

9 6 4 7 エタノールの殺菌作用への食塩の併用効果とその機構について

助成研究者：別府 道子(東京家政学院大学 家政学部)
共同研究者：片平 理子(東京家政学院大学 家政学部)

今までのDSC, NMR による実験結果から、食塩加エタノール溶液のエタノール、水、食塩の3成分間の相互作用で生じた新たな状態と殺菌力の発現、強弱との相関について示唆を得た。

本研究では、種々の濃度のエタノール溶液の大腸菌への殺菌作用に対する食塩の併用効果を多面的に実験をし、次に、食塩加エタノール溶液との接触による大腸菌の形態学的変化を究明する事により、エタノールの殺菌作用への食塩の併用効果の基礎的データと、さらに、その機構について検討した。

5%、10%、15%、20%のエタノールの殺菌作用に対する2%から16%までの食塩の併用効果の実験結果から、エタノール濃度が5%のように低い場合は食塩が高濃度でも併用効果はあまり認められなかったが、エタノール濃度が10%、15%と高くなると、食塩濃度が高いほどその併用効果が著しかった。エタノールの濃度が高いほど、エタノール分子に対する水分子の数が少なくなる。このような場合、添加された食塩の水和、すなわち、塩類のイオンによる選択的水和に水分子が奪われ、エタノールが高濃度の溶液の状態となり、併用効果が顕著に現れたと推測された。

次に、殺菌作用が認められない濃度のエタノール溶液に接触中の大腸菌に、途中食塩を添加すると生菌数が減少し続けた。これから、食塩の併用による殺菌力の発現は食塩添加による事がわかった。

食塩加エタノール溶液の大腸菌の形態への影響を超薄切片法による電子顕微鏡写真で検討したが、エタノール15%処理の場合、著しい原形質分離を起こしていたが、10%食塩添加15%エタノール処理の場合は、表層構造にも変化が認められず、超薄切片像は対照に近かった。

食塩のイオンの選択的水和によって引き起こされる溶液の状態、構造と殺菌作用との相関と、食塩加エタノールの殺菌作用の大腸菌の表層構造、特に細胞膜の物性(例えば相転移温度)および、大腸菌の膜の物性にかかわる膜酵素活性に対する影響を検討する事を今後の課題としたい。

9647 エタノールの殺菌作用への食塩の併用効果とその機構について

助成研究者：別府 道子(東京家政学院大学 家政学部)

共同研究者：片平 理子(東京家政学院大学 家政学部)

1. 研究目的

従来から食塩、エタノールはそれぞれ食品に対して防腐効果があり、幅広く利用されている。消費者の食品への健康志向はつよく、生活習慣病とも言われる成人病の予防のためにも低塩、低糖、低カロリーの食品の開発のニーズがある。それへの対応の一つとしてエタノールの殺菌作用への食塩の併用効果を応用して食品の保存性を維持、向上させる事も行われているが、エタノールと食塩を併用すると、防腐効果、殺菌作用が強くなる現象の機構はほとんど解明されていない。

エタノールは一次作用点の一つとして微生物細胞の表層構造、特に細胞膜に種々の影響・変化をあたえ、特に原核生物の細菌にとって生命現象維持に重要な細胞膜の機能に支障を、さらに、細胞内部で生体高分子に種々の影響・変化をもたらすとされている。エタノールの殺菌作用の利用は、多くの場合、水溶液状態で用いられているが、エタノール分子と水分子、その他の分子との間の相互作用で新たな状態が生じ、この事が微生物の表層構造へより強く影響し、殺菌作用の発現と強弱の要因の1つとなるのではないかとの推論に基づき継続して実験している。

今までの実験から、食塩加エタノール溶液の状態を多面的により適確に把握するために、示差走査熱量計による熱的挙動、NMR法による ^{17}O -NMRスペクトルの半値幅、 ^1H -NMRの化学シフトを測定し、エタノール、水、食塩との間の相互作用で生じた新たな状態と殺菌力の発現、強弱との相関について示唆を得た^{1), 2)}。

