

高電界パルス印加による大腸菌の伸長

村本 裕二^{*、1}, 岡 洋佑^{*}, 村上 祐一^{*}, 清水 教之^{*}, 市原 茂幸^{**}

(2013年9月6日受付; 2014年2月14日受理)

Elongation of *E. coli* after High Electric Field Pulse ApplicationYuji MURAMOTO^{*、1}, Yosuke OKA^{*}, Yuichi MURAKAMI^{*},
Noriyuki SHIMIZU^{*} and Shigeyuki ICHIHARA^{**}

(Received September 6, 2013; Accepted February 14, 2014)

We report sterilization of liquid using high electric field pulse. Sample was liquid including *Escherichia coli* (*E. coli*). The survival rate of *E. coli* reduced to 10^{-4} after the application of 50 pulses in a coaxial cylindrical tank. Most cells of *E. coli* elongate after the pulse application. The elongation of *E. coli* means that the bacteria can not divide. Therefore the pulse application retards the *E. coli* from cell division.

1. はじめに

食品の殺菌¹⁾には、加熱殺菌と非加熱殺菌がある。加熱殺菌は最も簡単な殺菌方法であり、強い殺菌効果が証明されている。しかし、熱によって食品の品質が変化することやエネルギー効率が悪いことが問題である。非加熱殺菌法には、パルス殺菌、紫外線殺菌、放射線化学的殺菌などが挙げられ、加熱殺菌の問題を解消できる殺菌法として期待されている。パルス殺菌法のなかでも、高電界パルス殺菌法は、熱や放電による殺菌ではなく、パルス電界により細胞膜に発生するMaxwell応力を利用している。そのため、他の方法に比して食品の品質に与える変化が少ない。

これまで多くの研究者達によって高電界パルス殺菌の研究が進められ、大腸菌、枯草菌、酵母などに対して高電界パルスを印加し、殺菌されることが示されている。これらの研究により電界強度と殺菌力の関係が示されており、電界が高いほど殺菌力が上昇することが報告されている²⁻¹⁵⁾。殺菌機構については、パルス電界により細胞膜に発生する電氣的圧縮による電気穿孔によりこれを破壊すること、臨界電圧以上で可逆的破壊または、不可逆的破壊が進行することが知られている⁸⁻¹⁵⁾。

本研究では、高電界パルスによる大腸菌殺菌におけるパルス印加回数-生存率特性に与える殺菌槽形状の影響を示し、さらに高電界パルス印加により大腸菌の長さが無印加のものより増大し、増殖を阻害する効果を示したことから報告する。

2. 高電界パルスによる殺菌モデル

図1に高電界パルスによる殺菌のモデル⁸⁻¹⁵⁾を示す。細胞の表面は細胞膜で覆われ、細胞の内部は、主に細胞質で構成されている。電氣的にみると、細胞膜の脂質二重層は絶縁体で、細胞質はイオンを含んでおり導電性流体である。高電界パルスを細胞に印加すると、細胞質内外のイオンの移動によって細胞膜の両側に電位差が発生する。この電位差によってMaxwell応力が発生し、細胞膜を圧縮する。その圧縮により細胞膜が薄くなることで電気絶縁破壊が生じ、孔があく。電位差が小さい時は孔が小さいため、細胞は自己修復をして孔をふさぐことができる(可逆的破壊)。電位差が大きい時は孔が大きいため、細胞は自己修復ができなくなり、細胞死に至ると考えら

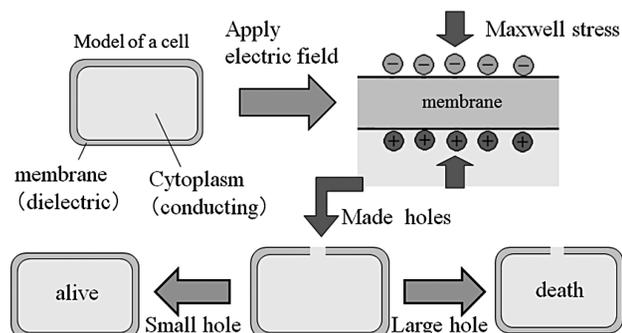


図1 高電界パルスによる殺菌
Fig.1 High electric field pulse sterilization.

