

助成番号 0849

## 微生物の高圧死滅挙動に及ぼす添加塩の影響

藤井 智幸

東北大学大学院農学研究科

**概要** 高濃度の塩を添加することにより食品の水分活性を下げ、微生物の増殖を抑制する方法が利用されている。塩の添加は、水分活性を下げるのみならず、浸透圧を上昇させる効果もある。浸透圧ストレスに対する細胞の挙動は、浸透圧の上昇あるいは低下によって異なり、高浸透圧条件下では、脱水が生じ、膨圧が低下して細胞が収縮する。低浸透圧条件下では、細胞内に水が流入し、膨圧が上昇して細胞が膨張する。塩を添加した食品を殺菌ということは、浸透圧ストレスを受けている細胞に対して殺菌することになり、例えば高圧殺菌の場合には、浸透圧ストレスと高圧作用の両者が高圧死滅挙動に影響を与えることになると考えられる。

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、大腸菌を供試菌として高圧死滅挙動を解析した。共存させる添加塩として LiCl、NaCl および KCl を選んだ。

供試菌として大腸菌 *Escherichia coli* K12 株を用いた。LiCl または NaCl、KCl 水溶液に大腸菌 K12 株を懸濁し、250～400 MPa (20°C) 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。大腸菌の高圧による死滅過程は、いずれの添加塩共存下においてもおおむね一次反応形式に従うことが示された。生理的にはそれほど重要ではない LiCl の場合には、塩濃度が変化しても死滅速度定数に顕著な変動は認められなかった。一方、NaCl または KCl を添加した場合には、250、300 MPa の圧力条件では死滅速度定数は塩濃度にそれほど依存せず顕著な変化は認められなかったが、350 MPa の圧力条件では 0.145 M (生理食塩水の濃度) において死滅速度定数が極小値をとり、より高塩濃度あるいはより低塩濃度になるにつれて死滅速度定数が増加する傾向を示した。

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。高圧死滅反応の活性化体積はいずれの添加塩においても 0.20 M の濃度でその絶対値は極小値を示し、0.20 M 以下では濃度依存的に減少し、0.20 M 以上では増加した。一方、前指数因子に関しては、NaCl または KCl を添加した場合には、おおよそ 0.20 M の濃度で顕著な極大を示すベル型を示したのに対し、LiCl の場合には、塩濃度が変化しても NaCl または KCl ほどの極大は認められなかった。以上の結果から、大腸菌の高圧死滅反応においては、LiCl の場合と、NaCl、KCl の場合とでは、死滅メカニズムが異なることが示された。特に、等張条件から穏和な高張条件の範囲ではイオンポンプのような Na イオン、K イオンが関与するなんらかの膜機能系に高圧が作用した結果、細胞が死にいたったことが示唆された。

## 1. 研究目的

食の安全・安心に対する市民の関心が極めて高いことを反映して、「食の安全・安心条例」を制定する地方自治体が増えている。しかし、食の安全・安心をより高めるためには、行政の取り組みはもとより、消費者や食品関連事業者の食の安全性に対する意識を高めることが重要である。特に食品関連事業者は、自らの事業活動が市民の健康

に大きく影響を及ぼすことを自覚し、自主的に食品などの安全性の確保に取り組む責務を有している。大腸菌 O-157 集団食中毒事件や雪印乳業エンテロトキシン食中毒事件は食の安全性に対する市民の関心が高まるきっかけとなった。食品工場や、給食センターのような大量調理施設では、ひとたび食中毒が起こると被害が広範囲に及ぶため、食中毒を予防するための衛生管理技術がますます

す重要となっている。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。

薬剤を用いることもひとつの方法である。食品産業において最も用いられている殺菌剤は次亜塩素酸ナトリウムである。「大量調理施設衛生管理マニュアル」では、野菜及び果物を加熱せずに供する場合に必要な応じて 200 mg/L の濃度で 10 分間浸して殺菌を行うように定めている。

オゾンは強力な酸化作用力を有し、この酸化力によって非選択的に微生物を死滅させる。残留性が少なく、また、微生物の細胞壁や細胞膜に直接作用するため耐性菌が出にくいという長所がある。しかし、野菜等に付着した微生物に対しては著しく殺菌効果が低下する上に、食品成分も同時に酸化されることが避けられない。

