

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

谷野 孝徳*, 岡本 憲幸*, 岸 和範*, 松井 雅義*, 大嶋 孝之*¹

(2017年11月22日受付; 2018年1月16日受理)

Enhancement of Growth and Fermentation of *Aspergillus niger* by Pulsed Electric Field Treatment

Takanori TANINO*, Noriyuki OKAMOTO*, Kazunori KISHI*,
Masayoshi MATSUI* and Takayuki OHSHIMA*¹

(Received November 22, 2017; Accepted January 16, 2018)

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. PEF treatment was carried out at the germination phase, logarithmic growth phase, and early stationary phase of cultivation. All PEF-treated *A. niger* cultures showed significant increases in mycelial clump size and dry cell weight. The average diameters of the mycelial clumps of the PEF-treated culture and non-PEF-treated culture were 7.8 and 3.5 mm, respectively. The maximum dry cell weight was obtained in the PEF-treated culture at the germination phase, which was 1.8-fold higher than that of the non-PEF-treated culture. 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.

1. はじめに

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¹⁻⁴⁾、牛乳⁵⁻⁷⁾、アルコール飲料^{8,9)}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¹⁰⁻¹²⁾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¹³⁾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¹⁴⁻¹⁸⁾。

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。Eoloea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¹⁹⁾。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²⁰⁾。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²¹⁾。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

キーワード：高電圧パルス電界, アスペルギルス・ニガー, 増殖, 発酵

* 群馬大学大学院理工学府

(〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma 376-8515, Japan

¹ tohshima@gunma-u.ac.jp

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²²⁻²⁴⁾。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。本研究では HV-PEF による刺激が黒麹 *A. niger* の増殖挙動ならびに回分・流加条件におけるクエン酸発酵に及ぼす影響について報告する。

2. 実験方法・手順

2.1 黒麹 *A. niger* の調整と培養・発酵

黒麹 *A. niger* は American Type Culture Collection から購入した。購入した黒麹 *A. niger* (ATCC number: 9142) は PDA 寒天培地 [3.9% (w/v) Potato Dextrose Agar] 上に復元し 30°C で 2 週間培養することで孢子形成させた。滅菌した生理食塩水を用いて寒天培地上に形成した孢子を懸濁し、ガーゼを用い濾過することで寒天培地片と菌糸を除去した。得られた孢子懸濁液の一部を適当に希釈し、PDAT 培地 [3.9% (w/v) Potato Dextrose Agar, 0.25% (v/v) Triton X-100] 上に塗布し 30°C で 2 日間培養後、形成されたコロニーをカウントすることで、孢子濃度を決定した。

回分条件での黒麹 *A. niger* の培養ならびにクエン酸発酵は 100 ml 容量の三角フラスコを用い、合成培地 [3.5~7% (w/v) glucose, 1.69×10^{-2} % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25% NH_4NO_3 , 2.5×10^{-2} % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.5×10^{-4} % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.28×10^{-2} % KCl , 0.01% KH_2PO_4 , 7.5×10^{-3} % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] 50 ml に初発菌体濃度 10^3 cells/ml となるよう孢子懸濁液を植菌し、振盪数 180 rpm にて 30°C で行った。流加条件でのクエン酸発酵では初発グルコース濃度 35 g/L [3.5% (w/v)] の合成培地を用い培養を開始し、培地中のグルコース濃度がおよそ 10 g/L に低下後、150 g/L のグルコース溶液を用いて培地中のグルコース濃度がおよそ 25 g/L となるように流加を行った。流加発酵中に複数回グルコースの流加を行い、初発グルコースとして合成培地中に含まれていた 1.75 g と合わせ合成培地中に加えられたグルコースの総量が 3.5 g となるまで実施した。これは初発グルコース濃度 70 g/L の合成培地 50 ml 中に含まれるグルコース量と同等である。

2.2 HV-PEF 処理

パルス電源としてロータリースパークギャップ型パルス発生装置を用いた (図 1)。コンデンサー容量 8 nF、周波数 50 Hz であり印加電圧はスライドトランスにより調整した。

HV-PEF を黒麹 *A. niger* 培養液に印加するための電極としてステンレスワイヤー (0.5 mmφ) を用いた。先端 10 mm を除きシリコン材料で絶縁したステンレスワイヤー 2 本を電極間距離 10 mm となるよう培養栓に設置した (図 2a)。これを黒麹 *A. niger* 培養液の入ったフラスコに固定し、マグネチックスターラーを用いて穏やかに攪拌しながら HV-PEF を印加した (図 2b)。