キーワード：高電界パルス、液体食品、大腸菌、細胞分裂

* 名城大学理工学部電気電子工学科

(〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口 1-501)

Department of Electrical and Electronic Engineering,
Faculty of Science and Technology, Meijo University,
Shiogamaguchi 1-501, Tempaku-ku, Nagoya 468-8502, Japan.

** (元)名城大学農学部

(〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口 1-501)

(Retirement) Faculty of Agriculture, Meijo University,
Shiogamaguchi 1-501, Tempaku-ku, Nagoya 468-8502, Japan.

¹ muramoto@meijo-u.ac.jp

れている (不可逆的破壊). Zimmermann 氏ら¹⁰⁾ によると細胞膜穿孔は, 電位差が約 1 V を超えると生じると報告されている.

3. 実験方法

使用した大腸菌は無害なもの (JM103) を用い, 実験試料は菌を培養した液体培地を純水で 10 倍に薄めたものとした. 液体培地 (Luria Broth) は tryptone (1 wt%), 酵母エキス (0.5 wt%), NaCl (0.5 wt%), 純水 (98 wt%) の混合液である. 試料の導電率は, 約 130 m S/m であった. 実験試料を殺菌槽に入れパルス電圧を印加することで殺菌した. 殺菌槽は, 平行平板電極槽 (電極寸法 60 mm × 50 mm, 電極間距離 4 mm) と同軸円筒電極槽 (内部電極の直径 5 mm, 電極間距離 5 mm, 深さ 45 mm) を用いた. 図 2 に平行平板電極槽, 図 3 に同軸円筒電極槽を示す.

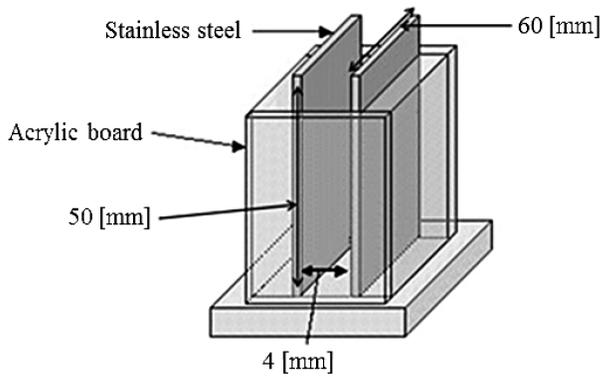


図 2 平行平板電極槽
Fig.2 The parallel plane electrodes tank.

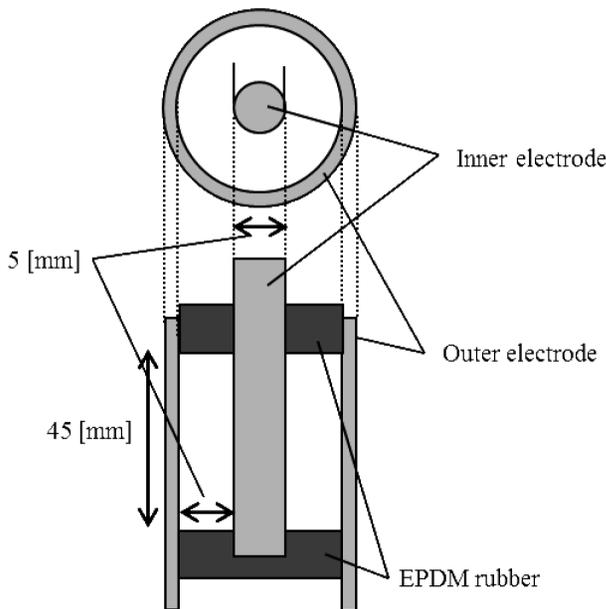


図 3 同軸円筒電極槽
Fig.3 The coaxial cylindrical electrodes tank.

