

パルス電界殺菌における選択殺菌条件の調査

齋藤 高輝*, 南谷 靖史*.¹, 小松 恵徳**

(2016年9月29日受付; 2017年1月19日受理)

Investigation of Selective Sterilization Condition by Pulsed Electric Field Sterilization

Koki SAITO*, Yasushi MINAMITANI*.¹ and Yoshinori KOMATSU**

(Received September 29, 2016; Accepted January 19, 2017)

This study focuses on the selective sterilization of fermented foods by the intense pulsed electric field (IPEF). Beneficial microorganisms are added in the food in the manufacturing process. During the process, there is a possibility that other unnecessary microorganisms contaminate the food. In that case, it is necessary to sterilize the unnecessary microorganisms only. In this study, we use lactic acid bacteria for the beneficial microorganism and yeast for the unnecessary microorganism. Under both 500 pulses of 10kV/cm and 50 pulses of 20kV/cm IPEF conditions, it was found that the sterilization ratio of yeast was two times higher than that of lactic acid bacteria.

1. まえがき

食の安全は我々が生活していくうえで重要な問題である。現在普及している食品の殺菌方法には加熱殺菌、化学殺菌及び紫外線殺菌等があるが、これらの殺菌方法には食品の風味の変質、薬物の残留や殺菌効率が悪いなどの問題点がある。そこでこのような問題のない殺菌方法として近年パルス電界を用いた殺菌が注目を集めている¹⁻³⁾。パルス電界殺菌の原理は細菌の細胞膜破壊によるものであるため非加熱で殺菌でき、加熱殺菌のように食品の風味を損なわず、また化学的な影響もない。パルス電界殺菌は食品内部に空気を含有していない食品の殺菌に適しており、実際にジュースや牛乳のような液体食品にパルス電界を適用し殺菌を行った例もある^{4,5)}。

細胞は電気的には細胞膜が絶縁物、細胞質が導電体となるため電気的な等価回路で表すことが可能であり、図1のような原核細胞の場合、細胞膜はコンデンサ、細胞質は抵抗とみなす事ができる⁶⁾。したがって微生物が含まれる液体に電圧を印加すると微生物の細胞膜には電荷が蓄積され、細胞膜の内部と外部で電位差が生じる。生じる電位差 V_m は式(1)のように示される。

キーワード：パルス電界、選択殺菌、酵母、乳酸菌

* 山形大学大学院理工学研究科

(〒992-8510 山形県米沢市城南 4-3-16)

Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, 4-3-16, Jonan, Yonezawa, Yamagata 992-0026, Japan

** 株式会社明治

(〒250-0862 神奈川県小田原市成田 540)

Meiji Co. Ltd., 540, Narita, Odawara, Kanagawa 250-0862, Japan

¹ minami@yz.yamagata-u.ac.jp

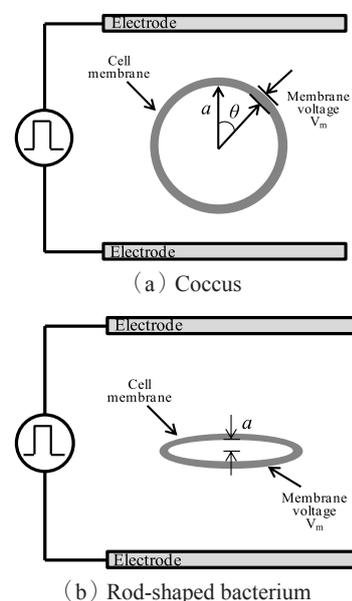


図1 微生物の標準的穿孔

Fig.1 Conventional electroporation for a microorganism.

