



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Study on Growth-inhibitory Mechanism of
Petit-High Pressure Carbon Dioxide
Pasteurization Technology

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: NIU, LIYUAN メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56224

氏 名 (本 国 籍)	NIU LIYUAN (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 7 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 9 年 3 月 3 1 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Study on Growth-inhibitory Mechanism of <i>Petit</i> -High Pressure Carbon Dioxide Pasteurization Technology (微高压二酸化炭素ガス殺菌技術の増殖阻害メカニ ズムに関する研究)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 中 川 智 行 副査 岐阜大学 教授 岩 橋 均 副査 静岡大学 教授 河 合 真 吾 副査 静岡大学 准教授 徳 山 真 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

食品加工において、伝統的な加熱殺菌技術より非加熱食品加工技術の方が食品の新鮮な風味を保って環境にやさしいことが知られている。高压を利用した非加熱食品加工技術において、圧力媒体に二酸化炭素ガスを用いた処理技術の開発が進んでいる。他のガスと比較して、二酸化炭素 (CO₂) は無毒で低温でも強い殺菌作用を示し、安価で入手しやすいからである^[1]。近年、微高压二酸化炭素ガス (*p*-HPCD) 条件 (0.3 MPa, 7 days) において、高压二酸化炭素ガス (HPCD) 条件 (5.0 MPa, 1 day) に相当するきわめて明瞭な殺菌効果が認められた^[2]。微高压というのは一般的に 1.5 ~ 13 atm である。この発見は、食品の微高压炭酸ガスの商業的流通への応用が期待される。しかし、微高压二酸化炭素ガスによる微生物の増殖阻害メカニズムは未だ明らかとなっていない。食品加工及び流通において *p*-HPCD 技術を発展させるためには、明確で客観的なデータの提供が必要不可欠である。そこで、本研究は *p*-HPCD 技術の増殖阻害メカニズムに焦点を当てて解析した。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C (*MAT α SUC2 mal mel gal2 CUP1*) を 25°C で培養して対数期 (OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.8) に増殖させた後、CO₂ を 0.5 MPa、25°C で 2 時間処理した。この条件では、酵母の増殖は 50% が阻害された。この条件で、*p*-HPCD の生物学的効果をゲノミクス、クラスター解析およびメタボロミクス技術を用いて検討した。DNA マイクロアレイを用いたゲノミクス解析により 476 遺伝子の誘導が認められた。これらの誘導遺伝子は、Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS,

<http://mips.gsf.de/funecatDB/>) による遺伝子機能によって分類解析した。その結果、「cell rescue, defense and virulence」および「metabolism」が統計学的に最も有意であることが判明した。有意なサブカテゴリ内では、*p*-HPCD 処理に対する応答として尿素サイクルが重要であることが推定された。誘導された尿素サイクルに関する遺伝子を RT-PCR 法により確認した。また、メタボローム解析は、*p*-HPCD 処理後に尿素が蓄積されたことを示した。圧力下の CO₂ や HCO₃⁻ は、細胞膜を貫通して細胞内部に蓄積する可能性があるとは推定される。HCO₃⁻ や CO₃²⁻ の蓄積は、細胞および細胞膜からの細胞内無機電解質 (Ca²⁺、Mg²⁺ 等類似のイオン) を不溶化させる可能性がある。これらの無機電解質は、浸透圧ホメオスタシスを維持する機能を有する。従って、それらの不溶化は、細胞に有害な影響を及ぼすことが示されている^[3]。

階層的クラスタ分析により、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) およびラウンドアップを含むクラスターに *p*-HPCD が分類された。SDS は細胞膜の構造と流動性に影響することが知られている^[4]。また、YPD は栄養豊富な酵母培養の培地であるにもかかわらず、メタボロミクス分析ではグルタミン酸およびグルタミンを含むほとんどのアミノ酸の存在量が *p*-HPCD 処理後に大きく減少した。これらの結果は、細胞膜が *p*-HPCD ストレスの重要な標的の 1 つである可能性を示唆している。興味深いことに、硫黄同化に関する遺伝子 (*MET3*、*MET16*、*MET10*、*MET17*、*MET6* など) は、*p*-HPCD ストレスに応答して誘導された。ホスファチジルコリン生合成における最後の 2 つの段階を触媒する重要な遺伝子 *OPI3* コード酵素も、*p*-HPCD ストレスによって著しく誘導された。そこで、*p*-HPCD ストレスによって誘導される細胞膜への影響を確認するために、薄層クロマトグラフィーおよび走査型電子顕微鏡による観察を実施した。*p*-HPCD 条件下、2 時間処理した結果、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールおよびホスファチジルコリンの存在量が増加した。さらに、SEM による観察の結果、*p*-HPCD 処理後の酵母細胞の表面はディンプルがある不規則な形状になっていることが観察された。ディンプル自体は SEM 試料の調製時に生成されると考えられるが、細胞壁や細胞膜に何らかの影響があり、試料調製時にディンプルができやすくなったものと推定される。非水和 CO₂ と原形質膜との間には、高い親和性があることが理論的に証明されている^[5]。圧力条件下では、非水和 CO₂ が原形質膜中に拡散して、リン脂質の内層に蓄積することがある。脂質相中に非水和 CO₂ が蓄積することで、膜の構造が乱されディンプルが形成されやすくなったのではと考えている。同様に、培地からの栄養素の取り込みが阻害され、酵母の増殖阻害が引き起こされていると考えることができる。

p-HPCD ストレスに応答した尿素サイクルの誘導は、細胞生存に重要な役割を果たすと考えることができる。さらに、*p*-HPCD ストレスは、細胞膜の構造および機能に有害な影響を及ぼすことも確認した。これらの結果を受けて、より詳しい増殖阻害メカニズム解析の進展が期待される。

