

## 銀電極を用いた高電圧パルス殺菌装置による 種々の菌に対する不活性化効果

吉野 功<sup>\*,\*\*,\*1</sup>, 大嶋 孝之<sup>\*</sup>, 谷野 孝徳<sup>\*</sup>, 佐藤 正之<sup>\*</sup>

(2009年10月6日受付; 2009年12月15日受理)

### Effect of Silver Electrode in High Voltage Pulsed Electric Field System on Inactivation of Various Microorganisms

Isao YOSHINO<sup>\*,\*\*,\*1</sup>, Takayuki OHSHIMA<sup>\*</sup>, Takanori TANINO<sup>\*</sup> and Masayuki SATO<sup>\*</sup>

(Received October 6, 2009; Accepted December 15, 2009)

Inactivation effects of the silver electrode high voltage pulse (Ag-PEF) system on 3 kinds of microorganisms, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* spore, and *Saccharomyces cerevisiae* were studied. Ag-PEF system significantly decreased survival ratio of each microorganism. In case of 7 kV Ag-PEF treatment was applied to each microorganism, no colony formation of *S. aureus*, *A. niger* and *S. cerevisiae* was observed after 5, 7.5 and 1.25 min treatment, respectively. Moreover, the inactivation effect of the Ag-PEF system on the mixture solution of 3 microorganisms above and *Escherichia coli* was confirmed. In addition, the comparison of inactivation effects with Ag-PEF and PEF in the presence of silver nitrate instillation had shown that Ag-PEF exhibits synergistic microorganism inactivation effect.

#### 1. はじめに

人類が生活する環境には様々な微生物が存在し、衣食住すべてにその影響を受けている。細菌は細胞膜や細胞壁の形状により、グラム陰性菌とグラム陽性菌に大きく分類され、殺菌耐性も異なる。公的な抗菌試験<sup>1)</sup>では、大腸菌と黄色ブドウ球菌がそれぞれの代表菌として用いられている。また真菌では清酒製造などに利用されているコウジカビや酵母などの有用菌がいる一方で、カビは環境中で様々な場所に発生して不潔感を与えると共に、工業製品などにも腐食や変形など危害をもたらす。抗カビ試験法<sup>2)</sup>も公的に定められており、黒コウジカビ (*Aspergillus niger*) も対象となる菌種の一つである。

これらの菌を殺菌するために様々な手法が用いられているが、その中でも加熱処理は現在最も広く用いられている方法である。しかし、加熱処理は菌以外の成分にも影響を及ぼすため、非加熱的な殺菌手法が研究されている<sup>3)</sup>。高電圧パルス電界印加法 (PEF) は、対象となる菌体の細胞膜の内側

と外側の電位差を生じさせることにより、膜に電気穿孔といわれる破壊をさせる殺菌法である<sup>4)</sup>。電圧印加は短時間であるため、温度上昇が少ない非加熱殺菌であり、現在実用化に向け研究が行われている<sup>5-8)</sup>。また、PEFによる菌の不活性化効果を高めるためにオゾンなど他の非加熱殺菌手法<sup>9,10)</sup>との併用も研究されており、我々は前報<sup>11)</sup>で銀との併用効果を検証した。銀の殺菌効果については古くから知られており<sup>12)</sup>、殺菌原理としては銀が触媒となり作られる活性酸素によるもの<sup>13)</sup>、細胞内部に侵入した銀による生体活動の阻害によるものが考えられている<sup>14)</sup>が、カビには効きにくいとされている<sup>15)</sup>。我々は銀ワイヤーをスパイラル電極に用いた高電圧パルス (Ag-PEF) 処理装置を作成しグラム陰性菌である大腸菌に対する効果を検証した結果、PEF 処理に比べて Ag-PEF 処理が大きな不活性化効果を持つことを見いだした<sup>11)</sup>。

PEF 処理による菌の不活性化効果は菌の大きさや、膜の構造により異なるとされており<sup>16)</sup>、実用化するためには様々な菌に対する不活性化効果の知見の集積が必要である。大腸菌については、多くの報告があり<sup>8,10,11)</sup>、Sato らはスパイラル電極を用いた20分の処理で最大5桁以上の生菌数の減少を報告している<sup>17)</sup>。黄色ブドウ球菌については Evendilek らが35 kV/cm, 450  $\mu$ s のパルス処理により最大3桁の生菌率の減少を<sup>18)</sup>、酵母についても Donsi らが22.6 kV/cm, 1,500  $\mu$ s の条件でパルス電圧印加時に攪拌することにより、6桁以上の効果が得られると報告している<sup>19)</sup>。このように PEF 処理による微生物の不活性化の報告例は非常に多く存在するが、同一条件で様々な菌に対する不活性化効果の比較を行った報告はあまりなされていない。また、複数の菌種が混在する際の不活

