

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 3 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450182

研究課題名(和文)低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブルの微生物細胞への作用メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of action mechanism to microbial cells by low pressure carbon dioxide microbubbles

研究代表者

小林 史幸 (Kobayashi, FumiYuki)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師

研究者番号：50460001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル(MNBCO₂)による*Saccharomyces pastorianus*の殺菌における細胞内酸性化および細胞膜への影響を検討するため、様々な条件でMNBCO₂処理した*S. pastorianus*の細胞内pH、細胞膜損傷・流動性および貯蔵性を測定した。その結果、MNBCO₂は*S. pastorianus*細胞に対して45℃以上の温度で強い影響を与えることが認められた。さらに、MNBCO₂による*S. pastorianus*の殺菌には主に細胞膜への影響が関与しているが、細胞内酸性化とは直接関係がないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of intracellular acidification and on cellular membrane in the inactivation of *Saccharomyces pastorianus* by low pressure carbon dioxide micro-nano bubbles (MNBCO₂), intracellular pH, damage and fluidity of cellular membrane, and storage behavior of *S. pastorianus* treated by MNBCO₂ at different conditions were examined. In consequence, it was recognized that MNBCO₂ at temperature more than 45℃ had a strong effect on *S. pastorianus* cells. In addition, inactivation of *S. pastorianus* by MNBCO₂ was responsible primarily for the damage to cellular membrane, although bear no immediate relationship to intracellular acidification.

研究分野：食品科学

キーワード：マイクロ・ナノバブル 加圧二酸化炭素 殺菌 酵母 pH 細胞膜

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超臨界二酸化炭素(CO₂)を含む加圧CO₂による食品殺菌に関する研究は60年以上前から国内外の多くの研究者によって行われてきたが、実用化には至っていない。その理由の一つとして、加圧CO₂の殺菌機構が明確になっていないことが挙げられる。その殺菌機構としては、加圧CO₂による微生物細胞の物理的破壊もしくは生理的变化であると仮説されている。近年、我々は低加圧CO₂マイクロ・ナノバブル(MNBCO₂)を考案し、MNBCO₂による*Saccharomyces pastorianus*細胞の損傷、細胞からのDNAおよびタンパク質の漏出や細胞内代謝酵素の失活を明らかにしたが、MNBCO₂がどのように微生物細胞へ影響を与えているかはわかっていない。

2. 研究の目的

MNBCO₂による*S. pastorianus*の細胞膜変化および細胞内酸性化ならびにMNBCO₂処理した*S. pastorianus*の貯蔵性について検討した。

3. 研究の方法

(1)MNBCO₂による*S. pastorianus*の細胞膜損傷および細胞内酸性化

試料調整

*S. pastorianus*を5%エタノールを含む生理食塩水に懸濁した(1.0×10⁶ CFU/mL)。

MNBCO₂処理

MNBCO₂処理は図1に示す装置を使用し、表1の処理条件で行った。

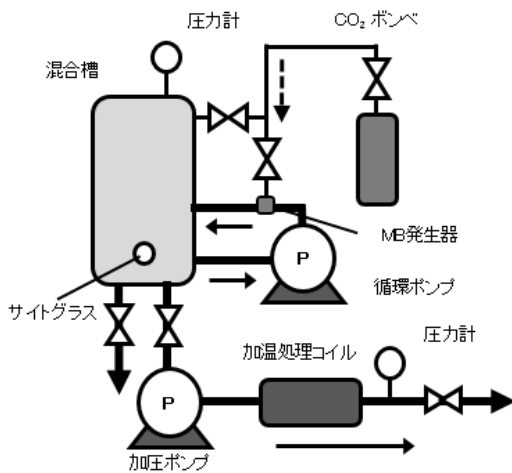


図1 MNBCO₂処理装置の概略図

表1 MNBCO₂処理条件

	温度 ()	圧力 (MPa)	時間 (min)
混合槽	10	0-1.0	5
加温処理槽	35-45	2.0	0-3

殺菌効果の評価

YM寒天培地を用いて25℃で48h培養後に形成されるコロニー数を測定した。

細胞膜損傷の測定

Propidium iodide (PI)を用いた蛍光分析により行った。

細胞内pHの測定

5-(and-6)-Carboxy-2'7'-dichlorofluorescein diacetate succinimidyl esterを用いた蛍光分析により行った。

