

助成番号 0749

微生物の高圧死滅挙動に及ぼす添加塩の影響

藤井 智幸

新潟薬科大学応用生命科学部食品科学科

概要 食品の品質低下を抑制しながら微生物を殺菌することが可能な非加熱殺菌法のひとつが高圧処理である。食品中の微生物は必ず共存物質と共に存在するので、共存物質を添加した状態での死滅挙動を知ることが重要である。そこで、本研究では微生物の高圧死滅挙動に及ぼす添加塩の影響を実験的に検討することを目的とした。微生物に共存させる添加塩として、水和半径の異なる一価の陽イオンをもつ NaCl および KCl を選び、大腸菌を供試菌として高圧死滅挙動を解析した。

0.1～0.3 mol/l の濃度域に調整した NaCl または KCl 水溶液に大腸菌 K12 株を懸濁し、250～400 MPa (20℃) の条件で高圧処理を施した。処理後の大腸菌懸濁液の生菌数から死滅挙動を解析した。いずれの共存塩、濃度、圧力条件においても大腸菌の高圧死滅挙動は一次反応に従うことが示された。高い圧力条件での大腸菌の死滅速度は、等張液の濃度で最小となり、高張液側あるいは低張液側にシフトするに連れて増加していくことが示された。これらの結果から、高張液側および低張液側の浸透圧ストレスの増加に伴い死滅速度が増加した可能性が示唆された。また、共存塩の種類による死滅速度定数への影響を比較したところ、同一の濃度および圧力条件では、死滅速度定数が NaCl を添加した場合よりも KCl を添加した場合の方が小さい値となり、陽イオンの違いが死滅挙動に影響することが示された。

死滅速度定数の圧力依存性から活性化体積および前指数因子を算出した。同一の塩濃度条件では、NaCl を共存した場合の活性化体積の絶対値が KCl を共存させた場合よりもやや大きい値を示す傾向が認められ、高圧死滅反応における活性化状態への体積変化の大きさがイオン種に依存することが示唆された。この依存性は共存イオンの水和半径の大きさに起因するものと考えられた。次に、それぞれの共存塩について、濃度と活性化体積の関係を解析したところ、いずれの塩においても 0.20 mol/l の濃度で活性化体積の絶対値は極小値を示し、0.20 mol/l 以下では活性化体積の絶対値が濃度依存的に減少し、0.20 mol/l 以上では増加した。前指数因子の値に関しても、共存塩の種類にかかわらず、約 0.20 mol/l の濃度で極大値を示した。以上の結果から、大腸菌の高圧死滅反応において共存塩濃度 0.2 mol/l を境に死滅メカニズムが異なることが示された。

1. 研究目的

食品製造において殺菌技術は食品の安全性を確保するためにきわめて重要である。殺菌技術として現在最もよく用いられているのが加熱殺菌法である。しかし、一般に加熱処理を食品に施すと脂質の酸化やビタミン類の破壊などの品質劣化が問題となることが多く、成分劣化が少ない非加熱殺菌技術が注目されている。

食品に 100 MPa 以上の高い静水圧を加える高圧処理

は、加熱処理の際に頻発する栄養成分の損失などの品質低下を抑制しつつ殺菌が可能である。高圧処理の加工技術としての利点として、圧力の伝播が瞬時であることが挙げられる。「加熱」では殺菌が完了するまでに中心部と表面部に温度差が生じて調理にむらが出てしまうのに対し、「加圧」では調理むらが生じない。高圧処理のこのような特徴は特に固体食品を対象にした場合には有利である。

こうした高圧処理の持つ利点から非加熱殺菌法としての高圧殺菌の研究が活発に行われてきた¹⁾。食品の殺菌においては、存在する微生物の種類だけでなく、温度、pH、塩や糖質濃度などの様々な要因が関与している。したがって、同じ微生物を対象とした場合であっても、食品の種類により殺菌に必要な圧力条件が異なるため、個々の食品について殺菌条件を検討する必要がある。

