

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05896

研究課題名(和文)低加圧二酸化炭素マイクロバブルによる殺菌におけるアポトーシス誘導の解明

研究課題名(英文) Analysis of apoptosis induction on the inactivation 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・准教授

研究者番号：50460001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：35 での低加圧二酸化炭素マイクロバブル(CO2MB)により、*Saccharomyces pastorianus*は細胞膜疎水性度の上昇および細胞内pH・ミトコンドリア膜電位の低下を生じた。40 以上でのCO2MBにより細胞膜流動性が変化し、核酸・タンパク質を漏出した。CO2MB処理により細胞内の可溶性タンパク質は不溶化し、そのなかの1つが解糖系酵素であるGAPDHであった。CO2MB処理により細胞内DNAのAP siteが増加したため、活性酸素の発生を示唆した。35 および40 でCO2MB処理した*S. pastorianus*の生存数は25 での貯蔵中に徐々に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低加圧二酸化炭素マイクロバブル(CO2MB)は、従来の加熱よりも低い温度帯または短時間で殺菌可能であるため、近年多様化した食品への適用も期待できる見込みのある殺菌技術であるが、その殺菌メカニズムがわかっていない。今回の研究において、CO2MBにより微生物細胞内で生じる様々な変化を明らかにし、特に変性したタンパク質の1つが解糖系酵素であったことを特定することができた。この結果は、世界中で行われている加圧CO2殺菌の研究において非常に重要な成果であり、他の殺菌技術の殺菌メカニズム解析にも役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Increase of cell surface hydrophobicity and decrease of intracellular pH and mitochondrial membrane potential in *Saccharomyces pastorianus* were induced by low-pressure carbon dioxide microbubbles (CO2MB) at 35 . Cell membrane fluidity in *S. pastorianus* was changed by CO2MB over 40 , resulting in the leakage of nucleic acid and protein. Soluble proteins in *S. pastorianus* cells were insolubilized by CO2MB and one of those proteins was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a glycolytic enzyme. It was suggested that active oxygen in *S. pastorianus* cells was generated by CO2MB because of the increase of AP site. The number of surviving *S. pastorianus* cells treated by CO2MB at 35 and 40 increased gradually during storage at 25 but at 45 and 50 remained undetected during storage of 3 weeks.

研究分野：食品科学

キーワード：殺菌 加圧二酸化炭素 マイクロバブル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品の殺菌は通常、加熱殺菌により行われ、その技術開発も進んでいるが、熱による食品へのダメージは少なからず生じることから、非加熱殺菌技術の開発は進んでいる。そのなかで、加圧二酸化炭素 (CO₂) による殺菌は、数 MPa の圧力下で CO₂ を用いて低温殺菌よりも低い温度帯においても高い殺菌効果を発揮する見込みのある非加熱殺菌技術の 1 つである。しかしながら、加圧 CO₂ による殺菌は世界中で研究されているものの、殺菌メカニズムについては明らかになっていない。加圧 CO₂ の殺菌メカニズムは、細胞内酸性化または細胞膜損傷の大きく分けて 2 つの仮説が総説としてまとめられているが¹⁾、加圧 CO₂ の微生物細胞に対する作用は詳細になっていない。これまでに、研究代表者は加圧下で CO₂ をマイクロバブル (MB) 化することで殺菌効果を高める方法 (CO₂MB) を考案し^{2,3)}、2016 年に CO₂MB を清酒の殺菌技術として世界初の加圧 CO₂ の実用化を達成した^{4,5)}。さらに、CO₂MB の殺菌メカニズムを解明するための研究を行い、CO₂MB により微生物の細胞内酸性化および細胞膜損傷は生じるが、細胞内酸性化は殺菌の致命傷ではないこと、細胞膜損傷は温度および溶存 CO₂ の影響を受けて生じるが、損傷の程度は処理条件によって異なることを報告した^{6,7)}。

2. 研究の目的

本研究では、CO₂MB が微生物の細胞膜および細胞内に与える影響を検討することにより、CO₂MB 処理した微生物が再増殖しない致命的な損傷を見つけ、微生物の代謝変化を明らかにし、新たな CO₂MB の殺菌メカニズムを提案する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内基質および細胞膜に及ぼす影響⁸⁾

