[報文]

照射糖培養液の微生物生育に及ぼす影響

伊藤 均

日本原子力研究所高崎研究所・研究嘱託 (〒 370-0884 群馬県高崎市八幡町 935-6)

Effects of Microbial Growth in Irradiated Sugar Media

Hitoshi Ito

Research advisor, Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute,
935-6 Yahata, Takasaki, Gunma, 370-0884, JAPAN

Summary

Effects of gamma-irradiated media containing 1% glucose on the growth of microorganisms were investigated using with strains of *Saccharomyces cerevisiae* 52a, *Escherichia coli* A4-1, S2 and *Bacillus subtilis* IAM1069 after irradiated at 16kGy under air-equilibrium or oxygen-equilibrium. Same growth were observed when cultivated with *Scerevisiae* in the glucose media after irradiated at 16kGy under air-equilibrium or 16kGy under oxygen-equilibrium compared with heat sterilization. In the case of *E. coli* A4-1 and S2, a little inhibition of growth were observed in irradiated media especially at oxygen-equilibrium irradiation. Strong growth inhibitions were observed in irradiated media when cultivated with *B.subtilis* especially remarkable at oxygen-equilibrium irradiation. Irradiation of 1% glucose media caused pH drops from 7.4 to 6.6 at air-equilibrium irradiation and 6.4 at oxygen-equilibrium irradiation whereas 6.8 at heat sterilization. When these media were neutralized to pH 7.0 - 7.2, no inhibitions of growth were observed on *B.subtilis* between irradiated and heat sterilized media. These results indicated that cytotoxicity effects were not observed in irradiated media on these microorganisms. Similar pH drops were observed in sugar media at glucose, xylose and lactose after 16kGy irradiation whereas observed strong drop of pH at xylose by heat sterilization. From these results, pH drop of sugar media after irradiation must be considered for the design and interpretation on media effects at the wholesomeness evaluation of irradiated foods.

緒 言

米国等の食品照射反対運動では現在でも 1969 年に Schubert が報告した総説「照射食品および食品成分の変異原性と細胞毒性」を反対運動の重要な論拠の一つに用いている¹⁾。この総説では 1%糖含有培養液等を照射すると微生物や植物細胞、哺乳動物細胞、原生動物細胞に対し細胞毒性や変異原性を示すと述べている。これに対し、わが国ではガンマ線照射した糖液や糖・アミノ酸混合液の変異原性についての一連の研究が行われている^{2)~5)}。これらの研究では、糖液を照射すると弱変異原性物質が若干生成するが果汁抽出液や動物体内で無毒化され、糖・ア

ミノ酸混合液では加熱の場合と異なり照射による変異原性物質の生成はないと報告されている。しかし、これらの研究では細胞毒性に及ぼす照射の影響についてほとんど検討されていない。糖類は水溶液の状態では放射線で分解されやすいが、熱処理でも著しく分解するものがある。そこで、本研究では糖発酵能を有する酵母菌や細菌類を用いて照射糖培養液と蒸気滅菌糖培養液における生育能に及ぼす糖分解物の影響について検討を行った。

実験方法

1. 照射糖培養液の調整

糖培養液はペプトン無添加培養液 (glucose 10g,

NH_4NO_3 1g, K_2HPO_4 1g, NaCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 蒸留水 1l, pH 7.4) とペプトン添加培養液 (glucose 10g, polypeptone 2g, NaCl 0.5g, K_2HPO_4 0.3g, 蒸留水 1l, pH 7.4) を準備した。この糖培養液を 250ml 容の通気瓶 2 本に約半量ずつ入れ、片方は酸素ガスを約 10 分通気後に密封した。他の通気瓶は通気口を綿栓した。ガンマ線源は 10 万キュリー (4.0PBq) の Co-60 板状線源を用い、4.0kGy/h の位置での両面照射で 16kGy 照射した。照射位置の線量率は Fricke 鉄線量計とアラニン線量計であらかじめ測定して両者の吸収線量が一致することを確認しておいた。また、比較として xylose, lactose 培養液も照射した。しかし、微生物によっては xylose や lactose 発酵能がないものがあるため、培養試験には用いなかった。一方、非照射の糖培養液は 120℃・15 分で蒸気滅菌しておいた。これらの処理済み培養液は 4℃ で 1 夜保存して培養試験に供した。

2. 供試菌株

Saccharomyces cerevisiae 52a 株は ascospore を形成しやすい野生酵母菌である。*Escherichia coli* S2 株は下水汚泥から分離され⁶⁾、ペプトン無添加の合成培地でも活発に生育する。*E. coli* A4-1 株は牛肉より分離されペプトン無添加培地では生育できず、ソルビ

