高電界パルス殺菌におけるパルス波形に関する考察 宮崎 大貴*.¹,豊満 陽希*,片野 景一郎*,主計 俊哉*,勝木 淳** (2019年9月12日受付;2019年11月29日受理)

Experimental and Analytical Considerations of Pulse Waveform for Efficient Sterilization Using Pulsed Electric Field Daiki MIYAZAKI^{*,1}, Haruki TOYOMITSU^{*}, Kei-ichiro KATANO^{*}, Shunya KAZUE^{*} and Sunao KATSUKI^{**}

(Received September 12, 2019; Accepted November 29, 2019)

Pulsed electric field (PEF) is one of the non-thermal physical bactericidal agents that are unlikely to denature ingredients in fresh liquid foods. This paper discusses the optimum pulse waveform experimentally and analytically for efficient PEF sterilization. *Enterobacter aerogenes* in carboxymethyl cellulose solution (10^7 /ml) was continuously subjected to various kinds of PEFs (field strength: 30-50 kV/cm, pulse duration: 100-600 ns) before the exposure to the mild thermal energy at the temperature of 55°C. The minimum pulse durations for the field strengths of 30 and 50 kV/cm for 6-log order bacterial reduction were approximately 600 and 400 ns, respectively. PEFs with a longer pulse duration and a moderate field strength tends to kill bacteria more efficiently than more intense and shorter ones, in the experimental range. The pore expansion process based on the thermal energy associated with the pulse waveform was discussed using the quasi-steady state calculation of the electric field around the pore. The pulse waveform determines the history of the energy dissipation in the pore, of which the diameter influences the transmembrane electric field around the pore. The calculation suggests that longer pulses enlarge the membrane pore, whereas faster buildup fields are likely to increase the number of the pores.

1. はじめに

国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO) の合同機関である食品規格(CODEX)委員会で発表さ れた国際的な食品衛生管理基準であるHACCP(Hazard Analysis and Critical Control Point)¹¹は,流通する全ての 加工食品に対して十分な殺菌を義務付けている.その手 法として大容量処理かつ確実な殺菌が可能であることか ら加熱殺菌が主流となっている.しかし,生鮮食品,特 に,牛乳,豆乳や液卵に代表されるタンパク質を主成分 とする食品は栄養素や風味成分が熱によって劣化する. このため,予てから低温殺菌技術が求められている.低

キーワード:高電界パルス,液体低温殺菌,パルス波形, 膜小孔,準静電界解析

* 熊本大学大学院自然科学教育部情報電気工学専攻 (〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番地1号) Department of Computer Science and Electrical Engineering, Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8555, Japan

* 熊本大学パルスパワー科学研究所 (〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番地1号) Institute of Pulsed Power Science, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8555, Japan

d.miyazaki@st.cs.kumamoto-u.ac.jp

DOI: https://doi.org/10.34342/iesj.2020.44.1.8

温物理殺菌法²⁴⁾のうち高電界パルス(PEF)殺菌法は, 原理的に細胞膜を有する対象のみを選択的に傷害し,タ ンパク質などの食品成分への直接的な影響はほとんどな い. PEF処理によるタンパク質凝集が数例報告されて いるが^{5,6)},いずれもジュール熱による過度な液温上昇 に起因するものである. PEF法は連続処理を可能とし, 処理部が小さいので現行の食品製造ラインに容易に付設 できるなど,製造現場とのマッチングが良い.

