食肉中のニコチン酸アミドからニコチン酸生成 に關与する細菌の検討

(平成2年8月31日受理)

大石 充男^{*1} 池島 伸至^{*1} 入倉 善久^{*1}
古川裕季子^{*1} 大西 和夫^{*1} 寺山 武^{*1}
西島 基弘^{*2} 中澤 裕之^{*3}

Studies on Contaminating Bacteria in Meat in Relation to the Conversion of Nicotinamide to Nicotinic Acid

Mitsuo OISHI^{*1}, Nobuyuki IKEJIMA^{*1}, Yoshihisa IRIKURA^{*1}, Yukiko FURUKAWA^{*1}, Kazuo ONISHI^{*1},
Takeshi TERAYAMA^{*1}, Motohiro NISHIJIMA^{*2} and Hiroyuki NAKAZAWA^{*3}

(^{*1}Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-16-25, Shibazaki-cho, Tachikawa-shi, Tokyo, Japan; ^{*2}Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan; ^{*3}National Institute of Public Health: 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, Japan)

In order to clarify the reason why nicotinic acid (NA) was observed in meat during storage, the influence of contaminating bacteria in meat on the conversion of nicotinamide (NAA) to NA was studied using aseptically prepared rabbit liver. When the washed solution of ground meat was added to aseptic liver meat and incubated at 25°C, viable counts of bacteria increased to a level of 10⁸/g after 24 hr, and thereafter remained constant. The ability to convert NAA to NA followed the same time course as bacterial growth. In addition, the ability to convert NAA to NA was found in *Streptococcus* spp. and *Enterobacter* spp. but not in *Pseudomonas* spp.

From these results, it was concluded that the contaminating bacteria in ground meat contributed to the conversion of NAA to NA.

(Received August 31, 1990)

Key words: ニコチン酸 nicotinic acid; ニコチン酸アミド nicotinamide; 食肉 meat; 細菌 bacteria; *Streptococcus* spp.; *Enterobacter* spp.; *Pseudomonas* spp.

緒 言

一般に牛、豚などの食肉には 20~60 µg/g のニコチン酸アミド (NAA) が含まれているが、ニコチン酸 (NA) はほとんど含まれていない^{1)~6)}。しかし、市販ひき肉からしばしば微量の NA が検出されることから、その生成機構を解明するため食肉の保存試験を行った結果、この微量の NA は食肉中の NAA が保存中に変化したものであることを明らかにした。また、保存試験を繰り返した結果、NAA から NA に変化する時間がその都度

異なることや、変化の速度が温度に依存するなどの結果が得られたことから、食肉中の NAA が NA に変化する要因としては、微生物の関与が推察された⁷⁾。

そこで今回、NA の生成に微生物が関与していることを確認するため、無菌的に摘出したウサギ肝臓に市販ひき肉由来の細菌を接種して保存し、NA の生成過程を調査した。また、ひき肉から分離した細菌を NAA 添加培地で培養し、培養液中における NA 生成過程を検討したので併せて報告する。

実験方法

1. 試料及び試薬

1) 無菌的肝臓: 日本白色種ウサギを心臓採血によりと殺後、肝臓を無菌的に摘出し、細切したものを実験に

^{*1} 東京都立衛生研究所多摩支所: 東京都立川市柴崎町 3-16-25

^{*2} 東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*3} 国立公衆衛生院: 東京都港区白金台 4-6-1

供した。

2) ひき肉: 都内の精肉店で購入した牛ひき肉を用いた。

3) NAA, NA 及びその他の試薬は前報⁷⁾に従った。

2. 装置

1) 振とう機: New Brunswick Scientific 社製 Gyrotory water bath shaker G76

2) 冷凍遠心分離機: (株)日立製作所製 18-PR-3

3) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) は前報⁷⁾に記載したものを使用した。

3. 保存試験

市販牛ひき肉, 無菌的肝臓及び牛ひき肉に倍量の生理食塩水を加えて汚染細菌を洗い出した。このひき肉洗浄液を無菌的肝臓に約 1/10 量添加したものをそれぞれ 25° で保存し, 経時的に NAA と NA の変動及び生菌数を調べた。