本研究では、種々の濃度のエタノール溶液の殺菌作用に対する食塩の併用効果を多面的に実験をし、次に、食塩加エタノール溶液との接触による大腸菌の形態学的変化を究明する事により、エタノールの殺菌作用への食塩の併用効果の基礎的データと、さらに、その機構について検討した。

2. 研究方法

2.1 エタノールの殺菌作用に対する食塩の併用効果

あらかじめ30℃にした種々の濃度の食塩加エタノール溶液に、前培養した大腸菌の液体培養液を、0.1 ml加え1分後または適時サブリッジし、滅菌生理的食塩水を用いて段階希釈し直ちにスパイラルシステムにより平板ブイオン培地に表面塗抹し、37℃、24時間培養後、生菌数を測定し、残存率を算出した。

殺菌作用のない濃度のエタノールへの食塩添加の効果は、前培養した大腸菌を加えた4分後に、滅菌した食塩溶液を添加し適宜サブリッジし、残存した生菌数を測定した。

エタノールの殺菌作用に対する食塩の併用効果の経日的変化は、所定のエタノール、食塩加エタノール溶液を調製し、20℃に29日間放置し、適宜サブリッジし、前培養した大腸菌に対する殺菌作用を求めた。

2.2 食塩加エタノール溶液処理の大腸菌の形態に及ぼす影響

細胞の表層構造、細胞内成分の移動、局在を観察し、形態学的変化の有無、相違を調べるために、対照、15%エタノール溶液、10%食塩添加の15%エタノール溶液にそれぞれ大腸菌を接触させ、常法の超薄切片法による透過電子顕微鏡(TEM)写真を得た。

3. 試験結果と考察

3.1 エタノールの殺菌作用への食塩の併用効果

5%、10%、15%のエタノールの殺菌作用に対する10% NaClの併用効果の経時的变化をFig. 1に示した。エタノール単独では5%、10%、15%の濃度では殺菌効果は認められなかった。

5%の低濃度のエタノールでは食塩の併用効果が認められなかったが、15%の高濃度のエタノールでは最初の測定時である接触時間5分間でも著しい併用効果があった。このような傾向は接触時間を20分まで延長しても変わらなかった。

3.2 種々の濃度のエタノールの殺菌作用への種々の濃度の食塩の併用効果

5%、10%、15%、20%のエタノールの殺菌作用に対する2%から16%までの食塩の併用効果をFig. 2に示した。エタノールの殺菌力に対する食塩の併用効果はエタノール濃度が5%のように低い場合は食塩が高濃度でも添加効果はあまり認められなかったが、エタノール濃度が10%、15%と高くなると、食塩濃度が高いほどその併用効果が著しかった。

種々のエタノール濃度におけるエタノール1分子にたいする水分子の数の計算値をFig. 3に示した。高濃度になればなる程、エタノール分子に対する水分子の数が少なくなり、このとき、食塩の併用効果が著しく現れた。

例えば、食塩の殺菌作用に対する併用効果が、エタノール濃度が10%より、20%の場合のほうが著しく認められたが、計算上、エタノール1分子に対し、水が約30分子である10%エタノールに比べ20%エタノールでは約13分子しかなく、エタノール濃度が高くなればなる程、水分子の数が著しく減っている。このような場合、添加された食塩の水和、すなわち、塩類のイオンによる選択的水和に水分子は奪われ、20%の濃度がより高濃度のアルコール溶液の状態となり、併用効果が顕著に現れたと推測された。

このように食塩のイオンの選択的水和の影響が、高い濃度のエタノールに高い濃度の食塩を添加した場合現れたのは、少ない水を、高濃度の食塩により、より多く引っ張られるからであり、その結果、エタノール濃度がさらに高くなり、それに対応してエタノールと水の形成する構造も変化し、殺菌効果が顕著になったと示唆される。西信之ら³⁾は、水分子・エタノール分子の集合によって形成されるエタノール・水混合クラスターのアルコール濃度によって異なる構造モデルを報告している。それによるとエタノール分子と水分子がおおよそ1対1になる重量で70%のエタノールの構造化したクラスターは、細胞膜の脂質層におおきな影響を与え、殺菌効果を示すと提唱している。