食品中に存在する微生物の高圧死滅メカニズムを解明する上で、比較的シンプルな共存物質を添加したモデル系での死滅挙動の解析は重要である。そこで、本研究では微生物の高圧死滅挙動に及ぼす添加塩の影響を実験的に検討することを目的とした。微生物に共存させる添加塩として、水和半径の異なる一価の陽イオンをもつ NaCl および KCl を選び、大腸菌を供試菌として高圧死滅挙動を解析した。

2. 研究方法

2.1 使用菌株および培養方法

供試菌として大腸菌 *Escherichia coli* K12 株を用いた。培地には 200 ml の LB 培地 (Bacto Tryptone, 10 g/l; Bacto Yeast Extract, 5 g/l; 塩化ナトリウム, 10 g/l; pH 7.2) を用い、500 ml 容の坂口フラスコを使用して 37°C で 24 時間振盪培養を行った。得られた培養液を用いて大腸菌懸濁液を調製した。

2.2 大腸菌懸濁液の調製

0.074、0.114、0.145 (生理食塩水の濃度)、0.2、0.24、0.29 mol/l の NaCl および KCl 水溶液を調製した。それぞれの水溶液 180 ml に対して、大腸菌の培養液を 20 ml 添加したものを大腸菌懸濁液とした。

2.3 高圧処理

高圧処理にはピストン式高圧処理装置 (神戸製鋼所製; 内径 60 mm, 深さ 180 mm; 加圧方式, ピストン直圧式; 圧力媒体, 水) を使用した。処理温度は 20°C とし、処理圧力に達してからの時間を圧力保持時間とした。

2.4 生菌数の測定

大腸菌懸濁液を生理食塩水 (0.85% NaCl 水溶液; 0.145 mol/l に相当) を用いて希釈し、希釈液 1 ml をコンパクトドライ「ニッスイ」EC (日水製薬) に接種し、37°C で 24 時間静置培養した。出現した青色コロニーの数から生菌数を求めた。

3. 実験結果および考察

3.1 死滅速度定数におよぼす共存塩の影響

大腸菌培養液を 0.074~0.29 mol/l の濃度に調整した NaCl または KCl 水溶液に懸濁し、250 MPa~400 MPa の圧力条件で高圧処理を行った。圧力保持時間を 0~300 s の間で変化させそれぞれの生菌数を求めた。Fig. 1 には、0.145 mol/l の NaCl 水溶液に懸濁した大腸菌の生存率と圧力保持時間の関係を図示した。

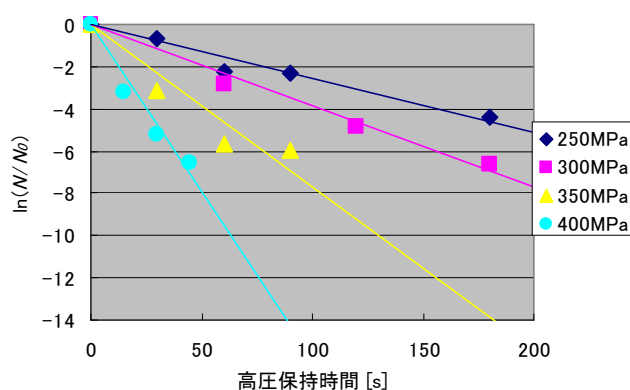


Fig. 1. NaCl 0.145 mol/l 水溶液に懸濁した大腸菌の高圧死滅曲線

全ての圧力条件において、圧力保持時間 t と大腸菌の生存率 N/N_0 (N , 時間 t での生菌数; N_0 , 時間 0 s での生菌数) の対数の間には直線関係が認められた。実験を行った全ての条件において、圧力保持時間と生存率の対数の間には、同様の直線関係が認められた。これらのことから、大腸菌の高圧死滅挙動は一次反応式に従うことが示され、式 (1) から死滅速度定数 k を求めた。

