◆◆◆ 解説 (2007年度日本食品工学会奨励賞) ◆◆◆

交流高電界による液状食品の殺菌技術の開発

植 村 邦 彦

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所食品工学研究領域

Inactivation of Microorganisms in Liquid Foods by High Electric Field Alternating Current

Kunihiko UEMURA

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Heat treatment is commonly used to inactivate microorganisms in liquid foods in order to improve food safety and extend shelf life. However, heat treatment to kill spores also causes thermal damage to the food, which can adversely affect the flavor and lead to loss of nutrients. We developed an apparatus to apply a high electric field AC (HEF-AC) that inactivates heat-resistant microbe spores in liquid food while preserving the freshness of raw food.

Keywords: High Electric Field AC, spore, inactivation,

1. 緒 言

1996年に発生した病原性大腸菌O157の食中毒事故による健康被害に対応して、農林水産省による委託研究プロジェクトが開始された。筆者らは、それまでに食品に直接電気を通電することで食品自身の加熱を行う通電加熱とよばれる食品加工に関する研究を行ってきた経緯から、4本プロジェクトにおいて、食品の電氣的な殺菌方法に関する研究に取り組んだ。

食品の殺菌方法は、昔から加熱することが一般的に行われてきたが、その過程で熱に弱い香気成分や有用な機能性成分が同時に損失されることが問題とされてきた。そこで、加熱を伴わない非熱的な殺菌方法として、超高圧、高電圧パルス、光パルス、放射線等の各種の方法が国内外で多く研究開発されてきたが、いずれの方法も低コストで大量処理を要求される食品産業への応用に問題があり、限られた利用にとどまっていた。筆者らは、非熱殺菌にこだわらず、加熱殺菌の中でその加熱時間を短縮する方法として、従来の通電加熱の印加電界を高めることで電氣的な殺菌効果を期待した新しい殺菌方法である交流高電界技術を開発した。これによって、食品の安全性と品質の向上を担保しつつ、

実用レベルの生産が可能となった。以下に、交流高電界技術の基礎となった通電加熱、小規模な交流高電界およびその実用化について解説する。

2. 理 論

2.1 通電加熱

食品の殺菌は有史以前から火を使った外部加熱が一般的に行われてきた。100年ほど前から、電気エネルギーを利用して食品自身を発熱させる内部加熱の利用が始まった。電気エネルギーによる内部加熱は、マイクロ波帯の周波数の電波を用いたマイクロ波加熱と比較的低い周波数の交流電気をを用いた通電加熱の2つに分けられる。マイクロ波加熱は我が国では主に2.45 GHzの周波数のマイクロ波の電磁波エネルギーを食品の加熱に利用したもので、工業用から一般家庭用に普及した加熱技術である。一方、後者の通電加熱は、食品に一对の電極を密着させ、その電極間に交流電圧を印加し、食品内部を流れる電流とそれに逆らう電気抵抗により、食品自身が発熱することを利用した加熱方法のことである。米国では、1920年に通電加熱を牛乳の殺菌に利用した例が報告されている[1]ように、マイクロ波加熱よりも原始的な加熱方法といえる。20年ほど前から使われるようになった20 kHz程度の高周波数を用いた通電加熱はその安定性とエネルギー効率の高さから、すり身加工品に多く利用されるようになった。通電加熱

による殺菌は、熱の効果だけでなく電気による効果をもつものだと考えられてきたが、Palaniappan らが電気効果と熱効果を分離した実験を行ったところ、電気効果による微生物の致死効果は認められないと結論づけた [2]。ただし、今井らは、野菜の通電加熱において、印加する電界を高くして、細胞 1 個あたりにかかる電圧を 1 V に近づけた場合には、細胞膜の絶縁破壊が生じることを報告した [3]。植物細胞と微生物の違いがあるが、通電加熱の電界が十分高ければ植物細胞と同様に微生物の細胞膜に物理的な損傷を与えることが可能だと考えた。

