

論 文

気中パルス放電殺菌の特性について

村 尾 繁*, 宮 元 くるみ*, 服 部 隆 一*

(1991年5月31日受理)

Microbial Lethal Effects of High Voltage Pulse Discharge in Air

Shigeru MURAO,* Kurumi MIYAMOTO* and Ryuichi HATTORI*

(Received May 31, 1991)

There is possibility that liquids can be sterilized using in-water high voltage pulse application without rising temperature of the liquids. To research this possibility further, we studied a different method which was high voltage pulse discharge between a surface of liquid and an electrode above the surface. The survival rates declined logarithmically with discharging time and a fairly good lethal effect was observed for heat-resistant bacteria spores. But in-air discharge showed little effect on a species of bacteria (*D. radiodurans*) with low heat-resistance and high radiation-resistance. Small amount of nitric acid and hydrogen peroxide were found in the liquid after the discharging application. This caused pH lowered when liquid had little buffer action. Suggested was that a possibility of the in-air high voltage pulse discharge for a new sterilizing method without rising temperature of liquids. Radicals seemed to be formed in the liquids during the discharging application.

1. 緒 言

微生物を取り扱うすべての手段において、殺菌は重要なプロセスである。従来より、熱、紫外線、放射線、マイクロ波、薬剤等が、殺菌方法として利用されてきている。しかしそれぞれ長所短所があり、新たな特徴を持つ殺菌方法に対する要求は、未だ存在している。

高電圧を用いて液体の殺菌を行う技術の報告が、以前よりなされてきた¹⁻⁸⁾。これは被処理液体中に電極を配置し、その間に高電圧パルスを印加する方法（水中パルス放電）である。この方法では、従来の方法と同様に目的に応じた殺菌結果が期待できるとともに、印加方法の調節により過度の発熱が防止できる。液体中の成分が劣化しない、菌に対して他の方法とは異なる選択性がある等の特徴があり、新しい液体の殺菌方法としての可能性が十分考えられる。

我々は高電圧を利用した殺菌方法のさらなる可能性を追及するために、一方の電極を液体表面上に配置し高電圧パルスを印加するという方法（気中パルス放電）について、研究を行った。今回は、気中パルス放電殺菌の基

本的な特性について、報告する。

2. 電圧印加方法

2.1 実験装置及び高電圧パルス印加方法

電源は、パルス電子技術株式会社製の高圧パルス電源を用いた。印加回路は、Fig.1 に示した。電源の正極側の出力を被処理液面上 5 mm に配置したタンクステン製針状電極に導き、気中放電を起こすに十分な電圧を印加することで電極と液面の間に放電を起こす。処理液槽は、Fig.2 に示す形状であり、底部はステンレス製で下部電極として接地されている。側面はガラス製である。電源のもう一方の出力も、接地されている。処理液槽は、発熱を抑えるために -30°C のエタノールにより外

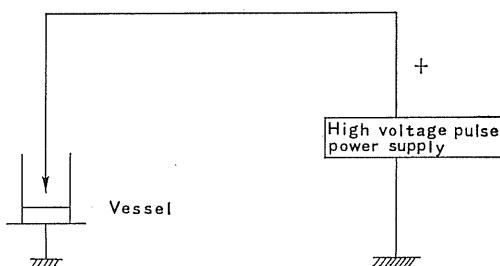


図1 パルス電源回路

Fig. 1 The scheme of high voltage pulse application.

キーワード：殺菌、パルス高電圧、放電

* ハウス食品工業株式会社研究所 (577 東大阪市御厨栄町 1-5-7)

Research Institute, House Food Industrial Co., Ltd., 5-7, 1-chome, Mikuriyasakaemachi, Higashi-osaka-city, Osaka, 577 Japan

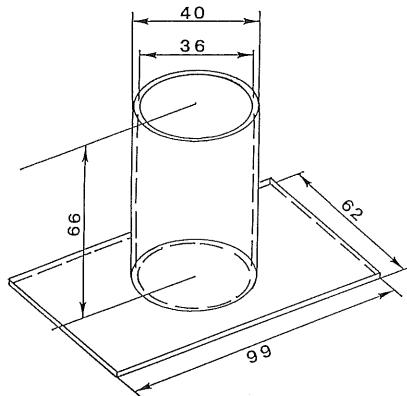


図2 水槽の形状
Fig. 2 The vessel.