印加条件は黒麹 *A. niger* の生菌数低下がわずかとなる条件を検討し、印加電圧は 10 kVp、印加時間は 1 分間、培養 (発酵) 期間を通じてこの条件で 1 回のみ印加を行うこととした。この際の電圧電流波形を図 3 に示す。

2.3 分析方法

黒麹 *A. niger* 菌糸の乾燥重量は以下のように測定した。ろ紙を用いた濾過により培養液から菌糸を分離し、蒸留水に再懸濁することで洗浄を行った。再度ろ紙を用いた濾過により洗浄液から菌糸を分離した後、乾燥したろ紙の間に挟み圧迫することで水分を除去した。これを 65°C にて 24 時間乾燥させた後に密閉し常温に戻した後、

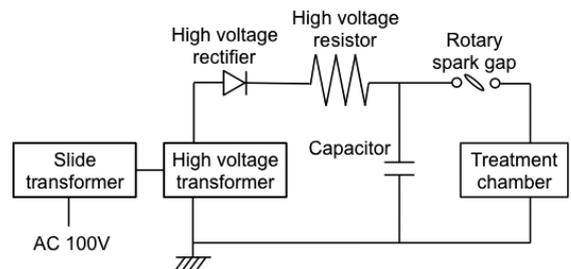


図 1 本実験で用いたパルス電源装置の回路図
Fig.1 Schematic of the circuit diagram used in this study

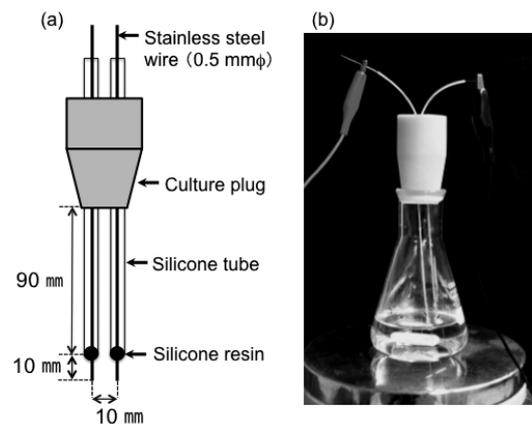


図 2 電極構造の模式図 (a) と PEF 処理時の写真 (b)
Fig.2 Schematic of the electrodes used in this study (a) and picture of PEF treatment (b).

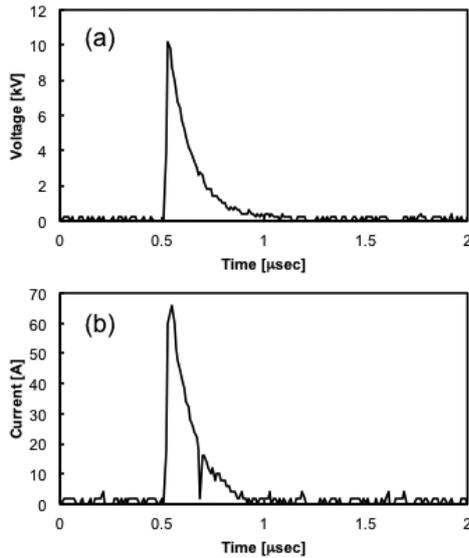


図3 パルス電圧印加時の電圧波形(a)ならびに電流波形(b)
Fig.3 Typical waveforms of voltage (a) and current (b) when PEF was applied to the culture.

重量を測定した。

培養液中のグルコース濃度は、遠心分離により培養液から菌糸を除去した培養上清に対しグルコース C-II テストワコー (和光純薬) を用いて吸光分光法により測定した。

培養液中のクエン酸濃度は、グルコース濃度の測定と同様に培養上清に対し Marier と Boulet のメソッド²⁵⁾ を用いて吸光分光法により測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 HV-PEFが黒麹*A. niger*の増殖挙動に及ぼす影響