また、塩類のイオンによる選択的水和は、タンパク質の溶液に多量の塩類を加えると、その溶解度が減少する塩析効果に類似している。塩析効果は塩類の添加によって多量に生じたイオンが水和しているため、溶媒の活動度が減少し、溶解度を低下させるものであると考えられている。

次に、殺菌作用が認められない濃度のエタノール溶液に接触中の大腸菌に、途中食塩を添加するとどの様になるかを検討した。Fig. 4 に示すように、22.5%のエタノールとの2分間の接触でも、生菌数は減少しなかったが、そこに食塩を添加すると希釈によりエタノール濃度としては15%に下がるが、エタノールの殺菌作用に対する食塩の併用効果により生菌数が減少し続けた。

22.5%エタノールで予め2分間接触した影響が残るとしても、15%エタノールに8.3%食塩の併用による殺菌力の発現は食塩添加による事がわかった。

3.3 食塩加エタノール溶液の経日的殺菌作用の変化

泡盛、蒸留酒の熟成過程におけるエタノールおよび水の分子会合状態の変化について玉城⁴⁾大河内⁵⁾が報告しているが、食塩加エタノール溶液調製後の時間経過にともなう殺菌力の変化の有無を検討した。

食塩加エタノール溶液を調製後、常温に放置し適時サンプリングし、常法の実験方法で残存率を求め、Fig. 5 に示した。その結果、約1か月の実験期間では、大腸菌に対する殺菌作用は低濃度のエタノールでは殆ど認められず、高濃度では著しく、その傾向は常温放置29日間で変化しなかった。すなわち、食塩加エタノール溶液調製後、大腸菌に対する殺菌作用は経日的変化は1か月間では認められなかった。

3.4 食塩加エタノール 溶液の大腸菌の形態に対する影響

大腸菌の細胞構造の形態学的な変化の有無を検討するため、対照、エタノール 15%、食塩10%添加エタノール 15%処理の大腸菌の超薄切片法による電子顕微鏡写真を得た。エタノール 15%処理の場合、細胞壁と細胞質膜の間隔が広がり、著しい原形質分離を起こしているが、もっと浸透圧が高い食塩加エタノール 処理の場合は原形質分離がむしろ抑えられ、また、細胞壁・細胞質膜の表層構造にも変化がなく、細胞内容物の漏出も観察されず、対照の細胞の形態・状態に近い。

エタノール の殺菌作用への食塩の併用効果の測定時には、溶液に大腸菌を接触後、直ちに滅菌生理的食塩水で段階希釈し、プレック培地に植えるので エタノール 15%処理の場合、接触後に原形質分離しても元の状態に戻る原形質復帰が起こり、残存率の減少がみられなかったと推論される。

一方、15%エタノール に10%食塩をさらに加えた食塩加エタノール 処理の場合、エタノール、食塩の浸透圧による原形質分離が認められなかった。動物の細胞膜の主成分であるホスファチジルコリン(PC)のリポームを用いた実験結果から、エタノール がPCリポーム の二分子層の一部を指組み構造にし、物質の透過を促すと小松ら⁶⁾が報告していた。このような構造上の変化に起因すると考えられる細胞内容物の漏出も認められなかった。しかし、エタノールの殺菌作用への食塩の併用効果は著しく大腸菌は死滅していた。

一般的に細菌の形態は培養条件、菌令によって変化する上、さらに超薄切片作成の過程と殺菌力の測定実験との条件の微妙な差によって切片像が異なってくることを考慮すると、顕微鏡写真をさらに回を重ねなければならないと思う。今回はしたがって、細菌の内部構造の変化まで言及する事は難しかった。

さらに検討の余地を残すが、食塩加エタノール 処理の場合は形態学的な可視的な変化は認められなかったが、残存率は著しく低下したのは、むしろ表層構造、特に細胞膜の物性に变化をもたらし、その波及的影響として膜酵素活性なども低下した事に起因する可能性が示唆され、この点についての検討を今後の課題としたい。

4. 今後の課題

今後も 大腸菌のエタノール の殺菌作用に対する食塩の併用効果に顕著の差が認められる条件すなわち、エタノール 濃度10%、20% と食塩5%、10%の組み合わせに絞り、下記のような実験を行い、エタノール の殺菌作用に対する食塩の併用効果の機構の解明をする。