(2)MNBCO₂による*S. pastorianus*の殺菌における細胞内外のpHの影響

試料調整

*S. pastorianus*をMcIlvaine緩衝液(pH3、4および5)に懸濁した(1.0×10⁶ CFU/mL)。

MNBCO₂処理

MNBCO₂処理は図1の装置を使用し、表2の処理条件で行った。

表2 MNBCO₂処理条件

	温度 ()	圧力 (MPa)	時間 (min)
混合槽	10	0-1.0	5
加温処理コイル	35-45	2.0	0-3

殺菌効果の評価

(1)のと同様の方法で行った。

細胞内pHの測定

(1)のと同様の方法で行った。

(3)MNBCO₂による*S. pastorianus*の細胞膜流動性の変化

生存*S. pastorianus*数の測定

(1)のと同様の方法で行った。

MNBCO₂処理

MNBCO₂処理は図1の装置を使用し、表3の処理条件で行った。

表3 MNBCO₂処理条件

	温度 ()	圧力 (MPa)	時間 (min)
混合槽	10	2.0	5
加温処理コイル	27-37	4.0	1

細胞膜流動性の測定

1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)を用いた蛍光分析により行った。

Alkaline phosphatase (AP)活性の測定

p-Nitrophenyl phosphateを基質としてAP活性を測定した。

(4)MNBCO₂処理した*S. pastorianus*の貯蔵性

試料調整

(1)のと同様の方法で行った。

MNBCO₂処理

MNBCO₂処理は図1の装置を使用し、表4の処理条件で行った(MNB35、40、45、50)。

表4 MNBCO₂処理条件

	温度 ()	圧力 (MPa)	時間 (min)
混合槽	10	2.0	5
加温処理コイル	35-50	4.0	1

加熱処理

比較のための加熱処理は、図1の装置の加熱処理槽のみを使用して80℃で1分間行った(H80)。

貯蔵試験

S. pastorianus 懸濁液を5℃および25℃で3週間貯蔵し、1週間おきに生存 *S. pastorianus* 数を測定した。

生存 *S. pastorianus* 数の測定

(1)のと同様の方法で行った。

4. 研究成果

(1) MNBCO₂による *S. pastorianus* の細胞膜損傷および細胞内酸性化

混合槽の圧力0および0.5 MPaでは、40℃の加熱処理コイルにおいて生存 *S. pastorianus* 数の減少はほとんどなく、PI 吸収率は処理前の約1.2倍程度増加し、細胞内pHは加熱処理コイル内の滞留時間1分で5.8から4.9まで低下し、5分後までほとんど変わらなかった(図2)。しかしながら、混合槽