キーワード: パルス電界, 銀, 非加熱殺菌

\* 群馬大学大学院工学研究科環境プロセス工学専攻  
(376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1)

Department of Chemical and Environmental Engineering,  
Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma  
376-8515, Japan

\*\* 群馬県立産業技術センター (379-2147 群馬県前橋市亀里町 884-1)

Gunma Industrial Technology Center, 884-1 Kamesato,  
Maebashi, Gunma 379-2147, Japan

<sup>1</sup> yoshino-i@pref.gunma.jp

性化効果を確認した知見は報告されていない。そこで本研究では、大腸菌（グラム陰性菌）の不活性化に効果的であった Ag-PEF による不活性化試験を同一条件下で黄色ブドウ球菌（グラム陽性菌）、黒コウジカビ孢子（真菌孢子）、酵母（真菌）に対して行い、さらに単一の菌への効果だけではなく大腸菌も含めた4菌種の混在状態に対する不活性化効果の比較を行ったので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験装置<sup>11)</sup>

コンデンサ容量8 nF, 周波数50 Hz の高電圧パルス電源を用いた<sup>8)</sup>。出力パルス電圧と電流は高電圧プローブ (P6015A, Tektronix) と広帯域電流変換器 (M411, Pearson Electronics) で測定し, デジタルオシロスコープ (TDS1002, Tektronix) で観察した。図1にステンレス電極と銀電極を用いた場合の処理開始直後の典型的な電圧波形 (7 kV) を示す。銀電極を用いた場合には処理時間と共に若干半値幅が小さくなる傾向があったが, 電圧波形的には大きな差異は認められなかった。

処理槽には二重らせん電極を用いた。これは図2のように径の異なる2つのアクリル円筒を組み合わせ, その隙間に2本のワイヤー電極を対向にらせん状に巻いたもので, 一方が高電圧側, 一方がアース側となっている。処理槽は内径19 mm, 外径22 mm, 長さ87 mm で処理容量は8.4 mL

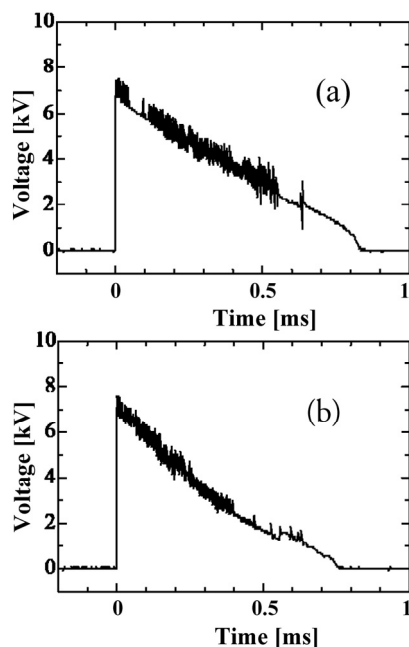


図1 パルス波形:(a)ステンレス電極, (b)銀電極

Fig. 1 Pulsed electric field (PEF) wave form of (a) stainless steel wire or (b) silver wire as the high voltage electrode.

であった。長さ330 mmのワイヤー電極を15 mmのピッチで対向らせんに5巻きし, 電極間隔を7.5 mmとした。ステンレス電極槽は両方のワイヤーを直径0.8 mmのステンレスに, 銀電極槽は高電圧側を直径0.8 mmの銀ワイヤーに変更した同規格のものを作製した。試料液体は下から上への流路とし, 気泡が滞留しないようにした。ビーカーに入れた試料液体200 mLをスターラーで攪拌し, マイクロチューブポンプで流量160 mL/minに設定して循環させた。

硝酸銀滴下試験では, マイクロチューブポンプを用いて100 ppmに希釈した硝酸銀標準液(関東化学社製)を1 mL/1 minの速度で試料液体の入ったビーカーに滴下した。

### 2.2 使用菌体

標準試験菌株としては黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* NBRC12732), 黒コウジカビ孢子 (*Aspergillus niger* NBRC6341 spores), 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* きょうかい酵母901号), 大腸菌 (*Escherichia coli* K-12) を用いた。

