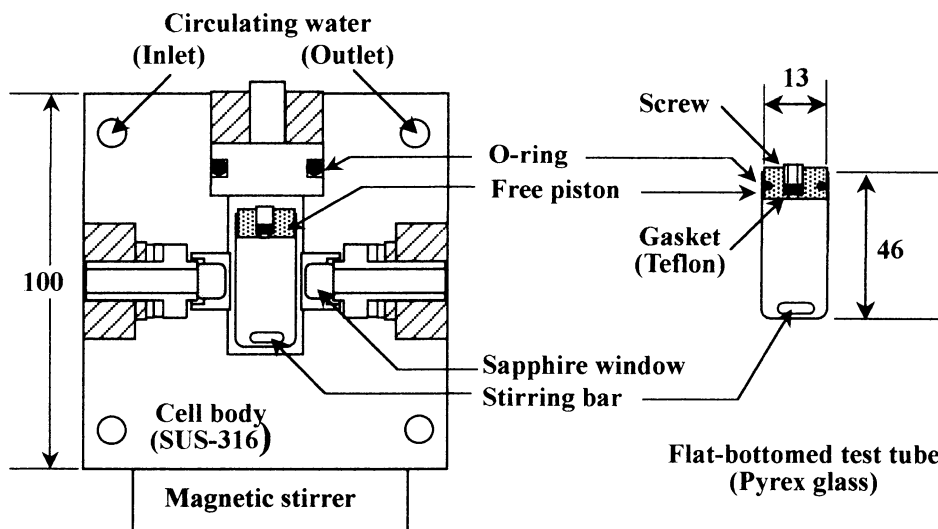


Fig. 2 Schematic diagram of high-pressure optical cell

管に取付けた。電動プランジャーポンプからの発生圧力は、このフリーピストンを介して試料に伝達されることになる。試験管内にはテフロン攪拌子を入れており、それを回転させることで、加圧中の胞子の沈降を防ぐようにした。本装置の特徴は、試料の交換が簡便であること、高压下での微生物試料のその場観察が迅速に行えることなどである。

実際の実験では、試験管を高压容器にセットし、試料の調温のため5分間放置した。その後、所定の加圧(50 MPa)を開始し、600 nmにおける胞子懸濁液の吸光度の変化を一定の時間間隔で自動的に測定した。

### 実験結果及び考察

Fig. 3 には、25°C および 30°C で 50 MPa の加圧を行った場合、試料の吸光度がそれぞれどのように変化していったかを示している。Fig. 4 は、同様の実験を 35°C および 40°C で行って得た結果である。

Fig. 3 の場合、試料への加圧が開始されても約 5 分前後、試料の吸光度には何ら変化が認められないが(図中では、lag period とした期間)、その後、徐々に低下していく、即ち試料である細菌胞子が徐々に発芽していく傾向を示している。圧力によって発芽が引き起こされるのは、吸光度の低下から見て明らかである。しかし、今回の実験結果で最も重要なのは、加圧によってすぐ胞子が発芽するのではなく、発芽開始までの lag period が存在する事実が初めて見出されたことである。この発見は、本実験のために開発したこの光学窓付き高压容器の使用なしにはありえなかったと言える。

さらに、Fig. 3 だけでなく、Fig. 4 に示した 35°C での加圧の場合にも同様の lag period が観察されたが、その期間は 25°C および 30°C の時に比べ短くなっている。そして、Fig. 4 に示した 40°C での加圧によって得た結果からは、もはや、lag period は見かけ上存在しなくなっている。そこで、縦軸に lag period を、横軸に加圧時の温度をとり、これらの結果をまとめたのが、Fig. 5 である。

両者の間には、ほぼ直線関係が成立し、圧力による発芽開始までの lag period は温度依存性を示すこと、40°C になるとほぼ加圧と同時に発芽が始まることが明らかになった。

今回の実験は、すべて加圧は 50 MPa でのみ行われたが、もっと高い圧力、もっと低い圧力の場合、どのような結果になるのかは大変興味深い、今後の研究を待たなければならない。

