

高電界パルス印加による水溶液中の大腸菌殺菌
に関する研究

Study on Sterilization of *Escherichia coli* in Aqueous Solution
by Application of High Electric Field Pulse

村上 祐一

平成 28 年度 博士論文

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

論文概要

高電界パルス殺菌法は加熱殺菌法と比較して、液体食品中の栄養の変性や消費エネルギーが小さいことから、液体食品の新しい殺菌方法として注目されている。多くの研究者が高電界パルス殺菌法の研究を行ってきたが、殺菌機構は未だ不明な点が多い。従来までの殺菌法は、単に食品中の菌を殺すのみであった。近年では、高電界パルス殺菌法以外の非加熱殺菌法の研究が数多く進められており、複数の殺菌法を組み合わせることにより、我々に有益な菌は残し、害をなす菌だけ殺すという、“選択的殺菌技術”への応用も試みられている。選択的殺菌技術の実用化のためには、各々の異なる殺菌法のメカニズムの解明や、その殺菌効果の定量化が必要不可欠となる。そこで、本研究では、高電界パルスによる殺菌機構の解明と殺菌効果の定量化を目的とした。本論文は全 8 章で構成される。

第 1 章では、高電界パルス殺菌法の研究背景や殺菌原理を説明し、先行研究を紹介した。

第 2 章では、U. Zimmermann らが提唱する高電界パルス殺菌機構のモデルから算出した生菌率と、大腸菌を含む液体培地試料に波高値 -3.8 kV 、 -4.4 kV および -5.3 kV のパルス電圧を印加した後の生菌率を比較した。生菌率の計算では、細胞膜の電位差が 1 V 以上で菌が死滅すると仮定し、菌の長軸と電界方向のなす角、菌の長さや幅、印加パルス電圧波高値、パルス電圧印加回数を考慮した。その結果、生菌率の算出値と実験値は良く一致した。

第 3 章では、液体温度とパルス電圧の印加間隔が高電界パルスによる大腸菌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。その結果、低温領域($-1.2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim+3.0\text{ }^{\circ}\text{C}$)の大腸菌の生菌率は、室温領域($+17.3\text{ }^{\circ}\text{C}\sim+25.7\text{ }^{\circ}\text{C}$)のものより高かった。パルス電圧印加間隔の影響は、低温領域では 60 秒 間隔の生菌率が 120 秒 あるいは 180 秒 間隔のものより低く、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が得られた。これらから、大腸菌の細胞膜の修復時間として、低温領域では $60\sim120\text{ 秒}$ 、室温領域では 60 秒 以下であることが示唆された。さらに第 2 章を基に、温度を考慮した大腸菌の生菌率算出を試みた。生菌率の算出では、高電界パルス印加により細胞膜に生じる電位差が、室温では 1 V 、低温では 1.4 V 以上になると、大腸菌は死滅すると仮定した。その結果、室温領域では、算出値と実験値は良く一致した。一方、低温領域では、算出値と 120 秒 および 180 秒 間隔の実験値は同程度だったが、算出値と 60 秒 間隔の実験値の差は大きくなった。

第 4 章では、水溶液中のイオンが高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響について検討し、高電界パルス印加により細胞膜に働く Maxwell 応力の観点から考察した。その結果、大腸菌の生菌率は、水溶液中の電解質濃度(濃度範囲: $3.0\times10^{-5}\sim1.0\times10^{-2}\text{ mol/L}$)

が高くなるほど減少した。また、 1.0×10^{-2} mol/L の NaCl, KCl, CsCl, CsBr 水溶液中の大腸菌の生菌率は同程度であったことから、本研究で使用した電解質(NaCl, KCl, CsCl, CsBr)のイオンの半径、質量、水和半径および移動度は、生菌率に影響を及ぼさないことが示された。さらに第 2 章を基に、水溶液中の電解質濃度を考慮した生菌率の算出を試みた。電解質濃度 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ mol/L の範囲では、算出値と実験値は一致せず、濃度 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ mol/L の範囲では、算出値と実験値は近い値を示した。

第 5 章では、大腸菌を含む 1.0×10^{-3} mol/L のアミノ酸(L-Serine, L-Alanine, L-Histidine, L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)および電解質(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)試料にパルス電圧を 60 秒間隔で印加した。その結果、負電荷極性側鎖を持つアミノ酸(L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)と電解質(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)試料の生菌率は、パルス印加回数とともに大きく減少したが、無電荷極性(L-Serine)、非極性(L-Alanine)、および正電荷極性(L-Histidine)の側鎖を持つアミノ酸試料の生菌率の減少率は小さかった。これらの結果から、水溶液試料中の負イオンおよび負電荷の濃度が生菌率を支配していると考えられる。

第 6 章では、高電界パルス印加後あるいは無印加の大腸菌の長さを測定し、高電界パルス印加 2.5 時間後の大腸菌は、無印加 2.5 時間後の大腸菌より長くなっていることを報告した。通常、大腸菌は時間とともに伸長し、約 2 倍の長さになると 2 つに分裂する。そして、伸長と分裂を繰り返して増殖する。高電界パルスを印加した大腸菌が異常に伸長していたことから、高電界パルス印加が大腸菌の細胞分裂を阻害することが示唆された。この原因として、高電界パルス印加により細胞膜に形成された孔から、細胞分裂を行うために必要な細胞内容物が細胞外へ流れ出てしまったことが考えられる。

第 7 章では、大腸菌を含む牛乳にパルス電圧を印加し、殺菌実験を実施した。その結果、波高値 -4.4 kV のパルス電圧を印加した牛乳中の大腸菌の生菌率は、低温保持殺菌 (63°C で 30 分加熱)したものより高くなった。また、それぞれのパルス電圧印加時の投入エネルギーを、印加パルス電圧および電流波形から導出した結果、 -3.8 kV と -4.4 kV 印加時の大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性は同程度の傾きを持ち、その傾きの直線延長上に低温保持殺菌の結果がプロットされていた。一方、 -2.2 kV 印加時の大腸菌の生菌率は、投入エネルギーの増加にも関わらずほとんど減少していない。これらの結果から、高電界パルスによる殺菌は投入エネルギーのみに依存するわけではなく、印加するパルス電界の強さも重要であることがわかる。第 2 章での生菌率算出方法を用いて各波高値のパルス電圧印加に対して算出した生菌率と、実験にて得られた生菌率は大方一致した。また、高電界パルス殺菌法は、FTIR スペクトルで観測する限り、低温保持殺菌法および高温保持殺菌法(90°C で 15 分加熱)と比較して、牛乳の成分をほとんど変化させない可能性があることを示した。

第 8 章は、以上の内容を総括した。

目次

第1章 序論

1.1	はじめに	1
1.2	加熱殺菌法	1
1.3	非加熱殺菌法	2
1.4	高電界パルス殺菌法の原理	3
1.4.1	細胞膜に生じる電位差	3
1.4.2	細胞膜の破壊機構	5
1.4.3	Maxwell 応力による圧縮	7
1.4.4	Born エネルギー	7
1.4.5	孔の形成	8
1.5	高電界パルス殺菌法に影響を及ぼす要因	9
1.5.1	パルス電界印加システムの影響	9
1.5.1.1	印加パルス電界強度	9
1.5.1.2	印加電界のパルス幅および周波数成分	9
1.5.1.3	殺菌槽	9
1.5.1.4	液体試料	10
1.5.2	殺菌対象となる微生物の影響	10
1.5.2.1	微生物	10
1.5.2.2	細胞質の電気的特性	12
1.5.2.3	細胞膜の電気的特性	12
1.5.2.4	細胞周期	14
1.5.2.5	増殖影響因子	15
1.6	本研究の目的	17
1.7	論文構成	17
	参考文献	18

第2章 高電界パルス殺菌モデルを用いた生菌率の算出

2.1	はじめに	22
2.2	実験方法	22
2.2.1	実験試料	22
2.2.2	殺菌槽	25
2.2.3	実験手順	26

2.2.4	生菌数の測定	30
2.2.5	大腸菌のグラム染色方法	31
2.3	実験結果	33
2.4	考察	35
2.4.1	殺菌機構モデルによる生菌率の算出	35
2.4.2	算出結果と実験結果との比較	40
2.5	まとめ	44
	参考文献	45

第3章 液体温度とパルス間隔が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響		
3.1	はじめに	46
3.2	実験方法	46
3.2.1	実験試料	46
3.2.2	実験手順	46
3.2.3	実験試料の温度変化	48
3.3	実験結果	49
3.4	考察	51
3.4.1	温度の影響	51
3.4.2	パルス印加間隔の影響	52
3.4.3	温度を考慮した生菌率の算出	53
3.5	まとめ	55
	参考文献	56

第4章 水溶液中のイオンが高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響		
4.1	はじめに	57
4.2	実験方法	57
4.2.1	実験試料	57
4.2.2	実験手順	58
4.3	実験結果	63
4.3.1	生菌率のパルス印加回数特性	63
4.3.2	生菌率の電解質濃度特性	63
4.4	考察	67
4.4.1	イオン種の影響	67
4.4.2	水溶液中の電解質濃度の影響	68

4.4.3	電解質濃度を考慮した生菌率の算出	70
4.4.3.1	算出方法	70
4.4.3.2	生菌率の算出値と実験値のパルス印加回数特性	70
4.4.3.3	生菌率の算出値と実験値の電解質濃度特性	71
4.5	まとめ	74
	参考文献	75

第5章 水溶液中のアミノ酸が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響

5.1	はじめに	76
5.2	実験方法	76
5.2.1	実験試料	76
5.2.2	実験手順	79
5.3	実験結果	80
5.3.1	生菌率のパルス印加回数特性	80
5.3.2	生菌率の溶質濃度特性	82
5.4	考察	83
5.5	まとめ	85
	参考文献	86

第6章 高電界パルスによる大腸菌の伸長

6.1	はじめに	87
6.2	実験方法	87
6.2.1	実験試料	87
6.2.2	実験手順	87
6.3	実験結果および考察	90
6.3.1	生菌率のパルス印加回数特性	90
6.3.2	パルス印加後の大腸菌の観察	91
6.4	高電界パルス印加による大腸菌の細胞内容物の漏出	97
6.4.1	高電界パルス印加による殺菌実験方法	97
6.4.2	アガロースゲル電気泳動方法	97
6.4.3	実験結果および考察	98
6.5	まとめ	102
	参考文献	103

第7章	高電界パルスによる牛乳中の大腸菌殺菌	
7.1	はじめに	104
7.2	実験方法	104
7.2.1	実験試料	104
7.2.2	実験手順	105
7.3	実験結果および考察	107
7.3.1	各殺菌処理と生菌率の関係	107
7.3.2	各殺菌処理の消費エネルギー	108
7.3.2.1	低温保持(63 °C, 30 分)殺菌の消費エネルギー	108
7.3.2.2	印加電圧電流波形から計算した消費エネルギー	108
7.3.3	高電界パルス印加による牛乳中の大腸菌の生菌率の算出	109
7.4	FTIR 法を用いた高電界パルス印加後の牛乳の成分解析	111
7.4.1	はじめに	111
7.4.2	実験方法	111
7.4.3	FTIR スペクトル観測	111
7.5	まとめ	115
	参考文献	116
第8章	総括	
8.1	本研究のまとめ	117
8.2	本研究の工学的意義	121
	研究実績	122
	謝辞	129

第 1 章 序論

1.1 はじめに

遠い昔から、我が国では微生物の力を借りて美味しい食べ物を作り続けてきた。我が国の伝統的な発酵食品である清酒，味噌，醤油，納豆は，微生物を無くしては作ることができない^[1]。科学技術が発展している現在では，様々な観点から微生物が研究されており，伝統に科学の力を加えて，さらに質の高い食品が作られ続けている。しかし，全ての微生物が我々に恩恵をもたらしてくれるわけではない。微生物の種類によっては食品中のタンパク質等を変性させ，さらに食中毒の原因にもなりうる。サルモネラ，腸炎ビブリオ，病原性大腸菌およびブドウ球菌などは，一時的に 10^6 個以上体内に取り込むことで食中毒を発症する^[2]。また，*Escherichia coli* O157:H7，*Vibrio cholerae* などの高い毒性を持つ病原菌による食中毒は，100 個程度を摂取することで発症すると言われている^[2]。これらの病原菌は食品に元々含まれているか，または加工の過程で付着してしまうため，食品の殺菌は重要である。一方，発酵食品などをつくるために必要な微生物は殺すわけにはいかない。以上のことから，食品中の微生物をコントロールする技術の開発は必要不可欠であると考えられる。

1.2 加熱殺菌法

加熱殺菌法は加熱蒸気，火炎，電熱，マイクロ波，赤外線，遠赤外線などにより食品を加熱し^[2]，微生物の細胞膜，タンパク質，酵素などを熱により変性させることで殺菌する。この方法は高い殺菌効果が簡単に得られるため，現在，液体食品の殺菌に広く使われている。生乳においては，乳及び乳製品の成分規格等に関する省令により 62～65℃で 30 分間加熱すること，あるいはこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌することが義務づけられている^[2]。表 1.1 に生乳の加熱殺菌法の種類を示す。低温保持殺菌法では，加熱による風味や栄養素の損失を抑えながら，病原菌を殺菌できる条件が設定してある。しかし，この殺菌法は，他の加熱殺菌法よりも牛乳中に残る一般細菌の量が多いため，比較的早く腐敗が進む。そのため，この方法によって殺菌された牛乳は，他のものより消費期限が短くなっている。近年では，パイプラインを通過させて 120℃～150℃で数秒間加熱殺菌する UHT(Ultra High Temperature: 超高温瞬間殺菌)法が一般的となっている。この殺菌法では，ほぼ全ての菌が殺菌される。中でも 140℃以上の UHT 法で殺菌され，無菌充填された滅菌乳は LL 牛乳(Long life 牛乳：ロングライフ牛乳)と呼ばれ，他の殺菌法よりも消費期限が長い^[3]。一方，高い温度で加熱すると多くの菌を殺菌することができるが，食品の栄養（タンパク質，炭水化物，ビタミン等）を劣化させ，品質（香り，色，食感等）を変化させてしまう。さらに食品中

の水分の比熱が大きいいため、液体の温度を高くするには、大量のエネルギーが必要である^[4]。加熱温度を低くすれば、食品中の栄養の劣化や品質の変化を抑えることができるが、殺菌効果は弱くなる。そのため、非加熱、常温で栄養の劣化や品質の変化を起こさず、全ての菌を殺菌する殺菌方法が求められている。

表 1.1 生乳の加熱殺菌法の種類^[2]

Table 1.1 Type of thermal sterilization for raw milk^[2]

方法名	処理
低温保持殺菌 (Low Temperature Long Time:LTLT 法)	62～65 [°C]で 30 分加熱
高温保持殺菌 (High Temperature Long Time:HTLT 法)	75 [°C]以上で 15 分以上加熱
高温短時間殺菌 (High Temperature Short Time:HTST 法)	72 [°C]以上で 15 秒以上加熱
超高温瞬間殺菌 (Ultra High Temperature:UHT 法)	120～150 [°C]で 1～3 秒以内加熱

1.3 非加熱殺菌法

非加熱殺菌法は冷殺菌法とも呼ばれ、加熱による殺菌以外の殺菌方法である。この殺菌法は物理的手法と化学的手法に分けることができる^[5]。化学的手法には、次亜塩素酸ナトリウム^[6]や放射線^[7]による殺菌などがある。これらの手法では、塩素や放射線などにより化学的に微生物の細胞膜の破壊、DNA を切断することで殺菌する。また、閃光パルス殺菌法^[4]も化学的手法に含まれ、波長領域の広い光パルスによって殺菌する。この殺菌作用には、紫外線による殺菌と長波長域による熱効果が利用されている。対象食品が固体素材なら素材表面しか殺菌効果が得られないが、透明な液体素材なら食品全体に殺菌効果がある。処理時間は短いが、対象食品の表面の酸化反応による品質の劣化や素材に着香の可能性があることが問題とされている。一方、物理的手法には、高圧殺菌法、交流高電界殺菌法、高電界パルス殺菌法などがある。高圧殺菌法^[4]は、対象食品素材に圧力を加え、生体膜を物理的に損傷させることで殺菌する。高圧による大腸菌の殺菌効果は、梶山らにより報告されている^[8]。対象食品には圧力が均一に伝搬できる高水分状態が求められる。高圧によりタンパク質などの高分子成分は変性するが、低分子成分の分解や蒸散が少ないため、果実等の食材の殺菌に向いていると考えられている。交流高電界殺菌法^[4,9-11]は電気抵抗をもつ食品に電流を流すことによって、食品自身がジュ

ール熱により発熱することや高電界印加により微生物を物理的に損傷させることで殺菌する。これにより、液体食品中の微生物を瞬間的に殺菌することができる。高電界パルス殺菌法^[12-13]は対象食品に極めて短いパルス状の高電圧を印加する方法であり、放電による殺菌ではなく、高電界パルス印加によって細胞膜に発生する Maxwell 応力を利用している。そのため、放電を利用している殺菌法であるストリーマ放電殺菌法、スパーク放電殺菌法と比べて、高電界パルス殺菌は食品の品質に与える変化が少ないと考えられている。さらに、この殺菌法は対象食品の温度を上昇させることもない。

1.4 高電界パルス殺菌法の原理

1.4.1 細胞膜に生じる電位差

幅の短いパルス電圧を水中の電極間に印加する場合、水中でのイオンの移動速度が電子に比べて遅いためイオンを含む水であっても誘電体のような性質を示す。したがって、高電界パルスを細菌が懸濁する水中に印加すると、細菌は瞬間的に高い電界にさらされることになり、細胞膜は物理的に破壊される^[12-13]。

図 1.1 に高電界パルスによる殺菌機構の模式図を示す。殺菌対象である細菌は、細胞質と細胞膜から構成される。細胞質はイオンを含む液体であり、導電体とみなすことができる。細胞膜は電荷を持った物質を透過させないため、絶縁体として考えることができる。高電界パルスを細菌が懸濁する水中に印加すると、細胞膜に電位差が生じる。このとき、細胞膜上の誘導電荷が互いに引き合う力(Maxwell 応力)が細胞膜を圧縮し、孔を形成させる。形成された孔が全体の膜面積に対して小さいならば、リン脂質分子の移動により孔は閉じられる(可逆的破壊)。一方、孔の数が多い場合や、大きな孔が形成された場合には、膜は修復不可能な状態となる(不可逆的破壊)^[13-14]。細胞膜の修復不可能な破壊、あるいは形成された細孔から細胞内容物が細胞外へ漏出することによって、菌は死滅すると考えられている^[14]。

図 1.2 に液体中に存在する菌のモデルを示す。ここで、細胞は導電率 δ_p の細胞質を非常に薄い絶縁膜でくるんだ半径 a [m]の球でモデル化される^[13]。導電率 δ_m の水溶液に均一なパルス電界 E [V/m]を印加したとき、膜の導電率が細胞膜内外液と比べて無視できるほど低く、膜の厚さが半径 a に比べて無視できるほど薄い場合には、時間 t [s]のとき電界方向と角度 θ をなす膜の間に発生する電位差 V_m [V]は、式(1.1)で示される^[15]。

$$V_m(\theta) = faE \cos \theta \left[1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau} \right) \right] \cdots (1.1)$$

ここで、 f は菌の形状で決まる係数を示す^[15]。また、 τ [s]は時定数を示し、式(1.2)で求められる。

$$\tau = [\delta_p + 2\delta_m]^{-1} C_m a \cdots (1.2)$$

ここで、 δ_p は細胞質の導電率 [S/m]を、 δ_m は細胞外の水溶液の導電率 [S/m]を、 C_m は細胞膜の単位面積当たりの静電容量 [F/m²]を示す^[15].

また、形状係数 f は、図 1.2 に示すように球状の菌の場合には 1.5、大腸菌のような桿菌の場合には、式(1.3)のように与えられる^[16].

$$f = \frac{a}{a - 0.33d} \quad (1.3)$$

ここで、 d は半球の直径 [m]である.

電界 E を与えて十分時間が経って平衡に達した後では、式(1.1)は式(1.4)で近似的に表せる^[13,15].

$$V_m(\theta) = faE \cos\theta \cdots (1.4)$$

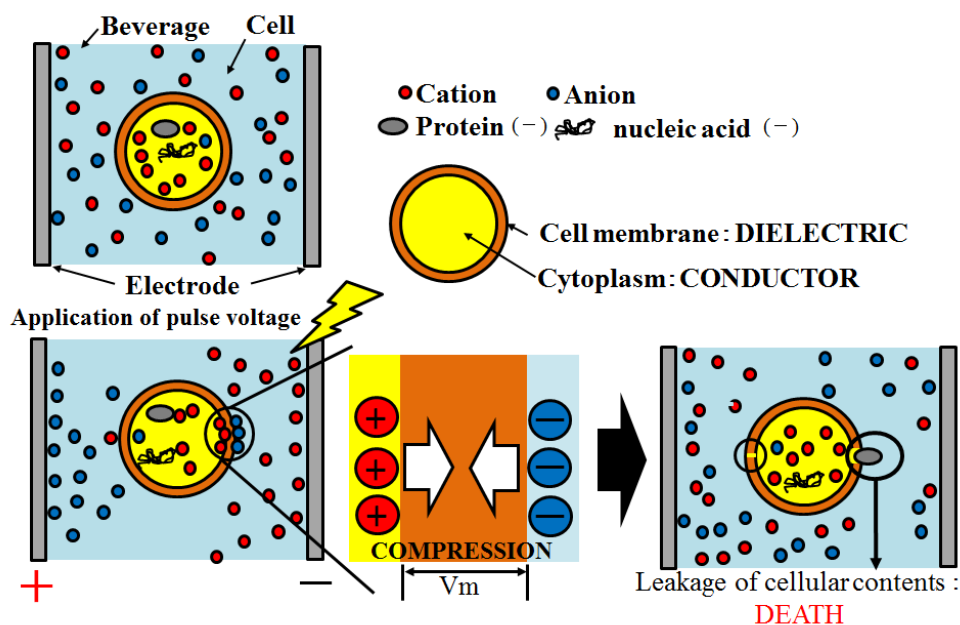


図 1.1 高電界パルスによる殺菌機構の模式図

Fig. 1.1 Schematic diagram of sterilization mechanism by high electric field pulse

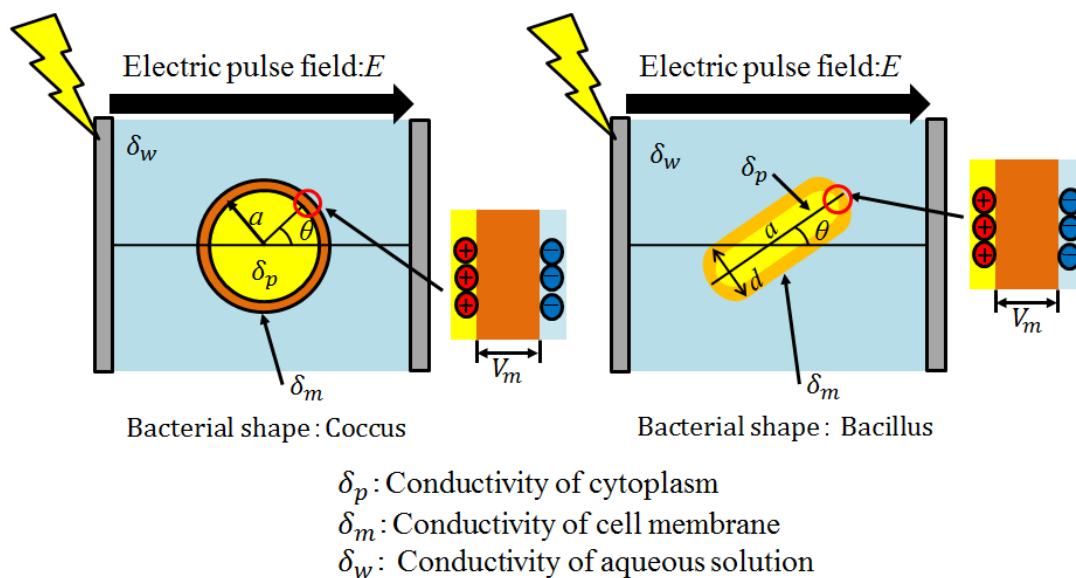


図 1.2 液体中に存在する菌のモデル
 Fig. 1.2 Model of bacteria in liquid

1.4.2 細胞膜の破壊機構

H. G. L. Coster は、巨大植物細胞のバロニア(*Valonia*)に電極を刺入し、幅 500 μs 程度の電流パルスを送る実験を実施した^[17]。図 1.3 にバロニアの膜の電流電圧特性を示す^[17]。図 1.3 から、約 850 mV まではバロニア膜の電流と電圧は比例しており、オームの法則に従っているように見える一方、約 850 mV で電流が不連続的に増加していることがわかる。図 1.4 に固体誘電体の電流電圧特性を示す^[18]。図 1.4 の領域 1 では、電流電圧特性がオームの法則に従う。領域 2 では電流電圧特性がオームの法則に従わなくなり、電流が指数関数的に増加する。領域 3 は破壊前駆領域であり、領域 2 よりさらに電流が急増し、固体誘電体は破壊に至る。図 1.3 と図 1.4 の電流電圧特性が良く似ていることから、細胞膜破壊機構は固体誘電体の破壊機構のモデルから考えられている。

その後の研究により、U. Zimmermann らは、細胞膜の破壊電圧は、菌の種類によらず約 1 V であると報告している^[16]。

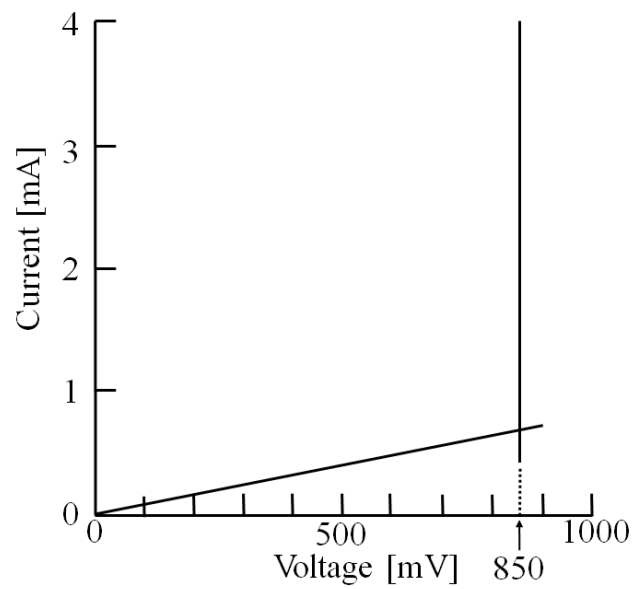


図 1.3 バロニアの膜の電流電圧特性^[17]

Fig. 1.3 I-V curve for cell membrane of *Valonia*^[17]

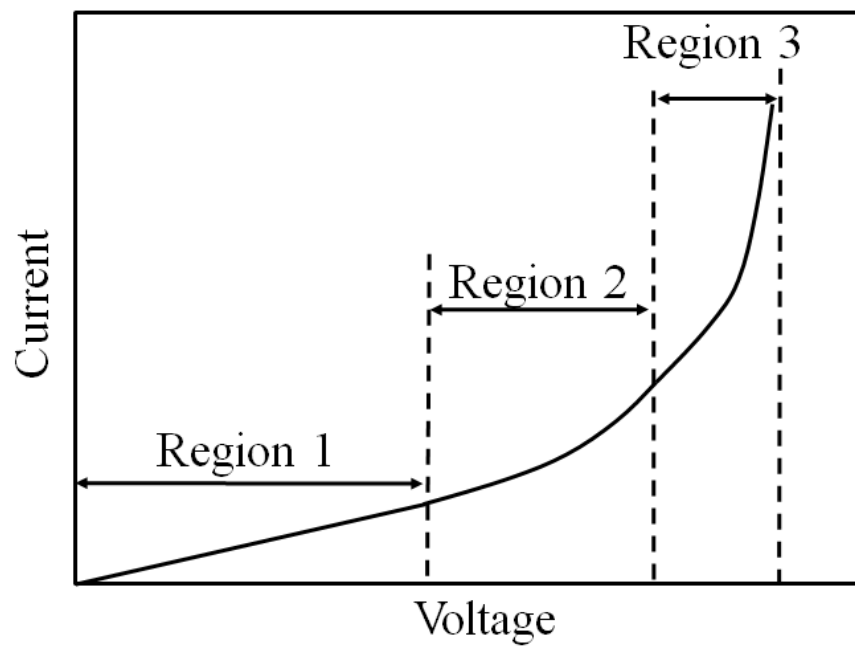


図 1.4 固体誘電体の電流電圧特性^[18]

Fig. 1.4 . I-V curve for solid dielectric^[18]

1.4.3 Maxwell 応力による圧縮

高電界パルス印加による細胞膜の破壊機構は、外部電界印加により細胞膜の電位差 V_m が高くなることによる、膜の絶縁破壊であると考えられている。固体誘電体の破壊機構の一つに、電気機械的な圧縮力(Maxwell 応力)による破壊機構がある。Maxwell 応力 F_m [N]の強さは、式(1.5)から求めることができる。

$$F_m = \frac{1}{2} \varepsilon_m \varepsilon_0 \left(\frac{V_m}{d_m} \right)^2 \cdot \cdot \cdot (1.5)$$

ここで、 ε_m は細胞膜の比誘電率を、 ε_0 は真空の誘電率 [F/m]を、 d_m は細胞膜の厚さ [m]を示す。膜電位 V_m が 1 V(細胞膜が絶縁破壊する電圧値)のとき、細胞膜を圧縮する Maxwell 応力 F_m は、 $\varepsilon_m = 2.1$ 、 $d_m = 2.8 \times 10^{-9}$ の値^[20]を参考にすれば、式(1.5)より $1.2 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ と求められる。膜で得られているヤング率は $5 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ であり^[15]、式(1.5)から算出した値と同程度であることから、Maxwell 応力の圧縮による細胞膜の破壊機構が多くの研究者に支持されている^[12,14-15,19]。

1.4.4 Born エネルギー

印加するパルス電界が高い場合には、Born エネルギーの効果が無視できなくなる。Born エネルギーとは水中のイオンが脂質の膜相に入るために必要なエネルギーであり^[21]、Born エネルギーに達するとイオンが水中から膜相に注入され、膜は破壊されることになる^[22]。Born エネルギー w [J]は、式(1.6)から求めることができる^[22]。

$$w = \frac{z^2 e_0^2}{8\pi \varepsilon_0 r} \left(\frac{1}{\varepsilon_m} - \frac{1}{\varepsilon_w} \right) \cdot \cdot \cdot (1.6)$$

ここで、 z はイオンの荷電数、 e_0 は素電荷 [C]、 r はイオン半径 [m]、 ε_0 は真空の誘電率 [F/m]、 ε_w は水の比誘電率である。いま、 r が $2 \times 10^{-10} \text{ m}$ 、 ε_m が 2.1、 ε_w が 80 とすると、1 価のイオン 1 mol 当たりに対する Born エネルギー w は、 $1.7 \times 10^5 \text{ J/mol}$ となる。一方、膜相が細胞膜のようなとても薄い層($d_m=2.8 \text{ nm}$ 程度)なら、式(1.6)は式(1.7)のように補正される^[22]。

$$w = \frac{z^2 e_0^2}{8\pi \varepsilon_0 r} \left(\frac{1}{\varepsilon_m} - \frac{1}{\varepsilon_w} \right) - \frac{z^2 e_0^2}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_m d_m} \ln \left(\frac{2\varepsilon_w}{\varepsilon_w + \varepsilon_m} \right) \cdot \cdot \cdot (1.7)$$

式(1.7)は、Born エネルギーは膜が薄くなると減少するということを示しており、式(1.7)での Born エネルギーは、 $1.6 \times 10^5 \text{ J/mol}$ となる。1 V の電位差下におけるイオンのエネルギーは 1 eV($9.6 \times 10^4 \text{ J/mol}$)であることから、式(1.7)から算出した Born エネルギーに達するためには、細胞膜に約 1.5 V の電位差を生じさせる必要がある。計算された Born エネルギーの値 1.5 V は、細胞膜の絶縁破壊電圧値である約 1 V と同じオーダーであることがわかる^[16]。

1.4.5 孔の形成

高電界パルス印加により破壊された細胞膜には孔が形成される。この孔の存在は、電界が存在しない環境では細胞膜を通して移動できない物質が、高電界パルスを印加することによって膜を透過できるようになることから確認されている。また、分子動力学シミュレーションによっても孔の存在は確認されている^[23-24]。孔の数は、破壊電圧に達した膜の面積に比例して増加する。膜の面積を一定とした場合、電界強度が高いほど、孔の数は増加すると考えられている^[15]。この孔の大きさは、直径およそ数 nm～数十 nm オーダーとされている。印加する電界強度が高いほど大きな孔が形成される。また、孔の形成に続いて 2 次的な現象として、形成された孔をイオンなどが通ることにより電流が流れ、孔が拡大されることも考えられる^[15]。細胞膜に形成される孔の大きさを調査した研究としては、DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine : ジパルミトイルホスファチジルコリン) の小胞($d=95\pm 5$ nm) に減衰波(時定数 τ : 60 μ s) を印加した場合、膜の破壊電界強度付近(31~33 kV/cm) にて形成された孔は K^+ を通すが、 Na^+ は通さず、これよりも高電界にさらすと、ショ糖なども通る大きな孔が形成されるという結果が報告されている^[15]。

高電界パルス印加により細胞膜上に孔を形成する技術は、様々なことに利用されている。エレクトロポレーション法はその利用法の一つであり、高電界パルス印加により形成された孔を通して、細胞外の薬剤等を細胞内へ導入する技術である。そして細胞膜の破壊が可逆的であるなら、この孔は時間とともに修復される^[25]。図 1.5 にエレクトロポレーションの概略図を示す。エレクトロポレーション法による遺伝子等の導入は、化学的導入法に比べて、操作が簡便で処理時間が短く、さらに無毒性などの点で優れている^[26]。

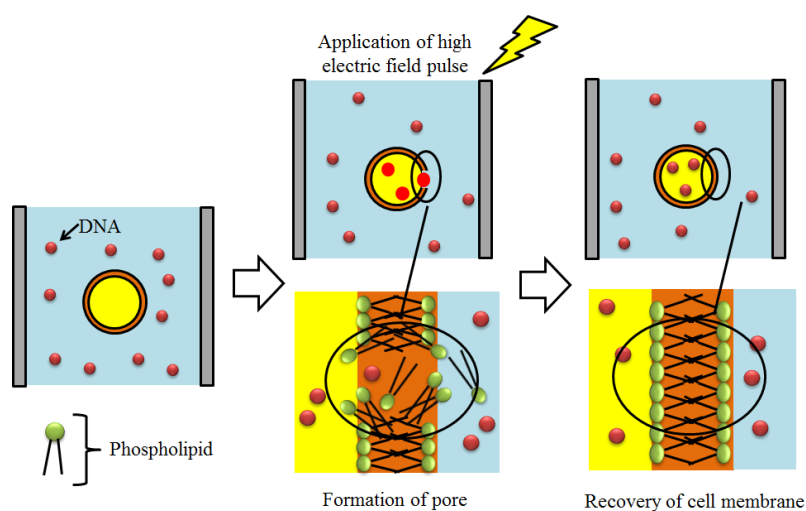


図 1.5 エレクトロポレーションの概略図

Fig. 1.5 Schematic diagram of electroporation

1.5 高電界パルス殺菌法に影響を及ぼす要因

1.5.1 パルス電界印加システムの影響

1.5.1.1 印加パルス電界強度

高電界パルスによる殺菌は、印加するパルス電界(強度や幅)や殺菌対象となる微生物の種類等に影響される。印加するパルス電界強度が高いほど殺菌効果が高くなることは、多くの研究者により報告されている^[27-30]。これは、印加する電界が高くなるほど、細胞膜に生じる電位差が高くなり、細胞膜に孔が形成されやすいためである。また、高電界パルスを印加する回数が多いほど、殺菌効果が高くなることも報告されている^[28-32]。

1.5.1.2 印加電界のパルス幅および周波数成分

印加するパルス電圧のパルス幅も高電界パルス殺菌法の殺菌効果に影響を及ぼす。高電界パルス印加により細胞膜に孔が形成され、破壊された部分を通して電流が流れ、孔が拡大されていくこと^[15]から、細胞膜の破壊電圧より高い電圧値のパルス電圧を印加するとき、同じ電圧値ならパルス幅が大きいほど大きな孔になる。R. Benz らは、印加する電圧のパルス幅が長くなるほど、細胞膜の破壊電圧値は小さくなるという結果を報告している^[33]。さらに齋藤らは、パルス幅が長いほど、殺菌効果が高くなることを報告している^[27]。

また、印加パルス電圧のパルス幅の変化は、電圧波形の周波数成分が変化することを意味する。細胞膜(絶縁体)と細胞質(導体)の電気的特性の違いから、印加電界の周波数が高いほど、電界は細胞内部へと侵入し、細胞内部構造に影響を及ぼすことが考えられる。勝木らは、印加パルス電圧波形の周波数成分が高電界パルス殺菌に及ぼす影響について検討し、パルス幅 10 μ s のパルス電圧では細胞膜が破壊され細胞内容物が外へ漏出し、幅 60 ns のパルス電圧では内容物の漏出はなく細胞内部構造が変化し、幅 300 ns では内部変化と内容物漏出の両方が生じたと報告している^[34,35]。

1.5.1.3 殺菌槽

平行平板電極を用いた殺菌槽は、均一な電界をつくるため高電界パルス殺菌法の研究に広く使用されている。しかし、高電界パルス殺菌法の実用化を目指す際、この殺菌槽では電極面積が増えると大電流が流れ、パルス電圧のピーク電圧が低下し、殺菌効果が低下する。そのため効率良く殺菌するための殺菌槽の研究が行われている。大嶋らは、平行-平行、平行-平板のエッジ付き、針-平板などの電極から構成される殺菌槽を用いて、殺菌実験を実施している^[36]。その結果、針-平板の電極形状が最も殺菌されたと報告している。これは針の先端部分で電界が集中することや、ストリーマ放電により生じた OH ラジカル等の影響だと考えられている。また、平板-平板の比較では、平板-平板エ

ッジ付の殺菌効果は平板・平板のものより高い。これはエッジ部分で電界が集中するためであると考えられている。北島らは、電界集中させるために電極間距離を短くすることが有効だと考え、織物電極を作製した^[37]。織物電極はたて糸の電気絶縁性繊維とよこ糸のワイヤ(電極)を織り込んだものである。その結果、織物電極の電極間距離が短くなるほど、殺菌効率が向上したと報告している^[37]。これらの研究から、高電界パルス殺菌には不平等電界を生む電極から構成される殺菌槽が有効だと考えられている。また、イシダらは高さ 5 cm(体積 4.8 mL)のスパイラル形状電極処理槽、高さ 10 cm(体積 9.7 mL)のスパイラル形状電極処理槽およびこれらの 2 つの殺菌槽を 2 個直列あるいは 2 個並列に組み合わせたものを用いて殺菌実験を行い、殺菌槽の高さや組み合わせは生菌率に影響を及ぼさないことを報告している^[38]。吉野らは、銀の殺菌効果に着目し、銀を用いた電極を作製した。そして、銀電極を用いた殺菌槽の殺菌効率はステンレス電極を用いたものより高いことを報告している^[39]。

1.5.1.4 液体試料

高電界パルス殺菌法の研究では、実験試料の溶液としてリン酸緩衝液^[30]、液体培地^[31]、NaCl 水溶液^[37-38,40]などが多く使用されている。液体試料と電極は直接接触しているため、高電界パルス殺菌法の殺菌率は、液体試料の導電率に影響される。高い導電率を持つ液体試料は、パルス電圧が印加されにくくなるため、高電界パルスによる殺菌処理が困難になることが予測される。また、実用化に向けて、実際の液体食品(牛乳^[28]、アップルジュース^[41]および青汁^[27])の高電界パルスによる殺菌実験が実施されており、その殺菌効果が確認されている。

1.5.2 殺菌対象となる微生物の影響

1.5.2.1 微生物

微生物とは、顕微鏡でなければ観察できないような微小な生物の総称である^[42]。図 1.6 に微生物の種類を示す。図 1.6 に示すように微生物は原核生物と真核生物に分けられる。図 1.7 に原核生物および真核生物の構造を示す^[43]。原核生物の内部構造は、細胞膜、細胞壁、細胞質、核、リボソームから構成される。一方、真核生物の内部構造は、細胞膜、細胞質、核、リボソーム以外にも核小体、核膜、ミトコンドリアなどから構成され、真核生物の構造は原核生物より複雑である。このため真核生物の大きさは原核生物のものよりも大きい。さらに、原核生物はグラム陽性菌とグラム陰性菌に分かれる。このように多くの種類の菌が存在する。高電界パルス印加による様々な種類の菌の殺菌実験が実施されており、大腸菌^[29,44]、酵母^[39-40]、黄色ブドウ球菌^[30,39]および黒コウジカビ胞子^[39]等の殺菌効果が確認されている。

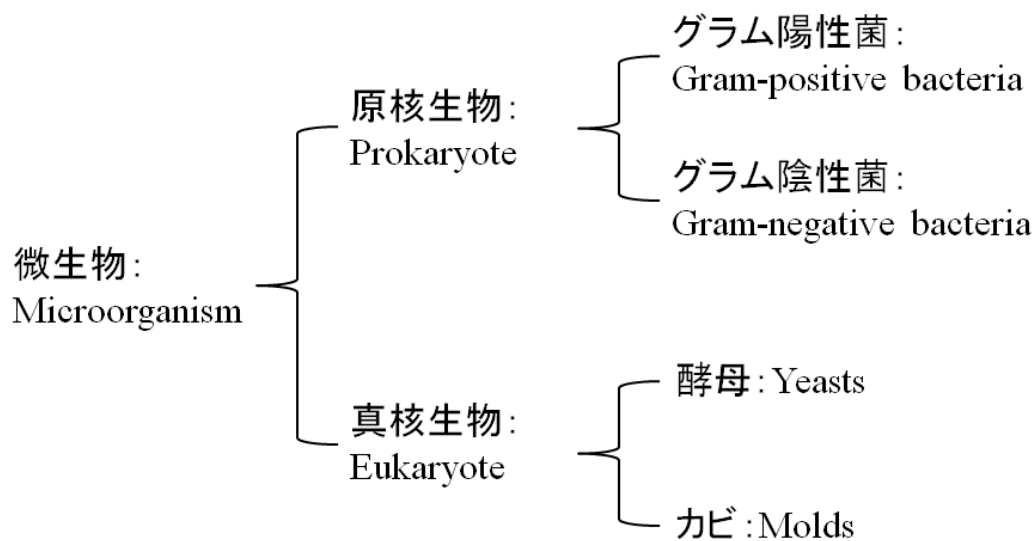


図 1.6 微生物の種類
Fig 1.6 Type of microorganism

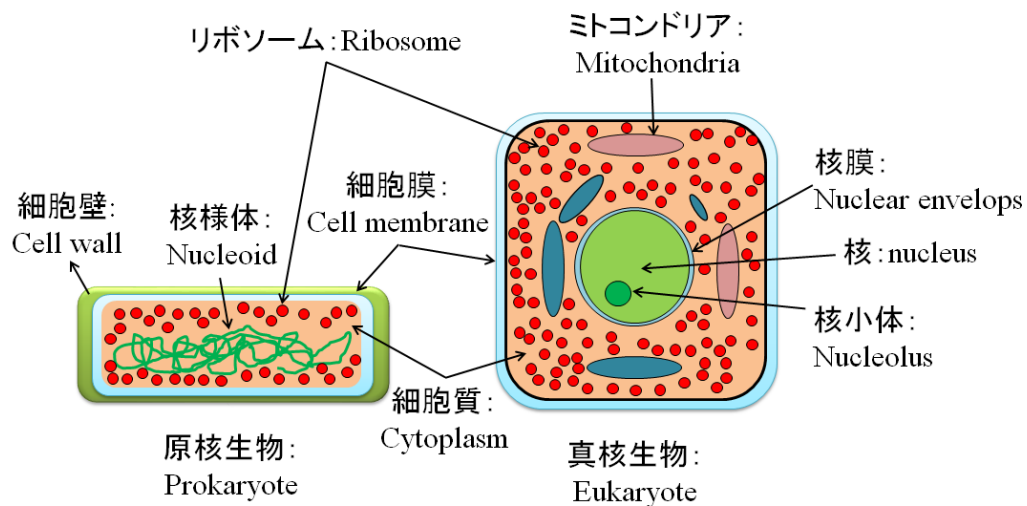


図 1.7 原核生物および真核生物の構造^[43]
Fig. 1.7 Structure of eukaryote and prokaryote^[43]