試料液の調整条件を下記に示す。

#### 2.2.1 黄色ブドウ球菌

標準寒天平板培地(栄研化学製)で37°C, 24時間前培養した培地上のコロニーを標準白金耳で4白金耳量(約8 mg)採取し, 5 mLの滅菌水に懸濁したものを黄色ブドウ球菌懸濁液とした。200 mLの滅菌蒸留水に0.5 mLの菌懸濁液を加え, 試料液体とした。初期菌体濃度は, 約 $5 \times 10^6$  cfu/mLであった。

#### 2.2.2 黒コウジカビ孢子

PDA培地(栄研化学製)で25°C, 7日前培養し, 5°Cで保存した後, 培地上の孢子を標準白金耳で50白金耳量(約100 mg)採取し, 10 mLの滅菌した0.01% Tween 80(関東化学社製)溶液に懸濁し, 黒コウジカビ孢子懸濁液とした。200 mLの滅菌蒸留水に2 mLの菌懸濁液を加え, 試料液体とした。初期菌体濃度は, 約 $5 \times 10^4$  cfu/mLであった。

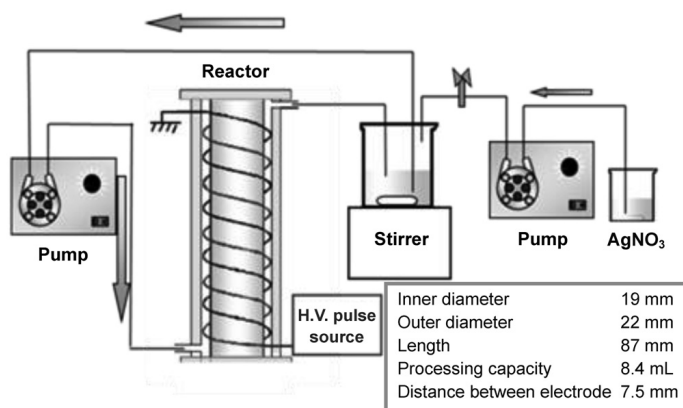


図2 パルス殺菌装置の概略図

Fig. 2 Schematic diagram of PEF treatment system.

### 2.2.3 酵母

10 mL の YPG 培地 (Glucose 40 g/L, Peptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g/L) で 30°C, 18 時間振とう培養した菌液を 3,000 rpm, 5 min 遠心分離し, 上澄みを捨ててから滅菌水 5 mL を加えて懸濁させたものを, 酵母懸濁液とした. 200 mL の滅菌蒸留水に 0.5 mL の菌懸濁液を加え, 試料液体とした. 初期菌体濃度は, 約  $5 \times 10^5$  cfu/mL であった.

### 2.2.4 大腸菌

10 mL の LB 培地 (Peptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L) で 30°C, 18 時間振とう培養した菌液を 3,000 rpm, 5 min 遠心分離し, 上澄みを捨ててから滅菌水 5 mL を加えて懸濁させたものを, 大腸菌懸濁液とした. 200 mL の滅菌蒸留水に 0.5 mL の菌懸濁液を加え, 試料液体とした. 初期菌体濃度は, 約  $1 \times 10^7$  cfu/mL であった.

### 2.2.5 混合菌液

単一菌種試験と同じ初期菌体濃度になるように, 4 種の菌懸濁液を 200 mL の滅菌蒸留水に加え混合菌試料液体とした.

### 2.3 生菌率の測定法

高電圧パルス処理中, 一定時間ごとに試料液を 0.5 mL サンプルングし, あらかじめ用意した滅菌生理食塩水 4.5 mL に加え, 適当な濃度に希釈した後, 原液および希釈液 0.1 mL を平板培地に塗布した. 大腸菌, 黄色ブドウ球菌については, 標準寒天培地 (栄研化学製) にて 37°C で 18 時間培養, 黒コウジカビ, 酵母については Triton X-100 (SIGMA 社製) を 0.25% 添加した PDA 培地 (栄研化学製) にて 30°C, 48 時間培養, 形成したコロニー数を計測することにより生菌数を求めた. 生菌率(S)は以下の式で求めた.

$$S = N/N_0 \quad (1)$$

ここで,  $N$  は処理後の生菌数,  $N_0$  は処理前の生菌数である.

### 2.4 銀濃度の測定方法

銀濃度の測定は, サンプルングした試料溶液を ICP-AES (optima 3000DV パーキンエルマー社) を用いて測定した.