図 4 に本実験で使用した回路図を示す. パルス電圧印加には, インパルス電圧発生器 (東京変圧器 (株) 898101) を使用した. 平行平板電極槽では, 一方を接地し, 他方に高電圧を印加した. 同軸円筒電極槽では, 外部電極を接地し, 内部電極をインパルス電圧発生器の出力に接続した. コンデンサに 88 kV (22 kV × 4) 充電し, 直列放電ギャップを放電により短絡させることで, パルス電圧を殺菌槽に印加した. 印加電圧は負極性, 殺菌槽内外で放電が起こらない波高値とした. 殺菌槽にかかる電圧は, 分圧器 (IWATSU ELECTRIC CO.LTD, HV-P30) を通してデジタルオシロスコープで測定した. 図 5 は, 実験試料の入った殺菌槽に印加したパルス電圧波形を示す. 波形は, 両電極槽に対して同じであり, 波高値 5.6 kV, 波頭長 2.8 μs, 波尾長 16.1 μs とした. またパルス印加間隔は, 約 60 秒であった.

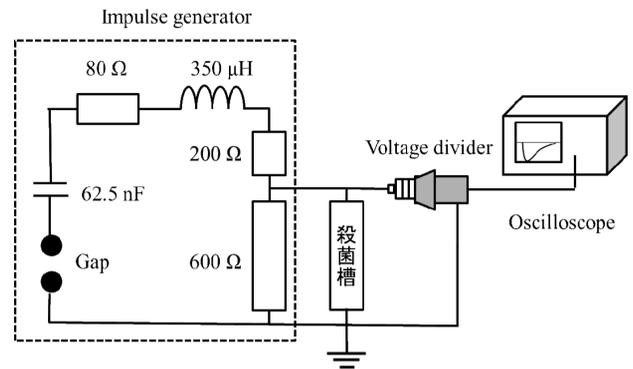


図 4 高電界パルス印加回路
Fig.4 High electric field pulse application circuits.

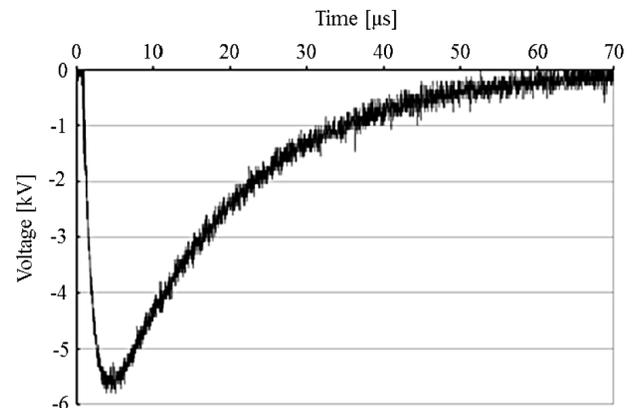


図 5 パルス印加波形
Fig.5 The shape of the voltage pulse.

殺菌槽内の電界は, 図 2 に示す平行平板電極槽では, 平等電界で 14 kV/cm となり, 図 3 に示す同軸円筒電極槽では, 内部電極に近い程大きく, 最大で 20 kV/cm, 最小で 6.7 kV/cm となる. パルス電圧を両殺菌槽に 50 回印加した. 印加 1 回ごとに殺菌槽を振って攪拌し, さらに印加 10 回ごとにコロニー計数法で生菌数を測定した. ま

たパルス電圧を印加した大腸菌と印加していない大腸菌をグラム染色し、光学顕微鏡で観察も実施した。

コロニー計数法とは、試料の生菌数を測定する方法である。十分に希釈した試料を寒天状の平面培地に広げて1日間培養するとコロニーがその培地上に形成される。ひとつのコロニーが1つの菌から分裂によって生ずるため、形成されたコロニー数を数えれば試料の生菌数が測定できる。

4. 実験結果及び考察

4.1 生菌率と印加回数との関係

生菌率 r_x を $r_x = n_x / n_0$ にて求めた。ここで、 n_0 はパルス電圧を印加する前の生菌数、 n_x は x 回のパルス電圧印加後の生菌数、 x は印加回数である。表1と図6に両電極槽での生菌率とパルス電圧印加回数依存性を示す。この結果は、同一の実験を5回行い、平均をとったものである。大腸菌の初期菌数は、 10^8 CFU/ml である。なお図6にはパルスを印加しない場合の生菌率の変化も示す。この場合、印加回数ではなく、0~50回の印加に要する時間0~50分に対して生菌率の変化を示してある。パルス印加が