黒麹 *A. niger* を合成培地を用い 30℃にて培養し、培養期間中に一度だけ1分間の HV-PEF 処理を実施した。この時、放電が発生していないことを確認している。発生した電流の多くは熱に変換されたものと考えられるが、印加時間が短時間であったため培養液の急激な温度上昇は確認されなかった。培養のスターターとして胞子を用い、黒麹 *A. niger* の発芽期、対数増殖期、定常期初期（それぞれ培養開始から8時間後、4日後、6日後）に HV-PEF 処理を実施した。培養開始から10日後に培養液から菌糸を取り出し観察を行ったところ HV-PEF 処理を行った黒麹 *A. niger* 培養液の外観に明確な変化が確認された（図4）。菌糸塊は HV-PEF 処理を行った培養系（図4b, 4c, 4d）では HV-PEF を行わなかった培養系（図4a）に比べ明確に大きくなり、PEF 処理を行った培養系（図4c）と行わなかった培養系（図4a）における菌糸塊の平均直径はそれぞれ 7.8 mm と 3.5 mm であった。液体培養条件下において *Aspergillus* 属を含む糸状菌は pH 変動、機械的応力、培地の浸透圧、酸素供給、栄養素供

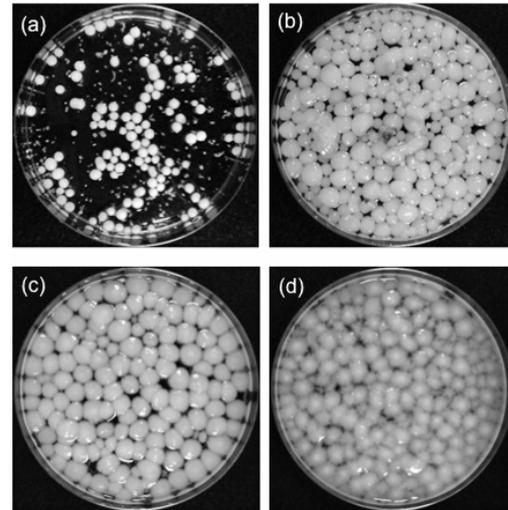


図4 培養10日後の黒麹 *A. niger* 菌糸の写真：PEF 未処理(a)、発芽期に PEF 処理 (b)、対数増殖に PEF 処理 (c)、定常期初期に PEF 処理 (d)
Fig.4 Pictures of mycelial clumps of *A. niger* after 10 days of incubation. Each picture shows non-PEF-treated *A. niger* (a) and PEF-treated *A. niger* at germination phase (b), logarithmic growth phase (c), and early stationary phase (d) of cultivation.

表1 培養10日後の培養液 50 ml 当たりの黒麹 *A. niger* 乾燥菌体重量
Table 1 Dry cell weights of 50 ml of *A. niger* cultures after incubation for 10 days.

<i>A. niger</i> culture	Dry cell weight [mg]
Control (non-PEF-treated)	193 ± 50
PEF-treated at germination phase	346 ± 48
PEF-treated at logarithmic phase	279 ± 27
PEF-treated at stationary phase	241 ± 19

給など培養条件下における様々な刺激に応じてその形態を変化させることが知られている²⁶⁾。本研究で確認された結果から、HV-PEF も黒麹 *A. niger* の形態変化を引き起こす刺激であるといえる。

黒麹 *A. niger* を 50 ml の合成培地を用い 10 日間培養した後の乾燥菌体重量の比較を表1に示す。乾燥重量においても HV-PEF 処理を行った培養系では HV-PEF を行わなかった培養系に比べ重量が増加していることが確認され、HV-PEF 処理を行った培養系においては、培養の初期に HV-PEF 処理を行うほど菌体重量の増加が顕著であった。発芽期に HV-PEF 処理を行った系（PEF-treated at germination phase）において乾燥菌体重量は 346 mg と最大値を示し、これは HV-PEF 処理を行わなかった系（control）と比較し 1.8 倍の値となった。菌糸塊の大きさの増加に比べ乾燥重量の増加の割合が小さくなったのは、酸素透過性が悪い菌糸塊の中心は中空構造であること、HV-PEF 処理を行った系では菌糸塊の密度が幾分低いように見受けられたことが原因であると考えられる。

これまでに確認された培養液中の黒麹 *A. niger* の菌体塊が大きくなるという形態変化ならびに乾燥菌体重量の増大から、HV-PEF 処理は黒麹 *A. niger* の増殖能を向上する効果があるものと考えられる。HV-PEF により酵母 *S. cerevisiae* では酸化ストレス応答遺伝子が誘導されることが分かっており²⁰⁾、黒麹 *A. niger* においてもこのような遺伝子が誘導されることで、生体内の代謝やシグナル伝達などに影響し増殖能の向上が引き起こされているのではないかと考えられる。