(1) 溶液状態を多様な方法でとらえ、食塩のイオンの選択的水和によって引き起こされる溶液の状態、構造と殺菌作用との相関について。

(2) 大腸菌の表層構造(特に細胞膜)の物性(例えば相転移温度)への食塩加エタノールの

影響を、大腸菌の細胞膜の主要成分ホスファチジルエタノールアミン (PE)、または生菌で実験する。さらに、大腸菌の膜の物性に関わりのある膜酵素活性に対する食塩加エタノールの影響を究明する。

5. 文献

- 1) 別府道子、中島雅子、片平理子：食衛誌. 31, 414~419(1990)
- 2) 別府道子、片平理子：食衛誌. 33, 429~436(1992)
- 3) 西信之：化学総説 溶液の分子論的描像 p. 201~212(1995)
- 4) 玉城 武、松下和弘、桶岡克哉、高宮義治：農化. 60, 191~197(1986)
- 5) 大河内正一、石原義正、稲葉 慎、上平 恒：同上 69, 11~15(1995)
- 6) 小松裕明、岡田敏史：膜シンポジウム No. 7(1995)Kyoto

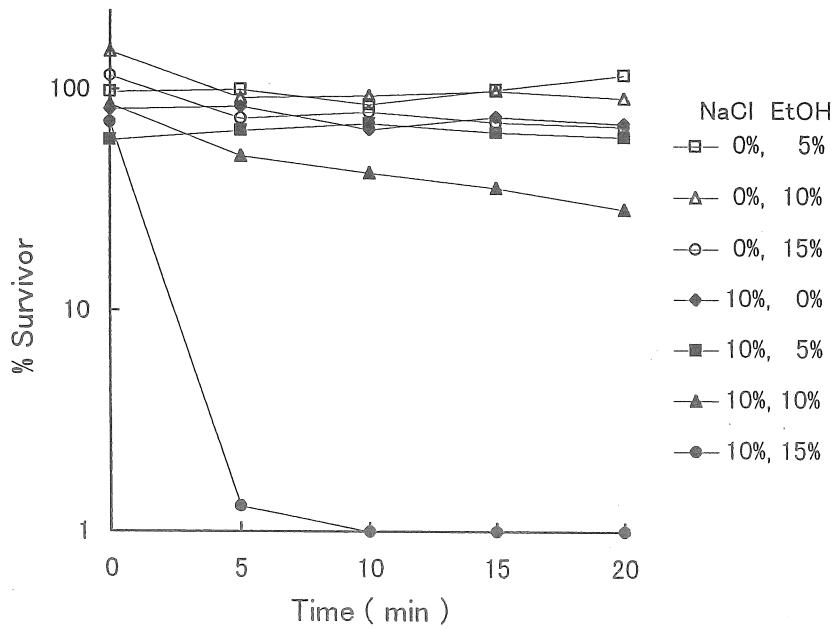


Fig. 1 Additive effects of NaCl on bactericidal action of ethanol.

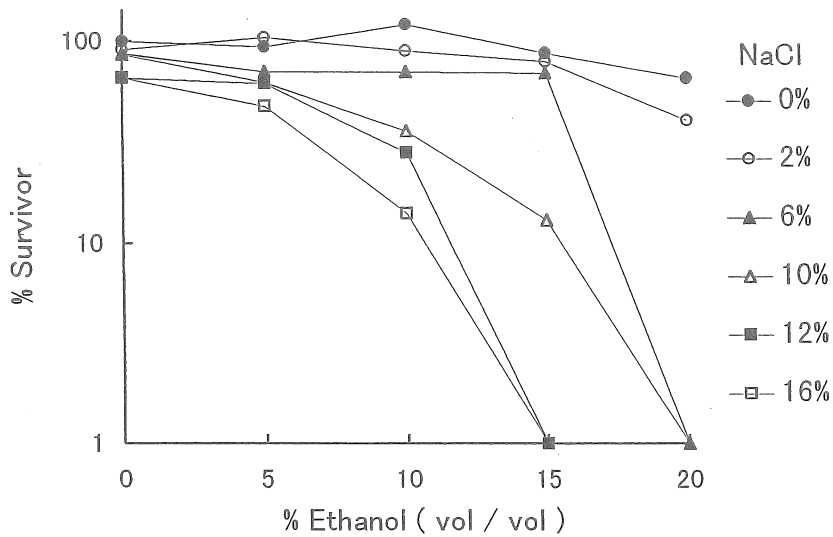


Fig. 2 Additive effects of various concentrations of NaCl on bactericidal action of ethanol.