1.5.2.2 細胞質の電気的特性

微生物や細胞は、細胞膜が細胞質を覆っている構造である。細胞質は DNA、酵素、イオンなどを含む液体であり、イオンを含むため導電性流体と考えることができる。表 1.2 にイカの巨大神経繊維細胞の細胞膜内外の溶液濃度を示す^[45]。K⁺はタンパク質合成などの様々な酵素反応に必要であるため、細胞質に多く含まれる^[43]。A⁻は有機質であり、主に酵素などのタンパク質である。

表 1.2 イカの巨大神経繊維細胞の細胞膜内外の溶液濃度^[45]

Table 1.2 Solution concentration of internal and external membrane for giant axon cell of squid^[45]

	Intracellular [mM]	Extracellular [mM]
Na ⁺	12	145
K ⁺	145	4
Cl ⁻	4	120
A ⁻	155	0

1.5.2.3 細胞膜の電気的特性

細胞膜は細胞を包む薄い構造体であり、その厚さは数 nm 程度である。生物の一般的な膜の構造はリン脂質の二重層構造である^[46]。リン脂質は疎水性の 2 本の長い脂肪酸の尾部と親水性(負極性を持つ)のリン酸を含む頭部を持つ。このように親水性部位と疎水性部位の両方をもつ分子を両親媒性分子と呼ぶ。図 1.8 にリン脂質および細胞膜の構造を示す^[47]。細胞膜の水の透過率を 100 としたときの各イオンの透過率は、Cl⁻では 0.000001, K⁺では 0.0000001, Na⁺では 0.00000001 である^[43]。このように、細胞膜はイオンや電荷を持った分子は透過させ難く、細胞膜の導電率は、 3×10^{-7} S/m 程度である^[48]。このため、細胞膜は絶縁体として考えることができる。

図 1.9 にグラム陽性菌とグラム陰性菌の細胞外膜構造を示す。図 1.9 に示すようにグラム陽性菌とグラム陰性菌の違いは細胞膜の構造にある^[49]。グラム陽性菌では、細胞質膜の外側に厚いペプチドグリカン層を形成している。一方、グラム陰性菌では、細胞質膜の外側に薄いペプチドグリカン層がある。ここには細胞内で合成された酵素などが存在している。ペプチドグリカン層の外には、リン脂質とリポ多糖から構成されている外膜がある。グラム陰性菌は、外膜が存在しているためグラム陽性菌と比べ、抗菌性物質などの化学的ストレスに強い傾向がある。一方、グラム陽性菌は熱などの物理的ストレスに強い。パルス電界印加により細胞膜を物理的に破壊する高電界パルス殺菌法において、物理的ストレスに強いグラム陽性菌は、グラム陰性菌より殺菌され難いと報告されている^[30]。

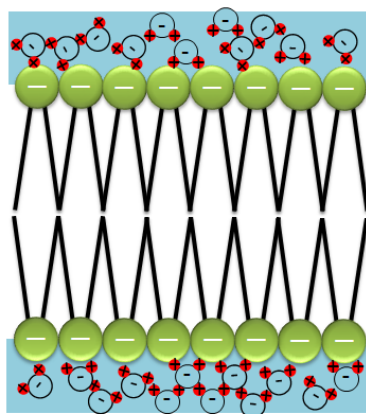
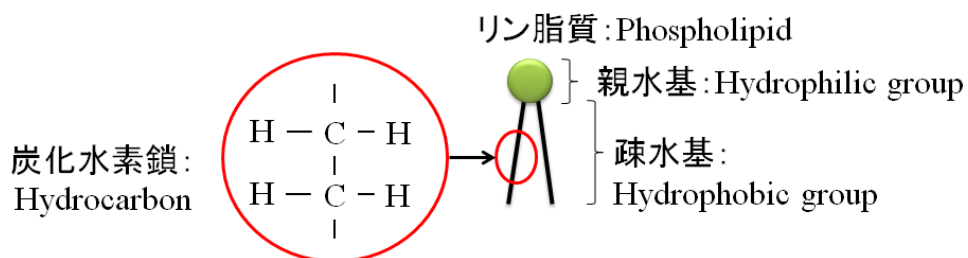


図 1.8 リン脂質および細胞膜の構造

Fig. 1.8 Structure of phospholipid and cell membrane

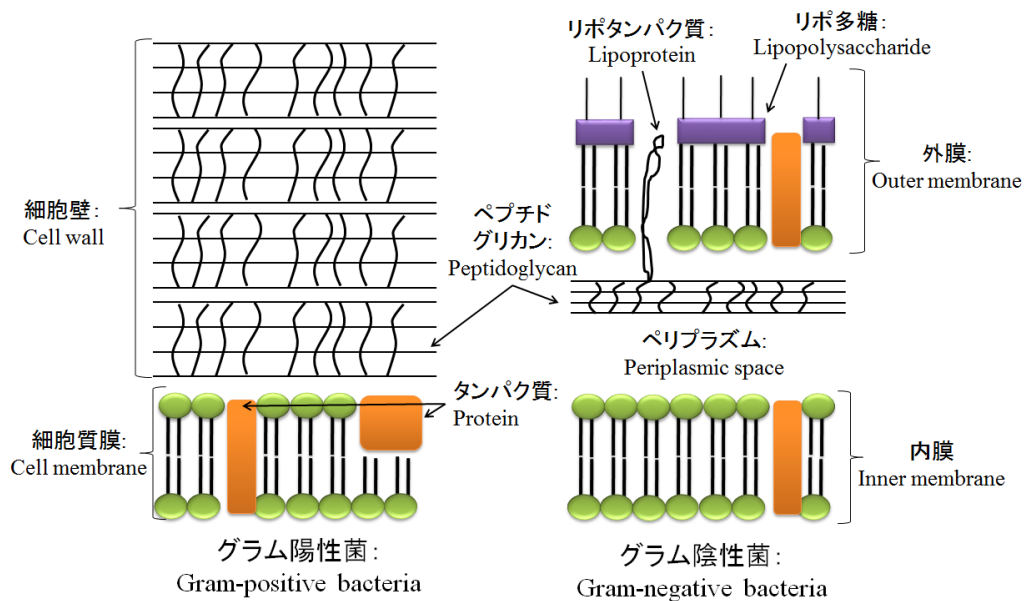


図 1.9 グラム陽性菌とグラム陰性菌の細胞外膜構造^[49]

Fig. 1.9 Structure of outer cell membrane for gram-positive bacteria and gram-negative bacteria^[49]

1.5.2.4 細胞周期

細胞の増殖は、細菌では細胞分裂、カビでは孢子の放出、出芽酵母では出芽により起こる。図 1.10 に細胞周期のモデルを示す。細胞周期は 1 つの細胞が 2 つになるまでのサイクルであり、G1-S-G2-M の 4 期に分けられる^[50]。S 期は DNA を合成するための期間、M 期は分裂を行う期間である。G1 期と G2 期はそれぞれ S 期と M 期に入るための準備期間であり、G0 期は長期間増殖を停止する休止期である。一般的な細胞では G1 期が 8 時間、S 期も 8 時間、G2 期は 4 時間、M 期は 2 時間要する^[45]。一方、大腸菌のような原核生物の周期の長さは周囲の環境に強く依存し^[50]、栄養条件が悪いと 60 分以上、良いと 20 分くらいで分裂する。

図 1.11 に微生物の増殖曲線を示す。新しい培地や食品に入った微生物はその環境に慣れるまで分裂を行わない。誘導期は微生物が新しい環境に順応し分裂するまでの期間であり、この長さは微生物の種類により異なる。対数増殖前期は菌の増殖速度が一定になる期間である。対数増殖後期は菌の増殖速度が減少する期間である。定常期は増殖に必要な栄養の欠乏などにより、死滅速度と発育速度が等しくなる期間である。死滅期は死滅速度が増殖速度より大きくなる期間であり、菌数は減少する。H. Hülshager らは、高電界パルスによる殺菌に及ぼす菌の増殖期の影響について検討しており、対数増殖期の菌は、定常増殖期のものより殺菌され易いという結果を報告している^[30]。

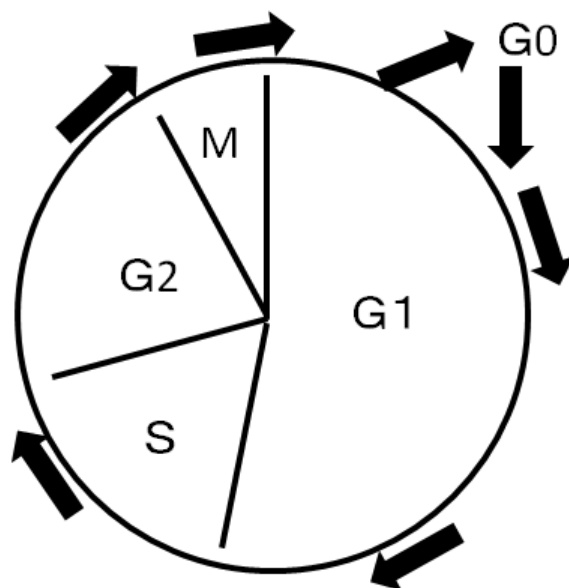


図 1.10 細胞周期のモデル

Fig. 1.10 Model of cell cycle

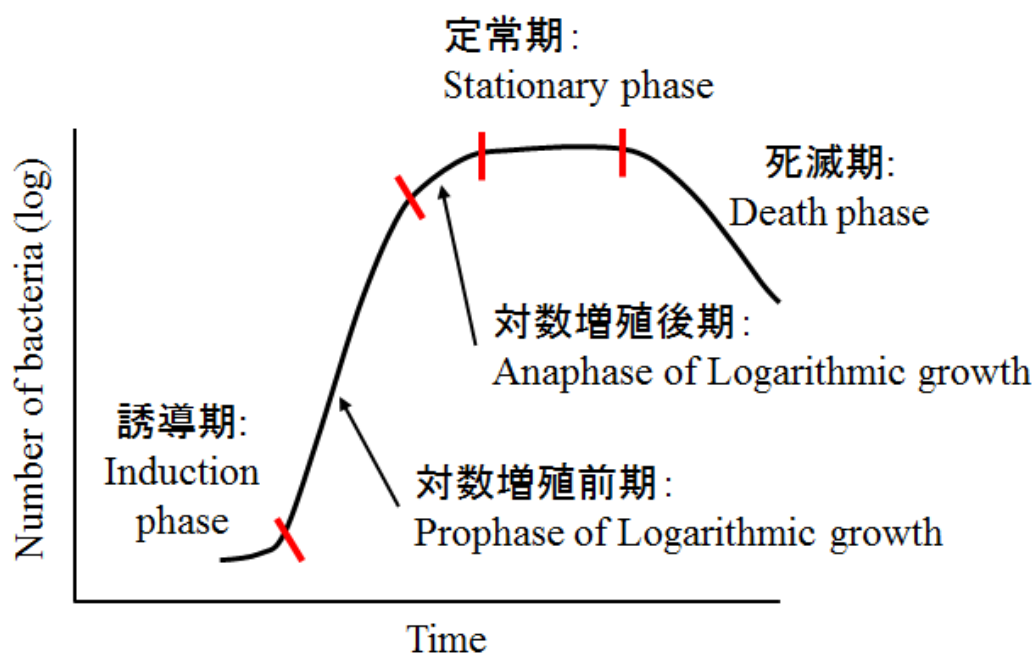


図 1.11 微生物の増殖曲線

Fig. 1.11 Growth curve for microorganism

1.5.2.5 増殖影響因子

培養温度や培地の pH は微生物の増殖に影響を及ぼすことが知られている^[50]. 温度は微生物の全ての機能に影響を及ぼす. 表 1.3 に微生物の生育の最適温度領域を示す^[50]. 微生物の種類によって生育に適した温度領域は異なり, これにより表 1.3 のように高温微生物, 中温微生物, 低温微生物にわけることができる. 増殖速度は, 最適温度で最も速くなり, 最適増殖温度域を外れるにつれて低下する. 特に高温側では増殖速度の低下が急激であり, 菌が不活性状態になることで死滅するようになる. 試料温度が高電界パルス殺菌法に及ぼす影響については, 数多くの研究者により報告されている^[29,51-53]. 試料温度のみの効果で殺菌されない温度範囲において殺菌実験を実施した場合, 試料温度が高くなるほど, 殺菌効果が高くなることが支持されている^[29,51-53]. また, 大嶋らは, 培養温度も高電界パルス殺菌法に影響を与えると報告している^[51]. この原因として, 大嶋らは, 培養温度を変化させると, 細胞膜を構成するリン脂質の成分が変化するためであると述べている^[51,54].

pH も微生物の増殖速度に影響を与える. 多くの微生物の最適の pH 領域は 5~8 である. この最適 pH 領域から外れた pH3 以下あるいは pH10 以上では微生物の増殖速度は低下する^[50]. 一般に病原性の細菌類は中性あるいは弱アルカリ性領域を好むもの

が多く、糸状菌や酵母はやや酸性(pH5～6)付近を最適としている^[50]。大腸菌では、最適 pH は温度に依存せず、最適 pH 領域を外れると増殖速度は低下すると報告されている^[50]。液体試料の pH が高電界パルス殺菌法に及ぼす影響についての研究では、桜内らの結果では、pH は殺菌に影響を及ぼさない^[55]が、Kristina Aronsson らおよび Humberto Vega-Mercado らの結果では、pH が低くなるほど、殺菌効果は高くなる^[32,53]ことが報告されている。

表 1.3 微生物の生育の最適温度領域^[50]

Table 1.3 Optimum temperature range of growth of microorganism^[50]

	最低温度 [°C]	最適温度[°C]	最高温度[°C]
高温微生物			
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	55	75
<i>Clostridium thermocellum</i>	50	60	68
中温微生物			
<i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	29	40
低温微生物			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	−8	20	37
<i>Candida scottii</i>	0	4～15	15

1.6 本研究の目的

高電界パルス殺菌法は加熱殺菌法と比較して、液体食品中の栄養の変性や消費エネルギーが小さいことから、液体食品の新しい殺菌方法として注目されている。多くの研究者が高電界パルス殺菌法の研究を行ってきたが、殺菌機構は未だ不明な点が多い。従来までの殺菌法は、単に食品中の菌を殺すのみであった。近年では、高電界パルス殺菌法以外の非加熱殺菌法の研究が数多く進められており、複数の殺菌法を組み合わせることにより、我々に有益な菌は残し、害をなす菌だけ殺すという、“選択的殺菌技術”への応用も試みられている。選択的殺菌技術の実用化のためには、各々の異なる殺菌法のメカニズムの解明や、その殺菌効果の定量化が必要不可欠となる。そこで本研究では、高電界パルスによる殺菌機構の解明と殺菌効果の定量化を目的とした。

1.7 論文構成

本論文は全 8 章で構成される。第 1 章では、高電界パルス殺菌法の研究背景や殺菌原理の説明や先行研究の紹介をした。第 2 章では、高電界パルスによる殺菌機構として、最も支持されているモデルを用いた生菌率の算出値と実験値を比較した。第 3 章では、高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす液体温度とパルス電圧印加間隔の影響について検討し、細胞膜の修復の観点から考察した。第 4 章では、水溶液中のイオンが高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響について検討し、高電界パルス印加による細胞膜に働く Maxwell 応力の観点から考察した。第 5 章では、液体食品の成分の一つであるアミノ酸が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響について検討した。第 6 章では、高電界パルス印加 2.5 時間後の大腸菌は、無印加 2.5 時間後のものより長くなることについて記述した。第 7 章では、高電界パルスによる牛乳中の大腸菌殺菌の結果と、大腸菌を含む牛乳の低温保持殺菌の結果を比較した。第 8 章では以上の内容を総括した。

参考文献

- [1] 好井久雄：「醗酵食品の真菌」，真菌誌，Vol. 20, No. 3, pp. 177-180 (1979)
- [2] 高野光輝：「食品の殺菌 - その科学と技術 - 」，(株)幸書房，pp. 1, 34, 327 (1998)
- [3] 池晶子：「微生物から知る食の安全性」，生物工程，Vol. 5, No. 5, pp.257-260 (2011)
- [4] 五十部誠一郎：「非加熱殺菌法を中心とした新規殺菌技術」，日本食品微生物学会雑誌，Vol. 27, No. 3, pp. 115-122 (2010)
- [5] 松田敏生：「非加熱殺菌技術による食品の殺菌と保全」，食品衛生学雑誌，Vol. 41, No. 3, pp. 163-170 (2000)
- [6] 福崎智司：「次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄・殺菌操作の理論と実際」，調理食品と技術，Vol. 16, No. 1, pp. 1-14 (2010)
- [7] 伊藤均：「放射線殺菌と食品微生物」，日本食品微生物学会雑誌，Vol. 28, No. 3, pp. 149-156 (2011)
- [8] 梶山昇，秋住啓二，安部井考蔵，長田優，江頭辰昭，三宅義章：「高圧による大腸菌殺菌」，日本食品工業会誌，Vol. 40, No. 6, pp. 406-413 (1993)
- [9] 井上考司，河原(青山)優美子，池田成一郎，土方祥一，五十部誠一郎，植村邦彦：「交流高電界による各種微生物胞子の殺菌」，日本食品工学会誌，Vol. 8, No. 3, pp. 123-130 (2007)
- [10] 植村邦彦：「通電加熱の基礎と応用」，日本食品化学工学会誌，Vol. 5, No. 4, pp. 151-145 (2003)
- [11] 植村邦彦：「交流高電界による液状食品の殺菌技術の開発」，日本食品化学工学会誌，Vol. 9, No. 4, pp. 221-228 (2008)
- [12] 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，Vol. 35, No. 3, pp. 114-119 (2011)
- [13] 静電気学会 編：「静電気ハンドブック」，(株)オーム社，pp. 820-821, pp. 842-845, pp. 864-867 (2006)
- [14] 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，Vol. 8, No. 4, pp. 191-199 (2007)
- [15] 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ー遺伝子導入法の基礎ー」，蛋白質核酸酵素，Vol. 31, No. 15, pp. 1591- 1603 (1986)
- [16] U. Zimmermann, G. Pilwat and F. Riemann：“DIELECTRIC BREAKDOWN OF CELL MEMBRANES”，Biophysical Journal，Vol. 14, No. 11, pp. 881-899 (1974)
- [17] H. G. L. Coster：“The Physics of Cell Membranes”，Journal of Biological Physics, Vol. 29, No. 4, pp. 363-399 (2003)
- [18] 秋山秀典：「高電圧パルスパワー工学」，(株)オーム社，p. 34 (2011)

- [19] JOSEPH H. CROWLEY : “ELECTRICAL BREAKDOWN OF BIMOLECULAR LIPID MEMBRANE AS AN ELECTROMECHANICAL INSTABILITY ”, BIOPHYSICAL JOURNAL, Vol. 13, No. 7, pp. 711-724 (1973)
- [20] Donald C. Chang, Bruce M. Chassy, James A. Saunders, Arthur E. Sowers : “Guide to Electroporation and Electrofusion”, Academic Press Inc. , pp. 91-118 (1992)
- [21] Vozken Adrian Parsegian : “Energy of an Ion crossing a Low Dielectric Membrane: Solution to Four Relevant Electrostatic Problems”, Nature, Vol. 221, pp. 844-846 (1969)
- [22] R. Benz, F. Beckers, U. Zimmermann : “Reversible Electrical Breakdown of Lipid Bilayer Membrane” : A charge-pulse Relaxation Study, J. Membrane Biol. , Vol. 48, No. 2, pp. 181-204 (1979)
- [23] Maura, Casciola, Marina A. Kasimova, Lea Rems, Sara Zullino, Francesca Apollonio, Mounir Tarek : “Properties of lipid electropores I : Molecular dynamics simulation of stabilized pores by constant charge imbalance”, bioelectrochemistry, Vol. 109, pp. 108-116 (2016)
- [24] Mounir Tarek : “Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation”, Biophysical Journal, Vol. 88, No. 6, pp. 4045-4053 (2005)
- [25] 杉村厚, 清水伸 : 「3.電気穿孔法」, 化学と生物, Vol. 29, No. 1, pp.54-60 (1991)
- [26] 元山裕孝 : 「生物・環境産業のための非熱プロセス事典」, (株)サイエンスフォーラス, pp. 35-54 (1997)
- [27] 斉藤高輝, 遠藤僚太, 野澤康仁, 南谷靖史, 深田秀樹 : 「パルス電界殺菌における細胞穿孔に対する絶縁破壊理論の適用に関する一考察」, 電気学会論文誌 A, Vol. 135, No. 6, pp. 341-346 (2015)
- [28] Silvia Bendicho, Gustavo V. Barbosa-Canovas, Olga Martin : “Milk processing by high intensity pulsed electric fields”, Trends in Food Science & Technology, Vol. 13, No. 6-7, pp.195-204 (2002)
- [29] H. Hulsheger, J. Potel, E. -G. Niemann : “Killing of Bacteria with electric Pulses of High Field Strength”, Radiat Environ Biophys, Vol. 20, No. 1, pp. 53-65 (1983)
- [30] H. Hulsheger, J. Potel, E. -G. Niemann : “Electric Field Effects on Bacteria and Yeast Cells”, Radiat Environ Biophys, Vol. 22, No. 2, pp. 149-162 (1983)
- [31] Sheshakamal Jayaram, G. S. P. Castle, Argyrios Margaritis : “The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of Lactobacillus brevis”, Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 40, No. 1, pp. 117-122 (1993)
- [32] Humberto Vega-Mercado, Usha R. Pothakamury, Fu-jung Chang, Gustavo V. Barbosa-Canovas, Barry G. Swanson : “Inactivation of Escherichia coli by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles” , Food Research International, Vol. 29, No. 2, pp. 117-121 (1996)

- [33] R. Benz, U. Zimmermann : “High electric field effects on the cell membranes of *Halicystis parvula* A charge pulse study”, *planta*, Vol. 152, No. 4, pp. 314-318 (1981)
- [34] 勝木淳, 矢野正彦, 佐久川貴志, 浪平隆男, S. Hamid R. HOSSEINI, 矢野憲一, 秋山秀典:「バイオエレクトリクスーパルス高電界の生体作用とバイオ・医療応用」, 静電気学会誌, Vol. 33, No. 4, pp. 142-147 (2009)
- [35] 勝木淳 :「パルスパワー生成放電プラズマのバイオ技術への応用 3.パルスパワーによるバクテリアの殺菌」, プラズマ・核融合学会誌, Vol. 79, No. 1, pp. 20-25 (2003)
- [36] 大嶋孝之, 佐藤正之 :「パルス殺菌ー自然のままに安全ー」, 日本調理科会誌, Vol. 36, No. 3, pp. 334-339 (2003)
- [37] 北島信義, 阿久澤悦子, 上田香奈, 大嶋孝之, 佐藤正之 :「織物電極によるパルス殺菌」, 日本食品工学会誌, Vol. 8, No. 3, pp. 139-145 (2007)
- [38] ネイデ ミホ イシダ, 大嶋孝之, 佐藤正之 :「スパイラル形状電極処理槽のパルス殺菌特性」, 日本食品工学会誌, Vol. 5, No. 1, pp. 35-40 (2004)
- [39] 吉野功, 大嶋孝之, 谷野孝徳, 佐藤正之 :「銀電極を用いた高電圧パルス殺菌装置による種々の菌に対する不活性化効果」, 静電気学会誌, Vol. 34, No. 2, pp. 81-86 (2010)
- [40] 速水光浩, 天満考昌, 水野彰 :「高電圧パルスによるイースト菌の破壊」, 静電気学会誌, Vol. 13, No. 4, pp. 322-331 (1989)
- [41] V. Heinz, S. Toepfl, D. Knorr : “Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment”, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Vol. 4, No. 2, pp. 167-175 (2003)
- [42] 小澤美奈子 :「生化学辞典(第3版)」, (株)東京化学同人, p. 1101 (1998)
- [43] Michael T. Madian, John M. Martinko, Jack Parker : *Brock 微生物*, (株)オーム社, pp.6-7, p. 65,107,125 (2003)
- [44] H. Hulsheger, E. -G. Niemann : “Lethal Effects of High-Voltage Pulses on *E. coli* K12”, *Radiat Environ Biophys*, Vol. 18, No. 4, pp. 281-288 (1980)
- [45] 太田行人, 岡田節人, 岡田善雄:「岩波講座 現代生物科学 3 細胞の構造と機能Ⅱ」, (株)岩波書店, p. 183, 310 (1975)
- [46] 新津恒良 :「要説 分子・細胞生物学」, HBJ 出版局, p. 50, 73 (1985)
- [47] T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar, D. Miklavcic : “Cell Membrane Electroporation - Part 1 : The Phenomenon”, *IEEE Electrical Insulation Magazine*, Vol. 28, No. 5, pp. 14-22 (2013).
- [48] Chenguo Yao, Dengbin Mo, Chengxiang Li, Caixin Sun, Yan Mi : “Syudy of Transmembrane Potentials of Inner and Outer Membranes Induced by Pulsed-Electric-Field Model and simulation”, *IEEE TRANSACTION ON PLASMA SCIENCE*, Vol. 35, No. 5, pp. 1541-1549 (2007)

- [49] 小澤美奈子：「生化学辞典(第3版)」, (株)東京化学同人, pp. 399-400 (1998)
- [50] 海老原熊雄：「図解微生物学ハンドブック」, (株)丸善, pp. 211-215, pp. 232-234 (1990)
- [51] Takayuki Ohshima, Kanako Okuyama, Masayuki Sato : “Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of *Escherichia coli*”, *Journal of Electrostatics*, Vol. 55, No. 3-4, pp. 227-235 (2002)
- [52] V. O. Marquez, G. S. Mittal, M. W. Griffiths : “Destruction and Inhibition of Bacterial Spores by High Voltage Pulsed Electric Field”, *Journal of Food Science*, Vol. 62, No. 2, pp. 339-402 (1997)
- [53] 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*, Vol. 2, No. 2, pp. 105-112 (2001)
- [54] 土戸哲明：「食品殺菌の微生物工学的研究」, 日本食品工学会誌, Vol. 10, No. 4, pp. 183-190 (2009)
- [55] 桜内雄二郎, 近藤栄昭：「高圧電場の微生物に対する殺菌効果について」, 日本農芸化学会誌, Vol. 54, No. 10, pp. 837-844 (1980)

第 2 章 高電界パルス殺菌モデルを用いた 生菌率の算出

2.1 はじめに

高電界パルス印加による生菌率の見積りが可能になることは、実用化に向けて重要な課題である。H. Hülshager らは豊富な研究データから、高電界パルス印加による大腸菌殺菌はパルス処理時間(印加パルス電圧の幅とその印加回数の積)に依存すると報告している^[1]。一方、高電界パルス印加によるバクテリアの生菌率の減少率は、あるパルス印加回数以上では緩やかになる結果も報告されている^[2]。また、大嶋らは消費エネルギー(オシロスコープ上の波形から算出)とバクテリアの殺菌率は、ある範囲までは相関があるが、その範囲を超えると生菌率の減少幅は小さくなると報告している^[3]。本章では、U. Zimmermann らが提唱する殺菌機構のモデルを用いて、大腸菌の長さ分布や印加電界強度、パルス電圧印加回数、菌の長軸と電界方向のなす角等を考慮して算出した生菌率と殺菌実験から得られた生菌率を比較した。

2.2 実験方法

2.2.1 実験試料

殺菌対象には *Escherichia coli* JM103(非病原性)を用いた。表 2.1 に液体培地および寒天培地の成分を示す。この菌を寒天培地上に塗布し、静置培養(37°C, 24 時間)させた。培養後、寒天培地上に形成されたコロニー1つを液体培地 5 mL 中に入れ、振とう培養(37°C, 24 時間)を行った。これらの寒天培地および液体培地は滅菌してから使用した。また、表 2.2 に培地成分として使用した Tryptone および Yeast Extract 中のビタミン類、表 2.3 に無機物類、表 2.4 にアミノ酸の含有量を示す^[4]。振とう培養した液体培地 5 mL 中の 100 μ L を、別の滅菌済みの液体培地 5 mL 中に入れ、再び振とう培養(37°C)した。実験試料は、この液体培地の吸光度(OD₆₂₀)が 0.6 になったときのもの 1 mL を滅菌した蒸留水 9 mL に入れたものである。吸光度の測定には、分光光度計(エルマー社 AE-11M)を用いた。液体培地の吸光度を調整することで、初期菌数濃度を調整した。実験試料の初期菌数は、コロニー計数法で測定したところ、約 1×10^7 CFU/mL だった。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)を用いて測定したところ、室温で試料の pH は約 6.5、導電率は約 130 mS/m であった。

表 2.1 液体培地と寒天培地の成分

Table 2.1 Components of liquid culture medium and agar culture medium

	Liquid culture medium [wt%]	Agar culture medium [wt%]
Tryptone	1.0	1.0
Yeast Extract	0.5	0.5
NaCl	0.5	0.5
Agar	0	1.5
Distilled water	98	96.5

表 2.2 Tryptone および Yeast Extract 中のビタミン類の含有量^[4]

Table 2.2 Content of vitamins in Tryptone and Yeast Extract^[4]

	Typtone [wt%]	Yeast Extract [wt%]
Biotin	0.1	3.3
Choline chloride	350.0	300.0
Cyanocobalamin	<0.1	<0.1
Folic acid	0.3	1.5
Inositol	1400.0	1400.0
Nicotinic acid	97.8	597.9
4-Aminobenzoic acid	3.7	763.0
Pantothenic acid	5.3	273.7
Pyridoxine	0.6	43.2
Riboflavin	<0.1	116.5
Thiamine	0.4	529.9
Thymidine	93.4	17.5

表 2.3 Tryptone および Yeast Extract 中の無機物類の含有量^[4]

Table 2.3 Content of minerals in Tryptone and Yeast Extract^[4]

	Tryptone [wt%]	Yeast Extract [wt%]
Calcium	0.013	0.013
Chloride	0.186	0.380
Iron	<0.001	<0.001
Magnesium	0.017	0.075
Phosphate	2.669	3.250
Potassium	0.229	3.195
Sodium	2.631	1.490
Sulfate	0.241	0.091
Sulfur [wt%]	0.740	0.634

表 2.4 Tryptone および Yeast Extract 中のアミノ酸の含有量^[4]

Table 2.4 Content of amino acid in Tryptone and Yeast Extract^[4]

	Tryptone [wt%]	Yeast Extract [wt%]
Alanine	4.4	1.0
Arginine	1.4	2.2
Asparagine	1.0	0.6
Aspartic Acid	1.6	0.4
Cystine	0.2	0.3
Glutamic Acid	6.6	1.4
Glutamine	0.2	0.1
Glycine	1.0	0.2
Histidine	0.4	0.5
Isoleucine	1.8	1.3
Leucine	3.0	4.8
Lysine	1.9	5.5
Methionine	0.6	1.0
Phenylalanine	2.0	3.0
Proline	0.8	0.2
Serine	1.3	0.7
Threonine	1.1	0.7
Tryptophan	0.5	0.8
Tyrosine	0.8	1.3
Valine	2.2	1.7

2.2.2 殺菌槽

図 2.1 に同軸円筒電極型殺菌槽の断面図を示す．電極にはステンレスを用い，電極の固定には EPDM (Ethylene Propylene Diene Monomer : エチレン・プロピレン・ジエン単量体) 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，内部電極の管軸からの距離 r の関数として式(2.1)で与えられる^[5]．

$$E(r) = \frac{V}{r \cdot \ln \frac{R_2}{R_1}} \quad (2.1)$$

ここで， V は入力電圧， 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)を示す．式(2.1)から内部電極に近いほど，電界強度は高いことがわかる．

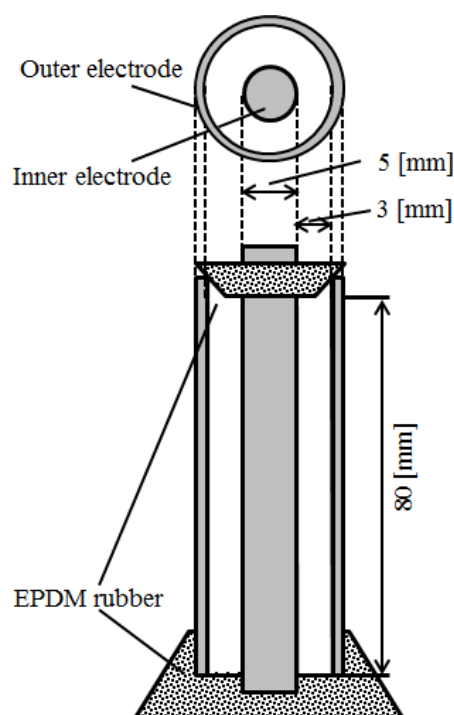


図 2.1 同軸円筒型殺菌槽の断面図

Fig. 2.1 Cross section of the coaxial cylindrical electrodes tank

2.2.3 実験手順

図 2.2 に実験回路を示す。図 2.1 に示す殺菌槽内に実験試料 6 mL を入れた。殺菌槽の内部電極にインパルス電圧発生器(東京変圧器(株) 898101)を用いてパルス電圧を 60 秒間隔で印加した。このインパルス電圧発生器は電気設備や機器などの絶縁強度の検証を行うために、人工的に雷を模擬した標準雷インパルス電圧を発生させるものである。装置の構造は 4 段のマルクス回路で、4 個の並列接続したコンデンサにそれぞれ充電し、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発生させる。印加パルス電圧の波高値は -3.8 kV, -4.4 kV および -5.3 kV とした。印加パルス電圧波高値は、図 2.2 中のコンデンサ(0.0625 μ F)に充電する電圧値を変化させることで調整した。殺菌槽にかかる電圧波形は分圧器(IWATSU ELECTRIC CO. LTD, HV-P30)を通してデジタルオシロスコープ(Tektronix DPO4034)を用いて観測した。図 2.3 にインパルス電圧波形を示す。雷インパルス電圧の波高値、波頭長および波尾長は以下のように定義される¹⁵⁾。波高値は電圧波形の電圧の最大値である。波高値の 30 %および 90 %の 2 点を直線で結び、これが零線と交わる点を規約原点とし、波頭長は規約原点から波高値になるまでの時間、波尾長は規約原点から波高値が 50 %に低下するまでの時間を表す¹⁵⁾。

図 2.4 に印加電圧波形を示す。波高値 -3.8 kV, -4.4 kV, および -5.3 kV の印加電圧波形の波頭長は約 5.3 μ s, 波尾長は 11.5 μ s であった。表 2.5 に電界強度を示す。この電界強度は、各印加電圧波高値を式(2.1)の V に代入して求めた殺菌槽内の強度である。槽内では内部電極付近に最大電界が、外部電極付近に最小電界が生じる。また、パルス電圧印加による試料の単位体積当たりの投入エネルギー E_n は、式(2.2)のように印加電圧波形と電流波形の積を積分することで求めた。図 2.5 に印加電流波形を示す。

$$E_n = \frac{\int_0^{20 \times 10^{-6}} V(t)I(t)dt}{T} \cdot n \quad (2.2)$$

ここで、 $V(t)$ は印加電圧 [V], $I(t)$ は印加電流 [A], t は時間 [s], n はパルス電圧印加回数, T は殺菌槽内の試料容積(6 mL)である。パルス電圧印加 30 回後の温度は、印加前と比較して 3 $^{\circ}$ C 程度上昇した。

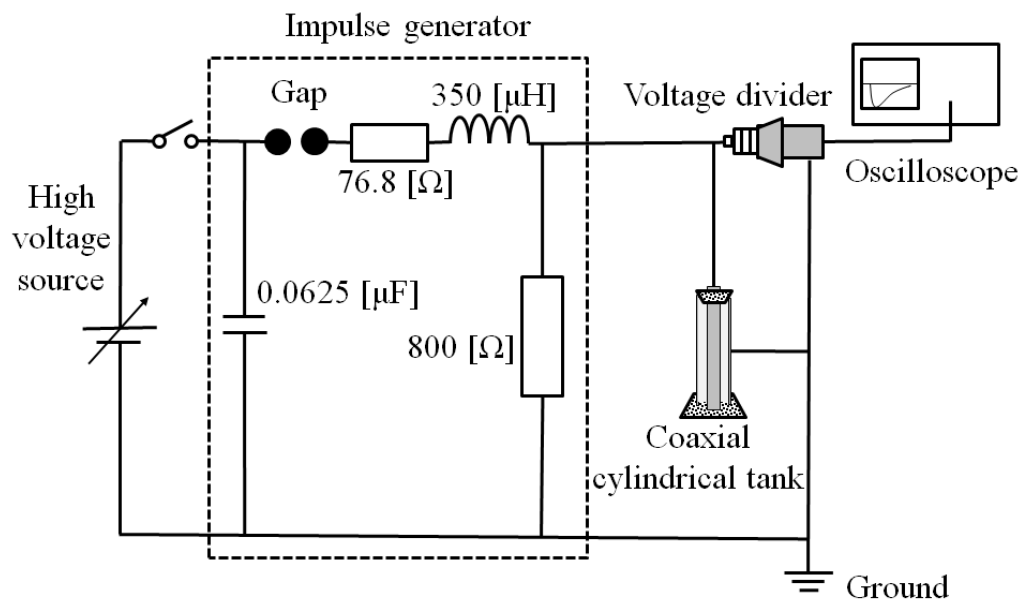


図 2.2 実験回路

Fig. 2.2 Experimental set up

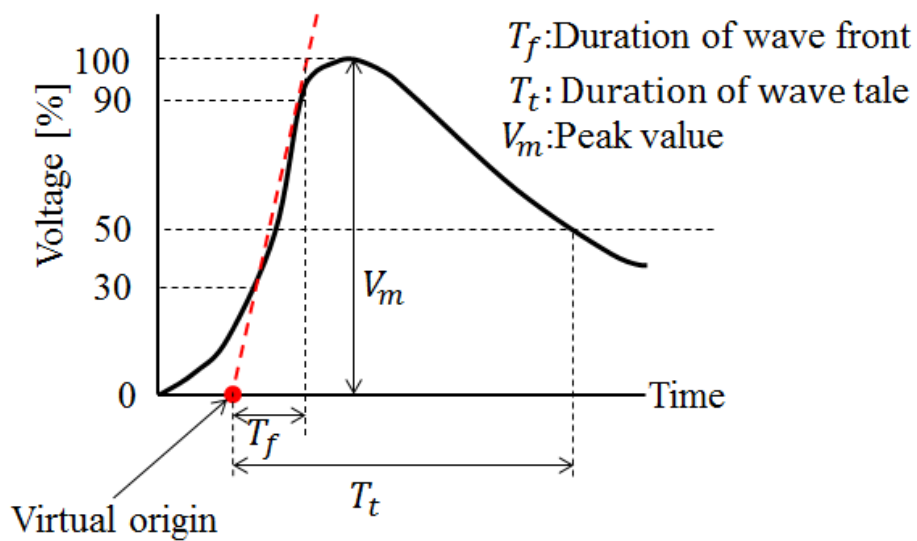


図 2.3 インパルス電圧波形

Fig. 2.3 The shape of impulse voltage

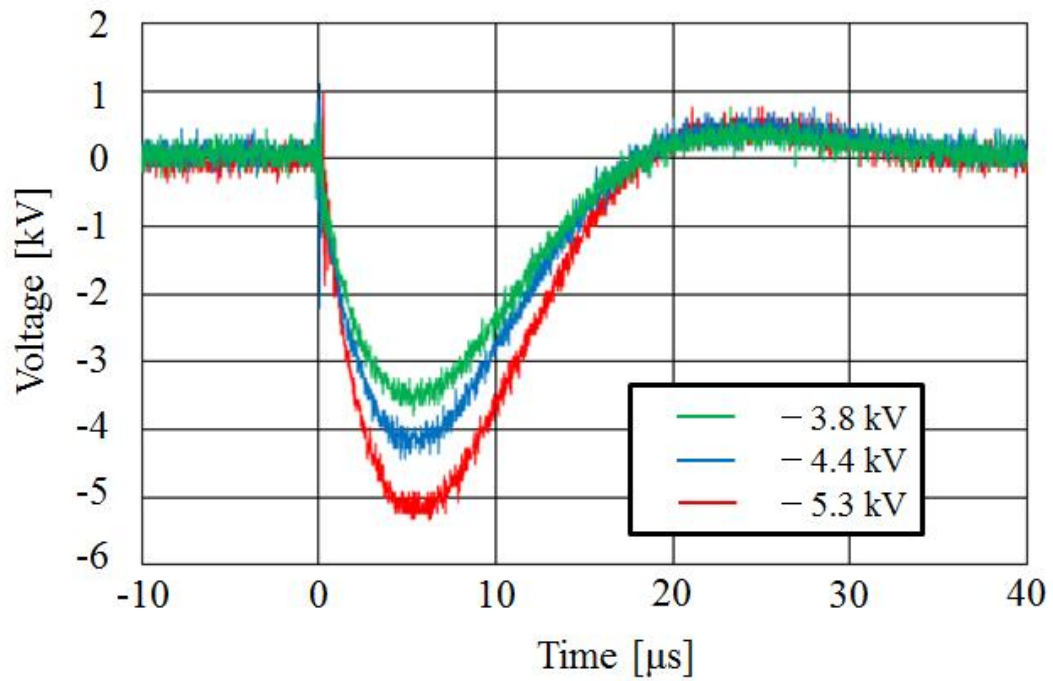


図 2.4 印加電圧波形

Fig. 2.4 The shape of the applied voltage

表 2.5 電界強度

Table 2.5 Electric field

Applied voltage [kV]	Maximum field at inner electrode [kV/mm]	Minimum field at outer electrode [kV/mm]
3.8	1.9	0.87
4.4	2.2	1.0
5.3	2.7	1.2

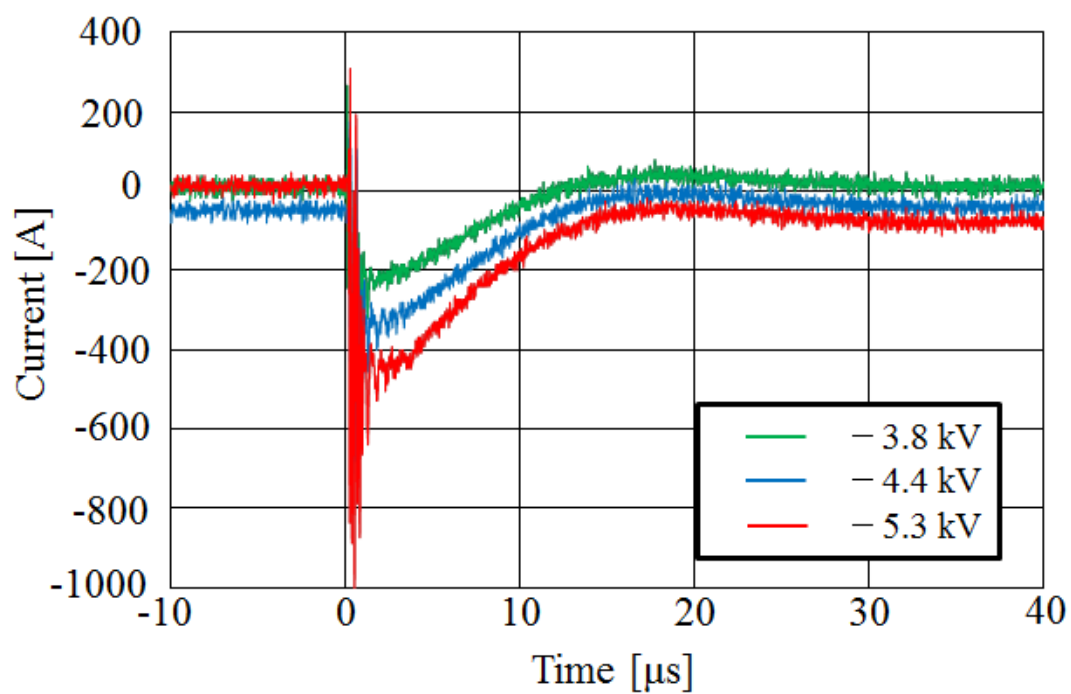


図 2.5 印加電流波形

Fig. 2.5 The shape of the applied current

2.2.4 生菌数の測定

大腸菌の生菌数の測定にはコロニー計数法を用いた⁶⁾。図 2.6 にコロニー計数法のモデルを示す。生菌数を測定したいサンプルを寒天培地に塗布し、静置培養(37 °C, 24 時間)する。大腸菌は分裂・増殖を繰り返し、培地上にコロニーを形成する。このコロニーは1つの菌が分裂・増殖することによりできるため、コロニー数が入れた菌液中の生菌数となる。このコロニーの単位には CFU(Colony Forming Unit : コロニー形成単位)が使われている。また、生菌数が多くなると、コロニーが連なり数えることができない。その場合、菌液を滅菌した 0.8 wt% NaCl で希釈した。この時の溶液中の生菌数は、コロニー数と希釈率の積から求めることができる。実験試料の初期菌数は約 1×10^7 CFU/mL だった。また、高電圧パルス印加 10 回毎に生菌数を測定し、生菌率はパルス印加後の生菌数／初期菌数から求めた。

