

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05903

研究課題名(和文)複合ガスを用いたプラズマベースイオン注入法による高効率食品殺菌技術の開発

研究課題名(英文)Development of Highly Efficient Food Sterilization Technology by Plasma-Based Ion Implantation Using Composite Gases

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：PBII処理に用いるサンプル固定用シャーレについて、その導電性の違いが殺菌効果に及ぼす影響を調査した。その結果、低い印加電圧の場合は、導電性のステンレスを用いた方が殺菌効果は高かった。その一方で、印加電圧を高くすると、誘電体のガラスを用いても絶縁破壊が起こり、殺菌効果に違いが見られなかった。これらの知見と初歩的なシミュレーションの結果から、複合ガスとしてHHOガスを用いたところ、-2kVのような低印可電圧であってもステンレスシャーレを併用することで窒素ガスや酸素ガスよりも優れた殺菌効果を示すことが確認出来た。また、食品素材に対してPBII処理を行い、表面加工が可能であることが確認出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、HHOガスをチャンバー内に導入し、サンプル固定用シャーレとしてステンレスを用いることで、酸素ガスや窒素ガスを用いるよりも印加電圧等を下げた状態、すなわち温和な条件でも効果的に殺菌出来る事を見いだしたことにある。また、サンプル固定用シャーレに誘電体であるガラスを用いたとしても、一定レベル以上の印加電圧を负荷すれば絶縁破壊が起こり、PBII処理が可能であることを見いだした。この結果は、誘電体である食品素材を対象とする場合でも、条件を整える事で、表面加工や殺菌処理が可能であり、PBII処理が食品加工に利用出来る可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The effect of the different conductivity of the Petri dishes used for fixing samples for PBII treatment on the sterilizing effect was investigated. The results showed that the sterilization effect was higher when conductive stainless steel was used at low applied voltages. On the other hand, at higher applied voltages, the dielectric breakdown occurred even when dielectric glass was used, resulting in no difference in sterilizing effect. Based on these findings and the results of rudimentary simulations, it was confirmed that the use of HHO gas and the stainless steel petri dish, even at a low applied voltage such as -2kV, showed a better sterilizing effect than nitrogen gas or oxygen gas. The PBII treatment was also applied to food materials to show that surface processing is possible.

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 (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の状態とされる。プラズマを用いた技術は半導体製造技術等に用いられてきたが、近年、医療分野での殺菌を目的とした開発も行われてきた。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り、既に実用機も販売されている。しかし、健康面への影響なども指摘されており、医療機器以外の殺菌には広がっていない。さて、過酸化水素ガスの使用に変わる技術として、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、試料の殺菌が出来る独創的で、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)。