$$V_m = faE \cos \theta \quad (1)$$

ただし a : 細胞の大きさ, E : 外部電界強度, θ : 電気力線と半径のなす角, f は細胞形状により決定される係数である。球菌の場合 $f = 1.5$ であり、桿菌の場合は菌の形状によって異なり、係数 f は式(2)に従う。

$$f = \frac{a}{a - 0.33d} \quad (2)$$

d は桿菌両端の半球の直径である⁷⁾。この電位差が 1V を超えると細胞膜に絶縁破壊が起き細孔ができ、細胞の組織が外部に流出することで細胞が壊死する⁸⁻¹⁰⁾。

式(1)から分かるようにパルス電界殺菌は細菌の大きさに依存した殺菌である。そのため菌の大きさで殺菌率

に違いが生じると考えられる。また、図1に示すような桿菌では、細菌の電界に対する配向に依存して、細菌の半径が変化するため、殺菌率に変化が生じると考えられる。我々はこのパルス電界殺菌の特性から、殺菌対象物に必要な菌と不要な菌が混在して複数の菌が存在する場合、必要な菌のみを残し、不要な菌を殺菌できる可能性があるということを見出した。例えばヨーグルトやチーズなどの発酵食品は決められた菌を人工的に添加して製造している。この工程は厳重に管理されているが、たまに発酵に不要な菌が食品に混入してしまうことがある。また、最初の工程で複数の菌を添加するが、後の工程で不要になった菌のみを殺菌または取り除くといったことが必要になることもある。そこで本研究では様々な菌を添加する発酵工程を有する食品にパルス電界を印加することで、食品の品質に変化を与えずに発酵、工程に不要な菌のみを殺菌する方法を検討している。

本論文ではヨーグルトなどの発酵乳製品内に不要な菌が混入した場合に乳酸菌を残し、不要な菌のみパルス電界で殺菌する方法について検討した。ヨーグルトは乳酸菌が発酵することにより、乳酸を発生して酸度が増加する。雑菌は酸度が上昇すると死滅するが、酸度が上昇することにより繁殖する菌もある。その代表的なものとして酵母が挙げられる。酵母は発酵を行う際に糖分を必要とするので、もしヨーグルト内に酵母が繁殖してしまうとヨーグルトの品質に変化を与える恐れがある。そこで培養した乳酸菌及び酵母に対してパルス電界を印加し、それぞれの殺菌状況について調査した。さらに、乳酸菌及び酵母を混合した状態でパルス電界を印加し、殺菌状況の変化やそれぞれの殺菌の差について調査した。

2. 実験装置及び方法

2.1 パルス電界発生装置

図2に本実験で用いるパルス電界発生装置を示す。パルスの発生にはCR放電回路を用いた。この回路は抵抗、コンデンサ、トリガトロンギャップスイッチ及びトリガ回路で構成されている。次に回路の動作について説明する。まず直流高電圧電源によりコンデンサCが回路のRを通して充電される。この時、充電電圧はコンデンサ出力側の電圧と逆極性の電圧である。次にトリガ回路を動作させると、抵抗とコンデンサの値から定まる時定数τによって減衰電圧波形が出力される。この出力電圧波形は(3)式で表すことができる。

$$V = V_0 e^{-\frac{t}{CR}} \tag{3}$$

ここでVは出力電圧、V₀は充電電圧を示す。また出

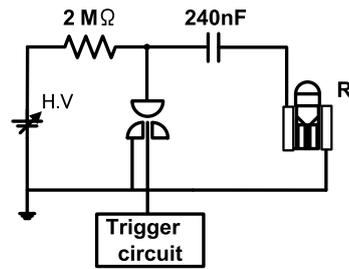


図2 PEF 発生器回路
Fig.2 The circuit of PEF generator.

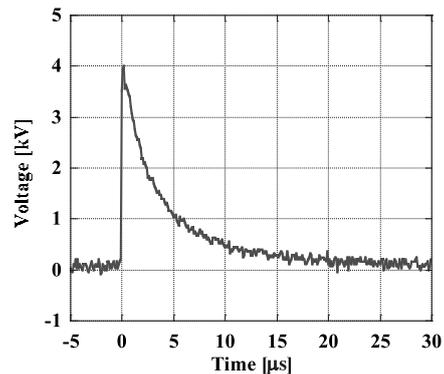


図3 出力電圧波形
Fig.3 Typical output voltage waveform.