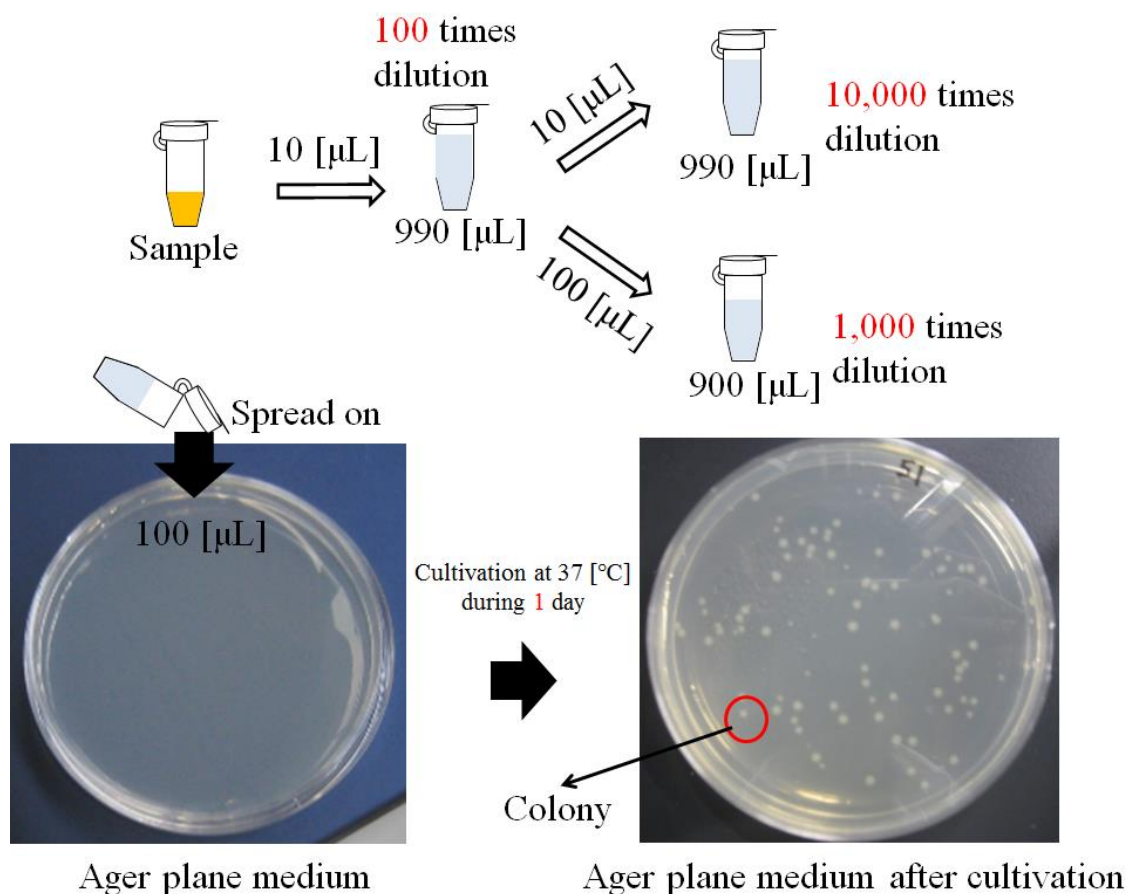


図 2.6 コロニー計数法のモデル

Fig. 2.6 Model of colony counting method

2.2.5 大腸菌のグラム染色方法

グラム染色法とは，オランダの C. Gram によって 1884 年に，経験的に発見された細菌の染色手法であり，この染色法によって，紫色に染まるグラム陽性菌と対比染色により赤色に染まるグラム陰性菌にわけることができる^[7]．本研究では，大腸菌の長さを測定する際，光学顕微鏡で観察し易いように，大腸菌をグラム染色法にて赤色に染色した．

表 2.6 にグラム染色の試薬の成分を示す．これらの試薬を用いて以下の①～⑥手順にて大腸菌を染色した．

- ① スライドガラスに水滴を載せ，その水滴に菌を混ぜる．
- ② 乾燥するまで遠火であぶる．乾燥後，火炎中をゆっくり 3 回ほど通過させると，菌がスライドガラスに固定されて染色しやすくなる．
- ③ 試薬 1 で 1 分間染色した後，過剰な試薬 1 を捨て，スライドガラスの裏面より水を静かに流して水洗する．水洗後は，ろ紙などで吸水して乾燥させる．
- ④ 試薬 2 を使って③と同様の方法で染色する．
- ⑤ エタノールで 30 秒間脱色する．
- ⑥ 試薬 3 を使って③と同様の方法で染色する．

図 2.7 および図 2.8 にグラム染色前後の大腸菌の光学顕微鏡写真を示す．図 2.7 の白色がかった細長い物体が染色前の大腸菌である．これをグラム染色することにより，グラム陰性菌である大腸菌は赤色に染まる．図 2.8 中の赤い細長い物体が染色された大腸菌である．

表 2.6 グラム染色の試薬の成分

Table 2.6 Component of reagent of gram stain

	調合方法
試薬 1	溶液 A：クリスタルバイオレット 2 g をエタノール（95 %）20 mL に溶かす． 溶液 B：硝酸アンモニウム 0.8 g を蒸留水 80 mL に溶かす． 溶液 A と B を混合し，1～2 日置く．
試薬 2	蒸留水 10 mL にヨウ化カリウム 1 g を溶かした後，ヨウ素 0.5 g を加える． 完全に溶解後，蒸留水 150 mL を加える．
試薬 3	サフラニン 0.25 g をエタノール 10 mL に溶かした後，蒸留水を 100 mL 加える．

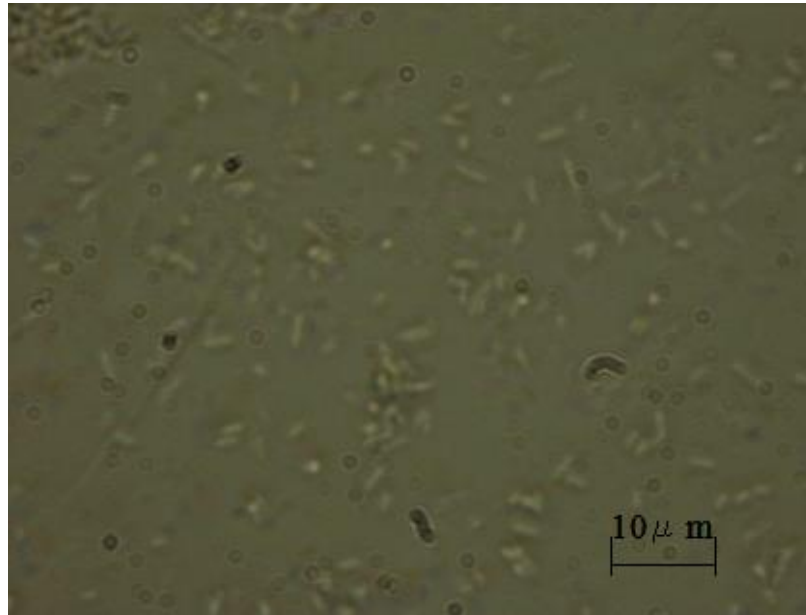


図 2.7 染色前の大腸菌の光学顕微鏡写真

Fig. 2.7 Optical microscope photograph of *E. coli* before stain

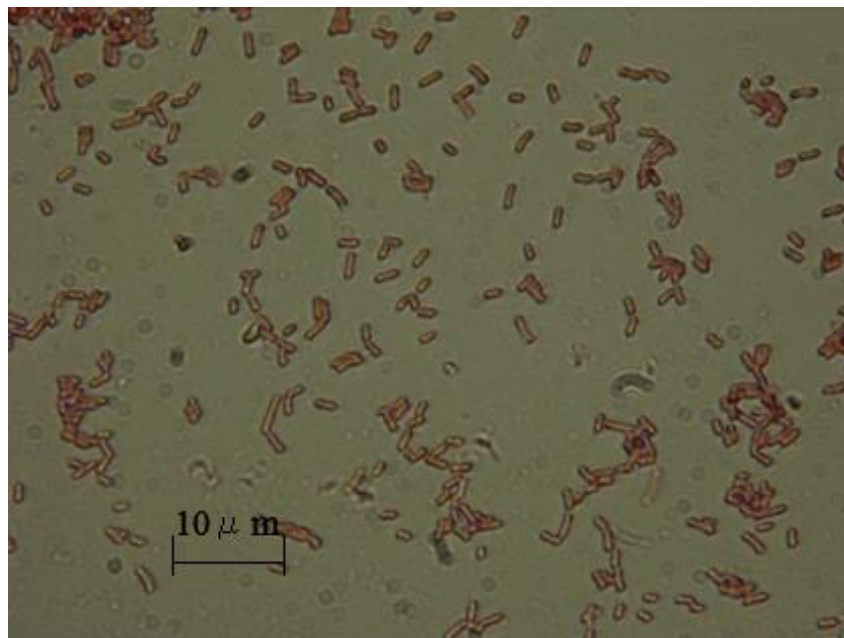


図 2.8 染色後の大腸菌の光学顕微鏡写真

Fig. 2.8 Optical microscope photograph of *E. coli* after stain

2.3 実験結果

図 2.9 に大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性を、図 2.10 に大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性を示す。投入エネルギーは式(2.2)より求めた。図中のマークは平均生菌率を、エラーバーは最小値および最大値を、括弧内の数字は実験回数を示す。エラーバーが重なり見難くなるため、 -3.8 kV および -4.4 kV 印加時の結果のマークとエラーバーは、左右に少しずらしている。なお、図 2.9 にはパルス電圧を印加しない場合の生菌率の変化も示している。この場合、印加回数ではなく、0~30 回の印加に要する時間 0~30 分に対しての生菌率の変化を示している。パルス電圧印加が無い場合には、大腸菌は殺菌されていないことが確認できる。

図 2.9 から、同じパルス印加回数では、印加したパルス電圧の波高値が高いほど平均生菌率は低いことがわかる。また、パルス電圧を印加した試料の生菌率はパルス印加回数の増加とともに減少しているが、ある印加回数を超えるとその減少率は緩やかになることがわかる。そして図 2.10 から、大腸菌の生菌率は投入エネルギーが大きいほど減少していることがわかる。また、同程度の投入エネルギーでも印加電圧の波高値が高いほど、生菌率は減少しているように見える。

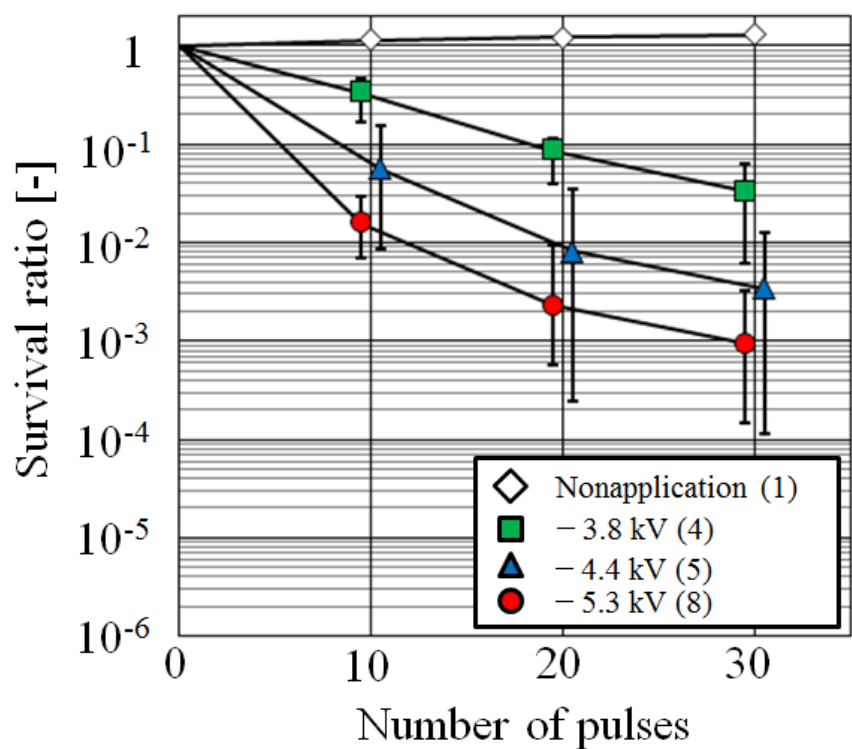


図 2.9 大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性

Fig. 2.9 The survival ratio of *E. coli* as a function of the number of pulses

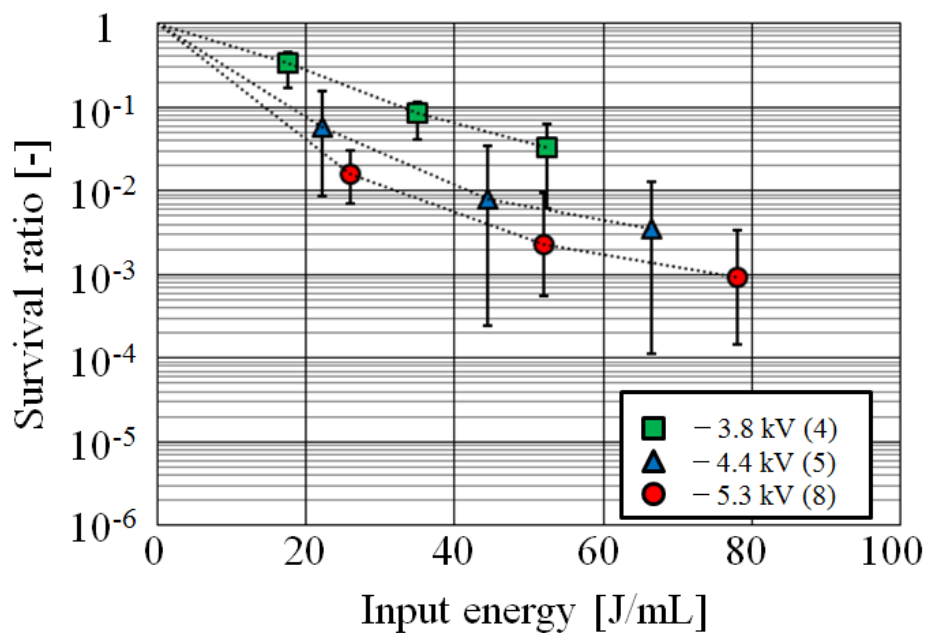


図 2.10 大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性

Fig. 2.10 The survival ratio of *E. coli* as a function of input energy

2.4 考察

2.4.1 殺菌機構モデルによる生菌率の算出

ここでは、U. Zimmermann らが提唱する殺菌機構のモデルに基づき、大腸菌の生菌率を印加回数の関数として算出することを試みる。そして、算出した生菌率と実験から得られた生菌率(図 2.9)を比較し、考察を行う。

式(1.3)および(1.4)から、大腸菌の細胞膜に生じる電位差は、大腸菌の長さ a と幅 d に依存していることがわかる。そこで、試料中の大腸菌の長さ a と幅 d の測定を行った。図 2.11 にパルス電圧印加前の 500 個の大腸菌の長さ分布を示す。この分布は、パルス電圧印加前の大腸菌の長さを 100 個ずつ 5 回測定し、計 500 個の分布をまとめた結果である。図 2.12 に大腸菌の光学顕微鏡写真を、表 2.7 に大腸菌の長さの区切りと平均値を示す。写真は光学顕微鏡(OLYMPUS 製: BX60)により倍率 500 倍にて撮影したものを PC 上で拡大したものである。対物レンズ(オリンパス製: UMPlamFI)の倍率は 50 倍であり、開口数は 0.80, 分解能は $0.42\text{ }\mu\text{m}$ である。大腸菌の長さ a と幅 d は図 2.12 のような写真から測定し、長さは表 2.7 に示すように区切った。図 2.11 に示すマークは、区切り範囲の平均値で示してある。長さの測定の際に、グラム染色により大腸菌を赤く染色した。測定の結果、大腸菌の長さ a は、 $0.50\text{ }\mu\text{m}\sim 4.50\text{ }\mu\text{m}$ であり、大腸菌の幅 d は約 $0.6\text{ }\mu\text{m}$ でほぼ一定だった。

U. Zimmermann らは、細胞膜の電位差 V_m が約 1 V を超えると細胞膜穿孔が生じると報告している^[8]。今回の計算では、 $V_m \geq 1\text{ V}$ になると大腸菌の細胞膜に孔が形成され大腸菌は死滅する、と仮定した。式(1.4)において、 $V_m = 1\text{ V}$ になる時の角度 θ を θ_c とする。 θ_c は、式(1.3), (1.4), (2.1)から菌の長さ a 、円筒槽内の菌の位置 r の関数として、以下の式(2.3)から導出される。

$$\theta_c(a, r) = \arccos\left(\frac{2 \ln \frac{R_2}{R_1}(a - 0.33d)r}{Va^2}\right) \quad (2.3)$$

図 2.13 に円筒槽内の大腸菌の模式図を示す。図 2.13 は、円筒の中心線を含む面で切断した断面図である。電界方向と大腸菌の長軸のなす角 θ の分布は、均一で偏りがないと考えられる。つまり、 θ は $0 \leq \theta \leq \frac{\pi}{2}$ の範囲で均一に分布している。従って、 θ が θ_c より小さな領域($0 \leq \theta \leq \theta_c$)となる確率は、 $\frac{\theta_c(a, r)}{\frac{\pi}{2}}$ である。また、長さ a の菌が、半径 r から $r+dr$ の

領域に存在する確率は、菌が均一に分布していると考えると、その体積 $\frac{2\pi r dr}{\pi(R_2^2 - R_1^2)}$ に比例

する。長さ a の菌の場合、半径が r から $r+dr$ の領域に存在し、殺菌される確率 $\alpha(a, r)$ は、以下の式(2.4)で示される。

$$\alpha(a, r) = \frac{2\pi r dr}{\pi(R_2^2 - R_1^2)} \frac{\theta_c(a, r)}{\frac{\pi}{2}} \quad (2.4)$$

よって殺菌槽全領域で長さ a の大腸菌が殺菌される確率 $\alpha(a)$ は、式(2.5)のように計算できる。

$$\alpha(a) = \int_{R_1}^{R_2} \frac{4r \cdot \theta_c(a, r)}{\pi(R_2^2 - R_1^2)} dr \quad (2.5)$$

図 2.14 に長さと殺菌率の関係を示す。図 2.14 は、パルス電圧 1 回印加による長さ a の大腸菌の殺菌率を式(2.5)から計算したものである。実験試料中の大腸菌には、図 2.11 に示すように長さ分布があると確認された。この図 2.11 の分布を用いて、初期菌数 1×10^7 CFU/mL 時の長さ a の大腸菌の個数 $N(a)$ を求めた。菌数 $N(a)$ の長さ a の大腸菌にパルス電圧を dx 回印加すると、殺菌率 $\alpha(a)$ で菌数は $dN(a)$ だけ減少する。減少した菌数 $dN(a)$ は式(2.6)から求められる。

$$dN(a) = -\alpha(a) \cdot N(a) \cdot dx \quad (2.6)$$

よって、パルス印加 x 回後の菌数 $N(a)$ は、式(2.7)で求めることができる。

$$N(a) = N_0(a)e^{-\alpha(a)x} \quad (2.7)$$

ここで、 $N_0(a)$ は長さ a の大腸菌の初期菌数である。パルス印加 x 回後に槽内に存在する全ての長さの大腸菌($a_{min} \sim a_{max}$)の菌数 N は、式(2.8)で計算することができる。

$$N = \int_{a_{min}}^{a_{max}} N(a) da = \int_{a_{min}}^{a_{max}} N_0(a)e^{-\alpha(a)x} da \quad (2.8)$$

従って、生菌率 Y は、式(2.9)から求めることができる。

$$Y = \frac{N}{N_0} = \frac{\int_{a_{min}}^{a_{max}} N_0(a)e^{-\alpha(a)x} da}{\int_{a_{min}}^{a_{max}} N_0(a) da} \quad (2.9)$$

図 2.15 に算出生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす印加電圧波高値の影響を示す。算出生菌率は、式(2.9)から求めた。

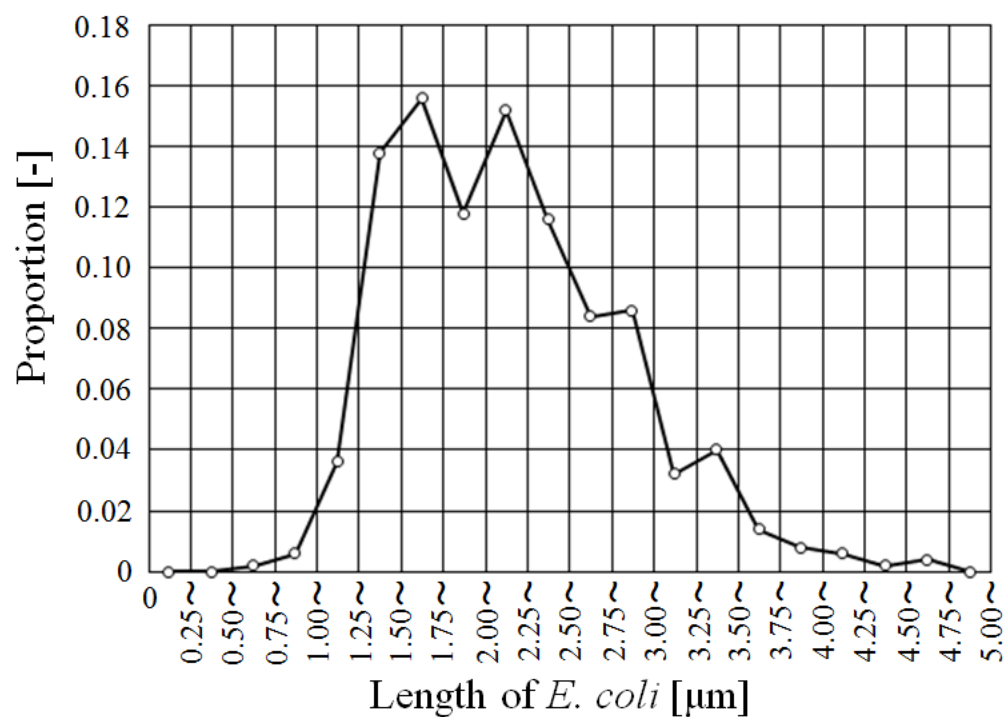


図 2.11 パルス電圧印加前の 500 個の大腸菌の長さ分布
 Fig. 2.11 Distributions of the length of 500 *E. coli* before pulses application



図 2.12 大腸菌の光学顕微鏡写真
 Fig. 2.12 Optical microscope photograph of *E. coli*

表 2.7 大腸菌の長さの区切りと平均値

Table 2.7 The section of length of *E. coli* and its average value

Section [μm]	Average value [μm]	Section [μm]	Average value [μm]
0~0.24	0.12	2.50~2.74	2.62
0.25~0.49	0.37	2.75~2.99	2.87
0.50~0.74	0.62	3.00~3.24	3.12
0.75~0.99	0.87	3.25~3.49	3.37
1.00~1.24	1.12	3.50~3.74	3.62
1.25~1.49	1.37	3.75~3.99	3.87
1.50~1.74	1.62	4.00~4.24	4.12
1.75~1.99	1.87	4.25~4.49	4.37
2.00~2.24	2.12	4.50~4.74	4.62
2.25~2.49	2.37	4.75~4.99	4.87

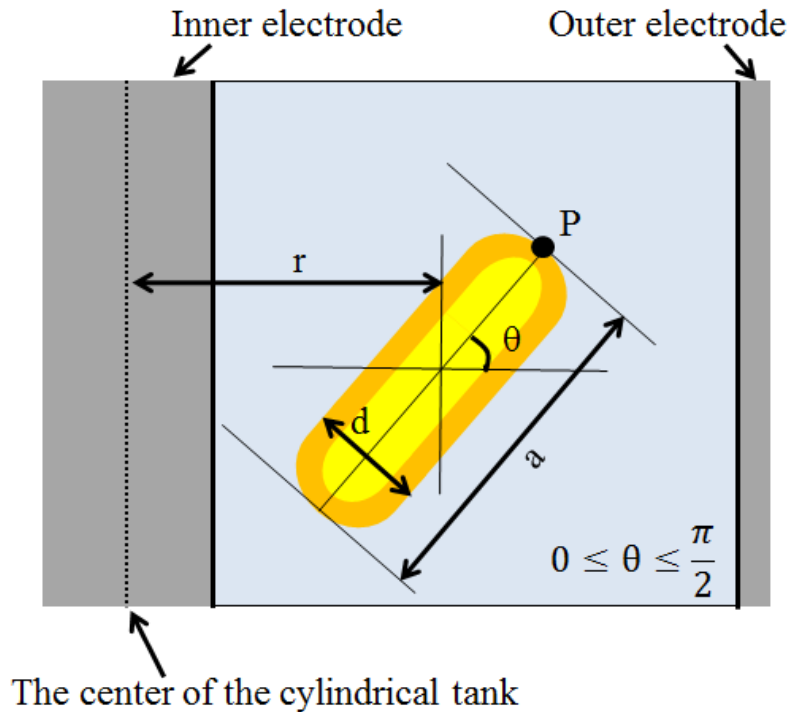


図 2.13 円筒槽内の大腸菌の模式図

Fig. 2.13 Schematic diagram of *E. coli* in the coaxial cylindrical tank

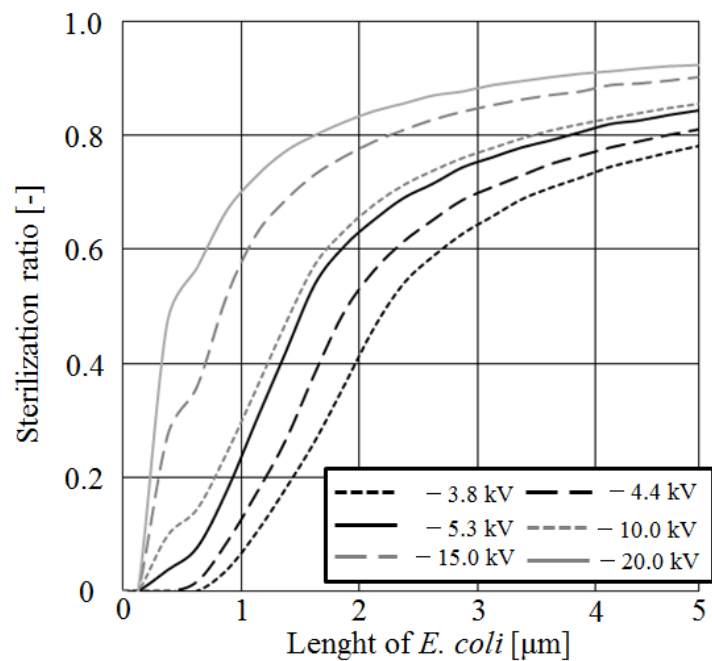


図 2.14 長さ と 殺菌率 の 関 係

Fig. 2.14 Sterilization ratio versa length of *E. coli*

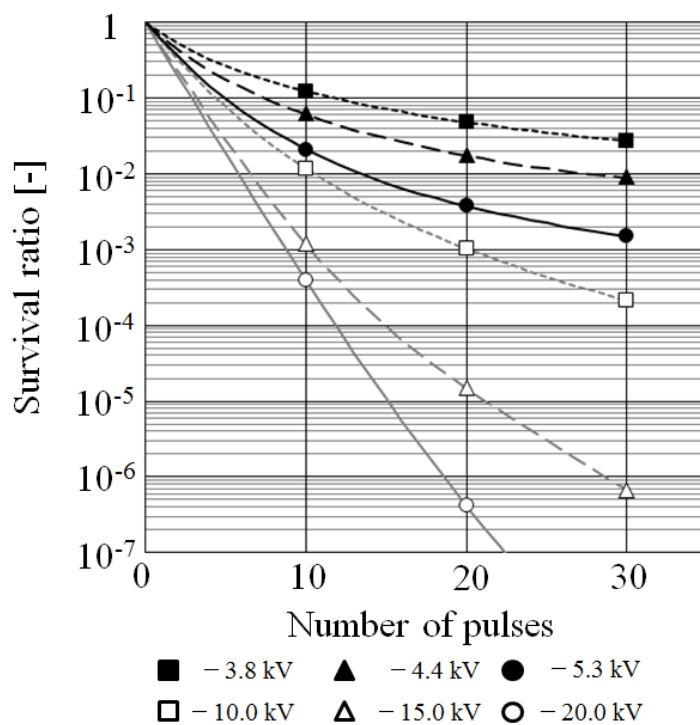


図 2.15 算出生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす印加電圧波高値の影響

Fig. 2.15 Effect of the peak value of applied voltage on the calculated survival ratio as a function of the number of pulses

2.4.2 算出結果と実験結果との比較

図 2.16 に、 -3.8 kV 印加時の算出生菌率と実験結果の比較を示す。なお、実験結果は図 2.9 でプロットしてあるものと同一であり、エラーバーは実験結果のものである。図 2.16 より、 -3.8 kV 印加時の算出生菌率と実験結果の減少傾向は、大方一致している。また、図 2.17 および図 2.18 は、 -4.4 kV および -5.3 kV 印加時の算出生菌率と実験結果の比較をそれぞれ示しており、 -4.4 kV および -5.3 kV 印加時の算出生菌率も、 -3.8 kV 印加時と同様に、実験結果の減少傾向と大方一致した。これらから、U. Zimmermann らのモデルを用いた本計算によって、生菌率を求めることが可能であることが示された。一方、実験値のエラーバーは大きい。今後は、実験値のばらつく要因を検討し、これを計算に考慮させることで、算出生菌率の精度を向上させる必要がある。

算出した生菌率および実験にて得られた生菌率は、図 2.16、図 2.17、図 2.18 から印加電圧波高値が高くなるほど減少していることがわかる。この傾向は、多くの先行研究でも報告されており、式(1.4)に示すように、印加電圧波高値、すなわち印加電界が高くなるほど膜に生じる電位差が高くなり、膜が破壊されやすくなったためであると考えられる。

生菌率の減少の度合いがパルス印加回数の増加とともに小さくなり、ある一定値に収束していることは、実験結果および計算結果ともに見られた。図 2.19 に、 -3.8 kV 印加時の算出した大腸菌の長さ分布を示す。なお、印加前の分布は図 2.11 と同一である。図 2.19 より、大腸菌の長さ分布はパルス印加回数の増加とともに長さの短い方(左)へシフトしていることがわかる。図 2.20 および図 2.21 に、 -4.4 kV および -5.3 kV 印加時の算出した大腸菌の長さ分布を示す。 -4.4 kV および -5.3 kV 印加時の大腸菌の長さ分布でも、 -3.8 kV 印加時の同様にパルス印加回数の増加とともに長さの短い方(左)へシフトしている。また図 2.19、図 2.20 および図 2.21 から、印加電圧波高値が高いほど、大腸菌の長さ分布は短い方へシフトしていることがわかる。これは図 2.14 に示すように、大腸菌の長さが長いほど殺菌率は高く、長い大腸菌は殺菌されていくからである。このことから、生菌率の減少幅が小さくなることは、パルス印加回数が増加すると殺菌され難い短い菌が残るためであると考えられる。また、本研究で印加したパルス電界では、殺菌されない短い大腸菌も存在するため、生菌率はある一定値に収束する。U. Zimmermann らのモデルより提案した式(2.9)による生菌率の算出から、本研究と同じパルス印加 30 回で、滅菌(生菌率が 10^{-6} 以下)を達成するためには、図 2.15 に示すように波高値 -15.0 kV 以上のパルス電圧を印加する必要があることが計算される。

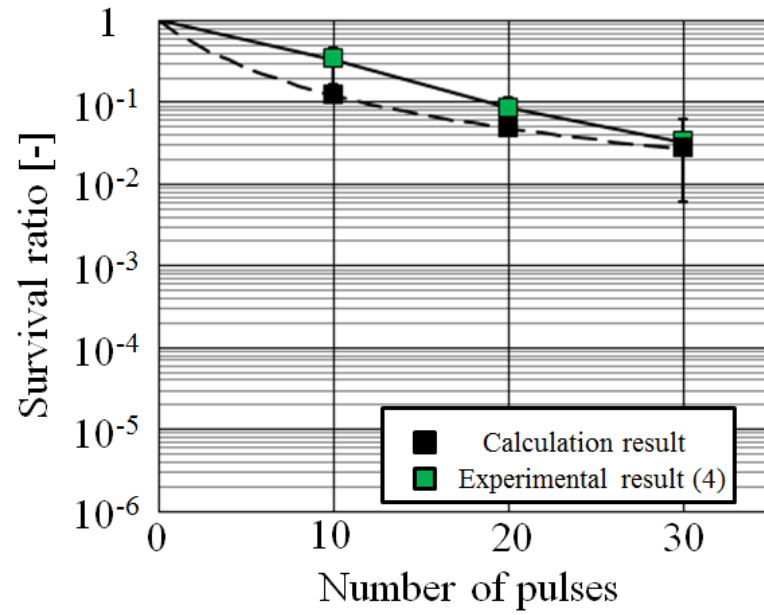


図 2.16 -3.8 kV 印加時の算出生菌率と実験結果の比較
 Fig. 2.16 Comparison of calculated survival ratio and experimental result
 (application of -3.8 kV pulses)

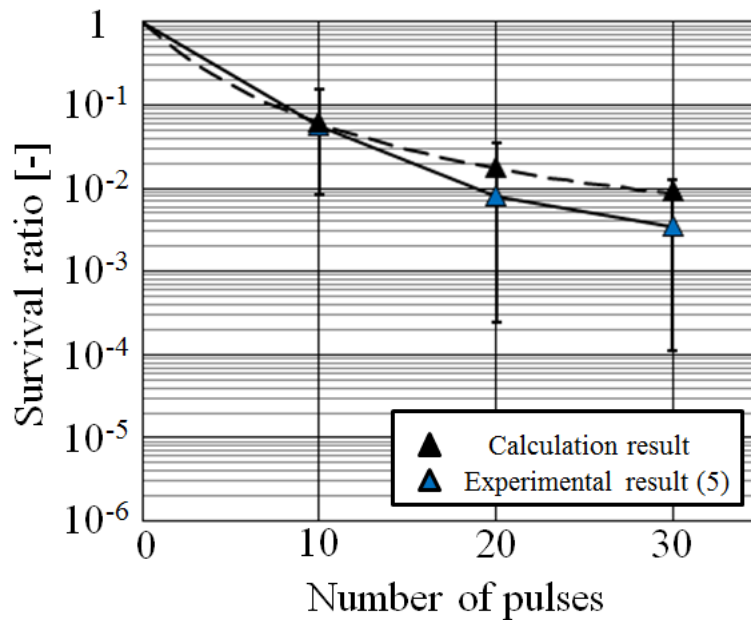


図 2.17 -4.4 kV 印加時の算出生菌率と実験結果の比較
 Fig. 2.17 Comparison of calculated survival ratio and experimental result
 (application of -4.4 kV pulses)

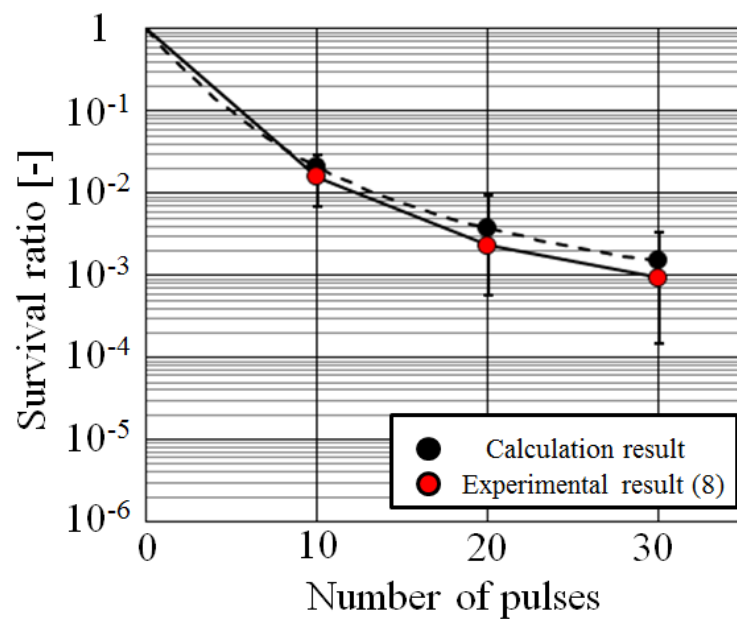


図 2.18 -5.3 kV 印加時の算出生菌率と実験結果の比較

Fig. 2.18 Comparison of calculated survival ratio and experimental result
(application of -5.3 kV pulses)

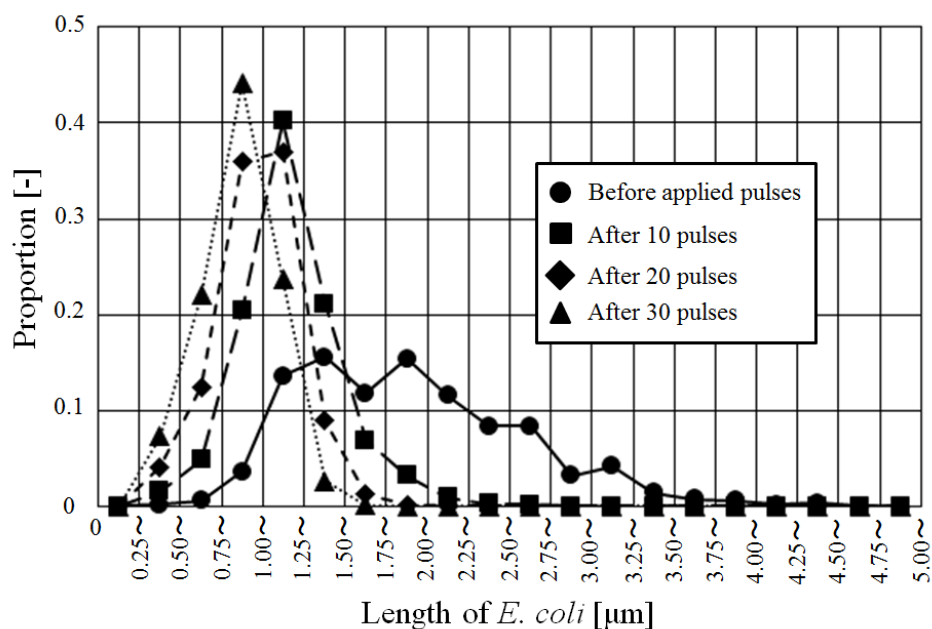


図 2.19 -3.8 kV 印加時の算出した大腸菌の長さ分布

Fig. 2.19 Calculated distributions of the length of *E. coli* (application of -3.8 kV pulses)

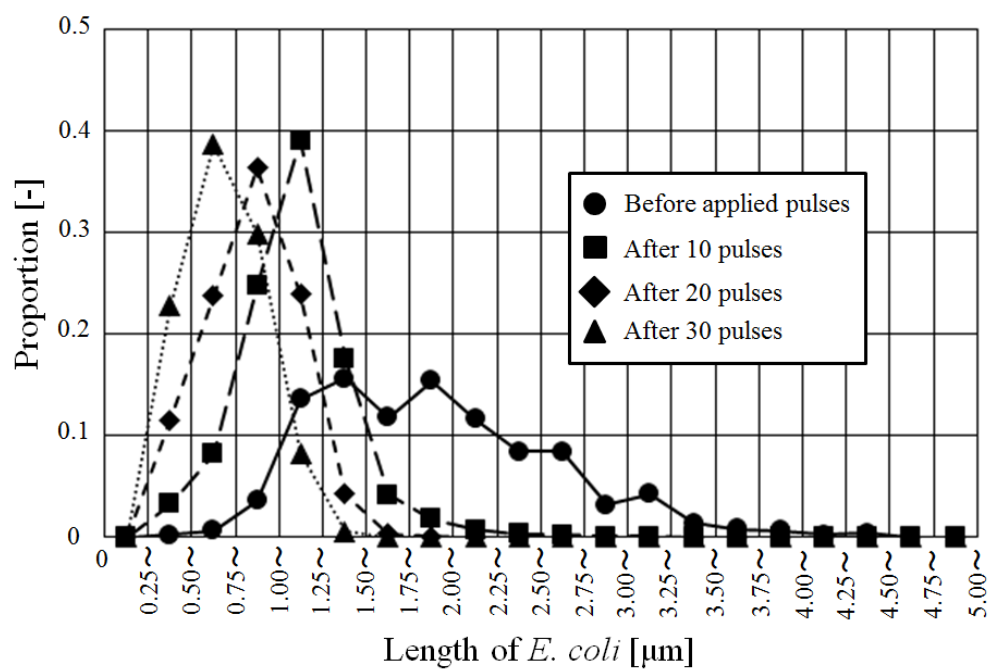


図 2.20 -4.4 kV 印加時の算出した大腸菌の長さ分布

Fig. 2.20 Calculated distributions of the length of *E. coli* (application of -4.4 kV pulses)

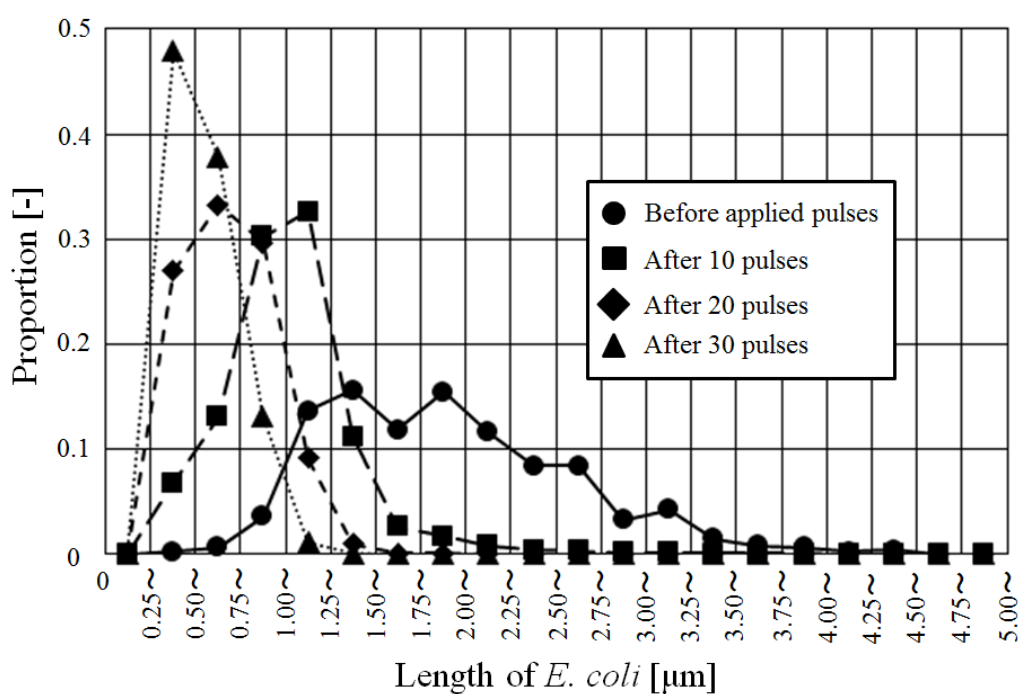


図 2.21 -5.3 kV 印加時の算出した大腸菌の長さ分布

Fig. 2.21 Calculated distributions of the length of *E. coli* (application of -5.3 kV pulses)

2.5 まとめ

本章では，大腸菌を含む液体培地試料に波高値 -3.8 kV， -4.4 kV および -5.3 kV のパルス電圧を印加し殺菌実験を行い，高電界パルス印加後の生菌率と U. Zimmermann らが提唱する殺菌機構のモデルから算出した生菌率を比較した．生菌率の計算では，U. Zimmermann らの報告を参考にし，細胞膜の電位差が 1 V 以上で菌が死滅するとし，印加電界強度，パルス電圧印加回数，菌の長軸と電界方向のなす角および菌の長さと幅を考慮した．生菌率の算出値と実験値は良く一致しており，印加パルス電界が高いほど，生菌率は減少した．これは，印加パルス電界が高いほど，細胞膜に生じる電位差が高くなり，細胞膜が破壊され易くなるからである．一方，生菌率の減少の度合いがパルス印加回数の増加とともに小さくなり，ある一定値に収束していることは，実験結果および計算結果ともに見られた．高電界パルス殺菌法では，菌の長さが長いほど殺菌率は高く，生菌率は減少しやすい．このことから，生菌率の減少幅が小さくなることは，パルス印加回数が増加すると殺菌され難い短い菌が残るためであると考えられる．

