

令和元年5月31日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06867

研究課題名(和文) 高電圧パルス電界による食品の品質と安全性・安定性を担保した非加熱殺菌技術

研究課題名(英文) Nonthermal sterilization technology using high-voltage pulsed electric field to secure the quality and safety of food

研究代表者

谷野 孝徳 (TANINO, TAKANORI)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：50467669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では液状食品の非加熱殺菌処理手法として薬剤を用いない電界の物理的作用を利用した高電圧パルス電界殺菌に着目し、この殺菌処理過程における食品中への金属漏洩ならびに食品への臭い移りの懸念を根本的に払拭するために、カーボン材料ならびにシリコン材料をそれぞれ電極材料、装置構成材料とした装置を開発した。また、装置構造体として高電圧電極とアース電極の間に隔膜を導入し、高電圧側に冷却水を循環させることで温度上昇を抑えこれまで以上の非加熱殺菌を可能とした。殺菌対象物は本装置を用いた殺菌し長期(1ヶ月)保存した後も安定していたことを確認し、安全性・安定性の高い殺菌技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品中の熱に弱い成分の変性・喪失などによる食品本来の新鮮さを維持できる非加熱殺菌技術の開発が望まれている。本研究では非加熱殺菌技術の一つとして期待されている高電圧パルス電界(PEF)を用いた殺菌技術において、液状食品への金属溶出やニオイ移りの心配のない殺菌装置の開発を実施した。このような安全性に重点を置いたPEF殺菌装置開発の試みは世界初である。本装置を用いることで加熱されていない新鮮な風味を維持した液状食品の生産が可能になる。また風味だけではなく熱により変質してしまう各種有用成分の維持も可能になることから、国民の健康増進につながる新たな液状食品の開発にも資することができると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, high-voltage pulsed electric field (HV-PEF) treatment was focused as the physical nonthermal sterilization technology for liquid food. A novel HV-PEF reactor using carbon material as the electrode was developed to avoid the release of metal from electrodes to liquid food. Silicon material was also used as the reactor structure to avoid smell transfer to liquid food. A separating membrane was introduced between the high voltage electrode and the earth electrode, and cooling water was circulated to the high voltage side to suppress the temperature rise of treatment solution. This enabled more nonthermal sterilization of liquid food. The liquid food treated by this reactor was stored for 1 month and the no change of quality of HV-PEF treated liquid food after preservation was confirmed. From these results, a nonthermal sterilization technology to secure the quality and safety of food was successfully developed.

研究分野：食品工学

キーワード：非加熱殺菌 高電圧パルス電界 金属フリー 液状食品

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

新鮮な食品が有する風味や栄養素を加熱により損なわない非加熱殺菌技術に対する食品業界からのニーズは非常に大きい。液状食品の非加熱殺菌技術の一つとして微生物細胞膜の物理的破壊を殺菌原理とする高電圧パルス電界(HV-PEF)殺菌技術が注目されている。HV-PEF 殺菌の国内で唯一の研究グループである我々のグループを含め世界中で多数のグループにより様々な液体に対する HV-PEF 殺菌の有効性の立証、様々な殺菌処理装置の考案がなされ、近年ではベンチスケールでの殺菌実証試験結果なども報告されるようになってきている。しかしながら殺菌効果に対する研究報告が先行している一方で、本来の目的である HV-PEF 殺菌の対象となる食品の品質ならびに安全性・安定性についての十分な知見の集積がなされているとは言い切れない。

