

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K14726

研究課題名（和文）冷凍と電界を組み合わせた新規冷凍殺菌技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel pasteurization technology combining freezing and electric fields

研究代表者

村上 祐一（Murakami, Yuichi）

名城大学・理工学部・准教授

研究者番号：80806498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、冷凍および電界を用いた低温殺菌技術を開発するために、冷凍と電界による大腸菌殺菌に及ぼす印加電圧波形、試料の冷凍条件およびインピーダンスの影響を調査し、冷凍電界殺菌機構に関して考察した。その結果、冷凍電界による大腸菌殺菌効果は氷試料に流れる電流に大きく影響されることが示され、電流値が大きいほど冷凍電界殺菌効果が高くなる。冷凍電界殺菌後の試料は凍結したままであることを確認した。アガロースゲル電気泳動にて、冷凍電界殺菌後の試料に核酸が漏出していることを確認し、氷試料に流れる電流が細胞膜に損傷を与えている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、大腸菌を含む凍結試料に対して電界を印加することで、冷凍のみよりも高い殺菌効果を得ることができた。この技術は冷凍保存中の食材を非加熱で殺菌することができ、更なる長期保存を可能にする。冷凍電界による殺菌効果が試料に流れる電流値に依存することや、試料成分も殺菌効果に影響を与えることを明らかにした。これらの知見は、非加熱殺菌技術である電界殺菌や冷凍殺菌の科学技術基盤を構築するための一助となり、安心・安全な食生活を送るための食品の加工技術の創出に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a novel pasteurization technique using freezing and electric field, the impacts of applied voltage waveform, freezing conditions, and Electrical properties on the pasteurization of Escherichia coli were investigated. The results showed that the pasteurization of E. coli using freezing and electric field was greatly affected by the electric current flowing through the ice sample. The larger the current value, the higher the sterilization effect using freezing and electric field. The frozen samples were confirmed to remain frozen after the electric field application. From the results of agarose gel electrophoresis, the nucleic acids were leaked from the frozen samples, suggesting that the electric current flowing through the ice samples may damage the cell membranes.

研究分野：電力応用

キーワード：電界殺菌 低温保存 冷凍殺菌 凍結

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低温環境下(特に  $-10^{\circ}\text{C}$  程度以下の温度)にて多くの微生物の増殖が停止することから、低温環境は食品の長期保存に利用されてきた。この冷凍保存技術の普及が進むことにより、食中毒発症件数も大幅に減少した。また、低温では化学反応が進みにくくなるため栄養の変性も防ぐことができる。この冷凍時に微生物の一部が死滅することから、冷凍殺菌法が検討されてきた。この冷凍殺菌では、氷結晶による微生物構造の破壊や、微生物外液の凍結が引き起こす脱水ストレス等により微生物が死滅する。冷凍殺菌に及ぼす食品の冷却速度や添加物などの影響が調査されてきた。しかしながら、冷凍殺菌は高い殺菌効果を得ることが難しいため、冷凍環境は微生物の増殖停止を目的として利用されている。冷凍時に食品中の微生物を全て殺菌できるのであれば、我々の食への安全はさらに保障され、食品保存期間の延長も期待される。そこで本研究では、近年、非加熱殺菌法として注目されている電界殺菌と冷凍殺菌を組み合わせた冷凍電界殺菌法を検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、電界印加による凍結物中の大腸菌殺菌に及ぼす印加電圧波形(直流、交流電圧等)、試料の冷凍条件やインピーダンスの影響について検討した。また、冷凍および電界による凍結物中の大腸菌殺菌機構を解明するために、試料内における殺菌実験前後の核酸漏出を調査した。

### 3. 研究の方法

殺菌対象は非病原性の大腸菌で、実験試料は大腸菌を含む NaCl 水溶液である。図 1 に冷凍電界殺菌の実験回路を示す。実験試料  $120\ \mu\text{L}$  をキューベット電極間に入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫にて冷凍した。図 2 に冷凍時の試料温度を示す。本研究での液体試料は全て  $10\sim 20$  分程度で凍結することを確認した。冷凍時間は  $40$  分として試料を凍結させ、冷凍庫内にて凍結試料に電界を印加した。その後、凍結試料への電界印加をやめ、凍結試料を室温下にて解冻させた。解冻させた試料中の大腸菌を採取して、コロニー計数法により処理前後の大腸菌生菌数を測定することで殺菌効果を評価した。

