

## 研究論文

## 電気化学的手法を用いた食品汚染カビの活性測定法の開発

近藤徹弥\*1、日渡美世\*1、岩田卓洋\*1

## Development of Fungal Vitality Assay Using Electrochemical Method

Tetsuya KONDO\*1, Miyo HIWATASHI\*1 and Takahiro IWATA\*1

Food Research Center\*1

電気化学的手法を用いたカビの基質酸化活性測定法の開発を試みた。酸化還元色素や基質に対する電流応答の大きさは、カビの種類によって大きく異なった。試験に用いたカビの多くは、脂溶性のキノン類に良く応答し、フェリシアニドや1-メトキシ-PMS等の水溶性色素に対しては低い応答を示した。酸化還元色素の添加に続いて基質を添加した場合、カビの種類によっては電流応答が低下する場合も見られた。カビの電流応答は、加熱やエタノール処理により低下する傾向が見られたが、増殖活性とは必ずしも対応しなかった。

## 1. はじめに

食品に生育したカビは、異味・異臭の原因としてだけでなく異物として視認しやすいことから、日常的に苦情・相談の対象となっている。さらに住環境の変化や輸入食品の増加、食品原料の多様化、加工技術の進歩等により、汚染カビの種類が増え、ハウスダストやカビ毒による健康被害の問題も懸念されるようになってきた。このため、加熱や薬剤等を用いたカビの生育制御法に関する研究が現在も活発に行われている。

カビ等の微生物の生育制御法の効果測定にはコロニー計数法が一般的に用いられる。この方法は特殊な装置を必要とせず手軽にできるが、以下の問題点がある。(1)カビの培養に数日以上を要するだけでなく、その間に集落が拡散してカビ数の正確な測定が困難な場合がある、(2)加熱等で部分的に損傷を受けた損傷菌は通常のコロニー計数法では検出されなくても、適当な条件下で回復して変敗事故を引き起こすことがある、(3)清涼飲料等の溶液系においてカビの制御法を検証する場合、カビの菌糸が塊となるため、カビ数の正確な測定が困難である。このため、培養法のみならず、カビの生理状態を容易、かつ迅速、高精度に測定できる方法が求められている。

生きた微生物は細胞内の様々な酸化還元酵素により、乳酸等の基質を酸化してエネルギーを獲得する。この際、生細胞は基質酸化に伴い、ベンゾキノン(BQ)等の酸化還元色素を電子受容体として還元できるが、死細胞は色素を還元できない。一方、生細胞によって還元された色素は電極上で電気化学的に酸化可能であり、還元された

色素の量に応じた電流を得ることができる。したがって、微生物による色素還元反応と電極での酸化反応を共役させれば、微生物の活性を電流として捉えることができる。このとき、酸化還元色素は微生物による反応と電極反応の電子伝達メディエータ(以下、メディエータ)として機能する。この原理に基づいて、我々は細菌や酵母を全細胞のまま電極に固定して、細胞の基質酸化活性を電気化学的に数分以内に測定する方法を開発し、通常の培養法では検出困難な損傷菌が計測できることを明らかにしてきた<sup>1)~3)</sup>。そこで本研究では、本方法をカビの活性測定に拡張することを試みた。さらに、加熱や各種薬剤処理がカビの基質酸化活性に及ぼす影響について検討し、カビ制御法の評価法としての本方法の有用性について検証した。

## 2. 実験方法

## 2.1 試験菌株及び菌体調製法

試験には、食品汚染カビとして比較的よく分離される種に属する7菌株を用いた(表1)。このうち、*Byssochlamys spectabilis* HW001(以下、*Bys. spectabilis* HW001)、及び *Neosartorya pseudofisheri* HW003の2株は変敗食品から分離した。残りの5株は菌株分譲機関から購入した。各カビは、ポテトデキストロース寒天(PDA)培地にて維持した。使用時に、PDA培地から1白金耳の菌体を採取し、YM液体培地に懸濁し、30℃、150rpmの条件で3~10日間振とう培養を行った。培養後、菌体をろ紙上にろ過集菌した。ろ紙等を用いて菌体の水気を十分に除去した後、湿重量として

\*1 食品工業技術センター 分析加工技術室

数 10mg に精秤した菌体を電気化学測定に供した。別に、湿重量が既知の菌体を 105°C で数時間乾燥して乾燥重量を求め、湿重量を乾燥重量に換算した。本研究では、菌体量を乾燥重量で表記した。