1967年 Sale と Hamilton の実験以降,数多くの PEF 殺 菌の研究が行われてきた⁷⁻⁹⁾. PEF 法では,電極間の電 界分布や温度分布,電界に対する菌の向きや媒体の性質 といった物理因子のほか,細胞周期や膜の状態などの生 物的因子が膜損傷の程度や損傷に対する応答に影響す る.PEF は菌膜を傷害するが,菌の一部は回復して活動 を再開する^{10,11)}.この生き残った菌を損傷菌といい,こ れが PEF 法の殺菌効果を弱める原因の1つである.PEF の殺菌作用を高めるために,天然由来の抗菌物質を添加 したり,温熱を併用するなど工夫されている^{12,13)}.著者 らも液状全卵の殺菌を想定し,50 kV/cmの PEF とタン パク質が変性しない 55℃の温熱処理を組み合わせて, カルボキシメチルセルロース水溶液中のエンテロバクタ ー菌の7桁殺菌に成功している¹⁴⁻¹⁶⁾.

製造現場で求められる毎時1トンを超える大流量処理 では、PEF処理中の冷却がほとんど効かないので、ジュ ール発熱による液温上昇が深刻になる。液温上昇抑制の ためには PEF への投入電気エネルギーを小さくするこ とに尽きる.前出のPEFと他の処理との組み合わせは、 電極から液体に供給されるエネルギーを減じるための方 策である.一方で、殺菌効果を高めるためのパルス波形 やパルス幅に関する議論も数々行われてきた17.18). 電界 強度を一定としてパルス幅のみを変化させた場合.パル ス幅が長いほど殺菌効果は大きくなるが、エネルギー効 率でみると 600~1000 ns で極大になるようである¹⁷⁾. た だ、殺菌とパルス波形との関連性を述べた研究の多くは 現象論に終始し、理論的な議論は見られない、本論文では、 PEF と温熱を組み合わせた殺菌法において殺菌効果を最 大にするパルス波形の特徴について、殺菌実験と数値計 算とを併せて議論する、パルス波形として台形を前提と する. PEF の操作可能な因子は電界強度とパルス幅であ り、付随する因子として電界の立上り速度にも着目する、 まず殺菌実験において、パルス幅を100~600 ns, 電界強 度を 30~50 kV/cm の範囲で変化させ、これら PEF 因子 と殺菌強度との関連を調べた。また、菌を単層の誘電体 膜からなる薄膜球体とする物理モデルを用いて細胞膜上 に形成された小孔に対する外部電界の役割を考えた上で、 殺菌のための最適な PEF の波形について考察する.

2. 殺菌実験

2.1 菌および菌液

本研究は液状全卵の殺菌を想定し、それを模した条件 で実験した.卵の加工食品でしばしば食中毒の原因とな るサルモネラ菌と同科であり低浸襲性のエンテロバクタ ー菌(Enterobacter aerogenes, ATCC 13048, グラム陰性) を用いた.35℃で24時間培養した菌を一旦10 mlの生 理食塩水に懸濁する.精製水にカルボキシメチルセルロ ースナトリウム1.5%と食塩0.25%を溶解し、導電率(6.7 mS/cm)と粘度(15.5 mPa・s)を液状全卵と同等に調 整する.このカルボキシメチルセルロース(CMC)水 溶液500 mlをオートクレーブ(120℃×30分)し、これ に菌を混釈して菌濃度10⁷個/ml 菌液とした.

2.2 1回通過連続流式殺菌システム

本装置は、菌液を連続的に流しながら1回のみ通過させて処理するシステムである¹⁴⁻¹⁶. PEF 処理部は、間隔4mmの並行平板ステンレス電極(SUS316)からなり、液体冷媒で冷却可能である。PEF 処理部の入口と出口の流路内に蛍光式光ファイバー温度計のファイバーセンサを挿入して液温を監視した。系全体を2気圧加圧し、出口のペリスタポンプによって流速を調整した。加圧ステンレス容器に入った濃度10⁷個/mlの菌液は、外径1/4インチのステン

レス管を通って一旦加温器で温度 T₁ (= 50℃) に昇温され た後, PEF 処理部において所定条件の PEF を受ける.本研 究では,出口温度が入口温度と等しくなるように冷却パワ ーを調整した.その後菌液は,55℃の保温器を150秒間で 通過し,ペリスタポンプで排出後に採取される.PEF 処理 部を通過する間に菌液に与える平均パルス回数を5回とし た.液温を冷媒で一定に保つために,パルス電源の繰返し 周波数を1 pps,流速を10 ml/min とした.菌液が PEF 処理 部を通過する時間,系全体を通過する時間,および1回の 試験時間はそれぞれ5秒,3分 30秒,および5分以内である.