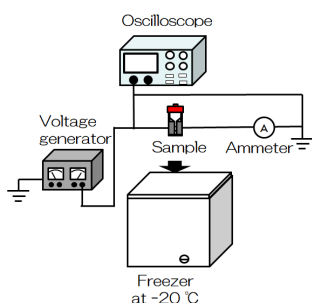


図1 冷凍電界殺菌の実験回路

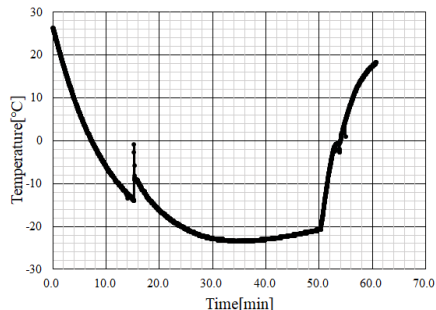


図2 冷凍時の試料温度

### 4. 研究成果

#### (1) 印加電界条件の影響

図3に直流電圧( $100\ \text{V}$ )印加時の電流波形を、図4に大腸菌生菌率の直流電界強度特性を示す。実験結果において、マーカーは平均生菌率を、エラーバーは最大値および最小値を示す。直流電圧を凍結試料に印加すると、試料に流れる電流は、固体誘電体に直流電圧を印加した際に流れる電流のように、瞬間的に大きな電流が流れた後、電流値は減少し、小さな電流が試料を流れ続けた。図4から、直流電界が高くなるほど、大腸菌生菌率は減少(高い殺菌効果は向上)した。このとき、図3に示す直流電圧の瞬時電流のピーク値は直流電界値が高くなるほど大きくなった。図5に大腸菌生菌率の直流電圧印加時間特性を示す。電圧印加時間は、 $1$ 秒(電圧印加直後)、 $10$ 秒(充電電流のピークを迎えた直後)、 $1$ 分(吸収電流が流れた後)、 $10\sim 180$ 分(漏れ電流が流れ続けている時間)とした。試料の冷凍時間が長くなっても冷凍のみの大腸菌生菌率は同程度となった。直流電界印加

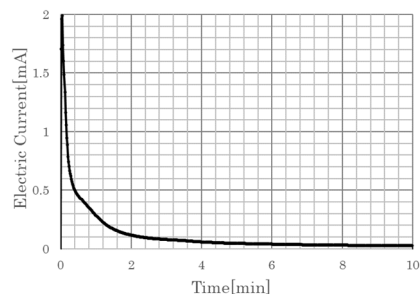


図3 直流電圧印加時の電流波形

した大腸菌生菌率と比較すると、印加時間 1 秒では冷凍のみの生菌率と同程度となり、電界印加による殺菌効果は認められなかった。印加時間 10 秒では、冷凍のみの生菌率よりも若干低下した。印加時間 1 分以上では、冷凍のみの生菌率より明らかに低い。印加時間 1 分以上での電界印加後の大腸菌生菌率は印加時間を長くしても変化しなかった。図 3 より、印加時間 1 分以降での漏れ電流は流れ続けるが、数  $\mu\text{A}$  程度と小さい電流であるため、印加時間 1 分以降における電界印加による殺菌効果は変化しなかったことが考えられる。図 4 および図 5 の直流電界の殺菌実験結果より、冷凍電界殺菌による大腸菌殺菌は電流値に依存することが示され、ピーク値で 1 mA 程度の電流が流れると氷中の大腸菌の殺菌効果が示された。また、このとき電流により凍結試料が融解していないことを確認した。

続いて、交流電圧による冷凍電界殺菌実験を実施した。交流電圧として図 6 に示すような正弦波交流を印加した。氷試料は抵抗 R とキャパシタンス C から構成される等価回路として考えられ、周波数が高くなるとそのインピーダンスは低下する。図 6 のように 1 MHz の交流電圧を印加した際、試料には 1 mA 程度の交流電流が流れた。直流電圧印加では図 4 のように 1 mA 程度の電流にて殺菌効果が示されたが、交流電圧印加では図 7 に示すように大腸菌の殺菌効果は示されなかった。