表 1 使用したカビ

菌株
<i>Aureobasidium pullulans</i> NBRC6353
<i>Byssosclamyces fulva</i> JCM23041
<i>Byssosclamyces spectabilis</i> HW001
<i>Cladosporium cladosporioides</i> NBRC6348
<i>Neosartorya pseudofisherii</i> HW003
<i>Moniliella acetoabutans</i> NBRC9482
<i>Penicillium expansum</i> NBRC5453

## 2.2 菌体の加熱処理

あらかじめ所定温度に加温した生理食塩水に、湿重量既知のカビの菌体を懸濁し、所定時間、所定温度で加熱した。氷水中で急冷後、メンブランフィルター(孔径 0.45  $\mu$ m)にてろ過集菌し、電気化学測定に供した。別に同様に加熱処理した菌体(湿重量既知)を YM 液体培地に投入し、30°C、150rpm の条件で 18~48 時間振とう培養を行った。培養後、ろ紙上にろ過集菌した菌体の乾燥重量から培養前後の菌体増加量を求め、これを増殖活性とした。

## 2.3 菌体の薬剤処理

所定濃度のエタノール溶液あるいは次亜塩素酸溶液に、湿重量既知のカビの菌体を懸濁し、30°C で 10 分間保持後、メンブランフィルター(孔径 0.45  $\mu$ m)にてろ過集菌し、電気化学測定に供した。別に同様に薬剤処理した菌体(湿重量既知)を YM 液体培地に投入し、30°C、150rpm の条件で 18~48 時間振とう培養を行った。培養後、加熱処理と同様にして増殖活性を求めた。

## 2.4 カビ菌体の電気化学測定

電気化学測定は、3 電極式の定電位アンペロメトリー法で行った。作用極としてカーボンペースト電極(外径 6mm、内径 3mm)を用いた。参照極には Ag/AgCl 電極、対極には Pt 線を使用した。カビの菌体を懸濁したリン酸緩衝液(pH6.0)に電極を入れ、電極電位 0.5V(vs. Ag/AgCl)における電流を継時的に測定した。

メディエータとして酸化還元色素を緩衝液に添加した際、あるいは、さらに続けて基質を緩衝液に添加した際の正味の電流増加速度( $dI/dt$ 、酸化方向を正)を電流応答とした。測定中、緩衝液は 30°C に保ち、マグネチックスターラーで攪拌した。なお、酸化還元色素として、フェリシアニド、1-メトキシ-PMS、メチレンブルー、メナジオン、*p*-BQ、メチル-*p*-BQ、2, 5-ジメチル-1, 4-

BQ、2, 6-ジメチル-1, 4-BQ、及びデュロキノンを用いた。基質として、グルコース、シュクロース、クエン酸、乳酸、コハク酸、ピルビン酸、グリセロール、及びエタノールを用いた。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 カビの電流応答の経時変化

カビの電流応答の典型例を図 1 に示す。*Bys. spectabilis* HW001、あるいは *Aureobasidium pullulans* NBRC6353(以下、*Aur. pullulans* NBRC6353)の菌体を緩衝液に懸濁し、メディエータとしてフェリシアニドを添加したところ、どちらのカビにおいても酸化電流がほぼ直線的に増加した。この電流増加は、カビ細胞中の内在基質の酸化に伴うフェリシアニドの還元によるものと考えられた<sup>4)</sup>。さらに、*Bys. spectabilis* HW001 においてグルコースの添加では  $dI/dt$  に変化は見られなかったが、乳酸の添加により  $dI/dt$  が増加した。*Aur. pullulans* NBRC6353 においても乳酸の添加により  $dI/dt$  が大きく増加した。以降の解析では、 $dI/dt$  を電流応答として用いることにした。このとき、メディエータのみの添加の時の  $dI/dt$  を  $dI_M/dt$ 、さらに基質を添加した時の正味の  $dI/dt$  を  $dI_S/dt$  とした。