2.3 パルス電源

パルス電源は,高電圧シリコンケーブルで作った空芯 インダクタL (260 nH) と高電圧キャパシタC (2.6 nF, FHV-9AJ, TDK) を1組として梯子状にn段結線したブル ームライン型パルス形成回路 (BPFN),およびこれを充 電する直流電源から成る¹⁴⁻¹⁶. 出力端からみたインピーダ ンスZおよび出力電圧のパルス幅 *dt* は次式で表される.

$$Z = 2\sqrt{L/C} \tag{1}$$

$$dt = 2n\sqrt{LC} \tag{2}$$

Zは20Ω固定である. *dt*は*n*によって容易に変更できる. 本実験では*n*を2,4,6,8および11とし,*dt*(FWHM) はそれぞれ100,200,300,400および600 nsとなる. BPFN



図1 高電界パルス殺菌実験システム Fig.1 Experimental setup for PEF sterilization.



図 2 PEF 印加部における電圧波形 Fig 2 Valta as unsufference anglied to the DEF

Fig.2 Voltage waveforms applied to the PEF treatment cell.

の短絡スイッチにはロータリーギャップスイッチを用いた. PEF 処理部の電極間電圧を高電圧プローブ(P6015a, Tektonix), 電流をピアソンコイル (Model 101, Pearson)を用いて測定した. Fig. 2 に PEF 処理部に菌液を流しながら印加した 20 kV のパルス電圧波形を示す. 電極間は 53 pFの静電容量を含むが 20 Ωの抵抗性負荷とみなしてよい.

2.4 殺菌強度評価

コロニーカウント法を用いて殺菌強度を評価した.ま ず採取した菌液を生理食塩水で希釈する.処理条件から 予想される菌数に応じて 1/10希釈を数回繰り返す.コ ントロールとして未殺菌処理の菌液を同様に 1/10⁶ およ び 1/10⁶ となるように希釈した.これらを 200 μ l ずつ標 準寒天培地に塗抹し、インキュベータ(ICL300b, Yamato)で 37℃,24時間培養した後、寒天上のコロニ ーを目視で計数した.PEF 処理した生菌数 N とコント ロールの生菌数 N₀ の比の対数 Log(N/N₀)を殺菌強度 とした.各条件の試行回数は3回である.

2.5 菌膜損傷の評価

PEF 処理した菌の膜損傷を確認するために,基質膜の 物質透過性を示唆する蛍光試薬ヨウ化プロピジウム (PI)を用いて蛍光観察した.PIは正常な脂質膜に対して 不透過であるが,一旦細胞内に入るとDNA にインターカ レートして 488 nm の励起光で赤色蛍光を発する.PI は, 分子量 668 Da,大きさ1 nm 程度であり,基質膜に直径数 nm の小孔ができれば菌内部に入り込む.このため,蛍光 を発する細胞は基質膜が損傷しているとみなされる¹⁹.こ こでは,PEF 印加直後の菌液にPIを添加するため,2.2節 で述べたシステムではなく,汎用エレクトロポレーション 用キュベットを用いて PEF を印加した.PI を滴下してピ ペッティングした後,暗所で 30分間静置した.その後ガ ラス底のディッシュに移して,顕微鏡(DMi8, Leica)の 位相差モードおよび蛍光モードで観察した.