2.2 高電圧パルス殺菌

高電圧パルスによる飲料の殺菌は、非常に短い ($10\ \mu\text{s}$ 以下) パルス状の高電界 ($10\ \text{kV/cm}$ 以上) を材料に印加することによる殺菌法である [4-7]。この殺菌のメカニズムは外部から細胞に大きな電界が印加された場合、細胞膜の両端に電位差が生じ、細胞膜の局所的な不安定性から穴が開くことで、電気穿孔またはエレクトロポレーションとよばれる [8]。細胞膜に電気穿孔が生じる電圧は、細胞の種類や大きさにかかわらず 1 個あたり 1 V 以上であることが知られている [9,10]。

Hülshager らは各種の微生物の殺菌に高電圧パルスを適用したところ、大腸菌に $30\ \mu\text{s}$, $12\ \text{kV/cm}$ のパルスを 10 回印加した場合に 10^2 オーダ低下し、30 回パルスを印加した場合には 10^3 オーダ低下することを報告した [11]。Qin らは $3\ \mu\text{s}$, $40\ \text{kV/cm}$ の高電圧パルスを 60 回繰り返し印加することにより、大腸菌を 10^6 オーダ低減することに成功した [7]。Pothakamury らは牛乳のモデル食品中の *Staphylococcus aureus* に対して、 $16\ \text{kV/cm}$ の高電圧パルスを 50 回印加し、 10^4 オーダ菌数を低下させた [12]。

3. 実 験

3.1 交流高電界における通電加熱

液状食品は電極ユニットを通過する際、接触した左右の電極に印加した交流電圧に従うように材料中を電流が流れる。この電流が材料固有の電気抵抗によって、熱エネルギーに変換され、材料自身が発熱する。具体的には、0.1% 濃度の食塩水 (オレンジジュースの電気伝導率に相当する) を $100\ \text{ml/min}$ の一定速度で流したものに $0.2\ \text{mm}$ の間隔に配置した対抗電極に $200\ \text{V}$ の交流電圧を給電した場合、材料の温度 (処理温度) は電極ユニットを通過する約 0.1 秒間で 20°C から 80°C 程度まで上昇する。このときの上昇温度は材料の電気伝導率に比例し、印加電界の二乗に比例する。各種液状食品はそれぞれ固有の電気伝導率をもつため、同じ条件の電界を印加した場合でも各材料の電気伝導率の違い

によって出口温度が異なる。この出口温度は殺菌効果に大きく寄与するため、所定の処理温度になるように、印加電界の他、初期温度、流速を適切に制御した。

3.2 交流高電界における電気穿孔

高電圧パルス殺菌では、殺菌の対象とする微生物の大きさを $1\ \mu\text{m}$ と仮定した場合、 $1\ \text{cm}$ の電極間隔のとき $10\ \text{kV}$ 以上の電圧を印加する必要がある。しかしながら、本研究では $0.2\ \text{mm}$ と非常に狭い電極間隔を用いていることから、 $200\ \text{V}$ の電圧を印加することで $1\ \mu\text{m}$ の細胞 1 個あたり 1 V の電圧を加えたことになる。

3.3 交流高電界殺菌装置

交流高電界装置は電源部、電極ユニット部から構成され、シグナルジェネレータ (HP, 8904A) で作られた周波数 $20\ \text{kHz}$ の交流信号を電力増幅器 (NF 回路ブロック, 4510) で $200\ \text{V}$ の電圧、最大 $5\ \text{A}$ の電流に電力増幅した交流を電極ユニット部の対向電極に給電した。液体材料は溶液タンクから液送ポンプで $6\sim 9\ \text{L/h}$ の一定流量で電極ユニットの材料供給口に入力した。電極ユニットを通過した液体は 0°C の冷却水で直ちに 20°C 以下まで冷却した (Fig. 1)。また、Fig. 2 に電極ユニットの詳細を示す。