4. 生菌数の測定

ひき肉又は肝臓を滅菌シャーレに入れ, 25° で保存して経時的に各々 2 g をひょう取し, 生理食塩水 18 ml を加えてホモジナイズ後, 10 倍段階希釈を行い, 標準寒天培地で混釈培養した。25° で 72 時間培養後, 発育したコロニー数を算定し, 1 g 中の菌数を求めた。NAA 添加培地での検討においては培養液 1 ml を採取し, 以下ひき肉と同様に操作し, 1 ml 中の菌数を求めた。

5. 牛ひき肉からの主要細菌の分離と同定

生菌数測定に用いた牛ひき肉の 10 倍段階希釈液をトリプトソイ寒天培地に塗抹し, 25°, 48 時間培養した。発育した集落 1 件当たり 30 個を鉤菌して, Vanderzant の方法により, グラム染色, Birtz の芽胞染色, オキシダーゼ試験, カタラーゼ試験, OF 試験の各試験を実施して菌属の分類を行った。すなわちグラム陽性球菌でカタラーゼ試験陰性を *Streptococcus* spp., グラム陰性桿菌でオキシダーゼ陽性, ブドウ糖非発酵を *Pseudomonas* spp., グラム陰性桿菌でオキシダーゼ陰性, ブドウ糖発酵を Enterobacteriaceae とした。一部の Enterobacteriaceae については TSI 培地, LIM 培地, シモンズのクエン酸塩培地, VP 試験, IPA 試験により菌属の同定を行った。

6. 牛ひき肉分離菌株による NA 生成能

実験開始日, 1 日後及び 2 日後の牛ひき肉から分離した優勢菌種である *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. 及び *Enterobacter* spp. の各々 2 株を実験に供した。NAA を 100 µg/ml 添加した普通ブイヨン 140 ml にそれぞれの供試菌株の普通ブイヨン培養液 1 ml を別々に接種し, 25°, 160 rpm で振とう培養を行い, 経時的に培養液中の生菌数の測定及び NAA と NA の定量を行った。なお, 対照として菌液のかわりに滅菌生理食塩水 1 ml を加えた NAA 添加普通ブイヨンを同じ条件のもとにおいたものについても経時的に検討した。

Fig. 1. Relationship between the change of NAA and NA content and the growth of bacteria in ground beef

○—○, NAA; ●—●, NA; □--□, bacterial count

7. NAA 及び NA の定量

ひき肉又は肝臓 2 g を経時的にひょう取し, メタノールを加えて 20 ml とした後, 以下前報⁷⁾に従って HPLC で NAA 及び NA を定量した。培養液より経時的に 5 ml ずつを採取し, 10,000 rpm で 15 分間遠心分離した後, 上清をメンブランフィルター (0.45 µm) でろ過した。ろ液 2 ml にメタノールを加えて 20 ml とし, 以下ひき肉の場合と同様に NAA 及び NA の定量を行った。

結果及び考察

1. 保存試験における生菌数, NAA 及び NA の経時変化

市販食肉には $10^4 \sim 10^6$ /g の細菌汚染が認められ⁹⁾, 無菌状態の食肉を得ることは困難である。そこでウサギから無菌的に摘出した肝臓を用いて, 細菌の関与しない条件のもとにおける NAA から NA の生成を比較検討することにした。

