

# 非加熱食品の殺菌技術に関する研究

野田安生\*・崎間万里\*\*・中川 優\*・小林弘昌\*\*

\* 微生物応用部、\*\* 九州東海大学農学部バイオサイエンス学科

## Bactericidal Effect of the Acidic Sodium Hypochlorite aqueous solutions and the Acidic Electrolyzed Waters

Yasuo HAYASHIDA\*, Mari SAKIMA\*\*, Masaru NAKAGAWA\* and Hiromasa KOBAYASHI\*\*

野菜から分離したグラム陰性球菌2株及び桿菌2株を塩酸でpHを低下させた次亜塩素酸ナトリウム水溶液(酸性次亜水)で処理したところ、残存生菌数は、塩酸を加えなかった次亜塩素酸ナトリウム水溶液(アルカリ次亜水)で処理した試験区より少なかった。4株の中で最も残存生菌数が多かったNo. 4株について次亜水処理中の一般生菌数の経時変化を測定したところ、酸性次亜水で処理した試験区はアルカリ次亜水で処理した試験区より一般生菌が速く減少した。しかし、殺菌によって有効塩素が消費されその濃度が0.5ppm以下になると、両試験区とも一般生菌数の減少が止まり、ほぼ一定の値で推移した。

### 1. はじめに

近年、食の安全・安心への消費者の関心の高まりから、食品製造業界は製造工程の衛生管理を従来以上に重要視するようになった。しかし、企業の製造する食品製品やその製造工程等は企業または工場毎に異なるので、衛生管理の改善への取り組み方も多様である。食品の衛生管理の基本は、①微生物の少ない、または、殺菌された原料を使用すること、②殺菌された器具等を使用し清潔で微生物増殖の危険性が少ない環境で食品製造を行うこと、③製品の殺菌を確実にを行うこと、の3点であるが、その食品や企業の持つ制約条件の中で、これらをいかに効果的に行っていくかが食品製造業者の課題となっている。

例えば、生野菜等の食材は、過度の加熱を行うと商品価値を失ってしまう。即ち、生野菜を包装してそのまま製品または製品の一部とする食品は、加熱殺菌を充分に行えないという製造上の制約条件がある。そして、このような製品のために様々な非加熱殺菌法が考案され実用化されてきた。その中で最も汎用されているのは、次亜塩素酸ナトリウムや同カリウム塩といった次亜塩素酸塩液処理による殺菌である。

近年、食塩または塩酸を電解して製造される強酸性電解水または微酸性電解水の製造装置が開発され医療機関や大手食品製造業者等を中心に普及しているが、その殺菌の有効成分は次亜塩素酸と

されており、平成14年6月に食品添加物として認可された際もその名称は強酸性並びに微酸性次亜塩素酸水となっている。

これらの酸性電解水は同じ有効塩素濃度ならば次亜塩素酸塩水溶液よりも殺菌能力が高いとされており、非加熱食品を製造する中小食品製造業者にとって、その利用は製品の殺菌をより効果的に行うために有用と思われる。

そこで、本研究では、酸性電解水の利用に関する知見を得るために、次亜塩素酸塩液のpHを塩酸で低下させて疑似的な酸性電解水を調製し、野菜から分離した常在細菌の殺菌への効果を検討した。

また、酸性電解水を用いて野菜の殺菌試験を試みたので報告する。

### 2. 方 法

#### 2.1 普通液体培地及び普通寒天培地の調製

液体培地は、酵母エキス2.5g、ペプトン5g、そして、ブドウ糖1gを1,000mlの蒸留水に溶解させた。寒天培地は、これに15gの寒天を加え、加熱溶解させて調製した。液体・寒天培地とも、121℃で15分間滅菌し試験に供した。

#### 2.2 残留塩素濃度の測定

残留塩素測定キット-SBT法(同仁化学、熊本)を用いた。説明書記載の方法で試料5ml中の次亜塩素酸または同イオンを発色させた後、吸光度(675nm)を測定した。

### 2.3 一般生菌数の測定

試料1ml、または、これを生理食塩水で希釈した液1mlを、50℃に保った普通寒天培地に混釈した。培地が固まった後37℃で24時間培養し、出現したコロニー数を測定した。

### 2.4 グラム染色試験及びカタラーゼ試験

常法に従って行った。

### 2.5 電解水

強酸性及び微酸性電解水は、強酸性電解水生成装置 ROX-10B(ホシザキ電機株)、並びに、微酸性電解水生成装置 MP-360(株ホクティ)で生成させたものを用いた。

## 3. 結果

### 3.1 野菜からの常在細菌の分離

小売店より任意に購入した野菜(レタス、もやし、ニンジン、キュウリ)の表面約1cm<sup>2</sup>を殺菌した綿棒で拭き取り、これを普通寒天培地に塗布して30℃で24時間培養した。出現した単コロニーから任意に1つを選び、No. 1~No. 4株として以下の試験に供した。

