

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580191

研究課題名(和文) 微高压炭酸ガス殺菌技術のメカニズムと適用性に関する基礎的・基盤的研究

研究課題名(英文) Studies on mechanisms and application of carbon dioxide petite high pressure pasteurization technology.

研究代表者

岩橋 均 (Iwahashi, Hitoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60356540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：微高压炭酸ガス殺菌技術は、高压ガス保安法の適用外の10気圧以下で、液状・半液状の食品を殺菌するための全く新しい技術である。梅干し、果汁、生酒、魚醤油、等への適用が開始され、製品が供給されつつある。しかしながら、当該技術の殺菌メカニズムや適用微生物種についての基礎的な研究は遅れている。そこで、酵母細胞を指標とした網羅的遺伝子発現(ゲノミクス)解析、メタボロミクス解析、および遺伝子破壊株等を用いた殺菌メカニズムの解明、酵母等微生物のタイプカルチャーを用いた殺菌効果のプロファイル作成を行い、微高压炭酸ガス殺菌技術の「メカニズム」「有効微生物プロファイル」の基盤情報を蓄積した。

研究成果の概要(英文)：Carbon dioxide petite high pressure pasteurization technology was applied to Umeboshi, fruit juice, non-pasteurized Sake, fermented fish sauce, and so on. These pasteurization can be carried out under less than 1 MPa, corresponding to upper range restricted by Japanese law. However, the mechanisms how microbes pasteurized or the ranges for applicable microbes are not yet well studied. Thus, this project aimed to study 1) genomics and metabolomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under carbon dioxide petite high pressure conditions and 2) pasteurization profiling of applicable microbes using microbial type culture collections. With these studies fundamental information concern to carbon dioxide petite high pressure pasteurization will be accumulated.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品製造・加工

### 1. 研究開始当初の背景

我々が口にする食品の多くは加熱処理技術による殺菌方法に依存している。加熱処理技術は確実に殺菌できる利点があるが、同時に食品特有の風味や栄養成分の劣化が引き起こされる。近年、非加熱殺菌法である高圧力技術の食品加工への応用が提唱された。高圧力技術による殺菌方法では食品の風味等の劣化が少ない。そのため、加熱殺菌では困難だった風味を保持したまま、食品を殺菌できる可能性をもつ。特に静水圧による食品加工技術は大きく進歩しているが、微生物の殺菌には数千気圧という非常に大きな圧力を必要としている。このため、その圧力に耐えうる強靱な圧力容器による初期投資コストが問題となっている。我々は、静水圧殺菌技術に加えて、様々な高圧ガスを圧力媒体としたガス圧殺菌技術に注目し、炭酸ガス圧を用いた殺菌方法の確立を目指している。炭酸ガス圧は 10~50 気圧という比較的穏やかな圧力で微生物の殺菌が期待できる。そのため、強靱な圧力容器が必要ではなく、また炭酸ガス自体も安価であるため、初期投資コストを抑えることが可能である。しかし、ガス圧の殺菌方法への応用は比較的新しい技術であり、研究が十分進んでいるとは言い難い。

### 2. 研究の目的

微高圧炭酸ガス殺菌技術は、比較的穏やかな圧力で微生物の殺菌が期待でき、高圧ガス保安法の適用外の 10 気圧以下で、液状・半液状の食品を殺菌（滅菌ではない）する事も可能である。梅干し、果汁、生酒、魚醬等への適用が開始され、製品が供給されつつある。しかしながら、当該技術の殺菌メカニズムや適用微生物種についての基礎的な研究は遅れている。そこで、(1)酵母細胞を指標とした網羅的遺伝子発現（ゲノミクス）解析、メタボロミクス解析、および遺伝子破壊株等を用いた殺菌メカニズムの解明、(2)酵母等微生物のタイプカルチャーを用いた殺菌効果のプロファイル作成を行い、微高圧炭酸ガス殺菌技術の「メカニズム」「有効微生物プロファイル」の基盤情報を蓄積する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)酵母細胞を指標とした網羅的解析