供試微生物として *Saccharomyces pastorianus* NBRC11024 を 3 L の生理食塩水 (5% エタノールを含む) に懸濁し、表 1 の条件で CO₂MB 処理を行った。殺菌効果は YM 寒天培地 (至適培地) を用いたコロニーカウントにより測定した。核酸・タンパク質の漏出および細胞膜疎水性度 (CSH) は分光光度計 (U-5100, 日立ハイテクサイエンス) によりそれぞれ測定した。アルカリフォスファターゼ (AP) 活性は基質として p-ニトロフェニルリン酸を用いて分光光度計 (U-5100) により測定した。細胞膜流動性 (FP) および細胞内 pH (pH_{in}) は、蛍光指示薬として 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene および 5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (Dojindo) をそれぞれ用いて蛍光分光光度計 (RF-5300PC, 島津製作所) により測定した。ミトコンドリア膜電位 (MMP) および酸化ストレスは、MitoPT JC-1 Assay キットおよび ROS-ID ROS/RNS 3-Plax Detection Mix (コスモ・バイオ) をそれぞれ用いて蛍光分光光度計 (RF-5300PC) により測定した。結果は未処理 (NT) と比較して表した。

表 1 CO₂MB の処理条件

	温度 ()	圧力 (MPa)	滞留時間 (min)
混合槽	10	2	5
加温処理槽	35, 40, 45, 50	4	1

(2) 細胞内タンパク質に及ぼす影響⁹⁾

表 1 の条件により CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 懸濁液から菌体を回収し、可溶性および不溶性タンパク質をタンパク質抽出キット (WSE-7423 EzBactYeast Crusher, アトー) により抽出した。得られたタンパク質溶液を SDS-PAGE を用いて分画し、CO₂MB 処理の影響を検討した。さらに、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により得られた CO₂MB 処理により変性したタンパク質の分画を切り出し、XL-Tryp キット (APRO Science Inc.) 用いてトリプシン消化させ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS, Bruker Daltonics) によりペプチドマッピングを作成し、CO₂MB 処理により変性したタンパク質をデータベースから推定した。推定したタンパク質である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の標準品を上記と同様にトリプシン消化させて MALDI-TOF/MS によりペプチドマッピングを作成して比較することで確定した。また、CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 細胞内の GAPDH 活性を GAPDH 活性測定キット (Cell Biolabs, Inc.) を用いてマイクロプレートリーダー (infinite F50, TECAN Trading AG) により測定した。結果は未処理との差を表した。

(3) 細胞内 DNA に及ぼす影響

表 1 の条件により CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 懸濁液から菌体を回収し、溶媒抽出により DNA を抽出した。得られた抽出液中の DNA 濃度を分光光度計 (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific K.K.) により定量し、酸化ストレスの指標として 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) および AP site を高感度 8-OHdG Check ELIZA (日研ザイル) および OxiSelect™ Oxidative DNA Damage Quantitation Kit (STA-324, Cell Biolabs Inc.) をそれぞれ用いてマイクロプレ

ートリーダー (infinite F50) により定量した。

(4) CO₂MB 処理した *S. pastorianus* の貯蔵試験^{9,10)}

表 1 の条件により CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 懸濁液を 25 (至適温度) および 5 で数日間貯蔵し、経時的にコロニーカウントにより生存菌数を測定した。また、比較として 80 で 1 min の加熱処理を行った (T80)。さらに、上記と同様に CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 懸濁液を YM 培地を用いて混釈培養したプレートに 25 で数日間培養後のコロニー数を測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞内基質および細胞膜に及ぼす影響⁸⁾

S. pastorianus の生菌数は、40、45 および 50 での CO₂MB 処理 (MB40、MB45 および MB50) により検出不可となり、35 (MB35) では 2 log 減少した。35 以上での CO₂MB により *S. pastorianus* は CSH の上昇、pH_{in} の低下および MMP の減少を生じた。さらに、40 以上での CO₂MB により、*S. pastorianus* の FP が変化し、核酸およびタンパク質を漏出した。一方、*S. pastorianus* の酸化