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kt} \quad (1)$$

各共存塩について、塩濃度と死滅速度定数の関係を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。共存塩として NaCl を添加した場合、250、300 MPa の圧力条件では塩濃度の変化に伴う死滅速度定数の顕著な変動は認められなかったが、350 MPa の圧力条件では 0.145 mol/l (生理食塩水の濃度) において死滅速度定数が最小値をとり、高塩濃度あるいは低塩濃度に変化するにつれて死滅速度定数が増加する傾向を示した (Fig. 2)。

一方、共存塩として KCl を添加した場合、300、350 MPa の圧力条件では塩濃度の変化に伴う死滅速度定数の顕

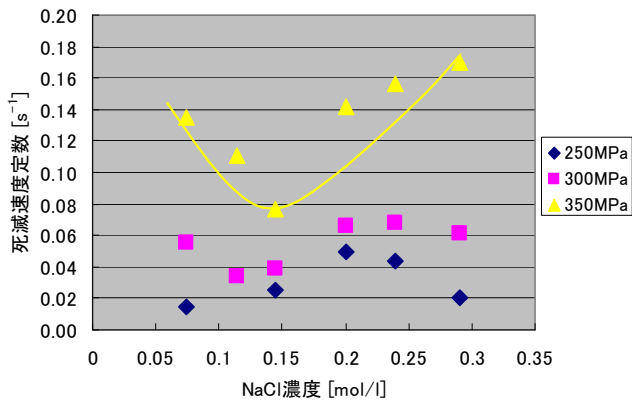


Fig. 2. 各圧力条件における NaCl の濃度と死滅速度定数の関係

著な変動は認められなかったが、400 MPa の圧力条件では、NaCl の場合と同様に 0.145 mol/l において死滅速度定数が最小値をとり、高塩濃度あるいは低塩濃度に変化するにつれて死滅速度定数が増加する傾向を示した (Fig. 3)。これらの結果から、高い圧力条件での大腸菌の死滅速度は、等張液の濃度で最小となり、高張液側あるいは低張液側にシフトするに連れて増加していくことが示された。高張液側あるいは低張液側の塩濃度条件では、浸透圧によるストレスが細胞に作用することが考えられる。低い圧力条件では、浸透圧ストレスに対する適応反応が機能することで、圧力による死滅挙動に顕著な影響は見られなかったものと考えられる。しかし、高い圧力条件では、適応反応が機能しきれず、高張液側および低張液側の浸透圧ストレスの増加に伴い死滅速度が増加した可能性が考えられる。

また、共存塩の種類による死滅速度定数への影響を比較したところ、同一の濃度および圧力条件では、死滅速度定数が NaCl を添加した場合よりも KCl を添加した場合の方が小さい値となった。この結果から、陽イオンの違いが死滅挙動に影響することが示された。一般に、細胞は細胞内のカリウムイオンの濃度を高く (通常 0.2 mol/l 以上)、ナトリウムイオンの濃度を低く (通常 0.01 mol/l 以下) 維持している²⁾。受動拡散により細胞外から細胞内にカリウムイオンが侵入してもダメージは少ないが、ナトリウムイオンが細胞内に侵入すると、能動輸送でナトリウムを細胞外に排出しなくてはならない。このことが、NaCl を添加した場合よりも KCl を添加した場合の方が小さな死滅速度定数を示した結果を導いた可能性が考えられる。