最後に、パルス高電圧による冷凍電界殺菌実験を実施した。パルス幅 0.1 および 50 ms のパルス高電圧による大腸菌殺菌効果は確認されず、冷凍のみの殺菌効果と同程度であった。液体試料に対するパルス電界殺菌では、凍結試料よりも短いパルス幅のパルス高電圧(36.6  $\mu\text{s}$ )を印加しても殺菌効果が認められた。凍結試料では、液体試料に比べて試料中をイオンが動き難いことから、パルス電界印加により凍結試料の殺菌効果が得られなかったことが考えられる。

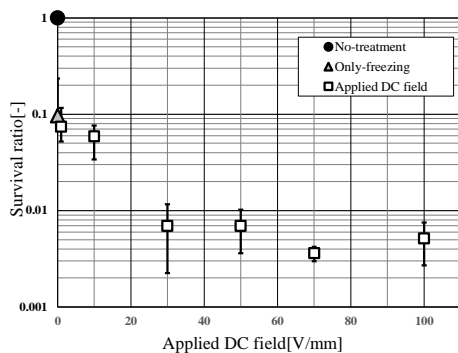


図 4 大腸菌生菌率の直流電界特性

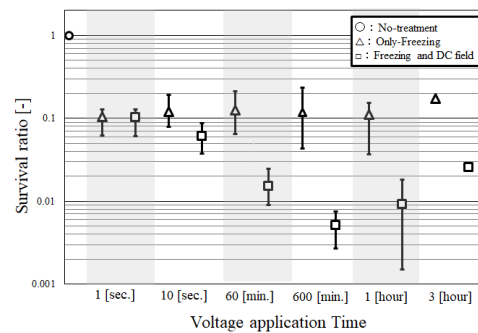


図 5 大腸菌生菌率の直流電界印加時間特性

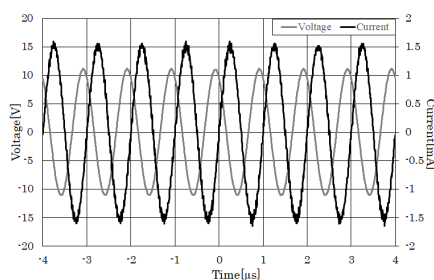


図 6 交流電圧および電流波形(1MHz)

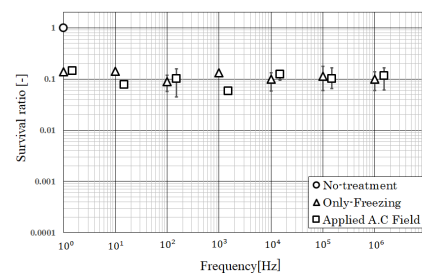


図 7 殺菌効果の交流電圧周波数特性

## (2) 冷凍条件の影響

食品の冷凍保存において、その冷凍速度は食品組織に影響を与えることが知られている。そこで本研究では、試料の冷凍速度(3.6  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  および 10.2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )が冷凍電界殺菌に及ぼす影響を検討した。図 8 に示す通り、3.6  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  および 10.2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の冷凍速度は、冷凍のみおよび冷凍電界による大腸菌殺菌にあまり影響を及ぼさないことが示された。このとき凍結試料に直流電圧(100 V)を印加しているが、その電流のピーク値は同じであった。

食品成分は氷結晶形成に影響を及ぼすことがあり、グリセロールなどは細胞内塩類の濃縮防止や細胞膜保護、氷晶の成長速度を遅らせる等の働きがあることから凍結保護剤として利用されている。この凍結保護剤を混合させた凍結試料は、凍結 NaCl 試料に比べて、冷凍のみおよび冷凍電界による殺菌効果が低くなった。また殺菌効果を有するエタノールの少量(1 wt%)を NaCl 水溶液試料に加えた。図 9 に示す通り、エタノールを混合させた凍結試料は凍結 NaCl 試料と比較して、冷凍電界により高い殺菌効果が得られた。これらから、試料成分は冷凍電界による殺菌効果に影響を及ぼすことが示された。

