

令和元年6月26日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07758

研究課題名(和文) プラズマイオン注入法を用いた食品殺菌技術の開発

研究課題名(英文) Development of food sterilization method by plasma-based ion implantation

研究代表者

角川 幸治 (Kakugawa, Koji)

広島工業大学・生命学部・教授

研究者番号：60441507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Geobacillus stearothermophilus 及びClostridium botulinumを用いて、PBII法による殺菌条件の最適化を行った。殺菌条件を最適化することで、それぞれ6D、3Dの殺菌効果を得ることが出来た。更に、食品の殺菌に最適なプラズマ生成法及び制御法の検討を行った。バーストプラズマと負の高圧パルス電圧を用いてプラズマを生成した。その結果、ガスの選択により、イオン種を決定し、バーストプラズマ用電源電圧の増加、及び高圧パルス電圧の増加によりシース内イオン密度が増加し、プラズマ中のイオン密度の高いプラズマの生成が示唆され、食品用殺菌装置の改良に向けた知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義は、80 以下の温度帯で耐熱性芽胞菌に対して6Dの殺菌効果が得られることを示し、また、ガス種の違いにより、芽胞細胞壁へ与える影響が異なることを明らかにした点にある。更に、食品殺菌に有用なガス種の一つとして酸素ガスを見出し、バーストプラズマと負の高圧パルス電圧を適切に組み合わせ、プラズマ中のイオン密度と速度を制御し、食品の殺菌を可能にした点にある。次に、非加熱殺菌手法を用いて耐熱性芽胞菌の殺菌が可能である事を示し、更に、一般的な酸素ガスを利用し、通常のプラズマチャンバーで動作できる高圧パルス電圧を用いて食品の殺菌が可能である事を示した点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to optimize the condition for the sterilization of Geobacillus stearothermophilus and Clostridium sporogenes by using the PBII method. As a result of the examination, the bactericidal effects of 6D and 3D were obtained respectively. This result shows that the PBII process is effective at the sterilization of thermotolerant spores. We examined the optimal plasma generation method and control method for food sterilization. Oxygen gas was used to sterilize the food. A plasma was generated using a burst plasma and a negative high voltage pulse voltage. As a result, the choice of gas determines the ion species, the increase of the power supply voltage for burst plasma, and the increase of the high voltage pulse voltage increase the ion density in the sheath, suggesting the formation of plasma with high ion density in the plasma. It is considered to be one of the effective conditions for sterilization of food.

研究分野：応用微生物学

キーワード：応用微生物学 食品加工 非加熱殺菌 プラズマ処理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プラズマとは、電離した気体であり、固体、液体、気体に次ぐ第4の状態と表される。プラズマを用いた技術は多岐にわたり、とりわけ半導体製造技術に用いられている。また、半導体関連以外にも、特に、バイオ・医療への応用が行われており、主として殺菌を目的とした開発が行われてきた。プラズマ殺菌の技術に関しては、過酸化水素ガスを使用し、医療機器を殺菌する技術があるが、医療用機器の殺菌以外の用途には広がっていない。

さて、過酸化水素ガスを使用するのに代わる技術として、真空槽内にプラズマを生成し、そのプラズマに対して高圧パルス電圧を印加するプラズマベイスイオン注入法(PBII法)がある(図1)。PBII法は、プラズマ中のサンプルに対して、負の高圧パルス電圧を印加することでサンプル表面にイオンシースが形成され、表面改質を行う技術である。シースの形状をサンプルに沿った形状にすることで、イオンを均一に注入することが可能であり、制御性の良さから、様々な形状物への表面処理方法として有効な手法として有望視されている。

PBII法を用いる殺菌技術は、一般的な低温プラズマ殺菌装置で使用されている危険なエチレンオキシドや過酸化水素ガスを用いることなく、試料の殺菌ができる独創的で、かつ、有望な技術であり、金属等の殺菌には有効である事を確認しているが、さらなる殺菌対象の拡大が期待されている(図2)。