3.2 HV-PEF処理が黒麹 *A. niger* によるクエン酸発酵挙動に及ぼす影響

HV-PEF によって黒麹 *A. niger* の増殖能が向上した。この増殖能の改善がクエン酸発酵に及ぼす影響を調査した。黒麹 *A. niger* 胞子を種々の初発グルコース濃度の合成培地に植菌、30℃でインキュベートし発芽期にHV-PEF処理を行った。培地中に含まれるグルコースの消費と培地中へのクエン酸の生産の経時変化を調査した。クエン酸発酵挙動を図5に、発酵結果を表2に示す。初発グルコース濃度、HV-PEF 処理の有無に関わらず、グルコースの消費に伴いクエン酸が生産されていることが確認され、系中のグルコース濃度が低下すると生産されたクエン酸も炭素源として黒麹 *A. niger* に消費されていることが確認される。すべての初発グルコース濃度の発酵において、HV-PEF 処理を行った系においてはグルコース消費が促進された。しかしながら、HV-PEF 処理を行った系ではHV-PEF 処理を行っていない系に比べ最大クエン酸濃度が低く、クエン酸収率も低いものとなった。これらの結果から、HV-PEF を行った系ではグルコースの多くの部分が増殖能の向上した黒麹 *A. niger* の菌糸形成に利用されたものと考えられる。HV-PEF 処理を行っていない系では発酵を通じてクエン酸濃度はほぼ直線的に増加していることが確認される。一方で、HV-PEF 処理を行なった系ではクエン酸濃度がある時期を境に急激に上昇している。この急激な上昇は培地中のグルコース濃度が関連しているようであり、グルコース濃度がおよそ

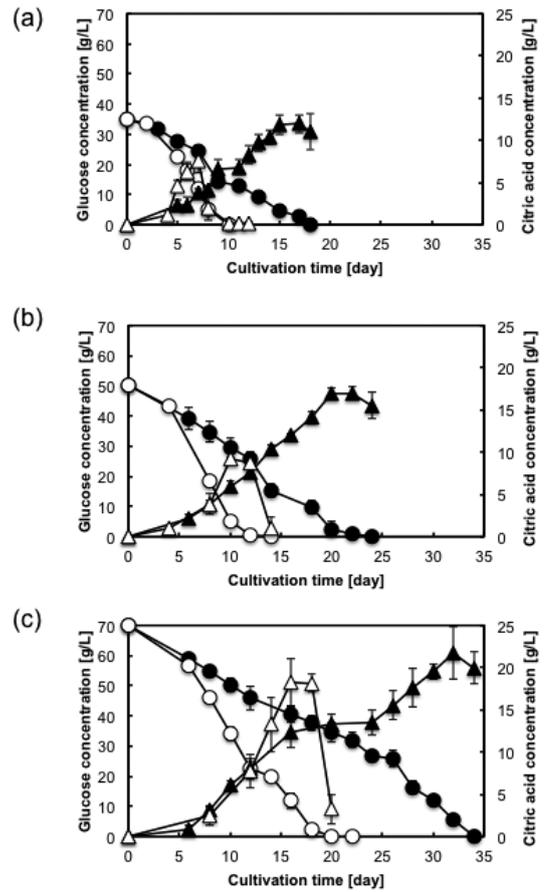


図5 初発グルコース濃度 35 (a)、50 (b) ならびに 70 (c) g/L における黒麹 *A. niger* によるクエン酸発酵挙動。●▲：PEF 未処理、○△：PEF 処理、●○：グルコース濃度、▲△：クエン酸濃度
Fig.5 Citric acid fermentation profiles in medium at various initial glucose concentrations of 35 (a), 50 (b), and 70 (c) g/L. Circles indicate glucose concentration and triangles indicate citric acid concentration. The closed and open symbols indicate the fermentation of non-PEF-treated and PEF-treated *A. niger*, respectively. The data points represent the average of three independent experiments.

25 g/L 以下で誘導されるようである。

3.3 HV-PEF処理を行った黒麹 *A. niger* を用いたクエン酸の流加発酵

培地中のグルコース濃度の制御がHV-PEF処理を行った黒麹 *A. niger* によるクエン酸発酵に及ぼす影響を、発

表2 種々の初発グルコース濃度における黒麹 *A. niger* によるクエン酸発酵結果
Table 2 Results of citric acid fermentation in medium at various initial glucose concentrations.