無い場合には、殺菌はされていないことが確認できる。

生菌率は、パルス電圧の印加回数の増加に従い、減少する。しかし、生菌率の減少は、ある印加回数を超えると小さく、緩やかになる。これは、大腸菌の大きさの相違や菌の溶液中の分布によりパルス電界が細胞膜に印加されにくくなり、菌が生き残るためであると考えられる。

平行平板電極槽での生菌率は、パルス電圧印加20回後から減少していない。これは平行平板電極槽にかかる電界が平等電界であり、小さな菌を殺すことができず、生き残ったためと考えられる。

同軸円筒電極槽では、パルス電圧印加回数の増加に対して、生菌率は減少し続けている。攪拌により高電界領域に移動した菌は、小さくても殺菌されやすくなる。したがって生菌率は減少したと考えられる。

4.2 パルス印加後の大腸菌観察

図7に高電界パルス印加直後の大腸菌を、図8に高電界パルス無印加の大腸菌の写真を示す。ここで高電界パルスは、同軸円筒電極槽(図3)にて50回印加した。これらの写真は、多くの菌が存在する領域で撮られたもの

表1 生菌率
Table.1 The survival rate.

Number of pulses	Survival rate	
	The coaxial cylindrical tank	The parallel plane electrodes tank
0	1	1
10	2.64×10^{-2}	2.46×10^{-2}
20	6.4×10^{-4}	4.3×10^{-3}
30	1.6×10^{-4}	5.7×10^{-3}
40	7.6×10^{-5}	3.1×10^{-3}
50	3.5×10^{-5}	3.2×10^{-3}

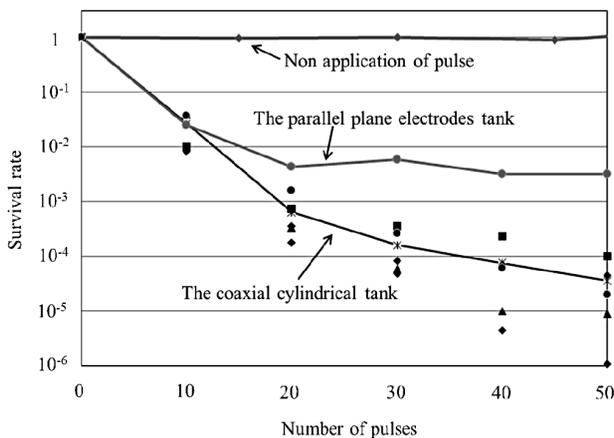


図6 生菌率のパルス印加回数依存性
Fig.6 The survival rate as a function of the number of pulses.

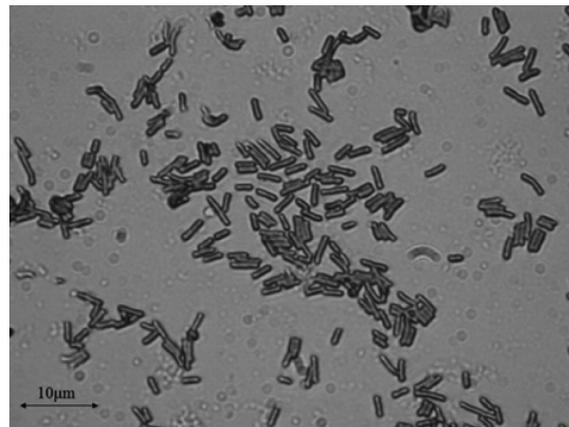


図7 パルス電圧印加直後の大腸菌
Fig.7 E. coli just after the pulse application.