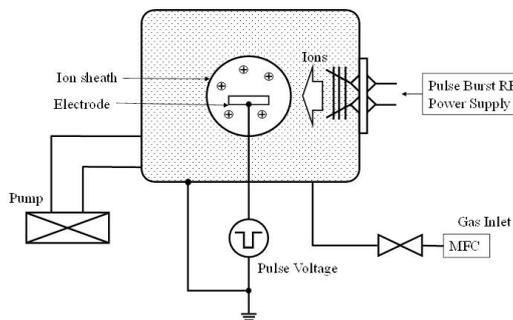


図1 プラズマイオン注入法の模式図

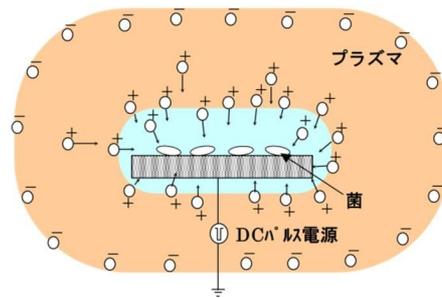


図2 PBII法による殺菌処理の原理

### 2. 研究の目的

殺菌の主な目的は、有害な微生物を殺すことにある。食品衛生法に基づく食品・食品添加物等の規格基準では、食肉製品、鯨肉製品および魚肉練り製品の製造基準として、使用する香辛料の芽胞菌数は1gあたり1,000個以下と定められている。その為、この規格を満たすように殺菌処理が行われており、一般的には高圧加熱殺菌が用いられている。しかし、高圧加熱殺菌処理は食品の品質を損なう恐れがあるため、非加熱殺菌法を用いた新規殺菌技術が注目されている。一例として、超高压処理や電解処理によるもの、また、大気圧プラズマによるものなどがあげられる。しかし、いずれの処理も食品そのものにダメージが出たり、一般細菌の殺菌は出来るものの耐熱性芽胞菌の殺菌が不十分であったりと実用機への応用は出来ていないのが実情である。

そこで本研究では、PBII法を用いた食品の新規非加熱殺菌技術の開発を目的とし、研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) PBII法を用いた殺菌装置の殺菌効果の検証

PBII法を用いた殺菌装置の殺菌効果を検証するため、指標菌とし *Geobacillus stearothermophilus* NBRC13737、*Clostridium sporogenes* NBRC16411 を用いた。*G. stearothermophilus*、*C. sporogenes* については、芽胞液を調整し、また *S. aureus* については、栄養細胞を集菌後、図1に示すような装置を用いてプラズマ処理を行った。プラズマ処理の際は、ガス種に酸素ガスもしくは窒素ガスを用い、周波数を1~5kHz、印加電圧を-2~-6kV、デレイ時間を50~250 $\mu$ s、パルス幅を5~25 $\mu$ s、RF電源を0~240VA、処理時間を10~40分に変化させ、最適殺菌条件の検討を行った。また、走査型電子顕微鏡による観察も行い、プラズマ処理が微生物に及ぼす影響について調査した。

#### (2) 実食品を用いたPBII法の有効性の検証

試験用の香辛料として、生存菌数の多かったコリアンダー、クミンを用い、それぞれの素材に対してPBII処理を行い、PBII処理の有効性を調査した。また、モデル食品として、オートクレーブ処理を行ったビーフジャーキーの表面に *Staphylococcus aureus* NBRC13276 を塗布したものを調製し、香辛料と同様にPBII処理の有効性を調査した。

#### (3) 食品の殺菌に最適なプラズマ生成法、および制御法の検討

本実験では、高圧パルス電圧は、パソコン内のコンピュータ制御システム(Fotgen2)により制御した。放電電流-高圧電圧波形の測定にはデジタル・オシロスコープ(waverunner、IWATSU-LeCroy社製)を用いて行った。ガス種に酸素ガス(99.99995%)、窒素ガス(99.9998%)を用いて行った。それぞれのガスは、チャンバー内の圧力を10Pa程度まで排気し、それ

そのガスを圧力 1kPa まで注入し、この操作を 3 回繰り返すことでチャンバー内のガスの純度を 99.99999%になるようにした。また、発光分光法を用いて、PBII 法で生成されたプラズマの発光分光を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) PBII 法を用いた殺菌装置の殺菌効果の検証

