

<平成18年度>

低圧条件での二酸化炭素を用いた革命的食品殺菌法の開発

早田 保義 ・ *小林 史幸

(明治大学農学部農学科, *明治大学研究・知財戦略機構)

1. 緒 言

加熱殺菌法は食品殺菌に一般的に使用されているが、熱により食品中の香気成分の損失や味の劣化を招きやすい。代替法として超臨界二酸化炭素(SC-CO₂)殺菌法は常温領域で殺菌可能であるため、加熱殺菌のように食品中の有効成分の変性を起こさないことから、新たな食品殺菌法として多くの研究者によって研究が盛んに行われてきた^{1~4)}。しかしながら、SC-CO₂殺菌は高い殺菌効果を得るために高圧(10 - 20 MPa)を維持する必要があり、装置コストが高くなることや、SC-CO₂は元来有機化合物の抽出溶媒として使用されており、食品中の香気成分を抽出してしまうなどの問題点があった。Shimodaら^{5~7)}はフィルターを介してSC-CO₂を泡状にして供給する連続式マイクロバブルSC-CO₂法を考案し、数種の微生物に対して高い殺菌効果があることを報告した。さらに、我々は連続式マイクロバブルSC-CO₂法の殺菌および香気成分抽出効果が溶存CO₂濃度および圧力にそれぞれ依存していることを見出した^{8,9)}。そのため、超臨界状態よりも極めて低い圧力でCO₂ガスを高濃度に液体試料中へ溶解させることが可能となれば、低装置コストで、しかも香気を損なわない新たな食品殺菌法が開発できるものと考えられる。しかしながら、Ouléら¹⁰⁾は40℃, 2.5MPa, 90minの加圧CO₂殺菌処理では*Escherichia coli*に対して殺菌効果を示さないと述べ、Loukaら¹¹⁾は*E. coli*および*S. cerevisiae*

を殺菌するために3.5MPaおよび4.5MPa以上の圧力をそれぞれ要することを報告した。

ところで、近年、マイクロ・ナノバブル(MNB)と呼ばれる50μm以下の泡は特殊な方法で水と気体を攪拌することで作り出すことができ、従来のフィルターを通過させることにより作成した泡とは異なり、比表面積が大きく、自己加圧効果を持っているため、気体の溶解効果が極めて優れていることから注目されている¹²⁾。現在までに、殺菌性の高いオゾンのMNBによる排水中の*E. coli*失活について報告されているが¹³⁾、CO₂のMNB化による殺菌に関する研究はまだ行われていない。そこで、我々は2.0MPa以下でMNB化したCO₂ガスを使用した殺菌(MNB-CO₂)法を開発し、衛生指標菌である大腸菌および酒類等の製造に用いられる酵母に対するMNB-CO₂法の殺菌効果について検討した。

2. 実験方法

2.1 微生物懸濁液の調整

大腸菌(*Escherichia coli* NBRC14237)および酵母(*Saccharomyces cerevisiae* NBRC10217)懸濁液の調整は以下の通りに行った。1白金耳量の各菌体を10mlのニュートリエント培地(Difco)およびYM培地(Difco)をそれぞれ含む試験管内に懸濁し、37℃で16時間、30℃で10時間それぞれ振とう培養した。その後、培養液を190mlのニュートリエント培地およびYM培地をそれぞれ含む300mlの三角フラスコに添加し、37℃

で24時間および30℃で12時間それぞれ振とう培養した。その培養液から菌体を2度の遠心分離(4℃, 8000rpm, 10分)により収集し, 初発菌数 1.0×10^6 CFU/ml になるように菌体を生理食塩水中に懸濁して実験に使用した。

2.2 MNB-CO₂ 処理装置および処理条件

MNB-CO₂ 処理は Fig. 1 に示す装置を使用し, 実験は以下の手順に従って行った。内容量 30l の vessel (Terada Iron Works Co., Ltd., Hiroshima, Japan) に挿入した 25l の試料を各処理温度まで加温し, vessel のヘッドスペース部分に CO₂ を各処理圧力に達するまで供給して実験を開始した。CO₂ の MNB 化は circulation pump (Teikoku Electric Mfg., Co., Ltd., Hyogo, Japan) により試料を 20l/min で循環させ, valve I を開き, CO₂ を circulation pump の出口付近から供給し, 試料と CO₂ の混合流体を MNB 発生装置 BT-50 (Bubbletank Co., Yamaguchi, Japan) に通過させることにより行った。また, CO₂ の代わりに N₂ ガスを MNB 化して実験を行った。比較として, valve II を開き, CO₂ を vessel の底部から供給し

た。処理圧力は valve III の開閉により ± 0.05 MPa 以内に制御し, 処理温度は vessel の周りに循環水を流すことで $\pm 1^\circ\text{C}$ に制御した。処理試料はゆっくりドレインを開放して 60 分間 10 分おきに採取し, 溶存 CO₂ 濃度および生残菌数を測定した。処理条件は処理温度: 常温 - 50℃, 処理圧力: 常圧 - 2.0MPa, CO₂ 供給量: 0.1 - 4.0l/min および試料中のエタノール濃度: 0 - 9% で行った。