細菌胞子の発芽機構に関しては、アラニンに代表される発芽誘起物質の場合についてが最も研究が進んでいる。Foster ら<sup>4)</sup>の提案した発芽モデルによれば、アラニンレセプターが熱ショックでアラニン感受性となり、発芽誘起物質のアラニンとアロステリックに結合するようになる。その結果、蛋白分解活性を持つようになったレセプターは、前駆体としてスポアコートの内側に局在するコルテックス分解酵素を加水分解し、活性化させると同時に熱感受性に変えていき、胞子の耐熱性を失わせていくようになる。さらに、活性化したコルテックス分解酵素による部分的なコルテックス分解の結果、胞子の水和がもたらされ、Ca<sup>2+</sup>とジピコリン酸の放出、光屈折性の喪失といった一連の発芽現象が進んでいくと考えられている。

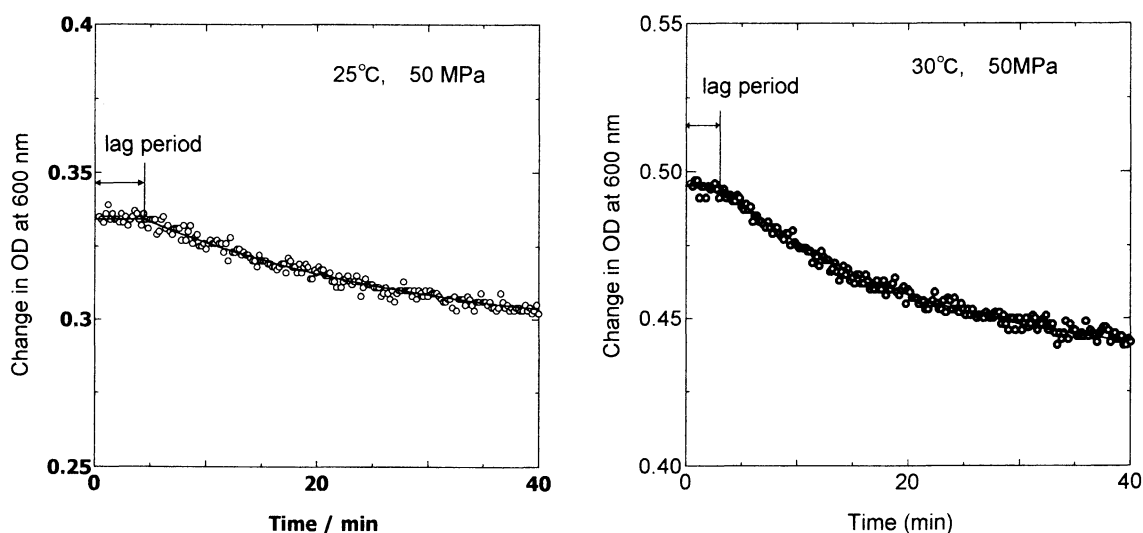


Fig. 3 Change in optical density of spore suspension during pressurization at 25°C and 30°C.