*G. stearothermophilus* の芽胞に対する最適殺菌条件の検討を行った。酸素ガスを用い、周波数 1kHz、印加電圧 - 6kV、ディレイ時間 50 $\mu$ s、パルス幅 10 $\mu$ s、RF 電源 240VA、処理時間 40 分の時に、殺菌効果は最大の 6D が得られた(図 3)。次に、*C. sporogens* の芽胞に対する最適殺菌条件の検討を行った。上記した *G. stearothermophilus* と同様の条件で、3D の殺菌効果を得られた。しかし、本菌については、20 分以上処理を続けても殺菌効果の向上は見られなかった。電子顕微鏡の観察でも、芽胞の損傷が少ないため、芽胞の細胞壁構造の違いにより、殺菌効果に大きな影響が出ているものと考えられた。なお、殺菌効果に影響を与えるイオンシースについては、40 分までは維持できている事が確認出来た。なお、ガス種として窒素ガスを用いた場合は、十分な殺菌効果を得られなかった。これは、窒素ガスの場合は、非反応性エッチングが起こったためであると考えられる。以上の様に、耐熱性芽胞であっても、非加熱殺菌技術である PBII 法を用いて一定程度の殺菌を行う事が出来た。

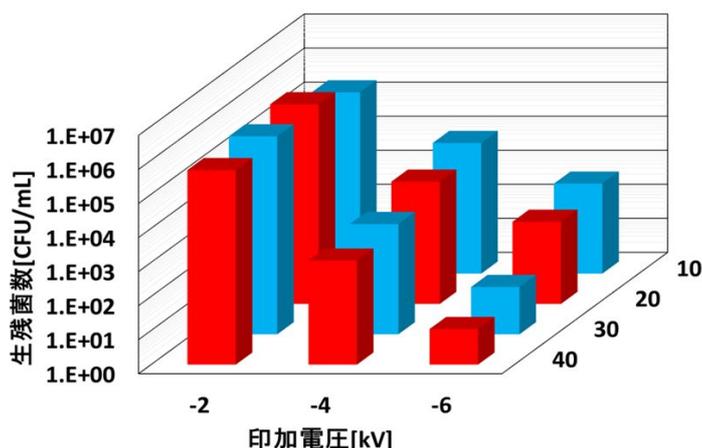


図 3 *G. stearothermophilus* の PBII 法による殺菌結果

##### (2) 実食品を用いた PBII 法の有効性の検証

香辛料であるクミンとコリアンダーを用いて、PBII 法による殺菌効果の検証を行った。酸素ガスを用い、周波数 1kHz、印加電圧 - 8kV、ディレイ時間 5 $\mu$ s、処理時間 10 分で PBII 処理を行ったが、両サンプルともほとんど殺菌効果の確認が出来なかった。そこで、プラズマ処理装置のチャンバー内に、水や過酸化水素を 10~30 $\mu$ L 滴下し、水蒸気や過酸化水素からプラズマを発生させ処理を行った。その結果、いずれの素材についても 1D の殺菌効果となった。殺菌処理後、どのような微生物が生き残っているのかを調査するため、生残菌の菌叢調査を行った。その結果、*Bacillus subtilis*、*B. licheniformis* といった耐熱性芽胞菌が多くを占めていることが分かった。(1)に示したように、モデル実験では、耐熱性芽胞菌であっても条件の最適化で 6D の殺菌効果を得ることが出来ているが、実食品では、1D 程度の殺菌効果となった。これは、香辛料をプラズマ処理装置にかける場合に、サンプルの重なりやサンプル自体の構造の関係で、イオン注入が理想通りに行かないことが原因であると考えられる。次に、ビーフジャーキーに *S. aureus* を塗布し、殺菌条件の最適化を行った。その結果、酸素ガスを用い、周波数 1kHz、パルス幅 5 $\mu$ s、処理時間 30 分の時に、3D の殺菌効果を得ることが出来た。上記した香辛料の場合とは異なり、生存している微生物が耐熱性芽胞菌で無い場合は、実食品であっても PBII 法による殺菌効果を確認することが出来た。また、PBII 法は、チャンバー内を一旦真空状態にするため、ビーフジャーキーの品質変化が起こっているかどうか調査を行った。その結果、水分含量、テクスチャー等に処理前と処理後に有意な差は見られず、PBII 法による品質劣化はあまり大きくないものと考えられた。いずれにせよ、実食品を用いる場合は、食品表面の構造により、イオン注入がモデル実験のようにいかない可能性が高いため、装置改良も含めたさらなる殺菌条件の最適化が必要であると考えられる。