力電圧波形の一例を図3に示す。上記の式からも分かるようにコンデンサCもしくは抵抗Rを変化させることでパルスの減衰時間が変化させることができる。本論文では時定数の値をパルス幅と定義した。

パルス電界の印加により熱が発生してしまうと殺菌効果が電界によるものか、熱によるものかが分からなくなる。そこで図2には図示されていないが、電極部を冷却する水冷装置を設置した。この装置はアース側の電極内にポンプにより水が流れることで、アース側の電極を冷やすように設計されている。さらに高圧側には熱交換用フィンと空冷用のファンを取り付けており、熱を逃がしやすくなっている。これにより電界印加中の試料の温度上昇を抑えた。実験において冷却水の温度は4℃に設定し、パルス印加による試料の温度上昇は実験で用いた電界強度以上の40 kV/cmで100パルス当たりの温度上昇を確認したが、温度変化は0.1℃以下の測定限界値以下であり、熱による試料への影響はないと考えられる。

2.2 パルス電界印加方法

実験試料には液体培地 (DifcoTV Lactobacilli MRS Broth) で2日間培養した乳酸菌 (Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus) と液体培地 (DifcoTM Potato Dextrose Broth) で3日間培養した出芽酵母 (Saccharomyces cerevisiae: ATCC Number 9763) を使用した¹⁰⁾。図5(a)に実際の乳酸菌と酵母の写真を示すが、実験に使った酵母と乳酸菌の典

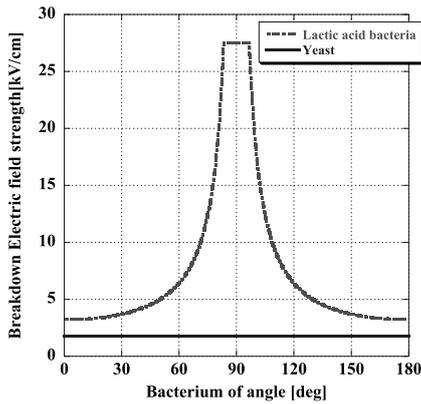


図4 微生物の角度と絶縁破壊電界強度との関係
Fig.4 Relationship between bacterium of angle and breakdown electric field strength.

典型的な大きさは、酵母が約 ϕ 7.5 μm 、乳酸菌が約 $6.0 \times 0.7 \mu\text{m}$ である。また実験に使用する乳酸菌及び酵母は生理食塩水により洗浄処理を行い、試料液を作製した。手順を次に示す¹²⁾。乳酸菌を含む培地 50 ml をマイクロチューブに入れ、3500 rpm で10分間遠心分離を行う。その後培地を全て抜き取り、生理食塩水を加え懸濁した後、同じ条件で遠心分離を行う。最後に生理食塩水を全て抜き取った後、100 mM リン酸カリウムバッファ¹³⁾ で懸濁したものを本実験の試料液とした。パルス電界の印加は電極付エレクトロポレーション用キュベット (電極間隔 2 mm) に入れ行った。

2.3 殺菌条件決定のための各菌に対する殺菌に必要な外部電界強度の算出

パルス電界殺菌の殺菌条件を決定するため、乳酸菌及び酵母に対して殺菌に必要な外部電界強度を算出した。図4に電界空間中における1つの菌に対して、絶縁破壊に必要な外部電界強度を式(1)、式(2)より算出したものを示す。膜電位 V_m は 1 V として計算した。また乳酸菌及び酵母の大きさは2.2で示したものをを用い、乳酸菌の形状を円柱の両端に半球が付いた形で近似し、酵母は完全球体で近似した。各菌の初期配置は図1に示した状態とし、この状態から時計回りに 180 deg 回転させた時の電界強度を示している。