過酸化水素は無色透明の液体で臭気はほとんど無く、水と良く混和する。食品自体の殺菌剤としては用いられていないが、無菌包装における容器表面の殺菌に利用されている。

物理的な方法もいくつか知られている。高電圧パルス処理は、電気エネルギーをコンデンサーに蓄え瞬間的に放電させる技術であり、液状食品の殺菌への応用が期待されている。直流電圧をパルス状に印加すると、発熱を抑制しつつ電場の効果を利用することができる。細胞懸濁液にパルス電界を印加すると、細胞内外に電位差が発生する。この電位差が小さいときには細胞膜の可逆的破壊が生じ、さらに電位差が大きくなると細胞膜の孔を修復することができなくなり、不可逆的破壊に移行する。従って、高電圧パルス殺菌はタンパク質の変性を主な要因とする加熱殺菌とは異なるメカニズムで殺菌される方法である。

マイクロバブル超臨界二酸化炭素殺菌法は、超臨界二酸化炭素を微細化して液状食品中に分散（溶解）させることにより、溶存二酸化炭素濃度を飛躍的に高め、非加熱下で酵素、微生物を失活させる方法である。分子状の二酸化炭素が細胞膜を透過し細胞内 pH を低下させることによって殺菌されると考えられている。

食品に 100 MPa 以上の高い静水圧を加える高压処理は、加熱処理に比べると栄養素の破壊やメイラード生成物が少なく、生に近い状態が維持されるという特徴を有し

ている。従って、低分子の薬効成分を変質させることなく殺菌することも可能である。約 20 年前に、殺菌や食品加工への超高压の応用が始まると、大腸菌、乳酸菌および酵母などの栄養細胞は圧力感受性が大きいため、処理圧力 200~400 MPa 程度で殺菌が可能であることが明らかにされ、さらに、600 MPa 前後でのタンパク質の圧力変性やデンプンに対する圧力の作用などに関する知見が蓄積された。これまで非加熱殺菌法として高压殺菌の研究が活発に行われてきている<sup>1)</sup>。

一方で、高濃度の塩を添加することにより食品の水分活性を下げ、微生物の増殖を抑制する方法が利用されている。塩の添加は、水分活性を下げるのみならず、浸透圧を上昇させる効果もある。浸透圧ストレスに対する細胞の挙動は、浸透圧の上昇あるいは低下によって異なり、高浸透圧条件下では、脱水が生じ、膨圧が低下して細胞が収縮するとともに適合溶質が産生される。低浸透圧条件下では、細胞内に水が流入し、膨圧が上昇して細胞が膨張する。塩を添加した食品を殺菌するという事は、浸透圧ストレスを受けている細胞に対して殺菌することになり、例えば高压殺菌の場合には、浸透圧ストレスと高压作用の両者が高压死滅挙動に影響を与えることになると考えられる。

そこで、本研究では微生物の高压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、大腸菌を供試菌として高压死滅挙動を解析した。共存させる添加塩としては、水和半径の異なる一価の陽イオンから構成される LiCl、NaCl および KCl を選んだ。

## 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。500 ml 容の坂口フラスコに 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 200 ml 分注し、植菌した後 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

大腸菌懸濁液は、LiCl、NaCl および KCl の水溶液それぞれ 180 ml に対して、大腸菌の培養液を 20 ml 添加して調製した。なお、最終濃度が 0.074、0.114、0.145 (生理食

塩水の濃度)、0.2、0.24、0.29 M となるようにした。

### 2.3 高圧処理

ピストン式高圧処理装置(神戸製鋼所製; 試料室サイズ: 内径 60 mm, 深さ 180 mm; 加圧方式: ピストン直圧式; 圧力媒体: 水)を使用して、高圧処理を行った。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 M に相当) を用いて適宜希釈し、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。

### 2.5 死滅速度定数の測定

大腸菌懸濁液(塩濃度を 0.074~0.29 M に調製)を、250 MPa~400 MPa の圧力条件で高圧処理した。圧力保持時間を 0~300 s の間で変化させそれぞれの試料について生菌数を求めた。高圧による死滅過程を一次反応形式に従うと仮定し、式 (1) から死滅速度定数  $k$  を求めた。