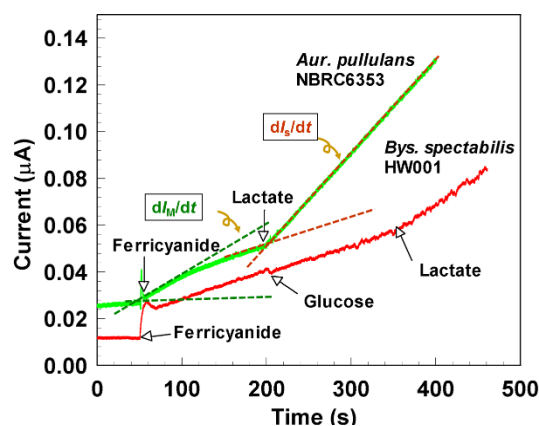


図 1 カビの電流応答の経時変化

### 3.2 様々なメディエータや基質に対するカビの電流応答

カビの様々なメディエータに対する応答は菌株によって大きく異なった(結果は図示せず)。*Aur. pullulans* NBRC6353、*Bys. spectabilis* HW001、及び *Cladosporium cladosporioides* NBRC6348(以下、*Cl. cladosporioides* NBRC6348)はデュロキノンに対し比較的高い応答性を示したが、他の菌株はほとんど反応しなかった。また、菌株に依らずデュロキノン以外の脂溶性キノン類である BQ 誘導体や *p*-BQ には高い応答を示し、ナフトキノン骨格を持つメナジオンにも多くの菌株が応答した。これに対して、水溶性のメディエータであるメ

チレンブルーや1-メトキシ-PMSには多くの菌株が応答せず、唯一フェリシアニドに対する応答がキノン類には劣るがいずれのカビでも認められた。水溶性のメディエータは一般的に細胞膜を透過できず、細胞膜中の酸化還元酵素や関連する電子伝達系において電子受容体として機能すると言われている。水溶性メディエータに対するカビの低い応答は、酸化還元酵素の電子受容体に対する親和性だけでなく、メディエータの細胞膜透過性も関与しているかもしれない。以降の実験では、*p*-BQ、メナジオン、及びフェリシアニドをメディエータとして用いた。

メディエータとしてフェリシアニドとメナジオンを用いた場合の基質に対する応答も、菌株によって大きく異なった(結果は図示せず)。また、メディエータとしてメナジオンを用いたとき、クエン酸に対する応答が *Byssochlamys fulva* JCM23041、*Bys. spectabilis* HW001、*Cla. cladosporioides* NBRC6348、及び *Penicillium expansum* NBRC5453(以下、*Pen. expansum* NBRC5453)では高いのに対し、*Aur. pullulans* NBRC6353では負になった。このように、メディエータが同じでもカビの種類によっては、基質に対する応答が負になる場合も観察された。さらに、*Cla. cladosporioides* NBRC6348のクエン酸、乳酸、及びピルビン酸に対する応答では、メディエータが変わると基質に対する応答の正負が反転することがあった。これら

の結果は、菌株によって基質代謝系が大きく異なること、さらに同一菌株であっても、メディエータの種類が違えば作用点(メディエータが電子を授受する酸化還元酵素)が異なることを示唆している。

### 3.3 加熱処理や薬剤処理したカビの電流応答

*Aur. pullulans* NBRC6353、及び *Pen. expansum* NBRC5453の菌体を50℃~90℃で15分間加熱後、メディエータのみを添加したときの電流応答及び増殖活性を調べた。結果を図2に示す。両カビともに加熱温度が高くなるにつれて増殖活性は低下したが、当初予想したよりは耐熱性が高かった。一般に、カビの菌糸は70℃で10分の加熱で死滅するが、カビの胞子はより耐熱性が高い。*Byssochlamys*属や*Neosartorya*属等のカビでは、90℃で30分の加熱でも胞子の生残するものがある。したがって、今回の結果はカビの菌糸だけでなく胞子の影響も含まれていることが示唆された。*Aur. pullulans* NBRC6353では、加熱温度が高くなるにつれて電流応答は低下した。しかし、*p*-BQに対する電流応答はフェリシアニドに対する電流応答や増殖活性に比べて耐熱性が低く、50℃の加熱で未処理の5%にまで応答が低下した。一方、*Pen. expansum* NBRC5453では、フェリシアニドに対する応答が加熱温度が高くなるにつれて低下するのに対し、*p*-BQに対する応答は121℃の加熱では消失するものの(結果は図示せず)、90℃までの加熱ではあまり低下せず、90℃でも未処理の約90%の

