

高電界パルスを用いた液体培地中の大腸菌殺菌に及ぼす パルス間隔と液体温度の影響

村上 祐一^{*、1}, 村本 裕二^{*}, 清水 教之^{*}

(2015年7月13日受付; 2015年9月11日受理)

Effect of Pulse Interval and Temperature on Sterilization of *Escherichia coli* in Liquid Medium by High Electric Field Pulse

Yuichi MURAKAMI^{*、1}, Yuji MURAMOTO^{*} and Noriyuki SHIMIZU^{*}

(Received July 13, 2015; Accepted September 11, 2015)

We have been investigating the sterilization of liquid food by high electric field pulse. The sample was *Escherichia coli* (JM103) in liquid medium. High voltage pulse (-5.32 kV) was applied to the sample varying pulse interval 60 seconds, 120 seconds, or 180 seconds. Experiments were carried out at room temperature region ($+17.3$ °C \sim $+25.7$ °C) and at low temperature region (-1.2 °C \sim $+3.0$ °C). As a result, the survival rates for all samples decrease with increase in the number of pulses. The survival rate at low temperature region is higher than that at room temperature region. At low temperature region, the survival rate for 60 seconds interval is lower than that for 120 and 180 seconds interval. On the other hands, at room temperature region, the pulse intervals of 60 and 120 seconds show almost the same survival rate.

1. はじめに

加熱殺菌は、比較的簡単に高い殺菌効果が得られることから、食品の殺菌方法として広く使われてきた。一方、加熱殺菌には、食品の品質劣化、ビタミン類や栄養成分の破壊、食品の香りや色調の変化を引き起こす問題がある。非加熱殺菌は、これらの加熱殺菌の欠点を解決するため、あるいは加熱殺菌が出来ない食品を殺菌するために提案されてきた¹⁾。高電界パルス殺菌法は、非加熱殺菌法の1つであり、主に液体食品の非加熱殺菌法として研究されている。高電界パルス殺菌法は、液体中の細胞にパルス電界を印加することで、マクスウェル応力により細胞膜を機械的に圧縮し、それにより形成される孔から、細胞内容物(DNAやタンパク質等)が細胞外へ漏出することで、殺菌すると考えられている^{2,3)}。パルス殺菌処理の殺菌効果は、液体試料の温度に強く依存し、温度が高くなると殺菌され易くなると報告されている^{4,7)}。その理由の1つとして、細胞膜の流動性が高温で上昇するからだと考えられている。一般的な細胞膜はリン脂質

分子の二重層から構成される。液体試料の温度が高いとき、リン脂質分子は動き易くなり、細胞膜の流動性は高くなる。よって、パルス電界印加により、二重層の配列は容易に乱され、細胞膜は破壊され易くなる。また、パルス電界印加により殺菌されなかった細胞は、穿孔を免れたか、あるいは細胞膜に形成された孔を修復できたものと考えられている⁸⁻⁹⁾。この修復機構は、主にリン脂質分子の移動によるものであり、修復時間は、細胞膜の流動性に依存することが予想される。これまでに、高電界パルス殺菌は、印加電界強度¹⁰⁾、印加回数¹⁰⁻¹¹⁾および液体試料のpH⁷⁾など、さまざまな要因に影響されると報告されている。本研究では、温度とパルス電圧の印加間隔がパルス殺菌に及ぼす影響について検討し、細胞膜の修復の観点から考察した。

2. 実験方法

2.1 実験試料

殺菌対象は、*Escherichia coli* JM103である。この菌を液体培地(1 wt% Tryptone, 0.5 wt% Yeast Extract, 0.5 wt% NaCl, 98 wt% 蒸留水)中で振とう培養(37°C, 24時間)させた。実験試料は、培養した液体培地から1 mLを採取し、これに滅菌した蒸留水9 mLを入れたものである。実験試料の初期菌数は 10^7 CFU/mLである。この試料を殺菌槽内に6 mL入れた。また、実験試料のpHおよび導電率をpH計(HM-30R型: TOADKK)および電気伝導率計(CM-30R型: TOADKK)を用いて測定

キーワード: 高電界パルス, 大腸菌, パルス間隔, 温度

*名城大学大学院理工学研究科電気電子・情報・材料工学専攻

(〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口 1-501)

Division of Electrical and Electronic, Information, and Materials Engineering, Graduate School of Science and Technology, Meijo University, Shiogamaguchi 1-501, Tempaku-ku, Nagoya 468-8502, Japan