2.3 溶存 CO₂ 濃度の測定

溶存 CO₂ 濃度の測定は前報¹⁴⁾と同様に次の計算式によって求めた。

$$\gamma = 273V_{\text{CO}_2} (760 - P_{\text{water}}) [(273 + 35)V_{\text{water}} - 760d]^{-1}$$

V_{CO_2} : 溶解した CO₂ 量。 P_{water} : 処理温度 35℃ における飽和蒸気圧。 V_{water} : 処理試料量。 d : 処理温度 35℃ における水の密度。

2.4 生残菌数の測定

大腸菌および酵母の生残菌数は標準寒天培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) および YM 培地プレートに 0.1ml の希釈試料をそれぞれ塗布し, 37℃ で 24 時間および 30℃ で 48

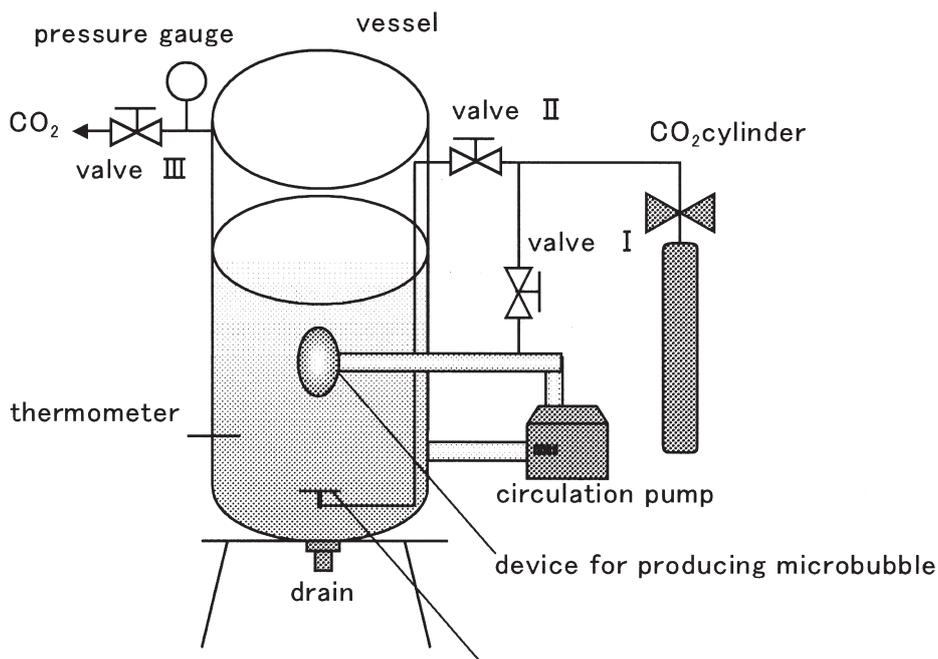


Fig. 1 低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル処理装置の概略図

時間それぞれ培養し、形成したコロニー数を測定することによって行った。実験は全て3反復行い、データは3反復の平均値と標準誤差である。

2.5 速度論的解析

D 値（生残菌数を 1/10 に減少させる時間）は次の計算式によって求めた。

$$\text{Log } N/N_0 = -t/D$$

N: t 分間処理後の生残菌数 (CFU/ml)。N₀: 初発菌数 (CFU/ml)。t: 処理時間 (min)。

3. 結果および考察

3.1 CO₂ および N₂ の MNB 化が大腸菌および酵母の殺菌効果に及ぼす影響

2.0MPa 下での加圧 CO₂ 処理による CO₂ の MNB 化が大腸菌および酵母の殺菌に及ぼす影響および MNB-N₂ 処理の殺菌効果について Fig. 2 に示す。CO₂ を MNB 化して供給したときの大腸菌の生残菌数の減少は最初 20min 緩やかであったが、その後急激に減少し、60min の処理によって 6 オーダーの殺菌を達成した。CO₂ を MNB 化しなかったときでは大腸菌の生残菌数の減少割合は CO₂ を MNB 化したときと比較して著しく低

く、生残菌数は 60min の処理においても 1.5 オーダー程度の減少にとどまった。MNB 化および MNB 化なしにおける D 値はそれぞれ 7.4min および 25.3 min、生残菌数が急激に減少するまでの時間 (L 値) はそれぞれ 20min および 30min であり、CO₂ を MNB 化して試料中に供給することによって D 値および L 値は著しく短縮した (Table 1)。また、2.0MPa 下での加圧 CO₂ 処理において、CO₂ を MNB 化して供給したときの酵母の生残菌数は 50min の処理によって 6 オーダー減少したが、CO₂ を MNB 化しないときは 3 オーダー程度であった。CO₂ を MNB 化して供給したときの D 値は 5.4min であり、CO₂ を MNB 化しないときでは 12.7min となり、CO₂ を MNB 化することで殺菌効果が著しく高まった (Table 2)。以前の研究から⁹⁾、SC-CO₂ 殺菌において殺菌効果を高めるために非常に重要な因子であると考えられる溶存 CO₂ 濃度は CO₂ を MNB 化することによって著しく上昇しており (Fig. 3)、MNB-CO₂ 殺菌においても溶存 CO₂ 濃度の上昇は殺菌効果に大いに影響を与えられとされる。高橋¹²⁾ は MNB-オゾンによるウィルスの不活化が