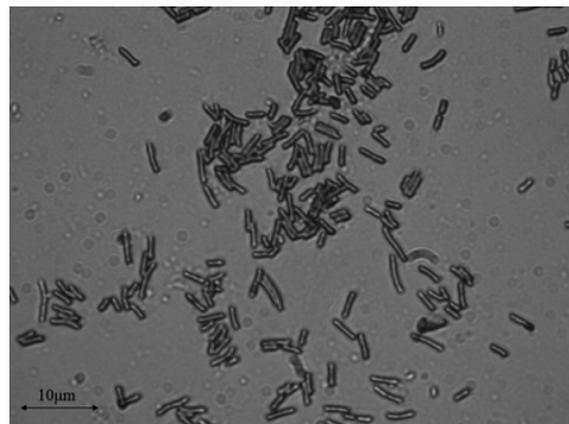


図8 パルス電圧無印加の大腸菌
Fig.8 E. coli without the pulse application.

で、写真に写っている菌の数は生菌率と関係はない。これらの写真から 100 個の大腸菌の長さを測定して得た長さ分布を図 9 に示す。図 9 の分布は、高電界パルスの印加直後には、大腸菌の長さに差がないことを示している。

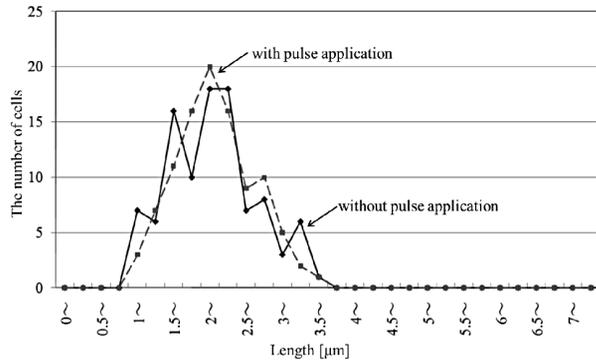


図 9 パルス電圧印加直後と無印加の長さ分布
Fig.9 Distribution of cell length just after the pulse application.

図 10 に高電界パルス印加 2.5 時間後の大腸菌の写真を、図 11 に高電界パルス無印加の大腸菌の写真を示す。

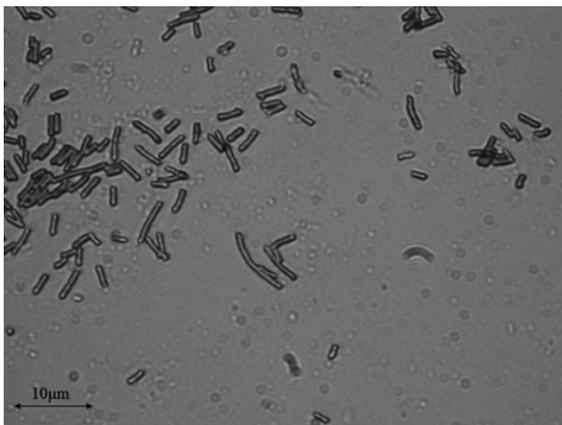


図 10 パルス電圧印加から 2.5 時間後の大腸菌
Fig.10 *E. coli* with the pulse application after 2.5 hours.

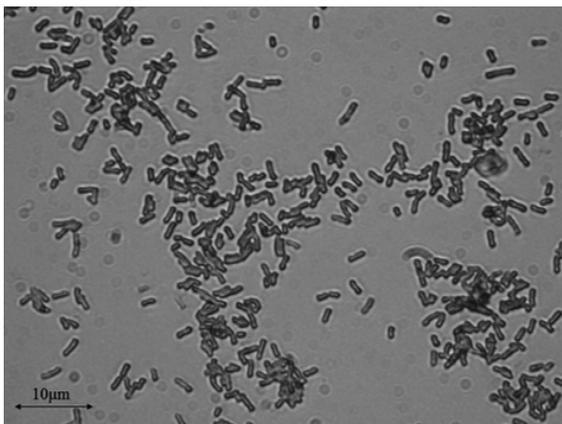


図 11 パルス電圧印加から 2.5 時間後の無印加の大腸菌
Fig.11 *E. coli* without the pulse application after 2.5 hours.

