

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：54701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871040

研究課題名(和文) 微高压炭酸ガス殺菌メカニズムの速度論的解明と有効微生物プロファイルの作成

研究課題名(英文) The effect of the petit-high pressure carbon dioxide gas to the microbes

研究代表者

楠部 真崇 (Kusube, Masataka)

和歌山工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：40403761

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)：人体に無害で栄養や風味に悪影響を与えない微高压炭酸ガス処理による微生物の不活化効果を調査した。酵母と真正細菌の実験結果比較から、この不活化メカニズムは、微生物細胞内の酸性化に起因することが推察された。本研究では、微高压炭酸ガス処理による酵母および真正細菌細胞内のpH変動と不活化の関係を確認するために、加圧条件下での細胞内pH挙動についてpH感受性蛍光プローブを用いて調査した。その結果、真正細菌は細胞質酸性化が確認でき、酵母では液胞内酸性化が確認された。このことより、微高压炭酸ガス加圧処理の不活化には細胞内pHの低下が大きく影響していることが明確となった。

研究成果の概要(英文)：The petit-high pressure carbon dioxide gas for microbe sterilization was suggested in this study. Carbon dioxide dissociates to carbonic acid (H_2CO_3) and second dissociates to proton and carbonate ion (HCO_3^-). These dissociates are promoted by pressurizing cause these reaction volume change shows negative value, i.e., this technique is very useful under high pressure. *Saccharomyces cerevisiae* S288C culturing cells were diluted to 10^4 - 10^5 by YPB fresh media, Tris Based Saline (TBS) buffer and 0.85% distilled saline (NaCl) and was CO_2 pressurized until 1.0 MPa at 30 or 40 °C for each hours. Inactivation rate (kd) was decided from colony forming unit (CFU). The kd value of NaCl diluted yeast cells is remarkable increased compared with other diluted solutions. We decided temperature and proton are most effective factors for yeast inactivation by statistical analysis and multiple linear regression analysis.

研究分野：食品加工

キーワード：食品加工 微高压炭酸ガス殺菌 高圧力 細胞内酸性化

1. 研究開始当初の背景

一般的に、食品の殺菌は主に加熱・食品添加物・静水圧で行われている。しかし加熱処理は素材の酸化により、栄養・味・色目の変化をもたらし、また食品添加物による処理は健康イメージを悪化させる懸念がある。一方、静水圧処理は、食材の風味や食感の保持、機能性の付加が可能であることが報告されており、食品加工の有効な殺菌処理法とされるが、設備コストなどの問題でそれほど普及はしていない。一方でガス圧殺菌が近年研究されてきており、可溶性ガスである二酸化炭素を用いたガス圧処理は、他の窒素やアルゴンガス等の様々なガス媒体の中でも特に殺菌効果が高いとされている。そこで本研究室では、人体に無害で栄養や風味に影響を与えない炭酸ガスを用いた、高压ガス保安法に抵触しない1 MPa未満での微高压炭酸ガス処理による微生物への影響を調査した。本技術は1 MPa未満での使用を検討しているため、高压を取り扱うための資格を必要とせず、誰にでも扱うことができる。

これまでの研究で、生理食塩水中では全ての微生物が不活化され、また栄養培地中では真正細菌である *Escherichia coli* (JCM5491) および、*Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002) が不活化したのに対し、酵母である *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC26108) は不活化しなかった。さらに、TBS 溶液中では3種ともに不活化しないことを確認している。ここでの不活化とは、処理後すぐに増殖する事ができない状態を意味する。

酵母は真核生物であり、細胞内に液胞と呼ばれる酸性小器官を持つ。酵母細胞は細胞質内のプロトン濃度が高くなると細胞膜や液胞膜に存在するプロトンポンプを通して細胞外や液胞内にプロトンを能動輸送することが知られている。さらに、細胞膜プロトンポンプは液胞膜プロトンよりも圧力感受性が高く、加圧による機能低下が起こりやす

い。しかしながら、液胞膜プロトンポンプの活性化は加圧条件下でも維持されているため、ATPが存在する系では効率的に細胞質内のプロトンを液胞に輸送することが可能である。

2. 研究の目的

これまでの研究背景より、微生物細胞内 pH を調整することで、不活化調節が可能であると推察した。微高压炭酸ガス処理の不活化は溶解した炭酸ガスではなく二次解離で発生するプロトンの影響が原因であることに注目し、本研究では、加圧処理中における真正細菌細胞質 pH および酵母細胞質、液胞内 pH のモニタリングを実施した。

3. 研究の方法

(1) pH 検量線

1 mM Carboxyfluorescein (CF) (Molecular Probes™) および 2 mM SNARF-1 (Molecular Probes™) を、任意の pH に調整した各 PBS 溶液 10 mL に添加し、最終濃度 0.2 μM になるように調製した。CF および SNARF-1 は、pH により蛍光強度が変化する性質を持つ蛍光プローブである。その後、30 °C で各 pH での蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度スペクトルより蛍光強度比を求め、pH 検量線を作成した。CF では λ_{Ex} 491 nm/ λ_{Ex} 461 nm、SNARF-1 では λ_{Em} 630 nm/ λ_{Em} 580 nm で各溶液 pH 環境での蛍光強度比を算出し、pH と蛍光強度比の関係性をプロットし検量線とした。