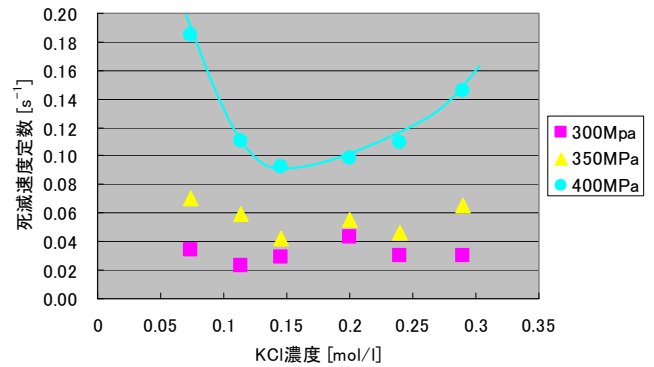


Fig. 3. 各圧力条件における KCl の濃度と死滅速度定数の関係

3. 2 活性化体積におよぼす共存塩の影響

各共存塩について各塩濃度条件での死滅速度定数の圧力依存性を解析した。Fig. 4 には 0.145 mol/l の NaCl 水溶液に懸濁した大腸菌の死滅速度定数の自然対数と処理圧力の関係を図示した。

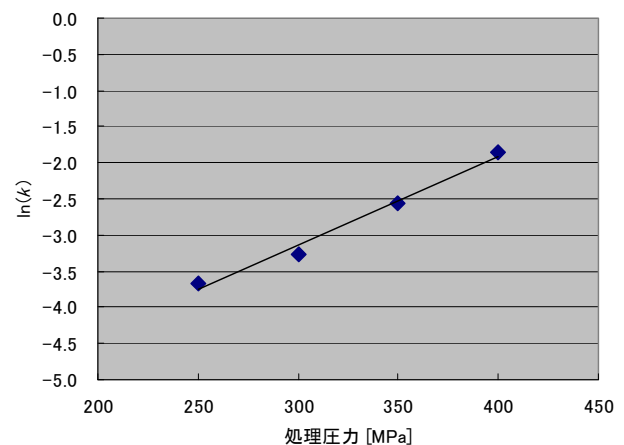


Fig. 4. NaCl 0.145 mol/l 水溶液に懸濁した大腸菌の死滅速度定数 k の圧力依存性

この条件を含め、実験した全ての条件について、死滅速度定数の自然対数と処理圧力との間に直線関係が認められた。直線の傾きから式 (2) を用いて活性化体積 ΔV^* [ml/mol] を求めた。

$$k = k_0 e^{-\frac{P\Delta V^*}{RT}} \quad (2)$$

ここで、 k_0 は前指数因子 [s^{-1}]、 R は気体定数 [$J/K \cdot mol$]、 T は絶対温度 [K] である。各共存塩について各塩濃度の活性化体積の絶対値 $|\Delta V^*|$ [ml/mol] を Fig. 5 に示した。

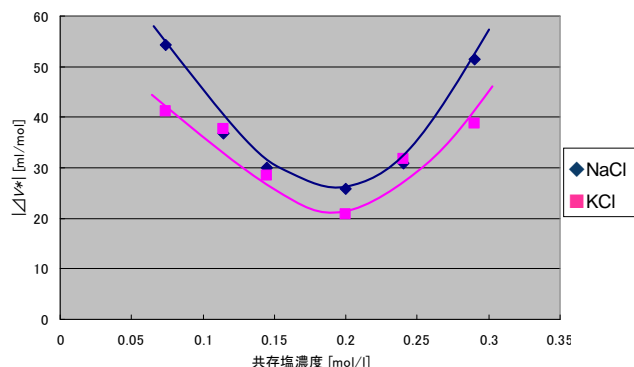


Fig. 5. 各共存塩の活性化体積に及ぼす影響

同一の濃度条件では、NaCl を共存した場合の活性化体積の絶対値が KCl を共存させた場合よりもやや大きい値を示す傾向が認められた。このことから、大腸菌の死滅反応において、NaCl を共存させた場合には KCl を共存させた場合よりも大きな体積変化が必要であることが示唆される。このことは、ナトリウムとカリウムの水和半径の違いや水和構造に対する影響の違いに起因している可能性が考えられる。