使用菌株は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C [MAT *SUC2 mal mel gal2 CUP1 [cir+]*] を網羅的解析並びに確認実験の指標株とした。培養は YPD 培地 (Bacto Peptone 20.0 g、Bacto Yeast Extract 10.0 g、Glucose 20.0 g、蒸留水を加えて 1 L とする。) を用いた。必要に応じて平板培地には Agar Powder 15.0 g を加えた。また、実験によっては、最少培地 (Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 6.7 g、Glucose 20.0 g に蒸留水を加えて 1 L とする) を用いた。酵母の微高圧炭酸ガス処理は、三

角フラスコに酵母培養液を加えて、高圧容器内に静置し、炭酸ガスボンベから高圧容器内に炭酸ガスを充当することで行った。すなわち、三角フラスコ中の YPD 培地 30 mL に、前培養液を 1% 植菌し、4 h、25 °C、130 rpm の条件で振盪培養後、三角フラスコを高圧容器に入れ、1-2 h、25 °C、0.5 MPa の条件で微高圧炭酸ガス処理を施した。これらのサンプルを処理群とした。1-2 h、25 °C、大気圧条件下に静置したものを未処理群とした。遺伝子発現解析を目的とした RNA の抽出には、Fast RNA Pro Red Kit (MP Biomedicals, CA, USA) によって抽出して、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。菌体は、それぞれの圧力条件の三角フラスコから培養液 1 mL を 1.5 mL マイクロチューブにとり、12,000 rpm、4 °C、1 min の条件で遠心分離をし、アスピレーターで上清を取り除き、-80 °C で急速に凍結し保存した。メタボローム解析における、酵母菌体の回収は、濾過法を用いた。すなわち、微高圧炭酸ガス処理群または未処理群の酵母培養液をピペットで 20 mL 取り吸引濾過、フィルター上で、10 mL の蒸留水で 2 回洗浄した。メタボライト抽出用メタノール 2 mL を入れた密閉シャーレに、取り外したフィルターを、菌体付着面を下にして浸漬させた。回収したメタノール溶液は -80 °C で保存した。メタボローム解析は Human Metabolome Technologies に委託した。酵母からのグルタミン酸の抽出は、OD600=0.5 程度になるまで振盪培養した菌体を、蒸留水で 2 回遠心洗浄後、メタボローム解析と同じ方法で行った。グルタミン酸の定量は、ヤマサ L-グルタミン酸測定キットを用いて行った。タンパク量当りに標準化するための、タンパク質定量は、DC プロテインアッセイを用いて行った。

#### (2)酵母等微生物を用いた殺菌効果のプロファイル作成

炭酸ガス圧による酵母 9 種およびバクテリア 11 種の定常期細胞の殺菌を試みた。炭酸ガス圧は、10~50 気圧、25 °C、24 時間の条件で処理した。微生物に対する炭酸ガス圧の殺菌効果は、コロニーカウント法により評価した。酵母は YPD 培地、バクテリアには LB 培地 (Difco TM LB Broth Miller 25.0 g、蒸留水を加えて 1 L とする。) を用いた。必要に応じて平板培地には 8.0 g の Agar Powder を加えた。

### 4. 研究成果

#### (1)酵母細胞を指標とした網羅的解析

ゲノミクスによる遺伝子発現解析では、5 気圧炭酸ガス処理により誘導された遺伝子は、2 倍誘導で 507 遺伝子、4 倍誘導で、67 遺伝子であった。これらを機能解析したところ、2 倍誘導では、アルギニン代謝、尿素サイクル等の代謝系、鉄イオンの輸送、イオンの輸送など細胞膜トランスポーター系、熱シ

ショック応答によるストレス応答系、熱感作反応、グルタチオン関連、過酸化反応などの解毒系、等の機能群が顕著に誘導されていた。4倍誘導では、上記の内、尿素サイクル、イオンの輸送系が残り、これら機能が顕著に誘導されている可能性を示していた。2倍誘導遺伝子産物の細胞内局在を解析したところ、液胞、細胞膜、に局在する遺伝子産物をコードする遺伝子の誘導が顕著であった。特に液胞に局在する因子をコードする遺伝子の誘導が顕著であった。誘導された遺伝子のリストを解析すると、上位に位置する遺伝子のほとんどが、細胞膜に局在する鉄イオン輸送に関与する遺伝子であった。また、界面活性剤などのように細胞膜に影響を与えると誘導される遺伝子マーカーとして知られる、*INO1*と*OPI3*の誘導が顕著であった。以上を総合すると、液胞、を構成する細胞膜に、大きな影響を与えていることが推定される。