参考文献

- [1] H. Hulsheger, J. Potel, E. -G. Niemann : “Killing of Bacteria with electric Pulses of High Field Strength”, *Radiat Environ Biophys*, Vol. 20, No. 1, pp. 53-65 (1983)
- [2] Sheshakamal Jayarm, G. S. P. Castle, Argyrios Margaritis : “The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*”, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 40, No. 1, pp. 117-122 (1993)
- [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, Vol. 35, No. 3, pp. 114 (2011)
- [4] BD Bionutrients テクニカルマニュアル 第 3 版 : (株)日本ベクトン・ディッキンソン
- [5] 河村達雄, 河野照哉, 柳父悟 : 「電気学会大学講座 高電圧工学 3 版改訂」, 電気学会, pp. 25-27 (2007)
- [6] 小西正朗, 堀内淳一 : 「細胞の増殖を捉える-計測法から比速度算出まで-」, 生物工学会誌, Vol. 93, No. 3, pp. 149- (2015)
- [7] 小澤美奈子 : 「生化学辞典(第 3 版)」, (株)東京化学同人, pp. 399-400 (1998)
- [8] U. Zimmermann, G. Pilwat and F. Riemann : “DIELECTRIC BREAKDOWN OF CELL MEMBRANES”, *Biophysical Journal*, Vol. 14, No. 11, pp. 881-899 (1974)

第 3 章 液体温度とパルス間隔が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響

3.1 はじめに

高電界パルスによる殺菌効果は、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^[1-4]。その理由の一つとして、細胞膜の流動性が高温で上昇するためであると考えられている。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^[5]。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、高電界パルス印加により、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^[6]。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。本章では、液体温度とパルス電圧の印加間隔が高電界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。

3.2 実験方法

3.2.1 実験試料

前章 2.2.1 と同様の手順にて、実験試料を作製した。

3.2.2 実験手順

殺菌槽、インパルス電圧発生器および実験回路は第 2 章で使用したものと同様である。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、 -5.3 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が同じ値になるよう調整した。図 3.1 に印加電圧波形を示す。図 3.1 から、室温領域と低温領域の試料の印加電圧波高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 $5.1\text{ }\mu\text{s}$ 、波尾長は $11.1\text{ }\mu\text{s}$ 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(2.1)から殺菌槽内の電界強度は，内部電極付近で最大電界 $2.6\ \text{kV/mm}$ ，外部電極付近で最小電界 $1.2\ \text{kV/mm}$ 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．

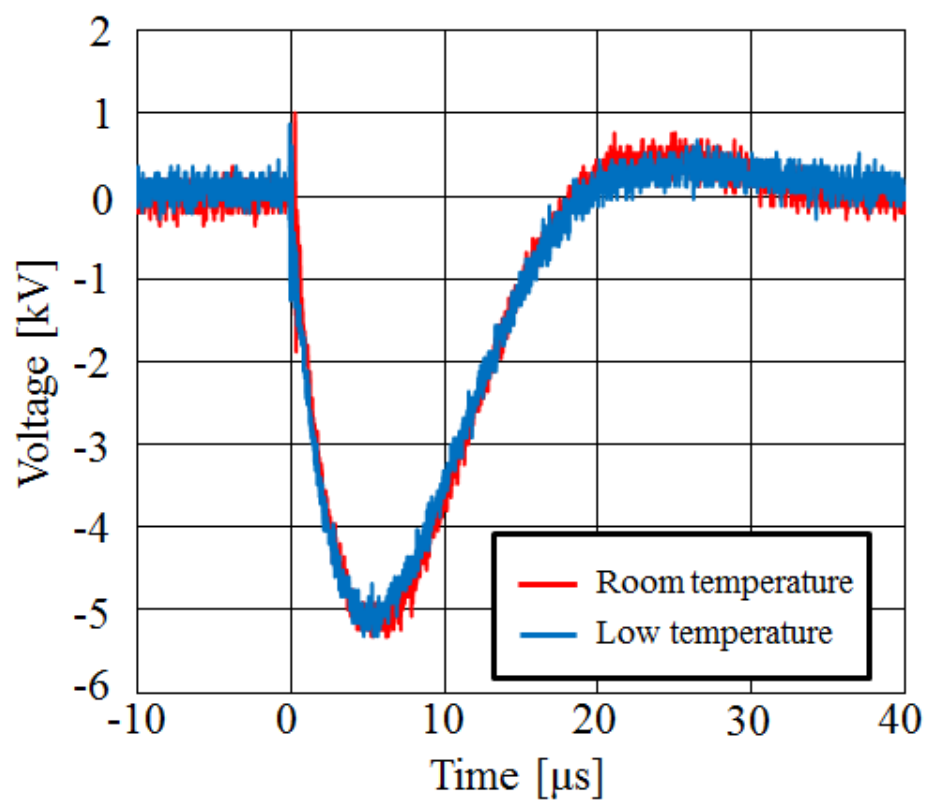


図 3.1 印加電圧波形

Fig. 3.1 The waveform of applied pulse voltage

3.2.3 実験試料の温度変化

図 3.2 に試料温度のパルス印加回数特性(時間特性)を示す．図中の破線は，無印加時における試料温度の時間特性を示している．図 3.2 から，無印加時において試料温度はほとんど変化しないことがわかる．一方，実線はパルス電圧印加時の試料温度のパルス印加回数特性を示しており，試料温度は印加回数の増加とともに上昇している．60 秒間隔で印加した試料温度は，室温領域では最大約 5 °C 上昇し，低温領域では最大約 3 °C 上昇した．

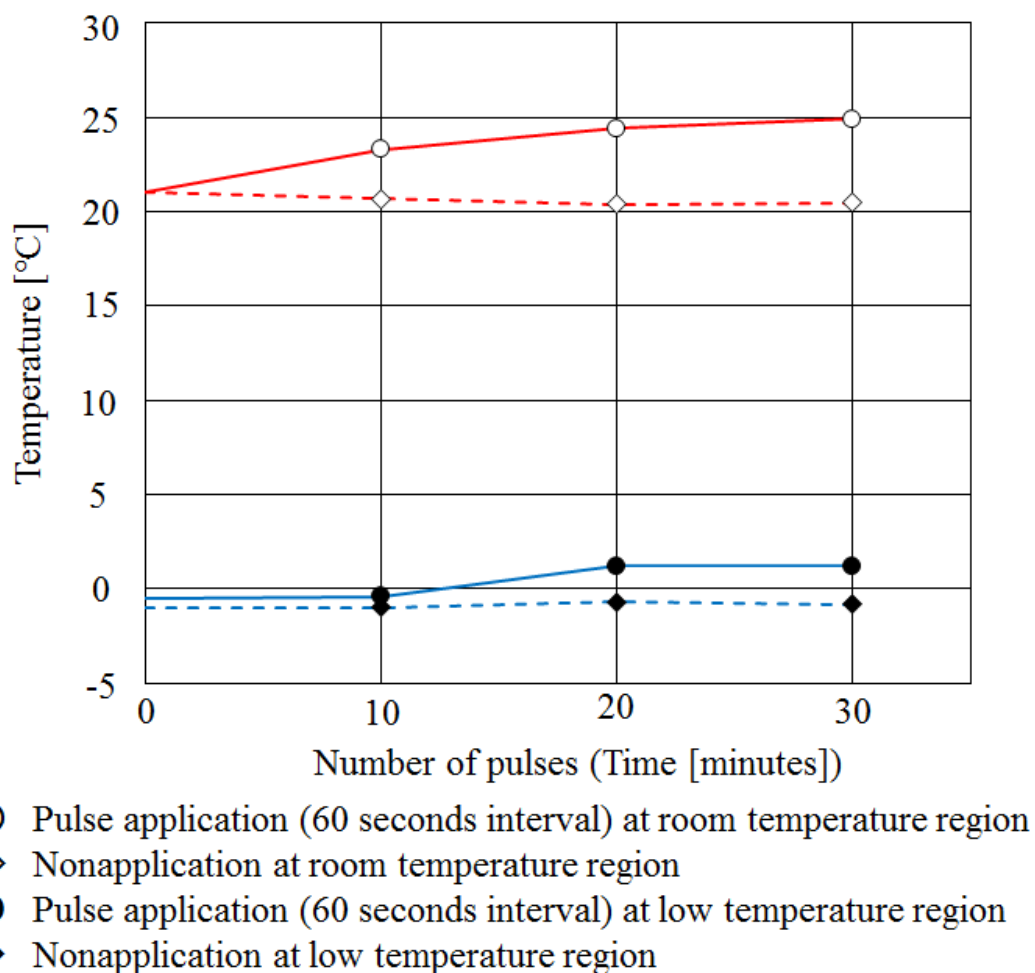


図 3.2 試料温度のパルス印加回数特性(時間特性)

Fig. 3.2 The temperature of sample as a function of the number pulses (time)

3.3 実験結果

図 3.3 に無印加時の大腸菌の生菌率の時間特性を, 図 3.4 および 3.5 に室温領域および低温領域での大腸菌の生菌率のパルス印加回数依存性を示す. 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 3.4 および図 3.5 では, パルス間隔を変化させた結果も示している. 図 3.3 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 3.3 から, 無印加時では各試料の生菌率は減少していない. 一方, 図 3.4 および図 3.5 から, パルス電圧を印加した試料の生菌率は減少している. これらの結果から, $-1.2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim +3.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ および $+17.3\text{ }^{\circ}\text{C} \sim +25.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ の温度では, 高電界パルスを印加しない場合, 大腸菌は死滅せず, 高電界パルス印加により大腸菌が殺菌されたことが確認できる. 図 3.4 および図 3.5 から, 室温領域および低温領域の両温度領域において大腸菌の生菌率は, パルス印加回数の増加とともに減少している. 一方, ある印加回数を超えると, 生菌率の減少は緩やかになっているように見える.

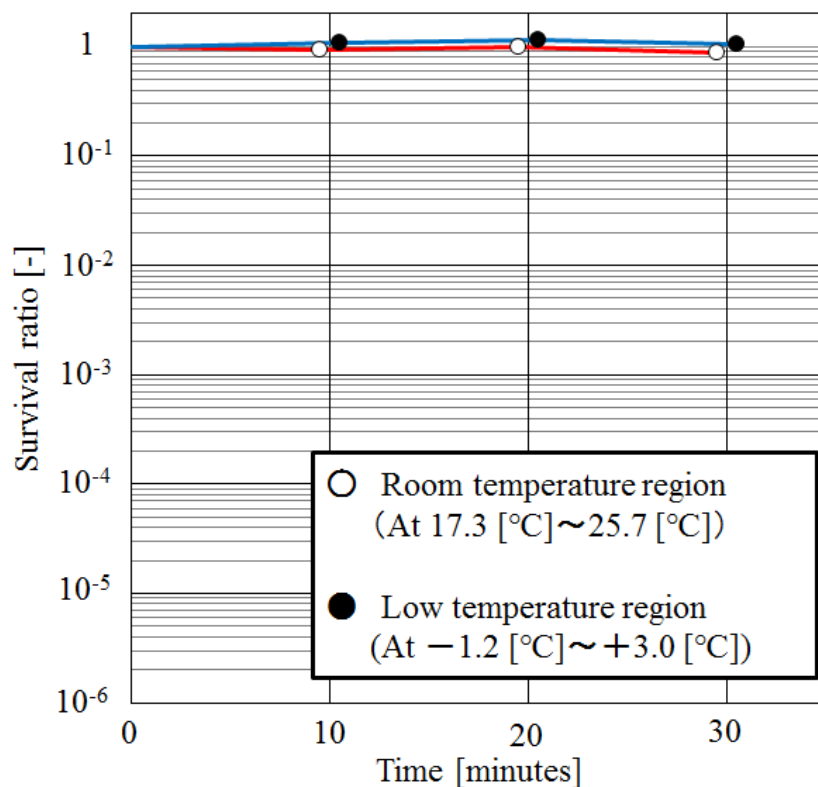


図 3.3 無印加時の大腸菌の生菌率の時間特性

Fig. 3.3 The survival ratio as a function of the time with the no pulse application

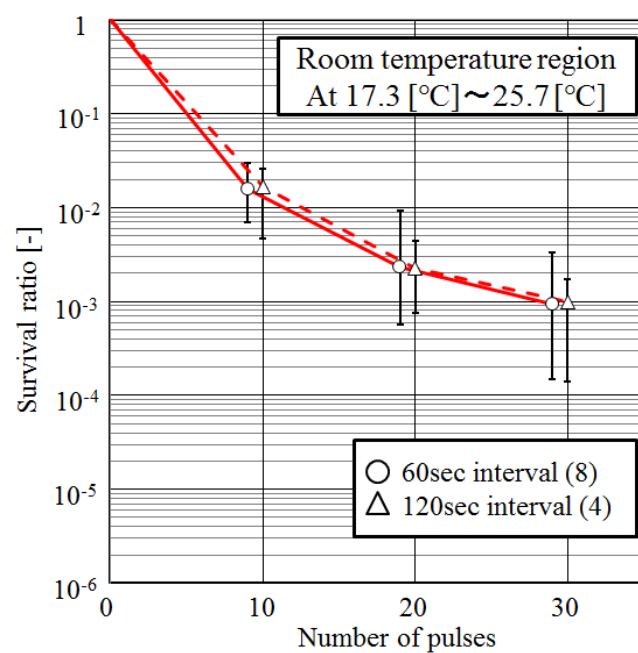


図 3.4 室温領域での大腸菌の生菌率のパルス印加回数依存性
 Fig. 3.4 The survival ratio as a function of the number of pulses at room temperature region (+17.3 °C ~ +25.7 °C)

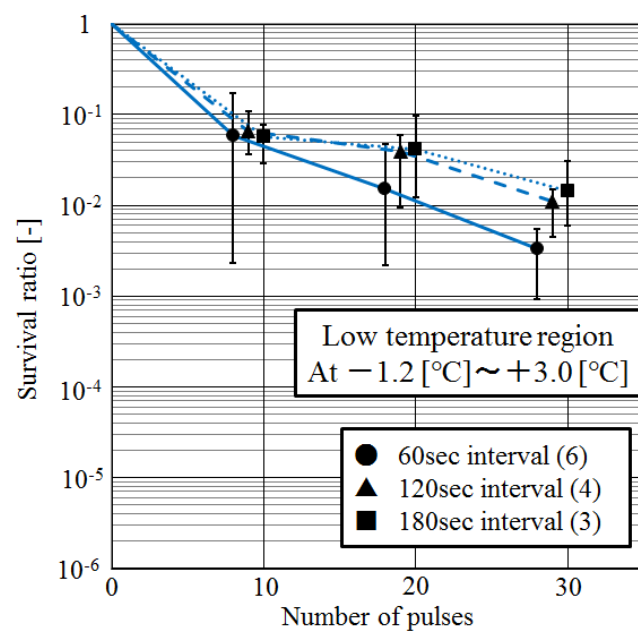


図 3.5 低温領域での大腸菌の生菌率のパルス印加回数依存性
 Fig. 3.5 The survival ratio as a function of the number of pulses at low temperature region (-1.2 °C ~ +3.0 °C)

3.4 考察

3.4.1 温度の影響

図 3.4 および図 3.5 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。大嶋らは、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^[1]。また、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^[1-4]。この原因として、Marquez 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^[2]。一方、大嶋らは、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^[1,4]。図 3.6 に細胞膜の構造に及ぼす温度の影響の模式図を示す。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^[7]。高電界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 Maxwell 応力が、細胞膜を圧縮し、膜を不可逆的に破壊することで殺菌すると考えられている。この Maxwell 応力の大きさ $[F]$ は、式(1.5)で与えられ、細胞膜に生じる電界 E_m の2乗に比例する。そして、この電界 E_m [V/m]は、式(3.1)で示される。

$$E_m = \frac{V_m}{d_m} \quad (3.1)$$

ここで、 V_m は細胞膜に生じる電位差 [V]を、 d_m は細胞膜の厚さ [m]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。細胞膜の流動性が高くなることから、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。リン脂質の疎水性部は、炭化水素鎖から構成されている。温度が高くなるほど、炭化水素鎖はC-C結合の周りで回転し易くなり、真っ直ぐ伸びきらなくなる。このため、細胞膜は薄くなると報告されている^[8]。式(3.1)から、細胞膜が薄くなると、細胞膜に生じる電界は高くなり、式(1.5)から Maxwell 応力が大きくなることがわかる。以上のことから、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、パルス電圧印加で生じる Maxwell 応力の圧縮力に対して高い抵抗力を持つ。また、リン脂質の炭化水素鎖は、低温では真っ直ぐ伸びていることから、細胞膜は厚くなると報告されており^[8]、式(3.1)および式(1.5)から、細胞膜が厚くなるほど Maxwell 応力は小さくなることがわかる。これらのことから、低温領域では大腸菌は殺菌されにくいと考えられる。

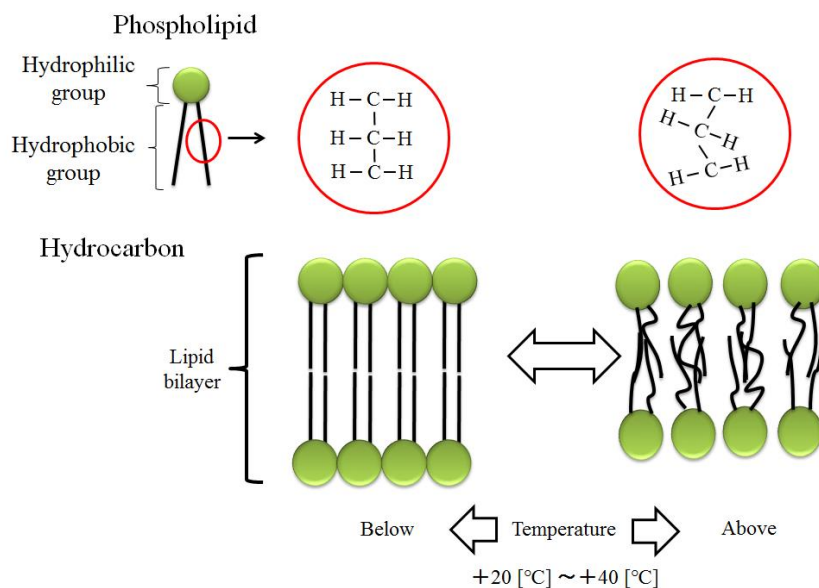


図 3.6 細胞膜の構造に及ぼす温度の影響の模式図

Fig. 3.6 Schematic diagram of the effect of the structure of cell membrane on the temperature

3.4.2 パルス印加間隔の影響

図 3.4 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 3.5 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の大きさが致死的ではない場合、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、リン脂質分子の移動により修復されると考えられている^[9]。高電界パルス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^[10]は約 180 秒、イカ巨大神経^[11]や人工膜^[11]では約 10 マイクロ秒、赤血球^[11]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。孔を閉じることに対する必要な時間がパルス電圧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、つまり細胞膜を修復し終える前に次のパルスが印加されたなら、

形成された孔を通して電流が流れることで孔が拡大し、菌は殺菌されやすくなることが考えられる。図 3.5 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($-1.2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim+3.0\text{ }^{\circ}\text{C}$)における修復時間が、60 秒 $\sim$ 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 3.4 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、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。これより、大腸菌の細胞膜の室温($+17.3\text{ }^{\circ}\text{C}\sim+25.7\text{ }^{\circ}\text{C}$)における修復時間は 60 秒より短いことが示唆された。

3.4.3 温度を考慮した生菌率の算出

第 2 章では、U. Zimmermann らの提唱する高電界パルス殺菌モデルを用いて、菌の長さや幅、印加パルス電界強度、菌の長軸と電界方向のなす角、パルス電圧印加回数を考慮して、生菌率を見積もった。ここでは、第 2 章の生菌率の算出方法を基に、温度を考慮した生菌率の算出を試みた。細胞膜に孔が形成される電位差は温度に影響されると報告されている^[11]。この報告では、幅 $0.4\text{ }\mu\text{s}$ のパルス電圧を酸化コレステロール膜に印加した結果が示されており、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ のときの孔が形成される電位差は約 1.4 V 、 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ のときは約 1 V であることが述べられている^[11]。そこで、今回は細胞膜に生じる電位差が室温では 1 V 、低温では 1.4 V 以上になると大腸菌が死滅すると仮定した。計算に必要な菌の長さや幅は、第 2 章での値を用いた。

図 3.7 に室温領域における生菌率の算出値と実験値の比較を、図 3.8 に低温領域における生菌率の算出値と実験値の比較を示す。図 3.7 および図 3.8 中において、黒塗りおよび中抜きのマークが実験値(図 3.4 および図 3.5)を、赤色および青色のマークは算出値を、エラーバーは最大値、最小値を示す。

図 3.7 から、室温領域での生菌率の算出値とパルス間隔 60 秒および 120 秒の生菌率の実験値は、良く一致していることがわかる。一方、図 3.8 から低温領域では、生菌率の算出値とパルス間隔 120 秒および 180 秒の生菌率の実験値は同程度であるが、パルス間隔 60 秒の実験値は、算出値とずれている。これは、低温領域のパルス電圧印加間隔 60 秒では、高電界パルスを印加された大腸菌の細胞膜は修復されておらず、細胞膜にダメージが蓄積され、殺菌効果が高くなるためであると考えられる。また今回は、温度が細胞膜の構造に影響を与えるモデルを考えてきたが、温度は液体試料中の成分の移動度等にも影響を及ぼすことが予想される。今後、細胞膜の修復時間や温度が液体試料成分に与える影響等を考慮し、生菌率を算出する必要がある。

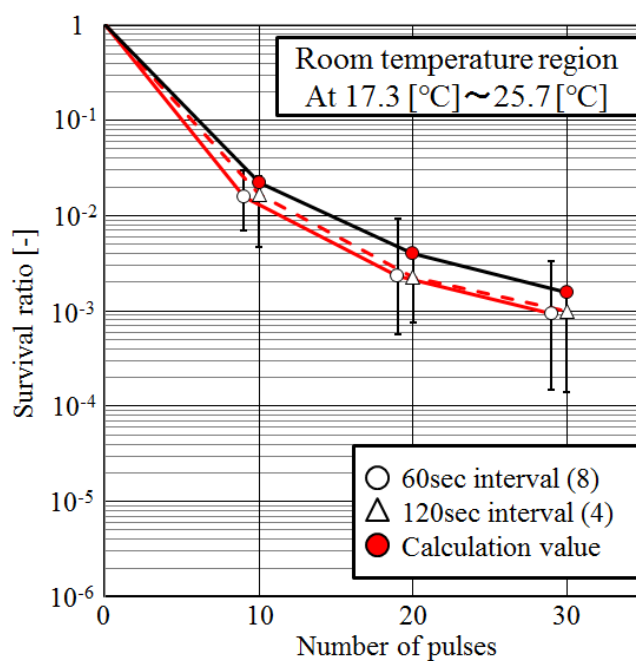


図 3.7 室温領域における生菌率の算出値と実験値の比較
Fig. 3.7 Comparison of calculated survival ratio and Experimental result
at room temperature region

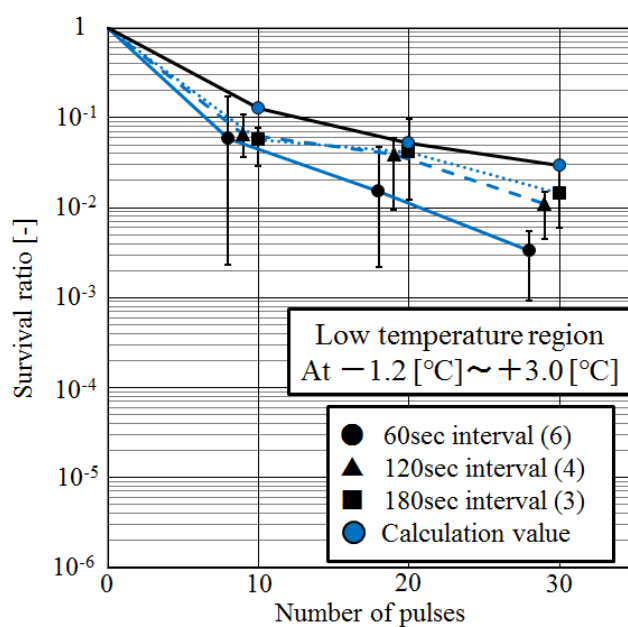


図 3.8 低温領域における生菌率の算出値と実験値の比較
Fig. 3.8 Comparison of calculated survival ratio and Experimental result
at low temperature region

3.5 まとめ

本章では、低温($-1.2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim+3.0\text{ }^{\circ}\text{C}$)あるいは室温($+17.3\text{ }^{\circ}\text{C}\sim+25.7\text{ }^{\circ}\text{C}$)の大腸菌を含む液体試料にパルス電圧(波高値： -5.3 kV ，幅： $20\text{ }\mu\text{s}$)を 60 秒，120 秒あるいは 180 秒間隔で 30 回印加することで，液体温度とパルス電圧印加間隔が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響を検討し，以下の結果を得た．

- ① 全ての実験試料の大腸菌の生菌率は，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る傾向がみられた．
- ② 低温領域の大腸菌の生菌率は，室温領域のものより高かった．これは，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，大腸菌の細胞膜の修復時間は低温領域では 60～120 秒，室温領域では 60 秒以下であることが示唆された．
- ④ 第 2 章を基に，温度を考慮した大腸菌の生菌率算出を試みた．パルス電界印加により細胞膜に生じる電位差が，室温では 1 V，低温では 1.4 V 以上になると，大腸菌は死滅すると仮定した．その結果，室温領域では，算出値と実験値は良く一致した．一方，低温領域では，算出値と 120 秒および 180 秒間隔の実験値は同程度だったが，算出値と 60 秒間隔の実験値の差は大きかった．これは，低温領域のパルス電圧印加間隔 60 秒では，高電界パルスを印加された大腸菌の細胞膜は修復されておらず，細胞膜にダメージが蓄積され，殺菌効果が高くなるためであると考えられる．また今回は，温度が細胞膜の構造に影響を与えるモデルを考えてきたが，温度は液体試料中の成分の移動度等にも影響を及ぼすことが予想される．今後，細胞膜の修復時間や温度が液体試料成分に与える影響等を考慮し，生菌率を算出する必要がある．

参考文献

- [1] Takayuki Ohshima, Kanako Okuyama, Masayuki Sato : “Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of *Escherichia coli*”, *Journal of Electrostatics*, Vol. 55, No. 3-4, pp. 227-235 (2002)
- [2] V. O. Marquez, G. S. Mittal, M. W. Griffiths : “Destruction and Inhibition of Bacterial Spores by High Voltage Pulsed Electric Field”, *Journal of Food Science*, Vol. 62, No. 2, pp. 339-402 (1997)
- [3] H. Hulsheger, J. Potel, E. -G. Niemann : “Killing of Bacteria with electric Pulses of High Field Strength”, *Radiat Environ Biophys*, Vol. 20, No. 1, pp. 53-65 (1983)
- [4] 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*, Vol. 2, No. 2, pp. 105-112 (2001)
- [5] William H. Elliott, Daphne C. Elliott (訳：清水孝雄，工藤一郎)：「生化学・分子生物学(第3版)」，東京化学同人，pp. 92-128 (2012)
- [6] 杉村厚，清水伸：「電気穿孔法」，*化学と生物*，Vol. 29, No. 11, pp. 54-60 (1991)
- [7] David L Nelson, Michael M Cox, “Lehninger PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY 4th edition”, W. H. Freeman and Company, pp. 380-381, (2005)
- [8] 小澤美奈子：「分子細胞生物学 第5版」，(株)東京化学同人，pp. 127-133 (2005)
- [9] 市川厚：「マッキー生化学—分子から解き明かす生命 (第4版)」，(株)化学同人，pp. 363-365 (2010)
- [10] 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」，*日本醸造協会誌*，Vol. 91, No. 12, pp. 867-872 (1996)
- [11] R. Benz, F. Beckers, U. Zimmermann : “Reversible Electrical Breakdown of Lipid Bilayer Membranes: A charge-Pulse Relaxation Study”, *J. Membrane Biol.* , Vol. 48, No. 2, pp. 181-204 (1979)

第 4 章 水溶液中のイオンが高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響

4.1 はじめに

高電界パルス殺菌法の研究では、実験試料の溶液としてリン酸緩衝液^[1]、NaCl 水溶液^[2-4]、液体培地^[5]などが多く使用されている。H. Hülshager らは、水溶液中の電解質濃度が高電界パルスによる殺菌率に影響を及ぼすことを報告している^[6-7]。しかし、殺菌率と電解質の種類や濃度の因果関係については不明な点が多い。そこで本章では、高電界パルス殺菌に影響を及ぼす水溶液中のイオンに注目し、種類や濃度を変化させて、実験を実施した。その結果を高電界パルス印加により細胞膜に働く Maxwell 応力の観点から考察した。

4.2 実験方法

4.2.1 実験試料

殺菌対象は *Escherichia coli* JM103(非病原性)である。この菌を寒天培地上に塗布し、静置培養(37 °C, 24 時間)した。その後、寒天培地上に形成されたコロニー1つを液体培地 5 mL 中に入れ、振とう培養(37 °C, 24 時間)した。培養に使用した培地の成分は、表 2.1 の通りである。振とう培養した液体培地 5 mL 中の 100 μ L を、別の滅菌済みの液体培地 5 mL 中に入れ、再び振とう培養(37°C)した。この液体培地の吸光度(OD620)が 0.6 になったときのもの 1 mL を採取し、滅菌したポリプロピレンチューブ内に入れ、チューブを遠心分離(8,000 rpm, 20 °C, 5 分)した。遠心後、チューブ内の上澄み液を捨て、沈殿物(大腸菌)のみをチューブ内に残した。沈殿物の質量は 30 mg だった。実験試料は、チューブ内の沈殿物(大腸菌)のみを濃度 $3.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L の NaCl, KCl, CsCl, CsBr 各種水溶液 10 mL 内に入れたものである。試料容量は約 10.3 mL となり、試料の初期菌数は約 1×10^7 CFU/mL である。また、実験試料の pH および導電率は、pH 計(HM-30R 型:TOADKK)および電気伝導率計(CM-30R 型:TOADKK)を用いて測定した。試料の pH は全ての電解質濃度で約 6.5 であった。図 4.1 に試料の導電率の電解質濃度特性を示す。図 4.1 は、試料の導電率は電解質濃度が高いほど増加していることを示している。

4.2.2 実験手順

殺菌槽，インパルス電圧発生器および実験回路は第 2 章で使用したものと同様である．殺菌槽内に試料 6 mL を入れ，インパルス電圧発生器から殺菌槽の内部電極に波高値 -4.4 kV のパルス電圧を 60 秒間隔で 30 回印加した．パルス電圧印加 1 回ごとに殺菌槽を振って攪拌した．なお，実験は室温で行った．試料の導電率は電解質濃度により異なるため，殺菌槽のインピーダンスが変化し，図 2.2 中のコンデンサ(0.0625 μ F)に充電された電圧値が同じ場合，殺菌槽に加わる電圧の波高値が変化した．そのため，殺菌槽に加わる電圧の波高値が同じ値になるようコンデンサの充電電圧値を調整した．図 4.2 に 0.01 mol/L NaCl 試料の印加電圧波形を，表 4.1 に印加電圧波形の波頭長および波尾長を示す．各試料に印加した電圧の波頭長および波尾長は，表 4.1 より電解質の種類や濃度の変化に対して大きく変化しなかった．式(2.1)から，殺菌槽の内部電極に近い程電界強度は高く，最大で 2.2 kV/mm，最小で 1.0 kV/mm である．また，パルス電圧印加による試料の単位体積当たりの投入エネルギー En は，式(2.2)のように印加電圧波形と電流波形の積を積分することで求めた．図 4.3 から図 4.6 に各試料の印加電流波形を示す．図 4.7 にパルス電圧 30 回印加に対する投入エネルギーの電解質濃度特性を示す．また，図 4.7 中で投入エネルギーが最も高い 1.0×10^{-2} mol/L CsCl 試料では，パルス電圧印加 30 回後の温度は，印加前の試料と比較して 3°C 程度上昇した．

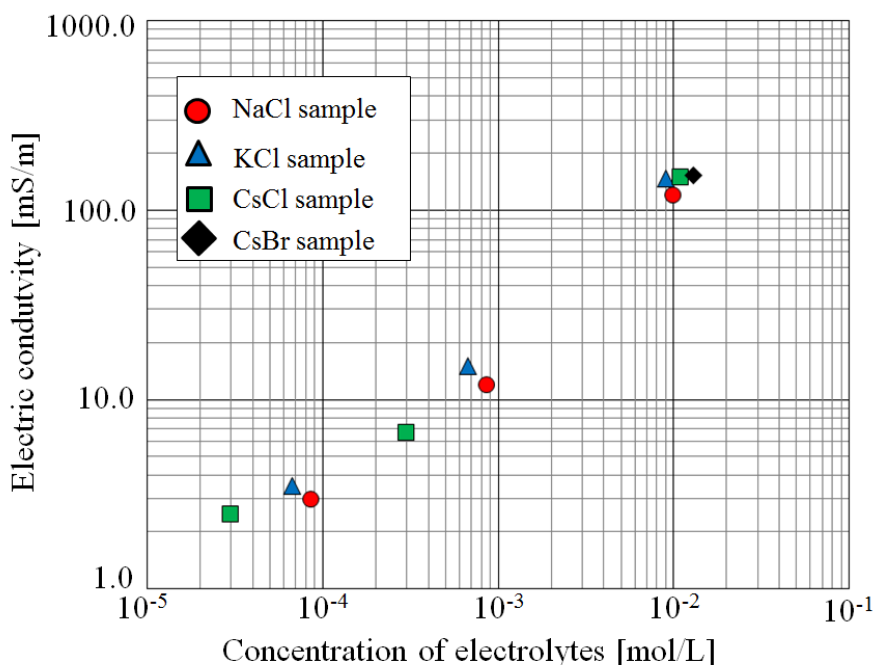


図 4.1 試料の導電率の電解質濃度特性

Fig. 4.1 The electric conductivity of sample as a function of the concentration of electrolytes

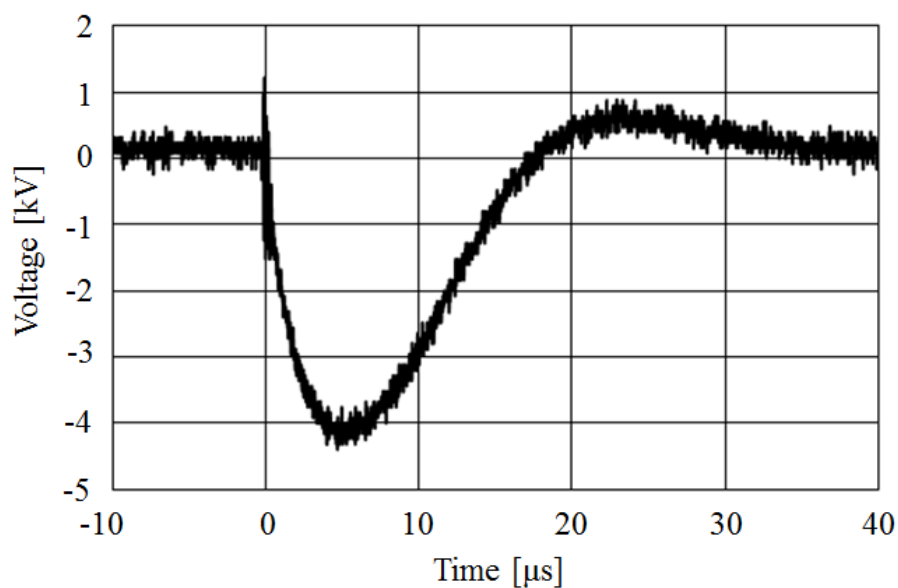


図 4.2 0.01 mol/L NaCl 試料の印加電圧波形

Fig. 4.2 The typical shape of the applied voltage (0.01 mol/L NaCl sample)

表 4.1 印加パルス電圧波形の波頭長および波尾長

Table 4.1 Duration of wave front and tail for applied voltages

Electrolytes	Concentration [mol/L]	Duration of wave front [μs]	Duration of wave tail [μs]
NaCl	1.0×10^{-2}	4.9	11.2
	8.6×10^{-4}	5.4	13.0
	8.6×10^{-5}	5.1	13.7
KCl	1.0×10^{-2}	5.2	11.4
	6.7×10^{-4}	5.3	12.4
	6.7×10^{-5}	4.9	12.6
CsCl	1.0×10^{-2}	4.8	11.5
	3.0×10^{-4}	5.6	13.2
	3.0×10^{-5}	5.2	13.6
CsBr	1.0×10^{-2}	5.3	11.6

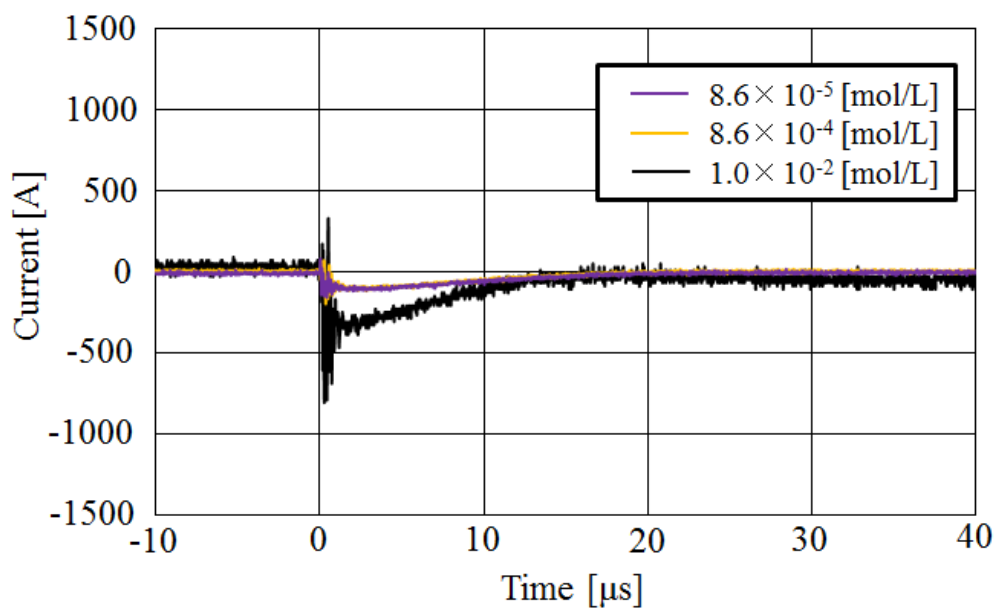


図 4.3 NaCl 試料の印加電流波形

Fig. 4.3 The typical applied current waveform for NaCl sample

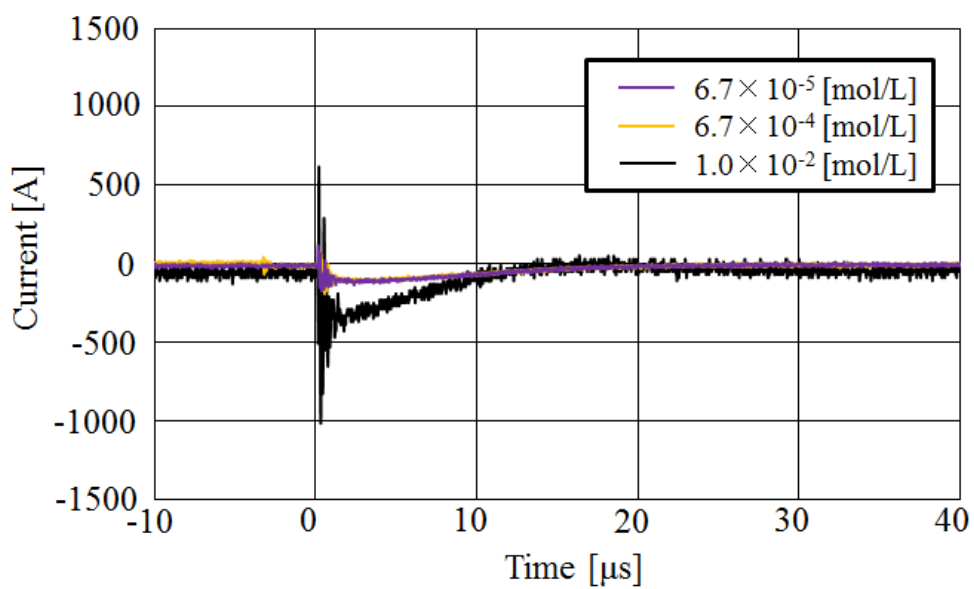


図 4.4 KCl 試料の印加電流波形

Fig. 4.4 The typical applied current waveform for KCl sample

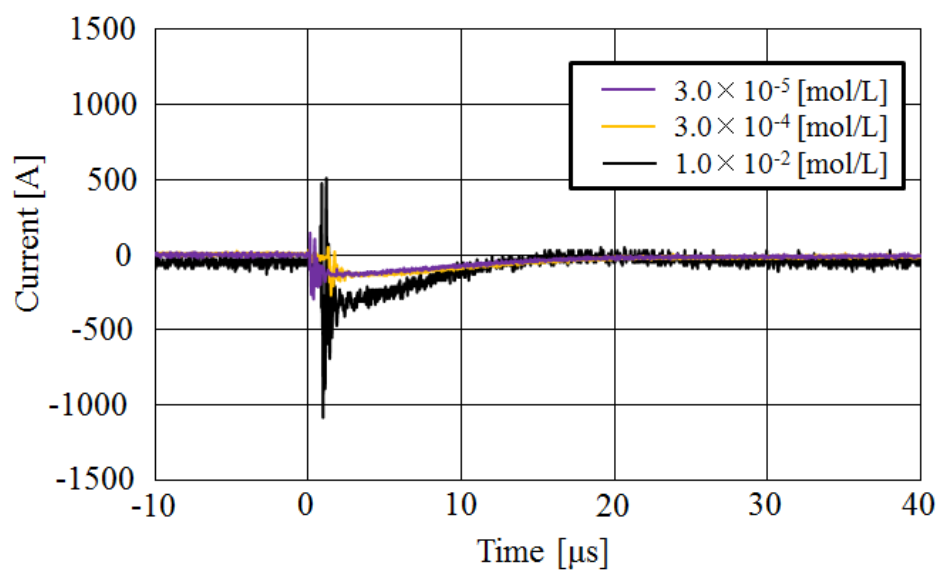


図 4.5 CsCl 試料の印加電流波形

Fig. 4.5 The typical applied current waveform for CsCl sample

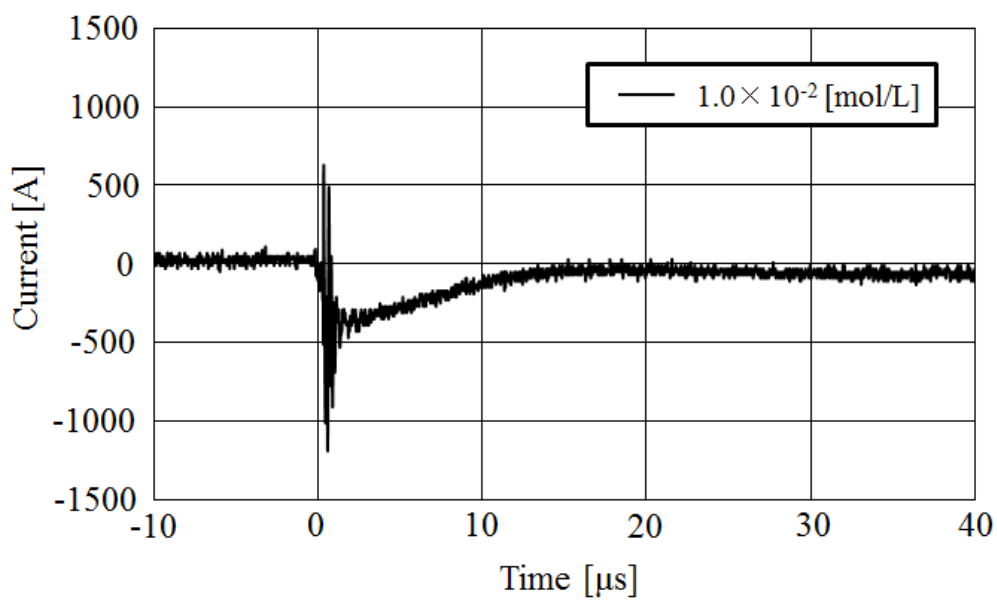


図 4.6 CsBr 試料の印加電流波形

Fig. 4.6 The typical applied current waveform for CsBr sample

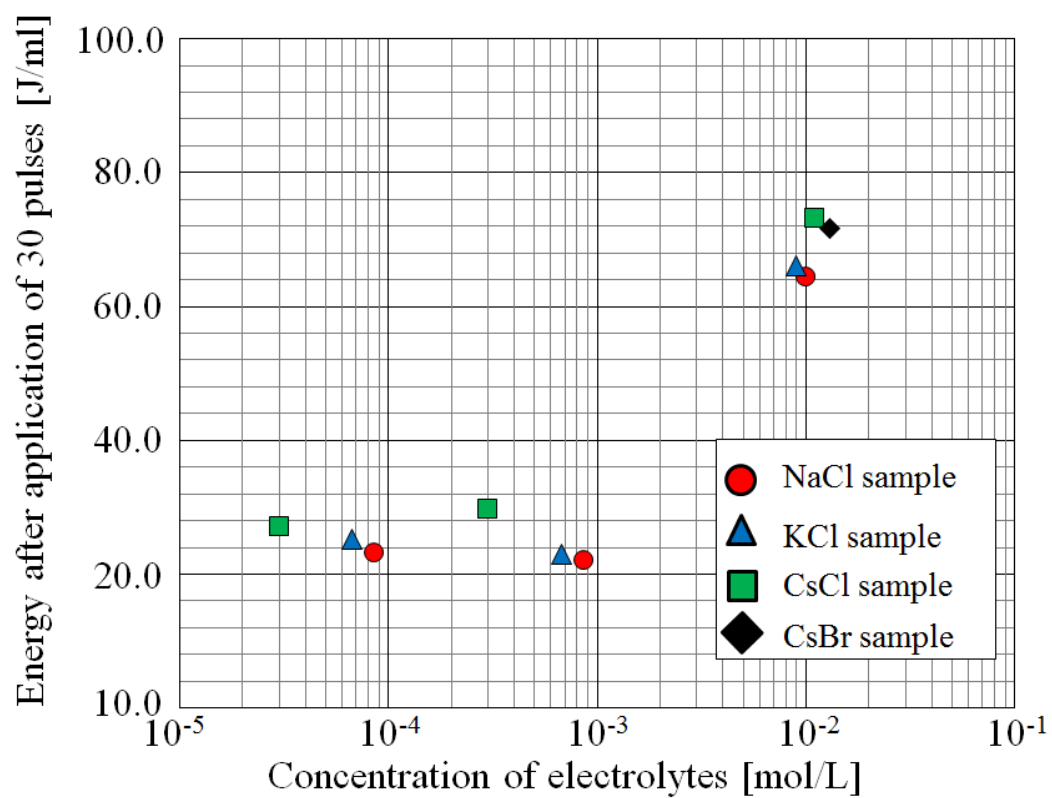


図 4.7 パルス電圧 30 回印加に対する投入エネルギーの電解質濃度特性

Fig. 4.7 The input energy for application of 30 pulses as a function of the concentration of electrolytes