3. 殺菌実験結果

Fig. 3 は,初菌濃度 10⁷個/mlの菌液を,電界強度とパル ス幅について様々な条件で殺菌処理した結果である.縦軸 は殺菌強度(コントロール菌液に対する処理菌液中の生菌 数の比の対数)であり,エラーバーは標準偏差を示す.破 線は最小二乗法を用いて指数関数で近似した曲線である. パルス幅が同一であれば電界強度が大きいほど殺菌強度 が大きい.電界強度を一定とするとパルス幅が長いほど殺 菌強度が大きく,パルス幅に関して指数関数的に生菌数が 減少している.Fig. 3 に見られる電界強度,パルス幅と殺 菌効果の相関は,従前の多くの研究^{17,18)}と同様である.殺 菌率 6桁を超える強い殺菌のためには 50 kV/cm の大きい





Fig.3 Bactericidal effect Log (N/N_0) of variety kinds of PEFs in terms of field strength and pulse duration for *Enterobactor aerogenes* (number of pulses during the PEF treatment : 5).

電界を用いても 400 ns 以上のパルス幅が必要である.40 kV/cm および 30 kV/cm に対して 6桁殺菌を可能にする最 小パルス幅は近似曲線よりそれぞれ約 500 ns,600 ns であ る.6桁殺菌するために必要な単位質量あたりの電気エ ネルギー,すなわちエネルギー効率を比較すると,30 kV/cm@600 ns,40 kV/cm@500 ns,50 kV/cm@400 ns に 対してそれぞれ 18 kJ/kg,27 kJ/kg,33 kJ/kg であり,30 kV/cm@600 ns の場合が最もエネルギー効率が高い.

実用的な大流量処理を考えると、電極間隔を大きくす るために電界は小さいほど良く、パルス電源への厳しい 要求を考えるとなおさらである.より良いエネルギー効 率で殺菌するために、電界強度を大きくすべきか、ある いはパルス幅を長くすべきか、という視点で、次章で菌 を単純化した物理モデルを用いて考察する. このほかパ ルス幅とエネルギー効率の関係については次の2点にも 注意したい.1点目は、膜充電に関わるものである、詳 しくは次章で述べるが, 菌に対する膜充電の時定数は 50 ns 程度なので、パルス幅が短いほどパルス全体に対 する膜充電にかかる時間の割合が大きくなる. すなわち, 全パルスに対して膜に強電界がかかる時間の割合が小さ くなる.2点目は、パルス波形の不完全性に関するもの である.パルス幅が短いほど全パルスに対して電界が大 きい時間の割合が小さくなる.このため、菌が強い電界 を受ける時間はパルス幅(半値全幅)よりも短い.

Fig. 4 は, 30 kV/cm, 600 ns の PEF を 5 回印加した直後に蛍光試薬 PI を加えた菌液の位相差顕微鏡像と同じ 視野の蛍光像である.視野のすべての菌において,強弱 はあるものの,赤色蛍光が見られ, PEF によって菌膜が 損傷していることがわかる.次章では, PEF によって小 孔が形成されることを前提に,継続する外部電界が小孔 にどのように作用するかという視点で議論する.



図 4 PEF (30 kV/cm, 600 ns, 5 回) を印加したエンテロバク ター菌の明視野像と PI 蛍光像

Fig.4 Bright field and PI fluorescent images of *Enterobactor* aerogenes exposed to five of 30 kV/cm, 600 ns PEFs.