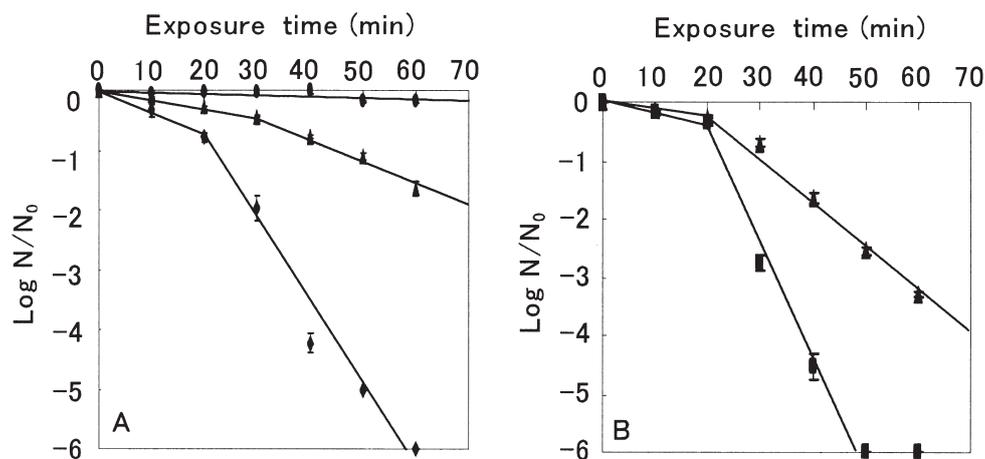


Fig. 2 加圧 CO₂ 処理による CO₂ の MNB 化が大腸菌および酵母の殺菌に及ぼす影響および MNB-N₂ 処理の殺菌効果

大腸菌に対する殺菌処理条件、温度：40℃、圧力：2.0 MPa、CO₂ 供給量：0.1l/min

酵母に対する殺菌処理条件、温度：40℃、圧力：2.0 MPa、CO₂ 供給量：2.0l/min、エタノール濃度：5%

A: 大腸菌, B: 酵母

●: MNB-N₂, ▲: non-MNB-CO₂, ■: MNB-CO₂

Table 1 MNB-CO₂による大腸菌殺菌におけるD値およびL値

Treatment condition				D (min) ^a	L (min) ^b
Gas-feeding way	Temp (°C)	Press (MPa)	CO ₂ (l/min)		
Non-MNB-CO ₂	40	2.0	0.1	25.3	30.0
MNB-CO ₂	40	2.0	0.1	7.4	20.0
MNB-CO ₂	40	2.0	1.0	5.5	10.0
MNB-CO ₂	40	2.0	2.0	4.8	—
MNB-CO ₂	RT	2.0	2.0	—	>60.0
MNB-CO ₂	30	2.0	2.0	8.1	20.0
MNB-CO ₂	35	2.0	2.0	6.8	10.0
MNB-CO ₂	40	AP	2.0	—	>60.0
MNB-CO ₂	40	0.5	2.0	11.0	10.0
MNB-CO ₂	40	1.0	2.0	7.0	10.0
MNB-N ₂	40	2.0	0.1	—	>60.0

^a 生残菌数が著しく減少したときの直線から得られたD値

^b 生残菌数が著しく減少するまでの時間

Table 2 MNB-CO₂による酵母の殺菌におけるD値およびL値

Treatment condition					D (min) ^a	L (min) ^b
Gas-feeding way	Temp (°C)	Press (MPa)	CO ₂ (l/min)	Ethanol (%)		
Non-MNB-CO ₂	40	2.0	2.0	5	12.7	20.0
MNB-CO ₂	40	2.0	2.0	5	5.4	20.0
MNB-CO ₂	35	2.0	2.0	5	11.2	50.0
MNB-CO ₂	40	2.0	2.0	5	5.5	10.0
MNB-CO ₂	45	2.0	2.0	5	5.0	—
MNB-CO ₂	40	2.0	2.0	0	—	>60.0
MNB-CO ₂	45	2.0	2.0	0	7.8	20.0
MNB-CO ₂	50	2.0	2.0	0	4.8	—
MNB-CO ₂	40	AP	2.0	5	—	>60.0
MNB-CO ₂	40	1.0	2.0	5	13.3	40.0
MNB-CO ₂	35	2.0	2.0	7	6.9	30.0
MNB-CO ₂	35	2.0	2.0	9	6.9	30.0
MNB-CO ₂	40	2.0	1.0	5	5.3	30.0
MNB-CO ₂	40	2.0	4.0	5	5.2	10.0

^a 生残菌数が著しく減少したときの直線から得られたD値

^b 生残菌数が著しく減少するまでの時間

MNB 表面に発生するヒドロキシラジカルおよび MNB の自己加圧効果によると述べたが、MNB-N₂ 処理による殺菌効果は認められなかったため、加圧 CO₂ 処理による大腸菌および酵母の殺菌は溶存 CO₂ 濃度が大きく影響していると考えられた。以上の結果から、2.0MPa 下においても加圧 CO₂ 殺菌処理は CO₂ を MNB 化して液体試料中に供給することによって大腸菌および酵母に対する殺菌効果を著しく高められることが判明した。

