

2Ma10 沖縄産植物から得られた GABA 生産性酵母

○池端 真美¹, 豊里 哲也¹, 安座間 盛力¹, 高良 亮¹,
渡嘉敷 唯章¹, 波平 知之², 新里 尚也², 松井 徹²
(¹トロピカルテクノセンター, ²琉大・熱生研)

【目的】沖縄地域は日本国内で唯一の亜熱帯地域に属しており、海に囲まれ、人的影響を受けていない無人島も多く存在している。島嶼環境により独特の進化をとげた独自の生態系をもち、他府県にみられない生物が生息するなど亜熱帯生物資源に恵まれた地域である。我々はこのような亜熱帯地域の環境中より採取したサンプルを用いて微生物の分離と保存を行うとともに、多様な機能性の解析を行い、沖縄微生物ライブラリーの構築を行っている。γ-アミノ酪酸 (GABA) 生産性を有する微生物は、乳酸菌などでの報告例は多いが、酵母での報告例は少ない。本研究では酵母の GABA 生産性を有する酵母の探索を行った。

【実験方法及び結果】沖縄本島北部および離島より採取した試料（植物体・土壌・河川水など）を分離源として、クロラムフェニコール添加YPD寒天培地にて微生物を分離した。得られた菌株より約3,000株について1%グルタミン酸ナトリウム添加YPD培地で培養し、培養上清に含まれるGABAをTLCおよびHPLCで検出し、GABA生産性を有する株をスクリーニングした。これらのGABA生産性菌株は、ヤンバルセンニンソウやインパチェンスの花、更にシークワサーやパイナップルの果実など、植物由来の分離源から分離され、26S r DNA 遺伝子解析の結果、*Candida* sp.、*Picia* sp.、*Aureobasidium* sp.、*Kluyveromyces* sp. など様々な酵母が含まれていた。

γ-Aminobutyric acid-producing yeasts isolated from Okinawan plants

○Mami IKEHATA¹, Tetsuya TOYOSATO¹, Morichika AZAMA¹,
Ryo TAKARA¹, Tadaaki TOKASHIKI¹, Tomoyuki NAMIHIRA²,
Naoya SHINZATO², Toru MATSUI²
(¹Tropical Technology Center. LTD., ²TBRC, Univ. Ryukyus)

Key words GABA, yeast, okinawa microbial library

2Ma12 Alicyclobacillus acidoterrestris の耐熱性に関する多面的な解析の試み (2. ナノサーチ技術の利用による新しい解析)

○中西 弘一, 出内 桂二
(キリンビバレッジ・開発研)

【目的】AATの耐熱性を多面的に解析しより速く、簡便に情報を得る方法を開発するため、芽胞の硬さに着目し耐熱性との関連性について調べた。
【方法・結果】耐熱性異なる複数のAAT株について、硬さと耐熱性そして耐熱性以外の物理的耐久性についても関連があるか解析した。硬さは走査型プローブ顕微鏡 (SPM) のカンチレバーによる表面接触走査機能に着目し、これを利用した解析を行った。ナノサーチ顕微鏡 (島津製作所) の装備する SPM カンチレバーによる芽胞の押込みに対する反発距離比から芽胞の硬さを測った (1)。その結果、AATにも芽胞の硬さと耐熱性には相関があることが確認できた。前の発表と併せ、これまでの加熱方法以外の多面的なアプローチにより芽胞形成菌の耐熱性を解析することが可能であった。

1)中西ら、日本農芸化学会2009年度大会講演要旨集p.2.