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 単一の菌種に対する不活性化効果

#### 3.1.1 黄色ブドウ球菌に対する不活性化効果

図3にステンレス電極および銀電極を用いた PEF 処理における各種印加電圧による黄色ブドウ球菌生菌率の経時変化を示す. ステンレス電極を用い PEF 処理を行った場合 (PEF), パルス電圧が上がるにつれて菌に対する不活性化効果は大きくなったが, 12 kV, 20 min 後の生菌率は  $1.5 \times 10^{-1}$  であり, 前報<sup>11)</sup>で試験した大腸菌に対する同条件の効果が  $1.9 \times 10^{-3}$  であったのに対して不活性化の程度は小さ

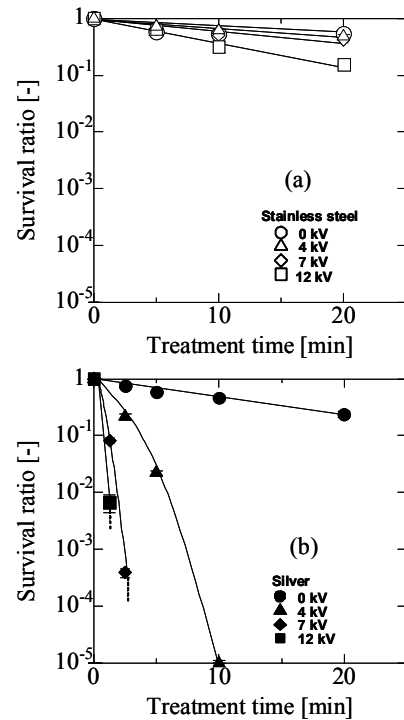


図3 PEF 処理印加電圧の違いによる黄色ブドウ球菌の生菌率変化: (a)ステンレス電極, (b) 銀電極

Fig. 3 Time courses of *S. aureus* survival ratios during various voltage PEF treatments with (a) stainless steel wire or (b) silver wire as the high voltage electrode. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n \geq 4$ ).

かった. 一方, 銀電極を用いた場合には, パルス電圧無印加 (Ag-0 kV) 処理時の生菌率は, 処理時間 5 min, 20 min でそれぞれ  $2.4 \times 10^{-1}$ ,  $5.9 \times 10^{-1}$  であり, わずかではあるが不活性化効果が確認された. これは, 試料液中の菌の銀電極への接触や, 微量に溶出した銀の効果と考えられた. しかし, 前報<sup>11)</sup>で大腸菌に対する同条件の不活性化効果が  $2.4 \times 10^{-5}$  であったのと比較してかなり小さいことから, 黄色ブドウ球菌は銀に対して耐性があると考えられる.

銀電極を用いた PEF (Ag-PEF) 処理 4 kV の生菌率は処理時間の経過と共に大幅に減少し, 処理時間 20 min では寒天培地上にコロニーの形成は認められなかった. 黄色ブドウ球菌の生菌率は PEF 処理 (4 kV, 10 min) では  $6.1 \times 10^{-1}$ , Ag-0kV 処理 (0 kV, 10 min) では  $4.6 \times 10^{-1}$  とそれぞれ 1 桁も減少しなかったのに対して, Ag-PEF 処理 (4 kV, 10 min) では  $1.0 \times 10^{-5}$  と 5 桁以上の減少が確認されたことから, Ag-PEF 処理により黄色ブドウ球菌に対しても大きな不活性化効果が得られることが明らかとなった.

黄色ブドウ球菌に対する Ag-PEF 処理では 7 kV, 12 kV と電圧が上がるにつれて不活性化効果は顕著に大きくなり, 7 kV, 12 kV の電圧印加では, それぞれ処理時間 5 min, 2.5 min 以上では寒天培地上にコロニーの形成は認められなかった.

### 3.1.2 黒コウジカビ孢子に対する不活性化効果

図4にPEFおよびAg-PEF処理における各種印加電圧による黒コウジカビ孢子生菌率の経時変化を示す。PEF処理では印加電圧が上がるにつれて、不活性化効果は大きくなったが、12 kV、20 min処理後の生菌率は $1.9 \times 10^{-1}$ であり、黒コウジカビ孢子についても黄色ブドウ球菌と同様に大腸菌よりも耐性があることが確認された。一方、Ag-0kV処理の生菌率は、処理時間5 minでは $5.9 \times 10^{-1}$ と黄色ブドウ球菌と同等であったが、20 minでは $4.9 \times 10^{-2}$ とやや大きな不活性化効果が認められた。Ag-PEF処理4 kVでは黒コウジカビ孢子生菌率は処理時間10 minで $2.7 \times 10^{-3}$ であり、PEF処理(4 kV、10 min)では $6.4 \times 10^{-1}$ 、Ag-0kV処理(10 min)では $2.9 \times 10^{-1}$ とそれぞれ1桁も減少しなかったのに対して、2桁以上の高い不活性化効果が得られた。さらに処理時間20 minでは寒天培地上にコロニーは認められなかった。黄色ブドウ球菌の場合と同様に黒コウジカビ孢子の場合にもAg-PEF処理では7 kV、12 kVと印加電圧が上がるにつれて不活性化効果は顕著に大きくなった。パルス電圧印加7 kV、12 kVでは、それぞれ処理時間7.5 min、3.75 min以上では寒天培地上にコロニーの形成は認められなかった。