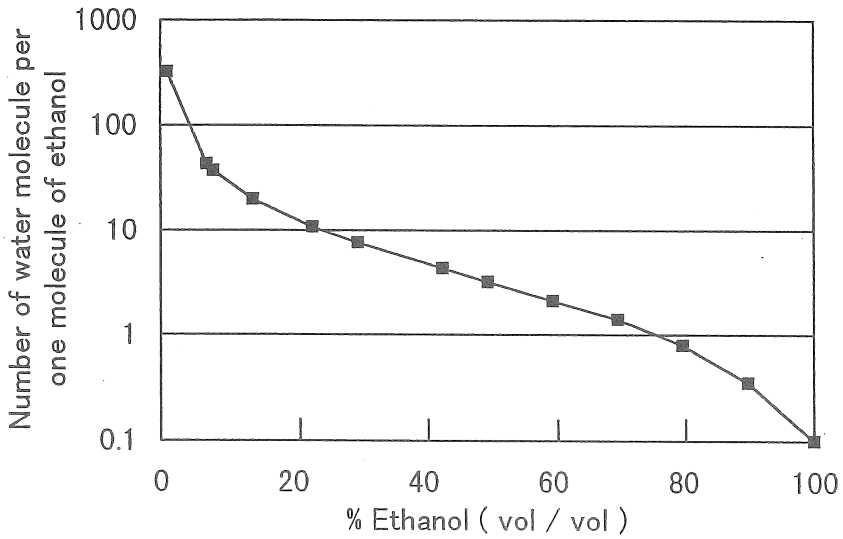


Fig. 3 The calculated number of water molecules per one molecule of ethanol.

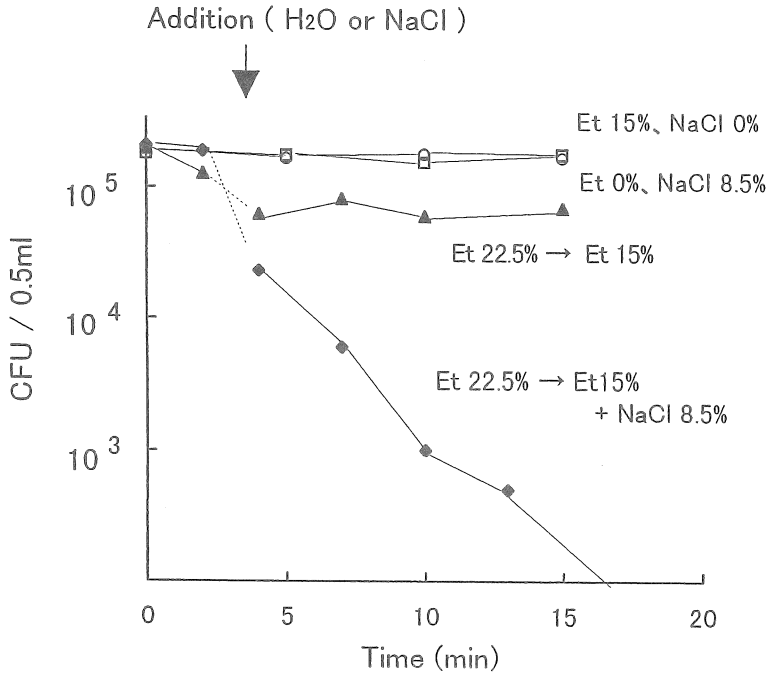


Fig. 4 Additive effects by the addition of NaCl on bactericidal action of ethanol.