4. 考察

電界下で細胞膜に小孔が形成される過程については, 膜を構成する分子の分子動力学的解析の試みが多くなさ れ²⁰⁾,明らかになりつつある。ここでは、小孔形成後も 外部電界がかかり続ける状況において、小孔の様態変化 における外部電界の役割を考える.まず,導電性液体中 に浮かんだ厚さ10 nmの非導電性膜でできた直径1 µm の薄膜球を考える.内部も導電性液体で満たされている. これに外部から立上り時間 50 ns, 振幅 40 kV/cm のステ ップ電界を印加する.この状況における準定常電界を CST Studio Suite (ダッソー・システムズ)を用いて計算 した. Fig. 5 は PEF 印加開始から 300 ns 経過後の電界方 向に沿った薄膜球中心軸上の電界強度分布である.球の 中心を電位基準とした. 液状全卵中に単独で存在する細 菌を想定し、計算に用いた膜や内外の液体の物性値は文 献 14 から引用し、一定とした. Fig. 5下段は高電位側の 膜近傍を拡大したものである.外部電界は膜の外側に正 電荷を集積させて電位を上昇させ、内側ではその逆が起 こる.このため膜横断電界が増幅される.Fig.6は、振 幅 30,40 および 50 kV/cm のステップ電界を印加したと きの膜電界の立上りからの経時変化である. 膜近傍に正 負の電荷が集積する時間τ[s]は、細胞半径α[m]、 膜の静電容量 C_m [F/m²] と細胞質および外液の導電率 σ_{p} , σ_{s} [S/m] を用いて次のように表される²¹⁾.

$$\tau = (\sigma_p + \sigma_s)^{-1} \alpha C_m \tag{3}$$

本研究においてτは約 50 ns である. 外部電界の立上 がりに対して膜電界の上昇が遅れていることがわかる. 仮に膜の破壊電界を2 MV/cm とすれば,外部電界の大 きさによって膜破壊の時刻が数 10 ns 程度異なる.

次に,高電位側の細胞膜に小孔が存在する場合の小孔 近傍の電界分布に着目して解析する.ここでは,小孔内 は均質であり,小孔内における熱伝導,イオンの拡散や 液と脂質膜の流体的な相互作用は考えないことにし,小



- 図5 外部電界(40 kV/cm)下の細胞の中心軸上の電界分布. 球中心を基準とした.下は高電位側の膜近傍の拡大.
- Fig.5 Potential profile along the center axis of the spherical cell in the direction of the external field of 40 kV/cm. The upper is the whole view and the lower is the magnified view around the membrane at the high potential side.



図 6 30, 40 および 50 kV/cm のステップ状の外部電界に対 する細胞膜の電界強度の時間変化(パルスの立上がり 時間は 50 ns)

Fig.6 Temporal variation of the electric field strength at the cell membrane for different external fields of 30, 40 and 50 kV/ cm.

孔に流れ込む電気エネルギーによって小孔内温度が上昇 し,脂質膜を押し広げるという仮説のもとで議論を進める. Fig.7は、小孔の直径を5,10および20nmとした場合の 小孔周辺の電流密度分布である.Fig.8は、小孔が存在す る場合の小孔中心軸上の膜を横断する電位分布を、小孔 がない場合と比べたものである.小孔形成によって勾配 が緩和されるものの、依然として大きい勾配が維持されて



図 7 PEF (40 kV/cm) の外部電界印加時の高電位側の膜の小孔周辺の電流密度分布 Fig.7 Current density distribution around the membrane pore at the high potential side for different pore diameters. External electric field is 40 kV/cm.



図8 外部電界(40 kV/cm)印加時の小孔周辺の電位分布(パ ラメータは小孔直径 D)

Fig.8 Potential profiles along the membrane pores for different pore diameters under the external electric field of 40 kV/cm.



図9 一定外部電界下で膨張する膜小孔内の電力密度推移(パ ラメータは外部電界強度 E)

Fig.9 Power density in the membrane pore as a function of pore diameter for different external electric fields.

いることがわかる.これによって小孔に電流が流れ込ん で急激に温度が上昇し、リン脂質を押し広げる圧力とな る.一方で、Fig.9にみられるように、一定の外部電界下 では小孔の拡大とともに電力密度が小さくなるので、小 孔拡大が飽和する.要するに、外部電界から小孔に供給 される電力密度の履歴によって小孔の大きさが決まる. したがって、殺菌のためには、膜小孔が物理的にも生物 的にも回復できないほど拡大するような電力密度の履歴



図10 単一小孔が存在する膜に外部電界(40 kV/cm)を印 加した場合の小孔周辺の膜横断電界(パラメータは 小孔直径 D)

Fig.10 Transmembrane electric field around the membrane pore under the external electric field of 40 kV/cm for different pore diameters.