¹ 143441504@cgalumni.meijo-u.ac.jp

したところ、室温で試料の pH は約 6.5 であり、導電率は約 130 mS/m だった。

2.2 殺菌槽

図 1 に同軸円筒電極型殺菌槽の断面図を示す。電極はステンレスを用い、電極の固定には EPDM ゴムを使用した。内部電極直径は 5 mm で、電極間距離は 3 mm、深さは 80 mm である。円筒槽内の電界 $E(r)$ は、半径 r の関数として式(1)で与えられる。

$$E(r) = \frac{V}{r \cdot \ln \frac{R_2}{R_1}} \quad (1)$$

ここで、 V は印加電圧、 R_1 は内部電極の半径 (2.5 mm)、 R_2 は外部電極の内半径 (5.5 mm)、 r は半径を示す。

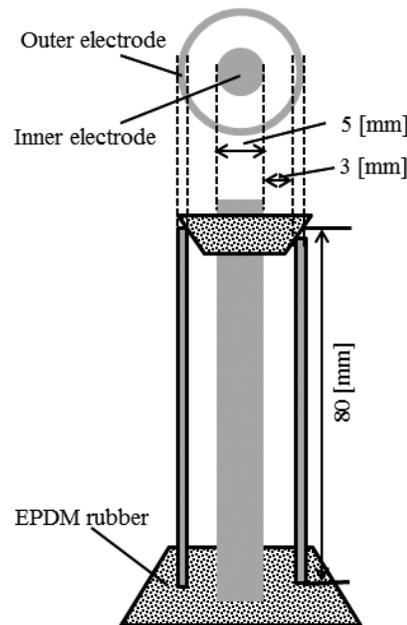


図 1 同軸円筒電極型殺菌槽
Fig.1 The coaxial cylindrical electrodes tank.

2.3 実験手順

図 2 に実験回路を示す。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。このインパルス電圧発生器は 4 段のマルクス回路構造であり、4 つのコンデンサにそれぞれ充電し、球ギャップを放電により短絡させることでインパルス電圧を得る。実験試料 6 ml を殺菌槽内に入れた。実験試料の温度を、 $+17.3^{\circ}\text{C} \sim +25.7^{\circ}\text{C}$ (室温) 領域と $-1.2^{\circ}\text{C} \sim +3.0^{\circ}\text{C}$ (低温) 領域とし、殺菌槽の内部電極にインパルス電圧発生器を接続し、波高値 -5.32 kV のパルス電圧を 30 回印加した。また、パルス電圧印加から次の印加までの時間間隔をパルス間隔とし、60 秒、120 秒、および 180 秒と変

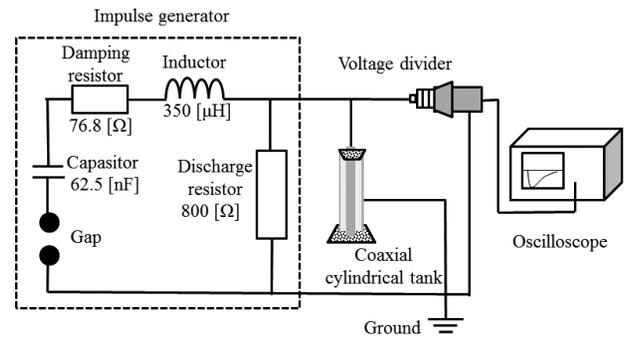


図 2 実験回路
Fig.2 Experimental set up.

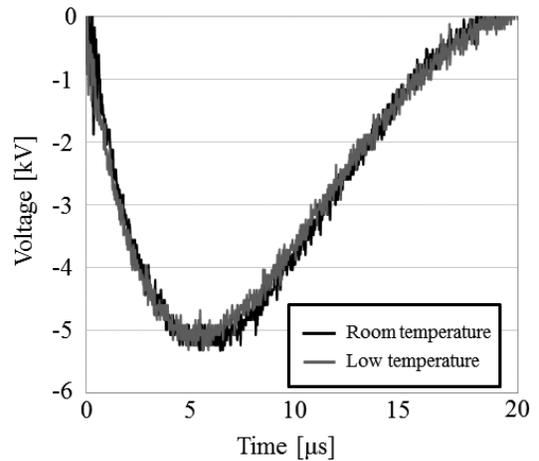


図 3 印加電圧波形
Fig.3 The waveform of applied pulse voltage.