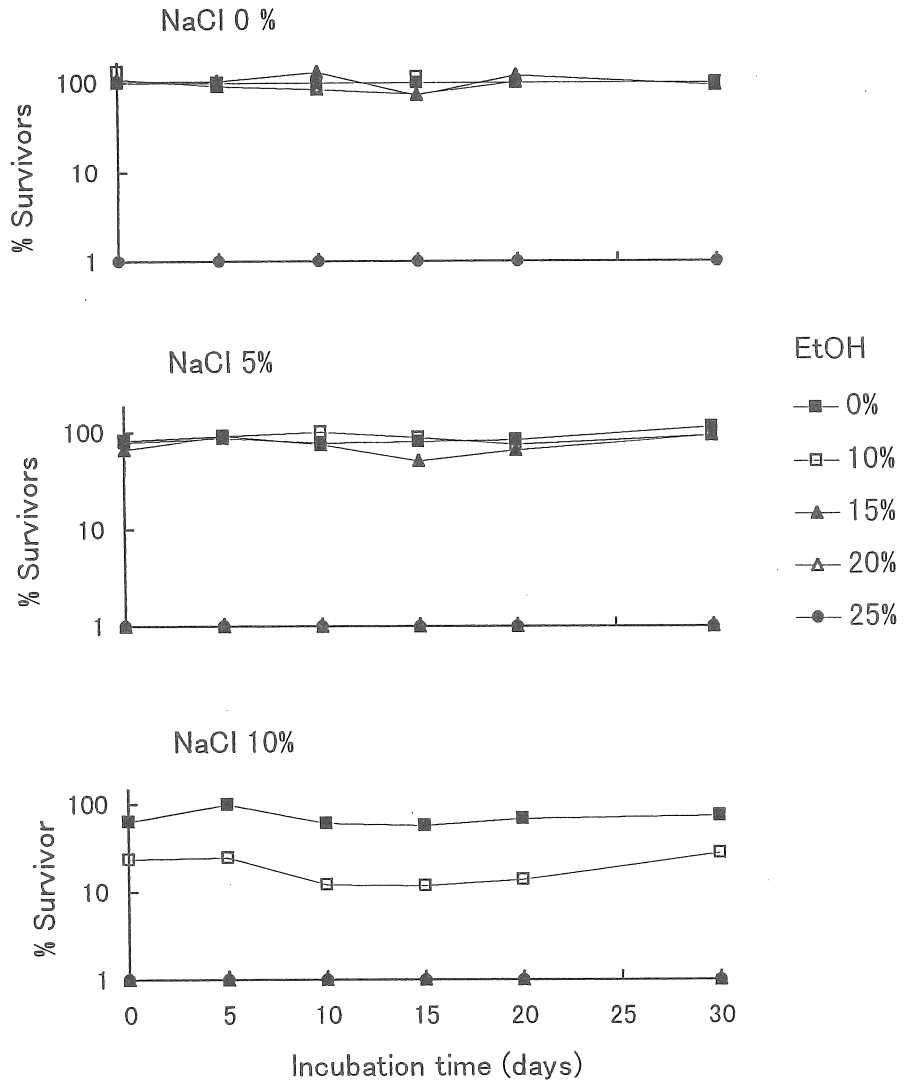


Fig. 5 The time-course of bactericidal action of NaCl-added ethanol.