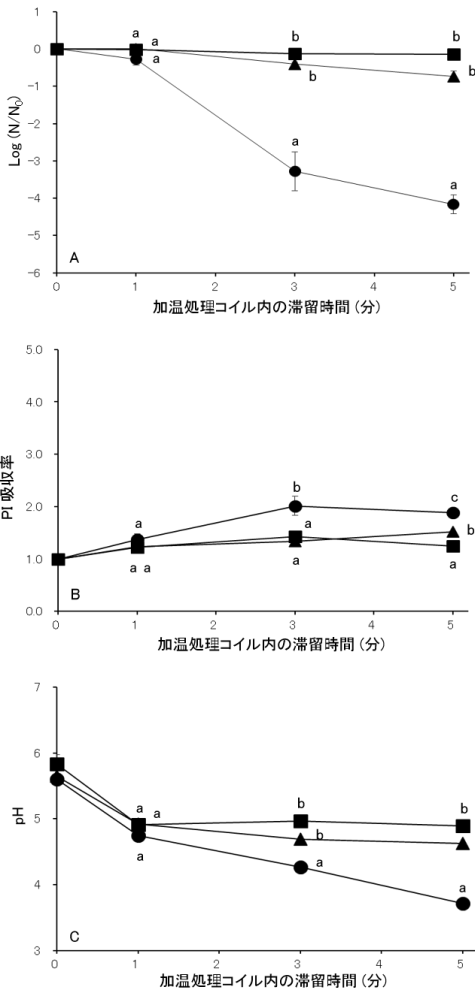


図2 MNBCO₂の混合槽の圧力が *S. pastorianus* の生存数(A)、PI 吸収率(B)および細胞内pH(C)に及ぼす影響

MNBCO₂ 処理条件

混合槽：温度 10℃、圧力 0 ()、0.5 () および 1.0 MPa ()

加熱処理コイル：温度 40℃、圧力 2.0 MPa

の圧力 1 MPa では、40℃の加熱処理コイルにおいて生存 *S. pastorianus* 数は加熱処理コイル内の滞留時間 5 分後に約 4 log 減少し、PI 吸収率は処理前の約 2.3 倍増加し、細胞内 pH は滞留時間に伴い直線的に低下し、5 分後に 3.7 となった(図 3)。加えて、加熱処理コイルにより温度を 45℃以上上げることで MNBCO₂ の *S. pastorianus* に対する殺菌効果および PI 吸収率の上昇ならびに細胞内 pH の低下が急激に生じた(図 3)。よって、MNBCO₂ の *S. pastorianus* に対する殺菌効果は細胞内 pH の低下および PI 吸収率の増加と関連していることおよびその効果が 45℃以上で急激に生じることが認められた。

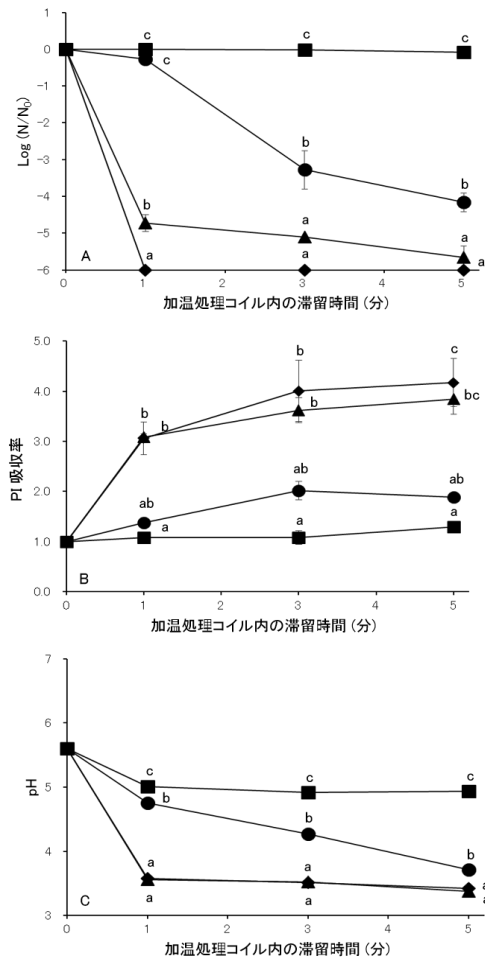


図3 MNBCO₂の加熱処理コイルの温度が *S. pastorianus* の生存数(A)、PI 吸収率(B)および細胞内pH(C)に及ぼす影響

MNBCO₂ 処理条件

混合槽：温度 10℃、圧力 1.0 MPa

加熱処理コイル：温度 35 ()、40 ()、45 () および 50 ()、圧力 2.0 MPa

(2) MNBCO₂による *S. pastorianus* の殺菌における細胞内外の pH の影響

MNBCO₂の *S. pastorianus* に対する殺菌効果は McIlvaine 緩衝液の pH 低下に伴い高くなったが、MNBCO₂ なしではほとんど生存 *S. pastorianus* 数は減少しなかった。pH 3 の McIlvaine 緩衝液に懸濁した *S. pastorianus*

