

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06574

研究課題名(和文) 麹菌の高電圧パルス電界による増殖促進効果と食品関連プロセス設計

研究課題名(英文) Growth enhancement effect and food process design by high-voltage pulsed electric field with *Aspergillus* SP

研究代表者

大嶋 孝之 (Ohshima, Takayuki)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：30251119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：この研究で、我々はパルス電界(PEF)刺激によって*Aspergillus niger*の生物学的な機能変化を調査した。特に増殖とクエン酸発酵のプロフィールを評価した。すべてのPEFによって処理された*A. niger*はサイズと細胞重量で顕著な増加を示した。これらの増加はクエン酸発酵の中でグルコース消費量とクエン酸生産量のプロフィールを変えていた。PEF処理、未処理の*A. niger*の発酵中で最大のクエン酸集中に到達する培養期間はそれぞれ、16と29日だった。PEF処理、未処理の*A. niger*発酵におけるクエン酸生産速度はそれぞれ1.67、0.96 g/L/dayだった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the induction of the biological function of *Aspergillus niger* by pulsed electric field (PEF) stimulation. In particular, the profiles of growth and citric acid fermentation were focused on. All PEF-treated *A. niger* cultures showed significant increases in mycelial clump size and dry cell weight. These increases changed the profiles of glucose consumption and citric acid production in citric acid fermentation. Combining PEF stimulation with fed-batch citric acid fermentation increases citric acid productivity. The fermentation times to reach the maximum citric acid concentration in the fermentation of PEF-treated and non-PEF-treated *A. niger* were 16 and 29 days, respectively. Moreover, the volumetric citric acid production rates in the fermentation of PEF-treated and non-PEF-treated *A. niger* were 1.67 and 0.96 g l⁻¹ day⁻¹, respectively.

研究分野：生物化学工学

キーワード：高電圧パルス 麹菌 増殖 クエン酸 グルコース

1. 研究開始当初の背景

高電圧パルス電界(High Voltage Pulsed Electric Field; HV-PEF)処理による微生物の殺菌は、薬剤の残留の懸念がない物理的処理であり、処理条件を制御することで発熱量を抑えた操作が可能であることから液体食品の非加熱殺菌技術として注目されている。これまでに多くの研究者により野菜・フルーツジュース、牛乳、アルコール飲料など様々な性状を有する液体食品を対象としたHV-PEF 殺菌試験が報告されている。また、*Escherichia coli*、*Listeria monocytogenes*、*Bacillus cereus*、*Staphylococcus aureus*、*Lactobacillus brevis*、*Saccharomyces cerevisiae* などといった広範囲の病原性または非病原性の微生物に対して HV-PEF 殺菌が有効であることが報告されている。HV-PEF 殺菌のメカニズムは、電気穿孔により微生物細胞膜に生じた孔が不可逆的な細胞膜破壊に達し、膜の透過性が上がることで細胞内外の物質移動が促進され、細胞内成分の流出と細胞外成分の流入が起こることによるものであると考えられている。このメカニズムを用いて、植物やキノコの細胞からの生体由来有用物質の抽出効率を向上させる手法としてもHV-PEF は用いられている。

近年、こういった食品分野への応用研究に加え、バイオテクノロジー分野においてHV-PEF が生体機能の発現を誘導する刺激となることが報告され始めている。EologeらはHV-PEF を印加することにより酵母 *S. cerevisiae* の細胞分裂速度が向上し、0.85 kV/cm の電界強度において最もその効果が高かったと報告している。我々は以前に電界強度 2.5 または 5 kV/cm の弱いHV-PEF を酵母 *S. cerevisiae* に印加し、幾つかの遺伝子発現の変化を転写レベルで調査したところ、酸化ストレス応答遺伝子の発現が誘導されることを確認している。また、Mattar らは発酵前に酵母 *S. cerevisiae* に電界強度 6 kV/cm のHV-PEF による電氣的刺激を行うことで、グルコース・フルクトース・スクロースの混合糖からなる発酵原料の消費挙動が改善されると報告している。これらの研究では、生体応答の解明研究に用いられる最も簡易なモデル細胞であり、産業的にも有用なアルコール発酵微生物である酵母 *S. cerevisiae* に着目し研究が行われている。他の有用微生物においてもHV-PEF がなんらかの生体機能を誘導することが考えられ、学術的・産業的に有用な知見が得られることが期待される。