3.2 MNB-CO₂ における各処理条件が大腸菌および酵母に対する殺菌効果に及ぼす影響

MNB-CO₂ 処理による大腸菌および酵母の殺菌に及ぼす CO₂ 供給量の影響および溶存 CO₂ 濃度の変化について **Fig. 4** および **5** に示す。MNB-CO₂ 処理による大腸菌に対する殺菌において、CO₂ 供給量を 0.1l/min から 2.0l/min まで増加させることによって 6 オーダーの殺菌効果が得られる時間が 30min 短縮した。特に、CO₂ 供給量

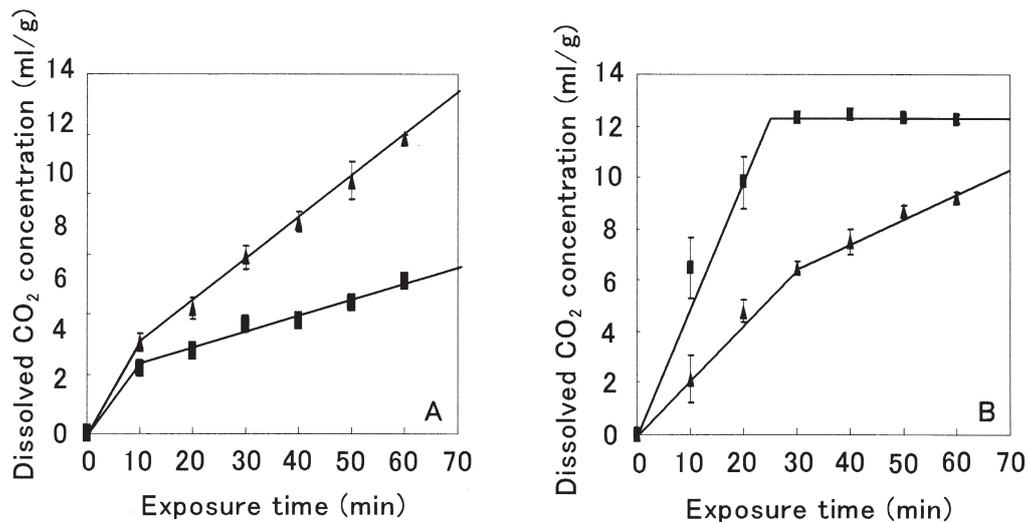


Fig. 3 加圧 CO₂ 処理における CO₂ の MNB 化が試料中の溶存 CO₂ 濃度に及ぼす影響
加圧 CO₂ 処理条件および symbol は Fig. 2 と同様

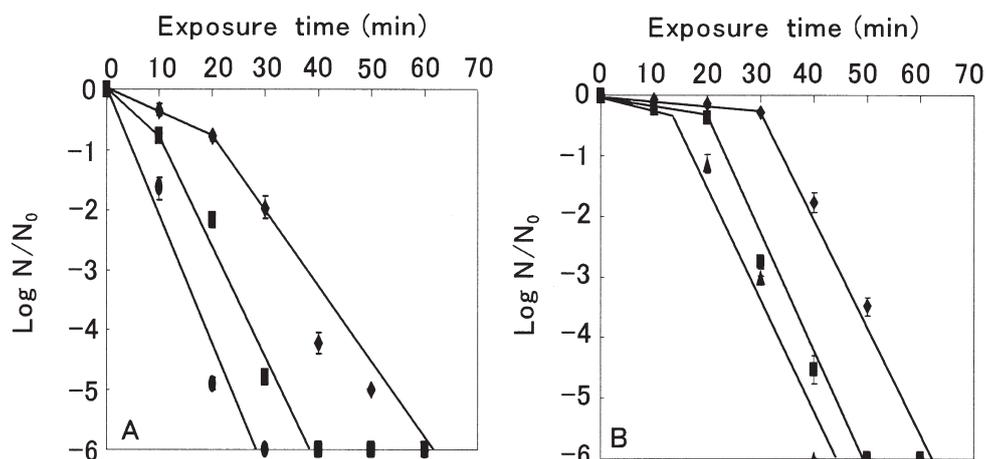


Fig. 4 MNB-CO₂ 処理による大腸菌および酵母の殺菌に及ぼす CO₂ 供給量の影響
大腸菌に対する殺菌処理条件, 温度: 40℃, 圧力: 2.0 MPa, CO₂ 供給量: 0.1l/min (◆), 1.0l/min (■) および 2.0l/min (●)
酵母に対する殺菌処理条件, 温度: 40℃, 圧力: 2.0 MPa, CO₂ 供給量: 1.0l/min (◆), 2.0l/min (■) および 4.0l/min (▲), エタノール濃度: 5%
A: 大腸菌, B: 酵母

