

論 文

気中パルス放電殺菌のメカニズムについて

村 尾 繁*, 宮 元 くるみ*, 服 部 隆 一*

(1991年5月31日受理)

Mechanism of Sterilization by Using High Voltage Pulse Discharge

Shigeru MURAO,* Kurumi MIYAMOTO* and Ryuichi HATTORI*

(Received May 31, 1991)

In our previous report, radicals were assumed to be formed in liquids during the in-air high voltage pulse discharge application. And the lightning containing ultraviolet ray seemed to be observed. By in-air discharge, the burst of bacteria bodies seemed to occur which was reported observed. By in-air discharge, the burst of bacteria bodies seemed to occur which was reported observed. To explicate this lethal mechanism, we carried out this study to find existence of radiation, ultraviolet ray, mechanical destruction. And degrees of their contribution were estimated. Their existence were observed and the degree of the contribution were 85% 6%, respectively. Sterilization by in-air high voltage pulse application was considered as a kind of electromagnetic sterilization.

1. 緒 言

高電圧パルスを用いた液体の殺菌技術は、他の殺菌方法ではない特性をそなえた新しい殺菌方法の一つになる可能性がある¹⁻⁸⁾。その可能性をさらに追及するためには、電極を液面上に配置し、電極と液体表面との間に気中パルス放電を起こすことで、該液体の殺菌を行うという研究を行っている。前報ではこの気中パルス放電の基本的な特性を報告した⁹⁾。そのなかで *Deinococcus radiodurans* という耐熱性は低いが放射線耐性は非常に強い細菌は、気中パルス放電では殺菌しにくい結果を得た。これは、本殺菌方法に放射線又は紫外線殺菌と近似の挙動があるのではないかと示唆された。

実際、気中パルス放電印加時には青白い発光を伴う。さらに水中では、過去に報告されているような衝撃波によって菌体の破壊が起こっていることも考えられる^{7,8)}。つまり気中パルス放電処理時には、幾つかの殺菌要因が複合して、殺菌が行われている可能性がある。そこで本殺菌方法を確実に殺菌結果が得られる方法として位置づけるために、その殺菌メカニズムを明らかにしようとした。メカニズムを解明する手段として、気中パルス放電処理時に放射線、紫外線、メカニカルな破壊の三種類の

殺菌作用が存在することを確認し、さらにそれぞれが全体の殺菌結果にどの程度寄与しているかを明らかにした。

2. 電圧印加方法

2.1 実験装置及び高電圧パルス危加方法

前報⁹⁾で報告したものと、同じである。

2.2 電源の出力

前報⁹⁾と同じである。

3. 実験方法

3.1 菌液調整方法

使用した菌は、*Bacillus subtilis* ATCC6633 spore (以下 *B. sub.*) 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。実験に使用する時は、自然解凍後、脱イオン水で希釈して用いた。この時の生菌数は、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/ml になるよう調製した。放電処理は、30 g の菌液に対して行った。

3.2 殺菌効果の判定

所定の時間気中パルス放電処理を行った後希釈法により標準寒天培地に処理液 1 ml を混ぜし、35°C 2 日間培養して生成したコロニーをカウントした。なお放電処理により生成する菌体の凝集の影響を無くすため、混ぜ前

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, Mikuriyasaakaemachi, Higashiosaka-city, Osaka, 577 Japan

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、60 秒である。

3.3 寄与率の算出

各殺菌要因を知る実験から得られた殺菌結果が、全体の殺菌結果にどの程度の割合（百分率）であるかを寄与率とした。

$$\text{寄与率} (\%) = \frac{\text{(各殺菌要因確認実験の殺菌結果)} / \text{(空気霧囲気下脱イオン水菌液での殺菌結果)}}{100}$$

3.4 放射線的殺菌要因の確認

菌懸濁液中にラジカル捕捉剤の一つであるシスティン（ナカライトスク製）100 mM を添加し、さらに気中放電霧囲気気体を、窒素（純度 99.99%）又はアルゴン（純度 99.99%）に置換して得られた殺菌結果と、空気霧囲気下放電・脱イオン水菌液での結果の差を、放射線的殺菌要因とした。

3.5 紫外線的殺菌要因の確認

化学的紫外線量測定方法であるシュウ酸鉄カリウム線量計により、気中パルス放電時に発生する紫外線量を測定した¹⁰。本方法は、紫外線照射により生成した Fe^{2+} の量を、510 nm の吸光度で測定するものである。そして得られた紫外線量と同じ線量を市販の殺菌灯（15 W）で菌液に照射し、その殺菌結果を紫外線的殺菌要因とした。この時菌液には、システィンを添加している。なおこれらの実験は暗黒下又は赤色光下で行い、誤差の発生を極力抑えた。使用した分光光度計は、日立分光光度計 U-1100 型である。