トール分解能がない⁷⁾。*Bacillus subtilis* IAM1069 株は低温下で簡単に溶菌を起こす菌である。

3. 培養試験

照射糖培養液または蒸気滅菌糖培養液 9ml を各 7 本の L 字管に無菌的に注入し、各種菌株培養液 1ml を加えシリコ栓をして、30℃ で振とう培養を行った。2 時間ごとに L 字管を採取し、660nm の吸光度 (島津 UV-150 型) で生育度を測定した。また、必要に応じて糖培養液の pH を測定し、培養液の着色は肉眼で観察した。

実験結果

S. cerevisiae の場合 Fig. 1 に示すようにペプトン添加培養液での生育は蒸気滅菌と照射処理での差は全く認められなかった。一方、*E. coli* S2, A4-1 株では蒸気滅菌培養液に比べ照射培養液での生育が若干抑制された。ことに酸素ガス飽和下で照射した培養液での生育抑制が明確に認められた (Fig. 2, 3)。

B. subtilis をペプトン無添加培養液 (照射前: pH 7.0) で培養すると、蒸気滅菌培養液では菌の生育が認められたのに対し、照射培養液での生育は著しく抑制され、ことに酸素ガス飽和下で照射された培養液での生育はほとんど認められなかった。この場合

Fig. 1 Growth of *S. cerevisiae* 52a in 1% glucose medium containing polypeptone at 30℃ after irradiation or heat sterilization.

● : heat sterilization,
○ : irradiated 16kGy under air-equilibrium,
▲ : irradiated 16kGy under oxygen-equilibrium

Fig. 2 Growth of *E. coli* S2 in 1% glucose medium without containing polypeptone at 30℃ after irradiation or heat sterilization.

● : heat sterilization,
○ : irradiated 16kGy under air-equilibrium,
▲ : irradiated 16kGy under oxygen-equilibrium

Fig. 3 Growth of *E. coli* A4-1 in 1% glucose medium containing polypeptone at 30°C after irradiation or heat sterilization.
 ● : heat sterilization,
 ○ : irradiated 16kGy under air-equilibrium,
 ▲ : irradiated 16kGy under oxygen-equilibrium

Fig. 4 Growth of *B. subtilis* IAM1069 in 1% glucose medium containing polypeptone at 30°C after irradiation or heat sterilization.
 ● : heat sterilization,
 ○ : irradiated 16kGy under air-equilibrium,
 ▲ : irradiated 16kGy under oxygen-equilibrium

の培養液のpHは蒸気滅菌処理液で6.4に対し、空気平衡下の照射培養液で6.2、酸素ガス平衡下の照射培養液で6.0であった。*B. subtilis*の生育がペプトン無添加培養液で活発でないため、ペプトン添加培養液で再度培養試験を行った。その結果、Fig. 4に示すように照射培養液では菌の生育が明確に抑制され細胞毒性があるように推察された。この場合の培養液のpHは処理前が7.4に対し、蒸気滅菌処理後には6.8に低下し、空気平衡下での照射培養液で6.6、酸素ガス平衡下での照射培養液で6.4に低下した。そこで、各処理培養液のpHを7.0～7.2に再調整してから*B. subtilis*を培養したところ、Fig. 5に示すように各培養液での生育に差は全く認められなくなった。このことは*B. subtilis*が他の菌種に比べpH変化に敏感であることを示しており、照射による分解生成物は各種微生物の生育に対し有害でないことを示している。

水溶液中のglucoseは蒸気滅菌に比べ16kGy照射で糖分解によるpH低下が起こりやすいことが明らかになったので、さらにxyloseやlactoseについても分解によるpH低下を比較した。その結果、Table 1に示すように照射によるpH低下は糖の種類による差は少なかった。一方、蒸気滅菌処理ではxyloseの

Fig. 5 Growth of *B. subtilis* IAM1069 in irradiated or heat sterilized 1% glucose medium containing polypeptone after adjustment of pH to 7.0-7.2.
 ● : heat sterilization,
 ○ : irradiated 16kGy under air-equilibrium,
 ▲ : irradiated 16kGy under oxygen-equilibrium

pH低下が著しく認められ糖の種類による差が大きかった。また、蒸気滅菌処理では糖培養液が薄茶褐色に着色したが照射糖培養液では着色は認められなかった。

Table 1. Change of pH and color on 1% sugar media after 16kGy irradiation under air-equilibrium or heat sterilization.