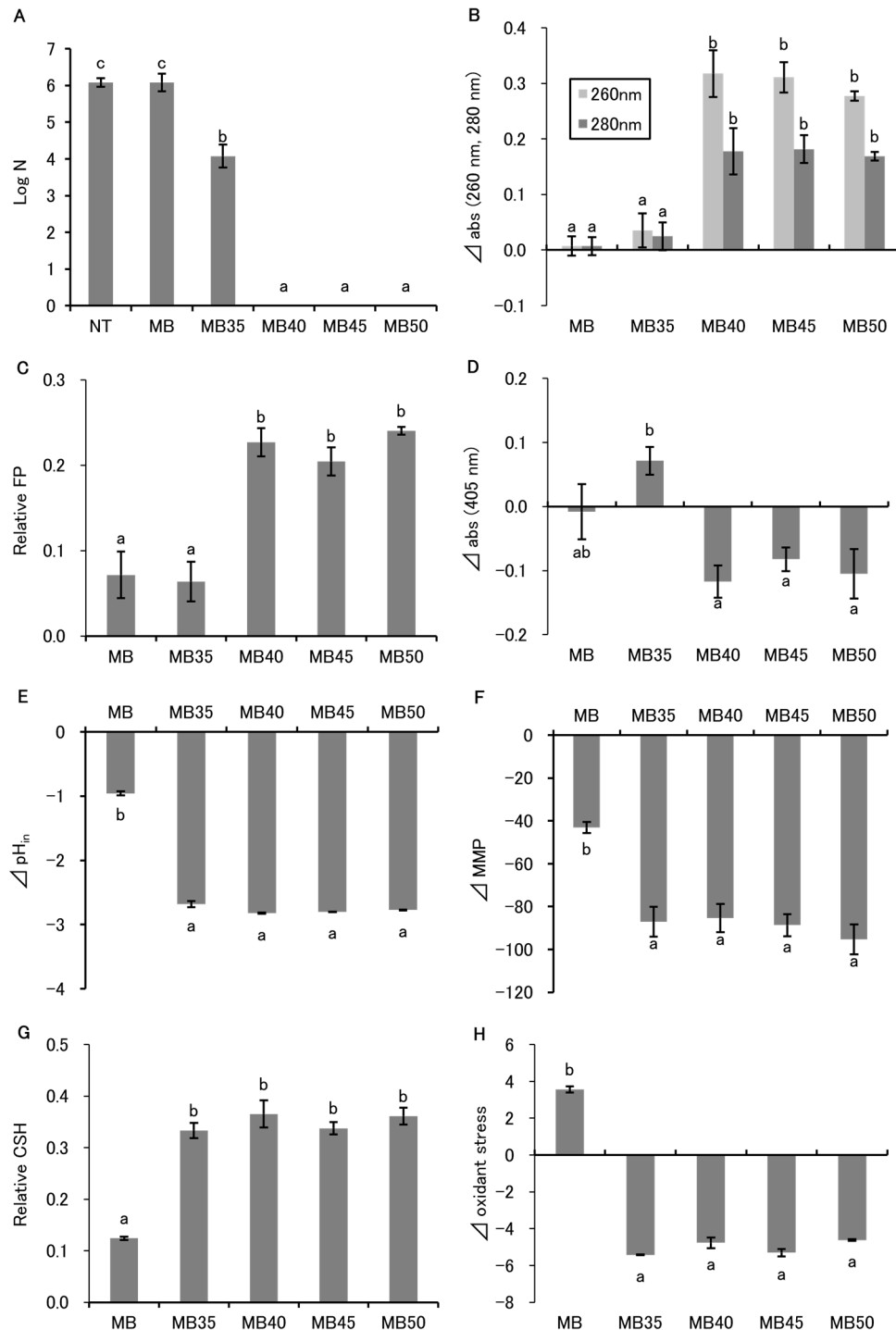


図 1 CO₂MB 処理した *S. pastorianus* の生存菌数 (A) 核酸・タンパク質の漏出 (B) FP (C) AP 活性 (D) pH_{in} (E) MMP (F) CSH (G) および酸化ストレス (H)。異なる英小文字は有意差を示す (p < 0.05)。

ストレスは低温での CO₂MB (MB)により増加したが、加温により減少し、AP 活性は 35 での CO₂MB により高まったが、40 以上で失活した。

(2) 細胞内タンパク質に及ぼす影響⁹⁾

CO₂MB および加熱処理した *S. pastorianus* 細胞から抽出した可溶性タンパク質のバンドは、未処理および MB よりも全体的に薄くまたは消失し、不溶性タンパク質のバンドが濃くなった(図 3)。この可溶性タンパク質の SDS-PAGE 内の黒枠で示すバンドを切り取り、トリプシン消化を行い、MALDI-TOF/MS で測定した結果、このバンドは GAPDH であることがわかった。さらに、CO₂MB および加熱処理後の *S. pastorianus* 細胞内の GAPDH 活性について、MB は NT とほぼ同等であったが、MB35 および MB40 で高まり、MB45、MB50 および T80 で有意に失活した(図 4)。