(3) 食品の殺菌に最適なプラズマ生成法、および制御法の検討

プラズマを扱う上で、プラズマの状態を知ることは重要であり、そのプラズマの状態を決定するのが、プラズマパラメータ(温度、密度など)である。そこで、まずは負の高圧パルス電源のみを有する自己点弧プラズマを用いた PBII 法における、形成されたイオンシース内部のイオン密度を、モジュレータ回路を基礎として算定した。図 4 に、例として酸素ガスを用いた場合のターゲット電流及び印加電圧波形を示す。

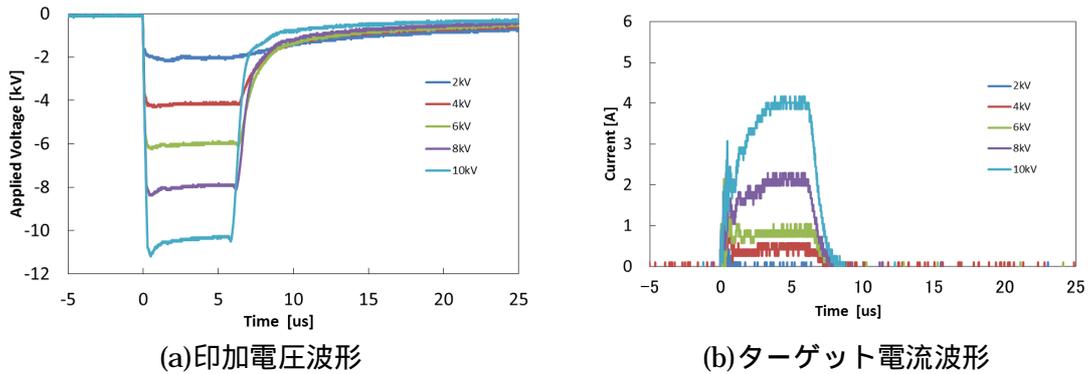


図 4 取得されたターゲット電流及び印加電圧波形

酸素ガスを用いた場合も窒素ガスを用いた場合も、印加電圧の増加に従って電流は大きくなり、酸素ガスにおいては印加電圧 10kV のとき、定常電流は約 6.2A 流れ、窒素ガスでは印加電圧 10kV のとき、約 5.2A 流ることが分かった。しかしながら、いずれのガスを用いた場合でも、8kV 以下では、同程度の電流量であることが分かった。このことから、同じ印加電圧でも高電圧になるほど、定常電流に差が出るということが分かった。これは、ガス種による二次電子放出率の違いによるものであると考えられる。また、自己点弧プラズマのみでプラズマを生成させた電流波形では、印加電圧のオーバーシュート部分でプラズマが生成され、その間に電流波形が立ち上がり定常電流を示すことが確認された。

窒素ガス及び酸素ガスの自己点弧プラズマ生成について、4kV 以降では、明確な自己点弧プラズマの生成が確認され、電流値が 0.26A 流れたとき、目視で自己点弧プラズマの発光が観察され、さらに電流値を増加させることで、強い発光が観察された。