Initial glucose concentration	Treatment	Maximum citric acid concentration	Fermentation time	Glucose consumed	Glucose consumption rate	Volumetric citric acid production rate	Citric acid yield
g l ⁻¹		g l ⁻¹	day	g l ⁻¹	g l ⁻¹ day ⁻¹	g l ⁻¹ day ⁻¹	mol mol-consumed-glucose ⁻¹
35	None	11.98 ± 1.10	17	32.18 ± 1.27	1.89 ± 0.07	0.70 ± 0.06	0.34 ± 0.02
35	PEF	7.57 ± 1.43	7	22.85 ± 1.72	3.26 ± 0.25	1.08 ± 0.20	0.32 ± 0.08
50	None	16.90 ± 0.65	20	47.52 ± 2.43	2.38 ± 0.12	0.85 ± 0.03	0.33 ± 0.03
50	PEF	9.20 ± 0.75	10	45.10 ± 0.97	4.51 ± 0.10	0.92 ± 0.07	0.19 ± 0.02
70	None	21.75 ± 3.10	32	64.42 ± 0.80	2.01 ± 0.02	0.68 ± 0.10	0.32 ± 0.05
70	PEF	18.31 ± 2.81	16	58.26 ± 2.60	3.64 ± 0.16	1.14 ± 0.18	0.29 ± 0.04

表3 黒麹 *A. niger* によるクエン酸流加発酵結果
Table 3 Results of citric acid fermentation in fed-batch fermentation.

Treatment	Maximum citric acid concentration g l ⁻¹	Fermentation time day	Glucose consumed g l ⁻¹	Glucose consumption rate g l ⁻¹ day ⁻¹	Volumetric citric acid production rate g l ⁻¹ day ⁻¹	Citric acid yield mol mol- consumed-glucose ⁻¹
None	27.80 ± 1.58	29	67.91 ± 1.52	2.34 ± 0.05	0.96 ± 0.05	0.38 ± 0.02
PEF	26.76 ± 2.20	16	67.33 ± 1.38	4.21 ± 1.98	1.67 ± 0.14	0.35 ± 0.01

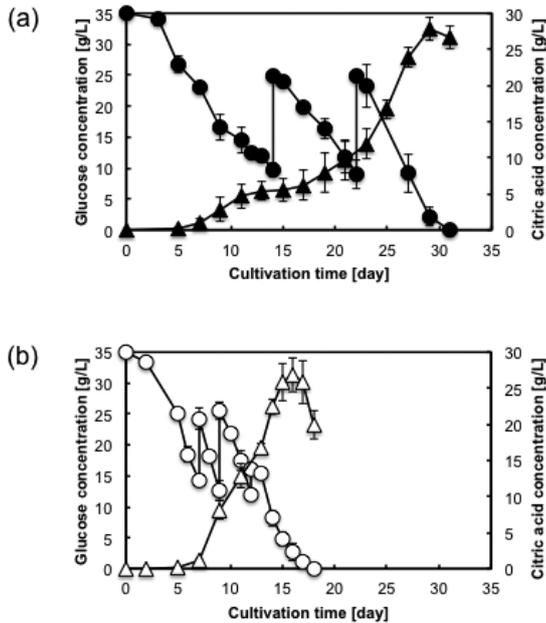


図6 PEF 未処理 (a) ならびに PEF 処理 (b) を行った黒麹 *A. niger* によるクエン酸流加発酵挙動。●▲：PEF 未処理, ○△：PEF 処理, ●○：グルコース濃度, ▲△：クエン酸濃度

Fig.6 Citric acid fermentation profiles in the fed-batch fermentation of non-PEF-treated (a) and PEF-treated (b) *A. niger*. Circles indicate glucose concentration and triangles indicate citric acid concentration. The data points represent the average of three independent experiments.