部から冷却し、さらに冷却効率を上げるためにマグネットスターラーで攪拌している。この冷却条件での処理液温は、40°Cであった。放電処理時のパルス波形をFig.3に示す。出力電圧が針状電極と液面との間を短絡するに十分になると、放電が開始し電流が流れるとともに、電圧が降下する。

2.2 電源の出力

設定値：電圧=20 kV、繰返し周波数=1000 Hz、パルス幅=1 μS、極性=正

3. 実験方法

3.1 菌液調整方法

使用した菌は、以下の菌種である。

A : *Bacillus subtilis* ATCC6633 spore (以下 *B. sub.*)
B : *Bacillus stearothermophilus* ATCC7953 spore (以下 *B. stearo.*)

C : *Escherichia coli* IAM12119 (以下 *E. coli*)
D : *Deinococcus radiodurans* WILD 株 (以下 *D. radio.*)

A～Cの菌は食品衛生上重要な菌である。Dの菌は放射線耐性が強い菌である。

B. sub. は、オートクレーブした標準寒天培地(日本製薬製)に接種し35°C 7日間培養後、得られたコロニーを脱イオン水に懸濁した。芽胞のみの菌液を得るために、80°C 20分間加熱して栄養菌体を死滅させ、それを-80°Cに凍結保存して、保存菌液とした。実験に使用時は、自然解凍後脱イオン水又は1/15 M リン酸バッファ(Sorenson Buffer, pH 7.15)に希釀して用いた。

B. stearo. は、*B. sub.*と培養条件が55°C 10日間であること以外は、同じである。

E. coli は、標準寒天培地(日本製薬製)に接種し35°C 2日間培養後、得られたコロニーを脱イオン水又は1/15 M リン酸バッファ(Sorenson Buffer)に十分懸濁した

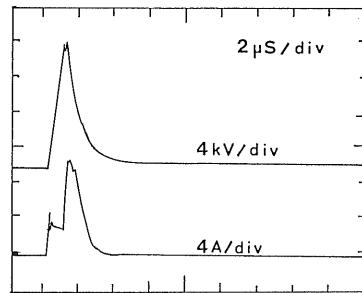


図3 放電波形
Fig. 3 The wave forms of discharge.

ものを菌液として用いた。

D. radio. は、Tryptone (Difco社製) 5 g, Glucose (ナカライテスク社製) 1 g, Yeast Extract (Difco社製) 3 gを1000 mlの水に溶かした後pH 7.0に調整しオートクレーブした液体培地(TGY培地)に接種し、30°C 1日間振盪培養後、1/15 M リン酸バッファ(Sorenson Buffer)で2回遠心洗菌し、再度同バッファに懸濁したものを菌液とした。

それぞれの菌液とも、生菌数は $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlになるように調整した。放電処理は、20 gの菌液に対して行った。

3.2 素菌結果の判定

所定の時間放電処理を行った後、希釀法により標準寒天培地に処理液1 mlを混釀し、所定の条件で培養した後発生したコロニーをカウントした。培養条件は、*B. sub.*, *E. coli* は35°C 2日、*D. radio.* は35°C 4日、*B. stearo.* は55°C 2日であった。なお後述の菌体の凝集の影響を無くすため、混釀前に超音波発生器UD-201型(トミー精工製)で凝集を分散させた。処理時間は、*B. sub.*, *B. stearo.* は60秒、他は10秒とした。

3.3 その他使用した機器

pH測定はpHメータF-12(ホリバ製)、菌の観察は生物顕微鏡(ニコン製)、放電波形の観察はデジタルストレージスコープDS-6121A(岩通電子製)を用いた。

4. 実験結果及び考察

4.1 放電処理後の処理液の変化

脱イオン水の場合、Fig.4に示したように放電処理により大幅にpHが低下した(処理後数10秒でpH 6からpH 3)。処理後の液に硝酸が検出されたため、pH低下の原因は、放電により空気中の窒素が酸化され、液にとけて硝酸となるからだと分かった。その量は処理時間10分で、273 ppmであった。硝酸量はサリチル酸メチルを利用した吸光度法により、測定した。しかしバッファのようなpH緩衝能がある液では、pHの変化はなか

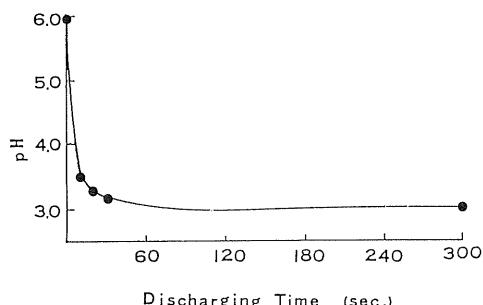


図4 放電処理による液のpH変化
Fig. 4 The change of pH by discharge.