極短時間の電圧（パルス電圧）の印加であるため水が誘電体のような性質を示し、ジュール熱や電気化学的反応を抑えることができる HV-PEF 殺菌においては、我々を含めこれまで処理装置の開発研究に電極として様々な金属材料を用いてきた。数件の研究報告における HV-PEF 殺菌時の電気化学的反応による電極からの金属漏出量は、日本において食品に適応される安全基準値以下の極微量である。実際に申請者らがステンレス製の電極を用い HV-PEF 殺菌を行ったミルクの元素分析を行った結果でも極微量の鉄の増加が確認されたものの、クロム、ニッケルの漏出による増加は確認されなかった。しかしながら、官能検査では増加した極微量の鉄に由来すると考えられる金属臭が指摘された。これまで漏出量が極微量であるため、我々を含め電極からの金属の漏出が食品の風味に及ぼす影響についての調査、ならびに金属漏出を抑制・防止する装置開発はなされていない。官能検査の結果は食品の品質保全に重点を置いた技術開発の必要性を再認識する契機となった。

食品風味に加え、実用化に際し殺菌を実施した食品の安全性についても流通・保存を考慮した視点からの知見の集約と技術開発が必要である。これまで HV-PEF の殺菌効果の調査には殺菌処理を施した直後のサンプル利用し、コロニーカウント法などにより評価が行われてきた。しかしながら、2015 年度食品工学会全国大会において、非加熱殺菌技術の一つである加圧殺菌では通常の培養温度ではコロニーカウント法にて生育が確認されない損傷菌体が存在し、被殺菌物を保存中に増殖活性を示すまで回復するといった報告がなされた。HV-PEF 殺菌において損傷菌の存在の有無、損傷菌が存在した場合の挙動については研究がなされておらず、損傷菌を考慮に入れた殺菌技術を構築し、HV-PEF 殺菌を施した食品の保存後の安全性を確認する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、液状食品の非加熱殺菌技術として高い関心が寄せられている高電圧パルス電界(HV-PEF)殺菌技術において食品の品質と安全性・安定性を保証するための包括的な技術体系を構築することを目的とした。具体的には、電極ならびに処理装置に金属材料以外を用いた食品風味に影響を及ぼさない金属フリーの殺菌処理装置の開発、他非加熱殺菌技術において被殺菌物の低温保存中に増殖活性の回復が確認された損傷菌の存在の調査、HV-PEF の食品中の糖、アルコールなど食品成分への影響と長期保存に及ぼす効果の3点に着目した研究を目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 食品風味に影響を及ぼさない金属フリーの殺菌処理装置の開発

電極材料として導電性を有し電気化学的反応による金属漏出の懸念がない炭素材料を用いた殺菌装置を作成し、十分な殺菌効果が得られる条件を検討する。電極に用いる炭素材料の形態が HV-PEF 殺菌効果ならびに発熱に与える影響を調査する。近年炭素材料は燃料電池開発などでも利用され、グラファイトに加えカーボンクロス、カーボンシートなど電極利用が可能な形態の材料が容易に入手できる。これまで我々は電極を繊維に織り込んだ織物電極の開発などを通じ不均一電界を生じる電極形状が高い殺菌効果を示すことを明らかにしている。カーボン繊維の織布で表面に凹凸を有し不均一電界の発生が期待できるカーボンクロスをはじめ種々の形状の炭素材料を電極として用いた場合の殺菌効果の調査は、金属フリーの殺菌装置開発において重要な知見となる。一方でカーボンクロスなどはグラファイトに比べ導電率が小さい。グラファイトにおいても金属に比べ導電率が1～2桁小さく、電圧を印加した際に金属電極を用いた場合に比べ発熱が懸念される。投入エネルギーと殺菌効率、発熱量に着目した観点から評価を実施し、発熱量が大きい場合にはグラファイト表面を加工した電極、電界が集中しやすい狭小流路構造、被殺菌物の温度を下げるための冷却機構を取り入れた装置開発を行う。

また金属や樹脂などわずかでも臭いが移る可能性がある材料との接触を極力避けたいとの要望がある清酒のように香りを特に重視する液体食品にも対応可能な装置を設計するため、食品機器に広く用いられているシリコン材料を装置材料とした装置開発を実施する。これを炭素電極と組み合わせることで金属フリーの殺菌装置とし、殺菌性能を評価する。