4. 結 果

4.1 交流高電界による大腸菌の殺菌特性

$2.1 \times 10^6\ \text{CFU/ml}$ の初発菌数の大腸菌を含む 0.05% の食塩水を $6\ \text{L/h}$ の一定流速で流し、電極ユニットに印加する電界強度を $5\sim 10\ \text{kV/cm}$ と変化させた場合に、電極ユニットを $0.1\ \text{s}$ で通過した食塩水には $1\ \text{A}\sim 5\ \text{A}$ の電流が流れ、電極出口の温度はそれぞれ Fig. 3 の添え字の値となった。図より、 $5\ \text{kV/cm}$ 以上の電界を印加した場合に殺菌効果が大きくなり、それ以降は印加電界が高くなればなるほど大腸菌数が減少することがわかった。ただし、ジュールの法則から印加電界を高くすると通電加熱の発熱が大きくなり、材料の出口温度が高くなる。したがって、この結果だけでは、電界の殺菌効果を温度効果から分離することができない。そこで、同一の温度上昇となるように、食塩水濃度を変えて電気伝導率を変えた材料を用意して交流高電界処理を行った。つまり、材料の電気伝導率に関わらず、出口温度が設定した温度となるように印加する電圧を調整した。出口温度が同一となる条件で、横軸に印加電界、縦軸に大腸菌の菌数の対数値を Fig. 4 にプロットした。図より、同一出口温度条件では大腸菌の菌数の対数値は印加電界に比例して低下することがわかった。つまり、本結果より大腸菌に対して交流高電界処理の電界効果が明らかにされた。一方で、処理温度が

Fig. 1 Laboratory scale HEF-AC setup.

Fig. 2 Electrode unit and the longitudinal section.

70℃の方が65℃のものよりも傾きが大きく、殺菌効果が高いことがわかった。つまり、交流高電界による大腸菌の殺菌は通電加熱による温度上昇と、電界印加による電気穿孔の相乗効果で殺菌効果が高くなったと推察される。その結果、加熱だけの処理に比べて

非常に短時間で効果的な殺菌が実現されたと考えられた [13]。交流高電界をリングジュース中の大腸菌の殺菌に応用した同様の結果が報告されている [14]。

The symbols on each point show the temperature at way out of the electrode.

Fig. 3 Inactivation of *E. coli* using HEF-AC.

The symbols on each point show the concentration of saline.

Fig. 4 Electric Field effect of inactivation of *E. coli* in HEF-AC.

4.2 加圧交流高電界による芽胞の殺菌特性

Fig. 1の交流電源を用いて最大12 kV/cmの電界を印加し、出口温度を100℃となる条件で枯草菌芽胞の殺菌を試みたところ、印加電界を高くしても枯草菌芽胞の菌数を減少させることができなかった。芽胞の殺菌は、高電圧パルスの場合も、十分な効果が得られなかったと報告されている[15]。そこで、枯草菌芽胞の殺菌を行うために材料温度を100℃以上に上昇させることにした。つまり、0.2 MPaの加圧下で交流高電界処理を行うような加圧式の交流高電界装置を試作した(Fig. 5)。市販のオレンジジュースに枯草菌芽胞を添加したものを供試材料として、出口温度が120℃となる条件で交流高電界処理を行ったところ、Fig. 6に示すように、4対数オーダー以上枯草菌芽胞が減少し、比較対象として130℃の温度になるまで30秒マイクロ波加熱したもの、

100℃の沸騰水中で10分間加熱したものよりも高い殺菌効果を示すことがわかった。また、オレンジジュース中のアスコルビン酸を定量したところ、交流高電界処理をした製品は、他の方法に比べてアスコルビン酸が20%以上多く保持されることがわかった。温州みかんの香気成分の変化について従来の加熱処理と10⁴オーダーの枯草菌芽胞の殺菌効果を持つ処理条件で比較したところ、交流高電界処理の香気成分の変化が少ないことがわかった[16]。

4.3 交流高電界装置のスケールアップ

交流高電界装置の実用化に必要な処理量の拡大を目指して、Fig. 7に示すように、系内で圧力を保持できる内圧型の交流高電界装置構造とし、最大100 L/hの流速で送液できるように装置を設計した。交流高電界ユ

Fig. 5 Pressurized HEF-AC setup.

Fig. 6 Inactivation of *B. subtilis* spore using HEF-AC, Microwave and a water bath.