えた。このとき、室温領域と低温領域の試料の導電率は異なっているため、殺菌槽のインピーダンスが変化し、同じ充電電圧では殺菌槽にかかる電圧の波高値が変化した。そのため、室温領域の試料では、60 kV を、低温領域の試料では 40 kV をそれぞれ充電し、殺菌槽にかかる電圧の波高値が同じ値になるよう調整した。殺菌槽にかかる電圧波形は分圧器 (IWATSU ELECTRIC CO. LTD, HV-P30) を通してオシロスコープ (Tektronix DPO4034) を用いて観測した。図 3 に印加電圧波形を示す。図 3 から、室温領域と低温領域の試料の印加電圧値はほとんど同じであることがわかる。波形についても、室温領域の試料の印加電圧波形の波頭長は、 $5.1 \mu\text{s}$ で、波尾長は $11.1 \mu\text{s}$ であり、低温領域では、それぞれ $5.5 \mu\text{s}$ 、 $11.5 \mu\text{s}$ とほぼ同じ値とみてよい。式(1)から殺菌槽内の電界強度は、内部電極付近で最大電界 2.67 kV/mm であり、外部電極付近で最小電界 1.22 kV/mm だと計算される。パルス電圧 1 回印加毎に、殺菌槽をよく振り攪拌させ、パルス電圧印加 10 回毎に大腸菌の生菌数をコロニー計数法により測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 試料の温度変化

図4にパルス間隔60秒における低温および室温領域の試料の温度変化を示す。図中の実線は、パルス電圧無印加時における試料の温度—時間特性を示している。図4から、無印加時において試料の温度はほとんど変化しないことがわかる。一方、破線はパルス印加時(60秒間隔)の試料の温度—パルス印加回数特性を示しており、試料の温度は印加回数の増加とともに上昇している。パルス間隔120および180秒の場合も同様で、室温領域では最大約5℃上昇し、低温領域では最大約3℃上昇した。

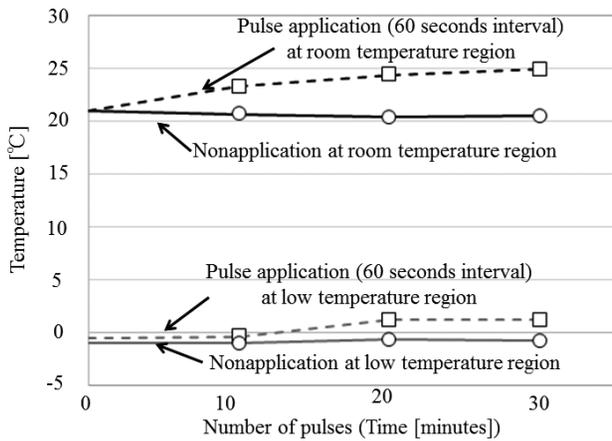


図4 試料の温度—パルス印加回数(時間特性)
Fig.4 The temperature of sample as a function of the number of pulses (time).

3.2 生菌率—パルス印加回数特性

生菌率 r_x を 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。

図5に無印加時の生菌率—時間特性を、図6および7に室温領域および低温領域の生菌率—パルス印加回数特性を示す。図中のマークは平均生菌率を、括弧内の数字は実験回数を、エラーバーは最小値と最大値を示す。なお、図6および7では、パルス間隔を変化させた結果も示してある。

図5は、パルス電圧を印加せず30分間(パルス電圧印加30回に必要な時間)放置した時の生菌率を示している。図5で、無印加時では各試料の生菌率は減少していないが、図6、7では、印加回数とともに生菌率が減少していることから、高電界パルス印加が大腸菌殺菌に有効であることが確認できた。

また、図6、7における生菌率の減少は、ある印加回数を超えると緩やかになっているように見える。パルス殺菌では、菌を含む液体にパルス電界を印加することで、

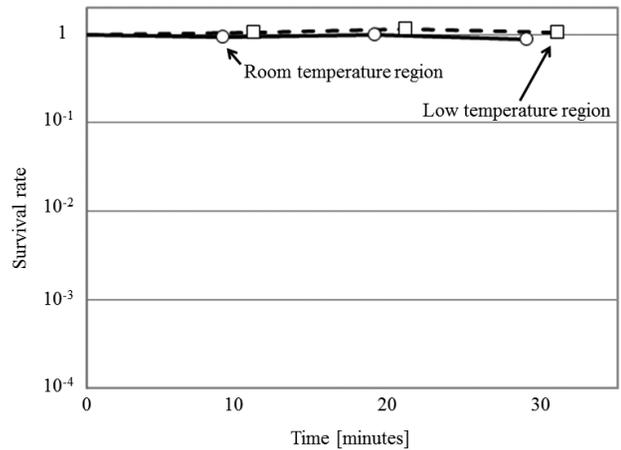


図5 無印加時の生菌率—時間特性
Fig.5 The survival rate as a function of the time with the no pulse application.