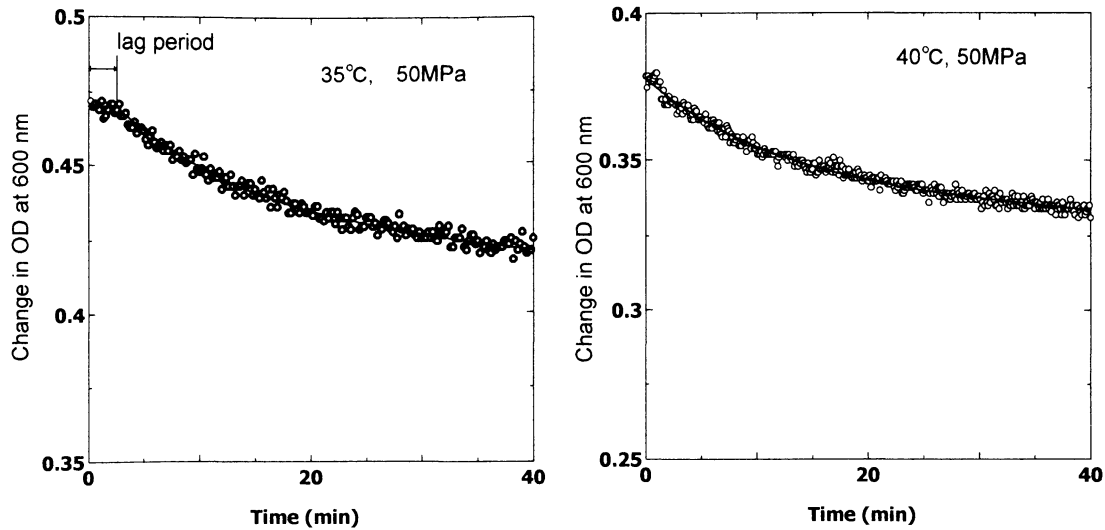


Fig. 4 Change in optical density of spore suspension during pressurization at 35°C and 40°C.

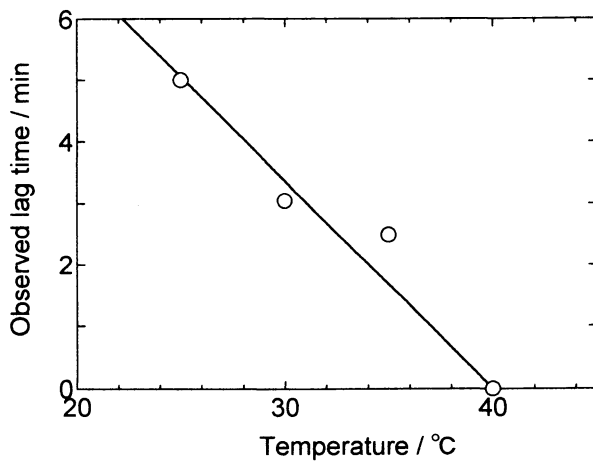


Fig. 5 The relationship between the lag period and temperature during pressurization.

それでは、圧力による発芽は、上記の発芽誘起物質の場合とは何が異なるのだろうか？ 阻害剤や変異株を使った Wuytack ら<sup>5</sup>の研究によると、100 MPa 前後の比較的低い圧力による発芽は、アラニンなどの発芽誘起物質による発芽機構と大部分重複していると考えられる。即ち、発芽の第一段階となるアラニンレセプターの活性化メカニズムが違うだけである。圧力の場合、それはコンフォメーションな構造変化が圧力によってアラニンレセプター蛋白に引き起こされた結果、レセプターの活性化をもたらしたと理解されている。

もし、この仮説が正しいとすれば、今回得られた重要な二つの結果、即ち、圧力による発芽開始までには lag period が存在すること、そしてそれが温度依存性を示すことも容易に説明され、何ら矛盾した結果とはならないであろう。なお、今回の結果と類似の現象と

して、加熱活性化によってアラニン発芽の lag period が短縮される事実も報告されている。しかし、これはレセプター自体の活性化ではなく、アラニンの到達が早められた結果によるものであり、今回の結果とは直接の関係はないと思われる<sup>6</sup>。

一方、今回の結果は、食品や医薬品への高压利用の面からも大変意義があることを指摘しておきたい。それは、高压利用の実用化に際しての操作条件決定、高压と加熱の併用による殺菌コスト削減などに寄与すると考えられるからである。今後、もっとさまざまな実験条件下でも、この光学窓付き高压容器による細菌胞子の発芽の直接観察を行い、応用面にも役立つ基礎的なデータを提供していく予定である。

#### 謝 辞

本論文は、神戸大学工学部応用化学科 曾谷知弘博士との共同研究に基づくものであり、これまでのご協力に深く感謝の意を表するものであります。

#### 参考文献

- 1) S. Asada, T. Sotani, J. Arabas, and H. Kubota: *Proc. of AIRAPT-17* (Honolulu, Hawaii, 25-30 July 1999), pp. 305-307.
- 2) Y. Tsuchida, T. Tsuchido: *Biocontrol Sci.*, 2, 19 (1997).
- 3) Y. Hachisuka et al.: *J. Bacteriol.*, 69, 389 (1955).
- 4) S. J. Foster, K. Johnstone: *Mol. Microbiol.*, 4, 137 (1990).
- 5) E. Y. Wuytack, J. Soons, F. Poschet, C. W. Michiels: *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 257 (2000).
- 6) Y. Yasuda, K. Tochikubo: *Antibact. Antifung. Agents*, 25, 333 (1997).