ニットを通過した溶液は直ちにプレート式熱交換機で室温まで冷却後、出口に設けた圧力調整弁で系内の圧力を調整しながら、処理液を排出した。

市販のオレンジジュースに枯草菌芽胞を添加したものを供試試料とし、電極長：32 mm、電極間隔：1 mmの電極を用いて電界を印加しながら60 L/hの一定流速で処理したとき、処理温度と殺菌効果の結果をFig. 8に示す。図より、出口温度が115℃以上で殺菌効果が高

くなり、出口温度が120℃のとき、 10^4 オーダの殺菌効果が得られた [17]。

枯草菌を含めた各種微生物の交流高電界による殺菌結果をTable 1にまとめた。表より、酵母や大腸菌は70℃の処理温度で 10^4 オーダ以上の殺菌が可能であったが、微生物芽胞は一般に120℃以上の出口温度で殺菌効果が高く、とくに耐熱性の高い *Geobacillus stearothermophilus* の場合は、140℃まで出口温度を高

Fig. 7 100L/hour of throughput HEF-AC setup.

Fig. 8 Survival ratio of *B.subtilis* spore for outlet temperature.

Table 1 Inactivation of selected microorganism by HEF-AC.

Tempera ture	<i>S.cerevi siae</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>A.acidoca ldarius</i>	<i>Geo.stearoth ermophilus</i>
65℃	○	△				
70℃	○	○				
110℃			×	×		
115℃			△	△	×	
120℃			○	○	○	×
130℃			○		○	×
135℃						△
140℃						○

The wrongmark (×), the triangle (△) and the circle (○) represent the inactivation level of less than 10¹, less than 10² and higher than 10³ orders. The filled in box represent the safety area.

くする必要があることがわかった [18]. ただし、これらはいずれも 0.1 秒以内の処理で以上の殺菌が実現されていることは、従来の加熱殺菌手法では考えられないほど短時間で殺菌できる特長を有している。

4.4 交流高電界処理の品質への影響

オレンジジュースに元々含まれている主要な機能性成分について、交流高電界処理 (12.5 kV/cm の電界を 0.01 s 間印加し 120℃ まで昇温) と枯草菌芽胞に対して同程度の殺菌効果を有する超高温処理 (UHT, 110℃ で 10 s 間保持) とを比較検討した. Fig. 9 にヘスペリジン、還元型ビタミン C、リナロールおよびリモネンの変化を示す. 以上の 4 項目全てにおいて、交流高電界処理を行ったものは UHT 処理のものよりも多く残留し、未処理のものに近い値を示すことがわかった。

また、交流高電界処理および UHT 処理を行ったオレンジジュースの官能検査を 10 名の専門パネラーで実施したところ、交流高電界処理を行ったものは、UHT のものよりも官能検査の評点が上回ることがわかった。

5. ま と め

交流高電界技術により大腸菌や酵母などのグラム陰性菌は、5 kV/cm 以上の電界を印加することにより、

効率的な殺菌を行うことができた。また、耐熱性の高い微生物芽胞に対しては、交流高電界を印加して 100℃ 以上まで急速に昇温することにより、高い殺菌効果が得られることがわかった。交流高電界技術は加熱時間を従来の加熱だけの殺菌に比べて 100 分の 1 以下の時間に短縮できることから、熱に弱い有用成分 (ビタミン C) や香気成分の損失が少ない殺菌方法であることがわかった。また、本技術はスケールアップや連続処理が確認され、装置コストおよびランニングコストも比較的安価であることから、実用化に適した殺菌技術といえる。本技術は、果汁飲料以外にも茶飲料、酒類などへの応用が可能なが確認されている。ただし、交流高電界技術は牛乳のようにタンパク質を含む液状食品への応用には難があり、固形食品への応用と併せて、今後の研究課題となっている。また、交流高電界による食品中の不要な酵素を効率的に失活できることが報告されており [19], 今後、液状食品の殺菌以外にも応用範囲が拡大することが期待される。

謝 辞

交流高電界装置の開発はフロンティアエンジニアリングの協力で、実用化を目指したスケールアップの段階でポッカコーポレーションとの共同で行いました。

Fig. 9 Functional components in orange juice treated by HEF-AC or UHT.