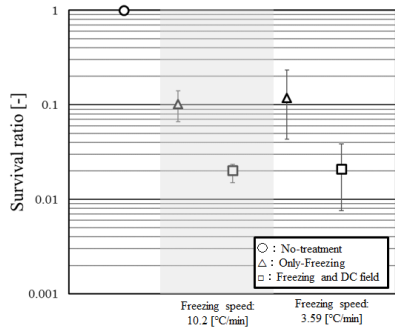


図 8 各冷凍速度での冷凍電界殺菌効果

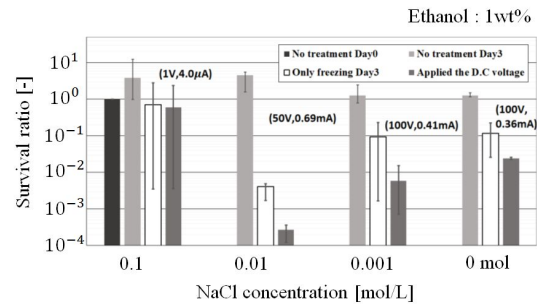
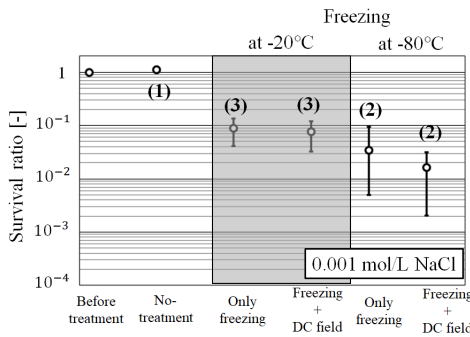


図 9 エタノール・NaCl 試料での冷凍電界

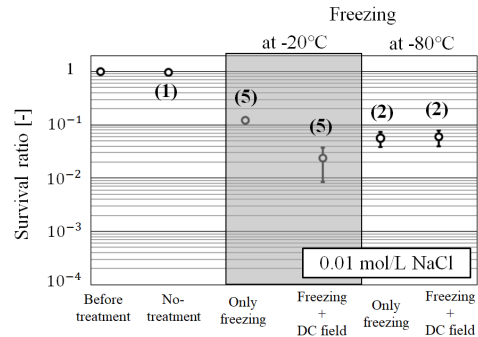
### (3) 氷のインピーダンスの影響

冷凍電界殺菌による大腸菌生菌率は直流電流値に大きく依存することが示された。凍結試料に流れる電流値は試料インピーダンスに依存する。試料インピーダンスが温度や NaCl 濃度によって変化することから、冷凍電界殺菌に及ぼす試料温度および NaCl 濃度の影響を検討した。試料温度および NaCl 濃度が低くなるほど試料のインピーダンスは低下する。図 10 に 0.001 mol/L(a) および 0.01 mol/L(b) の NaCl 試料の冷凍電界殺菌効果を示す。凍結した 0.01 mol/L NaCl 試料に対して -20 °C 下で直流電界を印加した場合、冷凍および電界による大腸菌生菌率は冷凍のみより低く、電界印加による殺菌効果が確認できた。このとき、約 0.33 mA のピーク値を持つ電流が観測された。一方、これ以外の温度および NaCl 濃度の場合では、電界印加による凍結物中の大腸菌殺菌効果は確認することができなかった。これらの殺菌されなかった試料では、そのインピーダンスは高く、電流波形を観測することができなかった。

次に、海水のような高い NaCl 濃度(低インピーダンス)試料での冷凍電界殺菌実験を実施した。図 11(a)は電流波形を示しており、直流電圧を印加した際、高インピーダンス試料(低濃度 NaCl)では誘電体、低インピーダンス試料(高濃度 NaCl)では抵抗体のような電流波形が観測された。低電圧(10 V)印加でも 1 mA 程度の電流が流れて、図 11(b)に示す通り、電界印加により凍結物中の大腸菌生菌率が減少した。一方、印加電圧を高くするとジュール熱により試料が融解することや、印加時間が長くなると部分的に気泡が観測され、一部にて電気分解のような現象が観測された。