続いて、メタボローム解析を行った。解析の結果、微高圧炭酸ガス処理により、いくつかの化合物の増減において有意 ( $p < 0.05$ ) な変動が認められた。有意に蓄積した物質は、表1に示すようにGABAや尿素などであった。一方、有意に減少した物質は、チロシンやUTP、グルタミン酸などであった。そこで、培養液上清の遡出したグルタミン酸濃度の測定を行った。グルタミン酸は検出定量が容易で、グルタミン酸輸送体の細胞膜依存性は広く知られているからである。しかしながら、YPD培地を用いた微高圧炭酸ガス処理と未処理での差を見出すことは困難であった。これは、元々のグルタミン酸の濃度が600 mg/L以上と多過ぎるためである。微高圧炭酸ガス処理によって細胞外にグルタミン酸が漏出しているかを判断することは難しい。このため、最少培地における同様の実験を行った。しかしながら、高圧炭酸ガス処理および未処理において、培養液上清からグルタミン酸を検出することはできなかった。

Compound name	Comparative Analysis			
	ガス圧1 h比較群 vs ガス圧1 hコントロール群		ガス圧2 h比較群 vs ガス圧2 hコントロール群	
	Ratio	p-value (Paired)	Ratio	p-value (Paired)
GABA	2.5	0.116	3.1	0.044 *
2-インソプロビルリノ酸	3.3	0.075	2.9	0.003 **
ピペコリン酸	1.7	0.075	2.8	0.021 *
スベルミン	2.3	0.087	2.4	0.015 *
コリン	3.7	0.092	2.4	0.037 *
アデニン	1.7	0.072	2.3	0.018 *
尿素	3.2	0.004 **	2.0	0.247
5-メチルチオアデニン	1.7	0.005 **	1.9	0.005 **
4-メチル-2-オキソ吉草酸	1.2	0.715	1.5	0.015 *
3-メチル-2-オキソ吉草酸	1.2	0.715	1.5	0.015 *
ピリドキサミン5リン酸	1.4	0.030 *	1.5	0.137
5-アデノシルメチオニン	1.0	0.862	1.5	0.041 *
アラニン	1.7	0.060	1.4	0.007 **
ホモセリン	1.9	8.8E-04 ***	1.3	0.241
グリシン	1.4	0.034 *	1.1	0.068

表1 蓄積した代謝物質

以上の結果は、微高圧炭酸ガス処理によってグルタミン酸が培地中に漏出していないことを示唆している。そこで、酵母細胞内でグルタミン酸量が減少したのは、細胞外に出ているのではなく、外から取り込めなくなっている可能性が考えられた。

Compound name	Comparative Analysis			
	ガス圧1 h比較群 vs ガス圧1 hコントロール群		ガス圧2 h比較群 vs ガス圧2 hコントロール群	
	Ratio	p-value (Paired)	Ratio	p-value (Paired)
5-メチルアデニン	0.5	0.119	0.13	0.006 **
βアラニンリジン	0.4	0.115	0.14	0.006 **
パントチン酸	0.8	0.449	0.2	0.011 *
チロシン	0.7	0.337	0.2	0.001 **
ウリジン	0.6	0.248	0.2	0.010 **
UTP	0.3	0.024 *	0.2	0.009 **
UDP-N-アセチルグルタミン	0.3	0.035 *	0.2	2.0E-04 ***
UMP	0.4	0.036 *	0.2	0.051
N-アセチルグルタミン酸	0.5	0.148	0.2	0.027 *
dCDP	0.4	0.057	0.3	0.039 *
CDP-コリン	0.3	0.014 *	0.3	0.006 **
グルタチオン(GSH)	0.5	0.084	0.3	0.035 *
N-アセチルオルニチン	0.6	0.381	0.4	0.007 **
リンゴ酸	0.4	0.017 *	0.4	0.124
グルタミン酸	0.7	0.039 *	0.4	0.002 **
ヒスチジン	0.8	0.137	0.4	0.017 *
CDP	0.6	0.110	0.4	0.015 *
UDP-グルコース	0.6	0.115	0.5	0.003 **
UDP-ガラクトース	0.6	0.115	0.5	0.003 **
CIP	0.5	0.022 *	0.5	0.143
ADP	0.4	0.162	0.5	4.8E-04 ***
S-ラクトイルグルタチオン	0.8	0.072	0.5	0.019 *
S-アチルホモセリン	0.5	0.055	0.5	0.012 *
チアミン	0.5	0.043 *	0.5	0.003 **