### 3.1.3 酵母に対する不活性化効果

図5にPEFおよびAg-PEF処理における各種印加電圧に

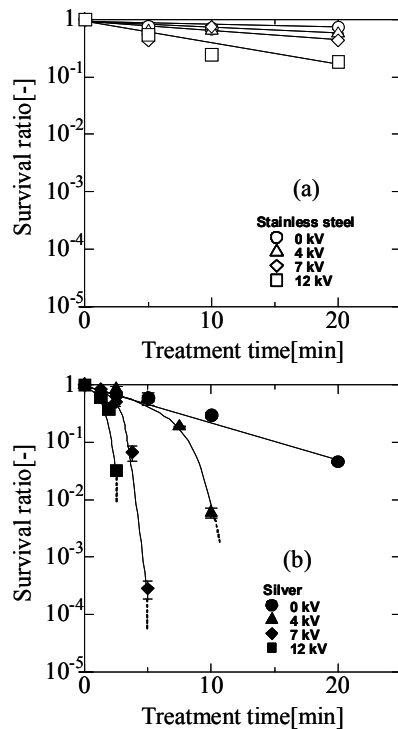


図4 PEF処理印加電圧の違いによる黒コウジカビ孢子の生菌率変化：(a)ステンレス電極、(b)銀電極

Fig. 4 Time courses of *A. niger* survival ratios during various voltage PEF treatments with (a) stainless steel wire or (b) silver wire as the high voltage electrode. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n \geq 4$ ).

よる酵母生菌率の経時変化を示す。PEF処理においても印加電圧が上がるにつれて菌の不活性化効果は大きくなり、PEF処理(12 kV、20 min)の生菌率は $2.0 \times 10^{-4}$ であった。これは今回試験した菌の中で最もPEF処理の不活性化効果が大きいものであり、前報<sup>11)</sup>の大腸菌と比較しても不活性化効果は大きかった。また、Ag-0kVの生菌率は、処理時間2.5 minで $3.7 \times 10^{-3}$ であり、5 min以降では寒天培地上にコロニーの形成は認められなかった。これは酵母が銀に対して耐性が低く容易に不活性化されてしまうためであると考えられる。Ag-PEF処理では、4 kV、7 kV、12 kVの各印加電圧において、処理1.25 min後には、寒天培地上にコロニーの形成は認められず酵母に対し不活性化効果が非常に大きいことが示された。

### 3.1.4 菌種間の不活性化効果の差異

これまでの結果からPEFならびにAg-PEF処理の各菌種に対する不活性化効果を比較すると、PEF処理において酵母では大腸菌以上に不活性化効果は大きかったが、黄色ブドウ球菌、黒コウジカビ孢子では不活性化効果が小さかった。一方、Ag-PEF処理ではPEF処理に比べ大きな不活性化効果が得られた。酵母と大腸菌は4 kVから非常に大きな不活性化効果が得られるのに対して、黄色ブドウ球菌では、7 kV以上から非常に大きな不活性化効果が得られた。黒コウジカビ孢子は

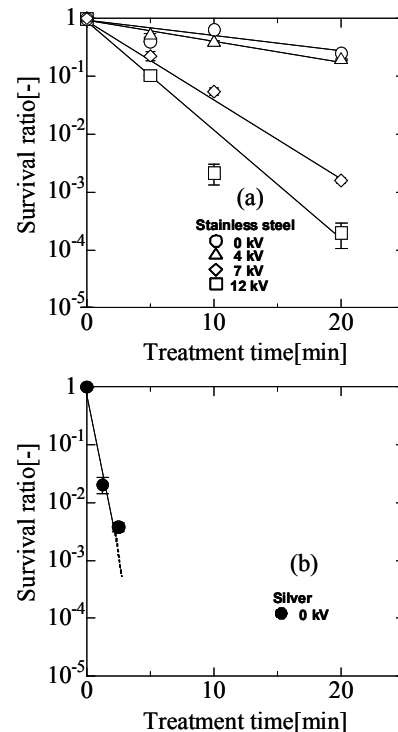


図5 PEF処理印加電圧の違いによる酵母の生菌率変化：(a)ステンレス電極、(b)銀電極

Fig. 5 Time courses of *S. cerevisiae* survival ratios during various voltage PEF treatment with (a) stainless steel wire or (b) silver wire as the high voltage electrode. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n \geq 4$ ).