図 11 は、図 10 と同じ時間が経過した後、撮影したものである。図 10, 11 に写っている菌の数は、図 7, 8 と同様に生菌率とは関係はない。これらの写真においても 100 個の大腸菌の長さを測定して得た長さ分布を図 12 に示す。この分布では、高電界パルスを印加した大腸菌が無印加の菌に比べ長くなっていることが示された。さらに t 検定にてパルス印加の有無による大腸菌の長さの有意差を評価したところ 99.9999% 以上の棄却率にて評価でき、パルス印加有の大腸菌は、パルス印加無しのものに比べて長くなることが確認された。

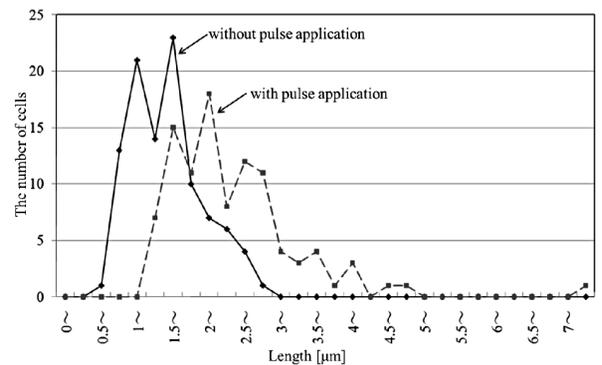


図 12 パルス電圧印加から 2.5 時間後の長さ分布
Fig.12 Distribution of cell length after 2.5 hours from the pulse application.

高電界パルス印加が、印加から 2.5 時間後の大腸菌の長さ分布に変化を与え、さらにコロニー計数法で求めた生菌率が大きく低下している。図 13 に著者らの推測した細胞分裂の過程に及ぼす高電界パルス印加の影響を示す。大腸菌は一般に時間とともに DNA が複製 (DNA 複製期) され、伸長し約 2 倍の長さになると 2 つに分裂 (細

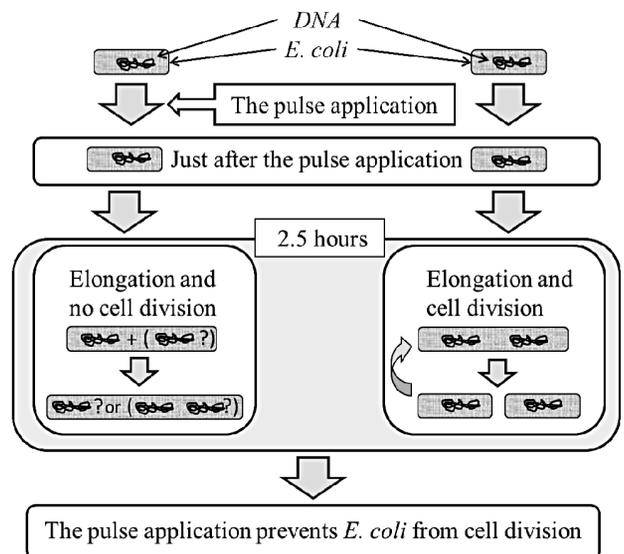


図 13 細胞分裂の過程に及ぼす高電界パルス印加の影響
Fig.13 Effect of high electric field pulse on cell division.

胞分裂期)する。そして、DNAの複製および伸長、分裂を繰り返して増殖をする¹⁶⁾。一方、高電界パルスを印加された大腸菌は伸長できる。しかし、コロニー計数法によって測定された生菌率が減少していることから、大腸菌は分裂できないこと、即ち増殖できないことが示された。本実験の結果からは、高電界パルスがDNAの複製を阻害したのか、細胞分裂を阻害したかは不明である。今後、DNAが複製されているかを検討する必要がある。

図14に一般的な長さの約10倍長い大腸菌を示す。これは図10と同様の条件によって得られた。図14に示すような極めて長い大腸菌が存在することからも、高電界パルスが大腸菌のDNAの複製および細胞分裂の一方又は両方を阻害することが支持される。

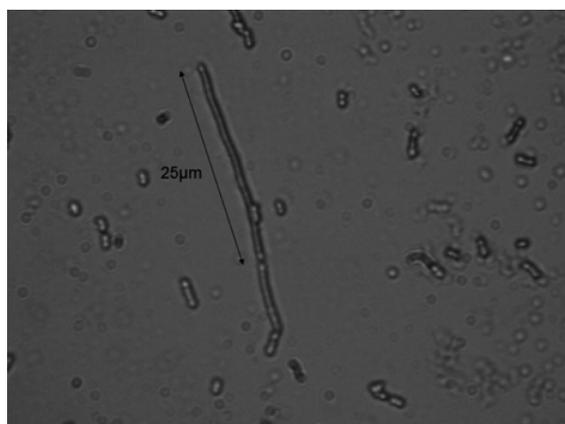


図14 通常の長さの約10倍の大腸菌
Fig.14 10 times length of *E.coli*.