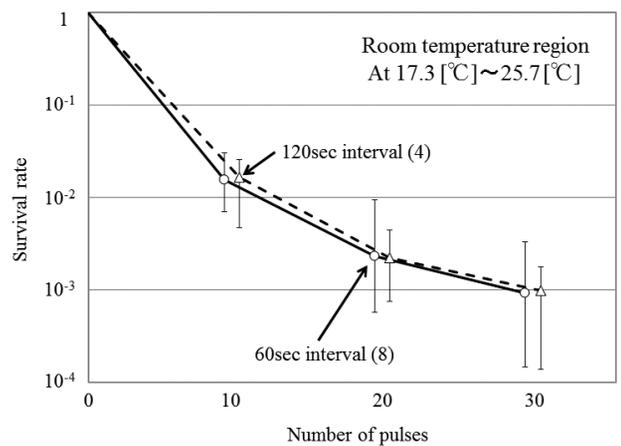


図6 室温領域の生菌率—パルス印加回数特性
Fig.6 The survival rate as a function of the number of pulses at room temperature region (+17.3°C ~ +25.7°C).

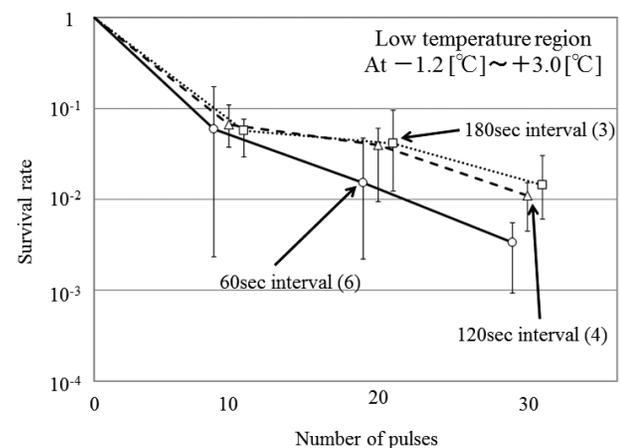


図7 低温領域の生菌率—パルス印加回数特性
Fig.7 The survival rate as a function of the number of pulses at low temperature region (-1.2°C ~ +3.0°C).

細胞膜に電位差を生じさせる。このとき、電位差が大きければ大きいほど、細胞膜は破壊されやすくなり、菌は

殺菌されやすくなる。電位差は菌の長さが長くなるほど大きくなると報告されている¹²⁾。また、本試料中の大腸菌 500 個の長さを光学顕微鏡写真から測定したところ、大腸菌の長さは、0.50~4.5 μm に分布していた。これらのことから、パルス印加回数の増加とともに、殺菌されやすい長い大腸菌の数は減り、生菌率の減少幅は小さくなることが考えられる。

3.3 温度の影響

図 6 および図 7 で同じパルス間隔のデータを比較すると、室温領域 (+17.3 °C ~ +25.7 °C) における大腸菌の生菌率は低温領域 (-1.2 °C ~ +3.0 °C) のものより低いことがわかる。温度がパルス殺菌に及ぼす影響は、多くの研究者により検討されている^{4,7)}。大嶋氏らは、5~50 °C の実験試料中の大腸菌にパルス電界 (16 kV/mm : 50 Hz) を印加し、試料温度が高くなると、生菌率は低くなると報告している⁴⁾。多くの研究者が、温度が高いほど殺菌効果が高いということを支持している^{4,7)}。この原因として、Marquez 氏らは、温度が高くなるほど溶液の導電率が増加し、導電率が高くなったから殺菌効果が高くなったと考えている⁵⁾。一方、大嶋氏らは、温度により細胞膜の流動性が変化するからだとして報告している^{4,7)}。図 8 に細胞膜の構造を示す。リン脂質から構成される細胞膜には流動性がある。細胞膜の構造は、低温ではゲル状態、高温では液晶状態になり、その転移温度は +20 °C ~ +40 °C と報告されている¹³⁾。パルス殺菌の機構は、細胞膜の破壊を利用したものであり、高電界パルス印加により生じるマクスウェル応力が、細胞膜を圧縮し、不可逆的に破壊することで殺菌すると考えられている。マクスウェル応力は、式(2)から求めることができ¹⁴⁾、大きくなるほど殺菌し易くなる。