図4から乳酸菌は 3.2 kV/cm ~ 27.5 kV/cm、酵母は 1.78 kV/cm の電界強度を加えることで理論上は殺菌可能であることがわかる。この結果から選択殺菌を行う上では 5 kV/cm 程度の電界強度が望ましいと考えたが、ギャップスイッチの放電が不安定だったため、10 kV/cm 以上の電界強度を加えることとした。また乳酸菌が理論値において殺菌可能であったか確認するため 30 kV/cm までの範囲で殺菌検証を行った。その他の条件としてパルス印加回数 50, 200, 500 回、パルス幅 10 μs 、繰り返し周波数 0.5 pps でパルス電界を印加した。パルス幅は、まえ

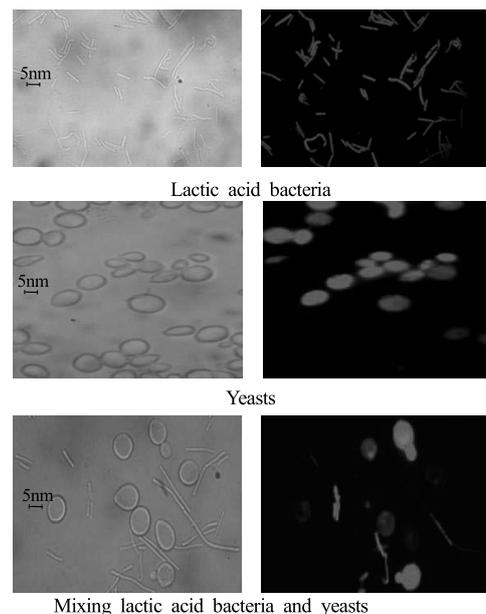
がきでも触れた細胞を電氣的等価回路で表した細胞内の電圧分布の周波数特性のシミュレーションを行った結果、細胞膜に十分な電圧を印加するためには印加パルスに 1 MHz 以下の周波数成分が含まれる 1 μs 以上のパルス幅が必要だったので余裕をもって 10 倍の 10 μs とした¹⁵⁾。

2.4 PI 蛍光染色法による細孔の確認

パルス電界により殺菌される割合は PI (Propidium Iodide) 蛍光染色法で調べた。PI 蛍光染色液は死細胞を検出する分子プローブである。PI 蛍光染色液 (-Cellstain-PI solution P378; 同仁化学研究所) は、生細胞の細胞膜を透過できないが、損傷を受けた細胞膜は透過して細菌の内部にある DNA を染色するため、細胞膜が破壊もしくは劣化していれば内部に染色液が入り込み DNA が染色され、530 nm の励起波長を加えることで 620 nm の蛍光波長を示す。図5に染色例を示す。図5(a)はサンプルに PI 蛍光染色液を加えた後、明視野観察法により菌を観察した様子であり、図5(b)は蛍光視野観察法により染色した菌を観察した様子である。

PI 蛍光染色の手順を次に示す¹⁴⁾。パルス電界を印加した試料は生理食塩水を用いて 10 倍に希釈する。3500 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清液を取り除き、PI 溶液を 2 μl 懸濁する。その後、室温にて 5 分間インキュベーションする。その液を 5 μl 採取し蛍光顕微鏡を用いて乳酸菌の細胞膜が破壊されているか確認する。また、パルス電界を印加しない状態で細胞膜がどの程度破壊されているかも確認する。この試料を Control という。

乳酸菌と酵母を混合させた試料液の作製法を以下に示



(a) Bright field (b) Fluorescence field
図5 微生物染色の例
Fig.5 The examples of staining of microorganisms.

す。乳酸菌と酵母を混合する際は各菌液を 25 ml ずつ用意し、遠心分離を 3500 rpm で 10 分行い培地を抜き取る。その後、生理食塩水を 25 ml 加え懸濁し、乳酸菌と酵母を混合させ同様条件で遠心した後、生理食塩水を全て抜き取る。最後に菌に対してリン酸カリウムバッファ (pH7.0) を 500 μl 加え、試料液とした。