図6から高電界パルス殺菌後の生菌率が、大きく減少しているにもかかわらず、印加後に撮影した写真(図7, 10)に大腸菌は写っている。つまり、高電界パルス殺菌後の大腸菌の多くは、分裂することができないが、原形を保っている。原形を保つことができなかった菌数は、直接、顕微鏡観察による計数法を用いることで測定することができる。これらの分裂できない大腸菌は、少なくとも染色の時点までは生きており、その後の生死は明確ではない。しかし、増殖して多数となった菌が害毒を及ぼすので、増殖の能力を奪えば無毒化したことになり、殺菌の目的は達していると考えられる。

5. まとめ

大腸菌を含んだ液体に高電界パルスを印加し、殺菌した結果、以下の結論を得た。

(1) 大腸菌の生菌率は、パルス電圧の印加回数の増加に従って減少した。平行平板電極槽と同軸円筒電極槽との生菌率を比較したところ、平行平板電極槽より

も同軸円筒電極槽での生菌率は、パルス電圧印加回数増加に対して大きく減少した。

(2) パルス電圧印加後の大腸菌を観測したところ、菌の長さが長くなっていることがわかった。高電界パルス印加が大腸菌のDNAの複製および細胞分裂の一方又は両方を阻害することが示唆された。

参考文献

- 1) 高野光輝：食品の殺菌－その科学と技術－，pp.12, 19,20,327,328, (株)幸書房 (1998)
- 2) Grahame W, Gould：New Methods of Food Preservation, Springer, pp.244-245 (1995)
- 3) 佐藤正之：水中パルス電界による微生物の殺菌. 化学工学論文集, **14** (1988) 566
- 4) 清水光浩：高電圧パルスによるイースト菌の破壊. 静電気学会誌, **13** (1989) 322
- 5) 佐藤正之：高電圧パルスによる微生物制御. 日本食品工学会誌, **8** (2007) 191
- 6) Takayuki Ohshima, Kaneko Okuyama and Masayuki Sato: Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of *Escherichia coli*. Journal of Electrostatics, **55** (2002) 227
- 7) D. Garcia, N. Gomez, S. Condon, J. Raso and R. Pagan: Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology, **36** (2003) 140
- 8) Humberto Vega-Mercado et al: Non-thermal food preservation: Pulsed electric fields. Trends in Food Science & Technology, **8** (1997) 151
- 9) 王斗艶, 秋山秀典：パルスパワーによる液中の殺菌・バイオ応用. 静電気学会誌, **37** (2013) 132
- 10) U. Zimmermann, G. Pilwat and F. Riemann：DIELECTRIC BREAKDOWN OF CELL MEMBRANES. Biophysical Journal, **14** (1974) 881
- 11) 葛西道生, 稲葉浩子：高電圧パルスによる細胞穿孔のメカニズム. 蛋白質核酸酵素, **31** (1986) 1591
- 12) 杉村厚, 清水伸：電気穿孔法. 化学と生物, **29** (1991) 54
- 13) 佐藤正之：パルス殺菌技術. 食品と技術, 2008年7月号 (2008) 1
- 14) 大島孝之, 谷野考徳：水中における高電圧パルス電界・放電の発生と利用. 静電気学会誌, **35** (2011) 114
- 15) T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar, D. Miklavcic and M. Tarek：Cell Membrane Electroporation – Part 1: The Phenomenon. IEEE Electrical Insulation Magazine, **28** (2012) 14
- 16) 太田行人, 岡田節人, 岡田善雄 編：岩波講座現代生物化学3 細胞の構造と機能II, p.171, 岩波書店 (1975)