本実験の結果から、自己点弧プラズマにおいてプラズマが生成されている範囲でシース内イオン密度の算定を行った(図 5)。

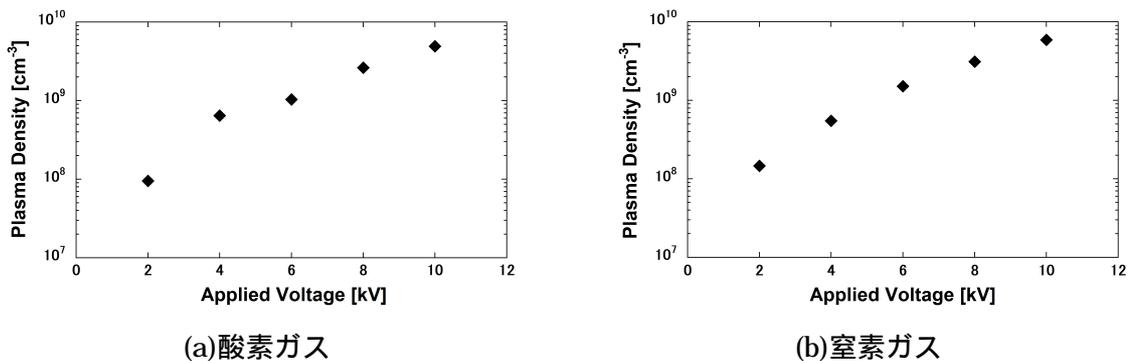


図 5 シース内イオン密度算定結果

この結果から、酸素ガス及び窒素ガスにおいてシース内イオン密度が算定されることが示された。また、印加電圧を増加させることで、シース内イオン密度が増加していることが示された。印加電圧 10kV においては、シース内イオン密度は  $4.8 \times 10^9 \text{cm}^{-3}$  であった。また、窒素ガスでは、シース内イオン密度は  $5.9 \times 10^9 \text{cm}^{-3}$  であった。

次に、反応チャンパー内に水蒸気を供給する治具を設置し、カップ内に純水を入れ、油回転ポンプを用いて真空にし、蒸発によりチャンパー内に水蒸気を満たした状態で PBII 法を適用した。その結果、数 10Pa から数 Pa の圧力範囲の間、放電が確認出来た(図 6)。

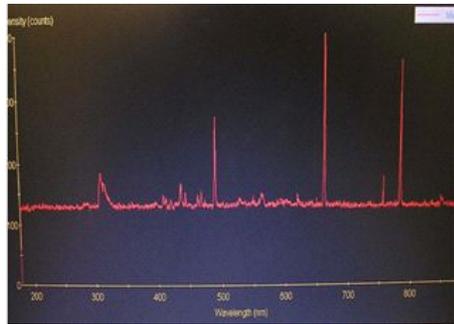


図 6 H<sub>2</sub>O プラズマの発光スペクトル

以上の結果をまとめると、PBII 法においてモジュレータ等価回路を基礎として、シース内イオン密度を求めることが出来た。PBII 法において、殺菌プロセスで使用される自己点弧プラズマを形成し、取得した放電電流-高圧電圧波形からプラズマ密度及びシース長の算定を行うことが出来た。この方法を用いて、プラズマ密度、シース長等の今後装置設計する際に重要なパラメータの一部を求めることが出来た。また、印可電圧の増加または圧力を増加させることで、シース内イオン密度が増加することが示され、さらに RF 電源と併用することで、自己