4.3 実験結果

4.3.1 生菌率のパルス電圧印加回数特性

図 4.8 に無印加時の 30 分後の大腸菌の生菌率の電解質濃度特性を示す。図 4.8 は、各試料のパルス電圧印加前の生菌率を 1 とし、パルス電圧を印加せず 30 分間(パルス電圧印加 30 回に必要な所要時間)放置した時の生菌率である。パルス電圧印加が無い場合には大腸菌は死滅しないことが確認できる。

図 4.9 に NaCl 試料での大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす NaCl 濃度の影響を示す。図中のマークは平均生菌率を、エラーバーは最小値および最大値を、括弧内の数字は実験回数を示す。図 4.9 から、NaCl の濃度が高くなるほど大腸菌の生菌率は減少していることがわかる。また、NaCl 試料の生菌率は、パルス印加回数の増加とともに減少しているが、生菌率の減少幅は小さくなっている。図 4.10 および図 4.11 に KCl および CsCl 試料での大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす KCl および CsCl 濃度の影響を示す。図 4.10 および図 4.11 から、KCl および CsCl 試料の大腸菌の生菌率は KCl あるいは CsCl の濃度が高くなるとともに減少していることがわかる。また、これらの生菌率も、NaCl 試料と同様にパルス印加回数とともに減少しているが、その減少幅は小さくなっていることがわかる。生菌率の減少幅が印加回数の増加とともに小さくなることについては第 2 章で述べたように、大腸菌の長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、菌が生き残るためだと考えられる。また、図 4.12 は濃度 1.0×10^{-2} mol/L 試料における大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす電解質の種類の影響を示しており、試料中の電解質の種類が異なる場合でも、電解質の濃度が同じであれば、生菌率の減少傾向はほとんど同じであることが示された。

4.3.2 生菌率の電解質濃度特性

図 4.13 にパルス電圧印加 30 回後の大腸菌の生菌率の電解質濃度特性に及ぼす電解質の種類の影響を示す。図 4.13 では、横軸は電解質濃度、縦軸は図 4.9 から図 4.12 の各試料のパルス電圧印加 30 回後の生菌率をプロットした。図 4.13 から、パルス電圧印加 30 回後の生菌率は、電解質濃度が高くなるほど減少し、その減少の軌跡も電解質の種類によらず、ほぼ同じ傾向を示すことがわかった。

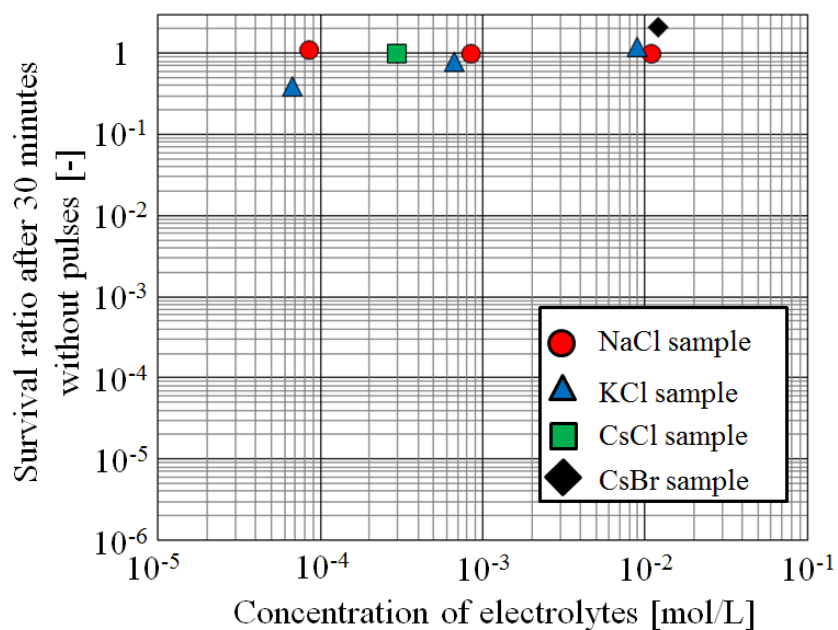


図 4.8 無印加時の 30 分後の大腸菌の生菌率の電解質濃度特性

Fig. 4.8 The survival ratio of *E. coli* after 30 minutes as a function of the concentration of electrolytes with no pulse application

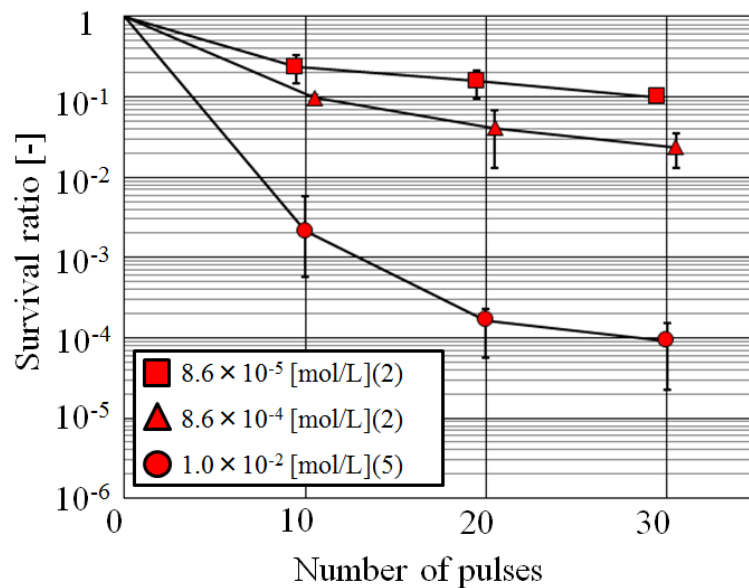


図 4.9 NaCl 試料での大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす NaCl 濃度の影響

Fig. 4.9 Effect of the concentration of NaCl on the survival ratio of *E. coli* for NaCl samples as a function of the number of pulses

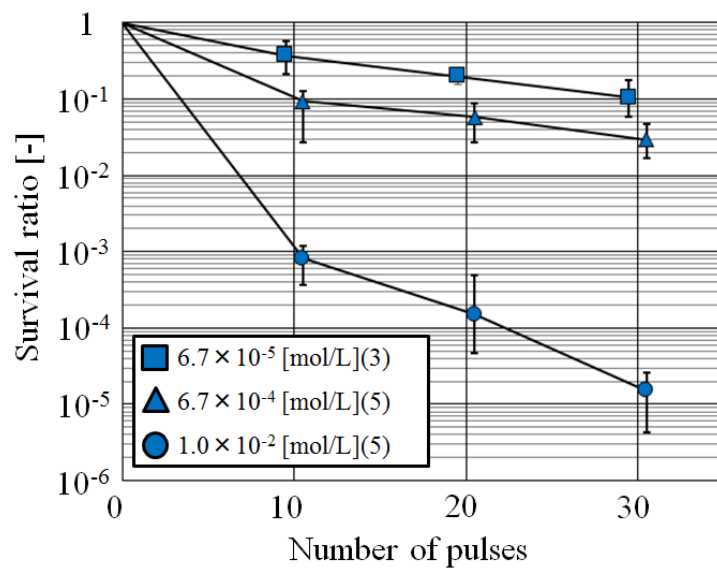


図 4.10 KCl 試料での大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす KCl 濃度の影響
 Fig. 4.10 Effect of the concentration of KCl on the survival ratio of *E. coli* for KCl samples as a function of the number of pulses

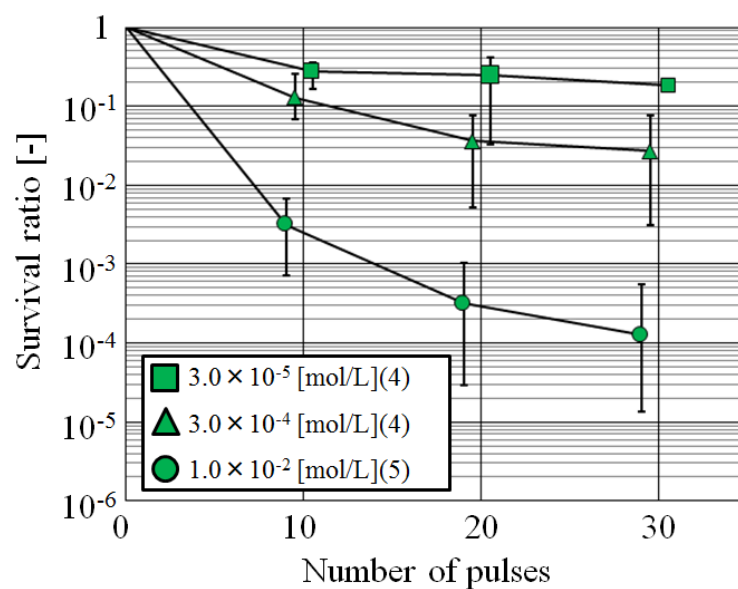


図 4.11 CsCl 試料での大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす CsCl 濃度の影響
 Fig. 4.11 Effect of the concentration of CsCl on the survival ratio of *E. coli* for CsCl samples as a function of the number of pulses

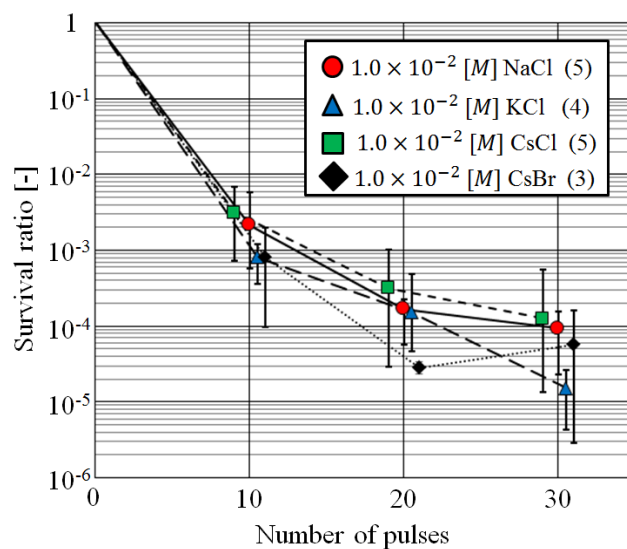


図 4.12 濃度 1.0×10^{-2} [mol/L] 試料における大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性に及ぼす電解質の種類の影響

Fig. 4.12 Effect of the kinds of electrolytes on the survival ratio of *E. coli* for 1.0×10^{-2} [mol/L] samples as a function of the number of pulses

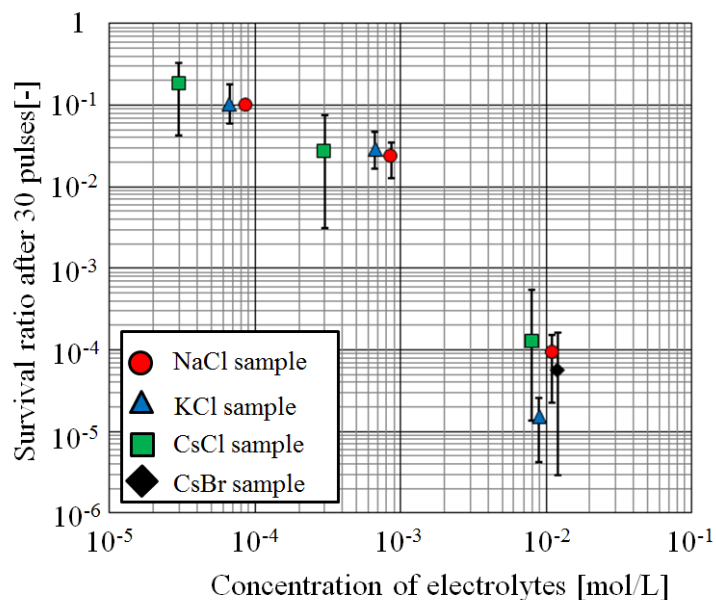


図 4.13 パルス印加 30 回後の大腸菌の生菌率の電解質濃度特性に及ぼす電解質の種類の影響

Fig. 4.13 Effect of the kinds of electrolytes on the survival ratio of *E. coli* after 30 pulses as a function of the concentration of electrolytes

4.4 考察

細菌を含む水溶液試料に高電界パルスを印加すると、細胞質(細胞内部)と水溶液試料中(細胞外部)のイオンが細胞膜表面に移動し、整列することで細胞膜間に Maxwell 応力が生じる。高電界パルス殺菌法は、この応力により機械的に細胞膜を破壊し、細菌を死滅させると考えられている。以下では、水溶液中のイオンに着目し、電解質の濃度が高くなるほど生菌率が減少することを Maxwell 応力の観点から検討する。

4.4.1 イオン種の影響

表 4.2 にイオンの半径^[8]、質量^[9]、水和半径^[8]および移動度^[10]を示す。表 4.2 から水溶液中の各イオンの半径、質量、水和半径および移動度は異なっていることがわかる。それぞれの差異は、イオン半径では 2 倍、質量では 6 倍、水和半径では 1.1 倍、移動度では 1.6 倍である。しかし、図 4.13 では、大腸菌の生菌率が電解質の種類には依存せず、水溶液中の電解質濃度だけに依存していることが示されている。さらに、図 4.12 より、濃度 1.0×10^{-2} mol/L において、各試料の生菌率は同程度であることがわかる。これらのことから、本研究で使用した電解質の種類とその濃度範囲では、大腸菌の生菌率は水溶液中のイオンの半径、質量、水和半径、および移動度ではなく、水溶液中の電解質濃度のみに依存していることが示唆された。

表 4.2 イオンの半径^[8]、質量^[9]、水和半径^[8]および移動度^[10]
Table 4.2 The radius^[8], the molar mass^[9], the hydrated radius^[8], and the mobility^[10] of the ion

	Ionic Radius ^[8] [nm]	molar mass ^[9] [g/mol]	hydrated radius ^[8] [nm]	Mobility ^[10] [cm ² /sV]
Na ⁺	0.095	22.99	0.36	5.19×10^{-4}
K ⁺	0.133	39.10	0.33	7.62×10^{-4}
Cs ⁺	0.169	132.91	0.33	7.96×10^{-4}
Cl ⁻	0.181	35.45	0.33	7.91×10^{-4}
Br ⁻	0.195	79.90	0.33	8.10×10^{-4}

4.4.2 水溶液中の電解質濃度の影響

高電界パルス印加による大腸菌殺菌は、水溶液中の電解質の濃度に依存していることが示唆された。図 4.14 に高電界パルス殺菌機構に及ぼす電解質濃度の影響を示す。水溶液中のイオンは、高電界パルス印加により生じる Maxwell 応力に寄与する。そして、この応力が細胞膜を破壊することで殺菌する。Maxwell 応力 $[F]$ の大きさは、式(1.5)で与えられ、細胞膜に生じる電界 E_m の 2 乗に比例する。そして、電界 E_m $[V/m]$ は、式(4.1)で示される。

$$E_m = \frac{\delta}{\epsilon_0 \epsilon_m} \quad (4.1)$$

ここで、 ϵ_0 は真空の誘電率 $[F/m]$ を、 ϵ_m は細胞膜の比誘電率を、 δ は細胞膜表面に存在する電荷面密度 $[C/m^2]$ を示す。式(4.1)から、細胞膜表面に整列するイオンの電荷面密度、従って細胞質および水溶液試料に含まれるイオンの濃度が高いほど、細胞膜に生じる電界強度は高くなることがわかる。また、式(1.5)から Maxwell 応力は、細胞膜に生じる電界強度が高くなるほど大きくなることがわかる。従って、図 4.14 に示すように細胞外(液体試料)中のイオン濃度が高くなるほど、膜に働く Maxwell 応力は強くなり、生菌率は減少したことが考えられる。

一般に細胞内には豊富な正イオン(Na^+ , K^+)が存在し、その濃度は 0.15 mol/L 程度である^[11]。一方、細胞質内の負イオン(Cl^-)の濃度は正イオンの濃度より低く、0.004 mol/L 程度であり^[11]、濃度 0.12 mol/L の RNA や DNA などの巨大分子が細胞内の負電荷を担っていることから、細胞内は電氣的に中性に保たれている^[11]。しかし、巨大分子の移動度は低いため、それに担われた負電荷は Maxwell 応力に寄与し難いことが考えられる。これらのことから、高電界パルスが大腸菌を含む水溶液に印加されると、負電極側の細胞内では、細胞質中に豊富に存在する正イオン(Na^+ , K^+)が細胞膜内側表面に整列し、これと対となるように水溶液中の負イオン(Cl^- , Br^-)が細胞膜外側表面に整列することにより、大きな Maxwell 応力が細胞膜間に生じ、高い殺菌率が得られると考えられる。また、細胞中の正イオン濃度は 0.15 mol/L 程度であり^[11]、本研究で使用した電解質の濃度範囲($3.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L)と比較して十分高い。そのため、Maxwell 応力は負イオン(Cl^- , Br^-)の濃度が高くなるとともに大きくなる。つまり、負イオンの濃度が生菌率の支配要因であることが示唆される。ここで、水溶液試料中には、 H_2O 分子が解離した OH^- イオンも含まれているが、各水溶液試料の pH から求めた OH^- イオンの濃度は 3.2×10^{-8} mol/L 程度であり、本研究での電解質の濃度と比較してはるかに小さいため、高電界パルス殺菌には影響しないと考えられる。一方の正電極側では、細胞内の巨大分子は移動し難いため、負イオン(Cl^-)が細胞膜内側表面に整列するが、負イオンの濃度は正イオンの 1/40 倍程度しかないため、Maxwell 応力は負電極側に対して 1/1600 倍程度小さいことが考えられる。

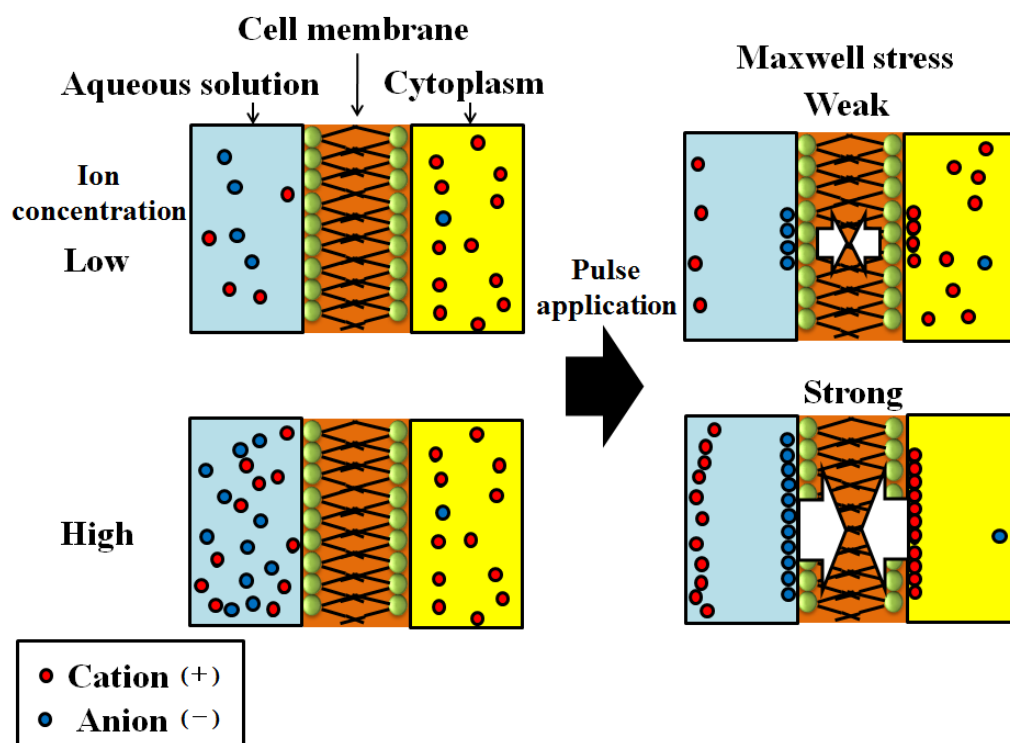


図 4.14 高電界パルス殺菌機構に及ぼす電解質濃度の影響

Fig. 4.14 Effect of the concentration of electrolytes on the mechanism of sterilization by high electric field pulse

4.4.3 電解質濃度を考慮した生菌率の算出

4.4.3.1 算出方法

第2章では、U. Zimmermann らが提唱する殺菌機構のモデル^[12]に基づき、細胞膜の電位差が1V以上になると大腸菌は死滅すると仮定し、パルス電界印加回数、殺菌槽内の電界強度、菌の長軸と電界方向のなす角および菌の長さや幅を考慮し、生菌率を算出した。一方、第2章の算出方法では、水溶液中の電解質濃度を考慮することができない。そこで本章では、第2章の算出方法を基に、水溶液中の電荷単体(イオン等)の量の変化に対応する Maxwell 応力 F_m' を以下の式(4.2)から求めた。

$$F_m' = \frac{1}{2} \varepsilon_m \varepsilon_0 \left(\frac{V_m}{d_m} \right)^2 + \frac{1}{2} \varepsilon_m \varepsilon_0 \left(\frac{\delta}{\varepsilon_m \varepsilon_0} \right)^2 \cdots (4.2)$$

式(4.2)の右辺第一項は、式(1.5)の右辺と同じものであり、細胞膜に生じる電位差により働く Maxwell 応力の大きさを示す。式(4.2)の右辺第二項は、 V_m が式(1.4)で示すように、菌の長さや幅、電界強度、菌の長軸と電界方向のなす角に影響されるため、これらの値を考慮することができる。第一項の計算に必要な大腸菌の長さや幅は、第2章での値を用いた。

式(4.2)の右辺第二項は、細胞膜表面に存在する電荷により生じる Maxwell 応力の大きさを示す。第二項の δ は電荷面密度を示し、以下の式(4.3)から求めることができる。

$$\delta = C \times F \times T \times 10^{-3} \cdots (4.3)$$

ここで、 C は溶質濃度 [mol/L]を、 F はファラデー定数(96,485 C/mol)を、 T は電極間距離 (3 mm)を示している。電荷面密度 δ は、水溶液中では電解質は全て解離していると仮定し、式(4.3)に示すように、溶質濃度 C とファラデー定数 F と電極間距離 T を掛けてやり、単位Lを m^3 へ変換することで求めることができる。今回の算出では、式(4.2)の F_m' が $1.2 \times 10^{-6} \text{ N/m}^2$ (式(1.5)より $V_m=1 \text{ V}$ の時に生じる Maxwell 応力の大きさ)を超えると、大腸菌は死滅すると仮定し、生菌率の算出を試みた。

4.4.3.2 生菌率の算出値と実験値のパルス印加回数特性

図 4.15, 図 4.16 および図 4.17 に NaCl, KCl および CsCl 試料の生菌率の算出値と実験値の比較をそれぞれ示す。図中において、赤色、青色および緑色のマークは実験値(図 4.9, 図 4.10, 図 4.11)を、中抜きマークは算出値を示す。実験値のエラーバーは最小値および最大値を、括弧内の数字は実験回数を示す。

図 4.15, 図 4.16 および図 4.17 から、生菌率の算出値は実験値と一致していないことがわかる。一方、算出値と実験値ともに、パルス印加回数の増加も伴いに生菌率は減少し、その減少率は小さくなっていることがわかる。また、算出値および実験値ともに、NaCl, KCl, CsCl 濃度の増加に伴い生菌率は減少している。ここで、図 4.15, 図 4.16 お

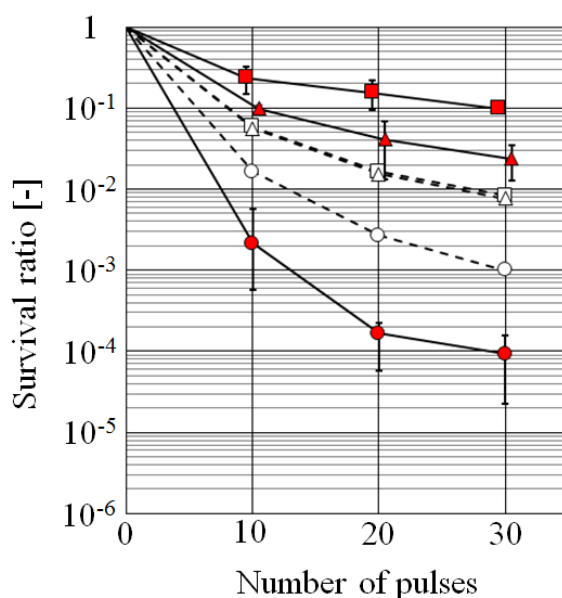
よび図 4.17 の□マークと△マークの生菌率は，同程度であるように見えるが，算出結果では，△の値は□のものよりわずかに低い．

4.4.3.3 生菌率の算出値と実験値の電解質濃度特性

図 4.18 に生菌率の算出値と実験値の比較(電解質濃度の影響)を示す．図 4.18 中において，赤色，青色および緑色のマークが実験値(図 4.13)を，中抜きのマークは算出値を示す．実験値のエラーバーは最小値および最大値を示す．

図 4.18 から，生菌率の実験値は電解質濃度の増加とともに減少していることがわかる．一方，算出値は濃度 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L の間ではほとんど変わらず，濃度 10^{-3} mol/L 以上になると，減少し始めるように見える．これは，濃度 C が $10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L のときは，式(4.2)の右辺第二項の Maxwell 応力の大きさが，右辺第一項のものに比べて無視できるほど小さく，生菌率は右辺第一項のイオン濃度に依存しない Maxwell 応力の大きさで決定されるからである．濃度 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ mol/L の範囲では算出値と実験値は一致せず，濃度 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ mol/L の範囲では算出値と実験値は近い値を示した．

今回のイオン濃度を考慮した生菌率の算出では，電解質濃度が Maxwell 応力のみに依存すると仮定した．実際には，電解質濃度，すなわちイオンや溶質の濃度が変化すると，大腸菌に働く浸透圧や膜電位が変化する．今後，生菌率の算出値と実験値を一致させるためには，水溶液中の溶質濃度の変化が大腸菌に及ぼす影響を考慮する必要があると考えられる．

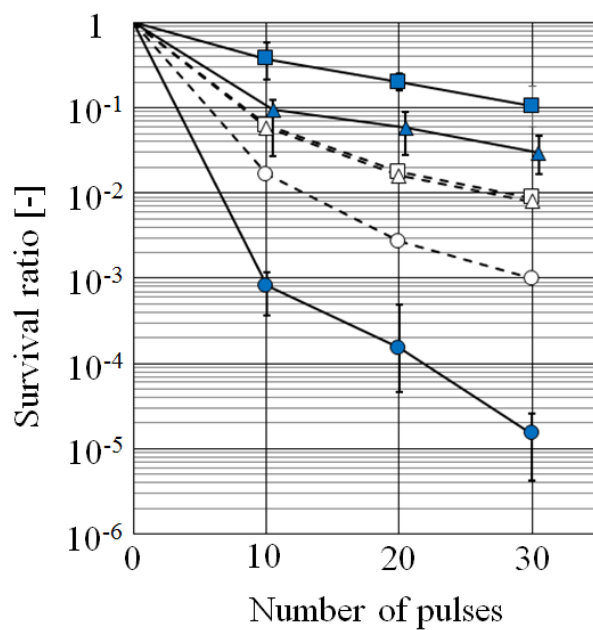


Experiment value: ■ 8.6×10^{-5} mol/L (2) ▲ 8.6×10^{-4} mol/L (2) ● 1.0×10^{-2} mol/L (5)

Calculation value: □ 8.6×10^{-5} mol/L △ 8.6×10^{-4} mol/L ○ 1.0×10^{-2} mol/L

図 4.15 生菌率の算出値と実験値の比較(NaCl 試料)

Fig. 4.15 Comparison of calculated and experimental value of survival ratio (NaCl samples)

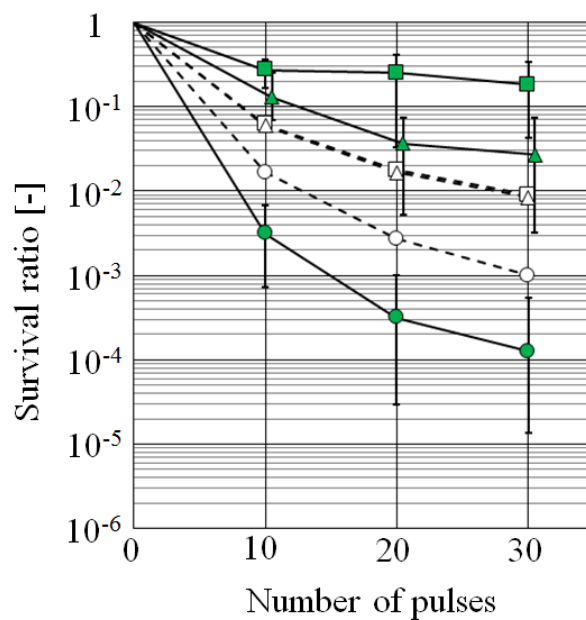


Experiment value: ■ 6.7×10^{-5} mol/L (3) ▲ 6.7×10^{-4} mol/L (5) ● 1.0×10^{-2} mol/L (5)

Calculation value: □ 6.7×10^{-5} mol/L △ 6.7×10^{-4} mol/L ○ 1.0×10^{-2} mol/L

図 4.16 生菌率の算出値と実験値の比較(KCl 試料)

Fig. 4.16 Comparison of calculated and experimental value of survival ratio (KCl samples)



Experiment value: ■ 3.0×10^{-5} mol/L (4) ▲ 3.0×10^{-4} mol/L (4) ● 1.0×10^{-2} mol/L (5)

Calculation value: □ 3.0×10^{-5} mol/L △ 3.0×10^{-4} mol/L ○ 1.0×10^{-2} mol/L

図 4.17 生菌率の算出値と実験値の比較(CsCl 試料)

Fig. 4.17 Comparison of calculated and experimental value of survival ratio (CsCl samples)

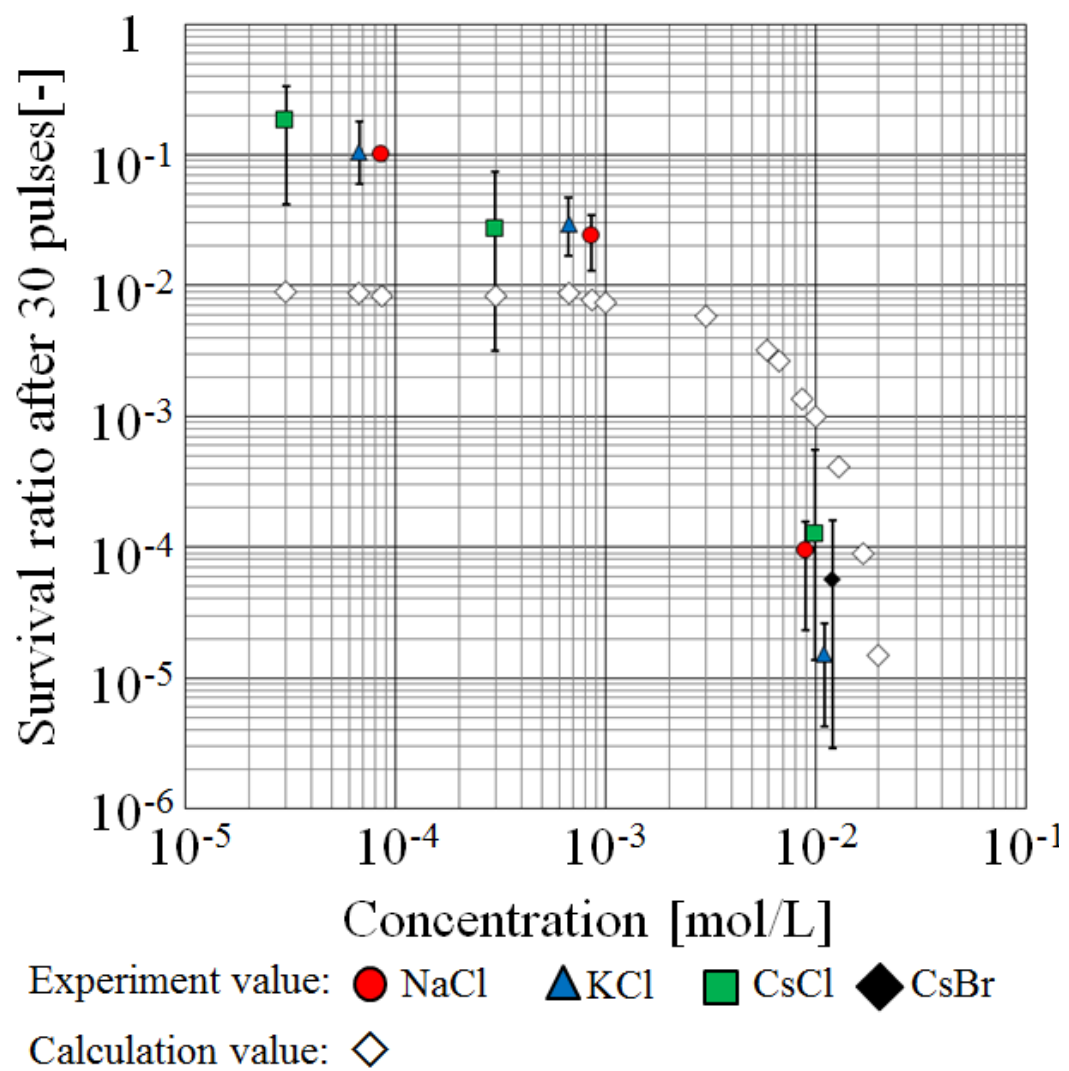


図 4.18 生菌率の算出値と実験値の比較(電解質濃度の影響)

Fig. 4.18 Comparison of calculated and experimental value of survival ratio (Effect of the concentration of electrolytes)

4.5 まとめ

本章では、大腸菌を含む $3.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L の NaCl, KCl, CsCl, および CsBr 水溶液にパルス電圧(波高値: -4.4 kV, 幅: $20 \mu\text{s}$)を 60 秒間隔で印加し、殺菌実験を実施した結果、以下の結論を得た。

- ① 大腸菌の生菌率は水溶液中の電解質濃度が高くなるほど減少した。また、 1.0×10^{-2} mol/L の NaCl, KCl, CsCl および CsBr 水溶液中の大腸菌の生菌率は同程度であったことから、本研究で使用した電解質のイオンの半径、質量、水和半径、および移動度は、生菌率に影響を及ぼさないことが示された。
- ② 細胞内では豊富に含まれている正イオンが細胞膜内側表面に整列し、一方の細胞外(水溶液試料)では負イオンが外側表面に整列するとき、大きい Maxwell 応力が細胞膜を圧縮し、高い殺菌効果が得られることが考えられる。よって、水溶液試料中の負イオンの濃度が生菌率を決定していることが示唆された。
- ③ 第 2 章を基に、水溶液中の電解質濃度を考慮した生菌率の算出を試みた。電解質濃度 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ mol/L の範囲では算出値と実験値は一致せず、濃度 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ mol/L の範囲では算出値と実験値は近い値を示した。今回のイオン濃度を考慮した生菌率の算出では、イオン濃度が Maxwell 応力のみに依存すると仮定した。実際には、イオン濃度、すなわち溶質濃度が増加すると、大腸菌に働く浸透圧や膜電位が変化する。今後、生菌率の算出値と実験値を一致させるためには、水溶液中の溶質濃度の変化が大腸菌に及ぼす影響を考慮する必要があると考えられる。

参考文献

- [1] H. Hulsheger, J. Potel, E. -G. Niemann : “Electric Field Effects on Bacteria and Yeast Cells”, *Radiat Environ Biophys*, Vol. 22, No. 2, pp. 149-162 (1983)
- [2] 北島信義, 阿久澤悦子, 上田香奈, 大嶋孝之, 佐藤正之 : 「織物電極によるパルス殺菌」, *日本食品工学会誌*, Vol. 8, No. 3, pp. 139-145 (2007)
- [3] ネイデ ミホ イシダ, 大嶋孝之, 佐藤正之 : 「スパイラル形状電極処理槽のパルス殺菌特性」, *日本食品工学会誌*, Vol. 5, No. 1, pp. 35-40 (2004)
- [4] 速水光浩, 天満考昌, 水野彰 : 「高電圧パルスによるイースト菌の破壊」, *静電気学会誌*, Vol. 13, No. 4, pp. 322-331 (1989)
- [5] 吉野功, 大嶋孝之, 谷野孝徳, 佐藤正之 : 「銀電極を用いた高電圧パルス殺菌装置による種々の菌に対する不活性化効果」, *静電気学会誌*, Vol. 34, No. 2, pp. 81-86 (2010)
- [6] H. Hulsheger, J. Potel, E. -G. Niemann : “Killing of Bacteria with electric Pulses of High Field Strength”, *Radiat Environ Biophys*, Vol. 20, No. 1, pp. 53-65 (1983)
- [7] H. Hülshager, E. -G. Niemann : “Lethal Effects on High-Voltage Pulses on E. coli K12”, *Radiat. Environ. Biophys*, Vol. 18, No. 4, pp. 281-288 (1983)
- [8] 水間裕市 : 「分子間力と表面力」, (株)マグロウヒル出版, p. 42 (1991)
- [9] Peter Atkins, Julio de paula : “ATKINS’ PHYSICAL CHEMISTRY 8th edition”, OXFORD UNIVERSITY PRESS, p. 1065 (2006)
- [10] 小澤美奈子 : 「化学・生命科学系のための物理化学」, (株)東京化学同人, p. 159 (2003)
- [11] 太田孝之, 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」, 岩波書店, pp. 309-310 (1975)
- [12] U. Zimmermann, G. Pilwat and F. Riemann : “DIELECTRIC BREAKDOWN OF CELL MEMBRANES”, *Biophysical Journal*, Vol. 14, No. 11, pp. 881-899 (1974)

第 5 章 水溶液中のアミノ酸が高電界パルス による大腸菌殺菌に及ぼす影響

5.1 はじめに

高電界パルス殺菌法の実用化に向けて、高電界パルス印加による実際の液体食品(牛乳^[1]、アップルジュース^[2]および青汁^[3])の殺菌実験が実施されている。液体試料の導電率が高電界パルス殺菌に及ぼす影響は報告されている^[4-5]が、液体食品中のビタミンやタンパク質などの栄養成分がどのように殺菌に影響するかは明らかになっていない。本章では、液体食品に含まれている栄養成分の一つであるアミノ酸が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響について検討し、高電界パルス殺菌の機構の詳細な解明を目指した。

5.2 実験方法

5.2.1 実験試料

実験試料は、*Escherichia coli* JM103(非病原性)を含む水溶液である。食品の成分を模擬している溶質には、アミノ酸あるいは電解質(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)を用いた。大腸菌を寒天培地上に塗布し、静置培養(37 °C, 24 時間)した。その後、寒天培地上に形成されたコロニーを 1 つ取り、それを液体培地 5 mL 中に入れ、振とう培養(37 °C, 24 時間)した。培養に使用した培地の成分は、表 2.1 の通りである。振とう培養した液体培地 5 mL 中の 100 μ L を、別の滅菌済みの液体培地 5 mL 中に入れ、再び振とう培養(37°C)した。この液体培地の吸光度(OD620)が 0.6 になったときのもの 1 mL を採取し、滅菌したポリプロピレンチューブ内に入れ、チューブを遠心分離(8,000 rpm, 20 °C, 5 分)した。遠心後、チューブ内の上澄み液を捨て、沈殿した大腸菌(約 30 mg)だけを、後述する 6 種類のアミノ酸、 K_2HPO_4 および KH_2PO_4 水溶液 10 mL にそれぞれ入れたものを実験試料とした。溶質の濃度は、 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L である。図 5.1 に本研究で用いたアミノ酸の構造を、表 5.1 に本研究で用いたアミノ酸の分子量と側鎖を示す。アミノ酸とは、同一分子内にカルボキシ基とアミノ基を有する化合物のことである^[6]。側鎖(図 5.1 中の色付けされた部分)の違いから、20 種類のアミノ酸が存在する。この側鎖の電気的極性からアミノ酸は、無電荷極性(Polar, uncharged)、非極性(Nonpolar)、正電荷極性(Positively charged)および負電荷極性(Negativity charged)に分類される。L-Glutamic acid と D-Glutamic acid の分子量および側鎖は、表 5.1 に示すように同じである。これらの立体構造は鏡像異性体の関係である^[7]。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)を用いて測定した. 図 5.2 に試料の導電率の溶質濃度特性を, 図 5.3 に試料の pH の溶質濃度特性を示す. 図 5.2 および図 5.3 中には, 第 4 章で使用した電解質試料の導電率と pH も示してある.