酵系中に逐次的に基質を添加する流加培養を行うことで調査した。初発グルコース濃度 35 g/L の合成培地に黒麹 *A. niger* 胞子を植菌, 30°C でインキュベートし発芽期に HV-PEF 処理を行った。培地中のグルコース濃度を経時的に測定し, グルコース濃度が 10 g/L 程度となったら 150 g/L グルコース溶液を用いて培地中のグルコース濃度が 25 g/L となるようにグルコースの流加を行った。流加発酵で用いた総グルコース量は初発グルコース濃度 70 g/L の合成培地に含まれる量と同量である。流加発酵におけるクエン酸発酵挙動を図 6 に, 発酵結果を表 3 に示す。

回分発酵結果 (図 5c, 表 2) と比べると流加発酵では最大クエン酸濃度が向上し HV-PEF 処理を行った系においては回分発酵時では 18.31 g/L であったのに対し, 流加発酵では 26.76 g/L とおよそ 1.5 倍に向上した。またこの最大クエン酸濃度 (26.76 g/L) は, 流加発酵において

HV-PEF 処理を行っていない系の最大クエン酸濃度 (27.80 g/L) とほぼ同等であった。流加発酵においても HV-PEF 処理を行った系ではグルコース消費が促進される現象は維持されていた。このため, 最大クエン酸濃度に達するまでに必要となる発酵期間が HV-PEF 処理を行わなかった系では 29 日であったのに対し, HV-PEF 処理を行った系では 16 日と 13 日間短縮され, 体積あたりのクエン酸生産速度も 0.96 g/L/day から 1.67 g/L/day と向上した。これらの結果から HV-PEF によって誘導される黒麹 *A. niger* の増殖能の向上はクエン酸発酵生産において有用であることが考えられる。しかしながら, 本研究で得られたクエン酸収率は一般的な工業レベルで実施されているクエン酸発酵における収率 0.5~0.6 mol/mol-consumed-glucose (対糖収率 50~60%) に比べ低いものである。この主な原因としては, 本研究では pH や溶存酸素量の調節が不可能な小規模のフラスコ内での発酵であることが挙げられる。溶存酸素は糖酸化で生じる電子の受容体として重要であり, pH2 以下の低 pH は不要な他の有機酸の生成を抑制する上で重要である²⁷⁾。これらの要素も形態変化などの黒麹 *A. niger* が有する生体機能を誘導する刺激であり, これらの要素を制御しつつ HV-PEF と組み合わせることでのどのような影響が得られるかの検討が今後必要になると考えられる。また本研究では HV-PEF 印加条件は発芽期に 1 分間, 1 回のみとしているが, 印加時間や複数回の印加が及ぼす影響については検討はなされておらず, 他要素と組み合わせた際の最適化を含めた検討も必要である。

4. まとめ

近年 HV-PEF は生体機能発現を誘導する刺激として着目され始めており, 本研究では黒麹 *A. niger* を対象として HV-PEF による刺激が増殖とクエン酸生産に及ぼす影響を調査した。HV-PEF 処理により, 黒麹 *A. niger* の菌糸塊が大きくなり菌体重量も増加する, つまり増殖能が向上することが確認された。また増殖能が向上することでグルコース消費速度が向上する一方, 回分条件でのクエン酸発酵においてはクエン酸生産量が低下した。これは消費されるグルコースの多くが菌糸形成に利用されて