本研究では、産業的に有用な微生物の一つである黒麹 *Aspergillus niger* に対しHV-PEF による刺激が及ぼす影響を調査した。黒麹 *A. niger* は複数の加水分解酵素の強力な生産宿主として遺伝子組換えの有無を問わず用いられており、国内では焼酎や泡盛製造における糖化工程に用いられている。また黒麹 *A. niger* の最たる特徴はそのクエン酸

発酵能力であり、全世界で年間に生産されるクエン酸の大半が黒麹 *A. niger* によるクエン酸発酵により生産されている。有用物質の生産宿主として微生物を考えた場合、微生物の増殖能は高い生産効率を得る上で重要である。

2. 研究の目的

麹菌は、醤油、味噌、日本酒や焼酎といった日本古来の発酵・醸造食品の製造に用いられる微生物である。また黒麹カビ (*Aspergillus niger*) は、泡盛の醸造だけでなく、クエン酸を発酵によって生成する。世界で年間150万トン(2010年)生産されるクエン酸は、ほぼ黒麹カビのクエン酸の工業発酵法により生産されている。

麹菌と同じ菌類の研究として、シイタケの菌床に高電圧を与えることで、菌糸が切れるなどの刺激を受けて生育が活性化し、収穫量が倍近く増加したという報告がされている。また当研究室では PEF (Pulsed Electric Field) を用いた研究をしており、シイタケと同じ糸状菌に属する黒麹カビに PEF 印加を行なうことで、菌体増殖やクエン酸生成の活性化ができるのではないかと考えた。本研究では PEF を用いた電界効果によって、黒麹カビの増殖とクエン酸生成の促進を試みた。

3. 研究の方法

3.1 培養方法および PEF 印加方法

本研究では *Aspergillus niger* ATCC9142 を使用した。100 mL 三角フラスコを培養槽として用い、液体培地 50 mL に菌体濃度 105 CFU/mL の孢子溶液を 100 μ L 添加し、30、180 rpm で振とう培養した。植菌から 8 時間後、*A. niger* の孢子から菌糸が発芽していることを肉眼で確認した後、液体培地内に針電極 (Fig. 1) を差し込み、攪拌子で培地をかき混ぜつつ PEF 印加 (印加電圧: 10 kV、電極間距離: 10 mm、処理時間: 1 min、周波数: 50 Hz) を行なった。印加後は再び振とう培養し、液体培地内の炭素源のグルコースが全て消費されるまで培養を続けた。この操作を行なったものを PEF と呼称し、植菌から培養終了時まで振とう培養のみを行なったものを Control と呼称する。

3.2 流加培養

培地の初期グルコース濃度を 35 g/L に設定し、*A. niger* によりグルコースが消費されて濃度が 10 g/L 付近まで低下したら、150 g/L に調製したグルコース溶液を追加して 25 g/L のグルコース濃度の培地になるように調製した。追加したグルコース溶液の量が 11.67 mL (グルコース重量換算 1.75 g) に達したら溶液の追加 (濃度調整) を終了し、培地のグルコースがなくなるまで振とう培養した。流加培養で *A. niger* へ与えたグルコースの量は、初期グルコース濃度 35 g/L \times 50 mL (液体培地容量) = 1.75 g とグルコース溶液による追加分 1.75 g で 1.75 g + 1.75 g = 3.5 g で

ある。回分培養は培地の初期グルコース濃度を 70 g/L に設定し、振とう培養を行なった。回分培養で *A. niger* へ与えたグルコースの量は、初期グルコース濃度 70 g/L × 50 mL = 3.5 g である。よって2つの培養方法で与えたグルコースの量は同じ 3.5 g である。この2種類の培養方法を Control と PEF で行ない、クエン酸生成への影響を観察した。