0.1l/min のときの緩やかな生残菌数の減少は 2.0l/min では認められず, 生残菌数は処理開始直後から急激に減少した。各処理区における D 値はそれぞれ 7.4min, 5.5min および 4.8min, L 値はそれぞれ 20min, 10min および 0min であり (Table 1), CO₂ 供給量の増加に伴い D 値および L 値は大幅に短縮した。MNB-CO₂ 処理の大腸菌に対する殺菌効果および溶存 CO₂ 濃度は CO₂ 供給量を増加させることで著しく高まった。また,

MNB-CO₂ 処理による酵母に対する殺菌における各 CO₂ 供給量での D 値は 5.3min (1.0l/min), 5.4 min (2.0l/min) および 5.2min (4.0l/min) となり (Table 2), ほぼ同等であったが, L 値は CO₂ 供給量の増加に伴い短縮した。このときの溶存 CO₂ 濃度は全ての処理区において 12 - 13ml/g で飽和となり (Fig. 5), MNB-CO₂ 処理による酵母の殺菌における D 値と溶存 CO₂ 濃度の飽和値との間には相関関係があることがうかがえた。

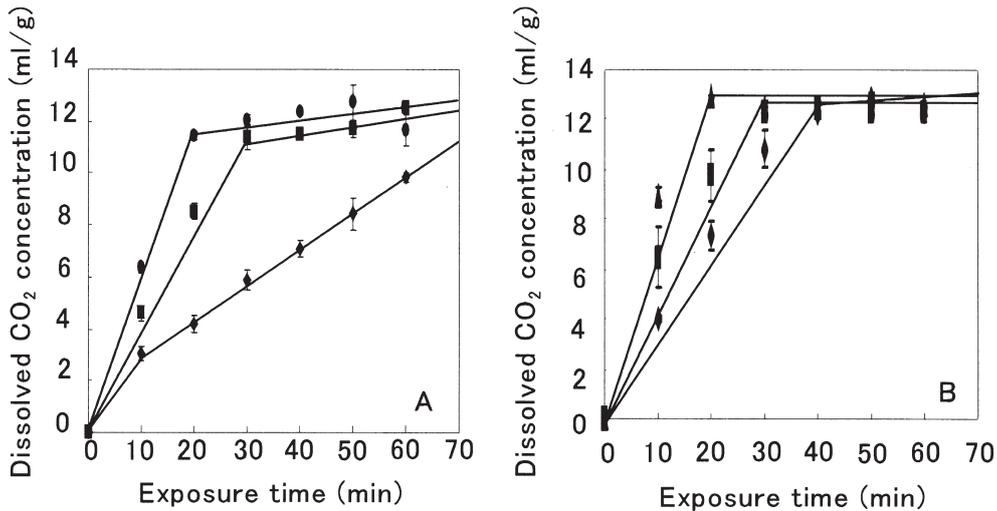


Fig. 5 MNB-CO₂ 処理における CO₂ 供給量が試料中の溶存 CO₂ 濃度に及ぼす影響
加圧 CO₂ 処理条件および symbol は Fig. 4 と同様

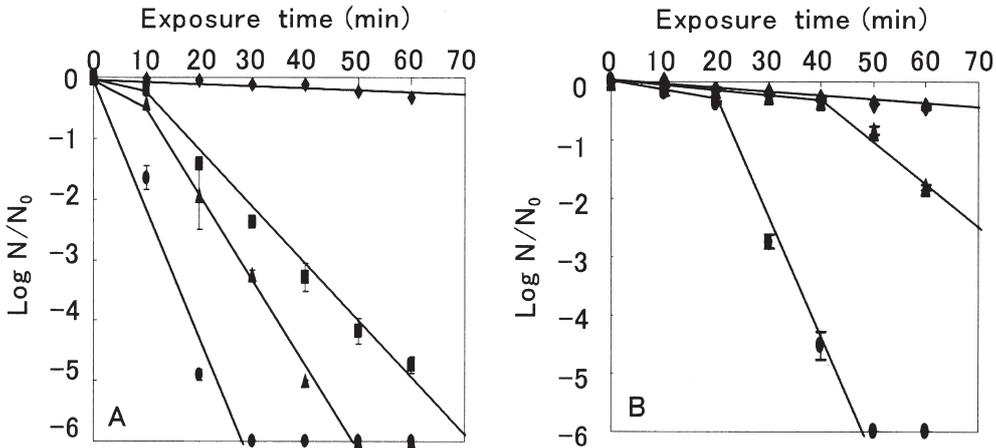


Fig. 6 MNB-CO₂ 処理による大腸菌および酵母の殺菌における処理圧力の影響
大腸菌に対する殺菌処理条件, 温度: 40℃, 圧力: 常圧 (◆), 0.5 MPa (■), 1.0 MPa (▲) および 2.0 MPa (●), CO₂ 供給量 2.0l/min
酵母に対する殺菌処理条件, 温度: 40℃, 圧力: 常圧 (◆), 1.0 MPa (▲) および 2.0 MPa (●), CO₂ 供給量: 2.0l/min, エタノール濃度: 5%
A: 大腸菌, B: 酵母