1) 牛ひき肉における生菌数と NAA 及び NA の経時変化

牛ひき肉を保存したときの生菌数と NAA 及び NA の経時変化を Fig. 1 に示した。生菌数は実験開始時には 10^7 /g のものが経時的に増加し, 16 時間後には 10^9 /g と最大となり以後はほぼ一定となった。NAA は生菌数が最大値となったところから急激に減少し始め, 36 時間後には検出されなくなった。NA は NAA の減少とは逆に増加し, 36 時間後には NAA の実験開始時の量 (41 µg/g) とほぼ同じ値となった。このことは, ひき肉中に存在した NAA の大半が保存中に細菌により脱アミド化を受け, NA に変化したものと考えられる。

2) ウサギ肝臓における生菌数と NAA 及び NA の経時変化

無菌的に採取したウサギ肝臓を保存したときの生菌数と NAA 及び NA の経時変化を Fig. 2 に示した。生菌数

Fig. 2. Relationship between the change of NAA and NA content and the growth of bacteria in control liver of rabbit which was aseptically prepared
The symbols are the same as in Fig. 1.

Fig. 3. Relationship between the change of NAA and NA content and the growth of bacteria in control liver added bacteria rinsed out from ground beef
The symbols are the same as in Fig. 1.

は36時間保存後でも全く認められなかった。しかし肝臓中のNAAは136 $\mu\text{g/g}$ から経時的に徐々に減少し、36時間後には84 $\mu\text{g/g}$ となった。一方、NAはNAAの減少とは逆に実験開始時の6 $\mu\text{g/g}$ から36時間後には17 $\mu\text{g/g}$ とわずかに増加した。ウサギ肝臓中にはNAAをNAへ変化する脱アミド酵素¹⁰⁾の存在が知られている。従って、このように生菌数が少数にもかかわらず、NAAの緩やかな減少及びNAの増加がみられたのは、ウサギ肝臓中の脱アミド酵素によるものと推察される。

3) ウサギ肝臓に牛ひき肉洗浄液を加えたときの生菌数とNAA及びNAの経時変化

ウサギ肝臓に牛ひき肉洗浄液を加えたものを保存したときの生菌数とNAA及びNAの経時変化をFig. 3に示した。一般生菌数は実験開始時 $10^6/\text{g}$ のものが16時間後には $10^8/\text{g}$ に増加し、以後一定となった。NAAは初めは緩やかな減少傾向を示したが、一般生菌数が $10^8/\text{g}$ に達した頃から、急激に減少し始め36時間後には検出されなくなった。それに対しNAはNAAの減少と対称的に増加する傾向を示した。

Fig. 4. Relationship between the change of NAA and NA content and the growth of *Streptococcus* spp. in culture
Streptococcus sp., strain A: $\triangle$ --- $\triangle$, bacterial count; $\bigcirc$ --- $\bigcirc$, NAA; $\square$ --- $\square$, NA
Streptococcus sp., strain B: $\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$, bacterial count; $\bullet$ --- $\bullet$, NAA; $\blacksquare$ --- $\blacksquare$, NA

このように牛ひき肉及びウサギ肝臓に牛ひき肉洗浄液を加えて保存したときには、生菌数の増加とNAAの減少及びNAの増加との間に相関関係がみられた。無菌的にウサギ肝臓を保存したときにも肝臓中の脱アミド酵素による緩やかなNAAからNAへの変化を示すが、これに牛ひき肉由来の菌を添加するとNAAからNAへの変化の速度が速まり、さらに36時間後には試料中のNAAはほとんど完全にNAに変換された。本実験結果には再現性がみられ、繰り返した実験でもほぼ同様の結果が得られた。哺乳動物のNAAをNAに変換する脱アミド酵素の K_m 値は0.04~0.177 Mと非常に高い^{10)~12)}のに比較し、微生物の酵素では K_m 値は0.2~14 μM と非常に低い^{13)~15)}、微生物の酵素活性は非常に高いとされている¹⁶⁾。従って、本実験結果より保存中におけるNAAからNAへの変化には細菌が密接に関与していることが推察された。