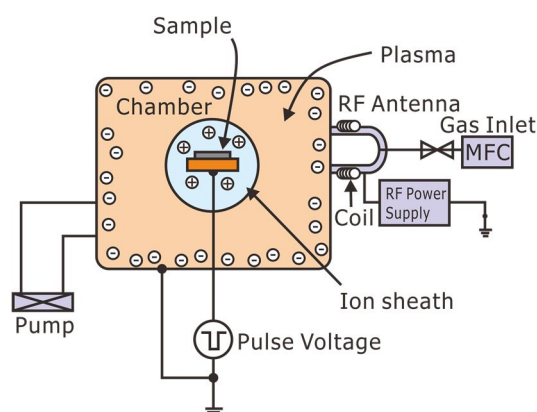


図1 プラズマイオン注入法の模式図

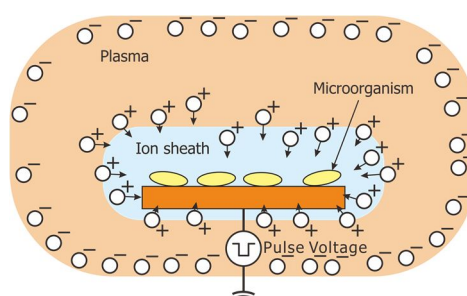


図2 PBII法による殺菌処理の原理

### 2. 研究の目的

これまで、当グループでは、*Geobacillus stearothermophilus* や *Clostridium sporogenes* を指標菌として PBII 法の殺菌効果について検証を行い、その有効性について確認を行ってきた。その結果、印加電圧-12kV、RF 出力 240VA の 10 分処理において、*G. stearothermophilus* に対して 6D の殺菌効果を実現できた。しかし、将来、食品を対象とした殺菌装置として検討するには、出力が強すぎると考えられた。そこで、本研究では、新たに、PBII 法に複合ガスを利用し、できるだけ低い出力を用いて殺菌効果を向上させ、かつ、食品の栄養成分等に影響を与えないプラズマ制御法の検討及び最適殺菌条件を見いだすことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)PBII法に混合ガスを用いた際の最適なプラズマ制御法の検討及び最適殺菌条件の検討

PBII法を用いて殺菌を行う際の最適なプラズマ制御法を検討するため、まずは、窒素ガス、酸素ガス及び混合ガスについて、種々のパラメーターを変更し、それぞれの殺菌挙動について詳細なデータ取りを行った。PBII処理前後の微生物細胞は、電子顕微鏡観察を行った。混合ガスについては、様々な検討の結果、精製水を電気分解して生成させた水素と酸素の混合ガス(HHOガス)を用いた。プラズマシミュレーションについては、プラズマシミュレーションソフト(ペガサス社製 PIC-MCCM)を用いて、PBII法を用いた際の初歩的なプラズマのシミュレーションを行った。そして、その結果に基づき PBII 処理装置の改造を行った。具体的には、混合ガスの供給方法は、半導体製造装置の供給方法をベースに設計・作製した。その後、PBII 処理装置に HHO ガスを供給できるようにし、上記した方法と同様に殺菌実験を行った。

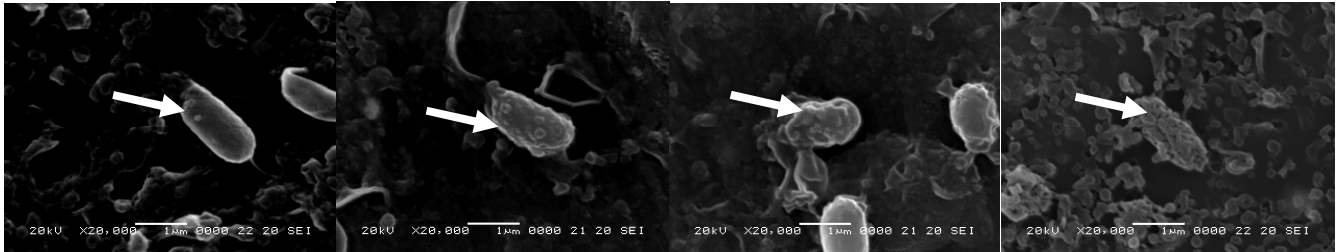
#### (2)PBII法を用いた食品の表面処理技術の開発

実験サンプルとしては、市販されているキャベツと豚バラ肉を使用した。それぞれの試料は 2cm×2cm の大きさに切り、予備乾燥を行った後、酸素ガスを用い PBII 処理を行った。食品試料を用いた実験については、装置使用上の制限により、RF 出力付きのプラズマ処理装置ではなく、自己点弧型のプラズマ処理装置を使用した。PBII 処理後の食品試料については、一般生菌数の測定、ビタミン C の定量、テクスチャー測定を行い、PBII 処理が食品の品質に与える影響について評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) PBII 法に混合ガスを用いた際の最適なプラズマ制御法の検討及び最適殺菌条件の検討

PBII 法の最適なプラズマ制御法を明らかにする一端として、まずは、サンプル固定用シャーレの導電性が、微生物細胞にどのような影響を与えるか評価を行った。その結果を図3に示す。



(a) 印加電圧-3kV (b) 印加電圧-5kV (c) 印加電圧 -3kV (d) 印加電圧 -5kV

図3 PBII 処理された *G. stearothermophilus* の耐熱性芽胞の電子顕微鏡写真

(a), (b) : Spores fixed on glass petri dish, (c), (d) : Spore fixed on stainless petri dish