の細胞内 pH (pH_{in}) は、MNBCO₂ の有無に関わらず 45 に温度上昇させることで約 3.5 まで低下した。しかしながら、MNBCO₂ は pH 4 および 5 の McIlvaine 緩衝液に懸濁した *S. pastorianus* に対して殺菌効果を発揮したものの、*S. pastorianus* の pH_{in} を全く減少させなかった (図 4)。よって、MNBCO₂ の *S. pastorianus* に対する殺菌効果と細胞内酸性化に相関性は認められなかった。

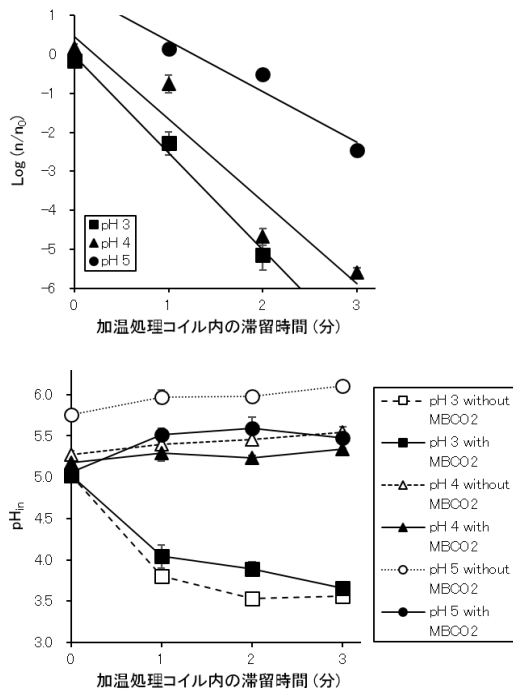


図 4 MNBCO₂ による McIlvaine 緩衝液に懸濁した *S. pastorianus* の殺菌 (上) および細胞内 pH の変化 (下)

MNBCO₂ 処理条件

混合槽：温度 10 、 圧力 1.0 MPa

加温処理コイル温度 45 、 圧力 2.0 MPa

(3) MNBCO₂ による *S. pastorianus* の細胞膜流動性の変化

MNBCO₂ (処理時間 1 分) による生存 *S. pastorianus* 数の減少は 33 から生じ、35 および 37 で -5 log 以下まで減少した (図 5-A)。MNBCO₂ 処理した *S. pastorianus* からの DPH の放出率は 31 から温度上昇に伴い増加した (図 5-B)。MNBCO₂ 処理した *S. pastorianus* の AP 活性は 29 から温度上昇に伴い徐々に高くなり、31 で最も高くなったが、33 以降で低下した (図 5-C)。よって、MNBCO₂ による *S. pastorianus* の殺菌は、殺菌効果が得られる前に細胞膜流動性の変化を引き起こしていることが示唆された。

(4) MNBCO₂ 処理した *S. pastorianus* の貯蔵性

MNBCO₂ 処理により、MNB40、MNB45 および MNB50 ならびに H80 の生存 *S. pastorianus* 数は検出不可能となり、MNB35 の生存 *S. pastorianus* 数は 2 log 減少した。5 での貯蔵中、MNB35 の生存 *S. pastorianus* 数は貯蔵 1 週目に約 2 log 減少し、MNB40、MNB45、MNB50

および H80 の生存 *S. pastorianus* 数は貯蔵期間中、検出不可能のままであった。一方、25 での貯蔵中、MNB35 および MNB40 の生存 *S. pastorianus* 数は貯蔵 3 週目までに NT と同じ程度まで上昇したが、MNB45、MNB50 および H80 の生存 *S. pastorianus* 数は 5 での貯蔵と同様に検出不可能のままであった (表 5)。よって、MNBCO₂ 処理した *S. pastorianus* 懸濁液の常温域での貯蔵性を高めるためには 45 以上の温度で MNBCO₂ 処理する必要があることが認められた。