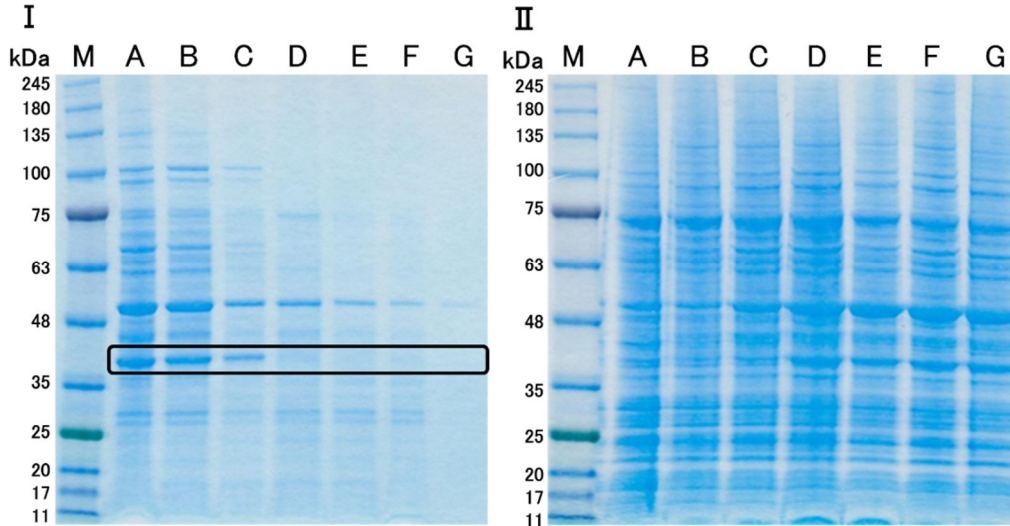


図 3 CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 細胞から抽出した可溶性および不溶性タンパク質の SDS-PAGE。I: 可溶性タンパク質, II: 不溶性タンパク質, M: マーカー, A: 未処理 (NT), B: MB, C: MB35, D: MB40, E: MB45, F: MB50, G: T80

(3) 細胞内 DNA に及ぼす影響

CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 細胞から抽出した DNA 濃度は、35 では未処理と変わらなかったが、処理温度を 40 および 45 に上げると減少した。さらに、抽出した DNA の AP site は CO₂MB 処理の温度および時間に伴い増加したため、細胞内で活性酸素を生じたことが示唆された。一方、DNA 酸化損傷マーカーである 8-OHdG の発生は DNA 濃度と同様の傾向を示したため、CO₂MB 処理の影響を受けないと推察された。

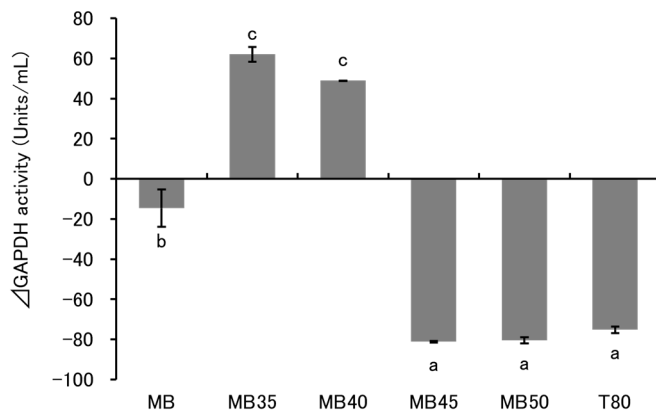


図 4 CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 細胞内の GAPDH 活性。異なる英小文字は有意差を示す (p < 0.05)。