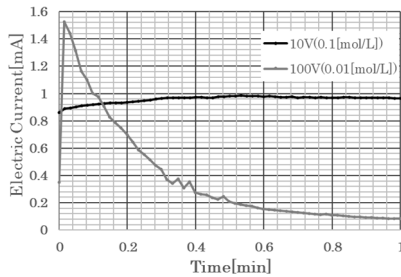


(a) 0.001 mol/L NaCl

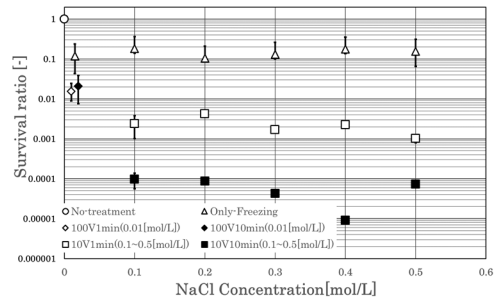


(b) 0.01 mol/L NaCl

図 10 - 20 および - 80 冷凍での冷凍電界殺菌効果



(a) 電流波形



(b) 殺菌実験結果

図 11 0.01 および 0.1 mol/L NaCl 試料の冷凍電界殺菌実験

#### (4) 微生物内容物の漏出

これまでの(1)~(3)の研究成果にて、冷凍電界による大腸菌殺菌効果は試料に流れる電流に影響を受けることが示された。そこで、この電流が大腸菌殺菌にどのように働いているかを検討するために、冷凍電界殺菌後における試料中の核酸をアガロースゲル電気泳動にて検出した。図12にアガロースゲル電気泳動結果を示し、左から順に1kbpのマーカーM、未処理試料①、冷凍処理試料②、冷凍電界処理試料③を表している。

レーンの未処理試料では核酸は検出されなかったが、およびレーンの冷凍および冷凍電界処理試料では10kbp付近にバンドが出現しており核酸が検出された。冷凍処理試料では、凍結により生じる浸透圧による脱水ストレスやそれによる収縮が細胞膜に損傷を与えたことで、核酸が細胞外へ漏出したと考えられる。また、冷凍電界処理のバンドの色は冷凍処理のものより濃い。バンドの色が濃いほど、核酸量は多いことを示していることから、凍結試料に直流電界を印加することで、細胞膜に何らかの影響を与え、核酸が漏出したことが考えられる。

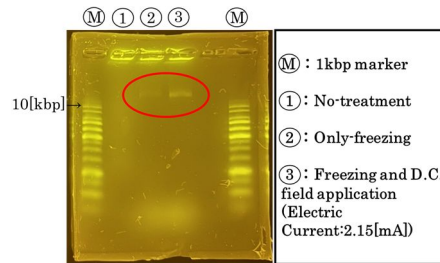


図12 アガロースゲル電気泳動結果

#### (5) 冷凍電界殺菌の予想殺菌モデル

図13に冷凍電界殺菌の予想殺菌モデルを示す。凍結により細胞膜の機能障害や構造破壊が生じて一部の微生物は死滅することが知られており、本研究成果(1)~(3)にて冷凍のみでも大腸菌生菌率が減少し、(4)より核酸が細胞外部へ漏出したことを確認した。冷凍にて死滅しなかった微生物の多くは解凍後に細胞膜を修復して生存する。凍結試料に電界を印加する(電流を流す)と、(1)~(3)の成果より大腸菌を殺菌できることが示され、その殺菌効果は冷凍のみよりも高く、試料に流れる電流値に大きく影響されることが示された。また、凍結障害を保護する物質や微生物に損傷を与える物質を試料に加えると殺菌効果は変化した。凍結試料内では、微生物の内外は凍結した細胞質あるいは試料であり、細胞質の周囲には細胞膜が存在する。殺菌機構の解明には至らなかったが、凍結により生じる浸透圧による脱水ストレスやそれによる収縮が細胞膜を損傷させ、細胞内部へ電流経路を形成し、この電流により細胞膜損傷部位の拡大や微生物内部損傷が発生しているのではないかと考えている。