#### (2) 損傷菌の存在の調査と殺菌技術の開発

HV-PEF 殺菌処理後の被殺菌物中に損傷菌としてどの程度の割合で存在するのか、損傷菌が被殺菌物保存中に増殖活性を示すまで回復するのかを調査する。この際、被殺菌物の性状、温度、

保存期間などが及ぼす影響を明らかとする。HV-PEF 殺菌は細胞膜の物理的破壊を殺菌原理としており、膜の流動性が低下する低温では致命的な膜破壊に至らず回復する損傷菌の存在が考えられる。高圧殺菌においても大腸菌を殺菌対象とした場合に低温の 25℃での培養で出現コロニー数の増加が報告されている。そこで、本研究では日本酒中の酵母に対し、殺菌効果が得られるHV-PEF 殺菌処理後に至適培養温度よりも低温において非選択培地上で培養し損傷菌の有無の確認、損傷菌が最も回復を示す培養温度、損傷菌の存在割合を調査する。また、低温でHV-PEF 殺菌を実施した日本酒を保存した場合における経時的な損傷菌の回復プロファイルについても調査する。

### (3) HV-PEF の食品成分への影響と長期保存に及ぼす効果

食品に含まれる成分に対し、PEF 殺菌処理前後での状態を調査する。PEF 殺菌ではパルス電圧を印加するため、直流電圧を印加した場合のように顕著な電気分解反応は生じないものの、僅かな電気化学反応は生じる。この電気化学反応によって生じる化学種が食品成分に影響を及ぼしてしまうことも考えられる。そこで主要な食品成分に対し PEF 殺菌前後で成分量の変化を調査する。また、官能評価を実施することで食品としての性状がどのように変化するかを調査する。具体的には、上記①で開発した金属フリーの処理槽と損傷菌を殺菌するための温度制御システムを統合した殺菌システムを確立し、これを用いて日本酒中の糖・アルコールの変化を液体クロマトグラフィー(HPLC)により調査する。また PEF 殺菌処理後の日本酒を長期保存することでこれらの成分の変化が起こりうるのかも調査を実施する。これらの調査を実施留守事で、PEF 殺菌処理の食品の品質を保持可能であるという特性を再評価すると共に、食品の安全性と安定性に対する優位性を確認する。

## 4. 研究成果

### (1) 炭素材料を電極材料とした PEF 殺菌

PEF 殺菌の電極に用いる炭素材料としてカーボンボードとカーボンメッシュを採用し、大腸菌に対する殺菌効果をステンレス電極を用いた場合と比較した。印加電圧 10 kV、電界強度 6.25 kV/cm にて 3 分間の PEF 殺菌試験を行った結果、大腸菌の生菌率はステンレス電極を用いた場合では 1 桁の減少が確認されたのに対し、カーボンボード電極では 1.5 桁、カーボンメッシュ電極では 3.5 桁の減少が確認され、電極材料として炭素材料を用いることで金属材料を用いた場合に比べ高い殺菌効果が得られることが明らかとなった。カーボンメッシュを電極として用いた際に高い殺菌効果が得られた原因として、カーボンメッシュはステンレス電極やカーボンボードとは異なり、繊維状の織り目からなる構造を有し表面が均一でないため、電圧を印加した際に表面に不均一な電場が生じるため、部分的に強電場が生成され殺菌効果が向上したのと考えられる。またこの際の処理液の温度上昇は金属電極と炭素電極を用いた場合において大きな差は確認されず、金属材料に比べ導電率の低い炭素材料を PEF 殺菌装置の電極用いることで処理液の温度上昇を引き起こしてしまうという懸念は払拭された。