2. 細菌叢の経時変化

牛ひき肉を25°で保存したときの優勢細菌叢についてみると、実験開始時のものは *Streptococcus* (60%) 及び *Pseudomonas* (31%) がほとんどを占め、24時間後には *Pseudomonas* (36%), *Streptococcus* (25%) 及び *Enterobacteriaceae* (25%), 48時間後には *Enterobacteriaceae* (65%) 及び *Pseudomonas* (22%) となり、保存時間の経過に従って主要菌叢が変化した。

3. 優勢菌叢由来菌株によるNAAからNAの生成

上記の優勢菌叢から分離した菌株をNAAを添加した普通ブイヨンに接種して培養したときの生菌数及びNAAからNA生成の経時変化を調べた。

1) *Streptococcus* について 実験開始時の優勢菌種である *Streptococcus* spp. 2株について行った実験結果をFig. 4に示した。菌株間に多少の差はみられるが、いずれの菌株においても生菌数は経時的に増加し、20時

Fig. 5. Relationship between the change of NAA and NA content and the growth of *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas sp., strain A: $\triangle$ — $\triangle$, bacterial count; $\circ$ — $\circ$, NAA; $\square$ — $\square$, NA
Pseudomonas sp., strain B: $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, bacterial count; $\bullet$ — $\bullet$, NAA; $\blacksquare$ — $\blacksquare$, NA

間後には 10^8 /ml と最大に達し、以後一定となった。NAA は生菌数が最大となったところから減少し始め、以後経時的に減少し 64 及び 80 時間後には検出されなくなった。一方、NA は NAA の減少と対称的に増加し、NAA の検出されなくなった 64 及び 80 時間後には最大となった。培養期間中の NAA と NA の合計値は常にほぼ一定の値を示したことから、NAA が *Streptococcus* spp. の増殖によって NA に変化されたことが推察される。

2) *Pseudomonas* について 24 時間後の優勢菌種である *Pseudomonas* spp. 2 株について検討した結果を Fig. 5 に示した。生菌数は経時的に増加し、24 時間後最大となり以後一定となった。しかし NAA 及び NA は培養期間中全く変化が認められなかった。従って *Pseudomonas* spp. には NAA から NA への脱アミド活性がないと推察される。

3) *Enterobacteriaceae* について *Enterobacteriaceae* のうち優勢に認められた *Enterobacter* spp. 2 株を実験に供した。Fig. 6 に示したように生菌数は経時的に増加し、20 時間で 10^9 /ml と最大値を示し以後一定の値を示した。NAA は *Streptococcus* spp. の場合と比べ緩やかに減少し、108 時間後においてもまだ残存が認められた。NA は NAA の減少に伴って増加した。各測定時における NAA と NA の合計値は常に一定であったことから *Streptococcus* spp. の場合と同様、*Enterobacter* spp. の場合も菌の増殖に従って NAA が NA に変化されたことが推察される。

Streptococcus spp. 及び *Enterobacter* spp. の NAA から NA への脱アミド活性を比較すると、*Streptococcus* spp. は *Enterobacter* spp. の生菌数 10^9 /ml より低い 10^8 /ml で一定の値となりながら、NAA から NA への変化は前者の場合の方が後者の場合よりも急激であった。従って *Streptococcus* spp. の方が *Enterobacter* spp.

Fig. 6. Relationship between the change of NAA and NA content and the growth of *Enterobacter* spp. in culture

Enterobacter sp., strain A: $\triangle$ — $\triangle$, bacterial count; $\circ$ — $\circ$, NAA; $\square$ — $\square$, NA
Enterobacter sp., strain B: $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, bacterial count; $\bullet$ — $\bullet$, NAA; $\blacksquare$ — $\blacksquare$, NA

に比べて NAA から NA への脱アミド活性が強いとみられる。

消化管内の細菌が NAA を脱アミドし NA を生成することが知られているが¹⁰⁾、本実験で使用した牛ひき肉は、その優勢細菌叢が限られたものであるため、今後、NA 生成に関与する菌の同定を含めて、今回分離した細菌以外の菌種の関与に関しても検討を加える必要があるものと考えられる。