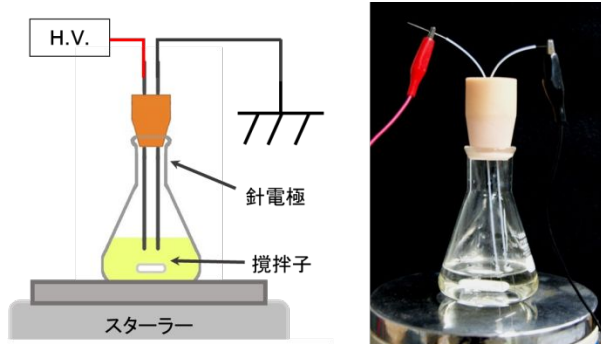


Fig. 1 PEF 印加時の概略図と写真

4. 研究成果

4.1 PEF 印加による影響

発芽が確認された *A. niger* に PEF 印加を行い炭素源のグルコースが無くなるまで培養した。Fig. 2 は、培養中の菌体を培養槽から取り出し、シャーレに移して菌体の外観の撮影および菌体重量の測定を行なったものである。培養終了後、PEF を印加した菌体の乾燥重量（3 回測定した平均値）は 0.40 g となり、PEF 印加を行なわずに培養した Control の菌体乾燥重量 0.33 g と比較すると、PEF により約 1.2 倍の菌体増殖効果が確認された。Fig. 3 は、液体培地内のグルコース濃度とクエン酸濃度の経時変化を示したグラフである。*A. niger* のクエン酸生成量とクエン酸収率は、Control : 11.97 g/L、32.0% PEF : 7.57 g/L、20.2% だった。しかしクエン酸の最大生成量に達するまでにかかった日数は、Control は 17 日、PEF は 8 日と PEF の場合、半分以下に短縮できた。この結果からクエン酸生成速度 (= クエン酸の最大生成量 [g/L]

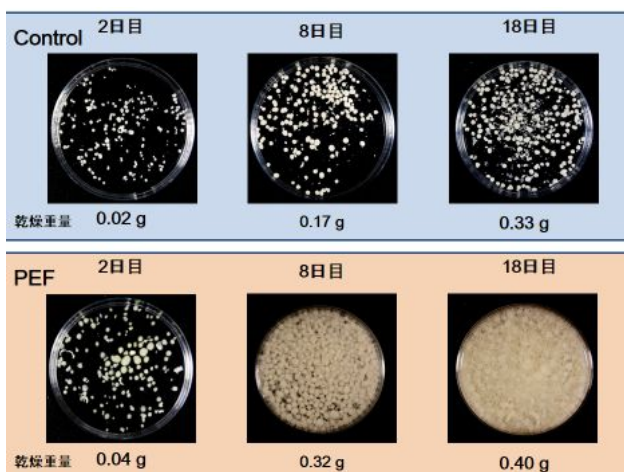


Fig. 2 *A. niger* の外観と菌体重量

÷ 最大生成量に達するまでにかかった日数) を求めた。Control のクエン酸生成速度は、0.70 [g/(L·Day)] (= 11.97 [g/L] ÷ 17 [Day])、PEF のクエン酸生成速度は、0.95 [g/(L·Day)] (= 7.57 [g/L] ÷ 8 [Day]) となり、PEF 印加により *A. niger* のクエン酸生成速度が 1.4 倍になることがわかった。PEF のクエン酸の生成量は、炭素源を菌体重量の増加に使用したため減少したが、菌体が増えた分クエン酸の生成が早いペースで行なわれたものと思われる。