### (2) カーボンクロスを用いた流通型 PEF 殺菌装置の開発

高い殺菌効果が得られたカーボンメッシュは、これまで用いられていたステンレス板や同時に比較したカーボンボードなどとは異なり網目状の構造を有しているため、電極内を液体が通過するような流れ場を作ることが可能である。不均一な電極が発生する電極近傍を必ず通過する流れ場を導入することで殺菌効果の向上が期待できる。そこでカーボンメッシュを用いた PEF 殺菌装置において、処理液が電極表面と平行に流れる平流型と電極を通過する通過型の流通型 PEF 殺菌装置 (図 1) を開発し殺菌効果の評価を行った。

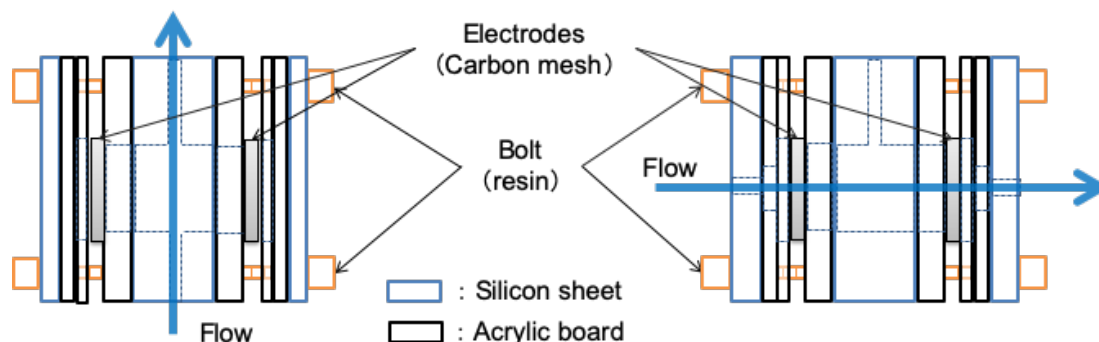


図 1 カーボンメッシュを用いた PEF 殺菌装置概略図、左：平流型、右：通過型

両流通型 PEF 殺菌装置を用いて印加電圧 10 kV、電界強度 6.25 kV/cm、流量 30 mL/min (滞留時間  $\tau = 22.6$  sec) の条件で大腸菌を対象として殺菌効率の比較を実施した。両型の装置とも処理液中の大腸菌を殺菌可能であったが、処理液を 3 回循環し殺菌処理を実施した後の処理液中の大腸菌の生菌率は、平流型では 4 桁、通過型では 6 桁の減少が確認され、不均一電界が生じるカーボンメッシュ電極表面を処理液が必ず通過する通過型 PEF 殺菌装置が高い殺菌効果が得ら

れることが確認された。通過型 PEF 殺菌装置を用い電界強度を 6.25 kV/cm に保ったまま流量を 20 mL/min ( $\tau = 33.9$  sec) に減らし殺菌試験を行った結果、1 回の循環で処理液中の大腸菌の生菌率は 4 桁減少し、2 回の循環で  $10^9$ CFU/ml の濃度で調整した処理液中の大腸菌が滅菌された。また流量を 30 mL/min ( $\tau = 12.7$  sec) とし電界強度を 1.11 kV/cm と上げて殺菌試験を行った場合においても、1 回の循環で処理液中の大腸菌の生菌率は 4 桁減少し、2 回の循環で  $10^9$ CFU/ml の濃度で調整した処理液中の大腸菌が滅菌された。これらの結果から流量と電界強度が殺菌効果に大きく影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。両因子を滞留時間に基づき比較すると、電界強度を上げることで短時間の滞留時間でも高い殺菌効果が得られており、流量を落として滞留時間を伸ばすより電界強度を上げるほうがより殺菌効果に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