MNB-CO₂ 処理による大腸菌および酵母の殺菌における処理圧力の影響および溶存 CO₂ 濃度の変化について Fig. 6 および 7 に示す。MNB-CO₂ 処理による大腸菌に対する殺菌において、常圧では殺菌効果はほとんど認められなかった。常圧を除く 0.5MPa, 1.0MPa および 2.0MPa の D 値はそれぞれ 11.0min, 7.0min および 4.8min, L 値はそれぞれ 10min, 10min および 0min であり (Table 1), 処理圧力の増加に伴い殺菌効果は著しく高まった。また、MNB-CO₂ 処理による酵母

に対する殺菌においても常圧では殺菌効果は認められず、処理圧力 1.0MPa および 2.0MPa の D 値はそれぞれ 13.3min および 5.4min, L 値はそれぞれ 40min および 20min であり (Table 2), 殺菌効果は処理圧力が高いほど高くなった。溶存 CO₂ 濃度の飽和値は圧力に依存しており、圧力が高くなるほど試料中に溶解する CO₂ 量が増えるため、MNB-CO₂ 処理の大腸菌および酵母に対する殺菌効果は溶存 CO₂ 濃度が高まるにつれて高くなったと考えられる。加圧 CO₂ 殺菌において、1.0

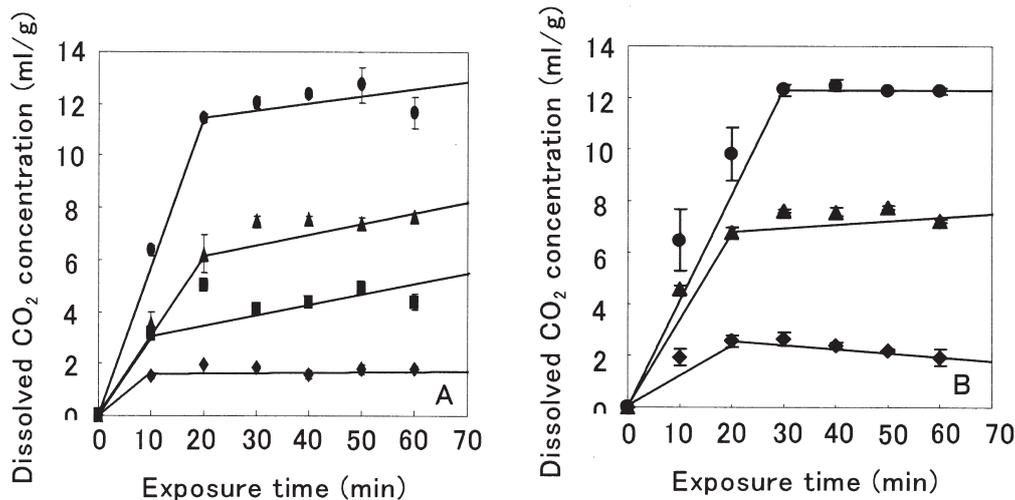


Fig. 7 MNB-CO₂ 処理における処理圧力が試料中の溶存 CO₂ 濃度に及ぼす影響
加圧 CO₂ 処理条件および symbol は Fig. 6 と同様

MPa 以下の処理圧力で殺菌効果が認められた報告はほとんどなく、MNB-CO₂ 処理が極めて高い殺菌効果を有することがうかがえた。Louka ら¹¹⁾ は常温、4.5MPa 以上の加圧 CO₂ 処理によって *S. cerevisiae* を殺菌可能であることを報告したが、今回我々は 40℃、2.0MPa 以下の加圧 CO₂ 処理によって *S. cerevisiae* を殺菌可能であることを立証した。

MNB-CO₂ 処理による大腸菌および酵母に対する殺菌における処理温度の影響について Fig. 8 に示す。MNB-CO₂ 処理による大腸菌に対する殺菌において、処理温度 35℃ および 40℃ では生残菌数はそれぞれ 30min および 40min の処理によって 6 オーダー減少し、処理温度 30℃ においても 60min の処理によって 5 オーダーの失活が認められたが、常温ではほとんど殺菌効果は認められなかった。処理温度 30℃、35℃ および 40℃ における D 値はそれぞれ 8.1min、6.8min および 4.8min、L 値はそれぞれ 20min、10min および 0min となり (Table 1)、処理温度が高いほど殺菌効果は著しく高まった。また、MNB-CO₂ 処理による酵母に対する殺菌において、試料中のエタノール濃度 0% での MNB-CO₂ 処理では処理温度

40℃ で *S. cerevisiae* を効果的に殺菌できなかった。処理温度 45℃ および 50℃ における D 値はそれぞれ 7.8min および 4.8min、L 値はそれぞれ 20min および 0min となり (Table 2)、処理温度の増加に伴い殺菌効果は著しく高まった。しかしながら、試料中のエタノール濃度 5% における各処理温度の D 値は 11.2min (35℃)、5.4min (40℃) および 5.0min (45℃) であり (Table 2)、エタノールを添加することによって殺菌効果は著しく改善された。そこで、MNB-CO₂ 処理による酵母の殺菌において、さらに試料中のエタノール濃度の影響について検討したところ (Fig. 9)、殺菌効果はエタノール濃度が 5% から 7% に増加することで著しく高まったが、7 - 9% ではほぼ同等であり、各エタノール濃度区における D 値は 11.2min (5%), 6.9min (7%) および 6.9min (9%) となった (Table 2)。SC-CO₂ 殺菌において試料中へのエタノール添加は殺菌効果を向上させることが報告されている¹⁵⁾。このことから、MNB-CO₂ 処理はビールのようなアルコール飲料の殺菌に対して非常に有効であることが示唆された。