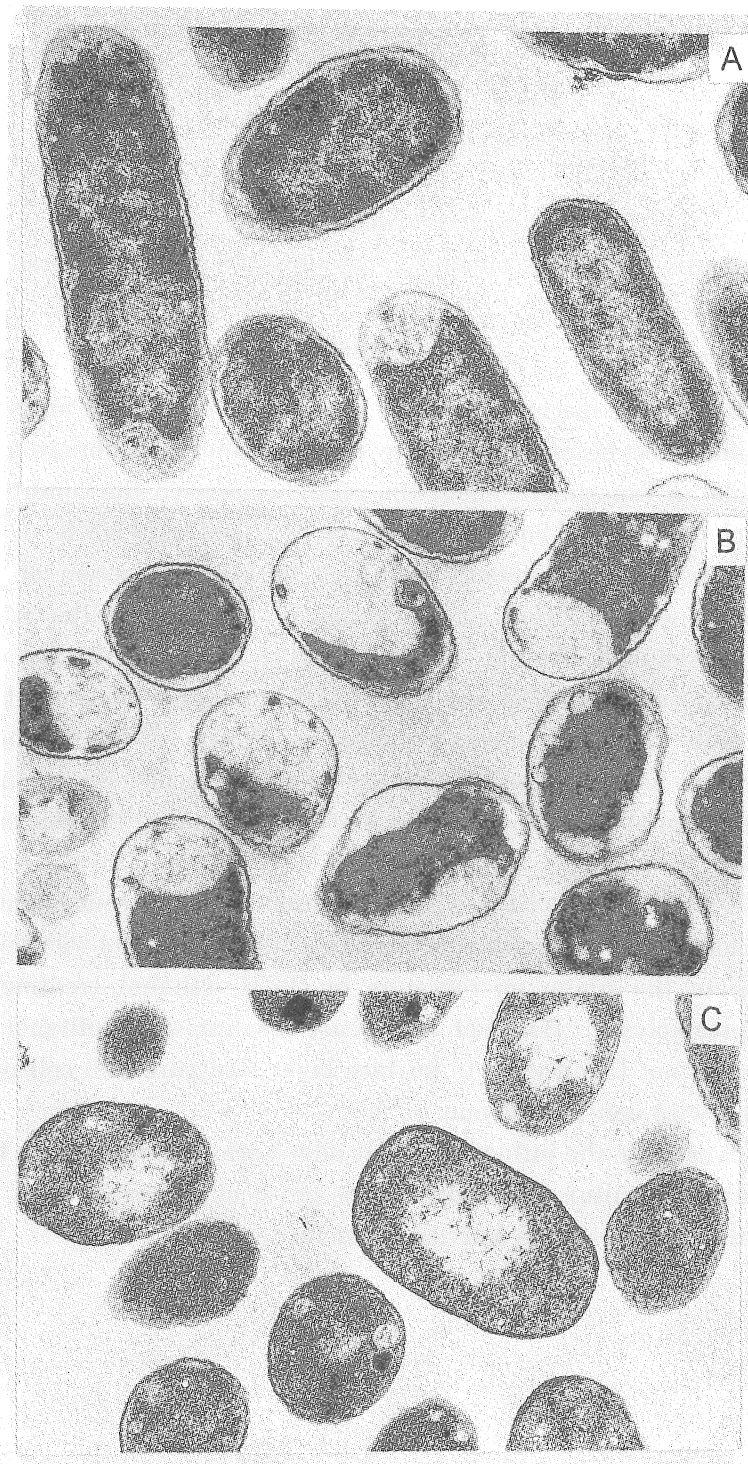


Fig. 6 Typical structures of *E. coli* cells shown by TEM.
A. Control; B. Treated with 15% ethanol; C. Treated with NaCl-added ethanol (15% ethanol, 10% NaCl).

Mechanisms of Additive Effects of Salt on Bactericidal Action of Ethanol.

Michiko BEPPU and Riko KATAHIRA

Faculty of Home Economics, Tokyo Kasei Gakuin University

Summary

We investigated the mechanism of the phenomenon that both antiseptic effect and bactericidal effect became stronger by using ethanol in combination with salt. We have made an experiment about the relation between the condition of salt-added ethanol solution and bactericidal action with DSC and NMR.

This time, as the experimental result of bactericidal action of salt-added ethanol solution with different concentration on coliform bacillus, it was made clear that the combined effect of salt was small in low concentration of ethanol, but remarkable combined effect was shown with the higher concentration of both ethanol and salt. This reason was supposed as follows. If the number of water molecules became fewer, compared with that of alcohol molecules, the influence of selective hydration of salt appeared much strongly, making the concentration of alcohol higher.

When salt was added, on the way, to ethanol with low concentration which showed no bactericidal action, the bactericidal action of ethanol was revealed.

According to the photo micrographs by TEM, ethanol treatment caused remarkable plasmolysis. However, in the case of saline-added ethanol treatment, any change was not found even in surface layer structure and cell picture was similar to that with non-treated one.

We will investigate the influence of salt-added ethanol solution on the surface layer structure of bacillus, especially on the physical property of cell membrane and membrane-bound enzyme activity in the future.