普通寒天培地で単離培養したNo. 1~No. 4株を光学顕微鏡で観察したところ、いずれも細菌様の形態をしており、No. 1及びNo. 2株は球菌、No. 3及びNo. 4は桿菌であり、いずれの株も孢子の形成は見られなかった(孢子形成観察試料の培養温度及び時間は30℃、36時間)。

また、これらの株を普通液体培地で培養してグラム染色試験、カタラーゼ試験を行ったところ、すべてグラム陰性、カタラーゼ反応陽性であった。

### 3.2 酸性次亜水の調製

次亜塩素酸ナトリウム液を超純水で希釈して有効塩素濃度が20、10及び2ppmになるよう調製した。調製した次亜塩素酸ナトリウム水溶液(以下、アルカリ次亜水)のpHは、それぞれ8.8(20ppm)、8.6(10ppm)、そして、7.5(2ppm)であった。この溶液1,000mlに1N-HCLをpH3.5以下になるまで加えた。加えた量は有効塩素濃度が高いもの程多かったが、400ul~600ulの範囲であった(図1)。これらの酸性次亜塩素酸ナトリウム水溶液(以下、酸性次亜水)は、0.22um無菌フィルターで除菌処理し以下の試験に使用した。フィルター除菌処理によるpH及び有効塩素濃度の変化は見られなかった。

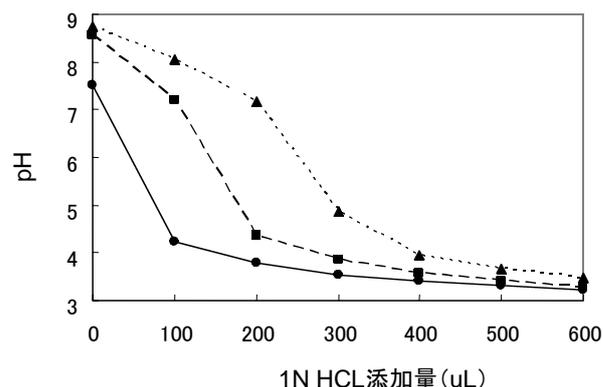


図1 1N塩酸添加による次亜水pHの低下

2ppm (●), 10ppm (■), 20ppm (▲)次亜塩素酸ナトリウム水溶液1lに1N-HCL添加した。

### 3.3 細菌の次亜水処理

細菌株No. 1~No. 4を普通液体培地で12時間振とう培養した。培養液を遠心分離(3000rpm, 10min)して集菌し、生理食塩水で2回洗浄した後、濁度(OD660)が0.5になるように生理食塩水で希釈した。

この菌液500ulと有効塩素濃度10ppmの次亜水5mlを混合し、正確に1分間及び10分間放置した。そして、普通液体培地5mlを加えて残留塩素を培地中の有機物によって消滅させた後、直ちに一般生菌数を測定した。比較のため、次亜水の代わりに生理食塩水を用いて同様の試験を行った(放置時間は10分間のみ)。全ての試験は2回繰り返し、その平均値を結果とした(表1)。測定値平均値の差は平均値の±10%未満であった。

生理食塩水で処理した試験区からは10<sup>7</sup>個/mlの一般生菌が検出された。次亜水で処理した試験区は全て生理食塩水処理区より一般生菌数が低かった。

1分間処理区では一般生菌が検出された試験区が多かったが、菌数は菌株によって異なった。最も濃度が高かったのはNo. 4株(10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>個/ml)であった。また、全ての菌株で酸性次亜水で処理した試験区がアルカリ次亜水処理区に比べて一般生菌数が少なかった。10分間処理区からは、一般生菌は検出されなかった。

なお、No. 4株を用いた試験区で一般生菌の検出されたシャーレを更に24時間放置した後、コロニーを任意に釣菌して形態観察したところ、菌体の形態はNo. 4株と同様の細菌桿菌様であり、孢子の形成は見られなかった。また、これを生理食塩水

にケン濁し、沸騰水で10分間処理して一般生菌数を測定したところ、一般生菌は検出できなかった。対象として沸騰水で処理しなかったケン濁液を同様に試験したところ一般生菌は検出された。

表1 次亜水処理液中の一般生菌数

単位 (個 / ml)

| 菌株   | 処理時間   | 次亜水               |                        | 生理食塩水             |
|------|--------|-------------------|------------------------|-------------------|
|      |        | アルカリ性             | 酸性                     |                   |
| No.1 | 1 min  | $1.5 \times 10^2$ | ND                     | $3.4 \times 10^7$ |
|      | 10 min | ND                | ND                     |                   |
| No.2 | 1 min  | $8.4 \times 10^2$ | $5.2 \times 10^1$ (NQ) | $1.1 \times 10^7$ |
|      | 10 min | ND                | ND                     |                   |
| No.3 | 1 min  | $8.0 \times 10^1$ | ND                     | $8.6 \times 10^6$ |
|      | 10 min | ND                | ND                     |                   |
| No.4 | 1 min  | $3.0 \times 10^5$ | $1.7 \times 10^4$      | $2.6 \times 10^7$ |
|      | 10 min | ND                | ND                     |                   |