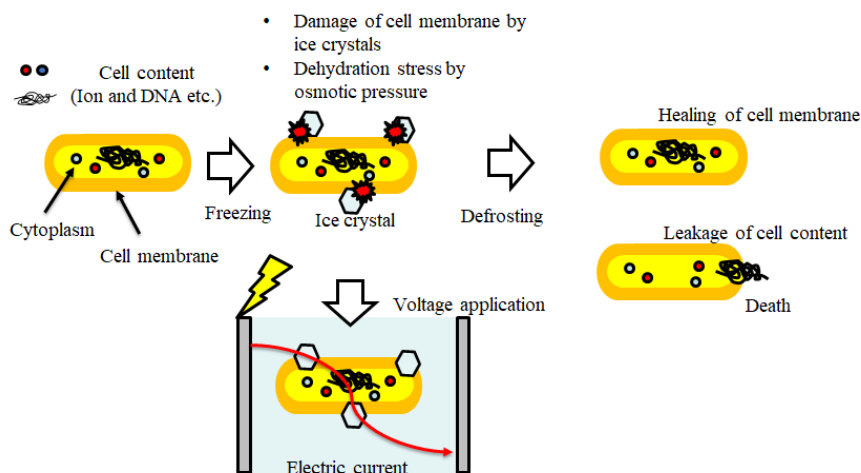


図13 冷凍電界殺菌の予想殺菌モデル

#### (6) まとめ

本研究では、高い殺菌効果を有する冷凍保存技術を開発するために、冷凍と電界による大腸菌殺菌に及ぼす印加電圧波形、試料の凍結条件およびインピーダンスの影響を調査し、冷凍電界殺菌機構に関して考察した。その結果、冷凍電界による大腸菌殺菌効果は氷試料に流れる電流に大きく影響されることが示され、電流値が大きいほど冷凍電界殺菌効果が高くなる。冷凍電界殺菌後の試料は凍結したままであることを確認した。凍結保護剤や殺菌効果を有するエタノールなどの試料成分は冷凍電界による殺菌効果に影響を与えることがわかった。アガロースゲル電気泳動にて、冷凍電界殺菌後の試料に核酸が漏出していることを確認し、氷試料に流れる電流が細胞膜に損傷を与えている可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami Yuichi, Sato Takunao, Goto Yuma, Muramoto Yuji	4. 巻 16
2. 論文標題 Inactivation of Escherichia coli in Ice through DC electric field application and freezing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering	6. 最初と最後の頁 505～510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tee.23323	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masato Watanabe, Yukiko Hikosaka, Yuichi Murakami, Yuji Muramoto
2. 発表標題 Relationship between Escherichia coli Sterilization in Ice and Electric Field Application
3. 学会等名 IEEE Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena 2023（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 直流電界印加による氷中の大腸菌殺菌と核酸漏出の関係
3. 学会等名 第23回静電気学会春期講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彦坂由貴子, 渡邊聖人, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 氷中の直流電圧印加による酵母及び枯草菌の殺菌
3. 学会等名 令和4年度電気学会全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 超低周波交流電界印加による凍結中の大腸菌殺菌に及ぼす塩化ナトリウム濃度の影響
3. 学会等名 令和4年度電気学会全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 冷凍電界殺菌の大腸菌生菌率に及ぼす冷却条件の影響
3. 学会等名 電気学会 誘電・絶縁材料研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 冷凍電界殺菌に及ぼす凍結解凍回数の影響
3. 学会等名 第53回電気電子絶縁材料システムシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 冷凍および直流電界印加による海水濃度水溶液の大腸菌殺菌
3. 学会等名 第46回静電気学会全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彦坂由貴子, 渡邊聖人, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 直流電圧印加による水中の大腸菌殺菌に及ぼす凍結状態の影響
3. 学会等名 電気学会 誘電・絶縁材料/電線・ケーブル合同研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 冷凍電界殺菌における大腸菌生菌率と電流の関係
3. 学会等名 電気学会 誘電・絶縁材料/電線・ケーブル合同研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 大腸菌殺菌に及ぼす冷凍及び電圧印加の影響
3. 学会等名 電気学会 電気学会 放電・プラズマ・パルスパワー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 彦坂由貴子, 渡邊聖人, 村上 祐一, 村本 裕二
2. 発表標題 直流電圧印加時の大腸菌殺菌に及ぼすグリセロールとスクロースの影響
3. 学会等名 令和3年度電気・電子・情報関係学会 東海支部連合大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 高電界パルス印加による水中の大腸菌殺菌
3. 学会等名 令和3年度電気・電子・情報関係学会 東海支部連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 水中の大腸菌殺菌に及ぼす直流印加電圧極性の影響
3. 学会等名 第45回静電気学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 水中の大腸菌殺菌に及ぼす印加電圧波形の影響
3. 学会等名 電気学会 電気学会 誘電・絶縁材料/電線・ケーブル合同研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 直流電界印加による水中の大腸菌殺菌と核酸漏出の関係
3. 学会等名 2022年度静電気学会春季講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊聖人, 彦坂由貴子, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 超低周波交流電界印加による水中の大腸菌殺菌に及ぼす水溶液中の塩化ナトリウム濃度の影響
3. 学会等名 令和4年電気学会全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彦坂由貴子, 渡邊聖人, 村上祐一, 村本裕二
2. 発表標題 水中の直流電圧印加による酵母及び枯草菌の殺菌
3. 学会等名 令和4年電気学会全国大会
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

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