(2) 前培養

一般的な酵母である *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC26108) を使用した。また、食中毒菌として *Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002) および *Escherichia coli* (JCM5491=ATCC25922) を用いた。*Salmonella typhimurium* は本来 BSL2 であるが、今回用いた菌株は遺伝子組み換えによる無毒性変異

株であり BSL1 に分類されている株である。また、*Escherichia coli* (JCM5491=ATCC 25922) は米国食品医薬品局(FDA)の参照株に指定されている。

Saccharomyces cerevisiae は YPD 培地で 30 °C、2 日間、*Escherichia coli* および *Salmonella typhimurium* は LB 培地で 37 °C、1 日間前培養した。各条件で培養した細胞を、4,000 rpm、4 °C、15 分で集菌した。上澄みを取り除いた後、各栄養培地で 2.0×10^7 CFU / mL に濃度調整し、1 mL マイクロチューブに分注した。

(3) pH 測定

菌体が入っている 1ml マイクロチューブに、Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) および SNARF-1, acetoxymethyl (SNARF-1, AM) を最終濃度 20 μ M になるように添加し、30 分各培養温度下で培養することで、蛍光プローブを細胞内にラベルした。CFDA および SNARF-1, AM は細胞内に取り込まれた後、細胞内のエステラーゼ修飾によりそれぞれ CF、SNARF-1 に分解される。CFDA は液胞を選択的にラベルする。その後、4,000 rpm、4 °C、5 分で集菌し、ラベルされなかった蛍光試薬が含まれる上澄みを取り除き、生理食塩水を 1mL 添加後、再び集菌した。再びこれの上澄みを取り除き、生理食塩水および TBS 緩衝溶液で懸濁後、高圧セルに充満させた。また一部をプレパラートに移し、蛍光顕微鏡にて染色を確認した。高圧セルを Fluoromax-4 Spectrofluorometer (HORIBA 社製) にセットし、炭酸ガス加圧処理前の蛍光スペクトルを測定した。その後、0.4 MPa になるよう炭酸ガスを注入し、測定開始から 3 分おきに 60 分まで各時間での蛍光スペクトルを測定した。

測定した各処理時間での蛍光スペクトルより、蛍光強度比を求め、pH 検量線より任意の微高圧炭酸ガス処理中における各細胞内の pH をリアルタイムで決定した。得られ

た pH 挙動の結果を用いて、炭酸ガス加圧処理時間と pH の相関図を作成した。

4. 研究成果

細胞内 pH のモニタリングに使用した pH 検量線を図 1 に示す。各蛍光プローブの傾きから、CF は約 pH 7 以下、SNARF-1 は約 pH 6 以上の測定に用いることが適切であると分かった。

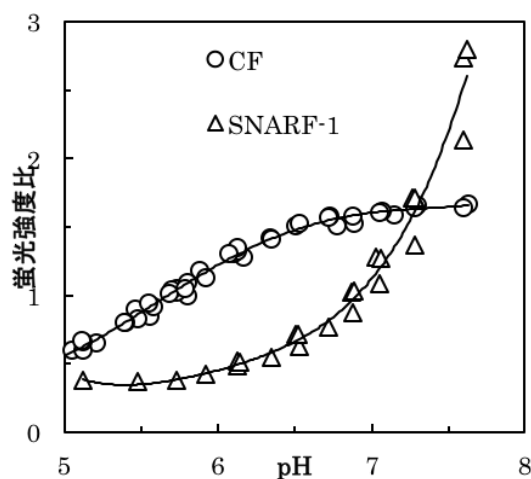


図 1. pH 検量線

図 2 に酵母の CFDA および SNARF-1, AM の染色の様子を示す。図 3 より CFDA は選択的に液胞に取り込まれていることが確認できる。SNARF-1, AM は細胞質に存在することが確認できる。各微生物の微高圧炭酸ガス処理による細胞内の pH 変化を図 3 に示す。図 3 より *Salmonella typhimurium* は、TBS 溶液・生理食塩水ともに処理後 10 分で急激に pH が低下した。TBS 溶液中の *Salmonella typhimurium* は生理食塩水中のものより pH が高く維持されていることがわかる。0.4 MPa 炭酸ガス加圧処理では、TBS 溶液でおよそ pH 5.5、生理食塩水でおよそ pH 4.8 に収束することが分かった。

Escherichia coli は *Salmonella typhimurium* 同様、TBS 溶液・生理食塩水ともに処理後 10 分で急激に pH が低下した。