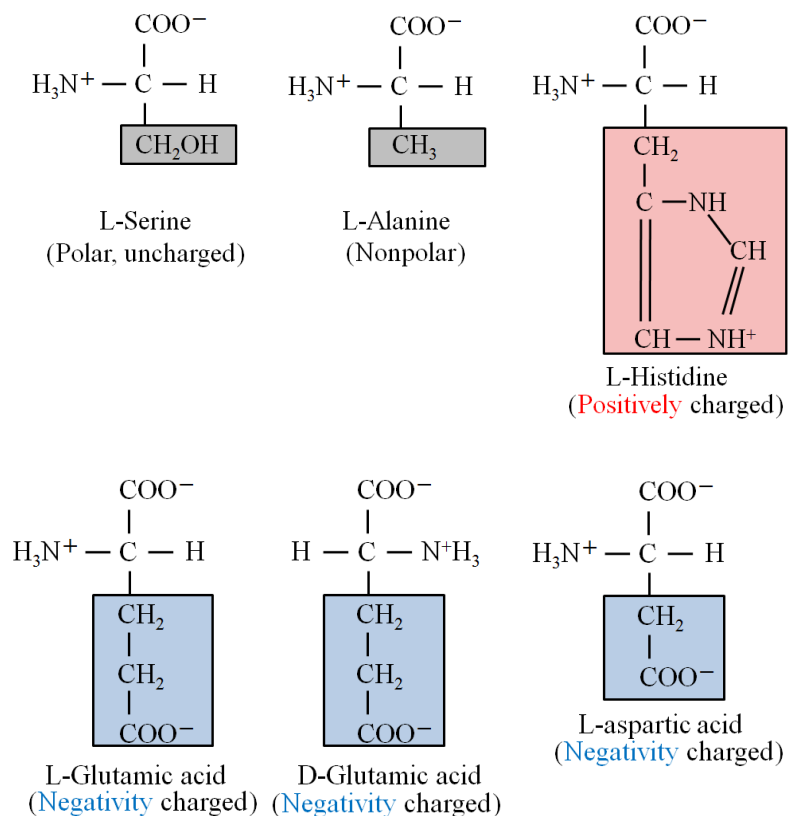


図 5.1 本研究で用いたアミノ酸の構造
色付けされた部分：側鎖

Fig. 5.1 Structure of amino acid in this study
Color parts : side chain

表 5.1 本研究で用いたアミノ酸の分子量と側鎖の特徴^[8]

Table 5.1 The molecular weight and side chain of amino acid in this study^[8]

Sample	Molecular weight [g/mol]	Side chains
L-Serine	105.09	Polar, uncharged
L-Alanine	89.09	Nonpolar
L-Glutamic acid	147.13	Negativity charged
L-Histidine	155.15	Positively charged
L-Aspartic acid	133.10	Negativity charged
D-Glutamic acid	147.13	Negativity charged

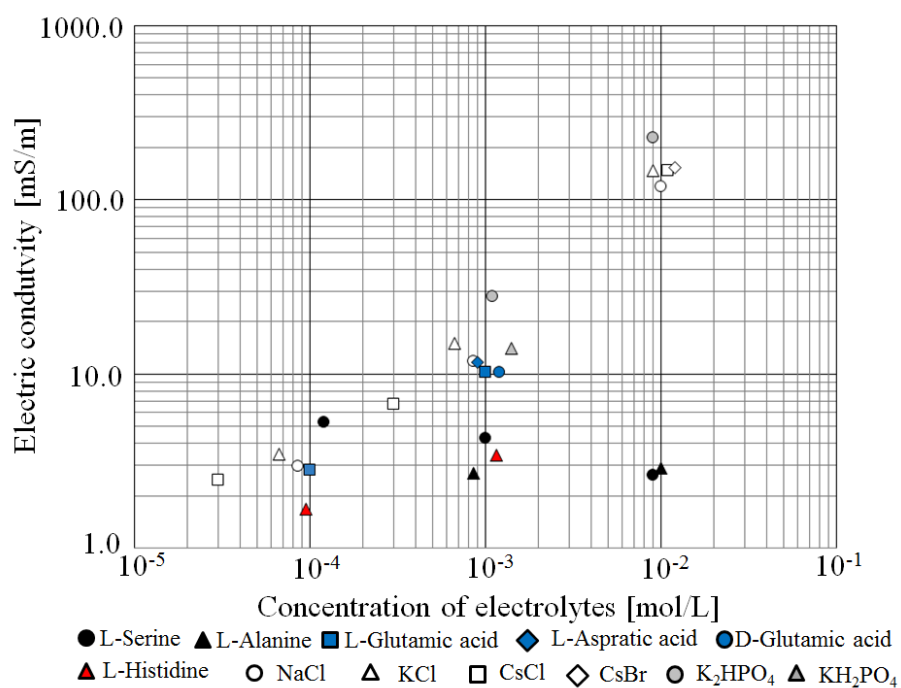


図 5.2 試料の導電率の溶質濃度特性

Fig. 5.2 The electric conductivity of sample as a function of the concentration of solutes

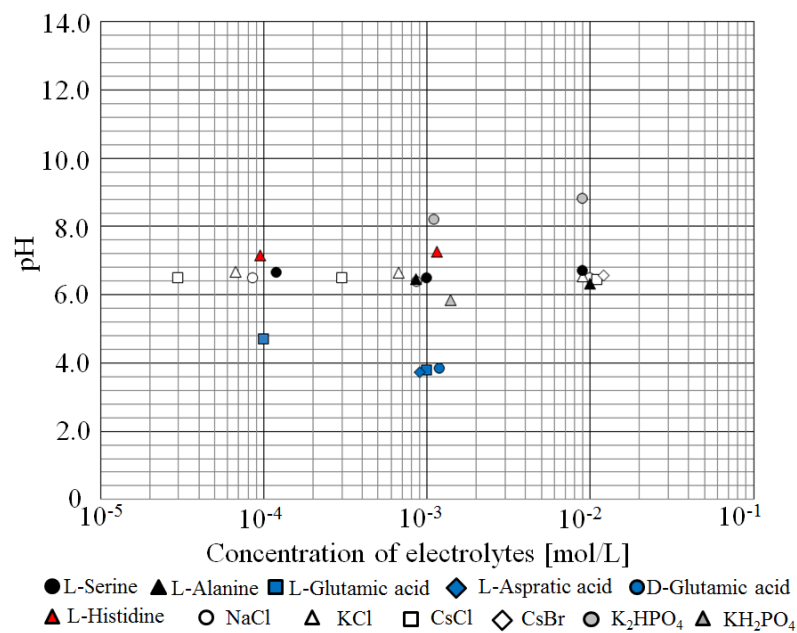


図 5.3 試料の pH の溶質濃度特性

Fig. 5.3 pH of sample as a function of the concentration of solutes

5.2.2 実験手順

殺菌槽，インパルス電圧発生器および実験回路は第 2 章で使用したものと同様であり，実験手順は第 4 章の通りである．印加パルス電圧の波高値を -4.4 kV とし，試料を入れた殺菌槽の内部電極に 60 秒間隔で 30 回印加した．殺菌槽にかかるパルス電圧の波高値が -4.4 kV になるようコンデンサの充電電圧値を調整した．図 5.4 に $1.0\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ L-Serine 試料の印加電圧波形を，表 5.2 に印加電圧波形の波頭長および波尾長を示す．各試料に印加した電圧の波頭長および波尾長は表 5.2 にあるように大きく変化しなかった．殺菌槽内の電界は，殺菌槽の内部電極に近い程電界強度は高く，最大で 2.2 kV/mm ，最小で 1.0 kV/mm である．パルス印加 1 回毎に殺菌槽を振って攪拌し，さらに印加 10 回毎にコロニー計数法で試料中の大腸菌の生菌数を測定した．

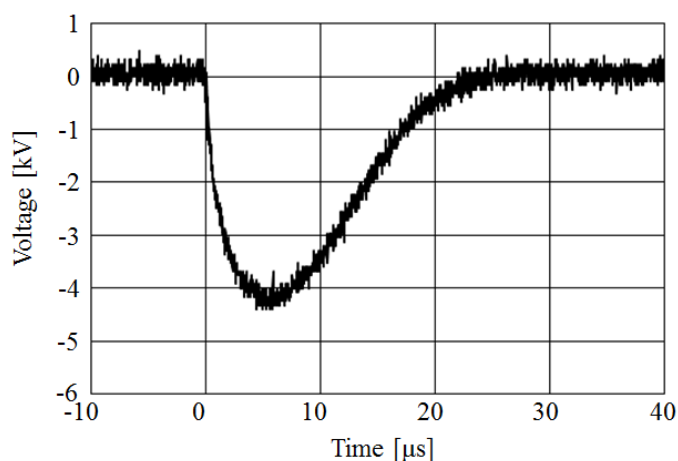


図 5.4 $1.0\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ L-Serine 試料の印加電圧波形

Fig. 5.4 The typical waveform of applied voltage ($1.0\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ L-Serine sample)

表 5.2 印加電圧波形の波頭長および波尾長

Table 5.2 Duration of wave front and tail for applied voltages

Sample	Duration of wave front [μs]	Duration of wave tail [μs]
L-Serine	5.8	13.8
L-Alanine	6.1	13.6
L-Glutamic acid	5.2	12.7
L-Histidine	5.6	13.7
L-Aspartic acid	5.3	13.1
D-Glutamic acid	4.9	13.3
K_2HPO_4	6.1	13.6
KH_2PO_4	5.8	13.9

5.3 実験結果

5.3.1 生菌率のパルス印加回数特性

図 5.5 に無印加時の各試料中の大腸菌の生菌率の時間特性を，図 5.6 に各試料中の大腸菌の生菌率の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，エラーバーは最小値および最大値を，括弧内の数字は実験回数を示す．図 5.5 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 5.5 で各水溶液中の大腸菌の生菌率は減少していないことから，無印加時では大腸菌は死滅しないことが確認できる．

図 5.6 から，L-Serine, L-Alanine および L-Histidine 試料中の大腸菌の生菌率は，パルス電圧印加回数の増加とともに減少しているが，その減少率は小さい．一方，L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid, K_2HPO_4 および KH_2PO_4 試料の大腸菌の生菌率は，パルス印加回数の増加とともに 1,000 分の 1 程度と大きく減少した．これらの実験試料に加熱殺菌処理を行うと，全試料中の大腸菌の生菌率は 10,000,000 分 1 程度に減少(生菌数は 0)する．今後は高電界パルス印加による殺菌効果の向上が課題として挙げられる．

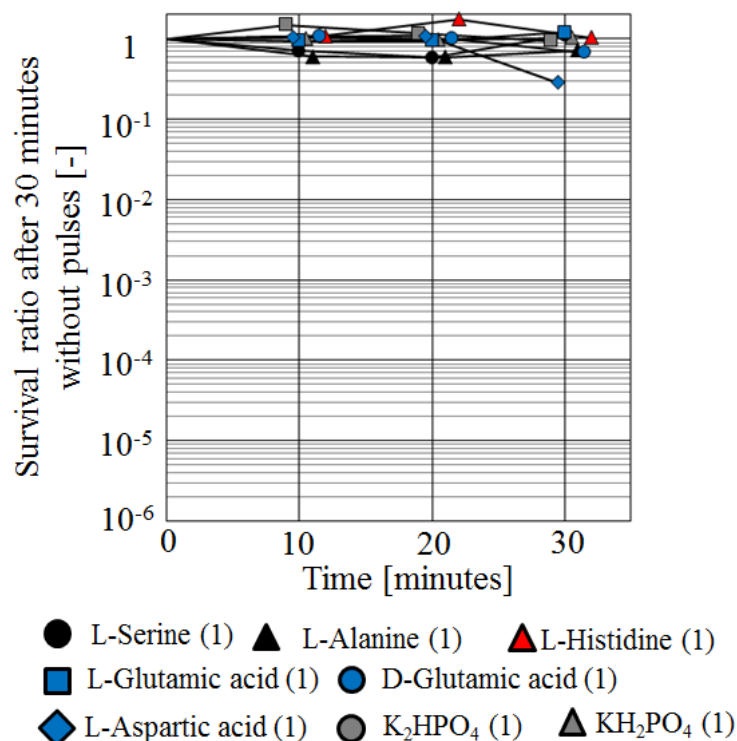


図 5.5 無印加時の各試料中の大腸菌の生菌率の時間特性

Fig. 5.5 The survival ratio of *E. coli* in each samples as a function of the time in nonapplication

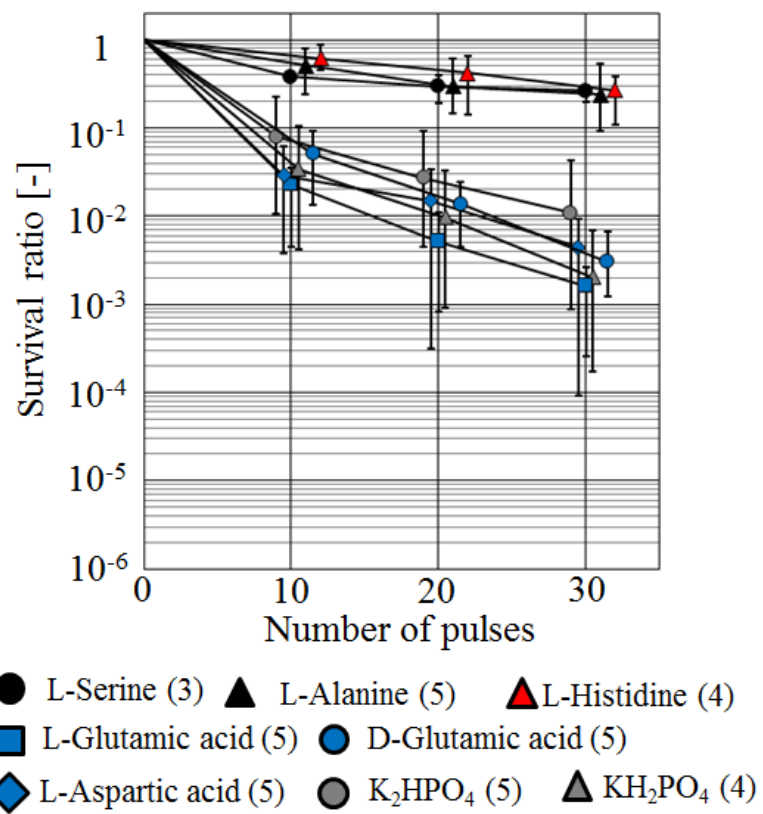


図 5.6 各試料中の大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性

Fig. 5.6 The survival ratio of *E. coli* in each samples as a function of the number of pulses

5.3.2 生菌率の溶質濃度特性

図 5.7 にパルス印加 30 回後の大腸菌の生菌率の溶質濃度特性を示す．この図には，第 4 章で示した 10^{-5} ～ 10^{-2} mol/L の電解質試料(図 4.13)の結果も記載している．図中のマークが平均生菌率を，エラーバーは最大値と最小値を示す．

図 5.7 から，電解質(NaCl, KCl, CsCl, CsBr, K_2HPO_4 , KH_2PO_4)試料と負電荷極性側鎖を持つアミノ酸(L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)試料中の大腸菌の生菌率は，溶質濃度の増加とともに減少していることがわかる．一方，無電荷極性(L-Serine), 非極性(L-Alanine), 正電荷極性(L-Histidine)側鎖を持つアミノ酸試料中の大腸菌の生菌率は，溶質濃度が増加してもあまり変化しなかった．

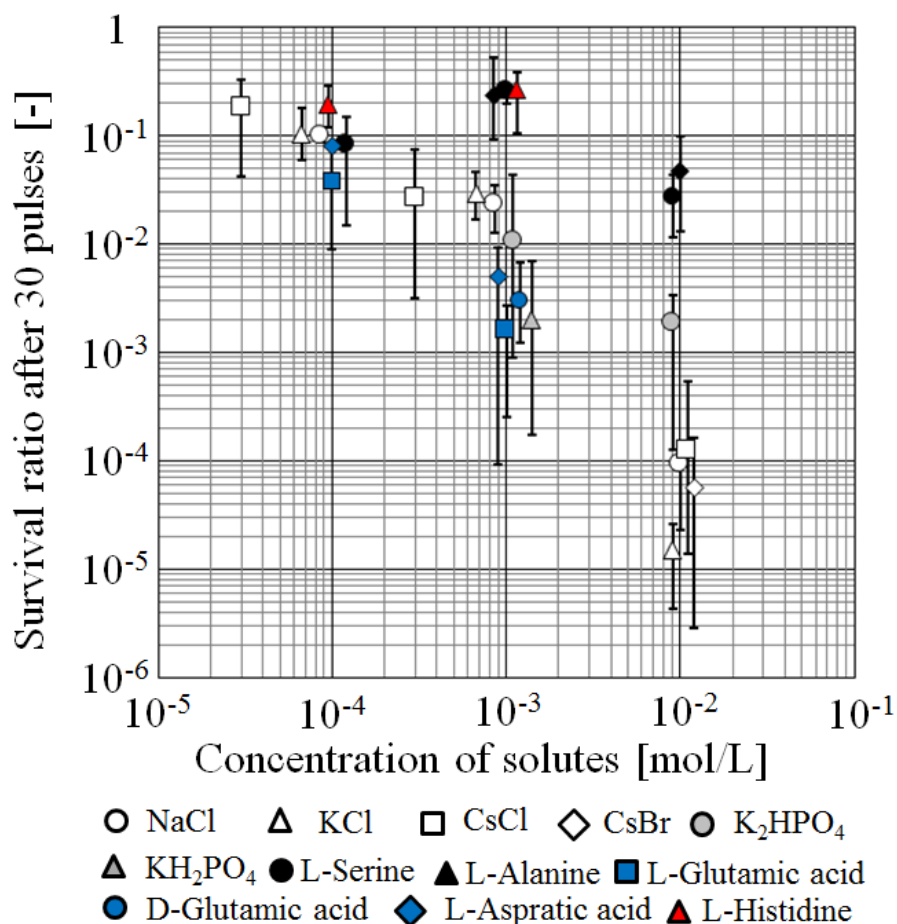


図 5.7 パルス印加 30 回後の大腸菌の生菌率の溶質濃度特性

Fig. 5.7 The survival ratio of *E. coli* after 30 pulses as a function of the concentration of solutes in the solution

5.4 考察

本章では, 第 4 章と同様に高電界パルス印加による細胞膜に生じる Maxwell 応力の観点から実験結果を考察する.

Maxwell 応力に寄与する細胞外(液体試料)の電荷担体は, 水溶液試料に含まれる溶質で決定され, 溶質がアミノ酸の場合, 図 5.1 および表 5.1 に示すようにアミノ酸の側鎖の構造によって決まる. また, 溶質が電解質の場合, 水溶液試料中で解離した正イオンおよび負イオンが電荷担体としてふるまう. これらの溶質の特徴から図 5.6 および図 5.7 の実験結果を眺めてみると, 正負イオンに解離する電解質試料(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)および負電荷極性(L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)の側鎖を持つアミノ酸試料中の大腸菌の生菌率は大きく減少しており, 無電荷極性(L-Serine), 非極性(L-Alanine)および正電荷極性(L-Histidine)の側鎖を持つアミノ酸試料中の大腸菌の生菌率はほとんど減少していないことがわかる. 図 5.8 に水溶液中の電荷担体の極性が高電界パルス殺菌の機構に及ぼす影響を示す. 図 5.8(a)に示すように大腸菌を含む電解質水溶液に高電界パルスを印加したとき, 負電極側では, 細胞内(細胞質)に豊富に存在する正イオン(Na^+ , K^+)が細胞膜内側表面に整列し, これと対となるように水溶液中の負イオンが細胞膜外側表面に整列することにより, 大きい Maxwell 応力が細胞膜間に働くことが考えられる. このとき, 細胞中の正イオン濃度は 0.15 mol/L 程度であり^[9], 本研究で使用した溶質の濃度($1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$)と比較して, 元々十分高いため, 水溶液中の負イオンの濃度が Maxwell 応力, 従って生菌率(殺菌率)の支配要因となっていることが示唆される. このため, 水溶液中の負電荷極性側鎖を持つアミノ酸試料の生菌率は, 負イオンを含む電解質試料と同様に, 減少したことが考えられる. 一方, 正電極側では, 細胞外(水溶液試料)中の正イオンおよび正電荷が細胞膜外側表面へ整列する. これと対となるように, 内側表面には, 巨大分子は移動し難いため負イオン(Cl^-)のみが整列するが, 負イオンの濃度は正イオンより低いため, Maxwell 応力は負電極側に対して小さいと考えられる. このため, 水溶液中の正電荷極性側鎖を持つアミノ酸試料の生菌率は, ほとんど減少しなかったことが考えられる. 第 4 章では, 水溶液中の負イオン濃度が高電界パルス殺菌による大腸菌殺菌に支配的であると考えてきた. これらの結果は, 第 4 章の考察を支持するものである. 図 5.8(b)には, 水溶液中の正および負電荷極性側鎖を持つアミノ酸が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響の概略図を示す.

さらに, D-Glutamic acid は, L-Glutamic acid の鏡像異性体であり, 図 5.2 および図 5.3 に示すように L-Glutamic acid と D-Glutamic acid 試料の導電率および pH はほとんど同じである. よって, Glutamic acid の L か D の種類は, 生菌率に影響を与えないことがわかる. また, 無電荷極性や非極性側鎖を持つアミノ酸試料中には Maxwell 応力に寄与する電荷担体が存在しないため, Maxwell 応力は働かない. よって, 無電荷極性や非極性側鎖を持つアミノ酸試料中の生菌率は, ほとんど減少しなかったことが考えられる.

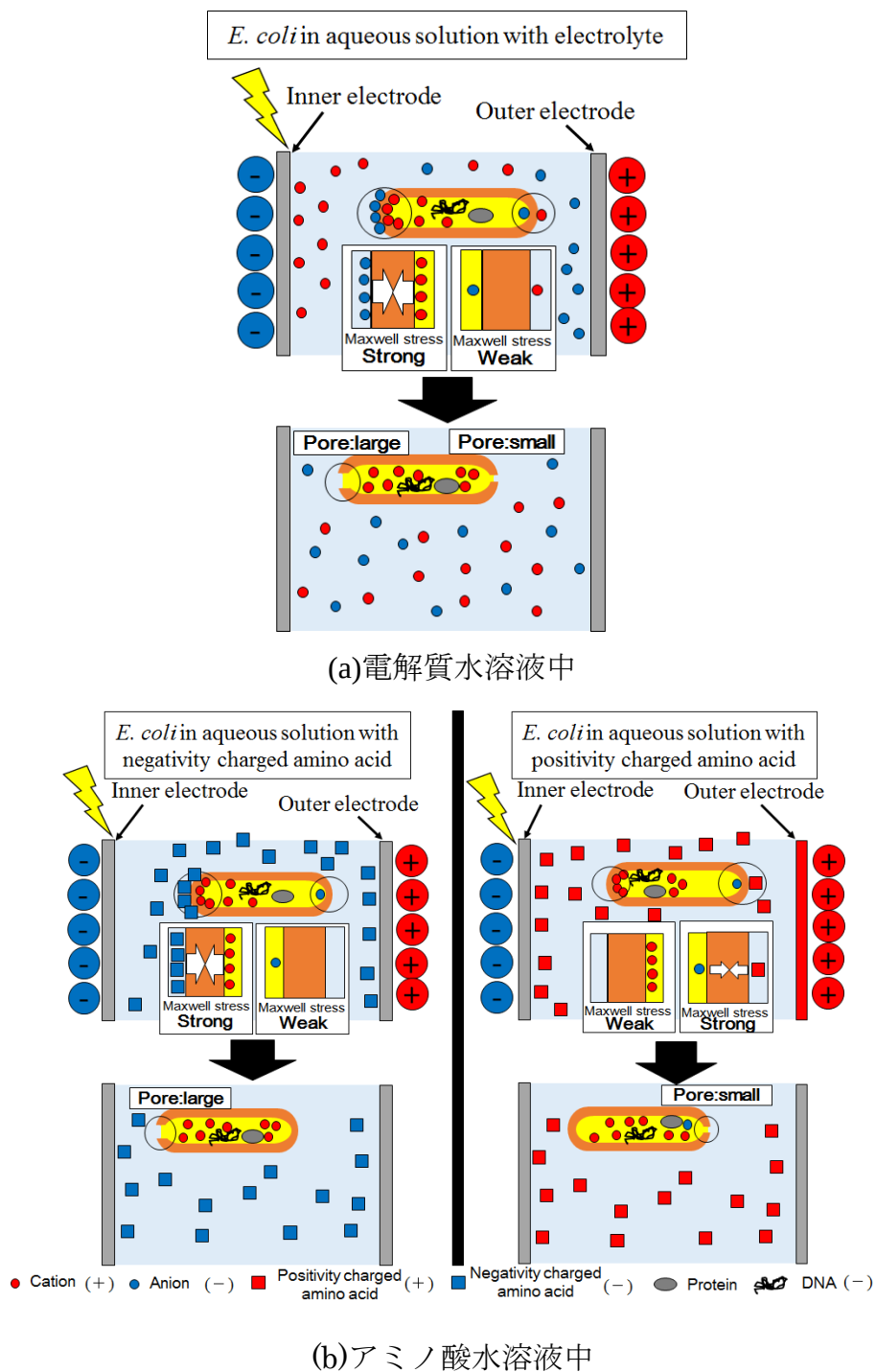


図 5.8 水溶液中の電荷担体の極性が高電界パルス殺菌の機構に及ぼす影響

(a) 電解質水溶液中 (b) アミノ酸水溶液中

Fig. 5.8 The effect of the electric polarity of charge carriers in aqueous solution on the mechanism of sterilization by high electric field pulse

(a) in the solution of electrolytes (b) in the solution of amino acid

5.5 まとめ

大腸菌を含む $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L のアミノ酸(L-Serine, L-Alanine, L-Histidine, L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)および電解質(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)試料にパルス電圧(波高値: -4.4 kV, 幅: $20 \mu s$)を 60 秒間隔で印加し, 殺菌実験を実施した結果, 以下の結論を得た.

- ① 正負イオンに解離する電解質試料(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)および負電荷極性(L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)の側鎖を持つアミノ酸水溶液中の大腸菌の生菌率は, パルス印加回数の増加とともに大きく減少した.
- ② 無電荷極性(L-Serine), 非極性(L-Alanine)および正電荷極性(L-Histidine)の側鎖を持つアミノ酸試料中の大腸菌の生菌率はほとんど減少しなかった.
- ③ L-Glutamic acid と D-Glutamic acid 試料の生菌率は同程度であり, Glutamic acid の L か D の種類は, 生菌率に影響を与えないことが示唆された.
- ④ 細胞内では豊富に含まれている正イオンが細胞膜内側表面に整列し, これと対となるように細胞外(水溶液試料)では負イオンおよび負電荷が外側表面に整列するとき, 大きい Maxwell 応力が細胞膜に働き, 高い殺菌率が得られることが考えられる. 実験結果でも, 電解質や負電荷極性側鎖を持つアミノ酸試料中の大腸菌は良く殺菌されたことから, 水溶液試料中の負イオンおよび負電荷の濃度が生菌率を支配していると考えられる. この結果は, 第 4 章の考察を支持する結果である.

参考文献

- [1] Silvia Bendicho, Gustavo V. Barbosa-Canovas, Olga Martin : “Milk processing by high intensity pulsed electric fields”, Trends in Food Science & Technology, Vol. 13, No. 6-7, pp.195-204 (2002)
- [2] V. Heinz, S. Toepfl, D. Knorr : “Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment” , Innovative Food Science and Emerging Technologies, Vol. 4, No. 4, pp. 167-175 (2003)
- [3] 齊藤高輝, 遠藤僚太, 野澤康仁, 南谷靖史, 深田秀樹 : 「パルス電界殺菌における細胞穿孔に対する絶縁破壊理論の適用に関する一考察」, 電気学会論文誌 A, Vol. 135, No. 6, pp. 341-346 (2015)
- [4] C. S. Djuzenova, U. Zimmermann, H. Frank, V. L. Sukhorukov, E. Ritcher, G. Fuhr : “Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporabilized myeloma cells”, Bioch. Biophys. Acta. , Vol. 1284, No. 2, pp. 143-152 (1996)
- [5] H. Vega-Mercado, U. R. Pothakamury, F. J. Chang, G. V. Barbosa-Canovas, B. G. Swanson : “Inactivation of E. coli by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles”, Food Res. Inter. , Vol. 29, No. 2, pp. 117-121 (1996)
- [6] 小澤美奈子 : 「生化学辞典(第 3 版)」, (株)東京化学同人, p.62 (1998)
- [7] 小澤美奈子 : 「生化学辞典(第 3 版)」, (株)東京化学同人, p.63 (1998)
- [8] Donald Voet, Judith G. Voet, 訳 田村信雄 他 : 「ヴォート生化学 (上)」, (株)東京化学同人, pp. 49-53 (2012)
- [9] 太田孝之, 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」, 岩波書店, pp. 309-310 (1975)

第 6 章 高電界パルス印加による大腸菌の伸長

6.1 はじめに

微生物や細胞が含まれる液体に高電界パルスを印加することは、殺菌以外の目的でも使用される。エレクトロポレーションは、高電界パルス印加により細胞膜に形成される孔を通して、細胞外から細胞内へ物質を導入する技術である^[1]。これとは逆に、大嶋らは、細胞内で作られた物質を細胞外へ出すための技術の研究成果を報告している^[2-5]。本章では、高電界パルス印加の殺菌以外の効果を調査することを目的とし、高電界パルス印加前後の大腸菌の長さを測定した。

6.2 実験方法

6.2.1 実験試料

前章 2.2.1 と同様の手順にて、実験試料を作製した。

6.2.2 実験手順

図 6.1 に同軸円筒電極槽の断面図を示す。殺菌槽は、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 6.2 に高電界パルス印加回路を示す。パルス電圧印加装置は第 2 章と同じものを使用した。殺菌槽の外部電極を接地し、内部電極にインパルス電圧発生器からパルス電圧を 50 回印加した。図 6.3 に印加パルス電圧波形を示す。印加電圧波形は波高値 5.6 kV, 波頭長 2.8 μ s, 波尾長 16.1 μ s とした。殺菌槽内の電界は、式(2.1)から、内部電極に近い程大きく、最大で 2.0 kV/mm, 最小で 0.67 kV/mm となる。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、高電界パルス印加前後の大腸菌をグラム染色(2.2.5 章)し、光学顕微鏡にて大腸菌の長さを測定した。

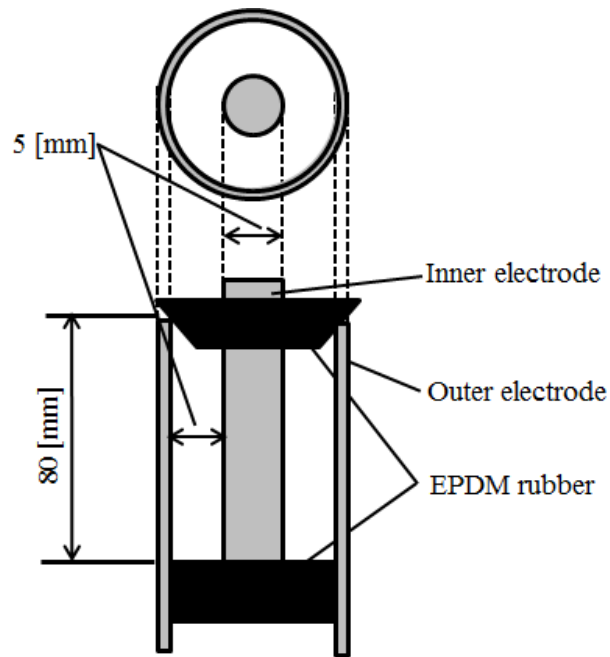


図 6.1 同軸円筒電極槽の断面図

Fig. 6.1 Cross section of the coaxial cylindrical electrodes tank

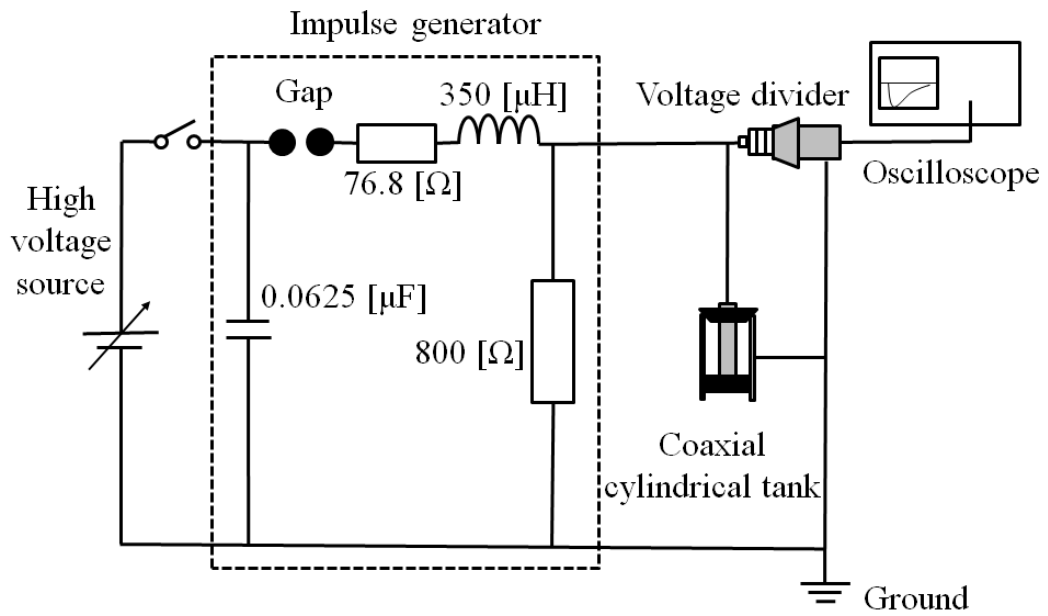


図 6.2 高電界パルス印加回路

Fig. 6.2 High electric field pulse application circuits

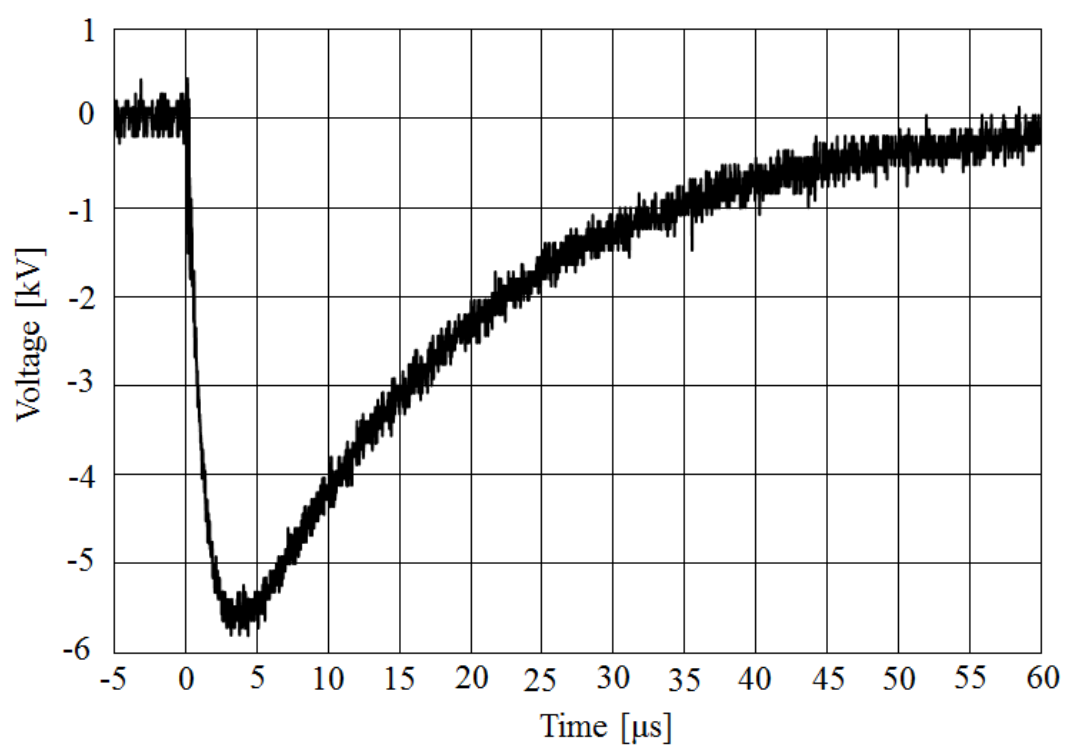


図 6.3 印加パルス電圧波形

Fig. 6.3 The shape of the voltage pulse

6.3 実験結果および考察

6.3.1 生菌率のパルス印加回数特性

図 6.4 に大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性を示す．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．エラーバーは最小値と最大値を示す．

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，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，第 2 章で述べたように，殺菌し難い短い大腸菌が残るためであると考えられる．

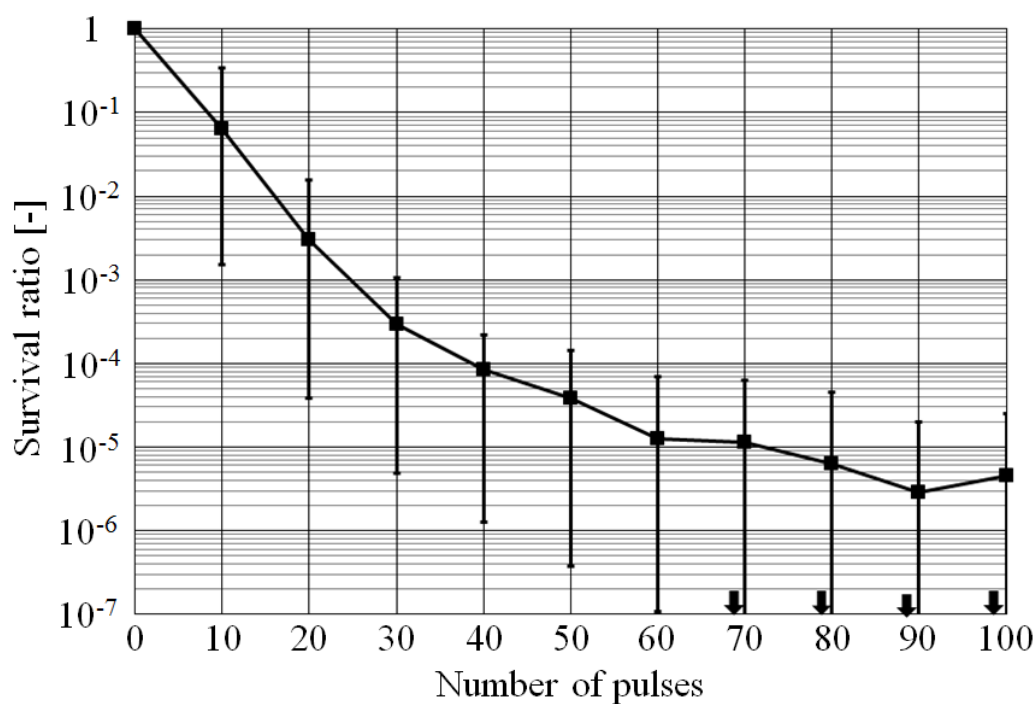


図 6.4 大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性

Fig. 6.4 The survival ratio of *E. coli* as a function of the number of pulses

6.3.2 パルス印加後の大腸菌の観察

図 6.5 に無印加の大腸菌を，図 6.6 にパルス印加直後の大腸菌を示す．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た．図 6.7 にパルス印加直後の大腸菌の長さ分布を示す．図 6.7 の分布は，高電界パルス印加直後と無印加の大腸菌の長さに差がないことを示している．

図 6.8 に 2.5 時間後の無印加の大腸菌を，図 6.9 にパルス印加から 2.5 時間後の大腸菌を示す．図 6.8 および図 6.9 に写っている菌の数は，図 6.5 および図 6.6 と同様に生菌率とは関係はない．図 6.10 にパルス印加から 2.5 時間後の大腸菌の長さ分布を示す．図 6.10 においても 100 個の大腸菌の長さを測定した．図 6.10 の分布から，高電界パルス印加 2.5 時間後の大腸菌は無印加 2.5 時間後の菌に比べ長くなっていることが示された．さらに t 検定にてパルス電圧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，高電界パルス印加 2.5 時間後の大腸菌は無印加 2.5 時間後のものより長くなることが確認された．図 6.11 に 10 倍の長さの大腸菌を示す．図 6.11 に示すような極めて長い大腸菌が存在することからも，高電界パルス印加が大腸菌を異常に伸長させていることがわかる．

大腸菌などの多くの細菌は，第 1.5.2.3 章(図 1.9)に示したように，ペプチドグリカンにより覆われている．ペプチドグリカンは，大腸菌の細胞内膜と細胞外膜の間(ペリプラズム空間)に存在する^[6]．ペプチドグリカンの役割は，浸透圧などから大腸菌を守ることであり，細菌の形態を最終的に決定する．大腸菌が伸長あるいは分裂するときにも，すでに存在するペプチドグリカンの分解や，新たに合成されたペプチドグリカンの挿入を厳密に制御することによって，大腸菌が破裂することなく，その形態を維持させる．そのためペプチドグリカンは，大腸菌の形態形成，伸長，細胞分裂に対して重要な役割を担う．そして，伸長・分裂を引き起こすためには，数多くの物質が必要である．

石野^[7]によると，ペニシリン結合タンパク質(PBP)である PBP-1A, 1Bs, PBP-2, PBP-3 が大腸菌の細胞分裂に寄与するとされる．PBP-1A, 1Bs が細胞の伸長，PBP-2 が形態形成，PBP-3 が細胞分裂にそれぞれ寄与する．ペプチドグリカンの生合成は，細胞の中央部で起こる．PBP-2 によりペプチドグリカンが合成され始め，PBP-1A, 1Bs により側壁ペプチドグリカン合成の正しい方向づけがされる．この過程が乱れると，大腸菌は，正しい桿菌構造がとれなくなる．細胞の長さが元の 2 倍程度になったところで，PBP-3 による隔壁ペプチドグリカン合成に切り替わる．また，FtsZ という物質も，細胞分裂に必要な因子であると報告されている^[8]．非加熱殺菌法の一つである高圧殺菌法の研究において，増殖期の大腸菌を 30～50 MPa で加圧培養すると，大腸菌は桿状の形を保ったまま，常圧培養菌に比べて異常に長くなることが報告されている．これは，圧力が物理的に細胞を長く引き伸ばしたのではなく，重量増を伴った成長による伸長である．この

異常伸長の原因として、高圧下では細胞分裂関連物質である FtsZ が脱重合し、細胞質分裂を伴わないまま DNA や RNA, タンパク質合成が進むからだと考えられている^[9,10].