(4) CO₂MB 処理した *S. pastorianus* の貯蔵試験^{9,10)}

5 および 25 での貯蔵中、未処理 (NT) の生存 *S. pastorianus* 数は 0 週目から 3 週目までほとんど変動しなかった。また、混合槽のみで CO₂MB 処理 (MB) した *S. pastorianus* の生存数は 5 での貯蔵中徐々に緩やかに減少したが、25 での貯蔵中では 1 週後に 3.8 log まで減少した後、2 週目には 5.5 log まで増加し、3 週目は同じであった。一方、混合槽で CO₂MB 処理後、35 および 40 の加温処理槽で 1 min 処理 (MB35 および MB40) した *S. pastorianus* の生存数は 5 での貯蔵することにより減少したが、25 での貯蔵中、徐々に増加した。しかしながら、混合槽で CO₂MB 処理後、45 および 50 の加温処理槽で 1 min 処理 (MB45 および MB50) および T80 の生存 *S. pastorianus* 数は、同様に 5 および 25 での貯蔵 3 週目まで検出不可のままであった。また、CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 懸濁液を YM 培地を用いて混釈培養後に形成されるコロニー数は、48 から 144 h でほとんど変わらなかった。

< 引用文献 >

- 1) Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, L., Van Impe, J.F. & Devlieghere, F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *Int.*