細胞膜がどの程度破壊されたか定量的に測定するため以下のような(4)式を用いて数値化した。この数値化したものを染色率と名付ける。この染色率の値が高いほど乳酸菌の細胞膜が破壊されており、殺菌されていることを示している。

$$\text{染色率} [\%] = \frac{\text{蛍光視野の菌数}}{\text{明視野の菌数}} \times 100 \quad (4)$$

得られた染色率は有意水準 5%において t 検定を行い、結果間に有意差があるかは検証した。

2.5 コロニーカウント法による細胞不活化の測定

PI 蛍光染色法により得られた結果をさらに検討するためにパルス電界印加による細胞の不活化割合をコロニーカウント法により測定した。PI 蛍光染色法は細胞膜が破壊された菌を数えることで殺菌割合を測定しているが、コロニーカウント法では増殖可能な菌が形成するコロニーを数えることで殺菌割合を測定している。つまり菌の細胞膜は破壊されていないが増殖機能を失った菌、すなわち不活化状態の菌はPI染色法では生菌として数えられるが、コロニーカウント法では死菌として数えられる。したがってPI染色法よりコロニーカウント法の方が殺菌率は高く出る傾向がある。

洗浄処理した乳酸菌及び酵母に電界強度 10~20 kV/cm、パルス印加回数 50, 200, 500回、パルス幅 10 μs、繰り返し周波数 0.5 pps でパルス電界を印加した。印加後の乳酸菌及び酵母の試料液を 10⁶ 倍に純水で希釈し、乳酸菌については MRS 液体培地 (MRS9; 3M 社) でさらに 10 倍希釈を行い、ペトリフィルム (一般生菌用 6400AC; 3M 社) にそれぞれ 1 ml 取り 30℃ と 37℃ のインキュベーター内でそれぞれ 72 ± 3, 48 ± 3 時間培養した。実験では不活化率は以下の式(5)で計算した。

$$\text{不活化率} [\%] = 100 - \frac{\text{電界を印加した時のコロニー数}}{\text{電界を印加しない時のコロニー数}} \times 100 \quad (5)$$

3. 実験結果及び考察

3.1 パルス電界印加後のPI蛍光染色の結果

図 6, 図 7 に PI 蛍光染色の結果を示す。図 6, 図 7 は

それぞれ乳酸菌及び酵母に対するパルス幅 10 μs での電界強度, 印加回数の影響を示している。各データは 2 回実験を行い再現性を確認しているが、図 6 の電界強度 30 kV/cm のデータは印加中にキュベット内で放電を起こしてしまい 1 回しかデータを取得することができなかった。図 7 においても 30 kV/cm の 200, 500 回印加ではキュベット内で放電が起きてしまい測定することができなかった。

2 回のデータ間にばらつきがあるものの図 6, 図 7 より乳酸菌と酵母の殺菌される条件に閾値が存在することが見て取れる。図 6 の乳酸菌に関しては電界強度 20 kV/cm, 印加回数 500 回に有意差があり、これ以上の条件では殺菌が行われることが示された。図 7 の酵母に関しては 10 kV/cm, 500 回に有意差があり、これ以上の条件で殺菌が行われることが示された。ばらつきに関しては、細胞膜における放電現象であることと、個々の乳酸菌, 酵母の大きさが一定でないことから大きいばらつきがでて

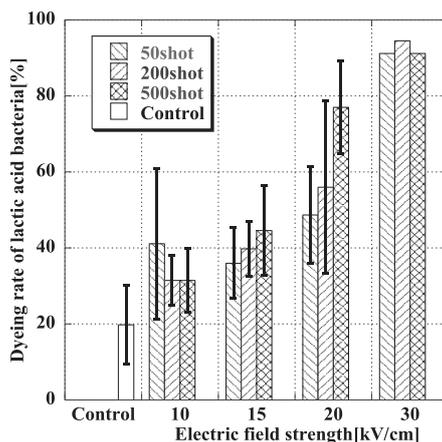


図 6 PI 蛍光染色による乳酸菌の細胞死の状況 (パルス幅 10 μs)
Fig.6 The situations of the cell death of lactic acid bacteria by PI fluorescence staining. (Pulse width 10 μs)