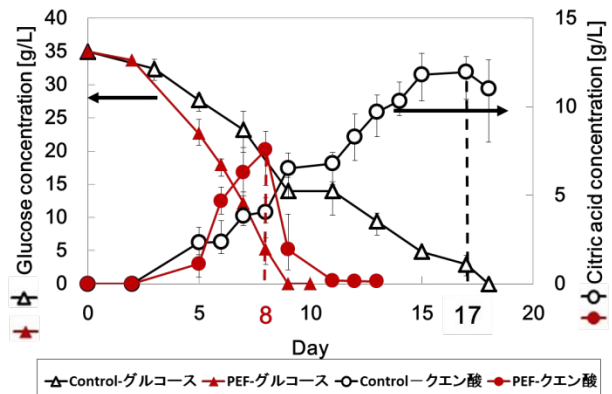


Fig. 3 グルコースとクエン酸濃度の経時変化

4.2 流加培養を行なった場合の比較

液体培地の初期グルコース濃度を変更する実験結果により、PEF 印加を行なった *A. niger* のクエン酸生成は、一定のグルコース濃度 (10~25 g/L) で盛んに行なわれることが判明した。そこで、培地内のグルコース濃度の調整をしつつ培養する流加培養を行なうことで、より多くのクエン酸生成が可能になるのではないかと考えた。Fig. 4 は、流加培養と回分培養でのクエン酸生成の経時変化を示したグラフである。流加培養による効果を確認すると、クエン酸生成量は回分培養よりも増加していた。また、最大生成量に達するまでにかかった日数は、Control では流加培養 : 29 日、回分培養 : 32 日となり、わずかに流加培養が早かった。また PEF は流加培養 : 16 日、回分培養 : 16 日と、どちらも同じ日数で最大生成量に達した。

Table 1 は Fig. 4 の結果に菌体重量・クエン酸収率とクエン酸生成速度をまとめた表である。流加培養による効果を確認すると、Control と PEF とともに菌体重量は減少、収率とクエン酸生成速度は増加していた。クエン酸生成に適した環境をつくることで、今まで菌体重量の増加に使用していたグルコースをクエン酸の生成に使わせることができ、その結果、収率とクエン酸生成速度が増加したものと考えた。

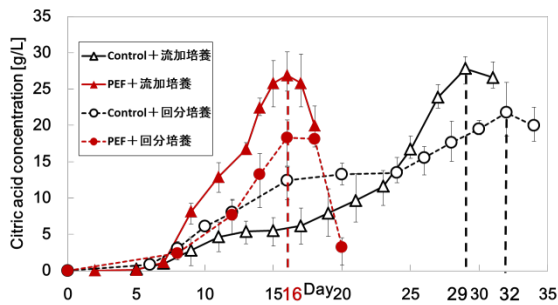


Fig. 4 流加培養と回分培養でのクエン酸濃度の経時変化

Table 1 菌体重量・収率とクエン酸生成速度

培養方法	菌体重量[g]	収率 [%]	クエン酸生成量 [g/L]	最大生成量までにかかった日数	クエン酸生成速度 [g/(L・Day)]
Control + 流加培養	0.55	37.8	27.8	29	0.96
PEF + 流加培養	0.69	39.0	26.87	16	1.68
Control + 回分培養	0.60	29.1	21.75	32	0.68
PEF + 回分培養	0.76	24.5	18.3	16	1.14

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 7件)

谷野孝徳、河井大輝、大嶋孝之(2016)「パルス放電及びオゾン処理による油水混合系中のオリブ油ならびに各種脂肪酸の分解特性」静電気学会誌 40(1):2-7 (査読有)

廣澤充、谷野孝徳、牧田康平、大嶋孝之(2016)「水溶性切削油から単離された細菌のパルス放電に対する耐性の検証」静電気学会誌 40(2):102-107 (査読有)

Ohshima T, Tanino T, Kameda T, Harashima H (2016) Engineering of operation condition in milk pasteurization with PEF treatment. Food Control. 68:297-302 (査読有)

岡田龍、谷野孝徳、古橋拓也、齋木あゆみ、大嶋孝之(2017)「気流中の浮遊菌に対するコロナ放電の除菌・電気集塵・殺菌効果の検討」静電気学会誌 41(1):14-19 (査読有)

谷野孝徳、茂木玲大、宮内賢一、大嶋孝之(2017)「カーボン電極材料としたピンホール型水中パルス放電装置の試作と放電特性」静電気学会誌 41(1):45-50 (査読有)

Sun, B., Xin, Y., Zhu, X., Gao, Z., Yan, Z., Ohshima, T., (2018) Effects of shock waves, ultraviolet light, and electric fields from pulsed discharges in water on inactivation of *Escherichia coli*. Bioelectrochemistry 120:112-119 (査

読有)

谷野孝徳、岡本憲幸、岸和範、松井雅義、大嶋孝之(2018)「高電圧パルス電界処理による黒麹 *Aspergillus niger* の増殖とクエン酸発酵の増進」静電気学会誌 42(2):84-89 (査読有)

[学会発表](計 13件)

(群馬大院) 大嶋孝之、谷野孝徳、廣澤充「高電圧パルス電界殺菌における炭素電極の利用」日本食品工学会第17回(2016年度)年次大会 2D08(2016年8月4-5日、東京海洋大学)