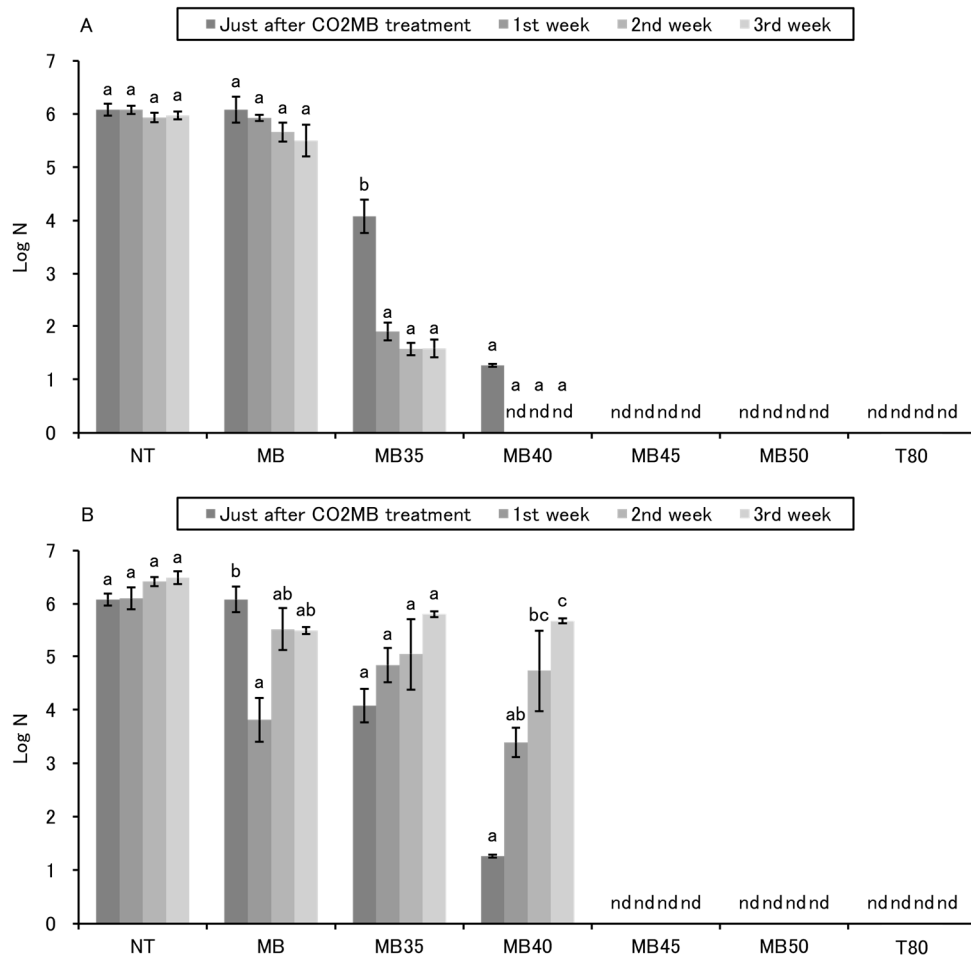


図5 CO₂MB 処理した *S. pastorianus* 懸濁液の貯蔵試験。

異なる英小文字は有意差を示す ($p < 0.05$)、nd は検出限界以下を示す。

- J. Food Microbiol., 117:1-28, 2007.
- 2) 早田保義, 小林史幸. 食品の処理方法及び食品の処理装置. 特許第 5131625 号.
 - 3) 早田保義, 小林史幸. 処理方法および処理装置. 特許第 5716258 号.
 - 4) Kobayashi, F., Ikeura, H., Odake, S. & Sakurai, H. Quality evaluation of sake treated with a two-stage system of low pressure carbon dioxide microbubbles. J. Agric. Food Chem., 62:11722-11729, 2014.
 - 5) 小林史幸・桜井博志. 液状物の処理方法. 特許第 6089718 号.
 - 6) Kobayashi, F. & Odake, S. Intracellular acidification and damage of cellular membrane of *Saccharomyces pastorianus* by low pressure CO₂ microbubbles. Food Contr., 71:365-370, 2017.
 - 7) Kobayashi, F. & Odake, S. The relationship between intracellular acidification and inactivation of *Saccharomyces pastorianus* by a two-stage system with pressurized carbon dioxide microbubbles. Biochem. Eng. J., 134:88-93, 2018.
 - 8) Kobayashi, F. & Odake, S. Determination of the lethal injury on the inactivation of *Saccharomyces pastorianus* cells by low-pressure carbon dioxide microbubbles. Curr. Microbiol., 79:120, 2022.
 - 9) Kobayashi, F., Nemoto, K., Narai-Kanayama, A., Katayama, K. & Odake, S. Relationship between intracellular protein denaturation and irreversible inactivation of *Saccharomyces pastorianus* by low-pressure carbon dioxide microbubbles. Biotechnol. Prog., 38:e3287, 2022.
 - 10) Takahashi, K., Kobayashi, F., Narai-Kanayama, A. & Odake, S. The correlation between denaturation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and inactivation of *Saccharomyces pastorianus* cells by pressurised carbon dioxide microbubbles. Lett. Appl. Microbiol., 2023 (In Press).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Fumiyuki, Odake Sachiko	4. 巻 79
2. 論文標題 Determination of the Lethal Injury on the Inactivation of <i>Saccharomyces pastorianus</i> Cells by Low-pressure Carbon Dioxide Microbubbles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-022-02817-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Fumiyuki, Nemoto Kaho, Narai Kanayama Asako, Katayama Kinya, Odake Sachiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Relationship between intracellular protein denaturation and irreversible inactivation of <i>Saccharomyces pastorianus</i> by low pressure carbon dioxide microbubbles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechnology Progress	6. 最初と最後の頁 e3287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/btpr.3287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Konomi, Kobayashi Fumiyuki, Narai-Kanayama Asako, Odake Sachiko	4. 巻 76
2. 論文標題 The correlation between denaturation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and inactivation of <i>Saccharomyces pastorianus</i> cells by pressurized carbon dioxide microbubbles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/lambio/ovad043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小林史幸	4. 巻 50
2. 論文標題 マイクロバブルを利用した微生物制御と食品衛生分野への応用。講座 食の安心・安全科学 -食品製造現場・食品にかかわる微生物汚染とその対策-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 247-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林史幸
2. 発表標題 ファインバブルの食品・飲料の殺菌・酵素失活への応用
3. 学会等名 進化するファインバブル技術と応用展開：最近の化学工学講習会70。化学工学会関東支部（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林史幸，根本香穂，奈良井朝子，片山欣哉，小竹佐知子
2. 発表標題 低加圧二酸化炭素マイクロバブルにより殺菌した酵母の再増殖と細胞損傷の関係
3. 学会等名 第21回 日本食品工学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋このみ、小林史幸、奈良井朝子、白石純一、太田能之、小竹佐知子
2. 発表標題 二酸化炭素マイクロバブルが <i>Saccharomyces pastorianus</i> のタンパク質およびDNAに及ぼす影響
3. 学会等名 日本食品科学工学会関東支部
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小林史幸（共著）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 266
3. 書名 マイクロバブル・ナノバブルの技術と市場 2021。第8章 二酸化炭素ファインバブルによる食品の殺菌・酵素失活	

1. 著者名 小林史幸（共著）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 化学工学会	5. 総ページ数 251
3. 書名 進化するファインバブル技術と応用展開。第16章 ファインバブルの食品・飲料の殺菌・酵素失活への応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関