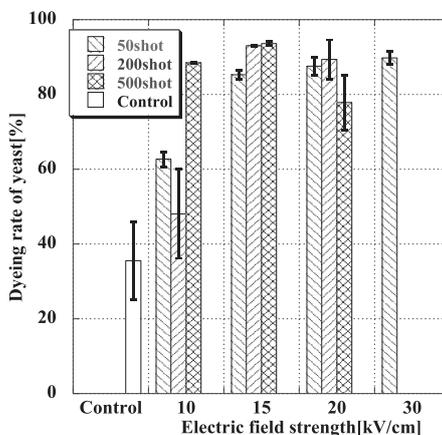


図 7 PI 蛍光染色による酵母の細胞死の状況 (パルス幅 10 μs)
Fig.7 The situations of the cell death of yeasts by PI fluorescence staining. (Pulse width 10 μs)

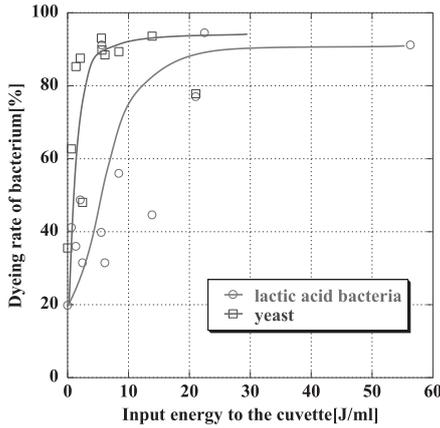


図8 入力エネルギーに対する乳酸菌と酵母のPI染色率 (パルス幅 10 μ s)
 Fig.8 PI staining ratio of lactic acid bacteria and yeasts for input energy to the cuvette. (Pulse width 10 μ s)

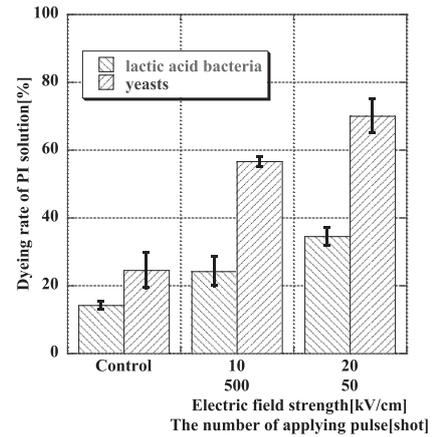


図9 乳酸菌と酵母を混合した懸濁液の各PI染色比 (パルス幅 10 μ s)
 Fig.9 Each PI staining ratios on the suspension mixing lactic acid bacteria and yeasts. (Pulse width 10 μ s)

いるものと考えられる^{16,17)}。その中で特に、図6の乳酸菌の低い電界強度において他の結果よりばらつきが大きい結果となった。これは乳酸菌が桿菌であるため図1(b)に示すように桿菌の角度で電気穿孔確率が異なるため染色率が大きくばらついたと考えられる。

図8に、図6、図7の結果を試料への印加エネルギーで整理したものを示す。この図から乳酸菌と酵母の殺菌に印加エネルギーによる閾値が存在することがわかる。酵母の殺菌には1 J/ml程度以上の印加エネルギーが必要で、乳酸菌の殺菌にはばらつきが大きい10 J/ml程度以上の印加エネルギーが必要で殺菌に必要なエネルギーで見ると1桁もの差があることがわかる。

本実験の目的は、パルス電界を印加した時に乳酸菌の細胞死をなるべく起こさずに、酵母を細胞死させることである。図6、図7の閾値の比較より、10 kV/cmでの500回印加、15 kV/cmでの各条件、また20 kV/cmでの50回印加において、乳酸菌の染色率が低く、酵母の染色率が高くなる結果が得られた。これらの条件下においてはヨーグルト中において不要な酵母の殺菌が可能と考えられる。乳酸菌と酵母で染色率に差が生じているのは、本論文の狙い通り乳酸菌と酵母の大きさの違いで細胞膜に印加された電界に差があったためと推測される。