った。同時に、過酸化水素も生成した。その量は、30分の処理時間で約0.3 ppmであった。過酸化水素量は、4-アミノアンチビリン法⁹⁾により測定した。

4.2 放電処理後の菌の状況

放電処理後、菌は凝集した。バッファに比べると、脱イオン水の方がその程度は顕著であった。顕微鏡で観察すると、凝集塊のみならず凝集塊を形成していない菌体もほとんどプラウン運動しておらず、また凝集は菌種にかかわらず認められたため、その原因はコロイド化学におけるゼータ電位低下による微粒子の凝集と同じだと思われる。

4.3 素菌結果

Fig. 5に、気中放電殺菌結果を示す。生菌数を1/1000にするに必要な時間は *E. coli* で10秒以下、*B. sub.* で約13分、*B. stearo.*、*D. radio.* で約20分の放電処理を必要とした。耐熱性の強い菌は、放電耐性も強いという傾向が認められた。しかし *D. radio.* は耐熱性が弱いにもかかわらず、放電耐性が強いことは、気中放電処理殺菌の大きな特性だと言える。Table 1に我々が測定した各菌種の耐熱性データを示した。なおここで示したD-Valueとは、ある一定の条件(ここでは100°Cの温度)のもとで、最初に存在した菌数を10分の1に減少させるのに要する時間(分)、Z-Valueとは、D-Valueを10分の1に減少するのに要する条件(温度)の変化を表す¹⁰⁾。

表1 菌の耐熱性
Table 1 The heatresistance of bacteria.

Bacteria	100°C D-Value (min)	Z-Value (°C)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 spore	1.2×10^0	8.7
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC7953 spore	1.6×10^4	5.5
<i>Escherichia coli</i> IAM12199	3.2×10^{-8}	6.2
<i>Deinococcus radiodurans</i> WILD TYPE	2.2×10^{-8}	7.7

Suspension: 1/15 M Sorensen Buffer pH 7.15

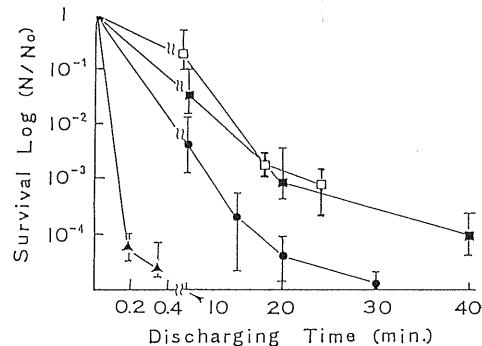


図5 気中パルス放電殺菌効果

Fig. 5 The lethal effect of in-air pulse discharge.

▲— *E. coli* ●— *B. sub.* □— *D. radio.* ■— *B. stearo.*

N : Number of cells survived.

No : Initial number of cells.

D. radio. は、放射線耐性が強い菌として知られており、この菌が殺菌されにくことから、気中パルス放電殺菌時には、放射線殺菌時と同じように水中にラジカルが生成しているのではないかと思われた。

B. stearo. は非常に耐熱性の強い菌ではあるが、耐熱性のわりには気中パルス放電で同菌は殺菌された。この結果は、気中パルス放電殺菌の有効性を示唆する。

このように気中パルス放電殺菌方法は、従来から知られている耐熱性より耐放射線性の方と、相関があるようと思われる。

殺菌は基本的には加熱殺菌と同様、対数直線的に行われた。しかし処理時間が長くなると、効果が悪化する傾向が認められた。これは、気中パルス放電により生成した凝集が、菌を保護するようになっているためではないかと考えられた。これを示唆する実験として、放電をいったん停止し、凝集を分散させるために超音波発生器処理を行い、再度放電を印加することを行ってみた。結果、悪化する傾向が改善された。これは完全に無菌にしたい時には、1つの必要な手段である。

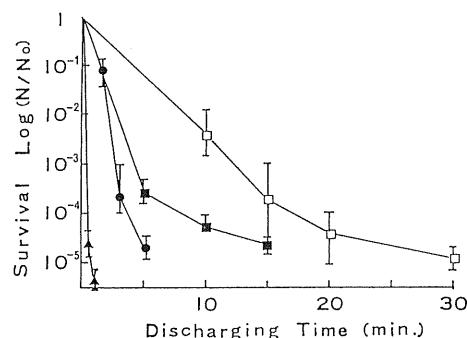


図6 菌懸濁液の違いによる殺菌効果の変化

Fig. 6 The difference of lethal effect by suspension.