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

### 2.6 反応速度論的パラメータの算出

各添加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の結果から、死滅速度定数の自然対数と処理圧力をプロットし、その直線の傾きから 式 (2) を用いて活性化体積  $\Delta V^*$  [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。各添加塩について各塩濃度の活性化体積の絶対値  $|\Delta V^*|$  [ml/mol] を求めた。

## 3. 実験結果

### 3.1 死滅速度定数におよぼす添加塩の影響

細胞は細胞内のカリウムイオンの濃度を高く(通常 0.2 M 以上)、ナトリウムイオンの濃度を低く(通常 0.01 M 以下)維持している<sup>2)</sup>。この濃度状態を保つためには濃度勾配に逆らって、ナトリウムイオンは細胞外へ汲み出され、カリウムイオンは取り込まれる必要がある。このために細胞膜にはイオンポンプが備わっている。従って、NaClの添加は

浸透圧ストレスとしての作用とナトリウムイオンの添加に伴う作用の両者が重ね合わさった効果を与えると考えられる。

そこで、生理的に重要なナトリウムイオンとカリウムイオンの結果を検討するために、生理的にはそれほど重要ではないリチウムイオンを比較対照として選んだ。Fig. 1 に、0.145 mol/l の LiCl 水溶液について、大腸菌の生存率と圧力保持時間の関係を示す。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) の対数の間に直線関係が認められた。実験を行な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、おおむね直線関係が認められた。これらのことから、大腸菌については、一次反応形式で死滅してゆくことが示された。

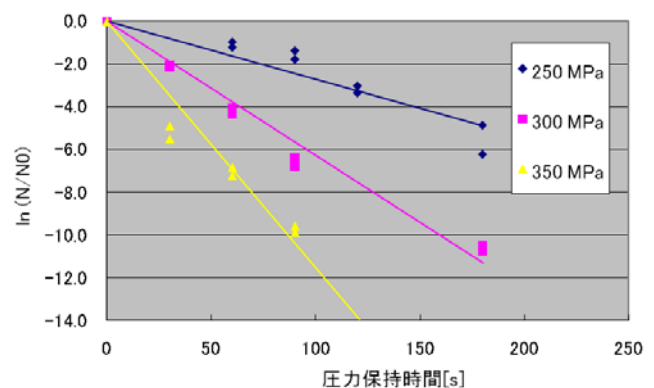


Fig. 1. LiCl 0.145 M 水溶液に懸濁された大腸菌の高圧死滅曲線

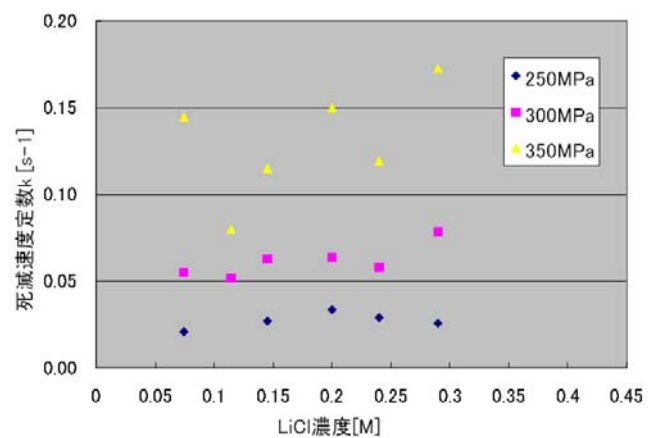


Fig. 2. 各圧力条件における LiCl の濃度と死滅速度定数の関係

LiCl 濃度と死滅速度定数の関係を Fig. 2 に示す。共存塩として LiCl を添加した場合、250、300、350 MPa のいずれの圧力条件でも塩濃度に変化しても死滅速度定数に顕著な変動は認められなかった。NaCl を添加した場合の結果を Fig. 3 に示す。NaCl の場合には 250、300 MPa の圧力条件では死滅速度定数は塩濃度にそれほど依存せず顕著な変化は認められなかったが、350 MPa の圧力条件では 0.145 M (生理食塩水の濃度) において死滅速度定数が極小値をとり、より高塩濃度あるいはより低塩濃度になるにつれて死滅速度定数が増加する傾向を示した。また、KCl を添加した場合 (Fig. 4) も NaCl の場合と同様に、300、350 MPa の圧力条件では死滅速度定数に塩濃度依存性が認められなかったのに対し、400 MPa の圧力条件では 0.145 M において死滅速度定数が極小値をとる傾向を示した。