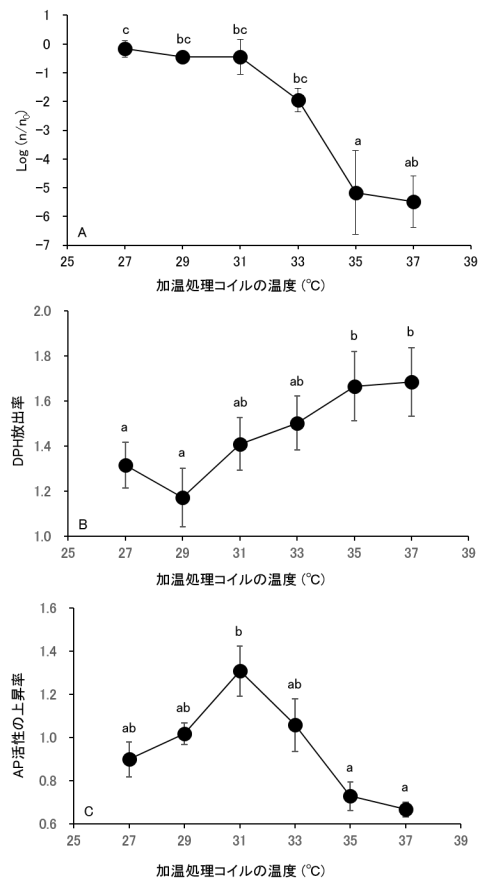


図 5 MNBCO₂ 処理した *S. pastorianus* の生菌数 (A)、細胞膜流動性 (B) および AP 活性 (C) の変化

表 5 MNBCO₂ 処理した *S. pastorianus* の貯蔵試験 (上表：貯蔵温度 25 、 下表：貯蔵温度 5)

	貯蔵期間 (週)			
	0	1	2	3
NT	6.08 ^z	6.10	6.42	6.49
MNB	6.08	3.81	5.52	5.50
MNB35	4.08	4.84	5.04	5.81
MNB40	n.d.	3.39	4.74	5.68
MNB45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MNB50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

	貯蔵期間 (週)			
	0	1	2	3
NT	6.08 ^z	6.08	5.93	5.97
MNB	6.08	5.92	5.66	5.50
MNB35	4.08	1.90	1.57	1.58
MNB40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MNB45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MNB50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

NT：未処理、MNB：混合槽のみでの MNBCO₂ 処理、MNB35-MNB50：加温処理コイルの温度 35-50 での MNBCO₂ 処理、H80：80 での加熱処理：^z生存 *S. pastorianus* 数の対数値、n.d.：検出不可能。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけ・インパクトおよび今後の展望

本研究により、MNBCO₂ による *S. pastorianus* の殺菌には、主に細胞膜への影響が関与しているが、これまでに加圧 CO₂ の殺菌メカニズムの1つとして考えられてきた細胞内酸性化とは直接関係がないことが示唆された。今後は、MNBCO₂ がどのように微生物細胞膜に影響を与えているかを調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Fumiyuki Kobayashi, Masaki Sugiura, Hiromi Ikeura, Michio Sato, Sachiko Odake and Masahiko Tamaki. Comparison of a two-stage system with low pressure carbon dioxide microbubbles and heat treatment on the inactivation of *Saccharomyces pastorianus* cells. Food Control, 46, 35-40, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.04.034

〔学会発表〕(計1件)

小林史幸、小竹佐知子。低加圧二酸化炭素マイクロバブルによる *Saccharomyces pastorianus* の殺菌における細胞内酸性化および細胞膜損傷の影響。日本農芸化学会関東支部大会 2015年9月26日 お茶の水女子大学(東京都文京区)

〔図書〕(計1件)

小林史幸(共著)。株式会社情報機構。マイクロバブル(ファインバブル・ウルトラファインバブル)のメカニズム・特性制御と実際応用のポイント。2015. 309-315.

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：処理方法および処理装置

発明者：早田保義、小林史幸

権利者：学校法人日本医科大学

種類：特許

番号：第 5716258 号

取得年月日：平成 27 年 3 月 27 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林史幸 (KOBAYASHI FUMIYUKI)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部食

品科学科・講師

研究者番号：50460001