それぞれの共存塩について、濃度と活性化体積の関係を解析したところ、いずれの塩においても 0.20 mol/l の濃度で活性化体積の絶対値は極小値を示し、0.20 mol/l 以下では活性化体積の絶対値が濃度依存的に減少し、0.20 mol/l 以上では増加した。以上の結果から、大腸菌の死滅反応速度における活性化体積の絶対値はイオン種に依存するが、極小値を与える濃度にはイオン種の依存性がないことが示された。

3. 2 前指数因子におよぼす共存塩の影響

各共存塩について各塩濃度の前指数因子 k_0 [s^{-1}] の値を Fig. 6 に示した。共存塩の種類にかかわらず、約 0.20 mol/l の濃度で前指数因子の値は極大値を示し、0.20 mol/l 以下では濃度依存的に増加し、0.20 mol/l 以上では減少した。共存塩の種類に依存した明瞭な前指数因子の値の違いも認められなかった。

前指数因子は、式 (2) から圧力が 0 MPa であるときの死滅速度定数を意味しており、概ね大気圧条件での死滅速度のパラメータと考えることができる。前指数因子の値は、高圧処理を行った場合の死滅速度定数 (Fig. 1, 2) に比べると非常に低い値であり、その変動幅もごくわずかである。しかし、活性化体積の絶対値と同様に 0.20 mol/l を境にし

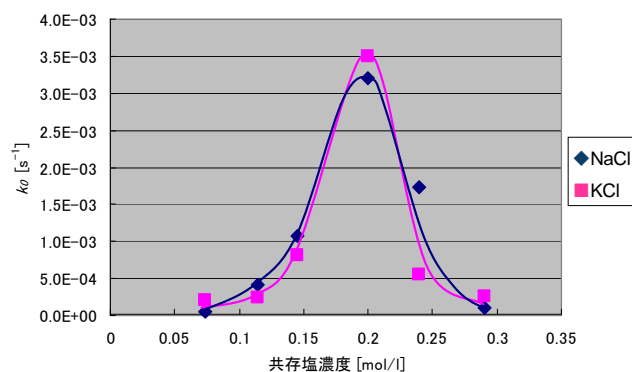


Fig. 6. 各共存塩の前指数因子 k_0 に及ぼす影響

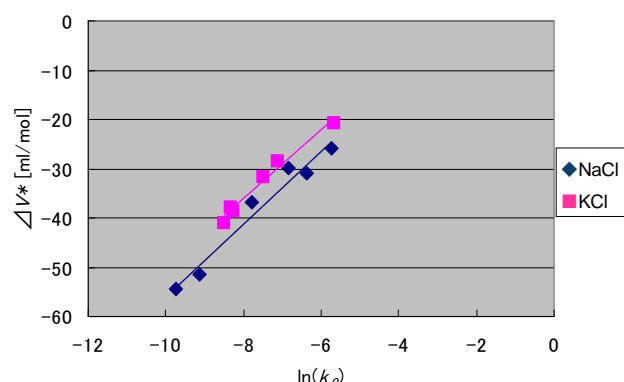


Fig. 7. 各共存塩における前指数因子 k_0 と活性化体積 ΔV^* の相関関係

て共存塩濃度に依存した変動挙動が異なるという結果は、この濃度を境にした異なる死滅メカニズムの存在を示唆している。

Fig. 7 には、各共存塩における前指数因子の自然対数と活性化体積の相関関係を図示した。いずれの塩についても、前指数因子の自然対数と活性化体積の間には明瞭な直線関係が認められた。また、それぞれの塩における直線は、イオン種に依存した活性化体積の絶対値の差を反映した間隔で離れていた。しかし、2本の直線の傾きはほぼ等しいことから、イオン種に依存しない死滅メカニズムの存在が示唆された。