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、生理的に重要なナトリウムイオン及びカリウムイオンの場合には、等張液の条件で極小となり、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。

### 3. 2 活性化体積および前指数因子に及ぼす共存塩の影響

Fig. 5 に 0.145 M の LiCl 水溶液における大腸菌の死滅速度定数の圧力依存性の結果を示す。死滅速度定数の対数と圧力のプロットは良好な直線性を示し、大腸菌の高圧死滅において、式 (2) が成立していることが示された。この条件を含め、実験した全ての条件について、おおむね式 (2) が成立していた。

式 (2) を用いて算出した活性化体積の結果を Fig. 6 に示す。それぞれの添加塩について、活性化体積の濃度依存性について解析したところ、いずれの添加塩においても 0.20 M の濃度で活性化体積の絶対値は極小値を示し、0.20 M 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 M 以上では増加した。以上の結果から、大腸菌の死滅反応における活性化体積の絶対値については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。また、0.145 M から 0.240 M の濃度範囲ではイオン種によって活性化体積の値に差が認められた。

各添加塩について各塩濃度における前指数因子  $k_0$  [ $s^{-1}$ ] の値を Fig. 7 に示した。ナトリウムイオンまたはカリウ

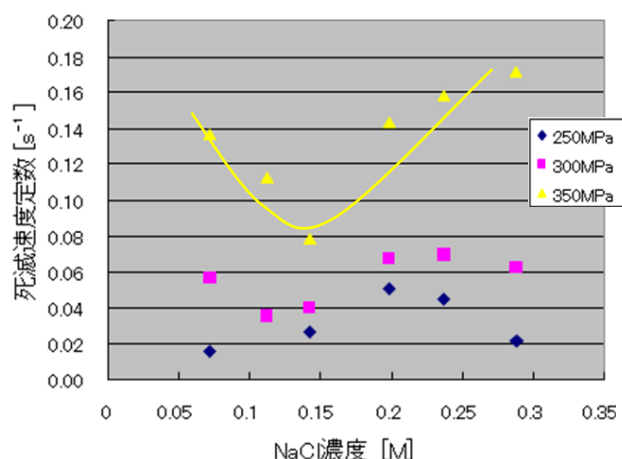


Fig. 3. 各圧力条件における NaCl の濃度と死滅速度定数の関係

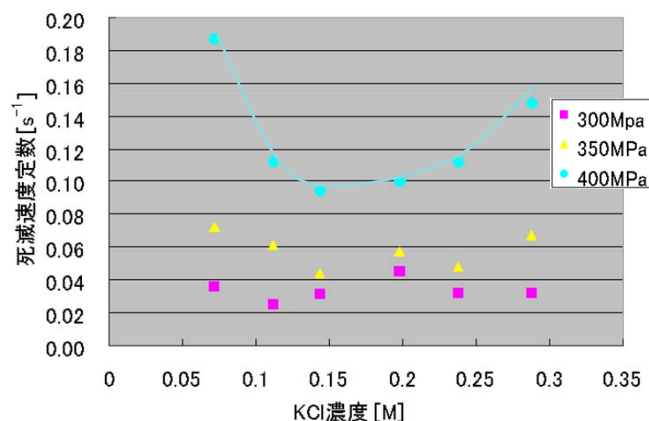


Fig. 4. 各圧力条件における KCl の濃度と死滅速度定数の関係

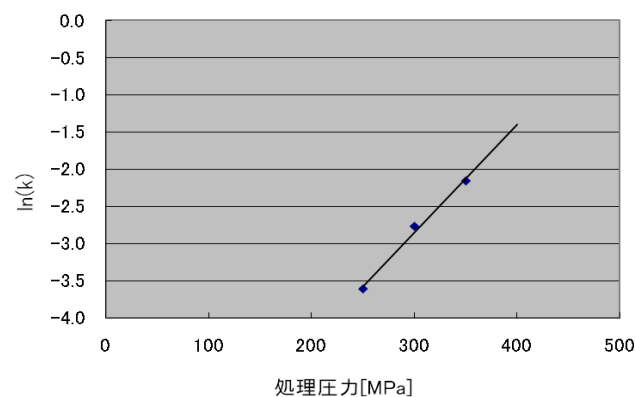


Fig. 5. LiCl 0.145 M 水溶液に懸濁された大腸菌の死滅速度定数  $k$  の圧力依存性

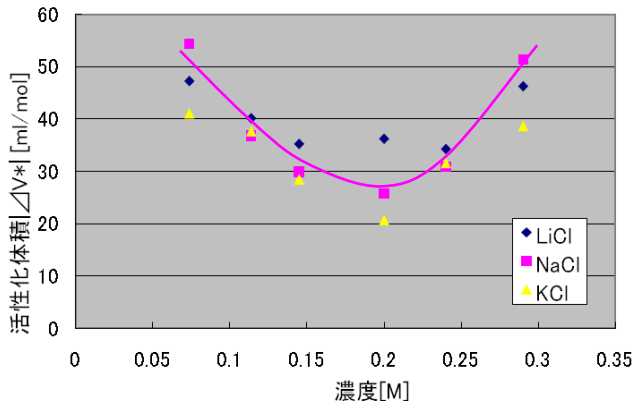


Fig. 6. 高圧死滅反応の活性化体積に及ぼす添加塩の影響

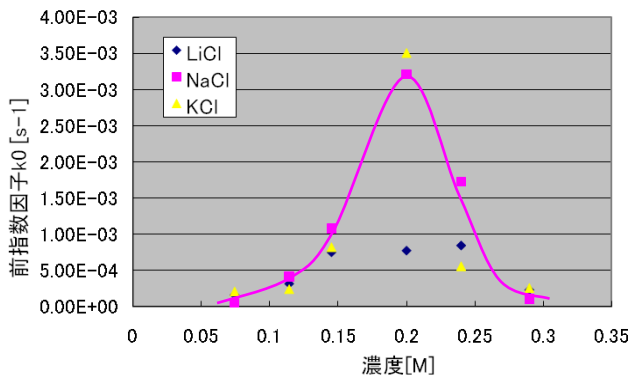


Fig. 7. 高圧死滅反応の前指数因子  $k_0$  に及ぼす添加塩の影響