3.2 乳酸菌と酵母を混合した液の細胞死の結果

3.1で判明した条件で酵母と乳酸菌を混合させた液にパルス電界を印加した。図9にPI蛍光染色結果を示す。印加条件は電界強度10 kV/cmで印加回数500回、20 kV/cmで50回である。繰り返し周波数は0.5 ppsとした。図9においてどちらの条件においても乳酸菌と酵母の殺菌率の違いに有意差があり乳酸菌に多くの細胞死を起こさず、酵母の方に細胞死を多く起こしていることがわかる。

これより乳酸菌を残し、酵母を殺菌することが十分可能であることがわかる。図9の結果は図6、図7の単独での殺菌結果と比較すると多少殺菌率が全体的に低下しているように見える。2つの菌が合わさったことにより溶液内で各菌にかかる電界分布が変わり殺菌効率が低下したことが考えられるが、これについては今後の検討が必要である。また、図9の結果では酵母が30%以上生存しているが、不活化しているものも存在していると考えられ、実際の菌が増殖しないという意味での殺菌率は多少高いと考えられる。

3.3 パルス電界印加後の細胞不活化

そこで実際パルス電界印加によりどの程度不活化が起きているのかコロニーカウント法により確認した。図10、図11にPI染色と同じ条件でパルス電界を印加した試料を、コロニーカウント法により調べた乳酸菌及び酵母の殺菌率(細胞不活化)の測定結果を示す。図より乳

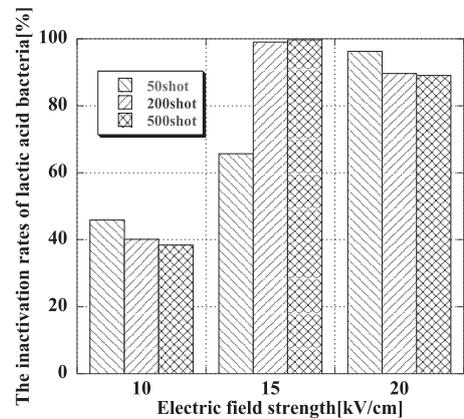


図10 コロニーカウント法による乳酸菌の不活化率 (パルス幅 10 μ s)
 Fig.10 The inactivation rates of lactic acid bacteria by the colony counting method. (Pulse width 10 μ s)

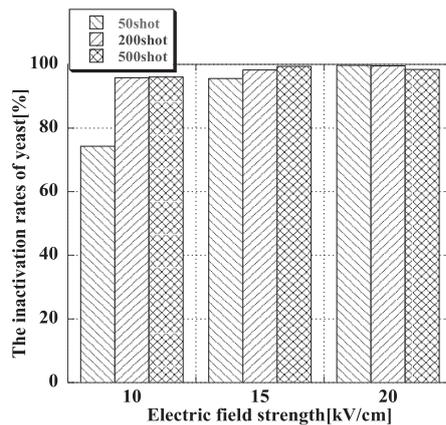


図 11 コロニーカウント法による酵母の不活化率 (パルス幅 10 μ s)

Fig.11 The inactivation ratios of yeasts by the colony counting method. (Pulse width 10 μ s)

酸菌及び酵母ともに PI から得られた細胞死の結果よりも高い値を示しており、細胞膜破壊は起こしていないが不活化が起きている菌が存在することが分かる。特に酵母については 10 kV/cm の 50 回印加以外ではほぼ 90% 以上の値を示しており、酵母の殺菌がかなり行えていることがわかる。PI 染色の結果よりも高い値を示していることから、図 9 においても膜破壊が起きずに不活化した菌も多く存在していると考えられる。ただしこの実験は 1 回しか行っておらず、図 10 の 15 kV/cm と 20 kV/cm のデータでは不活化率の逆転が起こっており今後データの拡充が必要とされる。