高電界パルス印加 2.5 時間後の大腸菌が無印加のもより長くなっており、コロニー計数法で求めた生菌率が大きく減少していることから、高電界パルス印加により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。大腸菌は一般に時間とともに DNA を複製(DNA 複製期)し、約 2 倍の長さになるまで伸長し、そして 2 つに分裂(細胞分裂期)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。この過程には多くの物質が関与する。高電界パルス印加により細胞分裂が阻害された原因は、2 つあると考えられる。1 つは、高電界パルス印加により細胞分裂関連物質が不活性化されたことである。これは、タンパク質や酵素の構造に高電界パルス印加が影響を及ぼし、酵素の活性化、不活性化をパルス電界で制御するという研究成果から考えることができる^[11]。もう 1 つは、高電界パルス印加により細胞膜に形成された孔から、細胞分裂関連物質が細胞外へ漏出したことである^[12]。

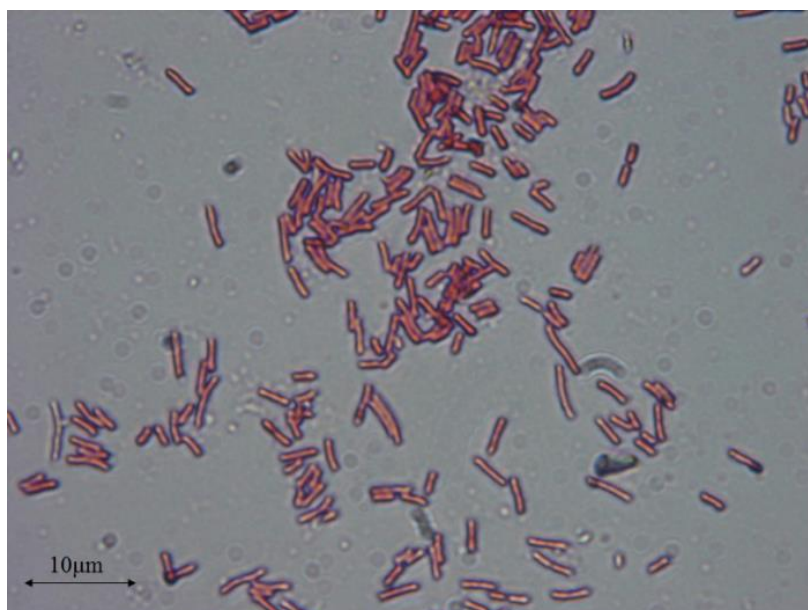


図 6.5 無印加の大腸菌

Fig. 6.5 *E.coli* without the pulse application

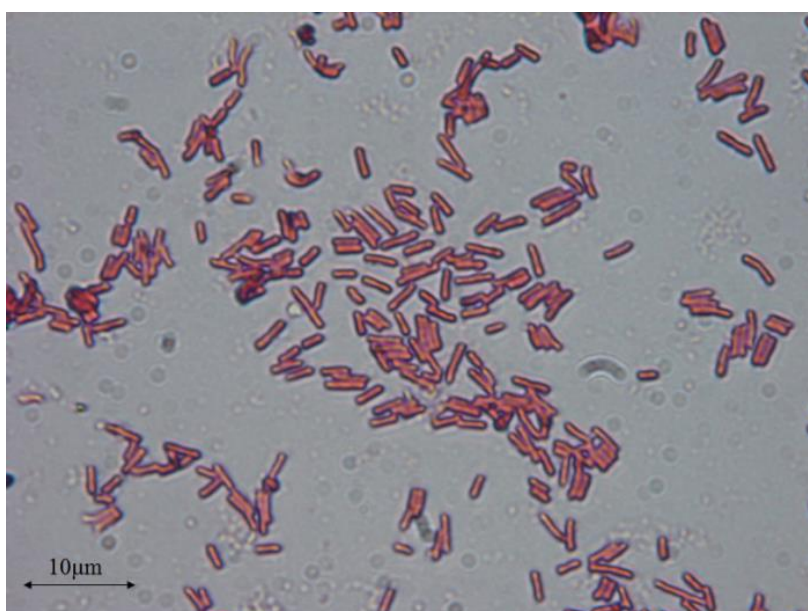


図 6.6 パルス印加直後の大腸菌

Fig. 6.6 *E.coli* just after the pulse application

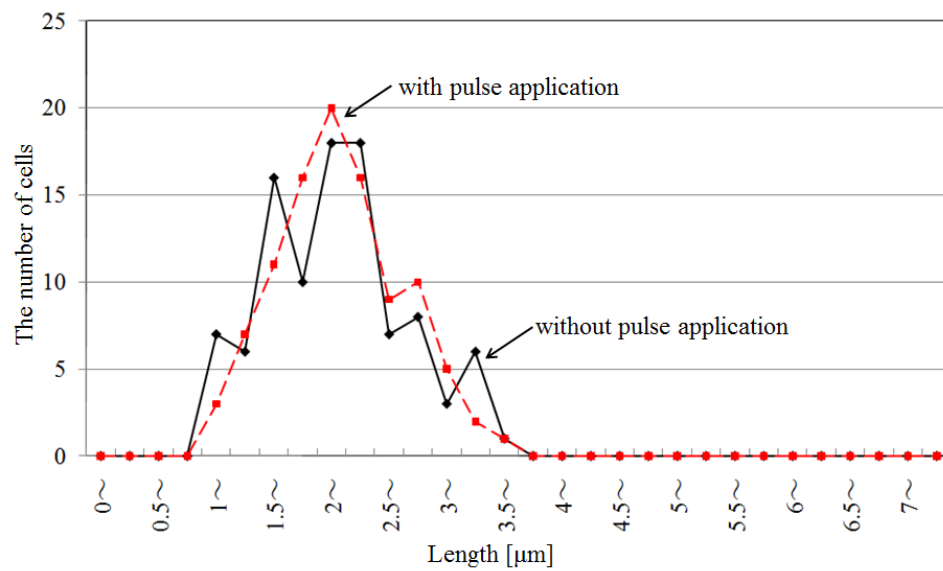


図 6.7 パルス印加直後の大腸菌の長さ分布

Fig. 6.7 Distribution of cell length of *E. coli* just after the pulse application

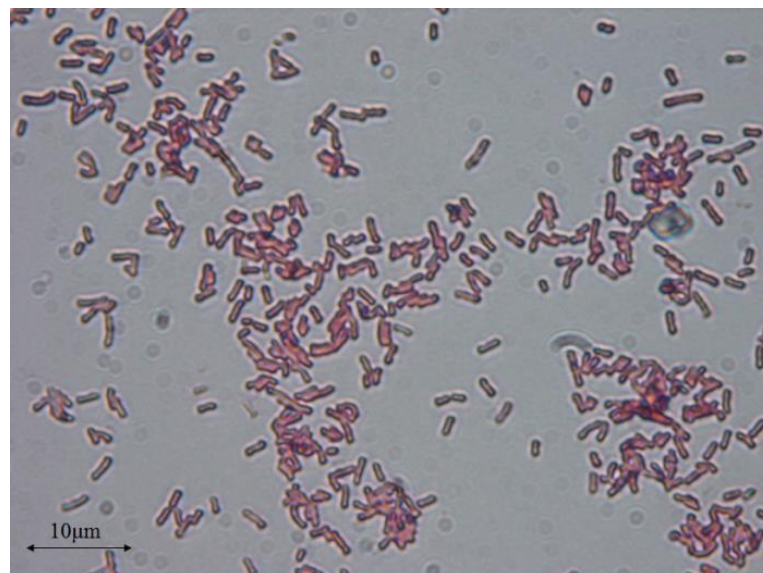


図 6.8 2.5 時間後の無印加の大腸菌

Fig. 6.8 *E. coli* after 2.5 hours without the pulse application

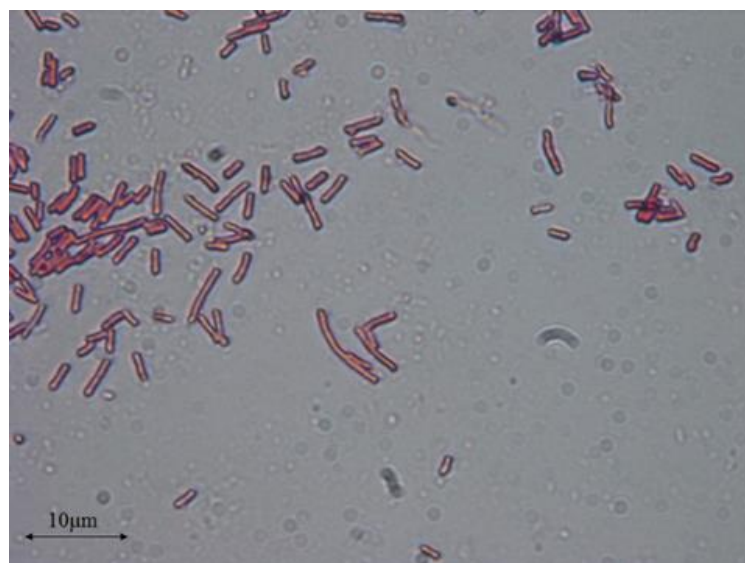


図 6.9 パルス印加から 2.5 時間後の大腸菌

Fig. 6.9 *E. coli* after 2.5 hours from the pulse application

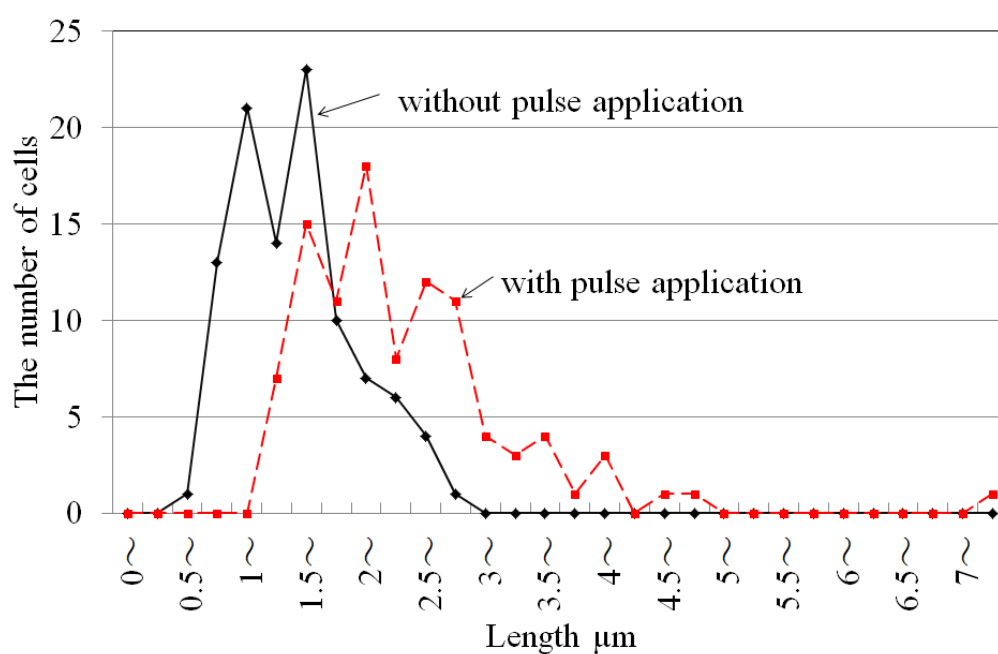


図 6.10 パルス印加から 2.5 時間後の大腸菌の長さ分布

Fig. 6.10 Distribution of cell length of *E. coli* after 2.5 hours from the pulse application



図 6.11 10 倍の長さの大腸菌
Fig. 6.11 10 times length of *E.coli*

6.4 高電界パルス印加による細胞内容物の漏出

高電界パルス印加により大腸菌が異常伸長した。この原因として、高電界パルス印加により細胞膜に形成された孔から、細胞分裂関連物質が細胞外へ漏出したことが考えられる。そこで、アガロースゲル電気泳動法を用いて、大腸菌の核酸等が細胞外へ漏出しているかを確認した。

6.4.1 高電界パルス印加による殺菌実験方法

大腸菌の異常伸長効果を確認した実験試料は液体培地である。一方、液体培地中には、表 2.2, 表 2.3, 表 2.4 に示すようにさまざまな物質が含まれている。そこで、実験試料中にできるだけ余分なものが含まれないようにするため、実験試料を 0.01 mol/L の NaCl 水溶液と変更した。作製方法は第 4.2.1 章の通りである。実験手順は、第 6.2.2 章の通りであるが、印加電圧の波高値は 7.0 kV とし、このパルス電圧を 30 秒間隔で 50 回印加した。パルス電圧印加前後の生菌数をコロニー計数法により測定し、殺菌の評価を行った。

6.4.2 アガロースゲル電気泳動方法

電気泳動法は、電界中を荷電粒子や分子が移動する現象を利用して DNA やタンパク質を分離する手法である。本研究では、核酸(RNA や DNA 等)をその大きさに応じて分離する手法であるアガロースゲル電気泳動法を使用した。アガロースとは寒天の主成分である。

パルス電圧印加前後の試料溶液を遠心分離(3,000 rpm, 10 分間)し、試料溶液中の大腸菌を沈殿させ、上澄み液をアガロースゲル電気泳動試料とした。表 6.1 に大腸菌一つの構成物質を示す^[13]。本実験では表 6.1 中の RNA と DNA などの核酸の検出をアガロースゲル電気泳動法にて試みた。アガロースゲルは、1 wt% アガロースと 99 wt% TAE buffer から調合した。ここで、TAE buffer は、トリス(Tris)、酢酸(Acetate)、エチレンジアミン四酢酸(Ethylenediaminetetraacetic acid)から構成される緩衝液である。電気泳動後、エチジウムブロマイド(臭化エチジウム)にて、試料を染色した。

表 6.1 大腸菌一つの構成物質^[13]
Table 6.1 Component of one *E. coli*^[13]

構成物質	重量[%]	種類数
水	70	1
タンパク質	15	3,000
DNA	1	1~4
RNA	6	>3,000
多糖類	3	10
脂質	2	20
単量体サブユニットとその中間体	2	500
無機イオン	1	20

6.4.3 実験結果および考察

図 6.12, 図 6.14, 図 6.16 にパルス電圧印加前後の大腸菌の生菌数を, 図 6.13, 図 6.15, 図 6.17 にアガロースゲル電気泳動の結果を示す.

図 6.12, 図 6.14, 図 6.16 から, 無印加の試料は, 25 分間(パルス電圧印加 50 回に必要な時間)放置しても生菌数はほとんど変化していないことがわかる. 一方, パルス電圧 50 回印加した試料の生菌数は, 印加前のものより大幅に減少した.

図 6.13, 図 6.15, 図 6.17 において, ①レーンのマーカーは, 核酸の大きさの目安である. ②レーンに印加前を, ③レーンに無印加 25 分放置を, ④レーンに高電界パルス印加後をそれぞれ示す. 核酸が検出されたなら, ②~④レーンで, ①レーンのように色が描かれる(バンドと呼ぶ). 図 6.13, 図 6.15, 図 6.17 から, ④レーンにバンドが存在しないことがわかる. これらの結果から, 以下のことが考えられる.

1. 本研究で印加したパルス電界では, 細胞膜に核酸が漏出できるほどの大きさの孔が形成されなかった.
2. 漏出した核酸が, 印加したパルス電界により分解された^[14].

本研究の結果のみでは, 上記 1.および 2.のどちらが原因かは不明である. また, 漏出量が微量の核酸は, アガロースゲル電気泳動法で検出されなかったことも考えられる. 今後, 漏出した微量の核酸を PCR(ポリメラーゼ連鎖反応, Polymerase Chain Reaction)法によりアガロースゲル電気泳動法により検出できる量まで増幅し, 漏出物の検出を試みる. また, タンパク質など他の細胞内容物の漏出と殺菌メカニズムの関係を調査する必要がある.

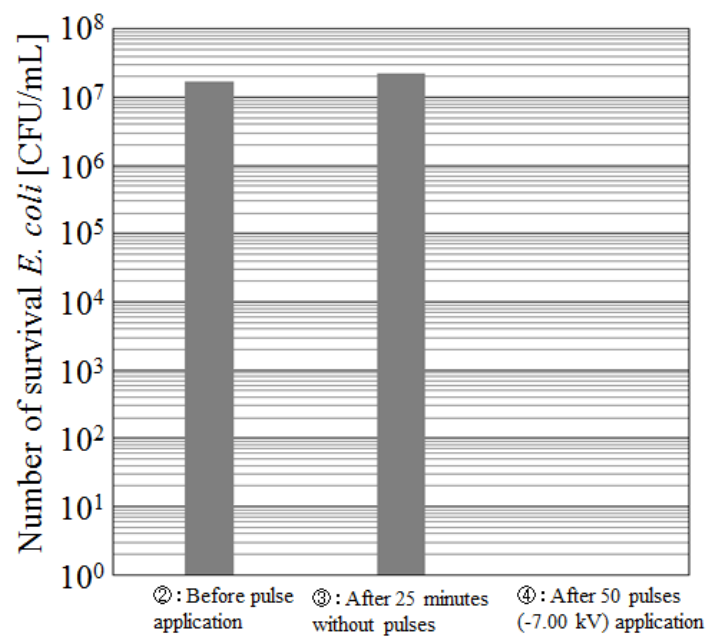


図 6.12 パルス電圧印加前後の大腸菌の生菌数①

Fig. 6.12 The number of survival *E. coli* before and after pulse application ①

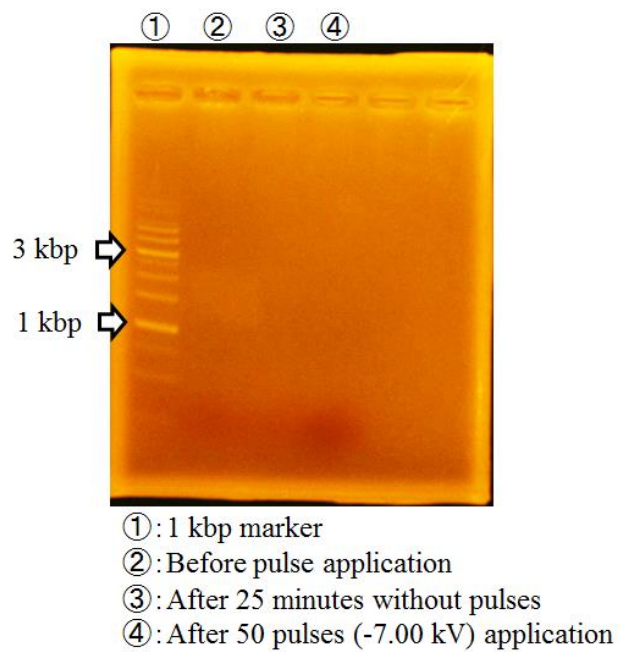


図 6.13 アガロースゲル電気泳動の結果①

Fig. 6.13 The result of agarose gel electrophoresis ①

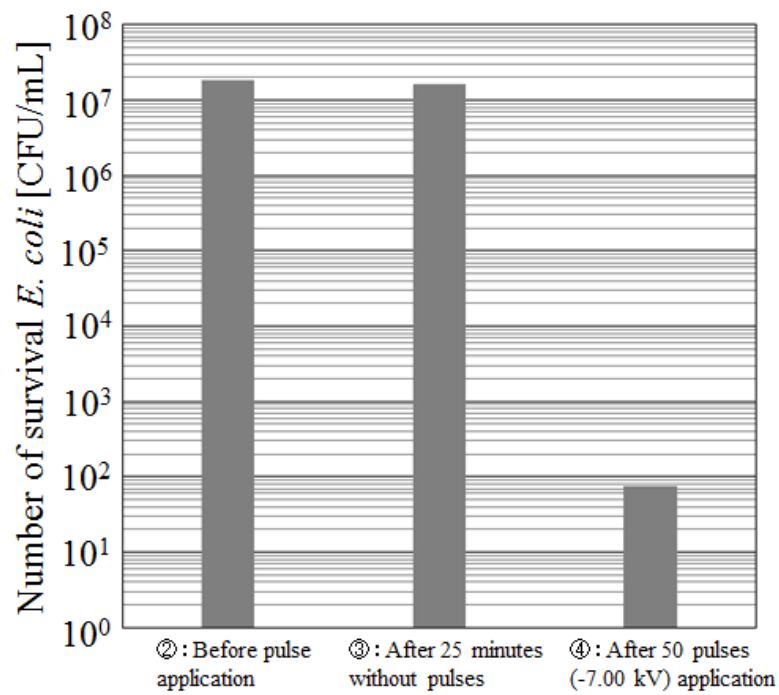


図 6.14 パルス電圧印加前後の大腸菌の生菌数②

Fig. 6.14 The number of survival *E. coli* before and after pulse application ②

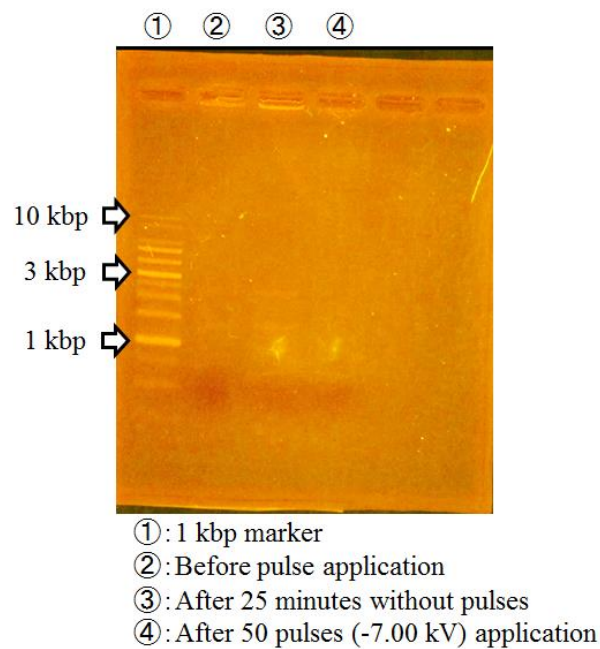


図 6.15 アガロースゲル電気泳動の結果②

Fig. 6.15 The result of agarose gel electrophoresis ②

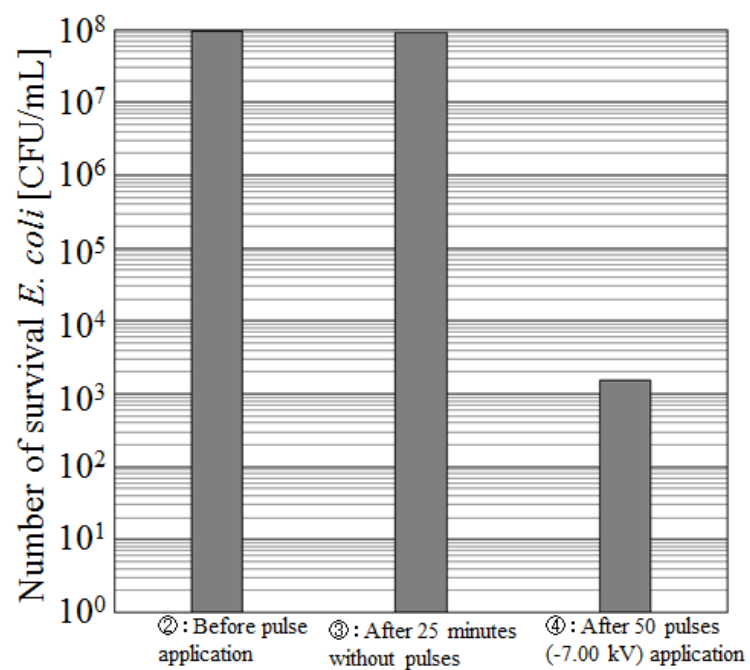


図 6.16 パルス電圧印加前後の大腸菌の生菌数③

Fig. 6.16 The number of survival *E. coli* before and after pulse application ③

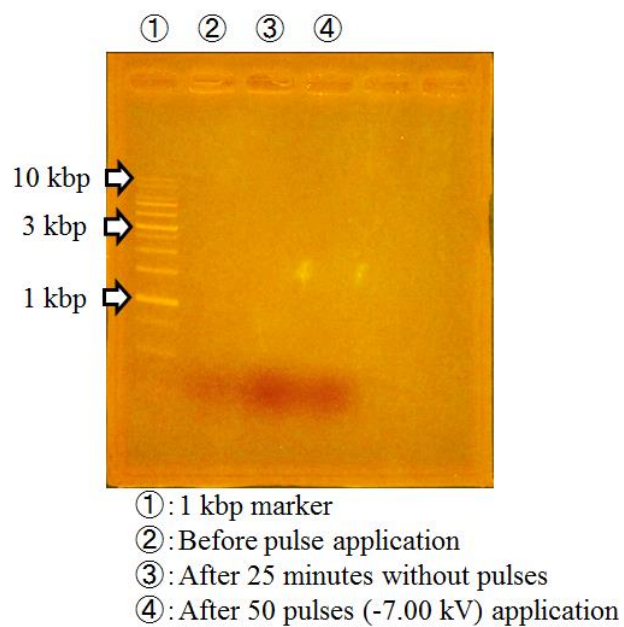


図 6.17 アガロースゲル電気泳動の結果③

Fig. 6.17 The result of agarose gel electrophoresis ③

6.5 まとめ

本章では、大腸菌を含む液体にパルス電圧を印加し殺菌実験を実施した。またパルス電圧印加有無の大腸菌の長さを測定した。さらに、アガロースゲル電気泳動にて高電界パルス印加後の液体中に大腸菌の核酸が漏出しているかを確認した。以下に結論をまとめる。

- ① -5.6 kV のパルス電圧印加 2.5 時間後の大腸菌を観測したところ、無印加 2.5 時間後のものより菌の長さが長くなっていることがわかった。
- ② 通常、大腸菌は時間とともに伸長し、約 2 倍の長さになると 2 つに分裂する。そして、伸長と分裂を繰り返して増殖をする。高電界パルスを印加した大腸菌が異常に伸長していたことから、高電界パルス印加が大腸菌の細胞分裂を阻害することが示唆された。
- ③ -7.0 kV のパルス電圧の印加では、大腸菌は殺菌されるが、大腸菌から核酸の漏出は確認できなかった。これらの結果から、本研究で印加したパルス電界では、細胞膜に核酸が漏出できるほどの大きさの孔が形成されなかったことや、漏出した核酸が印加したパルス電界により分解されたことなどが考えられる。また、漏出量が微量の核酸は、アガロースゲル電気泳動法で検出されなかったことも考えられる。今後、漏出した微量の核酸を PCR(ポリメラーゼ連鎖反応, Polymerase Chain Reaction)法によりアガロースゲル電気泳動法により検出できる量まで増幅し、漏出物の検出を試みる。また、タンパク質など他の細胞内容物の漏出と殺菌メカニズムの関係を調査する必要がある。

参考文献

- [1]杉村厚, 清水伸:「電気穿孔法」, 化学と生物, Vol. 29, No. 2, pp. 54-60 (1991)
- [2]Takayuki Ohshima, Masayuki Sato, Masahiro Saito: “Selective release of intracellular protein using pulsed electric field”, Journal of Electrostatics, Vol. 35, No. 1, pp.103-112 (1995)
- [3]Satoshi Shiina, Takayuki Ohshima, Masayuki Sato: “Extracellular Release of Recombinant α -Amylase from *Escherichia coli* Using Pulsed Electric Field”, Biotechnol. Prog., Vol. 20, No. 5, pp. 1528-1533 (2004)
- [4]Satoshi Shiina, Takayuki Ohshima, Masayuki Sato: “Extracellular production of α -amylase fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* using pulsed electric field”, Journal of electrostatics, Vol. 65, No. 1, pp. 30-36(2007)
- [5]Sasa Haberl Meglic, Tilen Marolt, Damijan Miklavcic “Protein Extraction by Means of Electroporation from *E. coli* with Preserved Viability”, J membrane Biol, Vol. 248, No. 5, pp. 893-901 (2015)
- [6]薬師寿治, 松山伸一, 徳田元:「グラム陰性細菌におけるリポ蛋白質の生合成機構-リポ蛋白質の選別と外膜局在化機構を中心に-」, 日本細菌学雑誌, Vol. 55, No. 3, pp. 517-526 (2000)
- [7]石野史敏:「大腸菌の細胞分裂酵素の研究」, 日本農芸化学会誌, Vol. 63, No. 11, pp. 1755-1769 (1989)
- [8]塩見大輔:「細菌形態形成制御機構に関する研究」, 日本細菌学雑誌, Vol. 69, No. 4, pp. 557-564 (2014)
- [9]田村勝弘:「大腸菌と酵母の圧力応答-非致死高圧力領域における挙動-」, 高圧力の科学と技術, Vol. 3, No. 2, pp. 142-148 (1994)
- [10]阿部文快:「微生物生理におよぼす圧力効果」, 高圧力の科学と技術, Vol. 18, No. 2, pp. 119-127 (2008)
- [11]畑山翔太, 安達隆太, 勝木淳, 秋山秀典:「強電界パルスのタンパク質への影響」, 平成28年電気学会基礎・材料・共通部門大会, p. 203(5-D-p2-4) (2016)
- [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, Vol. 8, No. 4, pp. 191-199 (2007)
- [13]David L Nelson, Michael M Cox, “Lehninger PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY 4th edition”, W. H. Freeman and Company, p. 16, (2005)
- [14]Ohshima Takayuki, Ono Takahiro, Sato Masayuki, “Decomposition of Nucleic Acid Molecules in Pulsed Electric Field and Its Release from Recombinant *Escherichia coli*”, Journal of Electrostatics, Vol. 46, No. 2-3, pp. 163-170 (1999)

第7章 高電界パルスによる牛乳中の大腸菌殺菌

7.1 はじめに

牛乳はヒトに対して豊富な栄養価を持つ食品であるが、微生物に対しても豊富な栄養源となり、生息・増殖に対して好適な場所である^[1]。現在、牛乳の殺菌には加熱殺菌が広く用いられており、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令により 62～65 °C で 30 分間加熱すること、あるいはこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌することが義務づけられている^[2]。牛乳の加熱殺菌法は、表 1.1 に示したように、様々な処理温度や時間などがある。最も多く使用されているのは、超高温瞬間殺菌(120～150 °C で 1～3 秒以内加熱)法であり、牛乳中の栄養素(ビタミン B₁, B₆, B₁₂ および葉酸)は多少損失してしまうが、ほとんどの菌を死滅させることができる^[1]。また、栄養素の損失を防ぐために、低温保持殺菌(62～65 °C で 30 分加熱)法が開発されてきた。低温保持殺菌法は超高温瞬間殺菌法に比べ栄養素の損失は少ない^[1]が、殺菌できない菌が増えてしまうという問題がある^[3]。そのため、牛乳中の栄養素を変性させず、全ての菌を殺菌する方法の開発が期待されている。高電界パルス殺菌法はこの期待に応えることができ、高電界パルス殺菌による牛乳等の殺菌実験が試みられている^[4-6]。本章では、本研究で使用してきた高電界パルス殺菌システムを用いて牛乳中の大腸菌殺菌を試み、第2章での生菌率の算出方法が実際の液体食品(牛乳)にも適用可能かを調査した。また、牛乳の FTIR スペクトルを取得し、牛乳の成分の変化を観測することも試みた。

7.2 実験方法

7.2.1 実験試料

殺菌対象は *Escherichia coli* JM103(非病原性)である。この大腸菌を寒天培地上に塗布し、静置培養(37 °C, 24 時間)した。その後、寒天培地上に形成されたコロニーを 1 つ取り、それを液体培地 5 mL 中に入れ、振とう培養(37 °C, 24 時間)した。培養に使用した培地の成分は、表 2.1 の通りである。振とう培養した液体培地 5 mL 中の 100 μ L を、別の滅菌済みの液体培地 5 mL 中に入れ、再び振とう培養(37°C)した。この液体培地の吸光度(OD₆₂₀)が 0.6 になったときのもの 1 mL を採取し、滅菌したポリプロピレンチューブ内に入れ、チューブを遠心分離(8,000 rpm, 20 °C, 5 分)した。遠心後、チューブ内の上澄み液を捨て、沈殿した大腸菌(約 30 mg)だけを市販の牛乳(せいきょう牛乳：生協) 10 mL の中に入れたものを実験試料とした。初期菌数は 1×10^7 CFU/mL である。

7.2.2 実験手順

殺菌槽，インパルス電圧発生器および実験回路は第 2 章で使用したものと同様である．実験試料を殺菌槽に入れ，パルス電圧を殺菌槽の内部電極に 60 秒間隔で印加した．印加電圧波高値は， -2.2 kV ， -3.8 kV ， -4.4 kV とした．実験は室温下($20.9\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 23.4\text{ }^{\circ}\text{C}$)で行った．図 7.1 に印加電圧波形を，表 7.1 に各印加パルス電圧波形の波頭長，波尾長および電界強度を，図 7.2 に印加電流波形を示す．また，試料を低温保持殺菌($63\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱)^[2]する実験も実施した．図 7.3 に各処理による試料の温度変化を示す．初期温度は約 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ であり，未処理の試料の温度は一定である．一方，波高値 -4.4 kV のパルス電圧を印加した試料の温度は約 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度上昇し，低温保持殺菌した試料は開始から 3 分後に $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ に達した．各処理後の生菌数をコロニー計数法により測定し，殺菌の評価を行った．

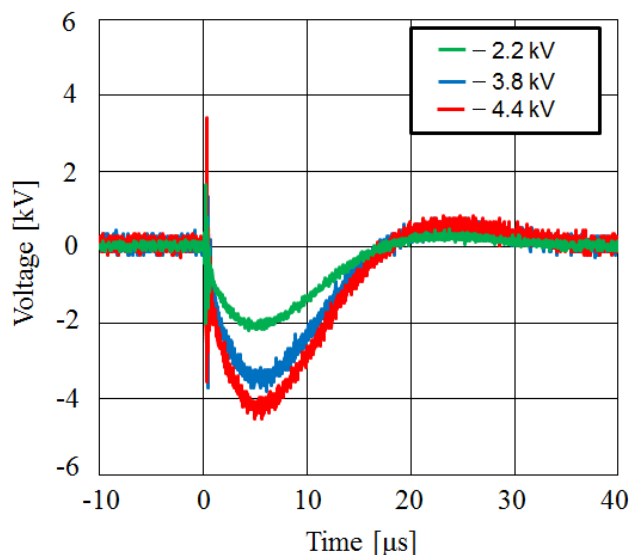


図 7.1 印加電圧波形

Fig. 7.1 The waveform of applied voltage

表 7.1 各印加パルス電圧波形の波頭長，波尾長および電界強度

Table 7.1 The duration of wave front and of wave tale, the strength of electric field for the each applied pulse voltage waveform

Peak value [kV]	Charging voltage [kV]	The duration of wave front [μs]	The duration of wave tale [μs]	The strength of electric field	
				Maximum [kV/mm]	Minimum [kV/mm]
-2.2	84	4.3	11.3	0.51	1.11
-3.8	128	5.2	12.2	0.87	1.92
-4.4	172	6.3	10.7	1.01	2.22

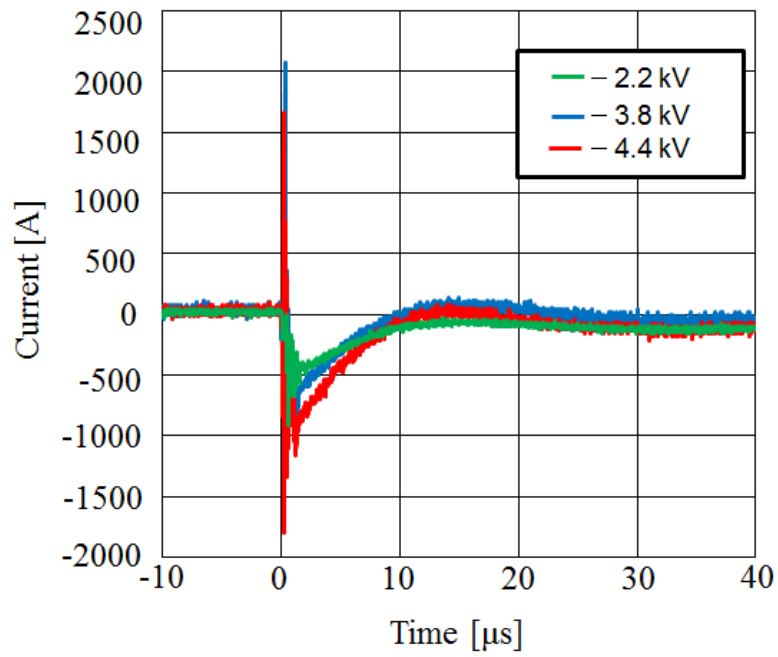


図 7.2 印加電流波形

Fig. 7.2 The waveform of applied current

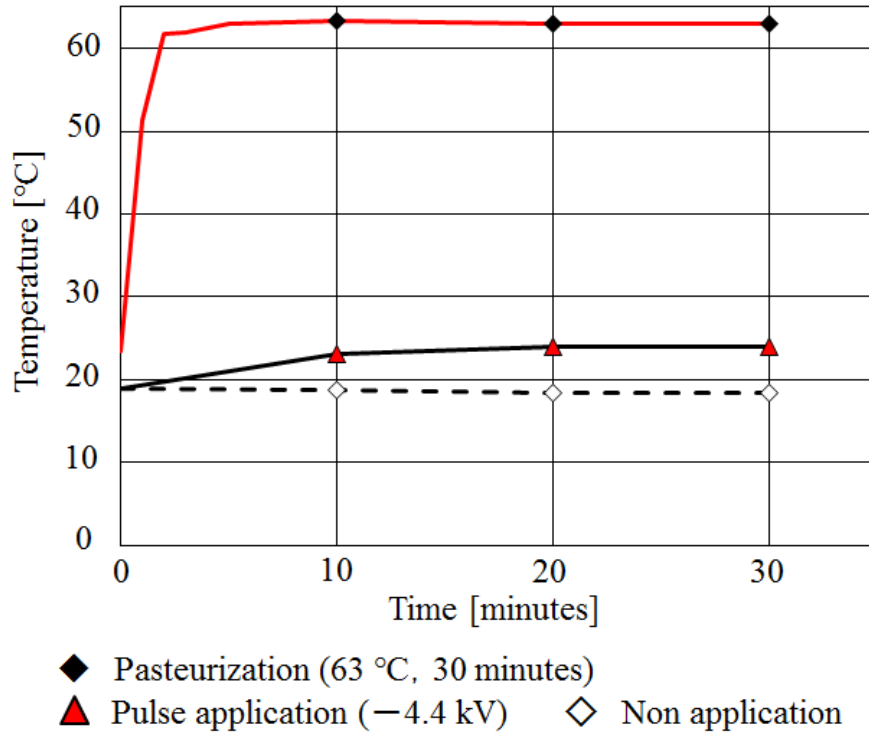


図 7.3 各処理による試料の温度変化

Fig. 7.3 Temperature of sample by each treatment as a function of time of each treatment

7.3 実験結果および考察

7.3.1 各殺菌処理と生菌率の関係

図 7.4 に牛乳中の大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性を示す。黒色の実線はパルス印加有の生菌率を、赤色の実線は低温保持殺菌した大腸菌の生菌率を、破線は無印加の生菌率を示す。無印加時の大腸菌の生菌率は試料にパルス電圧を印加せず、同じ環境下で 30 分間(パルス印加 30 回にかかる時間)放置したときの値である。図中のマークは平均生菌率を、エラーバーは最小値と最大値を、括弧内の数字は実験回数を示す。

無印加時の大腸菌の生菌率が減少していないのに対して、パルス電圧を印加した生菌率はパルス印加回数とともに減少している。これより高電界パルスによる牛乳中の大腸菌の殺菌効果が認められる。波高値 -3.8 kV、 -4.4 kV のパルス電圧を印加した牛乳試料の大腸菌の生菌率はパルス印加回数の増加とともに減少したが、 -2.2 kV のパルス電圧を印加したものはほとんど変化しなかった。これは、波高値 -2.2 kV のパルス電圧では、細胞膜を破壊するのに必要な電界が生じなかったためだと考えられる。波高値 -4.4 kV のパルス電圧を印加した牛乳試料の大腸菌の生菌率は、 -3.8 kV のものより低く、高電界パルス印加による牛乳中の大腸菌殺菌の電界強度依存性も確認された。一方、高電界パルスを印加した牛乳試料中の大腸菌の生菌率は低温保持殺菌した試料のものより高い。今後、高電界パルス殺菌の実用化のため、さらに高い殺菌効果が必要だと考えられる。

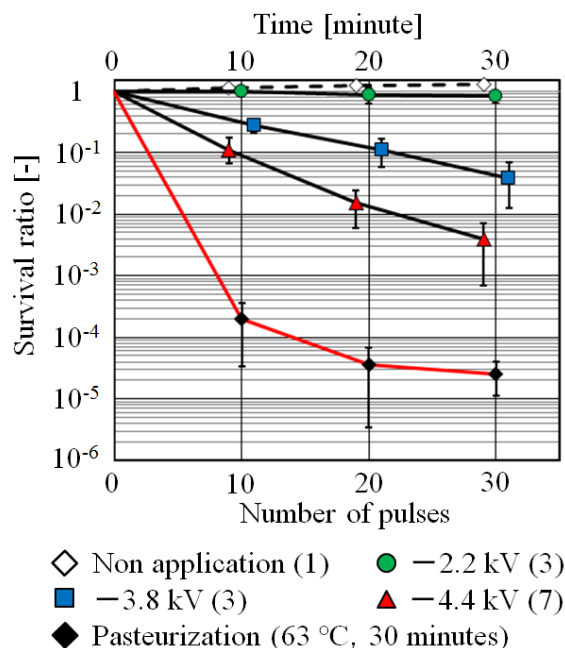


図 7.4 牛乳中の大腸菌の生菌率のパルス印加回数特性

Fig. 7.4 The survival ratio of *E. coli* in the milk as a function of the number of the pulses

7.3.2 各殺菌処理の消費エネルギー

7.3.2.1 低温保持(63 °C, 30 分)殺菌の消費エネルギー

加熱により消費するエネルギー W は式(7.1)で求めることができる.

$$W = C_q m \Delta t \quad (7.1)$$

ここで, C_q は試料の比熱, m は試料の質量, Δt は上昇した温度を示す. 試料の比熱を $4.2 \text{ J/g} \cdot \text{K}$ と仮定したとき, 式(7.1)から 6 mL の実験試料の温度を $26.7 \text{ }^\circ\text{C}$ から $63 \text{ }^\circ\text{C}$ まで上昇させるのに必要なエネルギーは 152.46 J/mL と計算される.

7.3.2.2 印加電圧電流波形から計算した消費エネルギー

パルス電圧印加による試料の単位体積当たりの投入エネルギー E_n は, 式(2.2)のように印加電圧波形(図 7.1)と印加電流波形(図 7.2)の積を積分することで求めた. 図 7.5 に大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性を示す. 図中のマークは, 平均生菌率を, エラーバーは最小値と最大値を, 括弧内の数字は実験回数を示す.

図 7.5 から, -3.8 kV と -4.4 kV 印加時の大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性は同程度の傾きを持ち, その傾きの直線延長上に低温保持殺菌の結果がプロットされていることがわかる. 一方, -2.2 kV 印加時の大腸菌の生菌率は投入エネルギーの増加にも関わらずほとんど減少していない. これらの結果から, 高電界パルスによる殺菌は投入エネルギーのみに依存するわけではなく, 印加するパルス電界の強さが重要であることがわかる.