点弧プラズマと比較してシース内イオン密度が増加することが示された。上記に加え、チャンパー内で水を蒸発させることで、PBII 法の殺菌において重要な役割を果たす OH ラジカルを発生させることが出来ることを、発光分光法を用いて確認することが出来た。これらは、今後、殺菌装置の改良や新たな設計を行う際に有用なデータとなる。(1)(2)に示したように、実食品の殺菌には、イオンシースを長時間安定させ、また、イオンシース内のイオン密度を増加させ、さらに OH ラジカル等、殺菌に有効なラジカル成分の発生が有効であると考えられる。今後は、物理化学的なシミュレーション結果を反映させた殺菌条件の設定及び殺菌装置の改良に取り組んでいきたい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) 角川幸治、田中武、プラズマベースイオン注入法の食品殺菌への応用について、アグリバイオ、査読無、Vol.2(5)、P.64-98(2018)
- (2) K. Kakugawa、M. Hosotani、M. Arikado、T. Tabe、K. Fukutomi、Y. Tsuchiya、T. Tanaka、Experimental study on sterilization of food with self-igniting plasma formed from liquid using plasma-based ion implantation、ELECTROTECHNICA & ELECTRONICA、査読有、Vol.53(7-8)、P.189-193(2018)
- (3) M. Hiyama、K. Kakugawa、A. Yakushiji、K. Watanabe、R. Matsuda、Y. Tsuchiya、T. Tanaka、Optimum conditions for sterilization of *Geobacillus stearothermophilus* spores using plasma-based ion implantation、ELECTROTECHNICA & ELECTRONICA、査読有、Vol.53(7-8)、P.194-198(2018)
- (4) K. Watanabe、R. Matsuda、T. Tabe、M. Hiyama、K. Sakasegawa、Y. Yamamoto、K. Kakugawa、T. Tanaka、Applied voltage dependence of plasma characteristic for food sterilization using PBII method、ELECTROTECHNICA & ELECTRONICA、査読有、Vol.53(7-8)、P.199-203(2018)
- (5) R. Matsuda、Y. Kijima、K. Kakugawa、H. Toyota、T. Tanaka、K. Vutova、Control of Plasma parameters by Penning ion effect、ELECTROTECHNICA & ELECTRONICA、査読有、Vol.53(7-8)、P.204-207(2018)

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) R. Matsuda、Y. Kijima、K. Kakugawa、H. Toyota、T. Tanaka、K. Vutova、Control of Plasma parameters by Penning ion effect、13th international conference on Electron Beam Technologies、2018 年
- (2) K. Watanabe、R. Matsuda、T. Tabe、M. Hiyama、K. Sakasegawa、Y. Yamamoto、K. Kakugawa、T. Tanaka、Applied voltage dependence of plasma characteristic for food sterilization using PBII method、13th international conference on Electron Beam Technologies、2018 年
- (3) M. Hiyama、K. Kakugawa、A. Yakushiji、K. Watanabe、R. Matsuda、Y. Tsuchiya、T. Tanaka、Optimum conditions for sterilization of *Geobacillus stearothermophilus* spores using plasma-based ion implantation、13th international conference on Electron Beam Technologies、2018 年
- (4) K. Kakugawa、M. Hosotani、M. Arikado、T. Tabe、K. Fukutomi、Y. Tsuchiya、T. Tanaka、Experimental study on sterilization of food with self-igniting plasma formed from liquid using plasma-based ion implantation、13th international conference on

Electron Beam Technologies、2018年

- (5) 角川幸治、薬師寺亜耶、山城朱音、水胤友宏、狩野卓也、田中武、プラズマベースイオン注入法を用いた *Bacillus stearothermophilus* の殺菌におけるパルス幅の最適化、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年
- (6) K. Kakugawa、A. Yamashiro、K. Saitoh、T. Mizutane、T. Kano、T. Tanaka、The effect of pulsed width on the sterilization of *Bacillus stearothermophilus* spores using plasma-based ion implantation、Asia-Pacific Conference on Engineering & Applied Sciences、2017 年
- (7) 岩下健嗣、町田竜朗、有元友基、細谷賢斗、足立拓磨、水胤友宏、山城朱音、角川幸治、田中武、食品の殺菌に最適なプラズマ生成条件、第 5 回電子デバイス・回路・照明・システム関連教育・研究ワークショップ、2017 年
- (8) 水胤友宏、狩野卓也、岡聡明、平田良樹、山城朱音、國近栄梨子、角川幸治、田中武、プラズマベースイオン注入法の理解のためのシミュレーションソフト(PEGASUS)の初歩的な応用、第 64 回 応用物理学会春季学術講演会、2017 年
- (9) 山城朱音、水胤友宏、狩野卓也、平田良樹、岡聡明、角川幸治、田中武、*Bacillus stearothermophilus* のプラズマ殺菌に関する研究、第 4 回 電子デバイス・回路・証明・システム関連 教育・研究ワークショップ、2016 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 武

ローマ字氏名：Takeshi Tanaka

所属研究機関名：広島工業大学

部局名：工学部電子情報工学科

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 10197444

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。