参考文献

- [1] Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Int J Food Microbiol.* 2007;117(1):1-28

- [2] Harada N, Iwahashi H, Obuchi K, et al. Effect of *petit*-high pressure sterilization for fruit juice investigation for long time treatment with Petit-High Pressure Carbon Dioxide gas. In: Abe F, editor. Proceedings of the 15th Symposium for Japanese Research Group of High Pressure Bioscience and Biotechnology; 2007 Sep 6-7; Yokohama, Japan; Yokohama: Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology; 2008. p. 96-100
- [3] Lin HM, Yang ZY, Chen LF. Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *The Chem Eng J.* 1993;52(1):B29-B34.
- [4] Glover RE, Smith RR, Jones MV, et al. An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;177:57-62.
- [5] Spilimbergo S. A study about the effect of dense CO₂ on microorganisms. PhD thesis, University of Padova, Italy. 2002.

審査結果の要旨

食品加工において、伝統的な加熱殺菌技術より非加熱食品加工技術の方が食品の新鮮な風味を保って環境にやさしいことが知られている。高圧を利用した非加熱食品加工技術において、圧力媒体に二酸化炭素ガスを用いた処理技術の開発が進んでいる。近年、微高圧二酸化炭素ガス (*p*-HPCD) 条件 (0.3 MPa, 7 days) において、高圧二酸化炭素ガス (HPCD) 条件(5.0 MPa, 1 day)に相当するきわめて明瞭な殺菌効果が認められた。微高圧というのは一般的に 1.5~13 atm である。この発見は、食品の微高圧炭酸ガスの商業的流通への応用が期待される。しかし、微高圧二酸化炭素ガスによる微生物の増殖阻害メカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで、本論文では、① ゲノミクスを用いた酵母細胞に対する微高圧二酸化炭素ガスによる増殖阻害の解析、② メタボロミクスを用いた増殖阻害の解析、③ 生物学的な変化の解析、の3項目に着目して解析している。

① 酵母を用いて、ゲノミクスを用いた微高圧二酸化炭素ガスによる増殖阻害の解析

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C (*MATaSUC2 mal mel gal2 CUP1*) を 25°C で培養して対数期 (OD₆₀₀ = 0.5~0.8) に増殖させた後、CO₂ を 0.5 MPa、25°C で 2 時間処理した。この条件では、酵母の増殖は 50% が阻害された。この条件で、*p*-HPCD の生物学的効果について、DNA マイクロアレイを用いたゲノミクス解析を行った。その結果、476 遺伝子の誘導が認められた。さらに、遺伝子発現プロファイルを他のストレス負荷後の遺伝子発現プロファイルと比較して階層的クラスタ解析を行ったところ細胞膜の構造と流動性に影響する、ドデシル硫酸ナトリウムを含むクラスタに *p*-HPCD が分類された。また、個別の遺伝子では、ホスファチジルコリン生合成の重要な遺伝子 *OPI3* も著しく誘導された。

② メタボロミクスを用いた増殖阻害の解析

ゲノミクスと同じ条件において行った、メタボロミクス解析は、*p*-HPCD 処理後に尿素が蓄積されたことを示した。このことは、圧力下の CO₂ または HCO₃⁻ は、細胞膜を貫通して細胞内部に達していることを示している。また、YPD は栄養豊富な酵母培

養の培地であるにもかかわらず、メタボロミクス分析ではグルタミン酸およびグルタミンを含むほとんどのアミノ酸の存在量が *p*-HPCD 処理後に大きく減少した。

③生物学的な変化の解析

細胞膜への影響が示されている。そこで、薄層クロマトグラフィーおよび走査型電子顕微鏡による観察を実施した。*p*-HPCD 条件下、2 時間処理した結果、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールおよびホスファチジルコリンの存在量が増加した。さらに、SEM による観察の結果、*p*-HPCD 処理後の酵母細胞の表面はディンプルがある不規則な形状になっていることが観察された。ディンプル自体は SEM 試料の調製時に生成されることが考えられるが、細胞壁や細胞膜に何らかの影響があり、試料調製時にディンプルができやすくなったものと推定される。

これらの結果から、申請者は *p*-HPCD ストレスが、細胞膜の構造および機能に有害な影響を及ぼすことにより増殖が阻害されることを示すことができた。増殖阻害メカニズムの解析は、微高圧炭酸ガスの食品産業への利用に際しての基礎理論としての利用が期待される。

研究内容と関連する項目に関する知識等も十分であると判断できたことから、本学研究科の学位論文として相応しい内容と判断した。

尚、この研究に関しては、以下の2つの学術論文が公表されている。

1. Niu L, Nomura K, Iwahashi H, Matsuoka H, Kawachi S, Suzuki Y, Tamura K. Urea cycle is enhanced by *petit*-high pressure carbon dioxide stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. High Pressure Research, 37: 70-77 2017
2. Niu L, Nomura K, Iwahashi H, Matsuoka H, Kawachi S, Suzuki Y, Tamura K. *Petit*-High Pressure Carbon Dioxide stress increases synthesis of *S*-Adenosylmethionine and phosphatidylcholine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biophysical Chemistry on line.