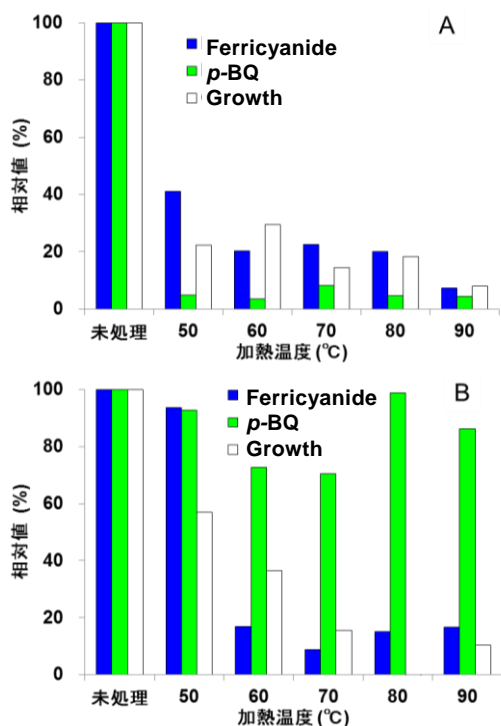


図2 カビの電流応答と増殖活性の加熱温度依存性 *Aur. pullulans* NBRC6353 (A)、*Pen. expansum* NBRC5453 (B)

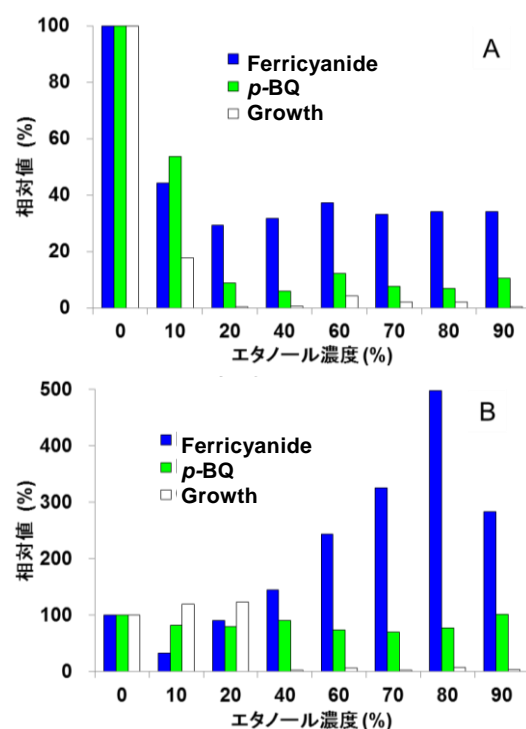


図3 カビの電流応答と増殖活性のエタノール濃度依存性 *Aur. pullulans* NBRC6353 (A)、*Bys. spectabilis* HW001 (B)

応答を示した。

エタノール溶液と接触後の *Aur. pullulans* NBRC6353、及び *Bys. spectabilis* HW001 について、メディエータのみを添加したときの電流応答及び増殖活性を図 3 に示す。両カビともに、エタノール濃度が高くなるにつれて増殖活性は低下した。*Aur. pullulans* NBRC6353 においては、フェリシアニドや *p*-BQ に対する応答はエタノール濃度が 20% までは大きく減少したが、それ以上の濃度ではほぼ頭打ちであり、*p*-BQ よりもフェリシアニドに対する応答の方が高かった。*Bys. spectabilis* HW001 では、*p*-BQ に対する応答はエタノール濃度にあまり依存せず、フェリシアニドに対する応答はエタノール濃度が高くなると大幅に増加する傾向が認められた。これは、エタノールによりカビの細胞膜の構造が破壊され、内部の酸化還元酵素が漏出して応答特性が良くなった可能性が示唆された。

#### 4. 結び

カビの生理活性を定量的に評価するため、電気化学的手法を用いたカビの基質酸化活性測定法の開発を試み

た。その結果、カビの種類により、メディエータや基質に対する電流応答が大きく異なることがわかった。また、カビの生育制御法の作用メカニズムの解明には、本方法と増殖活性の測定との併用が有用であることが示唆された。

#### 付記

本研究は、一般財団法人旗影会 2015 年度研究助成を受けて実施した。

#### 文献

- 1) T. Kondo, T. Ikeda : *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 217 (2000)
- 2) T. Kondo, T. Ando, T. Ikeda : *Electroanalysis*, **13**, 392(2001)
- 3) 近藤徹弥, 河合久美子, 安本教傳, 池田篤治 : 分析化学, **51**(6), 449(2002)
- 4) T. Kondo, T. Ikeda : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 664(1999)