図3に示したとおり、*G. stearothermophilus*の芽胞に対してPBII処理を行うと、(a)(b)に示したとおりガラスシャーレを用いた場合は、高電圧を印加するにつれて、芽胞の表面が削れている様子が確認出来る。一方、(c)(d)に示したとおりステンレスシャーレを用いた場合は、芽胞の表面が削られるだけでなく、穴が開くような変化が確認出来る。これは、芽胞固定用のシャーレとしてステンレス素材を用いた場合は、ガラス素材を用いた場合に比べて高電圧が印加される時間が長く、イオンエネルギーが増加するためであると考えられる。

次に、芽胞の死滅率を測定し、図4にその結果を示す。

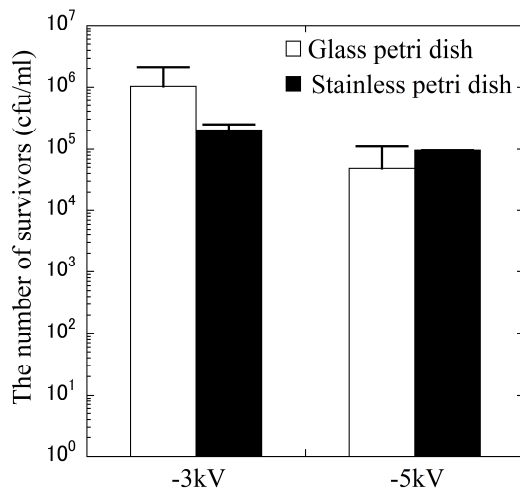


図4 サンプル固定用シャーレの材質が殺菌効果に与える影響。

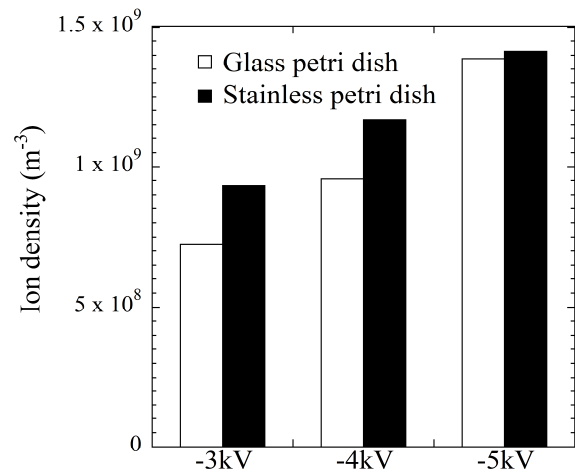


図5 サンプル固定用シャーレの材質とイオン密度の関係

図4に示したとおり、印加電圧-3kVでは、ステンレスシャーレを用いた方が殺菌効果が高くなっているが、-5kVでは差がなくなっている。これは、ステンレスを使用した場合は、芽胞の表面に穴が開くため、内容物の漏出が起こり、死滅しやすくなったためと思われる。一方ガラスを使用した場合は、表面が削られてはいるものの、死滅するほどは表面が削られていないものと思われる。-5kVについては、ガラスを使用した場合の表面の削り度合いが大きくなり、死滅する芽胞が一気に増えたものと考えられる。なお、ガラスよりもステンレスの方がイオンのエネルギーの加速時間が長く、エネルギーが高くなると考えられる。そのため、ステンレスを用いた場合には、穴が開くのではないかと考えられる。

次に、上記の考察を検証するため、イオン密度の算出を行った。その結果を図5に示す。

図5に示したとおり、イオン密度は、-3kVまではガラスの方が低く、-5kVになるとほぼ同程度になった。これは、ガラスが誘電体であるということに起因していると考えられる。すなわち、印加電圧-3kVの場合、誘電体により試料表面にかかる電圧が減少する。また、印加電圧を上昇させると、二次電子放出によるチャージアップを、ガラス基板を通過した電流では抑制できず、ステンレスよりも気相に印加される電圧が減少する。しかし、-5kVまで上昇させると気相中の



プラズマ密度が上昇し、誘電体表面に照射するイオンが増加し、伝導率が増加し、結果として、誘導体の抵抗率が減少しているのではないかと示唆される。その為、イオン密度を測定すると、印加電圧-5kV の場合には、ステンレスを用いた場合とガラスを用いた場合のイオン密度が同程度となり、殺菌効果についても同程度になったのではないかと考えられる。以上の事から、印加電圧を増加させると、サンプル固定に金属を用いてもガラスを用いても大きな差は出ないと考えられる。しかし、将来的に食品を対象とした殺菌を行う事を想定した場合には、より低い印加電圧でサンプルにイオンを衝突させる事が出来ると考えられるステンレスを用いることが適切であると考え。よって、以後は、導電性の高いステンレスをサンプル固定に用いることとした。