4. ま と め

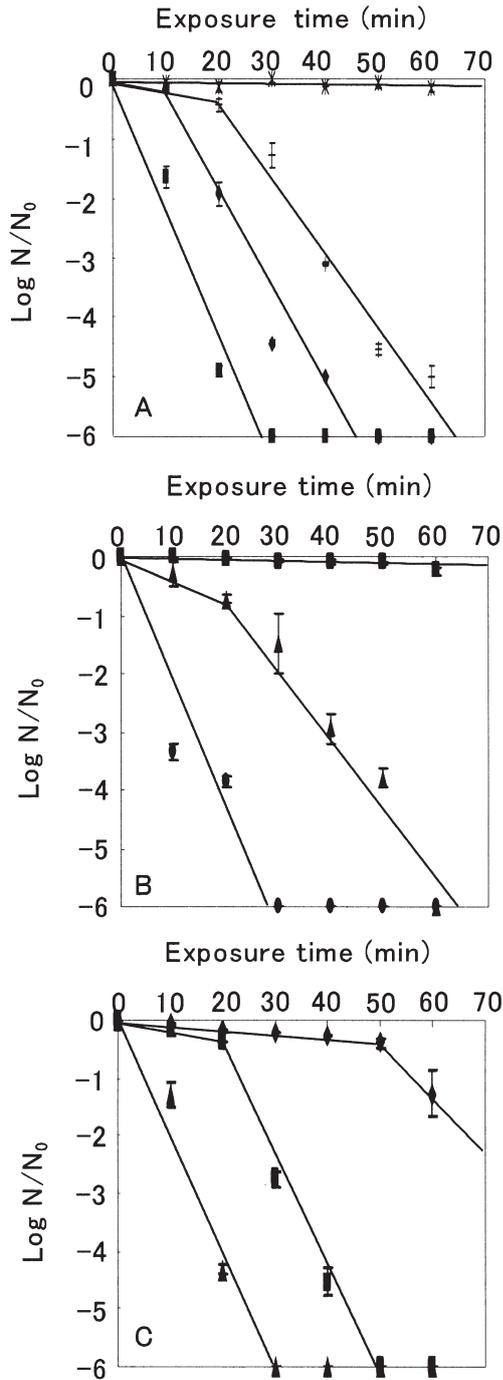


Fig. 8 MNB-CO₂ 処理による大腸菌および酵母の殺菌における処理温度の影響
 大腸菌に対する殺菌処理条件, 温度: 常温 (*), 30°C (+), 35°C (◆) および 40°C (■), 圧力: 2.0 MPa, CO₂ 供給量 2.0l/min
 酵母に対する殺菌処理条件, 温度: 35°C (◆), 40°C (■), 45°C (▲) および 50°C (●), 圧力: 2.0 MPa, CO₂ 供給量: 2.0l/min, エタノール濃度: 0 および 5%
 A: 大腸菌, B: 酵母 (0% エタノール溶液), C: 酵母 (5% エタノール溶液)

加圧 CO₂ 殺菌は従来, 臨界圧力以上の高圧二酸化炭素を使用することによって高い殺菌効果が得られていたが, 今回の結果から, 2.0MPa 以下

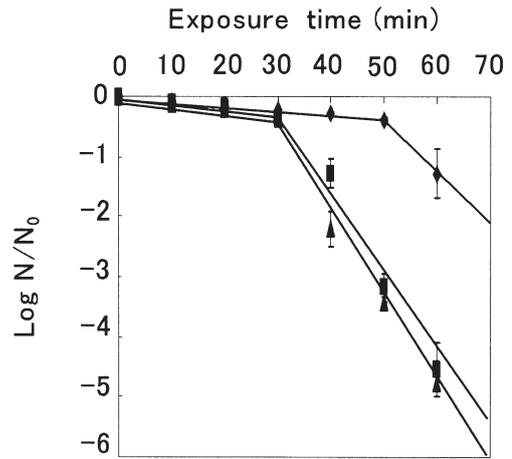


Fig. 9 MNB-CO₂ 処理による酵母の殺菌における試料中のエタノール濃度の影響
 酵母に対する殺菌処理条件, 温度: 35°C, 圧力: 2.0MPa, CO₂ 供給量: 2.0l/min, エタノール濃度: 5% (◆), 7% (■) および 9% (▲)

の低加圧下においても CO₂ をマイクロ・ナノバブル (MNB) 化して液体試料中に供給することによって著しく殺菌効果を高められることが判明した。MNB-CO₂ 処理の殺菌効果は試料中の溶存 CO₂ 濃度の上昇に伴い高められた。特に, その殺菌効果は試料中にエタノールを添加することによって著しく高くなったことから, MNB-CO₂ 処理はビール, 日本酒, ワインなどのアルコール飲料の殺菌に極めて有効であると考えられる。