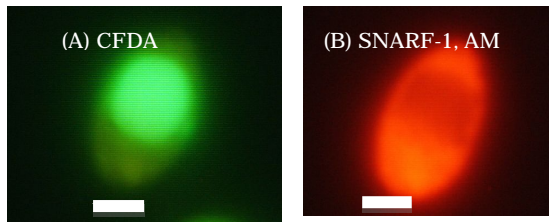


図 2. 蛍光プローブによる酵母の染色の様子(A) CFDA, (B) SNARF-1, AM 白線は 2 μ m を表す。

こちらも *Salmonella typhimurium* と同様に TBS 溶液中では pH が高く維持されていることがわかる。0.4 MPa 炭酸ガス処理で、TBS 溶液でおよそ pH 5.5、生理食塩水でおよそ pH 5.1 に収束することがわかった。

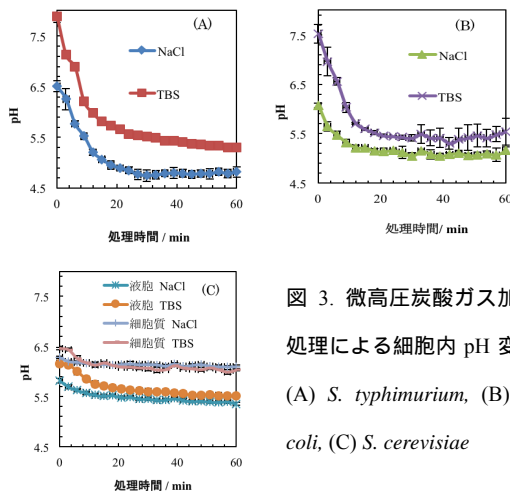


図 3. 微高压炭酸ガス加压処理による細胞内 pH 変化 (A) *S. typhimurium*, (B) *E. coli*, (C) *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae は液胞・細胞質ともに、TBS 溶液中では処理前の pH が生理食塩水中と比べ高く維持されていた。細胞質 pH は、生理食塩水中での変化は確認できなかった。一方で、TBS 溶液中ではわずかに細胞質 pH の低下が確認できた。液胞 pH は両者ともに大きく低下していることが確認できた。0.4 MPa 炭酸ガス処理で、TBS 溶液中で液胞はおよそ pH 5.6、細胞質はおよそ pH 6.1、生理食塩水で液胞はおよそ pH 5.5、細胞質でおよそ pH 6.1 に収束することがわかった。

< 引用文献 >

杵淵 美倭子、関谷 美由紀、山崎 彬、山元 皓二、高压処理を利用した玄米中への γ -アミノ酪酸(GABA)の蓄積、日本食品化学工学会誌、第 46 巻、第 5 号、1999.

T. Arao, Y. Hara, Y. Suzuki, K. Tamura.

Biosci Biotechnol Biochem 69(7), 1365-1371 (2005).

原田暢善、岩橋均、大淵薫他、食品の二酸化炭素ガス微高压長期処理による殺菌方法、特許番号 5004186 (2012)

Fumiyoshi Abe, Koki Horikoshi.

Extremophiles 2:223-228. (1998).

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)

楠部真崇、微高压炭酸ガス殺菌と無添加調味梅干しの開発、容器と缶詰、査読無、56(12)、pp.736-742、2015年12月

〔学会発表〕(計 6 件)

楠部真崇、**高压殺菌技術を用いた食品殺菌**、基調講演、2016年3月15日、アトマジヤヤ大学 (ジャカルタ (インドネシア))

Kusube Masataka, Ryusuke Okabe, Chizu Horie, Sho Hamada, Effect of the petit-high pressure carbon dioxide gas to the microbes, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec.15-20, 2015, Honolulu (US).

岡部竜丞、楠部真崇、微高压炭酸ガス処理による *Saccharomyces cerevisiae* の不活化、第55回高压討論会、2014年11月23日、徳島大工 (徳島県・徳島市)

楠部真崇、池本重明、岩橋均、海老成太郎、大淵薫、富上和成、微压炭酸ガス処理による調味梅干し加工技術の開発、近畿地区高専JST産学マッチングフェア、2013年12月5日、JST大阪オフィス (大阪府・大阪市)

楠部真崇、微高压炭酸ガス処理による調味梅干し加工技術の開発、わかやまテクノビジネスフェア'13、2013年12月、ダイワロイネットホテル（和歌山県・和歌山市）

楠部真崇、Dina Pranaswari、酵母細胞に与える微高压炭酸ガス圧の影響、第18回生物関連高压研究会シンポジウム、2013年9月、岐阜大（岐阜県・岐阜市）

〔図書〕（計1件）

楠部真崇、伊勢昇、濱田星、堀江千津、Dina Pranaswari、高压バイオサイエンスとバイオテクノロジー（共著：第15章：酵母細胞に与える微高压炭酸ガス圧の影響）、三恵社、2015年11月、pp.102-109

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

紀州新聞、平成25年8月24日、炭酸ガス処理で新しい食感・味覚を

紀州新聞、平成25年10月31日、健康食品なた豆茶を地域の特産に

6．研究組織

(1)研究代表者

楠部 真崇（KUSUBE, Masataka）

和歌山工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：40403761