(群馬大院理工) 谷野孝徳、岸和範、岡本憲幸、大嶋孝之「高電圧パルス電界による黒麹菌の増殖促進とクエン酸発酵への応用」日本食品工学会第17回(2016年度)年次大会 1P12(2016年8月4-5日、東京海洋大学)

(群馬大院) 上原建佑、谷野孝徳、大嶋孝之「減圧下における誘電体バリア放電による大腸菌の殺菌」日本食品工学会第17回(2016年度)年次大会 2P33(2016年8月4-5日、東京海洋大学)

(群馬大院*, 三菱電機(株)**) 岡田龍*、谷野孝徳*、古橋拓也**、齋木あゆみ**、大嶋孝之*「気流中の浮遊菌に対するコロナ放電の除菌・電気集塵・殺菌効果の検討」第40回静電気学会全国大会講演要旨 29aB-4(2016年9月29-30日、群馬大学)

(群馬大院) 谷野孝徳、茂木玲大、宮内賢一、大嶋孝之「カーボン電極材料としたピンホール型水中パルス放電装置の試作と放電特性」第40回静電気学会全国大会講演要旨 29pC-10(2016年9月29-30日、群馬大学)

(群馬大院) 廣澤充、二渡飛竜、谷野孝徳、松井雅義、大嶋孝之「炭素電極を用いた流通式 PEF 殺菌装置の開発と日本酒への応用」2017年度静電気学会春期講演会講演要旨 1a-4(2017年3月7日、東京大学)

(群馬大院) 松井雅義、伊藤美慧、谷野孝徳、大嶋孝之「食品製造工程から単離された低温で増殖可能な微生物の殺菌特性」日本食品工学会第18回(2017年度)年次大会 4-2A-6(2017年8月8-9日、関西大学)

(群馬大院) 谷野孝徳、井口優果、有坂拓也、松井雅義、大嶋孝之「放電処理によるコシヨウ表面の殺菌と殺菌後の品質評価」日本食品工学会第18回(2017年度)年次大会 6-2A-8(2017年8月8-9日、関西大学)

(群馬大院) 上原建佑、谷野孝徳、松井雅義、大嶋孝之「減圧下誘電体バリア放電による固体表面殺菌」日本食品工学会第18回(2017年度)年次大会 P64(2017年8月8-9日、関西大学)

(群馬大院)○谷野孝徳,井口優果,松井雅義,大嶋孝之「コシヨウの沿面放電による殺菌と品質評価」第41回静電気学会全国大会講演要旨12aC-7(2017年9月11-12日、関西大学)

(群馬大院)○松井雅義,伊藤美慧,谷野孝徳,大嶋孝之「冷蔵庫内で増殖可能な微生物の加熱・オゾン・UV殺菌特性」第41回静電気学会全国大会講演要旨12aC-10(2017年9月11-12日、関西大学)

【招待講演】大嶋孝之「高電圧パルス電界の食品・バイオ応用」第33回九州・山口プラズマ研究会平成29年11月11日(土)~11月12日(日)長崎につしろうかん

【招待講演】大嶋孝之「プラズマの食品分野への活用」plasma conference 2017シンポジウム8.農業食品分野へのプラズマなど電気処理技術の適用とその展開および国際連携2017.11.20-11.24姫路商工会議所

〔図書〕(計4件)

電気学会誌「水産業・食品加工への高電界活用」(2016)12pp806-809 大嶋孝之

月刊クリーンテクノロジー「静電気技術を用いた非加熱殺菌技術」クリーンテクノロジー(2017)10p.14-17 谷野孝徳、大嶋孝之

静電気学会誌「高電界パルスによる土壌線虫の防除の可能性」大嶋孝之,谷野孝徳 静電気学会(2017)41(6),p.254-258

五十部誠一郎監修「高付加価値化・生産性向上のための最先端食品加工技術」大嶋孝之(分担)p.72-83 S&T出版(2017)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6.研究組織

(1)研究代表者

大嶋孝之 (Ohshima, Takayuki)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号:30251119

(2)研究分担者

谷野孝徳 (Tanino, Takanori)
群馬大学・大学院理工学府・助教
研究者番号:50467669

(3)連携研究者

なし()

研究者番号:

(4)研究協力者

なし()