要 約

1. 食肉中 NAA が保存中に NA へ変化する原因を究明するため、牛ひき肉、ウサギの無菌的摘出肝臓及びウサギ肝臓に牛ひき肉由来の細菌を加えたものについて保存試験を行った。その結果、生菌数の増加と NAA の減少及び NA の増加との間に相関関係がみられた。

生菌数が認められなかったウサギ肝臓においても、NAA から NA への変化がわずかに認められたが、これに牛ひき肉由来の細菌を添加すると NAA から NA への変化が急激となったことから、この現象には細菌が関与していることが推察された。

2. 牛ひき肉を保存したときの優勢細菌叢は実験開始時が *Streptococcus* spp. 及び *Pseudomonas* spp., 24 時間後が *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. 及び *Enterobacteriaceae*, 48 時間後が *Enterobacteriaceae* 及び *Pseudomonas* spp. であった。

3. 上記の優勢細菌について NAA から NA への活性を検討した結果、*Streptococcus* spp. には強い活性がみられ、*Enterobacter* spp. にも活性がみられたが *Streptococcus* spp. に比較して弱かった。一方、*Pseudomonas* spp. には NAA から NA への活性は認められなかった。以上のことから NA 生成には細菌に含まれる酵素の関与が考えられるため、その詳細なメカニズムについて酵素学的な検討を加える予定である。

本研究の要旨は日本食品衛生学会第57回学術講演会(1989年5月, 東京)において発表した。

文 献

- 1) 北田善三, 井上雅成, 玉瀬喜久男, 芋生真子, 蓮池秋一, 佐々木美智子: 栄養と食糧. **35**, 121~124 (1982).
- 2) 吉田宏三, 山本行隆, 藤原光雄: 食衛誌. **23**, 428~433 (1982).
- 3) 高槻圭悟, 鈴木 滋, 牛沢 勇, 堺 敬一: 宮城県保健環境センター年報 **2**, 89~92 (1984).
- 4) 吉田綾子, 尾花裕孝, 今井田雅志: 大阪府立公衛研所報. 食品衛生編 **15**, 29~32 (1984).
- 5) Takatsuki, K., Suzuki, S., Sato, M., Sakai, K., Ushizawa, I.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 698~702 (1987).
- 6) 大石充男, 大西和夫, 中村 弘, 坂井千三: 東京都立衛研年報 **35**, 252~255 (1984).
- 7) 大石充男, 天川映子, 荻原 勉, 田口信夫, 大西和夫, 西島基弘: 食衛誌. **29**, 32~37 (1988).
- 8) Vanderzant, C., Nickelson, R.: J. Milk and Food Tech. **32**, 357~361 (1969).
- 9) 渡辺忠雄, 諸岡信一, 橋本秀夫, 菊池武昭: “食品の汚染と安全性” p. 41~42 (1980), 講談社.
- 10) Su, S., Albizzati, L., Chaykin, S.: J. Biol. Chem. **244**, 2,956~2,965 (1969).
- 11) Petrack, B., Greengard, P., Creston, A., Sheppy, F.: *ibid.* **240**, 1,725~1,730 (1965).
- 12) 田口 寛, 近藤久二夫, 嶋林幸英, 岩井和夫: ビタミン **56**, 659~664 (1982).
- 13) Tanigawa, Y., Shimoyama, M., Dohi, K., Ueda, I.: J. Biol. Chem. **247**, 8,036~8,042 (1972).
- 14) Calibreath, D. F., Joshi, J. G.: *ibid.* **246**, 4,334~4,339 (1971).
- 15) Joshi, J. G., Handler, P.: *ibid.* **237**, 929~935 (1962).
- 16) 日本ビタミン学会編: “ビタミン学 II 水溶性ビタミン” p. 248~255 (1980), 化学同人, 東京.