ムイオンを添加した場合には、前指数因子の値は、約 0.20 M の濃度で顕著な極大を示すベル型となり、0.20 M 以下では濃度依存的に増加し、0.20 M 以上では減少した。リチウムイオンの場合には、塩濃度が変化してもナトリウムイオンまたはカリウムイオンのような濃度依存的な変化は認められなかった。また、0.145 M 以下及び 0.240 M 以上の濃度領域では、前指数因子の値はイオン種による差が認められなかった。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. 2-4) 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 M を境にして添加塩濃度依存性が異なるという結果は、濃度に応じて異なる死滅メカニズムの存在を示

唆していると考えられた。

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。3 種の塩を添加したいずれの場合においても圧力による死滅挙動に顕著な違いが認められなかった高い濃度条件または低張条件では、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、添加塩の種類による死滅挙動の違いを検討したところ、リチウムイオンと生理的に重要なナトリウムイオン・カリウムイオンとで高圧死滅挙動が顕著に異なる濃度領域 (穏和な高張条件) が存在することが示された。この濃度領域では、浸透圧ストレスの寄与は小さく塩ストレスが主要な因子となっていることが示唆され、ナトリウムイオンストレスまたはカリウムイオンストレスによる適応反応が高圧によって何らかの影響を受けた結果として死滅にいたったと考えられた。

### 3.3 添加塩の濃度が影響する大腸菌の高圧死滅メカニズム

添加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。

高圧死滅挙動の速度論的解析の結果、0.145 M よりも低濃度の領域では活性化体積及び前指数因子はともに 3 種のイオンの場合同様の値となった。塩の種類に依存しなかったことから、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低く、浸透圧による細胞の膨張に高圧の作用が加わって死滅が起こっていると考えられた。0.240 M よりも高濃度の領域でも、活性化体積及び前指数因子にイオン種依存性が認められず、同様の値となった。このことから、浸透圧によって細胞が収縮した状態に高圧が作用し殺菌されたと考えられた。

