

**773 浸透圧ショックによる細菌死滅の特性**

○林 綱美, 仲本秀臣, 坂元 仁, 土戸哲明 (関西大・工・生物工学)

【目的】微生物は乾燥や濃縮の過程で起こる急速な水分活性の変化に障害を受け、死に至ることが推測される。食品や医薬品などの粉粒体製造時の乾燥、濃縮過程に起こる細菌の死滅挙動についての基礎的知見を得るため、本研究では大腸菌細胞の浸透圧ショック死の特性を調べた。

【方法と結果】対数増殖期の大腸菌細胞懸濁液を 4,20,37,45°C の 3M の塩化ナトリウムを含む緩衝液 (pH7.0) に 10 倍希釈法によって急にさらし、サンプリング、希釈後、平板法によって生菌数を測定した結果、二相性が見られた。ショック後数分間の第 1 相ではショック時の温度に依存して急激に生存数が低下し、その後は比較的緩やかな死滅が見られた。また、ショック時の塩濃度、pH、希釈倍率の影響を調べたところ、低濃度、酸性 pH、低希釈倍率の方が死滅は減少した。この作用は溶質の種類に依存し、グリセリンは全く効果がなく、塩化ナトリウム、スクロース、グルコースの順に効果があった。本研究で認められた浸透圧ショックによる死滅は、溶質濃度の急激な変化による著しい細胞内外の浸透圧差がもたらす細胞膜の物理的な損傷に由来するものと考えられるが、これに基づく生理学的な分解反応の関与の可能性について検討している。

**Properties of osmotic-induced death of bacterial cell**

○Kinumi Hayashi, Hideomi Nakamoto, Jin Sakamoto, Tetsuaki Tsuchido (Dept. Biotechnol., Kansai Univ)

**Key words** osmotic shock, bacterial cell, cell death, sodium chloride**775 多チャンネル型酸素電極 (DOX) 装置によるサルモネラ属菌の特異的・迅速検出法**

○末信一朗, 南保幸男, 松浦孝宣, 堀 照夫 (福井大・工・生応化)

【目的】食品の衛生管理を目的として、多チャンネル型溶解酸素測定装置 DOX とサルモネラ抗体を組み合わせて、多検体のサルモネラ属菌の検出が可能となった。今回、本法によるサルモネラ属菌の検出とその定量性を実試料について検討した。

【方法と結果】多チャンネル型溶解酸素測定装置はダイキン環境研究所製、DOX-96 を用いた。本装置は、三電極方式で 96 ヶプレート底部に一体型となって装着されている。抗体溶液をプレートの各ウェルに固定化しブロッキングした後、試料を反応、培地を加え 30°C で培養し溶解酸素の経時変化を測定した。*S. typhimurium*、*E. coli*、*B. subtilis* について交差反応を検討したところ *E. coli* がウェルあたりの生菌数で 103 オーダーまで混在していても、溶解酸素の減少が 12 時間以内に観察されない場合は、*S. typhimurium* は存在していないと判断され、大腸菌など多数の微生物の混在する試料中においても *S. typhimurium* がウェル中に 1 個のオーダーで存在すれば本方法で特異的に検出できる可能性が示唆された。食肉を実試料として、本方法と通常の平板培地による生菌数測定を比較したところ、本方法では極めて高い感度で *S. typhimurium* を検出することが可能であった。溶解酸素の減少時間と *S. typhimurium* の生菌数の定量的関係についても論じる。

**Rapid and specific detection of Salmonella sp. by using mulch channel type dissolved oxygen electrode**

○Shin-ichiro Suye, Yukio Nanbo, Takanori Matsuura, Teruo Hori(Dept. Appl. Chem. Biotechnol. Fukui Univ.)