ここで、大腸菌の高圧死滅反応における活性化状態へのギブスエネルギー変化 ΔG^* を考えると、次式で記述することができる。

$$\Delta G^* = -RT \ln K^* = -RT \ln \frac{k}{v} \quad (3)$$

ただし、 K^* は反応物と活性化複合体の間の平衡定数

であり、 v は $[s^{-1}]$ の単位を持ち、活性化状態から生成物の形成に向かう自由度のうち振動運動の頻度を表す³⁾。この式に式(2)を代入すると、次式を導くことができる。

$$\Delta G^* = -RT \ln k_0 + P\Delta V^* + RT \ln v \quad (4)$$

整理すると、

$$\Delta V^* = \frac{RT}{P} \ln k_0 + \left(\frac{\Delta G^*}{P} - \frac{RT}{P} \ln v \right) \quad (5)$$

となる。したがって、前指数因子の自然対数と活性化体積の比例関係の結果(Fig. 7)から切片値がイオン種に依存していることが認められたことから、イオン種が活性複合体の振動運動に影響を与えていることが示唆された。

3.3 共存塩の濃度が影響する大腸菌の高圧死滅メカニズム

共存塩の濃度が影響する大腸菌の高圧死滅メカニズムを考えると、(1)細胞膜上に局在するイオン輸送タンパク質の損傷による細胞死、(2)浸透圧による細胞の収縮あるいは破裂による細胞死、(3)細胞膜の構造あるいは機能の損傷による細胞死、などが可能性としてあげられる。

共存塩の濃度による活性化体積の変動挙動にはイオン種の依存性が示されなかった結果から、特定のイオン輸送タンパク質の損傷による細胞死の可能性は考えにくい。浸透圧が主要な要因である可能性については、3.1節で示した高い圧力条件での死滅速度の増加という結果からある程度の影響は否定できないが、等張液の濃度ではなく0.20 mol/lを境とした高圧死滅挙動の違いを説明することが難しい。また、ペプチドグリカン層および外膜で覆われた細菌の細胞構造を考えると、浸透圧が主要な要因とは考えにくい。これらのことから、共存イオンが細胞膜の構造あるいは機能になんらかの影響を与えることで細胞死を導くという死滅メカニズムが有力な可能性として残される。

通常、細菌の細胞表面はカルボキシル基やリン酸基の解離により負に帯電している。そして、細胞膜内外に形成される膜電位を利用して糖やアミノ酸などの栄養物質の取り込みやATPの合成などの重要な生命活動を行なっている。そのため、特に陽イオンが細胞表面に作用すると、表面の電荷が中和され、膜電位に対してイオン濃度依存的な影響が及ぼされると考えられる。Morisakiらは、

Pseudomonas syringae を含むいくつかの細菌細胞を用い、イオン強度(0 - 0.15 M)と表面荷電の関係を、電気泳動移動度を指標に解析した。その結果、イオン強度の増大に伴い、負の表面荷電の値が小さくなるが、0以外の負の値に漸近していくことを報告している⁴⁾。この結果は、イオン強度の増大に伴って表面荷電は中和されていくが、ある一定以上のイオン強度では表面電荷を負に維持する機構の存在を示している。

いくつかの酵素タンパク質について、その立体構造および水和構造が塩の影響を受け変化することで、触媒する反応速度の活性化体積が変動することが知られている。Lowらはピルビン酸キナーゼを含むいくつかの酵素を対象とし、その反応における活性化体積に及ぼす塩の添加効果を0~0.4 mol/lの濃度領域で検討した⁵⁾。その結果、NaClおよびKClを共存させたピルビン酸キナーゼの反応速度の活性化体積は、塩濃度0~0.2 mol/lにかけて濃度依存的に減少した。また、NaClを共存させた場合、約0.2 mol/lにおいて活性化体積が極小となり、さらに塩濃度を増加させると活性化体積も増加した。これらの結果から、彼らは共存塩がタンパク質の立体構造および水和構造に影響し、活性化体積の塩濃度依存的な変動を起こしていると考察している。Lowらの示した結果は、本研究で示した濃度に依存した活性化体積の変動挙動に類似している。大腸菌の表面荷電の維持を担うタンパク質の立体構造および水和構造が共存塩のイオンにより影響を受け、活性化体積の塩濃度依存的な変動につながった可能性が考えられる。