Treatment of media		Glucose	Xylose	Lactose
Sugar medium without containing polypeptone (pH 7.4)				
heat sterilization	pH	7.12	6.05	6.86
	color	±	++	+
16kGy irradiation	pH	6.94	9.82	6.86
	color	—	—	—
Sugar medium containing polypeptone (pH 7.4)				
heat sterilization	pH	7.12	6.03	6.88
	color	±	++	+
16kGy irradiation	pH	6.76	6.70	6.81
	color	—	—	—

考 察

糖類を乾燥下で照射すると有機酸のほかにアルデヒド類も生成するが、水溶液中で照射すると有機酸が主に生成すると報告されている⁸⁾。すなわち、水溶液中で glucose を照射するとグルコン酸、グリセリン酸、デオキシグルコン酸類、デオキシクトグルコース類が主に生成し、グルコソンの α -ジカルボニル化合物類なども若干量生成することがわかっている。これらの化合物の中でグルコソンの α -ジカルボニル化合物に弱変異原性を示すものがあるが、10kGy の照射では変異原性を示すのに必要な量の 100 分の 1 程度しか生成しないと報告されている²⁾。

本研究の結果では *S. cerevisiae* は pH6.0 以下でも生育が良好なため、蒸気滅菌処理と照射処理糖培養液で生育に差が認められないのは当然のことであろう。*E. coli* も比較的低 pH で生育が可能であり、照射糖培養液で生育が若干抑制されたのは pH 低下による影響であろう。*B. subtilis* は高 pH での生育を好み、しかも化学物質の細胞透過性が高い菌である。したがって、照射糖培養液で pH が著しく低下すれば生育が抑制されるのは当然である。しかも、培養液成分の影響が現れやすい菌であるにもかかわらず pH を 7.0 以上に再調整すると照射の影響が認められなくなったという結果は細胞毒性を示す物質がほとんど生成されないことを示している。

Schubert は照射により生成される過酸化水素や有

機過酸化物が生物細胞に悪影響を与えると述べている¹⁾。過酸化水素の生成量は蒸留水中で 100 μ M 程度と報告されているが⁹⁾、糖培養液中では培地成分が存在するため生成量は微量と思われる、しかも照射後に急速に分解されてしまう。照射による有機過酸化物の生成量は脂質でも加熱調理より少ないことが報告されており¹⁰⁾、本研究の結果でも細胞毒性を示す結果は得られていない。したがって、Schubert が引用した多くの研究報告は照射による培養液の pH 低下など実験条件の設定に問題のある結果が多く、それらの結果から照射食品の安全性を評価するのは問題であろう。なお、糖の多くは加熱調理でも分解して有機酸類などを生成するが、その分解生成物の種類は放射線と大差ないものと思われる。

文 献

- 1) J. Schubert: Mutagenicity and cytotoxicity of irradiated foods and food components, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **41**, 873-904, (1969).
- 2) 川岸舜朗, 大澤俊彦, 公文春枝: ガンマ線照射糖液の変異原性およびその抑制, 食品照射研究委員会・研究成果最終報告書, 日本アイソトープ協会, 135-149, (1992).
- 3) 祖父尼俊雄, 石館 基, 林 真, 能美健彦, 松岡厚子, 松井直子, 鈴木孝昌, 渡辺雅彦, 本間正充, 山田雅巳, 山崎奈緒美, 松井恵子: ガンマ線照射グルコースについての変異原性試験, 食品照射研究委員会・研究成果最終報告書, 日

- 本アイソトープ協会, 150-181, (1992).
- 4) 坂本京子, 岩原繁雄, 川上久美子: ガンマ線照射グルコースの変異原性, 食品照射研究委員会・研究成果最終報告書, 日本アイソトープ協会, 182-191, (1992).
- 5) 坂本京子: 糖・アミノ酸混合物の加熱物の変異原性に対するガンマ線照射の影響, 食品照射研究委員会・研究成果最終報告書, 日本アイソトープ協会, 192-203, (1992).
- 6) H. Ito, H. Watanabe, H. Iizuka and M. Takehisa : Change in microflora of sewage sludge by gamma-ray irradiation, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2707-2711, (1983).
- 7) 伊藤 均, Harsojo: 食肉中での大腸菌 O157 : H7 の放射線殺菌効果, *食品照射*, **33**, 29-31, (1998).
- 8) P. S. Elias and A. J. Cohen (Ed.): Radiation Chemistry of Major Food Components, Elsevier, (1977).
- 9) D. Ewing and S. R. Jones: Superoxide removal and radiation protection in bacteria, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **254** (1), 53-62, (1987).
- 10) W. W. Nawar: Volatiles from food irradiation, *Food Reviews International*, **2** (1), 45-78, (1986).

(2003 年 5 月 22 日受理)