

## 食品変敗菌*Bacillus coagulans*に対するカテキン類 の抗菌メカニズム解明に関する研究

佐藤, 惇

<https://hdl.handle.net/2324/1959183>

---

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

氏 名 : 佐藤 惇

論文題名 : 食品変敗菌 *Bacillus coagulans* に対するカテキン類の抗菌メカニズム  
解明に関する研究

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

高い耐熱性を有する芽胞を形成する芽胞形成細菌は、PET 容器詰茶系飲料を製造する上で重要な管理指標微生物である。その中で、*Bacillus coagulans* は、形成する芽胞の耐熱性が他の中温性芽胞形成細菌と比較して高い。従って、PET 容器詰茶系飲料の微生物学的な品質低下を適切に制御するには、①原料または製造工程、中間品、製品等の微生物種だけでなく、菌株を迅速かつ正確に同定・識別して重要管理点および管理基準を明確化し、これにより *B. coagulans* の混入防止および汚染の低減を図ること、②茶系飲料中での微生物の増殖に影響を与える因子を明確にし、その組成を工夫することで飲料中での菌の増殖を抑制することの 2 点が重要である。茶系飲料中での微生物の増殖を阻害する代表的な因子の一つとして茶ポリフェノール類、特にカテキン類が重要な働きをしていることが知られている。しかしながら、カテキンを含む茶系飲料の開発において重要な制御対象菌の一つである *B. coagulans* は、他の芽胞形成細菌と比較して茶系飲料中で増殖し易く、カテキン類に対する耐性を有する可能性があるにも関わらず、これまで茶飲料中での耐性が異なる理由も含めてカテキン類の抗菌作用機構解明の対象として研究が行なわれていない。

そこで本研究では、*B. coagulans* を対象として、菌株を迅速かつ正確に同定・識別する技術を開発し、カテキン類及び重合カテキン類の *B. coagulans* に対する抗菌メカニズム解明を試みた。

まず、repetitive-PCR (rep-PCR) 法およびリボタイピング法の従来法との比較および生化学性状との比較から Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による微生物解析技術を用いた迅速かつ正確な *B. coagulans* 菌株識別法の開発を行った。ゲノム上に点在する繰り返し配列を解析対象とした rep-PCR 法とリボソームタンパク質を対象とした MALDI-TOF MS のそれぞれ異なる原理に基づいた解析法を組み合わせる事で、生化学的および遺伝学的にさらに詳細に *B. coagulans* 菌株を識別できることを明らかにした。

次に、飲料・加工食品製造において有効な微生物制御技術の開発を目標に、これまで抗菌作用機構に関する報告の多い(-)-epigallocatechin gallate (EGCg) に加えて、その高い抗菌活性が注目されている重合カテキンの一つである theaflavin-3'-gallate (TF3'G), theaflavin-3,3'-digallate (TFDG) の抗菌作用に着目し、*B. coagulans* 細胞の細胞表層タンパク質に対する親和性を 2 次元電気泳動解析を用いて比較した。この結果、EGCg よりも TFDG が *B. coagulans* 細胞表層タンパク質に吸着しやすいことが明らかとなった。TFDG との相互作用が推定されるタンパク質としては細胞内への物質輸送に関わる ABC transporter を中心としたタンパク質群が同定された。また、EGCg は抗菌力を示す以上の濃度で作用させても *B. coagulans* の栄養源の取込活性は低下せず、他の *Bacillus* 属細菌と比較してカテキンに対する耐性が高い理由の一つとして *B. coagulans* の細胞表層と EGCg との親和性の低さが示唆された。

さらに、EGCg および TFDG に加えて、theaflavin (TF), theaflavin-3-gallate (TF3G), theaflavin-3'-gallate (TF3'G) の重合カテキン類を用いて抗菌性の違いを比較するとともに、細胞膜流動性に与える影響や細胞表層への吸着強度の違いなど細胞膜リン脂質に着目した解析を行なった。*B. coagulans* の細胞

膜流動性は EGCg 処理では全く変化しない一方で、galloyl 基を有する重合カテキンを作用させると顕著に細胞膜流動性が低下した。更に、*B. coagulans* では細胞膜リン脂質として phosphatidylglycerol (PG) が約 95%を占めており、モデル PG 膜との親和性も EGCg  $\approx$  TF < TF3G < TF3'G < TFDG の順に強く、抗菌活性との相関が認められた。

以上、本研究ではカテキンおよび重合カテキン類の抗菌活性が *B. coagulans* の細胞表層タンパク質との結合による機能阻害や細胞膜リン脂質の親水基への直接的な作用により発現していることを明らかにした。更に、細菌菌体とカテキンおよび重合カテキン類との親和性が異なり、これがカテキンおよび重合カテキン類に対して菌種毎に感受性が異なる原因の一つであることを見出した。細胞表層タンパク質との特異的な結合性やリン脂質との親和性を指標として、茶系飲料中での微生物の増殖阻害に効果的な食品素材のスクリーニング技術の開発や他の抗菌素材等との組み合わせにより、より安全性が高く、微生物による品質劣化の無い、賞味期限の長い飲料の開発が可能になると期待される。