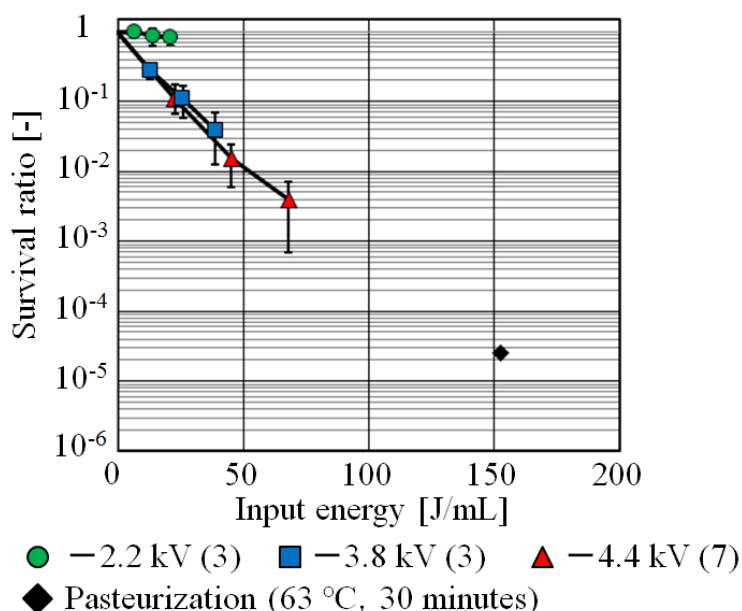


図 7.5 大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性

Fig. 7.5 The survival ratio of *E. coli* as a function of the input energy

7.3.3 高電界パルス印加による牛乳中の大腸菌の生菌率の算出

第 2 章での生菌率算出方法を用いて，各波高値のパルス電圧印加による生菌率を算出し，実験結果で得られた生菌率と比較した．図 7.6，図 7.7 および図 7.8 に波高値 -2.2 kV， -3.8 kV および -4.4 kV のパルス電圧印加時の算出した生菌率と実験結果の比較を示す．実験結果のプロットやエラーバーは図 7.4 のものと同じである．

図 7.6，図 7.7 および図 7.8 から，算出した生菌率と実験にて得られた生菌率は，大方一致しているように見える．これより，第 2 章で提案した生菌率の算出方法は，実際の液体食品である牛乳に適用できる可能性があることが示された．

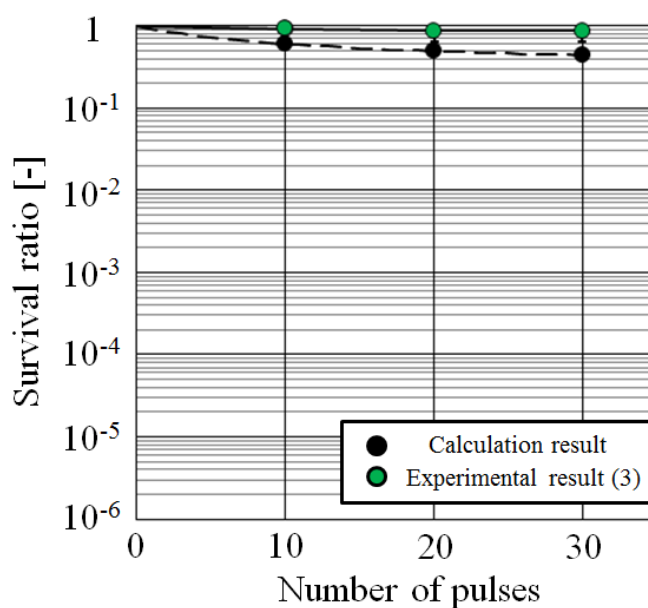


図 7.6 波高値 -2.2 kV のパルス電圧印加時の算出した生菌率と実験結果の比較

Fig. 7.6 Comparison of the experimental and calculated survival ratio
after application of -2.2 kV pulses

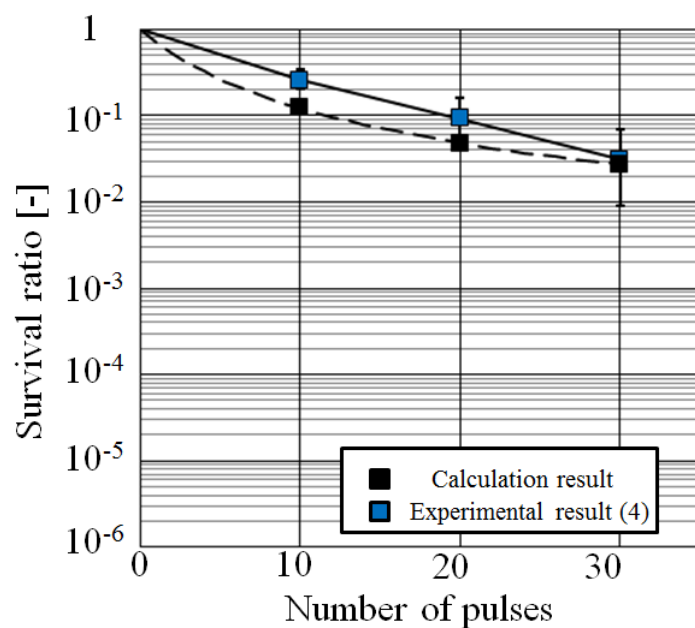


図 7.7 波高値 -3.8 kV のパルス電圧印加時の算出した生菌率と実験結果の比較
 Fig. 7.7 Comparison of the experimental and calculated survival ratio
 after application of -3.8 kV pulses

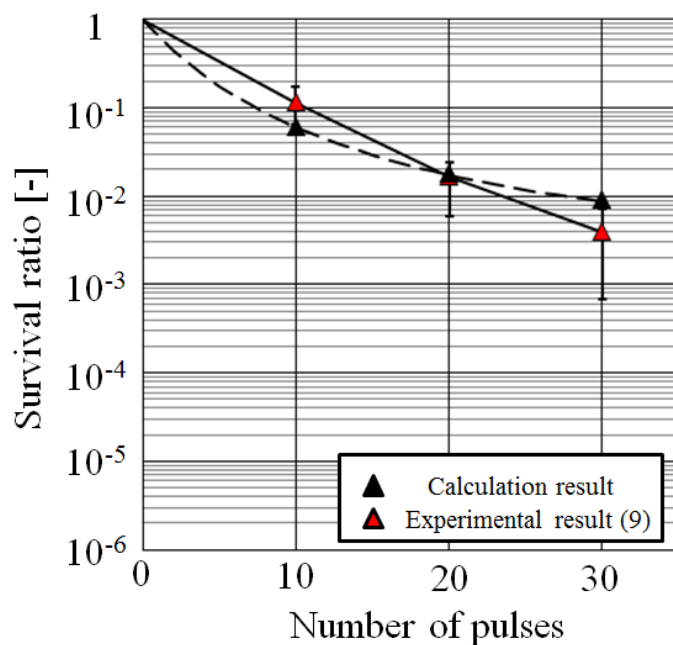


図 7.8 波高値 -4.4 kV のパルス電圧印加時の算出した生菌率と実験結果の比較
 Fig. 7.8 Comparison of the experimental and calculated survival ratio
 after application of -4.4 kV pulses

7.4 FTIR 法を用いた高電界パルス印加後の牛乳の成分解析

7.4.1 はじめに

高電界パルス殺菌法は、液体食品中の栄養素の損失を小さくできることから注目されている。Silvia Bendicho らは、高電界パルス印加、低温保持殺菌(LTLT : 65 °Cで 30 分加熱)および高温短時間殺菌(HTST : 75 °Cで 15 秒加熱)後の牛乳試料中のビタミンの保有量を調査した。その結果、高電界パルス印加後の牛乳中の Ascorbic acid(ビタミン C)の保有量は処理前と比較して 93.4 %となり、少し低下したが、低温保持殺菌(49.7 %)および高温短時間殺菌(86.7 %)に対して高い数値であることを報告している^[7]。また近年では、牛乳中の成分を解析する手法として FTIR 法が使用することも検討されている^[8]。そこで本章では、高電界パルス印加(−4.4 kV, 30 回)、低温保持殺菌(63 °Cで 30 分加熱)および高温保持殺菌(90 °Cで 15 分)後の牛乳の FTIR スペクトルをフーリエ変換赤外分光光度計により観測し、比較した。

7.4.2 実験方法

実験試料は、未処理の市販の牛乳(タカナシ低温殺菌牛乳 : (株)高梨乳業岩手工場) , この牛乳 6 mL に波高値−4.4 kV のパルス電圧を 30 回印加したもの、牛乳 10 mL を 63 °Cで 30 分または 90 °Cで 15 分間加熱したものである。高電界パルス印加回路および手順は前章 7.2.2 の通りである。ここで、63 °Cで 30 分間の加熱は低温保持殺菌法を、90 °Cで 15 分間の加熱は高温保持殺菌法を模擬している。加熱にはオイルバススターラー((株)アズワン : OBS-200M)を使用した。それぞれの試料 1 μL を KBr プレート((株)ジャスコエンジニアリング : 顕微赤外用 KBr プレート)で挟み、FTIR スペクトルをフーリエ変換赤外分光光度計(日本分光 : FT/IR-5300 型)により取得した。

7.4.3 FTIR スペクトル観測

図 7.9 に未処理、図 7.10 に高電界パルス印加後、図 7.11 に低温保持殺菌後、図 7.12 に高温保持殺菌後の牛乳試料の FTIR スペクトルを示す。また、図 7.13 に蒸留水の FTIR スペクトルを示す。

図 7.9、図 7.10、図 7.11 および図 7.12 の牛乳試料のスペクトルは、図 7.13 に示す蒸留水のスペクトルとほとんど同じように見える。一方、牛乳試料には 1000 ~ 1200 cm^{-1} 付近にピークが見られるが、蒸留水にはこのピークは存在しない。1067 cm^{-1} 付近のピークはリン酸基のものであり^[8]、この 1000 ~ 1200 cm^{-1} の間には、有機酸、アミノ酸由来のピークがいくつかあると言われている^[8]。

未処理(図 7.9)と高電界パルス印加後(図 7.10)の牛乳の FTIR スペクトルはほとんど同じように見える。これより、FTIR スペクトルで観測する限り、高電界パルス印加による牛乳の成分は変化しないことが示唆された。また、未処理(図 7.9)と低温保持殺菌(図 7.11)および高温保持殺菌(図 7.12)を比較すると、 $3000\sim4000\text{ cm}^{-1}$ 付近と $1500\sim1800\text{ cm}^{-1}$ 付近のピーク幅が短くなっているように見える。 $3000\sim4000\text{ cm}^{-1}$ 付近には、水由来のピーク以外に、C-H や N-H などに由来するピークが存在し、 $1500\sim1800\text{ cm}^{-1}$ 付近には、C-C や C-O, C-N などに由来するピークが存在する^[9-10]。これから、熱を与えたことにより、これらの結合を持つタンパク質等の高分子が変性したことが考えられる。

以上より、FTIR スペクトルで観測する限り、高電界パルス殺菌法は、低温保持殺菌($63\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分加熱)法および高温保持殺菌($90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 15 分加熱)法と比較して、牛乳の成分をほとんど変化させない可能性があることが示唆された。

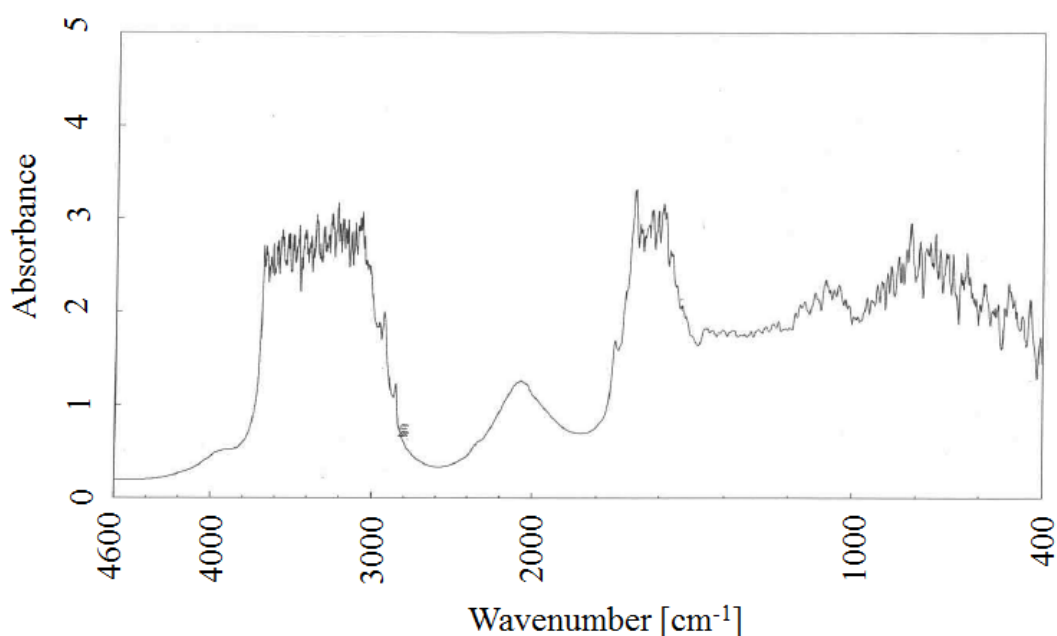


図 7.9 未処理の牛乳試料の FTIR スペクトル

Fig. 7.9 FTIR Spectrum of the milk sample without treatment

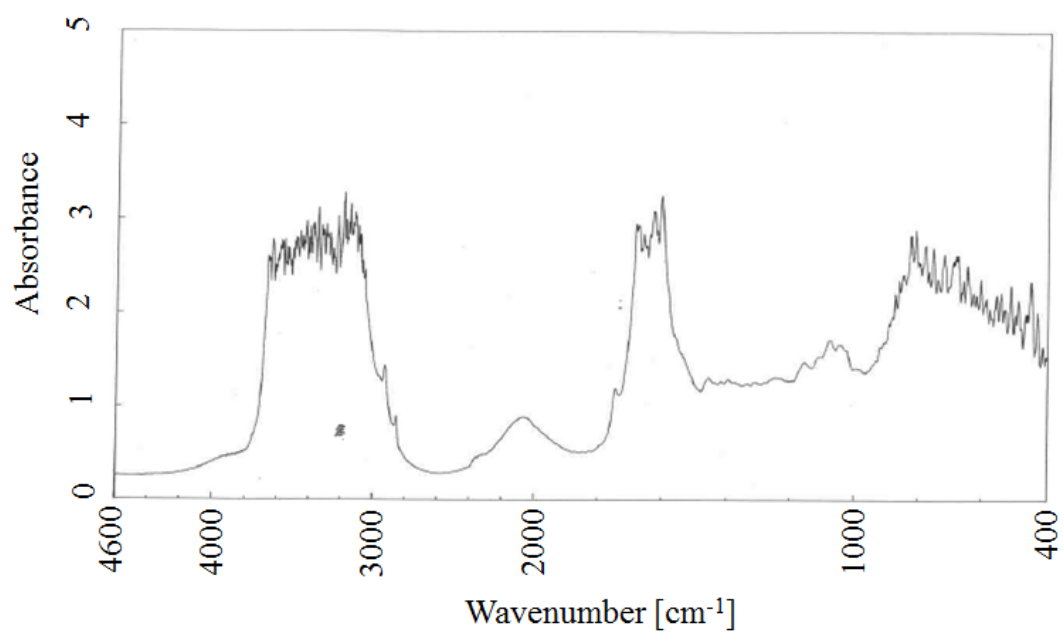


図 7.10 高電界パルス印加後の牛乳試料の FTIR スペクトル

Fig. 7.10 FTIR Spectrum of the milk sample after application of high electric field pulse

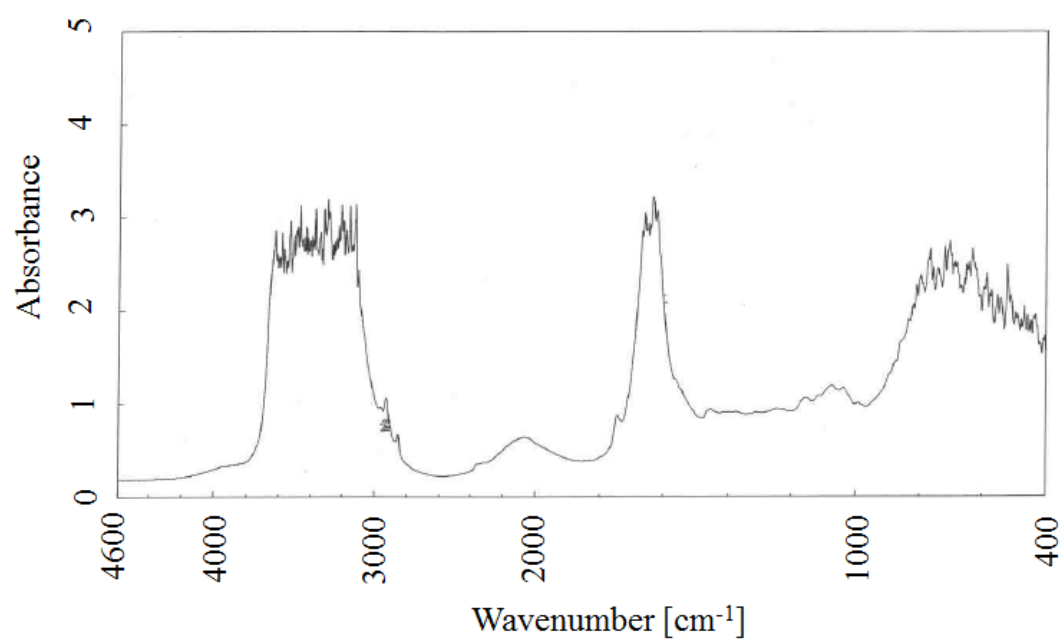


図 7.11 低温保持殺菌後の牛乳試料の FTIR スペクトル

Fig. 7.11 FTIR Spectrum of the milk sample after treatment of low temperature long time

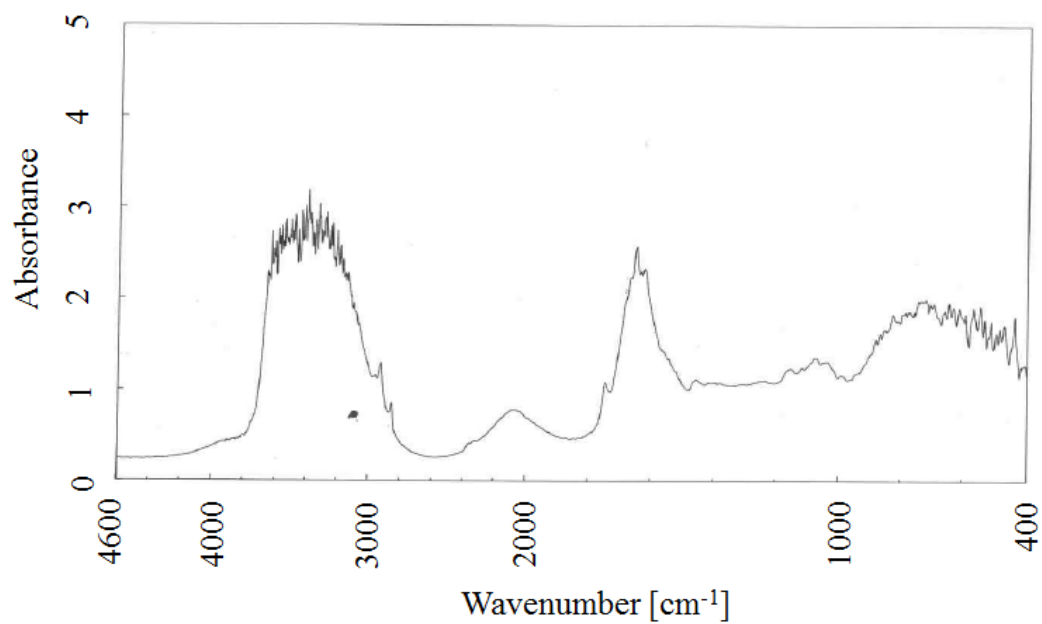


図 7.12 高温保持殺菌後の牛乳試料の FTIR スペクトル

Fig. 7.12 FTIR Spectrum of the milk sample after treatment of high temperature long time

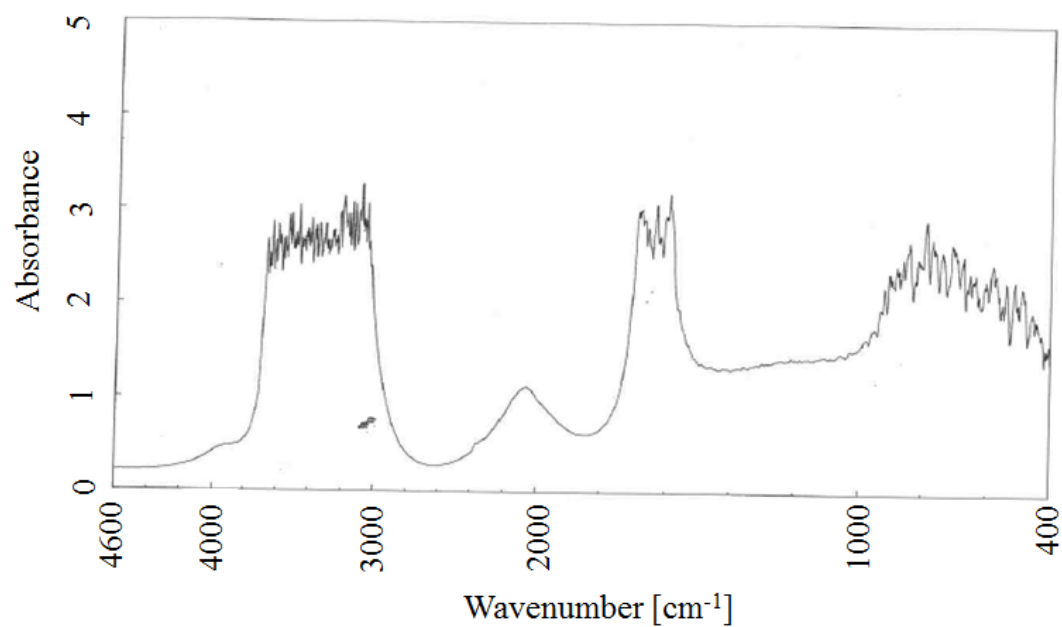


図 7.13 蒸留水の FTIR スペクトル

Fig. 7.13 FTIR Spectrum of the distilled water without treatment

7.5 まとめ

本章では、大腸菌を含む牛乳に波高値 -2.2 kV 、 -3.8 kV 、 -4.4 kV のパルス電圧(幅： $20\text{ }\mu\text{s}$)を印加し、殺菌実験を実施した。またパルス電圧印加後の牛乳の FTIR スペクトルを取得した。以下にその結果を示す。

- ① 波高値 -3.8 kV および -4.4 kV のパルス電圧を印加した牛乳試料の生菌率は、パルス印加回数とともに減少したが、 -2.2 kV のパルス電圧を印加したものは、ほとんど変化しなかった。これは、波高値 -2.2 kV のパルス電圧では、細胞膜を破壊するのに必要な電界が生じなかったためだと考えられる。また、波高値 -4.4 kV のパルス電圧を印加した牛乳試料の生菌率は、 -3.8 kV のものより低く、高電界パルス印加による牛乳中の大腸菌殺菌の電界強度依存性も確認された。一方、高電界パルスを印加した試料の生菌率は低温保持殺菌した試料のものより高い。今後、高電界パルス殺菌の実用化のため、さらに高い殺菌効果が必要だと考えられる。
- ② -3.8 kV と -4.4 kV 印加時の大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性は、同程度の傾きを持ち、その傾きの直線延長上に低温保持殺菌の結果がプロットされていることがわかる。一方、 -2.2 kV 印加時の大腸菌の生菌率は投入エネルギーの増加にも関わらず、ほとんど減少していない。これらの結果から、高電界パルスによる殺菌は、投入エネルギーのみに依存するわけではなく、印加するパルス電界の強さも重要であることがわかる。
- ③ 第2章での生菌率算出方法を用いて、各波高値のパルス電圧印加による生菌率を算出し、実験結果で得られた生菌率と比較した。算出した生菌率と実験にて得られた生菌率は大方一致した。これより、第2章で提案した生菌率の算出方法は、実際の液体食品である牛乳に適用できる可能性があることが示された。
- ④ FTIR スペクトルで観測する限り、高電界パルス殺菌法は、低温保持殺菌($63\text{ }^{\circ}\text{C}$ で30分加熱)法および高温保持殺菌($90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で15分加熱)法と比較して、牛乳の成分をほとんど変化させない可能性があることがわかった。

参考文献

- [1] 慶田雅洋：「わが国の飲用牛乳の変遷」，日本農芸化学会誌，Vol. 57，No. 8，pp. 103-106 (1983)
- [2] 高野光輝：「食品の殺菌 - その科学と技術 - 」，(株)幸書房，p. 1，34，327 (1998)
- [3] 荻原博和，桐部奈美，星野麻美，小田好恵，古川壮一，森永康：「低温保持式殺菌乳の微生物学的品質とその微生物叢」：日本食品微生物学会雑誌，Vol. 27，No. 3，pp. 152-157 (2010)
- [4] Sílvia Bendicho, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Olga Martín : “Milk processing by high intensity pulsed electric fields”, Trends in Food Science & Technology, Vol. 13, No. 6-7, pp.195-204 (2002)
- [5] O. MARTÍN, B.L. QIN, F.J. CHANG, G.V. BARBOSA-CÁNOVAS, B. G. SWANSON : “INACTIVATION OF ESCHERICHIA COLI IN SKIM MILK BY HIGH INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELDS”, Journal of Food Process Engineering, Vol. 20, No. 4, pp. 317-336 (1997)
- [6] Gun Joon Lee, Bok Kung. Han, Hyuk Joon Choi, Shin Ho Kang, Seung Chun Baick, Dong-Un 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. , Vol. 35, No. 6, pp. 800-806 (2015)
- [7] SILVIA BENDICHO , ALEXANDRE ESPACHS , JAVIER ARÁNTGUI , OLGA MARTÍN : “Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatment on vitamins of milk”, Journal of Dairy Research, Vol. 69, No. 1, pp. 113-123 (2002)
- [8] Poliana M. Santos, Edenir R. Pereira-Filho, Luis E. Rodriguez-Saona : “Application of Hand-Held and Portable Infrared Spectrometers in Bovine Milk Analysis”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 61, No. 6, pp. 1205-1211 (2013)
- [9] 堀口博：「赤外吸光図説総覧-有機構造化学の基礎と実際-」，(株)三共出版，p. 7，pp. 112-117 (1973)
- [10] 中西香爾：「赤外線吸収スペクトル-定性と演習-定性編」，(株)南江堂，pp. 7-10，p. 36 (1969)

第 8 章 総括

8.1 本研究のまとめ

本研究では、高電界パルス印加による水溶液中の大腸菌殺菌に関する研究を実施した。非加熱殺菌法の一つである高電界パルス殺菌法は、液体食品の新しい殺菌法として注目されているが、その殺菌機構は未だ不明な点が多い。今後、選択的殺菌技術への応用を考えれば、殺菌効果を定量化させることは重要である。本研究の第 2 章から第 5 章では、高電界パルスによる殺菌機構を解明するため、液体温度とパルス電圧印加間隔、水溶液中のイオンおよびアミノ酸の影響を検討した。また、先行研究にて報告されている殺菌機構モデルを基に生菌率を算出し、実験結果と比較した。さらに、第 6 章では高電界パルス印加前後の大腸菌の長さの測定した。第 7 章では、本研究で使用した装置を用いて実際に牛乳の殺菌実験を実施した。これらより、以下の知見を得た。

生菌率の算出(第 2 章)

U. Zimmermann らが提唱する高電界パルス殺菌機構のモデルから算出した生菌率と、大腸菌を含む液体培地試料に -3.8 kV, -4.4 kV および -5.3 kV のパルス電圧を印加した後の生菌率を比較した。生菌率の算出では、U. Zimmermann らの報告を参考し、細胞膜の電位差が 1 V 以上で菌が死滅すると仮定し、菌の長軸と電界方向のなす角、菌の長さや幅、印加パルス電圧波高値、パルス電圧印加回数を考慮した。その結果、生菌率の算出値と実験値は良く一致しており、印加パルス電界が高いほど生菌率は減少した。これは、印加パルス電界が高いほど細胞膜に生じる電位差が高くなり、細胞膜が破壊され易くなるためである。一方、大腸菌の生菌率の減少の度合いがパルス印加回数の増加とともに小さくなり、ある一定値に収束していることは、実験結果および計算結果ともに見られた。高電界パルス殺菌法では、菌の長さが長いほど殺菌率は高く、生菌率は減少しやすい。このことから、生菌率の減少幅が小さくなることは、パルス印加回数が増加すると殺菌され難い短い菌が残るためであると考えられる。

液体温度とパルス間隔の影響(第 3 章)

低温(-1.2 °C $\sim$ $+3.0$ °C)あるいは室温($+17.3$ °C $\sim$ $+25.7$ °C)の大腸菌を含む液体試料にパルス電圧を 60 秒, 120 秒あるいは 180 秒間隔で 30 回印加することで、試料温度とパルス電圧の印加間隔が高電界パルスによる大腸菌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。その結果、全ての実験試料の大腸菌の生菌率は、パルス電圧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る傾向がみられた。これは、第2章で述べたように、パルス電圧印加回数が増加すると殺菌され難い短い菌が残るためであると考えられる。液体温度の影響では、低温領域の大腸菌の生菌率は、室温領域のものより高い結果が得られた。これは、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。パルス電圧印加間隔の影響では、低温領域においては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く、室温領域においては60秒および120秒のパルス間隔ではほぼ同じ生菌率が得られた。これらから、大腸菌の細胞膜の修復時間は、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。第2章を基に、温度を考慮した大腸菌の生菌率算出を試みた。パルス電界印加により細胞膜に生じる電位差が、室温では1V、低温では1.4V以上になると、大腸菌は死滅すると仮定した。その結果、室温領域では算出値と実験値は良く一致した。一方、低温領域では算出値と120秒および180秒間隔の実験値は同程度だったが、算出値と60秒間隔の実験値の差は大きくなった。これは、低温領域のパルス電圧印加間隔60秒では、高電界パルスを印加された大腸菌の細胞膜は修復されておらず、細胞膜にダメージが蓄積され、殺菌効果が高くなるためであると考えられる。また今回は、温度が細胞膜の構造に影響を与えるモデルを考えてきたが、温度は液体試料中の成分の移動度等にも影響を及ぼすことが予想される。今後、細胞膜の修復時間や温度が液体試料成分に与える影響等を考慮し、生菌率を算出する必要がある。

イオンの影響(第4章)

大腸菌を含む濃度 $3.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L の NaCl, KCl, CsCl および CsBr 水溶液にパルス電圧(波高値: -4.4 kV, 幅: 20 μ s)を60秒間隔で印加した殺菌実験結果を高電界パルス印加により細胞膜に働く Maxwell 応力の観点から考察した。その結果、第2章と同様に、全ての実験試料の生菌率はパルス電圧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る傾向がみられた。また、大腸菌の生菌率は、水溶液中の電解質濃度が高くなるほど減少した。さらに、 1.0×10^{-2} mol/L の NaCl, KCl, CsCl および CsBr 水溶液中の大腸菌の生菌率は同程度であったことから、本研究で使用した電解質(NaCl, KCl, CsCl, CsBr)のイオンの半径、質量、水和半径および移動度は、生菌率に影響を及ぼさないことが示された。一般に細胞内には豊富な正イオン(Na^+ , K^+)が存在し、その濃度は0.15 mol/L 程度である。一方、細胞質内の負イオン(Cl^-)の濃度は正イオンの濃度より低く、0.004 mol/L 程度であり、濃度0.12 mol/L の RNA や DNA などの巨大分子が細胞内の負電荷を担っていることから、細胞内は電氣的に中性に保たれている。しかし、巨大分子の移動度は低いいため、それに担われた負電荷は Maxwell 応力に寄与し難いことが考えられる。これらのことから、細胞内では豊富に含まれている正イオンが細胞膜内側表面に整列し、一方の細胞外(水溶液試料)

では負イオンが外側表面に整列するとき、大きい Maxwell 応力が細胞膜を圧縮し、高い殺菌効果が得られることが考えられる。よって、水溶液試料中の負イオンの濃度が生菌率を決定していることが示唆された。さらに第 2 章を基に、水溶液中の電解質濃度を考慮した生菌率の算出を試みた。その結果、電解質濃度 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ mol/L の範囲では算出値と実験値は一致せず、濃度 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ mol/L の範囲では算出値と実験値は同程度だった。今回の電解質濃度、すなわちイオン濃度を考慮した生菌率の算出では、イオン濃度が Maxwell 応力のみに依存すると仮定した。実際には、イオン濃度、すなわち溶質濃度が変化すると、大腸菌に働く浸透圧や膜電位が変化する。今後、生菌率の算出値と実験値を一致させるためには、水溶液中の溶質濃度の変化が大腸菌に及ぼす影響を考慮する必要があると考えられる。

アミノ酸の影響(第 5 章)

大腸菌を含む $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L のアミノ酸(L-Serine, L-Alanine, L-Histidine, L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)および電解質(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)試料にパルス電圧(波高値: -4.4 kV, 幅: $20 \mu s$)を 60 秒間隔で印加し、液体食品中に含まれている栄養成分の一つであるアミノ酸が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響について検討した。その結果、全ての実験試料中の大腸菌の生菌率は、第 2 章と同様にパルス電圧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る傾向がみられた。負電荷極性側鎖を持つアミノ酸(L-Glutamic acid, D-Glutamic acid, L-Aspartic acid)と電解質(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)試料の生菌率は、パルス印加回数および溶質濃度の増加とともに大きく減少した一方、無電荷極性(L-Serine)、非極性(L-Alanine)および正電荷極性(L-Histidine)の側鎖を持つアミノ酸試料の生菌率の減少率は小さかった。これらのことから、水溶液試料中の負イオンおよび負電荷の濃度が生菌率を支配していると考えられる。この結果は、第 4 章の考察を支持する結果となった。また、L-Glutamic acid と D-Glutamic acid 試料の生菌率は同程度であり、Glutamic acid の L か D の種類は、生菌率に影響を与えないことが示唆された。

大腸菌の伸長(第 6 章)

高電界パルス印加の殺菌以外の効果を調査することを目的とし、高電界パルス印加前後の大腸菌の長さを測定した。その結果、パルス電圧印加 2.5 時間後の大腸菌は、無印加 2.5 時間後のものより長くなっていた。通常、大腸菌は時間とともに伸長し、約 2 倍の長さになると 2 つに分裂する。そして、伸長と分裂を繰り返して増殖をする。これらのことから、高電界パルス印加が大腸菌の細胞分裂を阻害することが考えられる。この原因として、高電界パルス印加により細胞膜に形成された孔から、細胞分裂を行うため

に必要な細胞内容物が細胞外へ流れ出てしまったことが考えられる。そのため、アガロースゲル電気泳動法を用いて、パルス電圧印加後の細胞外水溶液中に核酸が存在しているか(大腸菌内から核酸が漏出しているか)を調査した。その結果、 -7.0 kV のパルス電圧の印加では、大腸菌は殺菌されるが、大腸菌から核酸は漏出しない可能性が示された。これらの結果から、本研究で印加したパルス電界では、細胞膜に核酸が漏出できるほどの大きさの孔が形成されなかったことや、漏出した核酸が印加したパルス電界により分解されたことなどが考えられる。また、漏出量が微量の核酸は、アガロースゲル電気泳動法で検出されなかったことも考えられる。今後、漏出した微量の核酸を PCR(ポリメラーゼ連鎖反応, **Polymerase Chain Reaction**)法によりアガロースゲル電気泳動法により検出できる量まで増幅し、漏出物の検出を試みる。また、タンパク質など他の細胞内容物の漏出と殺菌メカニズムの関係を調査する必要がある。

牛乳の殺菌(第 7 章)

大腸菌を含む牛乳にパルス電圧を印加し、殺菌実験を実施した。その結果、波高値 -3.8 kV 、 -4.4 kV のパルス電圧を印加した牛乳試料中の大腸菌の生菌率はパルス電圧印加回数とともに減少したが、 -2.2 kV のパルス電圧を印加したものはほとんど変化しなかった。これは、波高値 -2.2 kV のパルス電圧では、細胞膜を破壊するのに必要な電界が生じなかったためだと考えられる。また、波高値 -4.4 kV のパルス電圧を印加した牛乳試料の生菌率は -3.8 kV のものより低く、高電界パルス印加による牛乳中の大腸菌殺菌の電界強度依存性も確認された。一方、高電界パルス殺菌処理した牛乳中の大腸菌の生菌率は低温保持殺菌した試料のものより高い。今後、高電界パルス殺菌の実用化のため、さらに高い殺菌効果が必要だと考えられる。それぞれのパルス電圧印加時の投入エネルギーを、印加パルス電圧および電流波形から導出した結果、 -3.8 kV と -4.4 kV 印加時の大腸菌の生菌率の投入エネルギー特性は、同程度の傾きを持ち、その傾きの直線延長上に低温保持殺菌の結果がプロットされていた。一方、 -2.2 kV 印加時の大腸菌の生菌率は、投入エネルギーの増加にも関わらずほとんど減少していない。これらの結果から、高電界パルスによる殺菌は、投入エネルギーのみに依存するわけではなく、印加するパルス電界の強さも重要であることがわかる。第 2 章での生菌率算出方法を用いて、各波高値のパルス電圧印加による生菌率を算出し、実験結果で得られた生菌率と比較した。算出した生菌率と実験にて得られた生菌率は大方一致した。これより、第 2 章で提案した生菌率の算出方法は、実際の液体食品である牛乳に適用できる可能性がある。また、FTIR スペクトルで観測する限り、高電界パルス殺菌法は、低温保持殺菌($63\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分加熱)法および高温保持殺菌($90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 15 分加熱)法と比較して、牛乳の成分をほとんど変化させない可能性があることが示唆された。

8.2 本研究の工学的意義

本研究では、高電界パルス印加による水溶液中の大腸菌殺菌に及ぼす液体温度とパルス電圧印加間隔、水溶液中のイオンとアミノ酸の影響について検討した。そしてこれらの結果を基に、高電界パルス殺菌法の殺菌機構の解明および高電界パルス殺菌機構モデルから生菌率の算出を試みた。従来までの殺菌技術の多くは、対象物中の菌を全て死滅させるのみであった。現在、これまで研究されてきた様々な殺菌法を組み合わせることにより、殺菌効率の向上や選択的殺菌技術の開発等が進められている。選択的殺菌技術の開発には、各々の殺菌法の殺菌効果を定量的に評価することが重要になってくる。高電界パルス殺菌法との組み合わせによる選択的殺菌を実施する際に、本研究の成果が重要になると考えられる。

研究業績

(1)学会誌に掲載された論文 (5 件)

1.	題目：高電界パルス印加による大腸菌の伸長 著者：村本裕二，岡洋佑，<u>村上祐一</u>，清水教之，市原茂幸 掲載誌名：静電気学会誌，Vol.38，No.2 発行所：静電気学会 掲載頁：pp. 108-112 発行年：2014 年
2.	題目：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 著者：<u>村上祐一</u>，村本裕二，清水教之 掲載誌名：静電気学会誌，Vol.39，No.6 発行所：一般社団法人静電気学会 掲載頁：pp. 258-262 発行年：2015 年
3.	題目：高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす水溶液中のイオンの影響 著者：<u>村上祐一</u>，村本裕二，清水教之 掲載誌名：静電気学会誌，Vol.40，No.2 発行所：一般社団法人静電気学会 掲載頁：pp.114-119 発行年：2016 年
4.	題目：高電界パルスによる大腸菌の殺菌－高電界パルス殺菌モデルによる生菌率の算出－ 著者：<u>村上祐一</u>，岡洋佑，村本裕二，清水教之 掲載誌名：静電気学会誌，Vol.40，No.4， 発行所：一般社団法人静電気学会 掲載頁：pp.199-205 発行年：2016 年
5.	題目：高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす水溶液中のアミノ酸の影響 著者：<u>村上祐一</u>，村本裕二，清水教之 掲載誌名：電気学会論文誌 A(基礎・材料・共通部門誌)， Vol. 136， No. 9 発行所：一般社団法人電気学会 掲載頁：pp. 568-573 発行年：2016 年

(2) 国際会議における発表 (4 件)

1. 【査読無】

題名 : Influence of temperature on sterilization of liquid by high electric field pulse

著者 : Yuichi Murakami, Yuji Muramoto, Noriyuki Shimizu

会議名 : 9th Internatinal Bioelectrics Symposium (Bioelectronics 2012)

開催期間 : 2012 年 9 月 5-8 日 (発表日:7 日)

掲載誌名 : 9th Internatinal Bioelectrics Symposium (Bioelectronics 2012)

発行所 : 不明

掲載頁 : なし (Paper No. P-2A-12)

発行年 : 2012 年

2. 【査読有】

題名 : Effect of temperature on survival rate in high electric field pulse sterilization

著者 : Y. Murakami, Y. Muramoto and N. Shimizu

会議名 : 2012 IEEE Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena (CEIDP 2012)

開催期間 : 2012 年 10 月 14-17 日 (発表日:15 日)

掲載誌名 : 2012 Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena

発行所 : IEEE

掲載頁 : pp. 259-262

発行年 : 2012 年

3. 【査読有】

題名 : Effect of Component of Liquid Sample on Sterilization of *E. coli* by High Electric Field Pulse

著者 : Y. Murakami, Y. Muramoto and N. Shimizu

会議名 : 2014 International Symposium on Electrical Insulating Materials (ISEIM 2014)

開催期間 : 2014 年 6 月 1-5 日 (発表日:3 日)

掲載誌名 : USB メモリ

発行所 : IEEE

掲載頁 : pp. 261-264 (VA21)

発行年 : 2014 年

4. 【査読有】

題名：Influence of Ion Concentration in Aqueous Solution on Sterilization of *E. coli* by High Electric Field Pulse

著者：Y. Murakami, Y. Muramoto and N. Shimizu

会議名：2014 IEEE Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena (CEIDP 2014)

開催期間：2014 年 10 月 19-22 日（発表日:20 日）

掲載誌名：2014 Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena

発行所：IEEE

掲載頁：pp. 228-231 (3C-1)

発行年：2014 年

(3) 国内学会における発表（14 件）

1. 【査読無】

題名：温度が高電界パルス殺菌に及ぼす影響

著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之

会議名：平成 24 年度電気関係学会東海支部連合大会

開催期間：2012 年 9 月 24－25 日（発表日:24 日）

掲載誌名：なし（CD-ROM のみ）

発行所：なし（CD-ROM のみ）

掲載頁：なし（CD-ROM のみ）(I2-2)

発行年：2012 年

2. 【査読無】

題名：パルス間隔が高電界パルスを用いた液体の殺菌に及ぼす影響

著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之

会議名：平成 25 年電気学会全国大会

開催期間：2013 年 3 月 20－22 日（発表日:20 日）

掲載誌名：平成 25 年電気学会全国大会講演論文集

発行所：社団法人電気学会

掲載頁：p. 201 (第 1 分冊) (1-165)

発行年：2013 年

3. 【査読無】 題名：高電界パルスによる牛乳中の大腸菌の殺菌 著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之 会議名：平成 25 年度電気関係学会東海支部連合大会 開催期間：2013 年 9 月 24－25 日（発表日:25 日） 掲載誌名：なし（CD-ROM のみ） 発行所：なし（CD-ROM のみ） 掲載頁：なし（CD-ROM のみ）(D3-7) 発行年：2013 年
4. 【査読無】 題名：液体培地中の成分が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響 著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之 会議名：平成 26 年電気学会全国大会 開催期間：2014 年 3 月 18－20 日（発表日:19 日） 掲載誌名：平成 26 年電気学会全国大会講演論文集 発行所：一般社団法人電気学会 掲載頁：p. 191 (第 1 分冊) (1-166) 発行年：2014 年
5. 【査読無】 題名：電解質濃度が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響 著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之 会議名：平成 26 年度電気・電子・情報関係学会東海支部連合大会 開催期間：2014 年 9 月 8－9 日（発表日:8 日） 掲載誌名：なし（CD-ROM のみ） 発行所：なし（CD-ROM のみ） 掲載頁：なし（CD-ROM のみ）(C2-9) 発行年：2014 年
6. 【査読無】 題名：水溶液中の溶質が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響 著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之 会議名： 開催期間：2015 年 3 月 24－26 日（発表日:26 日） 掲載誌名：平成 27 年電気学会全国大会講演論文集 発行所：一般社団法人電気学会 掲載頁：p. 122 (第 1 分冊) (1-101) 発行年：2015 年

7. 【査読無】 題名：水溶液中のアミノ酸が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響 著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之 会議名：第 46 回電気電子絶縁材料システムシンポジウム 開催期間：2015 年 9 月 3－5 日（発表日:4 日） 掲載誌名：第 46 回電気電子絶縁材料システムシンポジウム予稿集 発行所：一般社団法人電気学会 掲載頁：pp. 249-252 (MVP-19) 発行年：2015 年
8. 【査読無】 題名：高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす溶質の影響 著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之 会議名：平成 27 年度電気・電子・情報関係学会東海支部連合大会 開催期間：2015 年 9 月 28－29 日（発表日:29 日） 掲載誌名：なし（CD-ROM のみ） 発行所：なし（CD-ROM のみ） 掲載頁：なし（CD-ROM のみ）(H4-3) 発行年：2015 年
9. 【査読無】 題名：高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす水溶液中のアミノ酸濃度の影響 著者：村上 祐一，村本 裕二，清水 教之 会議名：平成 28 年電気学会全国大会 開催期間：2016 年 3 月 16－18 日（発表日:16 日） 掲載誌名：平成 28 年電気学会全国大会講演論文集 発行所：一般社団法人電気学会 掲載頁：p. 125 (第 1 分冊) (1-106) 発行年：2016 年
10. 【査読無】 題名：高電界パルス印加による牛乳中の大腸菌の生菌率 著者：山田 基生，村上 祐一，村本 裕二 会議名：第 47 回電気電子絶縁材料システムシンポジウム 開催期間：2016 年 8 月 31－9 月 2 日（発表日:1 日） 掲載誌名：第 47 回電気電子絶縁材料システムシンポジウム予稿集 発行所：一般社団法人電気学会 掲載頁：pp. 171-172 (MVP-6) 発行年：2016 年

11. 【査読無】

題名：水溶液中の成分の電氣的極性が高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす影響

著者：山田 基生, 村上 祐一, 村本 裕二

会議名：平成 28 年電気学会基礎・材料・共通文門大会

開催期間：2016 年 9 月 5－6 日（発表日:5 日）

掲載誌名：平成 28 年電気学会基礎・材料・共通文門大会

発行所：一般社団法人電気学会

掲載頁：p. 380 (5・P-27)

発行年：2016 年

12. 【査読無】

題名：高電界パルスによる大腸菌の核酸の漏出と生菌数の関係

著者：村上 祐一, 山田 基生, 村本 裕二

会議名：平成 28 年度電気・電子・情報関係学会東海支部連合大会

開催期間：2016 年 9 月 12－13 日（発表日:12 日）

掲載誌名：なし（CD-ROM のみ）

発行所：なし（CD-ROM のみ）

掲載頁：なし（CD-ROM のみ）(K1-2)

発行年：2016 年

13. 【査読無】

題名：非接触型殺菌槽を用いた高電界パルスによる大腸菌の殺菌

著者：山田 基生, 村上 祐一, 村本 裕二

会議名：平成 28 年度電気・電子・情報関係学会東海支部連合大会

開催期間：2016 年 9 月 12－13 日（発表日:12 日）

掲載誌名：なし（CD-ROM のみ）

発行所：なし（CD-ROM のみ）

掲載頁：なし（CD-ROM のみ）(K1-3)

発行年：2016 年

14. 【査読無】

題名：高電界パルス殺菌モデルを用いた水溶液中の溶質濃度を考慮した生菌率の算出

著者：村上 祐一，山田 基生，村本 裕二

会議名：静電気学会全国大会

開催期間：2016 年 9 月 29—30 日（発表日:29 日）

掲載誌名：静電気学会講演論文集 2016

発行所：一般社団法人静電気学会

掲載頁：pp.11-14 （29aB-3）

発行年：2016 年

謝辞

本研究の円滑な遂行ならびに本論文の作成にあたって多くの方からのご指導，ご助言を賜りました。

本研究に出会えたきっかけを与えて頂き，その遂行にあたりまして，学部4年から6年間，御指導，御鞭撻を賜りました名城大学 理工学部 電気電子工学科 村本裕二 教授に心から感謝いたします。また，本論文をまとめるにあたり数々の有益なるご教示および激励を頂きました名城大学 理工学部 電気電子工学科 多和田昌弘 教授ならびに伊藤昌文 教授に深く感謝申し上げます。

学部4年から博士後期課程2年次の2月までの4年11ヶ月間，研究の楽しさから厳しさまで数多くのことをご教授して頂き，また研究の遂行にあたり御指導，御鞭撻して頂きました故 清水教之 教授に心から感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり，学部4年次から6年間，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 応用生物化学科 加藤雅士 教授に深く感謝致します。また，博士前期課程1年次から5年間，本研究を進めるための数々の技術的御指導および御助言，さらに研究者としての心構えをご教授していただいた名城大学 農学部 応用生物化学科 志水元亨 助教に深く感謝致します。

本研究に対して多くの御助言を頂きました，本学博士後期課程修了生 奥村賢直 氏(平成25年度修了)，土屋龍平 氏(平成27年度修了)ならびに本学博士前期課程修了生 岡洋佑 氏(平成22年度修了)に深く感謝致します。また，本研究を進めるにあたり実験に協力いただきました，博士前期課程1年の山田基生 氏，学部4年の佐藤拓直 氏ならびに山本光希 氏，さらに本研究室卒業生の島林知輝 氏(平成24年度卒業)，安達駿佑 氏(平成25年度卒業)，大西勝也 氏(平成26年度卒業)，峰田莉子 氏(平成27年度卒業)，山田拓弥 氏(平成27年度卒業)に深く感謝いたします。

様々な事柄において御指導して下さった名城大学の諸先生方，本研究を進めるにあたり，様々な面で御協力を頂きましたエネルギー・環境研究室，応用微生物学研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。

最後に，研究者としての人生を歩むことを理解し，力強く支えてくれた父 一義，母 美子に心から感謝いたします。

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
エネルギー・環境研究室
143441504 村上祐一