3.6 メカニカル破壊による殺菌要因の確認

破壊による作用だけの殺菌が行われるホモジナイザー（ビードビーター・ホモジナイザー セントラル科学貿易）を用いて、破壊による生菌数の低下と懸濁液上清の 260 nm 吸光度との相関を確認した。一般に菌体が破壊されると、核酸などの菌体内容物が漏出する。この程度は 260 nm の吸光度変化を測定することにより知ることができる¹¹。なお吸光度測定時は菌懸濁液を 1800 × g 10 分間遠心し、その上清を測定した。そして気中パルス放電処理前後の 260 nm 吸光度変化から、メカニカル破壊の程度を知った。

4. 実験結果及び考察

4.1 放射線的殺菌要因の寄与率について

放射線殺菌作用は、直接作用と間接作用とに分けられることはよく知られている¹²。水中に菌が存在する場合、ほとんどは間接作用で殺菌されるとみなせる。間接作用とは、放射線により水が解離して生成する $\cdot\text{OH}$ 等のラジカルや活性酸素が殺菌作用を示すことである。しかし水中にこれらを捕捉する物質が存在すると、間接作

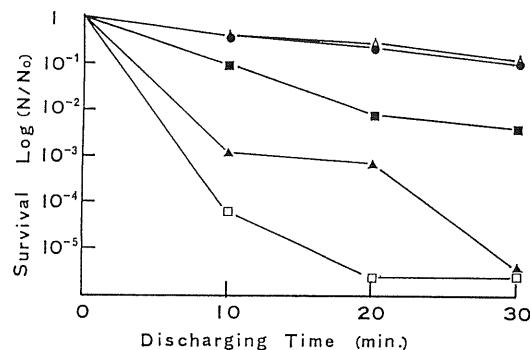


図 1 放射線的殺菌要因の確認

Fig. 1 The lethal effect as radiation.

▲—In-air ■—In-argon □—In-nitrogen
△—In-argon+cysteine ●—In-nitrogen+cysteine

N : Number of cells survived.

N_0 : Initial number of cells.

用を除去できる。また酸素が存在しない系でも、同様のことができる。Fig. 1 に、空気霧囲気下脱イオン水菌液での殺菌結果と、窒素又はアルゴン霧囲気下脱イオン水菌液での殺菌結果を示した。アルゴン置換によりラジカル等を発生させる因子を除き、さらに発生したラジカル等は殺菌作用を示す前に捕捉できるような実験条件では、大幅に殺菌結果が悪くなる。この差が、気中パルス放電殺菌における放射線的作用であると考えられた。この値により寄与率を算出すると、放電 10 分処理で 84%，放電 30 分処理で 83% となった。

よって気中パルス放電殺菌結果は、ラジカル等の生成及び捕捉力に大きく影響を受け、その結果寄与率も変化すると考えられた。

ところが同じ脱酸素の条件である窒素霧囲気下では、逆に殺菌結果が向上した。気中パルス放電処理後の pH が、空気霧囲気下より低下したので、放電処理中に生成する硝酸の量が、影響を及ぼしているのではないかと考えられた。であれば霧囲気下の酸素量とともに、窒素量も殺菌結果を左右する要因となり、これは放射線殺菌には見られない性質であると考えられた。

4.2 紫外線的殺菌要因の寄与率について

気中パルス放電時には、青白い発光がある。一般に紫外線の殺菌力を測定するには、殺菌照度計が用いられる。しかしこれは光エネルギーを電気エネルギーに転換することで測定を行うものである。本実験中には強いノイズが発生しているため、電気信号が正常に送れず、測定することができなかった。そこで今回は化学的線量計を用いて紫外線量を測定した。Fig. 2 は、化学的線量計により得られた放電処理時の紫外線量に対する *B. sub.*

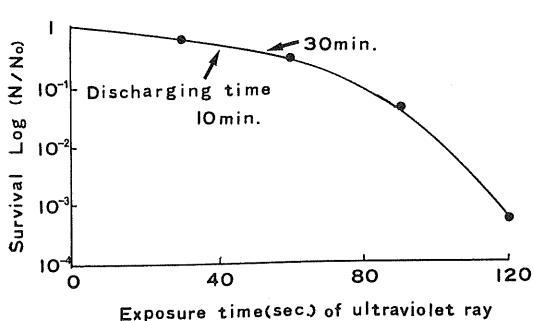


図2 紫外線的殺菌要因の確認

Fig. 2 The lethal effect as ultraviolet ray.

N : Number of cells survived.
 N_0 : Initial number of cells.