本研究の結果、大腸菌は共存する塩から何らかのストレスを感じ適応した結果圧力感受性が変化すると考えられた。この適応メカニズムは共存塩濃度0.2 mol/lを境に変化し、濃度依存的に圧力感受性を減少させる要因と増大させる要因が拮抗的に作用していることが示唆された。この現象を説明する仮説として、タンパク質が関与する表面荷電を維持する機構に基づく適応メカニズムが考えられる。今後、共存塩濃度0.20 mol/l以下と0.20 mol/l以上の領域での大腸菌の細胞膜の膜電位やタンパク質の発現プロファイルの解析等を含めた研究を進めることで、どのようにして塩ストレスに対する適応メカニズムの違いが生じるのかを分子論的に解明していきたいと考えている。

文 献

- 1) Patterson, M. F. and Linton, M. (2008) Factors affecting inactivation of food-borne bacteria by high pressure. *In* High-Pressure Microbiology, ASM Press, Washington, DC.
- 2) Maloney, P. C. (2002) Bacterial membrane transport: organization of membrane activities. *In* Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ
- 3) Chang, R. (2003) 化学・生命科学系のための物理化学, 東京化学同人, 東京
- 4) 森崎久雄 (2001) 表面と微生物の関わり, 表面科学, 22, 638-644.
- 5) Low, P. S. and Somero, G. N. (1975) Activation volumes in enzymatic catalysis: their sources and modification by low-molecular-weight solutes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 (8), 3014-3018.

No. 0749

Effect of Added Salts on High-Pressure Control of Microorganisms

Tomoyuki Fujii

Department of Food Science, Faculty of Applied Life Sciences,
Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

Summary

High-pressure processing is one of non-thermal technologies for microbial inactivation, which can inactivate microorganisms with preventing alteration in the flavor and nutrient contents of fresh foods. Microorganisms in foods are always accompanied with polysaccharides, proteins, fats, salts, sugars, and other food components. Therefore, it is important to understand microbial inactivation behaviors in presence of coexistent materials. Using NaCl and KCl, which have monovalent cations with different hydration sizes, the behavior of high-pressure inactivation of *Escherichia coli* was investigated.

The cell suspension solutions of *E. coli* strain K12 were prepared with the salt solutions of NaCl or KCl in the concentration range between 0.1 and 0.3 mol/l. The cell suspension was then applied to high pressure treatment at 250 to 400 MPa at 20°C. The viable cell number of high pressure treated cell suspension was counted as colony forming unit to determine the surviving rates. Under all experimental conditions, high-pressure inactivation of *E. coli* followed first-order kinetics. With both salts added, the inactivation rate constant (k) showed the minimum value at 0.145 mol/l, which is equivalent to isotonic solution, and it increased with lower and higher osmolarities at the high pressure level (350 MPa in NaCl and 400 MPa in KCl). For each salt concentration and pressure level, the inactivation rate constant with NaCl solution was higher than that with KCl, suggesting that difference in cations could effect on the inactivation behaviors.

The activation volumes (ΔV^*) and the pre-exponential factor (k_0) of each salt concentration were determined based on the dependency of k on the pressure levels. For each salt concentration, the absolute value of activation volume with NaCl solution was higher than that with KCl solution, suggesting the volume change between initial state and activated state of inactivation reaction would depend on the coexistent cation. For each salt added, the relationship between salt concentration and the activation volume were analyzed. As a result, with both salts, the absolute value of the activation volume showed the minimum value at the concentration of 0.20 mol/l, decreased below 0.20 mol/l and increased over 0.20 mol/l with increase in concentration. In conclusion, this study indicated that there could be different inactivation mechanisms by high-pressure below and over the border salt concentration of 0.20 mol/l.