を外部電界で与えることが必要であり、小孔を拡大しう る十分な電界強度を持続するパルス波形が好ましいとい える. Gintautas 等は、電界強度やパルス幅と細胞に形成 される小孔の大きさの関連について、大きさの異なる分 子の膜透過性を用いて調べており¹⁸⁾、ここで行った解析 の解釈は彼らの実験と矛盾しない.また、Fig.3に示した 殺菌実験のほか、PEF 殺菌におけるパルス幅の意義を議 論した Frey 等の報告¹⁷⁾とも合致する.

ここまでは単一の小孔についての議論であったが,実際は多数の小孔が形成されうる. Fig. 10 は, 膜に 1 つの小孔が存在する場合の小孔周辺の膜横断電界と小孔からの距離の関係を示す. 直径 5 nm の小孔から 30 nm 離れた地点において膜横断電界は小孔がない場合の 95%以上に維持されている. この大きい電界は別の独立した小孔の形成に寄与する. PEF によって小孔が形成され,時間経過とともに小孔が拡大すると,同時に電界が緩和される範囲が拡大する. このことは,電界の立上りが高速なほど(あるいは,同じ立ち上がり時間であっても振幅が大きいほど),小孔が密に存在する可能性を示唆する. ただし,電流が分散されるので個々の小孔を拡大させる圧力は抑

制される. Fig. 3 において,電界強度が大きい場合よりも パルス幅が長いほうが殺菌のエネルギー効率が高いのは, 小孔の数が多いことよりも直径が大きいことの方が菌にと って致命傷になりやすいことを示唆する. Kotnik 等は,脂 質膜に形成された小孔が脂質分子の熱運動によって閉じ る過程を分子動力学シミュレーションを用いて議論してお り,小孔径が大きほど膜の回復により長い時間を要し,20 nm程度を超えると縮小しなくなることを示している²⁰⁾. Fig. 3 のパルス幅 100 ns と 150 ns の場合に大きい電界でも 殺菌効果が小さかったのは,小孔が拡大するための時間 が十分でないことに加えて,電界の立上がりが高速なた めに却って小孔拡大が抑制されていることもありうる.

5. 結言

高電界パルス殺菌において,エネルギー効率を最大化 するパルス波形について,電界強度とパルス幅を変数と した殺菌実験と,小孔を有する細胞の物理モデルを用い た数値解析によって考察した.概して,パルス幅が短い ほど十分な殺菌効果を得るための電界強度を大きくしな ければならない.パルス幅が短く電界が大きい条件とパ ルス幅が長く電界が小さい条件を比較すると,後者のエ ネルギー効率が良いことがわかった.また,膜小孔形成 後の小孔膨張圧力が小孔内のエネルギー密度に依存する という仮説をもとに,外部電界下における小孔を有する 膜について電界計算を行い,直径や数で表される小孔の 様態の経時変化が外部電界の履歴,すなわちパルス波形 に依存する可能性を示した.

参考文献

- 厚生労働省:HACCP (2019) https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_ iryou/shokuhin/haccp/ (2019-2-26)
- R. Shankar, U. Kaushik and S. A. Bhat: The Emerging Technology in The Sector of Food Technology - The Non-Thermal Technology. Innovation and Applied Studies., 6 (2014) 941-958
- K. Sonobe: High Pressure Sterilization Technology Subject for the Application to Food. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 44 (1997) 522-530
- R. Galante, D. Ghisleni, P. Paradiso, V. Alves, T. Pinto, R. Colaco and P. Serro: Sterilization of silicone-based hydrogels for biomedical application using ozone gas: Comparison with conventional techniques. Materials Science and Engineering: C., **78** (2017) 389-397
- Z. Wai, Y. Rujin and C. Xiaochan: Pulsed electric field induced aggregation of food proteins ovalbumin and bovine serum albumin. Food Bioprocess Technol., 5 (2012) 1706-1714
- 6) Z. Wai, Y. Rujin and C. Xiaochan: Pulsed electric field-induced aggregation between lysozyme, ovalbumin and ovotransferrin