の殺菌量を求めるものである。放電処理 10 分で発生する紫外線の効果量は殺菌灯を41秒照射した時、放電処理 30 分で発生する紫外線の効果量は 51 秒照射した時に相当した。それぞれの紫外線の効果量に対する *B. sub.* の殺菌結果より寄与率を算出すると、放電 10 分処理で 10 %、放電 30 分処理で 8 % となった。紫外線の殺菌力は、処理液の表面的な部分で発現されると考えられるため、処理液槽の表面積や紫外線に対する処理液の透過度等が寄与率に影響を及ぼすと考えられた。

4.3 メカニカル破壊による殺菌要因の寄与率について

Fig. 3 は放電処理前後の吸光度変化より、*B. sub.* の破壊量を求めるものである。放電処理 10 分及び 30 分の吸光度変化より破壊された菌量を求め、寄与率を算出すると、いずれも 61 % となった。

非芽胞形成菌は、一般的に膜強度が低い。よって対象菌種が変われば、寄与率も大幅に変化すると考えられた。また膜表面を保護する物質の存在も、影響を及ぼすと考えられた。

4.4 寄与率のまとめ

得られた結果より、三種の殺菌要因はそれぞれ単独で作用しているのではなく、複合的に作用していると考えられた。例えばラジカルの殺菌作用の一つに、細胞膜に作用してその強度を低下させことがある。であるから放射線的的作用で死滅した菌体が容易に破壊されると考えることができると思われた。

よって結論として、各殺菌要因の寄与率は全体の値から放射線的的作用、紫外線的的作用を除いた値をメカニカル破壊として考え、その結果を Table 1 に示した。これより気中パルス放電殺菌のメカニズムはほとんど放射線的的作用で殺菌されており、これに紫外線的的作用の結果を加えると、気中パルス放電殺菌は一種の電磁波殺菌と言え

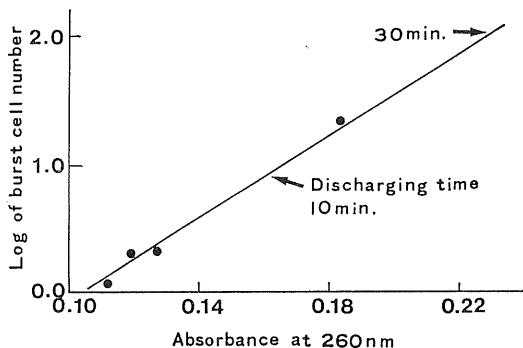


図3 メカニカル破壊の殺菌要因の確認

Fig. 3 The lethal effect as mechanical burst.

表1 各殺菌要因の寄与率

Table 1 The degree of contribution of the lethal factors.

Factor	Discharging time	
	10 min	30 min
Radiation	84%	83%
Ultraviolet ray	10%	8%
Mechanical burst	4%	7%

ると考えられた。

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、その殺菌メカニズムを明らかにしようとした。その結果以下の知見が得られた。

- ・気中パルス放電殺菌時には、ラジカルの生成が認められた。さらに紫外線も発生していることが分かった。これらが殺菌作用の要因であった。また菌体の破壊も認められた。
- ・それぞれの殺菌作用に対する寄与率を求めたところ、ラジカルの生成による放射線的的作用が約 85 % であり、それに紫外線的作用を加えると本殺菌方法は一種の電磁波の殺菌と考えられた。

このように気中パルス放電殺菌方法は、放射線殺菌と同様に期待する殺菌結果が得られることから、一つの殺菌方法として十分位置づけられると考えられる。しかし気中パルス放電は電磁波の殺菌方法の一種と考えられることから、今後応用の可能性を考えていく場合、既知の放射線や紫外線殺菌の情報から予想される利点、不利点を考慮する必要がある。ただ熱の発生なしで非常に耐熱性の強い菌も比較的良好に殺菌できること等、既知の殺菌方法にない特性を有している。また処理液中に溶解し

ている物質（溶質）によっても殺菌結果は変化すると思われる所以、処理対象に応じた対応が必要であろう。このように気中パルス放電殺菌は、今までの殺菌方法を完全に凌駕するほどの有効性は認められなかったが、処理対象菌などによっては十分応用の可能性を持った方法であると考える。

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) 吉村 畏, 鈴木浩正, 土居 謙, 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)
- 7) S.E. Gilliland and M.L. Speck: Appl. Microbiol., **15** (1967) 1031
- 8) M. Allen and K. Soike: Science, **154** (1966) 155
- 9) 村尾 繁, 宮元くるみ, 服部隆一: 静電気学会誌, **16** (1992) 138
- 10) J. Jagger (武部 啓訳): 紫外線生物学, p. 152, 共立出版 (1969)
- 11) 微生物研究法懇談会編: 微生物学実験法, p. 260, 講談社 (1975)
- 12) 近藤宗平: 分子放電線生物学, p. 153, 学会出版センター (1972)