### (3) 炭素電極を用いた PEF 殺菌装置による日本酒の殺菌と官能評価

通過型 PEF 殺菌装置を用いて日本酒中の酵母の殺菌試験を実施した。殺菌には実際の日本酒製造で用いられる協会酵母 No. 901 を殺菌対象とした。日本酒中では協会酵母 No. 901 酵母は殺菌され辛く、電界強度 1 kV/cm、流量 20 mL/min ( $t = 33.9$  sec) の条件で殺菌処理を実施しても、3 回の処理で処理液中の酵母の生菌率は 5 桁の減少であった。しかしながら、日本酒中の酵母を殺菌できることが確認でき、実際のろ過工程の後にはこれほど高濃度の酵母は含まれていないため、十分な殺菌効果が得られたものと考えられる。同条件で殺菌を実施した日本酒の官能試験を行った結果、殺菌前に比べ香り、風味の減衰が指摘され、やや焦げ臭が確認された。この原因を調査したところ、高電圧電極としたカーボンクロス上に若干の焦げ跡が確認され、複数回の日本酒の殺菌試験の後でははっきりとした焦げ跡が確認された。これは蒸留水中に微生物を懸濁し殺菌試験を実施した際には確認されなかった現象であり、日本酒中の何らかの成分が電極上で反応した結果だと考えられる。このため高電圧電極に日本酒が接触しない構造の PEF 殺菌装置の開発が必要となり、通過型 PEF 殺菌装置では高い殺菌効率が実現可能であるものの食品の殺菌には採用できず、再度装置構造の検討を実施する必要性が生じた。

### (4) 隔膜導入 PEF 殺菌装置の開発

高電圧電極とした炭素材料に殺菌対象食品が直接接触することを防ぐために PEF 殺菌装置内に隔膜を設置し、高電圧側に適当な水溶液をアース電極側に殺菌対象食品を保持できる PEF 殺菌装置を考案した。また、高電圧側に充填する水溶液を冷却水として利用することで PEF 殺菌処理過程における殺菌対象食品の温度上昇をより防止することができるものと考えられる。隔膜として食品製造でも利用実績のある一価陽イオン交換膜を用いた。また PEF 殺菌装置の装置構成材料をアクリルからシリコンへと変更とすることで日本酒風味への影響を払拭することを試みた。この際滞留時間を伸ばし電界強度を上げることで殺菌効果が向上することが明らかとなっているため、薄手のシリコンシートを利用し電極間距離が短く（電界強度が高く）長い流路を有し滞留時間を稼げる装置を考案した。電極材料としてはカーボンボードを用いた。この装置を用いて印加電圧 15 kV、電界強度 1.5 kV/cm、流量 14 mL/min ( $\tau = 27.9$  sec) または 7 mL/min ( $\tau = 55.7$  sec) の条件で日本酒中の酵母の殺菌試験を実施した。日本酒中の酵母の生菌率は 1 回の PEF 殺菌処理で流量 14 mL/min ( $\tau = 27.9$  sec) では 3 桁、7 mL/min ( $\tau = 55.7$  sec) では 4 桁の減少が確認され（図 2）、1 回の PEF 殺菌における殺菌効果の大幅な向上が実現できた。また冷却水を用いることで流量 7 mL/min ( $\tau = 55.7$  sec) の条件でも処理後の温度は 50°C 以下に抑えることが可能であった。同条件で処理した日本酒の官能評価を実施した結果、隔膜を設置する前のような焦げ臭は確認されず、味や風味も高いレベルで保持されていることが確認できた。