in multi-protein system. Food Chemistry, 175 (2015) 115-120

- A. J. H. Sale and W. A. Hamilton: Effects of high electric fields on microorganisms. Killing of bacteria and yeasts. Biochimica et Biophysica Acta., 148 (1967) 781-788
- A. J. H. Sale and W. A. Hamilton: Effects of high electric fields on microorganisms II: Mechanism of action of the lethal effect. Biochimica et Biophysica Acta., 148 (1967) 789-800
- A. J. H. Sale and W. A. Hamilton: Effects of high electric fields on microorganisms III: Lysis of erythrocytes and protoplasts. Biochimica et Biophysica Acta., 163 (1968) 37-43
- 10) D. Garcia, P. Manas, N. Gomez, J. Raso and R. Pagan: Bioquirements requirements synthetic for the repair of sublethal membrane damage in Escherichia coli cells after pulsed electric fields. Appl. Microbiology., 100 (2014) 428-435
- Erick K. Moen, Bennett L. Ibey, Hope T. Beier and Andrea M. Armani: Quantifying pulsed electric field-induced membrane nanoporation in single cells. Biochimica et Biophysica Acta., 1858 (2016) 2795-2803
- S. Monfort, G. Saldana, S. Condon, J. Raso and I. Alvarez: Inactivation of Salmonella spp. In liquid whole egg using pulsed electric fields, heat, and additives. Food Microbiology, 30 (2013) 393-399
- 13) L. Espina, S. Monfort, I. Alvarez, D. Garcia-Gonzalo and R. Pagan: Combination of pulsed electric fields, mild heat and essential ils as an alternative to the ultrapasteurization of liquid whole egg. Food Microbiology, **189** (2014) 119-125
- 14) K. Baba, T. Kajiwara, S. Watanabe and S. Katsuki: Low-teperature Pasteurization of Liquid Whole Egg using Intense Pulse Electric Fields. IEEJ Trans. Fundamentals and Materials, 137 (2017) 668-673
- 15) T. Kajiwara, T. Oide, S. Katsuki, T. Sakugawa and H. Akiyama: Liquid Pasteurization Using Intense Electrical Pulses Combined with Thermal Post-Treatment. 2014 IEEE Int. Power Modulator and High Voltage Conf., (2014) 53-56
- 16) T. Kajiwara, T. Oide, K. Baba, N. Ohnishi, S. Katsuki, H. Akiyama, R. Sasahara and K. Inoue: Inactivation of Enterobacter Aerogenes in Carboxymethyl Cellulose Solution using Intense Pulsed Electric Fields (iPEF) Combined with Moderate Thermal Treatment. IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation, 22 (2015) 1849-1855
- 17) W. Frey, C. Gusbeth and T. Schwartz: Inactivation of Pseudomonas putida by Pulsed Electric Field Treatment: A Study on the Correlation of Treatment Parameters and Inactivation Efficiency in the Short-Pulse Range. Springer Science + Business, Membrane Biology, 246 (2013) 769-781
- 18) S. Gintautas and S. Rita: Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses. Biochimica et Biophysica, 1818 (2012) 3032-3039
- M. Rosenberg, N. Azevedo and A. Ivask: Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. Scientific Reports, 9 (2019) 1-12
- 20) T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek and D. Miklavcic: Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. Annual Review of Biophysics, 48 (2019) 63-91
- 21) 葛西道生, 稲葉浩子:高電圧パルスによる細胞穿孔のメカ ニズム 遺伝子導入法の基礎. 蛋白質核酸酵素, 31 (1986) 1591-1603