$$F = \frac{1}{2} \epsilon_m E_m^2 \quad (2)$$

ここで、 ϵ_m は細胞膜の誘電率を、 E_m は細胞膜に生じる電界を示す。また、 E_m は式(3)から与えられる。

$$E_m = \frac{V_m}{d} \quad (3)$$

ここで、 V_m は細胞膜に生じる電位差を、 d は細胞膜の厚さを示す。

温度が高くなるほど、細胞膜を構成しているリン脂質は動き易くなる。細胞膜の流動性は高くなることから、パルス電界印加により二重層の配列は容易に乱され、細胞膜は破壊され易くなる。つまり、大腸菌は殺菌されやすくなることが予想される。また、温度が高くなるほど、細胞膜は無秩序な構造となるため、細胞膜は薄くなると報告されている¹⁵⁾。式(3)から、細胞膜が薄くなると、

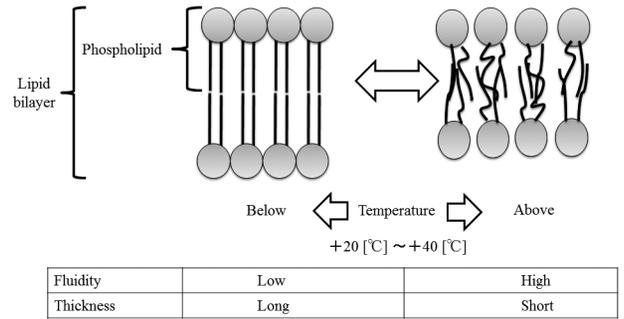


図 8 細胞膜の構造
Fig.8 The structure of cell membrane.

細胞膜に生じる電界は高くなり、式(2)からマクスウェル応力が大きくなることからわかる。よって、試料温度が高くなるほど、殺菌効果が高くなると考えられる。

一方、低温領域では、リン脂質は動き難くなり、細胞膜の流動性は低くなる。すなわち、低温領域におけるゲル状態の細胞膜は、パルス印加で生じるマクスウェル応力の圧縮力に対して高い抵抗力を持つ。また、低温では、細胞膜は厚くなると報告されており¹⁵⁾、式(2)および(3)から、マクスウェル応力が小さくなることからわかる。従って、低温領域では大腸菌は殺菌されにくいと考えられる。

3.4 パルス間隔の影響

図 6 の室温領域では、パルス間隔が 60 秒の生菌率と 120 秒のそれは、ほぼ同じ特性を示す。これに対し、図 7 に示す低温領域では、パルス間隔 60 秒の生菌率は、120 秒のそれより低い。180 秒の生菌率は 120 秒とほぼ同じである。以下にパルス間隔の効果の温度領域による違いについて考察する。

高電界パルス印加により細胞膜に形成された孔が小さく、細胞内容物の流出量が少量であり、膜の修復が可能な場合、大腸菌はその孔を修復し、生き続ける。この場合、パルス間隔が長くなるほど、細胞膜は修復されやすく、従って大腸菌は殺菌されにくくなることが予想される。この細胞膜の修復機構は、主に膜の流動性によるものであり、脂質分子の移動により修復されると考えられている¹⁶⁾。パルス電界印加により形成された孔は、印加が終了し電界が無くなると、リン脂質が移動することで修復が開始される。細胞膜の修復時間は、温度、膜の組成および塩環境などに影響され、酵母の細胞膜の修復時間¹⁷⁾は、約 180 秒、イカ巨大神経⁸⁾や人工膜⁸⁾では約 10 マイクロ秒、赤血球⁸⁾では、室温では数分程度、0~4 °C では数時間程度とそれぞれ報告されている。