表2 減少した代謝物質

次に、微高圧炭酸ガス処理をした酵母細胞内のグルタミン酸量を定量することで、どの程度取り込みが阻害されているかを実験することとした。酵母は、アミノ酸が多量に存在するYPD培地中において、アミノ酸輸送体関連遺伝子の発現を誘導し、グルタミン酸を培地から取り込んでいることが考えられる。しかし、グルタミン酸をはじめとするアミノ酸が含まれていない最少培地中においては、酵母細胞内で生合成しているはずである。両培地において微高圧炭酸ガス処理による細胞内グルタミン酸量に違いがあるかを調べるために、酵母細胞から抽出したグルタミン酸量を定量した。酵母細胞から抽出したグルタミン酸量と抽出液に含まれるタンパク質量から、単位タンパク質あたりのグルタミン酸量を算出し、未処理サンプルに対する処理サンプルのグルタミン酸蓄積率を評価した。その結果、YPD培地中の酵母細胞は最少培地中の酵母細胞と比較して、細胞内グルタミン酸量の蓄積率が有意に低くなった。このことは、グルタミン酸を生合成している最少培地では、生合成により、不足するグルタミン酸を供給できるのに対して、YPD培地では、グルタミン酸の取り込みができなくなり、不足したものであると考察した。以上の結果は、ゲノミクス解析で明らかとなった、微高圧炭酸ガスの細胞膜に対する影響を指示する結果であった。しかしながら、細胞内でグルタミン酸が大量に消費されている可能性は否定できない。今後の課題である。また、グルタミン酸の不足による細胞増殖の阻害については説明が付くが、死滅する理由にはならない。今後の検討課題であると言える。

(2) 酵母等微生物を用いた殺菌効果のプロファイル作成

適用微生物種プロファイリングの作成に関する研究では、20種類の微生物種について、殺菌効果を評価することができた。図1, 2, に50気圧下における殺菌例を示した。11種のバクテリアに関しては、菌株ごとに殺菌効果が著しく異なり、グラム陰性菌7種のうち5種、グラム陽性菌では4種中2種で有意な差が出た。グラム陽性菌と比較して、グラム陰性菌の方が炭酸ガス圧に対して、より感受性が高いことが報告されているが、本研究では有意な差は認められなかった。また、同属の微生物であっても種が異なると殺菌効果に違いが認められた。一方、9種の酵母株に対しては全てに強い殺菌効果を示した。以上の結果より、真核生物の方がバクテリアに比べガス圧に対して感受性が高いことが示唆された。