謝 辞

本研究に対し多大なご支援を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Lin, H.M., Yang, Z. and Chen, L.F. (1992). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Prog.*, 8, 458-461.
- 2) Lin, H.M., Yang, Z. and Chen, L.F. (1993). Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *Chem. Eng. J.*, 52, B29-B34.
- 3) Ballestra, P., Da Silva, A.A. and Cuq, J.L. (1996). Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under

- pressure. J. Food Sci., 61, 829-831, 836.
- 4) Gunes, G., Blum, L.K. and Hotchkiss, J.H. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* (ATCC 4157) in diluted apple cider by dense-phase carbon dioxide. J. Food Prot., 69, 12-16.
 - 5) Shimoda, M., Yamamoto, Y., Cocunubo-Castellanos, J., Tonoike, H., Kawano, T., Ishikawa, H. and Osajima, Y. (1998). Antimicrobial effects of pressured carbon dioxide in a continuous flow system. J. Food Sci., 63, 709-712.
 - 6) Shimoda, M., Cocunubo-Castellanos, J., Kago, H., Miyake, M., Osajima, Y. and Hayakawa, I. (2001). The influence of dissolved CO₂ concentration on the death kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Microbiol., 91, 306-311.
 - 7) Shimoda, M., Kago, H., Kojima, N., Miyake, M., Osajima, Y. and Hayakawa, I. (2002). Accelerated death kinetics of *Aspergillus niger* spores under high-pressure carbonation. Appl. Environ. Microbiol., 68, 4162-4167.
 - 8) Kobayashi, F., Hayata, Y., Kohara, K., Muto, N., Miyake, M. and Osajima, Y. (2006). Application of supercritical CO₂ bubbling to deodorizing of drinking water. Food Sci. Technol. Res., 12, 119-124.
 - 9) Kobayashi, F., Hayata, Y., Kohara, K., Muto, N. and Osajima, Y. (2007a). Application of supercritical CO₂ bubbling to inactivate *E. coli* and coliform bacteria in drinking water. Food Sci. Technol. Res., 13, 20-22.
 - 10) Oulé, M.K., Tano, K., Bernier, A.-M. and Arul, J. (2006). *Escherichia coli* inactivation mechanism by pressurized CO₂. Can. J. Microbiol., 52, 1208-1217.
 - 11) Louka, E.D., Louka, N., Abraham, G., Chabot, V. and Allaf, K. (1999). Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. Appl. Environ. Microbiol., 65, 626-631.
 - 12) 高橋正好 (2004). 小さな泡の工学的な利用。混相流, 18, 324-331.
 - 13) Sumikura, M., Hidaka, M., Murakami, H., Nobutomo, Y. and Murakami, T. (2007). Ozone micro-bubble disinfection method for waste reuse system. Water Sci. Technol., 56, 53-61.
 - 14) Kobayashi, F., Hayata, Y., Muto, N. and Osajima, Y. (2007b). Effect of the pore size of microfilters in supercritical CO₂ bubbling on the dissolved CO₂ concentration. Food Sci. Technol. Res., 13, 118-120.
 - 15) Tanimoto, S., Matsumoto, H., Fujii, K., Ohdoi, R., Sakamoto, K., Yamane, Y., Miyake, M., Shimoda, M. and Osajima, Y. (2007). Inactivation of *L. fructivorans* in sake using a continuous flow system for high-pressure carbonation. Food Sci. Technol. Res., 13, 210-214.

Development of revolutionary food sterilization technology with carbon dioxide under pressure

Yasuyoshi Hayata and * Fumiyuki Kobayashi

(Department of Agriculture and * Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University)

We revealed previously that the effect of microbial inactivation with supercritical CO₂ depended on the concentration of CO₂ dissolved in the solution. Micro- and nano-bubbles (tiny bubbles with diameters of less than 50 μ m) are abundantly dissolved in the solution. Therefore, we devised an instrument with micro- and nano-bubbled CO₂ under pressure less than 2.0 MPa (MNB-CO₂) for the purpose of inactivating microorganisms in food at near room temperature. The aim of this study was to investigate the effect of microbial inactivation by MNB-CO₂ against *Escherichia coli*, one of hygienic indicator bacteria, and *Saccharomyces cerevisiae*, used for producing alcoholic beverages like beer.

Both *E. coli* and *S. cerevisiae* cells were effectively inactivated by MNB-CO₂. Microbial reduction of 6-log cycles was recognized by MNB-CO₂ with the treatment condition of 40°C and 2.0 MPa within 60 min, whereas with non-MNB-CO₂ treatment *E. coli* and *S. cerevisiae* decreased only 1.5 and 3.5-log cycles, respectively. The decimal reduction times (D values) on the inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by MNB-CO₂ could significantly decrease concomitant with increasing treatment pressure and temperature. Furthermore, effect of microbial inactivation against *S. cerevisiae* could increase concomitant with increasing ethanol concentration in the sample solution. These results suggested that the D value might be related to the concentration of CO₂ dissolved in the sample solution and that MNB-CO₂ treatment under pressure less than 2.0 MPa was very effective for inactivating microorganisms in food, especially alcoholic beverages, as an alternative to heat sterilization.