+20 °C 以下では、細胞膜はゲル状態になり、流動性が低くなる。つまり、リン脂質が動きにくくなり、細胞膜は低温領域では修復されにくいことが考えられる。細孔

を閉じることに必要な時間がパルス印加の時間間隔より短いなら、高い生菌率を与える。一方、短い間隔、つまり次のパルスが修復し終えるまえに印加されたなら、形成された孔を通して電流が流れることで孔が拡大し⁸⁾、菌は殺菌されやすくなることが考えられる。図7の結果から、低温領域において、120秒と180秒間隔の生菌率が同程度であり、60秒間隔の生菌率が120秒あるいは180秒間隔の生菌率より低いことは、大腸菌の細胞膜の低温(-1.2℃~+3.0℃)における修復時間が、60秒~120秒の間にあることを示していると考えられる。

室温領域の細胞膜は、低温領域より流動性が高いことから、修復時間は短くなることが考えられる。低温領域では、60秒間隔の生菌率は120秒間隔のものより低かったが、図6から、室温領域において、60秒と120秒間隔の生菌率は同程度であることがわかる。これは、細胞膜の流動性が高くなったことで、細孔を閉じるのに必要な時間が60秒より短くなったからだと考えられる。これから、大腸菌の細胞膜の室温(+17.3℃~+25.7℃)における修復時間は60秒より短いことが示唆された。

4. まとめ

低温(-1.2℃~+3.0℃)あるいは室温(+17.3℃~+25.7℃)の大腸菌を含む液体培地に-5.32kVのパルス電圧を60秒、120秒、あるいは180秒間隔で30回印加し、以下の結果を得た。

- (1) 全ての実験試料の生菌率は、パルス印加回数の増加とともに減少した。しかし、ある印加回数を超えると、生菌率の減少は緩やかになった。
- (2) 低温領域の生菌率は室温領域のものより高かった。細胞膜の流動性が、室温領域よりも低温領域で低いことが原因と考えられる。
- (3) 低温領域では、60秒間隔の生菌率は120秒あるいは180秒間隔のものより低い。一方、室温領域では、60秒および120秒のパルス間隔ではほぼ同じ生菌率を示した。これらから、細胞膜の修復時間として、低温領域では60~120秒、室温領域では60秒以下であることが示唆された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、数々の技術的御指導および御助言を頂きました名城大学農学部加藤雅士教授および同大学農学部志水元亨助教に深く感謝致します。

参考文献

- 1) 松田敏生：非加熱殺菌技術による食品の殺菌と保存。

食衛誌, **41** (2000) 163

- 2) U. Zimmermann, G. Pilwat and F. Riemann : DIELECTRIC BREAKDOWN OF CELL MEMBRANES. *Biophysical Journal*, **14** (1974) 881
- 3) 大嶋孝之, 谷野孝徳：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
- 4) Takayuki Ohshima, Kanako Okuyama, and Masayuki Sato : Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of *Escherichia coli*. *Journal of Electrostatics*, **55** (2002) 227
- 5) V. O. Marquez, G. S. Mittal, and M.W. Griffiths : Destruction and Inhibition of Bacterial Spores by High Voltage Pulsed Electric Field. *Journal of Food Science*, **62** (1997) 399
- 6) H.Hülshager, J.Potel, E.-G. Niemann: Killing of Bacteria with electric Pulses of High Field Strength. *Radiat Environ Biophys*, **20** (1981) 53-65
- 7) Kristina Aronsson, Ulf Rönner : Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **2** (2001) 105
- 8) 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-遺伝子導入法の基礎-。蛋白質核酸酵素, **31** (1986) 1591
- 9) 杉村厚, 清水伸：電気穿孔法。化学と生物, **29** (1991) 54
- 10) H.Hülshager, J.Potel, E.-G. Niemann: Electric Field Effects on Bacteria and Yeast Cells. *Radiat Environ Biophys*, **22** (1983) 149-162
- 11) 村本裕二, 岡洋佑, 村上祐一, 清水教之, 市原茂幸：高電界パルス印加による大腸菌の伸長。静電気学会誌, **38** (2014) 108
- 12) 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
- 13) David L Nelson, and Michael M Cox: *Lehninger PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*, 4th edition, pp. 380-381, W.H. Freeman and Company
- 14) 秋山秀典：高電圧パルスパワー工学, pp. 33-36, オーム社 (2011)
- 15) 小澤美奈子：分子細胞生物学 第5版, pp. 127-133, 東京化学同人 (2005)
- 16) 市川厚：マッキー生化学—分子から解き明かす生命 (第4版), pp. 363-365, 化学同人 (2010)
- 17) 村治雅文, 建部渉：酵母のエレクトロポレーションについて。醸協, **91** (1996) 867