次に、プラズマシミュレーションについては、まず、池田の結果から、粒子濃度が0から0.2までの位置の電子、水素、アルゴン、および塩素をみると、電子、イオンの質量の増加に伴い、濃度の傾きが減少することが観察されている(池田圭, 3.2 流体モデルによるプロセスプラズマシミュレーション, J.PlasmaFusionRes. Vol. 93, No. 7 (2017) 327-331)。この結果と、アルゴン、窒素、および、酸素等を用いた結果を用いてシミュレーションした結果を用いて、水素酸素混合ガスを用いた場合の状態を推察した。

初歩的なシミュレーション結果に基づいて混合ガスの供給・流量制御装置の試作を行ったが、簡易な流量計とバルブを用いるだけでは、混合ガスの供給を安定的に行う事が出来なかったため、流量計にマスフローコントローラーを用いたところ、殺菌を行う際のガス圧を精度良くコントロール出来るようになった。それに基づき殺菌実験を行った。その結果を図6に示す。

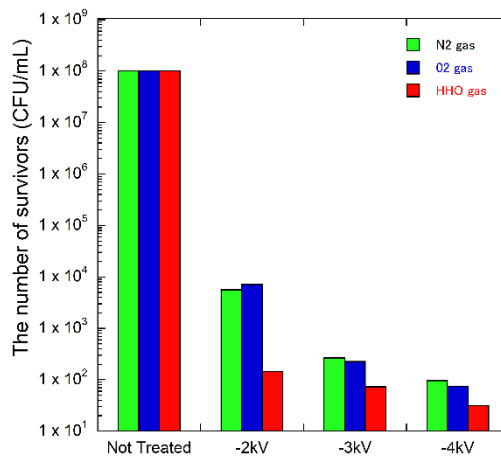


図6 PBII 処理に用いるガスの違いが *E. coli* の殺菌効率に与える影響

図6に示したとおり、印加電圧が-2kVという低い状態であっても、HHO ガスを用いた場合は、窒素ガスや酸素ガスよりも効果的に殺菌効果を上昇させることが出来る事が確認出来た。その差は、印加電圧を上昇させる事で小さくなったが、特に低印可電圧でのHHO ガスの優位性が確認出来た。これは、上記した酸素ガスを用いた際の減少と同様の理由によるものであると考える。

なお、現時点で未公表であるため詳細なデータは示さないが、耐熱性芽胞菌である *G. stearothermophilus* に対しても、RF 出力 240VA といったような高出力を用いなくとも 7D 以上の殺菌効果を得ることが出来る条件を見いだすことが出来た。