**Key words** Salmonella sp., food poisoning, microbial sensing**774 PCR 増幅物のイムノクロマトグラム膜による迅速検出法**

○武内 章, 堀江睦子, 小林 薫, 齊藤佳子, 指原信廣 (キュービー・研究所)

【目的】近年、PCR 増幅とアガロースゲル電気泳動による増幅物の検出を組合せた微生物の迅速検出が幅広く行われている。アガロースゲル電気泳動と臭化エチジウム染色による検出は煩雑であり時間がかかる。そのため、蛍光エネルギー転移の解消等を利用した PCR 増幅物のリアルタイムモニタリング技術が開発されたが、高価な機材・資材が必要であり、定性的な PCR 検出には活用されていないのが現状である。そこで、より迅速簡易な PCR 増幅物の検出法を開発した。

【方法および結果】イムノクロマトグラム用のニトロセルロース膜の中央部にアビジンを固定した。このニトロセルロース膜の一端に検査液を滴下するためのマウント用パッドを、他端に余剰液を吸収するための吸収パッドを装着した。同時に、サルモネラの *oriC* 領域を標的とするプライマーの正規鎖の 5' 末端をフルオロセインで、逆鎖の 5' 末端をピオチンで標識し、*S. Enteritidis* の DNA 抽出物を鋳型として PCR 増幅を行った。PCR 増幅物をイムノクロマトグラム膜のマウント用パッド上に注入し数分間展開後、トランスイルミネーターで蛍光観察した。アビジンを固定した位置に蛍光が観察された。一方、*S. Enteritidis* の DNA 抽出物を加えずに PCR 増幅を行った場合、フルオロセイン化プライマーはアビジン固定化部位に吸着されず、蛍光は観察されなかった。これらの結果より、フルオロセインとピオチンでヘテロラベルされた PCR 増幅物を迅速に検出できる DNA センサーが構築された。

サルモネラ属細菌の *oriC* 領域を属特異的に増幅できるアビジン化およびフルオロセイン化プライマーを使用し *oriC* 断片を PCR 増幅し、この DNA センサーを使用し検出することにより、電気泳動法よりも迅速にサルモネラ属を検出することができた。

**Rapid method for the detection of PCR amplicon using immunochromatographic membrane**

○Akira Takeuchi, Mutsuko Horie, Kaoru Kobayashi, Yoshiko Saito, Nobuhiro Sashihara (R&amp;D Div. Q.P. Corp.)

**Key words** PCR, immunochromatography, avidin, biotin, fluorescein, Salmonella**776 オカラ高度酵素分解に関する研究**

○笠井尚哉, 村田 葵, 乾 博, 阪本龍司 (大阪府大院・農生科)

【目的】未利用農産物の廃棄が問題となってきた。特に豆乳の絞りかすであるオカラは我が国をはじめアジア諸国で廃棄物であり、その有効利用が研究されてきた。しかしながら、オカラは高度な難分解性繊維として考えられ、50-70% の分解が限界とされてきた。本発表においては、大豆オカラの高度液化法確立とその有効利用探索を目的とした酵素による高度分解のための検討を行った。

【方法】オカラを対象物として、オートクレーブ処理、糖分解可溶性酵素を中心に 40°C、15 時間の反応条件下、検討を行った。また消化物に対しては、重量損失量、全糖量、糖組成、タンパク量、SDS-PAGE、HPLC、光学顕微鏡による反応処理後の染色像観察などにより評価した。

【結果】オカラをオートクレーブしたもの、同セルラーゼ処理したもの、及び大豆細胞について糖、蛋白質、脂質についてそれぞれ PAS、アクトレインシッフ、スザン染色し、セルラーゼ分解による変化を観察した。またセルラーゼ分解処理で残るオカラ及び大豆細胞についても同じく顕微鏡下各種染色を行い比較検討した。その結果、未分解オカラは主として蛋白質と糖質からなる構造物と考えられた。本未分解物に対して、各種プロテアーゼ、糖質分解酵素での分解の有無、及び未分解物アルカリ可溶化後、ゲル濾過にて得られる高分子画分について分析検討した。その結果、主成分は蛋白質、中性糖、ウロン酸からなる 700kDa 程度の高分子成分であり、一部のペクチナーゼにより効果的に分解できることが判明した。

**Strategy for Highly Enzymatic Hydrolysis of Okara**

○Naoya Kasai, Aoi Murata, Hiroshi Inui, Tatsuji Sakamoto (Osaka Pref. Univ., Div. Appl. Biol. Chem.)

**Key words** Okara, soybean, enzymatic hydrolysis, cellulase, pectinase