いるためだと推測された。この時クエン酸生産挙動は培地中の残存グルコース濃度に依存することが示唆され、流加発酵によりグルコース濃度を制御することでクエン酸生産効率を大幅に向上できることが明らかとなった。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (15H02231 および 15K06574) の助成を受けて行ったものです。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) G. A. Evrendilek: Change regime of aroma active compounds in response to pulsed electric field treatment time, sour cherry juice apricot and peach nectars, and physical and sensory properties. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **33** (2016) 195-205
- 2) J. Mosqueda-Melgar, R. M. Raybaudi-Maassilia, O. Martin-Belloso: Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innov. Food Sci. Emerg.*, **9** (2008) 328-340
- 3) B. Xiang, S. Sundararajan, K. M. Solval, L. Espinoza-Rodezno, K. Aryana, S. Sathivel: Effects of pulsed electric fields on physicochemical properties and microbial inactivation of carrot juice. *J. Food Process. Pres.*, **38** (2014) 1556-1564
- 4) P. Nguyen and G. S. Mittal: Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chem. Eng. Process.*, **46** (2007) 360-365
- 5) C. M. McAuley, T. K. Singh, J. F. Haro-Maza, R. Williams, R. Buckow: Microbiological and physicochemical stability of raq, pasteurized or pulsed electric field-treated milk. *Innov. Food Sci. Emerg.*, **38** (2016) 365-373
- 6) T. Ohshima, T. Tanino, T. Kameda, H. Harashima: Engineering of operation condition in milk pasteurization with PEF treatment. *Food Control*, **68** (2016) 297-302
- 7) P. Sharma, P. Bremer, I. Oey, D. W. Everett: Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing. *Int. Dairy J.*, **35** (2014) 49-56
- 8) C. Delsart, N. Grimi, N. Boussetta, C. M. Sertier, R. Ghidossi, M. M. Peuchot, E. Vorobiev: Comparison of the effect of pulsed electric field or high voltage electrical discharge for the control of sweet white must fermentation process with the conventional addition of sulfur dioxide. *Food Res. Int.*, **77** (2015) 718-724
- 9) J. R. Beveridge, K. Wall, S. J. MacGregor, J. G. Anderson, N. J. Rowan: Pulsed electric field inactivation of spoilage microorganisms in alcoholic beverages. *P. IEEE*, **92** (2004) 1138-1143
- 10) G. J. Lee, B. K. Han, H. J. Choi, S. H. Kang, S. C. Baick, D. Lee: Inactivation of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus brevis* in low-fat milk by pulsed electric field treatment: a pilot-scale study. *Korean J. Food Sci. An.*, **35** (2015) 800-806
- 11) W. Zhao, R. Yang, X. Shen, S. Zhang, X. Chen: Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control*, **32** (2013) 6-12
- 12) J. Mosqueda-Melgar, P. Elez-Martínez, R. M. Raybaudi-Massilia, O. Martín-Belloso: Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A review. *Crit. Rev. Food Sci.*, **48** (2008) 747-759
- 13) J. C. Weaver, Y. A. Chizmadzhev: Theory of electroporation: A review. *Bioelectroch. Bioener.*, **41** (1996) 135-160
- 14) K. G. L. R. Jayathunge, A. C. Stratakos, O. Cregenezán-Albertia, I. R. Grant, J. Lyng, A. Koidis: Enhancing the lycopene *in vitro* bioaccessibility of tomato juice synergistically applying thermal and non-thermal processing technology. *Food Chem.*, **221** (2017) 698-705
- 15) S. Y. Leong, D. J. Burritt, I. Oey: Evaluation of the anthocyanin release and health-promoting properties of Pinot Noir grape juices after pulsed electric fields. *Food Chem.*, **196** (2016) 833-841
- 16) D. Xue and M. M. Farid: Pulsed electric field extraction of valuable compounds from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Innov. Food Sci. Emerg.*, **29** (2015) 178-186
- 17) K. V. Loginova, N. I. Lebovka, E. Vorobiev: Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *J. Food Eng.*, **10** (2011) 127-133
- 18) Y. Yin, Y. Cui, H. Ding: Optimization of botulin extraction process from *Inonotus Obliquus* with pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg.*, **9** (2008) 306-310
- 19) D. Fologea, T. Vassu-Dimov, I. Stoica, O. Csutak, M. Radu: Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. *Bioelectroch. Bioener.*, **46** (1998) 285-287
- 20) T. Tanino, S. Sato, M. Oshige, T. Ohshima, Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. *J. Electrostat.*, **70** (2012) 212-216
- 21) J. R. Matter, M. F. Turk, m. Nonus, N. I. Lebovka, H. E. Zakhem, E. Vorobiev: *S. cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments. *Bioelectrochemistry*, **103** (2015) 92-97
- 22) K. V. Alekseev, M. V. Dubina, V. P. Komov: Metabolic characteristics of citric acid synthesis by the fungus *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Micro.*, **51** (2015) 857-865
- 23) G. S. Dhillon, S. K. Brar, M. V. Rajeshwar, D. Tyagi: Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food Bioprocess Technol.*, **4** (2011) 505-529
- 24) B. Max, J. M. Salgado, N. Rodríguez, S. Cortés, A. Converti, J. M. Domínguez: Biotechnological production of citric acid. *Braz. J. Microbiol.*, **41** (2010) 862-875
- 25) J. R. Marier and M. Boulet: Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. *J. Dairy. Sci.*, **41** (1958) 1683-1692
- 26) A. Antecká, M. Bizukoje, S. Ledakowicz: Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **32** (2016) 193
- 27) M. Papagianni: Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.*, **25** (2007) 244-263