## (2)PBII 法を用いた食品の表面処理技術の開発

PBII 法の食品加工装置としての可能性を探るため、食品としてキャベツ及び豚バラ肉を用いてPBII 処理を行った結果を示す。

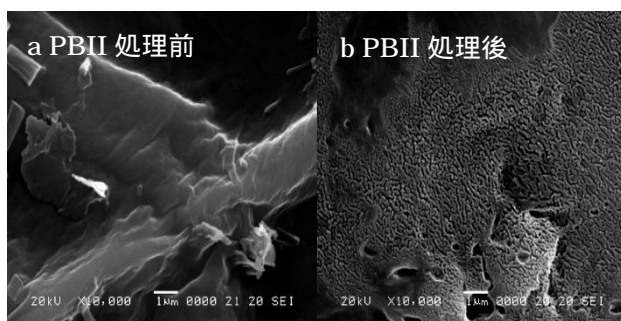


図7 PBII 処理前後のキャベツの電子顕微鏡写真

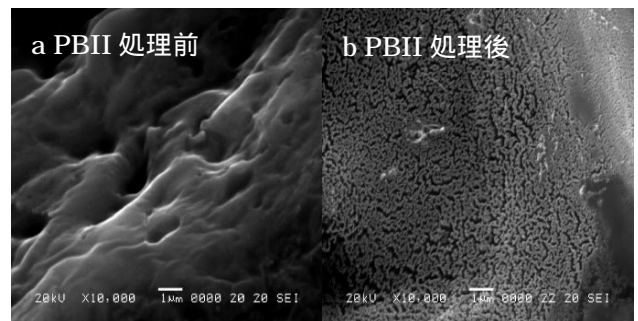


図8 PBII 処理前後の豚バラ肉の電子顕微鏡写真

詳細なデータは省略するが、図7a、図8aにキャベツ、豚バラ肉の処理前の電子顕微鏡写真を

示す。なお、キャベツ、豚バラともに-6kV以下の電圧では図7a、図8aとほぼ同様の状況で、表面に傷は見られなかった。印加電圧を上げると、図7b、図8bに示すように傷の数は増加し、食品素材の表面に細かな傷を付けることが出来た。これは、印加電圧の上昇に伴い、試料に衝突するイオンが増加したためと考えられる。また、キャベツと豚バラ肉の導電率の違いが、衝突するイオンの数に影響している可能性もある。図7b、図8bが示すように、キャベツの方が穴のない面積が大きいことから、キャベツは豚バラに比べて導電性が低く、イオン注入の効率が悪い部分があったのではないかと考えられる。実際、PBII処理後の一般生菌数を測定したところ、キャベツの死滅率が1.3D、豚バラ肉の死滅率は1.8Dとキャベツの死滅率が豚バラ肉の死滅率よりも悪かった。この殺菌効果の違いも、食品素材そのものの導電率の違いが原因と考えられる。なお、PBII処理中の温度についてサーモラベルを用いて測定したところ、チャンバー内は40以下の温度であったことが確認出来ている。

次に、PBII処理が食品中のビタミンC含量に与える影響について調査を行った。その結果を図9に示す。

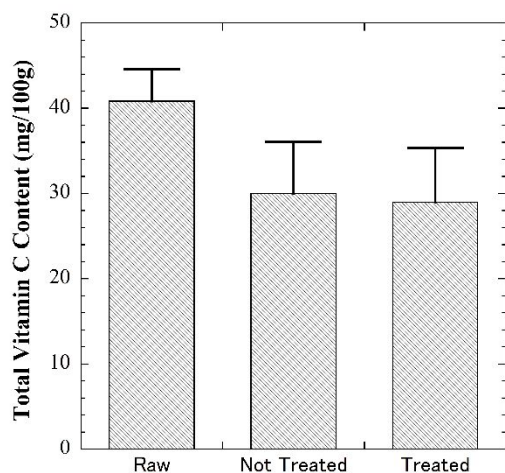


図9 PBII処理がキャベツのビタミンC含量に及ぼす影響

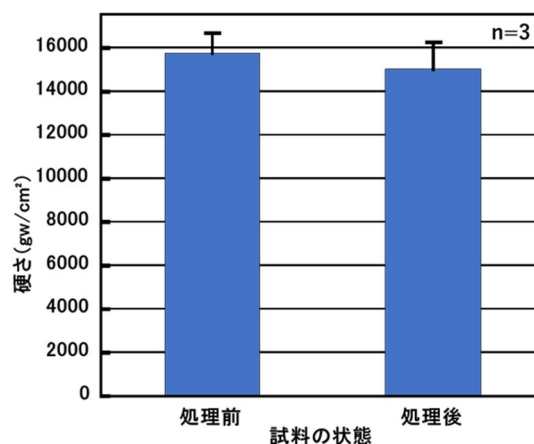


図10 PBII処理前後の豚バラ肉のテクスチャー測定の結果

図9に示すように、「未処理」で示している乾燥キャベツは、生のキャベツに比べてビタミンCが40.1mg (mg/100g)から30.0mg (mg/100g)と25.2%減少していた。一方、乾燥済みキャベツとPBII処理済みキャベツのビタミンC含有量に有意差は認められなかった。したがって、PBII処理そのものがビタミンC含量に影響を与えることはないと考えられる。一般的に、生キャベツを処理する際には、次亜塩素酸ナトリウムに浸漬することが行われている。その場合、ビタミンCの総含有量は27%減少すると報告されている。従って、今後の課題は、PBII処理の準備段階に行っている乾燥処理にあると思われる。