4. まとめ

パルス電界により菌の選択殺菌を行うことを検討している。そこで、本論文ではヨーグルトなどの発酵乳製品内に不要な菌である酵母が混入した場合に乳酸菌を残し、酵母のみをパルス電界で殺菌する方法について検討した。酵母は発酵を行う際に糖分を必要とするので、もしヨーグルト内に酵母が繁殖してしまうとヨーグルトの品質に変化を与える恐れがある。

まず、培養した乳酸菌及び酵母に対してパルス電界を印加し、それぞれの殺菌状況について調査した。その結果、パルス電界殺菌の印加条件を電界強度 10 kV/cm で印加回数 500 回及び 20 kV/cm で 50 回に調整することで、大きさの大きい酵母を殺菌し、大きさの小さい乳酸菌のみを残すことができる可能性を示した。

次に、実際に乳酸菌と酵母を混合した試料液の殺菌をその条件で行い、酵母の殺菌率の方が高くなることを確認した。

これは他の選択性のない殺菌方法にはない大きな優位性となると考えている。

参考文献

- 1) N. Dutreux, S. Notermans, T. Wijtzes, M. M. Gongora-Nieto, G. V. Barbosa-Canovas, B. G. Swanson: Pulse electric fields inactivation of attached free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *Inter. J. Food Microbiology*, **54** (2000) 91
- 2) T. Ohshima, K. Okuyama, M. Sato: Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of *Escherichia coli*. *J. Electrostat.*, **55** (2002) 227
- 3) V. Heinz, I. Alvarez, A. Angersbach, D. Knorr: Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technol.*, **12** (2002) 103
- 4) S. Bendicho, G. V. Barbosa-Canovas, O. Martin: Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science & Technol.*, **13** (2002) 195
- 5) M. P. Gaudreau, T. J. Hawkey, J. E. Petry, M. A. Kempkes: Solid-State Power Systems for Pulsed Electric Field (PEF) Processing. *Proc. 15th IEEE Int. Pulsed Power Conf.*, p. 1278 (2005)
- 6) K. H. Schoenbach, S. Katsuki, R. H. Stark, E. S. Buescher, S. J. BeeBe: Bioelectrics-New Applications for Pulsed Power Technology. *IEEE Tran. plasma sci.*, **30** (2002) 293
- 7) U Zimmermann: Electrical Breakdown, Electroporation, Electroporation and Electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **105** (1986) 176
- 8) H. Akiyama, et. al.: High voltage pulsed power technology, Ohmsha (2003)
- 9) S. Shiina, T. Ohshima, M. Sato :Extracellular production of α -amylase during fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* using pulsed electric field. *J. Electrostat.*, **65** (2007) 30
- 10) T. Ohshima, T. Tamura, M. Sato : Influence of pulse electric field on various enzyme activities. *J. Electrostat.*, **65** (2007) 156
- 11) 浜本哲郎・浜本牧子：Q & A で学ばやさしい微生物学，講談社 (2007)
- 12) 木村俊範：通電処理の殺菌効果 - 菌はシビレたのか？，食品と技術，**1** (2008) 1-8
- 13) 上野景平，今村寿明：試薬便覧，南江堂，pp.107-114 (1983)
- 14) 株式会社 同仁化学研究所：-Bacstain- PI solution 説明書
- 15) R. Kageyama, Y. Kobayashi, K. Tamura, K. Saito, Y. Minamitani, Difference of Cell Death of Budding Yeast for Frequency Components of Pulsed Electric Field. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **44** (2016) 877
- 16) 齋藤高輝，遠藤僚太，野澤康仁，南谷靖史，深田秀樹：パルス電界殺菌における細胞穿孔に対する絶縁破壊理論の適用に関する一考察，電気学会論文誌 A，**135-A** (2015) 341
- 17) Y. Minamitani, Y. Kobayashi, R. Kageyama: Investigation of Difference of Origin of ROS Generated in a Cell by Frequency Components of Pulsed Electric Field. *Proc. of 2015 IEEE Intern. Pulsed Power Conf.*, p. 5 (2015)