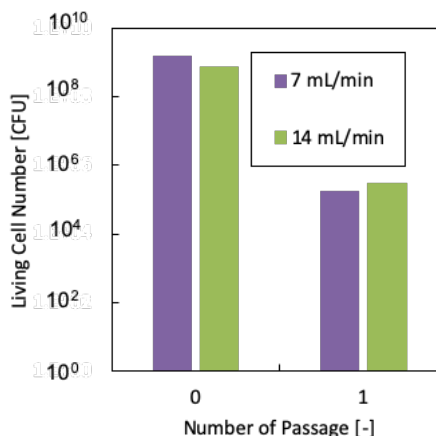


図 2 隔膜導入 PEF 殺菌装置を用いた日本酒中の酵母の殺菌

冷却水として用いる溶液の導電率が殺菌効率に及ぼす影響を調査した。冷却水導電率を 0.1, 1, 10 mS/cm とし大腸菌を対象に殺菌試験を実施した結果、冷却水の導電率を 0.1 mS/cm とした場合には殺菌効果は確認されず、1 mS/cm の時に殺菌効果が確認され 10 mS/cm のときには処理液温度の 50°C 以上への上昇が確認された。そこで 2.5, 5, 7.5 mS/cm にて再度殺菌試験を実施したところ、5 mS/cm で最も高い殺菌効果が得られ、処理液温度の上昇も 40°C 以下に抑えられることが明らかとなった。冷却水の導電率を調整することで隔膜導入 PEF 殺菌装置をより高効率に殺菌処理へ応用できることが示された。

### (5) 損傷菌の存在と回復プロファイルの確認

大腸菌と酵母に対して PEF 殺菌処理後の損傷菌の存在を調査した。PEF 殺菌処理後の大腸菌を至適培養温度 37°C よりも低温の 30, 20, 15°C において非選択培地上で培養し損傷からの回復を促

したが、至適温度で培養したもとのコロニー形成数は変わらなかった。また殺菌処理後に4℃で1, 2, 3日間保存することによる損傷からの回復を促進後に非選択培地上での至適温度培養を実施してもコロニー生菌数の増加は確認されなかった。これらの結果より、PEF殺菌において大腸菌の殺菌を試みた場合には、殺菌処理後の食品の安全性・安定性に大きな問題を引き起こす可能性を有する要件次第で回復し増殖可能となる半致死の損傷菌は存在しないという結論に至った。

酵母に関しても同様の調査を日本酒中で実施し、実際の食品中におけるPEF殺菌での損傷菌の存在調査を実施した。PEF殺菌処理後に至適培養温度30℃よりも低温の20, 15℃において非選択培地上で培養し損傷からの回復を促したが、酵母の場合にも至適温度で培養したもとのコロニー形成数は変わらなかった。また殺菌処理後に4℃で1, 2, 3日間保存後に至適温度のみならず20, 15℃で非選択培地上で培養しても形成コロニー数に変動はなかった。これらの結果より真菌である酵母のPEF殺菌においては半致死の損傷菌は存在しないことが明らかとなった。一方で4℃で保存することで保存後に培養すると形成コロニー数が減少するPEF殺菌条件を見出した。このことからPEF殺菌条件によっては通常の培養でコロニーを形成するものの多少の損傷を受けている非致死の損傷菌が存在し、アルコール存在下ではアルコールによる損傷と加味されて死滅するものと考えられる。

#### (6) PEF殺菌とその後の長期保存が日本主成分に及ぼす影響

日本酒に対しPEF殺菌処理を行った前後ならびに1ヶ月間保存した際の日本酒内の糖、アルコール成分の変化を調査した。PEF殺菌前後および保存期間中において糖、アルコール成分の変化は確認されず、PEF殺菌は食品中の成分に影響するような因子の生成などは起きないことが確認され、PEF殺菌処理は安全性の高い殺菌技術であることが確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

① 谷野孝徳、松井雅義、廣澤充、茂木玲央、大嶋孝之、炭素電極を用いた流通式PEF殺菌装置の開発と日本酒殺菌への応用、第42回静電気学会全国大会、2018. 9. 13

〔図書〕(計 1 件)

① 谷野孝徳、大嶋孝之、日本工業出版、クリーンテクノロジー：静電気技術を用いた日加熱殺菌技術、2017、10、14-17

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：大嶋 孝之

ローマ字氏名：OHSHIMA Takayuki

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院理工学府

職名：教授

研究者番号(8桁)：30251119

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。