次に、図10に、PBII処理前後の豚バラ肉のテクスチャー測定の結果を示す。

図10に示したとおり、PBII処理前後では、処理後にやや軟らかくなっていたが、有意な差とはなっていない。

以上の結果をまとめると、PBII処理によって食品の表面に穴を開けることが出来た。この結果は、PBII処理により、PBII処理を行った食品に、調味液や酵素液に浸漬することで、調味液や酵素液の浸透性を向上させることができることを示唆している。加えて、PBII処理自体は、ビタミンCなどの食品の栄養成分には影響を及ぼしていないと考えられる。さらに、PBII処理によって、テクスチャーを軟らかく変化させることが出来る可能性があるが、現時点では、有意な差とはなっていない。これは、PBII処理で作り出した穴の深さが浅いためと考えられる。現在、高齢者向けの食品を対象とした軟化処理技術が必要になってきている。今後、PBII処理の条件を最適化し、傷の深さを深くし、食品表面の食感を柔らかくすることができれば、上記した調味液等の浸透性の向上と併せ、PBII処理を様々な食品素材の加工装置として利用できる可能性が広がったと考える。

なお、実験装置の運用上の問題から今回の研究ではRF出力付きのPBII処理装置を用いて食品素材を処理することは行っていない。(1)に示したとおり、RF出力を併用することによって、食材に対しても殺菌効果を向上させ、さらにより深い穴を開けることが出来る可能性があり、より効果的な加熱殺菌と調理を両立させることが出来る可能性が見いだせた。これらの結果から、PBII処理装置は、新たな食品加工装置として応用できる可能性を示す事が出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 角川幸治、田中武	4. 巻 4(5)
2. 論文標題 新規食品殺菌装置の開発を目的としたプラズマベースイオン注入(PBII)法のフラットサワー菌に対する殺菌効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 72-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakugawa, K., Umamoto, S., Noda, T., Nosaki, K., Tanaka, T., Vutova, K.	4. 巻 57
2. 論文標題 Effect of the conductivity of the petri dish placed on the electrode on the surface layer of the spores in the PBII method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ELECTROTECHNICA & ELECTRONICA	6. 最初と最後の頁 41-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Umamoto, S., Kakugawa, K., Nosaki, K., Noda, T., Tanaka, T., Vutova, K.	4. 巻 57
2. 論文標題 The sterilization effect of plasma-based ion implantation on prokaryotic microorganisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ELECTROTECHNICA & ELECTRONICA	6. 最初と最後の頁 46-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 梅本章矢、酒瀬川健人、日山元子、田中武、角川幸治
2. 発表標題 酸素ガスを用いた、プラズマベースイオン注入法がGeobacillus stearothermophilus の芽胞に与える影響について
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Kakugawa, Motoko Hiyama, Yoshinobu Tsuchiya, Takeshi Tanaka
2. 発表標題 Influence of ion sheath size on the sterilization effect of <i>Geobacillus stearothermophilus</i> by plasma-based ion implantation (PBII) method
3. 学会等名 2019 international Conference on Agricultural and Food Science 3rd ICAFS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅本章矢, 河野隆司, 田中武, 角川幸治
2. 発表標題 プラズマベースイオン注入法に用いるサンプルプレートの導電性の違いが <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 芽胞の損傷に与える影響について
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第61回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kakugawa, K., Umemoto, S., Noda, T., Nosaki, K., Tanaka, T., Vutova, K.
2. 発表標題 Effect of the conductivity of the petri dish placed on the electrode on the surface layer of the spores in the PBII method
3. 学会等名 The Fourteen International conference on Electron Beam Technologies EBT 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Umemoto, S., Kakugawa, K., Nosaki, K., Noda, T., Tanaka, T., Vutova, K.
2. 発表標題 The sterilization effect of plasma-based ion implantation on prokaryotic microorganisms
3. 学会等名 The Fourteen International conference on Electron Beam Technologies EBT 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	田中 武  (Tanaka Takeshi)  (10197444)	広島工業大学・工学部・教授    (35403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------