一方、0.145 M から 0.240 M の中程度の濃度領域ではナトリウムイオン・カリウムイオンとリチウムイオンとで高圧死滅挙動が異なるという結果となった。浸透圧が主要な要因である可能性については否定できないが、等張液の濃度ではなく 0.20 M を境とした高圧死滅挙動の違いを説明することが困難である。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慮すると、浸透圧が主要な要因とは考えにくい。これらのことから、添加イオンが特

異的に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によって細胞死にいたらしめるという高圧死滅のメカニズムが考えられる。

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。そのため、特に陽イオンが細胞表面近傍に存在すると、表面の電荷が中和され、膜電位が変化すると考えられる。Morisaki らは、*Pseudomonas syringae* を含むいくつかの細菌細胞を用い、表面荷電に及ぼすイオン強度の影響を解析した<sup>3)</sup>。その結果、0 から 0.15 M までイオン強度が増加するに従って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た。この結果は、イオン強度が大きい条件下であっても表面電荷を負に維持する機構が存在し機能していることを示している。

また、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 らはピルベート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添加の影響を検討した<sup>4)</sup>。その結果、NaCl および KCl を共存させたピルベートキナーゼの反応の活性化体積は、塩濃度が 0 から 0.2 M に増加するにつれて減少した。また、NaCl を共存させた場合、約 0.2 M において活性化体積が極小となった。これらの結果から、彼らは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化を引き起こしていると考えしている。Low らの示した結果は、本研究で示した濃度に依存した前指

数因子の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塩化塩イオンにより影響を受け、前指数因子の変化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添加塩の濃度条件によって異なり、0.145 M 以下の低張条件及び 0.240 M 以上の強塩ストレス条件では浸透圧が主要な要因と考えられた。0.145 M から 0.240 M の穏やかな塩ストレス条件下では、イオン種に特異的な塩ストレス応答メカニズムが機能していることが示唆された。

## 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) 森崎久雄(2001) 表面と微生物の関わり, 表面科学, 22, 638-644.
- 4) 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. 0849

## Effect of Added Salts on High Pressure Inactivation of *Escherichia coli*

Tomoyuki Fujii

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

### Summary

High-pressure processing is one of non-thermal technique for microbial inactivation, which can inactivate microorganisms without the change in the flavor and nutrient component of foods. Microorganisms in foods are always accompanied with materials including salts, sugars, proteins and other food components. Therefore, it is important to understand microbial inactivation behaviors in presence of coexistent materials. The aim of this study was to analyze the effect of added salts on microbial inactivation by high-pressure treatment. The inactivation behavior of *Escherichia coli* with LiCl, NaCl and KCl by high pressure treatment was investigated.

The cell suspensions of *E. coli* strain K12 were prepared with the salt solutions of LiCl, NaCl or KCl in the concentration range between 0.1 and 0.3 M. 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 survival curves. Under all experimental conditions, high-pressure inactivation rates of *E. coli* obeyed first-order kinetics. With NaCl and KCl added, the inactivation rate constant ( $k$ ) showed the minimum value at 0.145 M, 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).

The activation volumes ( $\Delta V^*$ ) and the pre-exponential factor ( $k_0$ ) under the salt concentration were determined from the inactivation rate constant ( $k$ ). Under lower and higher salt concentrations, the absolute value of activation volume and pre-exponential factor did not depend on salts. These results suggest that the high-pressure inactivation was caused by the osmotic effect under the concentration condition. As a result, with NaCl and KCl, the value of the pre-exponential factor showed the maximum value at the concentration of 0.20 M, increased below 0.20 M and decreased over 0.20 M with increase in concentration. Under the lower and higher salt concentrations the difference in cations would effect on the inactivation behaviors. Under the middle concentration the behavior of the activation volume and pre-exponential factor depended on the difference in salts. In conclusion, this study indicated that there would be different inactivation mechanisms by high-pressure under lower, middle, and higher salt concentrations.