両企業の関係者の皆様方に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- [1] A. K. Anderson, R. Finkelstein; A study of the Electropure process of treating milk. *J. Dairy Sci.* **2**, 374-406 (1919).
- [2] S. Palaniappan, S. K. Sastry, E. R. Richter; Effects of electricity on microorganisms. *J. Food Proc. Preserve*, **14**, 393-414 (1990).
- [3] T. Imai, A. Noguchi, K. Uemura; Ohmic heating of Japanese white radish. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **30**, 461-472 (1995).
- [4] T. Ohshima, Y. Hama, M. Sato; Releasing profiles of gene products from recombinant *Escherichia coli* in a high-voltage pulsed electric field, *Biochem. Eng. J.*, **5**, 149 - 155 (2000).
- [5] H. Bushnell, J. E. Dunn, R. W. Clark; High pulsed voltage systems for extending the shelf life of pumpable food products. US Patent 5048404 (1991).
- [6] A. J. Castro, G. V. Barbosa-Canovas, B. G. Swanson; Microbial Inactivation of Foods by Pulsed Electric Fields. *J. Food Process. Preserve.*, **17**, 47-73 (1993).
- [7] B. L. Qin, Q. Zhang, G. V. Barbosa-Canovas, B. G. Swanson; Pulsed electric field treatment chamber design for liquid food pasteurization using finite element method. *Trans. ASAE*, **38**, 2, 557-565 (1995).
- [8] U. Zimmermann, R. Benz; Dependence of the electrical breakdown voltage on the charging time in *Valonia utricularis*. *J. Membrane Biology*, **53**, 33-43 (1980).
- [9] A. J. H. Sale, W. A. Hamilton; Effect of high electric fields on microorganism. I. Killing of bacteria and yeast. *B. B. A*, **48**, 781-788 (1967).
- [10] A. J. H. Sale, W. A. Hamilton; Effect of high electric fields on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts (1968).
- [11] H. Hulsheger, J. Potel, E. G. Niemann; Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, **22**, 149-162, (1983).
- [12] U. R. Pothakamury, A. Monsalve-Gonzalez, G. V. Barbosa-Canovas, B. G. Swanson; Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Res. Intern.*, **28**, 2, 167-171 (1995).
- [13] K. Uemura, S. Isobe; Developing a new apparatus for inactivating *Escherichia coli* in saline water with high electric field AC. *J. Food Eng.* **53**, 203-207 (2002).
- [14] D. J. Gevecke, C. Brunkhorst, P. Cooke, X. Fan; Nonthermal inactivation of *E. coli* in fruit juices using radio frequency electric fields. In: Juneja, V. K., Cherry, J. P. and Tunick, M. H. Editors, *Advances in microbial food safety*, American Chemical Society, Washington, DC 121-139 (2006).
- [15] Z. Cserhalmi, I. Vidacs, J. Beczner, B. Czukor; Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields. *Innov. Food sci. and Emerg. Tech.* **3**, 41-45 (2002).
- [16] K. Uemura, S. Isobe; Developing a new apparatus for inactivating *Bacillus subtilis* spore in orange juice with a high electric field AC under pressurized conditions. *s. l. : J. Food Eng.* **56**, 325-329 (2003).
- [17] K. Uemura, I. Kobayashi, T. Inoue, M. Nakajima; "Computer Fluid Dynamics study on heating liquid food by High Electric Field AC." (in Japanese). *Rep. Nat'l Food Res Inst.*, **71**, 27-32 (2007).
- [18] T. Inoue, Y. Kawahara-Aoyama, S. Ikeda, S. Hijikata, S. Isobe, K. Uemura; "Inactivation of various microorganism spores by High Electric Field AC treatment in saline." (in Japanese). *Japan J. Food. Eng.* **8**, 3, 123-130 (2007).
- [19] T. Inoue, Y. Kawahara-Aoyama, S. Ikeda, S. Isobe, K. Uemura, "Inactivation of pectinesterase in citrus juice by High Electric Field AC treatment." (in Japanese), *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*, **54**, 4, 195-199 (2007).

要 旨

食品の安全性の向上ならびに賞味期限の延長のために、食品中の微生物を殺菌する目的で、加熱処理が行われている。しかしながら、芽胞を殺菌する加熱処理は、同時に香気成分や栄養成分の損失を引き起こすことが問題である。そこで、我々は食品原料の鮮度を保ちつつ液状食品中の耐熱性微生物芽胞を効率的に殺菌することが可能な交流高電界（HEF-AC）技術を開発した。