- ▲—E. coli. in water
 - E. coli. in buffer
 - B. sub. in water
 - B. sub. in buffer
- N : Number of cells survived.
No : Initial number of cells.

4.4 菌懸濁液の違いが殺菌効果に及ぼす影響

*E. coli*において、懸濁液を脱イオン水にすると、Fig. 6 のように殺菌効果が向上した。逆に *B. sub.* では、脱イオン水の方が殺菌効果は悪かった。この原因是 *E. coli* では、低下した pH が殺菌に対して相乗作用を示したと考えられた。一方 *B. sub.* では pH 感受性が低いため pH の影響は少なく、反対に凝集程度が脱イオン水に比較して小さいため凝集の保護作用が少ないからだと考えられた。なおバッファの組成が異なっても、pH が同じであれば殺菌効果に影響はないことを確認している。これより気中パルス放電殺菌効果は、処理液の性質によって影響をうけることが、十分推定できる。

5. おわりに

液体液面上 5 mm の位置に配置した針状電極から、液体面に気中パルス放電を印加する方法で、液体中の細菌を殺菌する技術についてその基本的な殺菌特性を調べた。その結果以下のようないわゆる知見が得られた。

- ・殺菌は熱殺菌と同様対数直線的に行われ、耐熱性の弱い *E. coli* は 10 秒以下の放電印加で 1/1000 に生菌数を落とすことができた。耐熱性の強い *B. sub.* は同じ効果を得るのには 13 分の放電印加が必要であり、さらにより耐熱性の強い *B. stearo.* は 20 分の放電印加が必要であった。これより耐熱性の強い菌は、気中パルス放電殺

菌においても殺菌されにくいと考えられた。しかし *B. stearo.* の耐熱性は非常に強く、熱殺菌においても殺菌困難な菌である。そのような菌が熱によらず殺菌できたことは、気中パルス放電殺菌の有効な特性であると考えられる。

- ・耐熱性は弱いが放射線耐性は非常に強い *D. radio.* は、*B. stearo.* と同じ程度の放電耐性であった。このことは気中パルス放電時には、放射線殺菌時と同様に水中にラジカルが生成していることを示唆している。

- ・気中パルス放電処理後、処理液中に硝酸が生成した。その結果脱イオン水では、数 10 秒の処理で pH 6 から pH 3 に変化した。しかし pH 緩衝能があるバッファでは低下は認められなかった。pH 低下の原因は、空気中の窒素の酸化によるものであると推定される。また微量の過酸化水素の存在も確認された。

- ・気中パルス放電を液体に印加すると、液体中の菌は凝集した。また処理時間の経過とともに、殺菌結果が頭打ちになる現象が認められ、いったん放電を停止し超音波発生器で凝集を分散してやれば頭打ちの現象は解決できた。よってこの凝集はコロニーカウントによる殺菌結果の判定に誤差を生むだけでなく、殺菌効果に対して保護の作用があると考えられる。

本結果から気中パルス放電殺菌においても、目的に応じた殺菌結果が得られることが、明らかになった。また温度上昇なしでも所定の殺菌力があることから、温度上昇による品質の劣化なしに殺菌が行える可能性も示唆された。

参考文献

- 1) 速水光浩, 天満孝昌, 水野 彰: 静電気学会誌, 13 (1989) 322
- 2) 佐藤正之, 鶴田恵子, 定方正毅, 佐賀井武: 化学工学論文集, 14 (1988) 556
- 3) A.J.H. Sale and W.A. Hamilton: Biochim. Biophys. Acta, 148 (1967) 781
- 4) 桜内雄二郎, 近藤栄昭: 農化, 54 (1980) 837
- 5) H. Hulsheger, J. Potel and E.G. Niemann: Radiat. Environ. Biophys., 20 (1981) 53
- 6) S.E. Gilliland and M.L. Speck: Appl. Microbiol., 15 (1967) 1031
- 7) 吉村 昇, 鈴木浩正, 土居 騰, 中田健美, 石川雄章: 静電気学会講演論文集 '88, p. 367, 静電気学会 (1988)
- 8) M. Allen and K. Soike: Science, 154 (1966) 155
- 9) 伊藤裕志男: 食品衛生研究, 31 (1981) 15
- 10) 日本医科器械学会監修: 減菌法・消毒法第3集, p. 8, 文光堂 (1976)