黄色ブドウ球菌よりもやや耐性を有しているものの実験結果からは 7 kV で非常に大きな不活性化効果が期待できる。

PEF 処理による不活性化効果の菌種による差は菌のサイズが大きいほど膜にかかる電圧が大きくなり、膜破壊がおこりやすくなるためであると考えられている<sup>4)</sup>。今回の研究においても酵母 (5-10  $\mu\text{m}$ )、大腸菌 (1-2  $\mu\text{m}$ )、黄色ブドウ球菌 (1  $\mu\text{m}$ ) については、そのサイズが大きいほど不活性化効果が大きくなっている。しかし、黒コウジカビ胞子 (5  $\mu\text{m}$ ) については大腸菌よりも大きいにもかかわらず、強い耐性を示した。これは、カビ胞子の形状が円や楕円でなく、突起のある構造であることも考えられるが、PEF 処理によるカビに対する効果の知見は少なく、今後のさらなる検討が必要である。

銀による微生物不活性化メカニズムの1つとして、細胞膜や酵素との結合により微生物の生体活動を阻害すると考えられている<sup>14)</sup>。一方 PEF 処理は微生物の細胞膜構造に揺らぎを誘導すると考えられている<sup>4)</sup>。したがって Ag-PEF 処理が極めて大きな不活性化効果を示すのは銀の溶出と PEF による細胞内への取り込み促進が同時に起こるために不活性化効果が大きいと推測される。

### 3.2 複数菌種の混合状態に対する不活性化効果

Ag-PEF 処理が前報も含めて酵母、大腸菌、黄色ブドウ球菌、黒コウジカビ胞子の不活性化に有効であることが示された。つぎにこれらを混合した状態でも Ag-PEF 不活性化が有効であることを確認するために 4 菌種の混合菌液に対し 7 kV の Ag-PEF 処理を試みた。単一菌液に対する Ag-PEF 処理(7 kV)では、酵母、大腸菌、黄色ブドウ球菌、黒コウジカビ胞子はそれぞれ 1.25 min, 2.5 min, 3.75 min, 7.5 min 以上の処理時間で寒天培地上にコロニー形成が見られなくなった(図 6(a))。一方、混合菌液では酵母、大腸菌、黄色ブドウ球菌、黒コウジカビ胞子はそれぞれ 1.25 min, 3.75 min, 7.5 min, 10 min 以上と単一菌液に比べ、寒天培地上のコロニー形成が見られなくなるにはわずかに長い処理時間が必要であったが、同時不活性化が確認された(図 6(b))。また、Ag-PEF 処理による不活性化効果は黄色ブドウ球菌よりも酵母に対して大きいなど単一菌液の場合と同様の傾向を示した。これらの結果より Ag-PEF 処理は、多種の菌の混合状態でも同時に全ての菌を不活性化できる有用な手法であることが確認された。

不活性化効果が小さくなった原因として、今回の実験系では処理液中の初発菌の総数が混合菌液では単一菌液よりも多いことが不活性化効果に影響したと考えられる。一般に加熱殺菌では初発菌数にかかわらず、アレニウス式に従い不活性化速度は変化しないが、Ag-PEF 処理では菌の不活性化には PEF による電界効果に加え、系中の銀が関与しているため、菌濃度が増加すると一細胞あたりの銀濃度が低下し不活性化速度の低下が起こると考えられる。また、加熱殺菌では認

められない Ag-PEF 処理の不活性化特性として、単一菌液、混合菌液に関わらず時間とともに生菌率の減少度が大きくなる傾向が観察された。これは処理時間とともに処理液中の Ag 濃度が上昇することに起因しているのではないかと思われる。