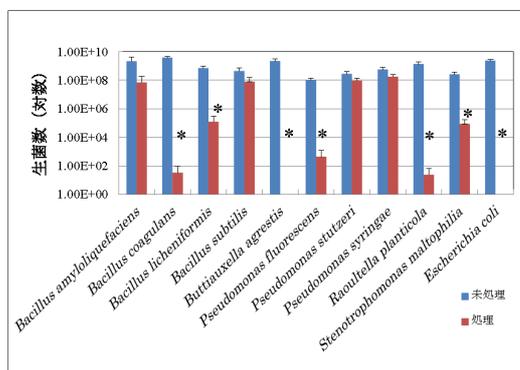


図1 バクテリア類に対する殺菌例

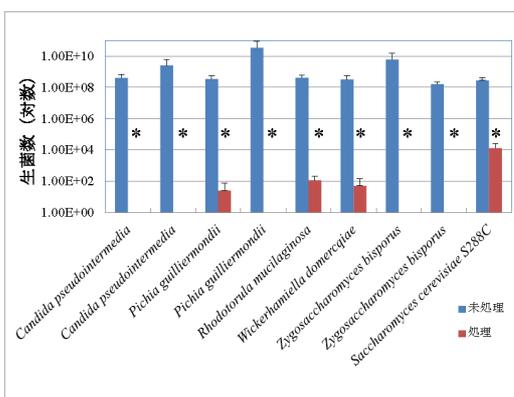


図2 酵母類に対する殺菌例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Nomura, K., Iwahashi, H., Pressure regulated fermentation: A revolutionary approach that utilizes hydrostatic pressure *Reviews in Agricultural Science*, 2, 1-10, 2014  
 Ge, Y., Wang, D.Z. Chiu, J.F., Cristobal, S., Sheehan, D., Silvestre,

F., Peng, X., Li, H., Gong, Z., Lam S.H., Wentao, H., Iwahashi, H., Liu, J., Mei, N., Shi, L., Bruno, M., Foth, H., Teichman, K., *Environmental OMICS: Current Status and Future Directions*. *J. Int. OMICS*, 141, 75-87, 2013  
 Ohshima, S., Nomura, K., Iwahashi, H., Clarification of the recovery mechanism of *Escherichia coli* after hydrostatic pressure treatment. *High Pressure Research*, 33:2, 308-314, 2013

野村 一樹, 岩橋 均 高圧力条件下における酵母細胞の死 高圧力の科学と技術 23:53-58, 2013

〔学会発表〕(計6件)

貝沼 瑞生, 牛 力源, 野村 一樹, 岩橋 均, 松岡 寛之, 河内 哲史, 鈴木 良尚, 田村 勝弘, 3A12p07 酵母を指標とした微高压炭酸ガスストレス応答の解析, 2014 年度農芸化学会大会, 東京, 日本 (2014/3/27-30).

K. Hachisuka, K. Nomura, S. Waki and H. Iwahashi, The development of liquid feeding with petit-high pressure carbon dioxide gas. HPBB2012 p. 129. Shiga, Japan (2012/10/29-11/2)

L. Niu, K. Nomura, H. Iwahashi, K. Obuchi, M. Kawamura, A. Kobayashi, A. Yamasaki, Y. Batori, Y. Kasai, H. Urakami, Proposal of preparation protocols for indicator microorganisms aimed to standardizing high-pressure processing technology. HPBB2012 p. 132. Shiga, Japan (2012/10/29-11/2)

S. Ohshima, K. Nomura, and H. Iwahashi, Clarification of the recovery mechanism after hydrostatic pressure treatment in *Escherichia coli*. HPBB2012 p. 134. Shiga, Japan (2012/10/29-11/2)

S. Waki, Y. Hachisuka, K. Nomura, H. Iwahashi, H. Matsuoka, S. Kawachi, Y. Suzuki, K. Tamura, The effect of carbon dioxide to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. HPBB2012 p. 139. Shiga, Japan (2012/10/29-11/2)

H. Iwahashi (2012). Biological reason why yeast is restored from temporal death after sub-lethal high pressure treatment- Primary damage -. HPBB2012 p. 136. Shiga, Japan (2012/10/29-11/2)

〔図書〕(計1件)

野村 一樹, 大島 秀斗, 蜂須賀 勝彦, 水野 陽太, 牛 力源, 岩橋 均 進化する食品高压加工技術 酵母への高圧力の

影響 致死以上の圧力レベルを中心に  
酵母への高圧力の影響 pp96-97, 2013

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.abios.gifu-u.ac.jp/h1884/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

岩橋 均 (Hitoshi Iwahashi)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：60356540

### (2)連携研究者

楠部 真崇 (Masataka Kusube)  
和歌山工業高等専門学校・物質工学科・准  
教授  
研究者番号：4040376