Challenge of multipronged analysis concerning heat tolerance of Alicyclobacillus acidoterrestris(2.New analysis using by Nano-serach technology)

○koichi Nakanishi, Keiji Deuchi
(Kirin Beverage)

Key words Alicyclobacillus acidoterrestris, spore, hardness, SPM

2Ma11 Alicyclobacillus acidoterrestris の耐熱性に関する多面的な解析の試み (1. 芽胞形成遺伝子からの解析)

○金成 繁太¹, 村上 裕之¹, 藤田 康弘¹, 高松 宏治², 渡部 一仁²
(¹キリンビバレッジ・開発研, ²摂南大・薬)

【背景】芽胞形成菌の芽胞の耐熱性を測定することは微生物品質の高い清涼飲料の製造において意義深い。操作が煩雑でありより簡便かつ迅速な方法が求められている。現状では「①対象の芽胞形成菌の芽胞の調整」、「②耐熱性の実測に多くの労力が必要」と2つの大きな課題がある。これら2点を解消するべく、耐熱性好酸性菌の一種である *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAT) を対象に遺伝学的な手法により耐熱性を予測する手法の検討を行った。【目的】AAT は耐熱性の高低により 2 つのグループに分けられ、16S rDNAと *gyrB* の SNPs と相関があった1)。今回はこれら遺伝子よりも耐熱性との関連性が深いと想定される芽胞形成遺伝子についての解析を行った。【方法・結果】*spoIVA* ユニバーサルプライマーで確認を行った結果、AAT は芽胞形成遺伝子を有することが示唆された。芽胞形成遺伝子の *spoIVA*・*spoVT* について耐熱性の異なる AAT の塩基配列を比較したところ、*spoVT* は耐熱性と SNPs が相関し、*spoVT* は AAT の耐熱性マーカーになることが明らかとなった。しかし *spoIVA* は比較した中 7 株中の 1 株が別の挙動を示し AAT の耐熱性マーカーにはならなかった。

1)米田ら：日本農芸化学会2008年度大会講演要旨集、p246

Challenge of multipronged analysis concerning heat tolerance of Alicyclobacillus acidoterrestris(1.In a view of sporulation genes)

○SIGETA KANARI¹, Hiroyuki MURAKAMI¹, Yasuhiro FUJITA¹,
Hiromu TAKAMATSU², Kazuhito WATABE²
(¹Kirin Beverage, ²Setsunan Univ)

Key words Alicyclobacillus acidoterrestris, sporulation gene, heat tolerance, SNPs

2Ma13 二酸化塩素の簡便な殺菌活性評価法の開発

○森山 恵, 青柳 秀紀
(筑波大院・生命環境)

【目的】近年、食品添加物である次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の問題点を排除した新たな殺菌剤として、二酸化塩素 (ClO₂) が注目されている。しかしながら、現状ではClO₂の殺菌機構が十分明らかにされていないと共に、微生物や食品成分に及ぼす影響に関するデータも少なく、実際に使用するための基礎的知見が揃っていない。本研究では、ClO₂の簡便な殺菌活性評価法の開発を試みた。

【方法・結果】モデルとして *Escherichia coli* と *Saccharomyces cerevisiae* を使い、様々な濃度の ClO₂ (あるいは NaClO) 溶液を 1 h 作用させた後、寒天平板培養法を用いて生菌数を測定し、殺菌活性を評価した。その結果、(1) ClO₂ は NaClO に比べて低濃度で殺菌が可能、(2) *S. cerevisiae* は *E. coli* に比べ、ClO₂ の影響を受けにくい、事が示唆された。しかしながら、操作が煩雑で評価に長時間を要すると共に、作用濃度によっては ClO₂ が残存し、反応時間を正しく設定できない等の問題があった。これらの問題点を排除するために、96穴ディープウェル内で一定時間 ClO₂ の反応を行った後、catalase と MOPS の混合液を添加して ClO₂ を消去した。その後、液体培地を添加して振盪培養を行い、O.D. で菌体の増殖をモニターし、増殖経過に基づき ClO₂ の殺菌活性を評価する方法を考案した。本法により種々の条件下における ClO₂ の殺菌活性を簡便に評価する事が可能になった (一例として、本法により ascorbic acid, catalase, SOD 等の抗酸化物質が共存すると ClO₂ の殺菌活性が低下することが把握できた)。

Development of a simple method for evaluating antimicrobial activities of chlorine dioxide

○Megumi MORIYAMA, Hideki AOYAGI
(Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words chlorine dioxide, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*