### 3.3 Ag-PEF 処理と硝酸銀溶液との不活性化効果比較

Ag-PEF 処理溶液中の銀濃度を測定したところ、印加時間に比例して直線的に増加しており、これはファラデーの法則に合致すると考えられる。また、処理対象となる菌を変えても銀の溶出量に変化は確認されなかった。Ag-PEF 処理中の印加エネルギーが全て銀の溶出に使われたときの 1 パルスあたりの電極からの銀溶出量は、電荷量 CV を用いてファラデーの法則により計算することができ、処理液中の銀濃度変化もパルス回数から求めることができる。この濃度を理論値とすると、7 kV Ag-PEF 処理時の溶液中銀濃度実測値は理論値の 30%程度の値であった。このことから Ag-PEF 処理においては全てのエネルギーが電気化学的な反応に消費されていないと示唆された。そこで、この濃度を超えないように硝酸銀溶液を理論値のおよそ 50%となるよう試験菌液に逐次滴下し、Ag-PEF 処理と黄色ブドウ球菌の不活性化効果を比較した。試験溶液の銀濃度の変化を図 7(a)に示す。硝酸銀滴下処理 ( $\text{AgNO}_3$ )、硝酸銀滴下同時ステンレス電極 PEF 処理 ( $\text{AgNO}_3 + 7 \text{ kV}$ ) とも予定の銀濃度が確認できた。黄色ブド

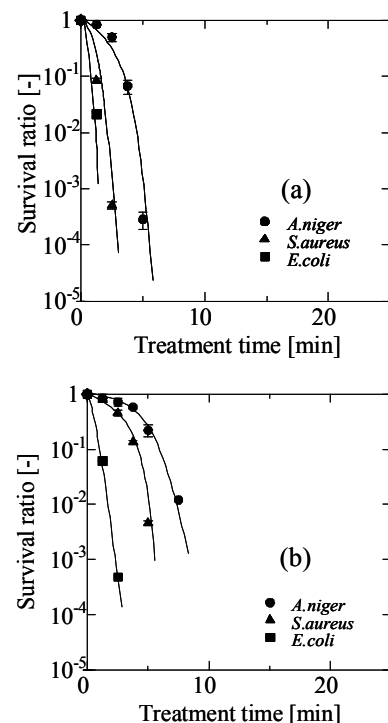


図 6 7 kV Ag-PEF 処理による生菌率変化の菌種間差異 : (a) 単一菌種, (b) 混合状態

Fig. 6 Time courses of each microorganism survival ratios during 7 kV Ag-PEF treatment. (a) Suspensions of pure microorganism and (b) 4 kinds microorganism mixture were treated, respectively. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n \geq 4$ ).

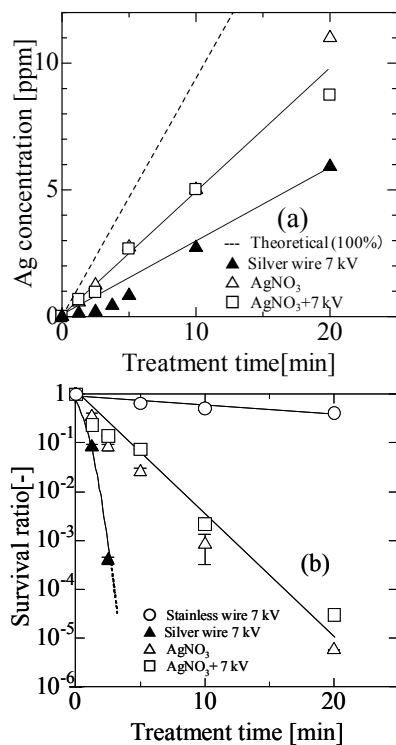


図7 硝酸銀溶液滴下処理試験における (a) 銀濃度変化と (b) 生菌率変化

Fig. 7 A silver nitrate solution dripping examination. (a) Time courses of silver concentration and (b) *S. aureus* survival ratios. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n \geq 4$ ).

球菌生菌率の経時変化を図7(b)に示す。AgNO<sub>3</sub>処理では生菌率は処理時間5 min, 10 minでそれぞれ $2.5 \times 10^{-2}$ ,  $8.2 \times 10^{-4}$ , AgNO<sub>3</sub>+7 kV処理では処理時間5 min, 10 minでそれぞれ $7.4 \times 10^{-2}$ ,  $2.1 \times 10^{-3}$ であり、どちらも生菌率の減少は直線的となり、Ag-PEF処理による生菌率の減少曲線の形と異なっていた。また硝酸銀溶液中ではステンレス電極PEF処理による殺菌効率の向上は認められなかった。一方7 kV Ag-PEF処理では、同じ処理時間の溶出銀濃度はAgNO<sub>3</sub>処理よりも低いにもかかわらず、3.75分以降で培地上にコロニーが観察されないなど、大きな不活性化効果が得られた。Simonettiらは電気化学的に溶出した銀は硝酸銀に比べて有効であることを報告している<sup>20)</sup>。Ag-PEF処理でもNO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオンは存在しないため、より効率的に銀が作用するのではないかと考えられる。また図7で示したような不活化速度の増大は硝酸銀を用いた系では時間と共に銀濃度が高くなっているのにも関わらず、確認できなかった。Ag-PEF処理の高い不活化効果のメカニズムは不明な点が多く、本報では解明しきれていないが、Ag-PEF処理がPEF処理、硝酸銀処理単独よりもはるかに高い不活化能力を持ち、かつ条件を最適化すれば菌種を選ばずに殺菌することができる方法であることが実証できた。今後はメカニズムの解明と共に、応用展開を図っていきたいと考えている。

#### 4. まとめ

3種類の微生物に対し同条件下における銀電極高電圧パルス(Ag-PEF)装置による不活性化効果について研究を行った。単一の菌種に対する試験では、黄色ブドウ球菌、黒コウジカビ胞子、酵母についてAg-PEF処理で著しい生菌率の減少が見られた。黄色ブドウ球菌と黒コウジカビ胞子に対するPEF処理または銀処理のみでは20 minで1桁程度の生菌率の減少にとどまったのに対し、7 kVのAg-PEF処理では、黄色ブドウ球菌では5 min以降、黒コウジカビ胞子では7.5 min以降で寒天培地上にコロニー形成が見られなかった。酵母については、Ag-PEFの不活性化効果はより顕著であった。大腸菌を含めた4つの菌種を混合した状態で7 kVのAg-PEF処理を行ったところ、単独状態よりやや効果は小さいものの、全ての菌種について10 min以内に不活性化することが可能であった。Ag-PEFの不活性化効果は溶出する銀以上の硝酸銀を滴下しPEF処理を施した時よりも顕著であり、有用な微生物の不活性化手法であることが実証できた。

#### 参考文献

- 1) 日本工業標準調査会編：「抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果 (JIS Z2801:2000)」, p.2, 日本規格協会 (2000)
- 2) 日本工業標準調査会編：「かび抵抗性試験方法 (JIS Z2911:2000)」, p.2, 日本規格協会 (2000)
- 3) 佐藤正之：「食品の非加熱殺菌応用ハンドブック」, p.17, サイエンスフォーラム (2001).
- 4) U. Zimmermann: *Biochim. Biophys. Acta*, **694** (1982) 227
- 5) S.F. Aguilar-Rosas, M.L. Ballinas-Casarrubias, G.V. Nevarez-Moorillon, O. Martin-Belloso and E. Ortega-Rivas: *J. Food Eng.*, **83** (2007) 41
- 6) P. Nguyen and G.S. Mittal: *Chem. Eng. Process.*, **46** (2007) 360
- 7) N. López, E. Puértolas, S. Condón, I. Álvarez and J. Raso: *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, **9** (2008) 477
- 8) 北島信義, 阿久澤悦子, 上田香奈, 大嶋孝之, 佐藤正之: *日本食品工学会誌*, **8** (2007) 139
- 9) N. Dutreux, S. Notermans, M.M. Gongora-Nieto, G.V. Barbosa-Canovas and B.G. Swanson: *Int. J. Food Microbiol.*, **60** (2000) 147
- 10) T. Ohshima, K. Sato, H. Terauchi and M. Sato: *J. Electrostat.*, **42** (1997) 159
- 11) I. Yoshino, T. Ohshima, S. Sato, and M. Sato: *日本食品工学会誌*, **10** (2009) 23
- 12) 高麗寛紀: *防菌防黴*, **24** (1996) 509
- 13) M. Chen, L. Yan, H. He, Q. Chang, Y. Yu and J. Qu: *J. Inorganic Biochem.*, **101** (2007) 817
- 14) Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim and J. O. Kim: *J. Biomed. Material. Res.*, **52** (2000) 662
- 15) 高山正彦, 杉本浩子, 内田理恵, 山内理恵子, 丹野憲二: *防菌防黴*, **22** (1994) 531
- 16) 佐藤正之: *日本食品工学会誌*, **8** (2007) 191
- 17) M. Sato, N.M. Ishida, A.T. Sugiarto, T. Ohshima and H. Taniguchi: *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **37** (2001) 1646
- 18) G.A. Evrendilekl, Q.H. Zhang and E.R. Richter: *Biosyst. Eng.*, **87** (2004) 137
- 19) G. Donsi, G. Ferrari and G. Pataro: *J. Food Eng.*, **78** (2007) 784
- 20) N. Simonetti, G. Simonetti, F. Bougnol, M. Scalzo: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (1992) 3834