ND:Not detectable, NQ:Not quantative(60個未満)

### 3.4 処理時間及び有効塩素濃度の細菌殺菌への影響

菌株No. 4の菌液を前章と同様に調製し、2ppm、または、10ppmに調製した次亜水で1、2、4、6、8及び16分間処理した。そして、処理液の残留塩素濃度及び一般生菌数を測定した。残留塩素濃度の測定は、処理水をそのまま、または、生理食塩水で希釈して試料とし、方法2.2により直ちに行った。一般生菌数の測定は前章と同じ方法で行った。試験は2度繰り返しその平均値を結果とした(表2、表3)。残留塩素濃度及び一般生菌数の測定値と平均値の差は、それぞれ平均値の±5%、10%未満であった。

処理水中の残留塩素濃度は処理時間と共に減少した。2ppm次亜水では、2分後に約0.5ppm程度になり有効塩素の約70%が消費されていた。10ppm次亜水では、処理2分後においても有効塩素の約60%が残留しており、16分後においてもその約44%(約4ppm)が残留していた。また、アルカリ次亜水中の残留塩素濃度は酸性次亜水中の残留塩素濃度よりも高い傾向があった。

次亜水処理によって処理液中の一般生菌数は減少した。特に、酸性次亜水で処理した試験区がアルカリ次亜水で処理した試験区よりも速く減少し、処理1分後の酸性次亜水処理液中の一般生菌数は同じ有効塩素濃度のアルカリ次亜水処理液中のその約6分の1であった。10ppm次亜水処理区において、アルカリ次亜水中の一般生数は処理8

分後に不検出となったが、酸性次亜水中の一般生菌は処理4分後に不検出となった。2ppm次亜水処理液中の一般生菌は処理2分後まで減少し、その後はほぼ一定の値( $10^3$ 個/ml~ $10^4$ 個/ml)になった。処理4分以降について、酸性次亜水処理液中の一般生菌数はアルカリ次亜水処理液中のそれより常に少なかった。

コントロールとして次亜水の代わりに生理食塩水、そして、生理食塩水1lに対して1N塩酸を500u1加えた酸性生理食塩水を用いて同様の試験を行ったところ、酸性生理食塩水で処理した試験区の方が一般生菌数が少なく、その値は生理食塩水で処理した試験区の約3分の2であった。

表2 次亜水処理液中の残留塩素濃度の経時変化

単位 (ppm)

| 処理時間 (min) | アルカリ次亜水 |        | 酸性次亜水 |        |
|------------|---------|--------|-------|--------|
|            | 2 ppm   | 10 ppm | 2 ppm | 10 ppm |
| 1          | 0.8     | 7.3    | 0.7   | 6.9    |
| 2          | 0.5     | 6.3    | 0.5   | 6.2    |
| 4          | 0.3     | 5.9    | 0.2   | 5.4    |
| 8          | 0.2     | 5.2    | 0.1   | 4.6    |
| 16         | 0.04    | 4.5    | 0.03  | 3.8    |
| C          | 1.8     | 9.1    | 1.8   | 9.4    |

C 菌液の代わりに生理食塩水を加えた試験区

表3 次亜水処理液中の一般生菌数の経時変化

単位 (個 / mL)

| 処理時間 (min) | アルカリ次亜水              |                   | 酸性次亜水                |                   |
|------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
|            | 2 ppm                | 10 ppm            | 2 ppm                | 10 ppm            |
| 1          | $6.5 \times 10^5$    | $1.2 \times 10^5$ | $1.1 \times 10^5$    | $2.1 \times 10^4$ |
| 2          | $2.0 \times 10^3$    | $1.6 \times 10^3$ | $1.3 \times 10^3$    | 4(NQ)             |
| 4          | $4.7 \times 10^3$    | 38(NQ)            | $6.8 \times 10^2$    | ND                |
| 8          | $5.1 \times 10^3$    | ND                | $1.2 \times 10^3$    | ND                |
| 16         | $2.4 \times 10^3$    | ND                | $1.1 \times 10^3$    | ND                |
| C          | $4.2 \times 10^7$ C1 |                   | $2.7 \times 10^7$ C2 |                   |

ND:Not Detectable, NQ:Not quantative(60個未満)

C1:次亜水の代わりに生理食塩水を使用

C2:次亜水の代わりに1N-HCL500u1を生理食塩水1Lに加えた酸性生理食塩水(pH3.1)を使用

なお、20ppm次亜水を用いて菌液を1分間処理したところ、酸性次亜水処理では $7.0 \times 10^3$  個/ml、アルカリ次亜水処理では $4.6 \times 10^4$  個/mlまで減少した。同条件で4分間処理したところ、一般生菌はいずれの試験区からも検出できなかった。

### 3.5 野菜の酸性次亜水及び電解水による処理試験

水洗いして水切りしたレタス2~3葉を生理食塩水、20ppm 次亜水、または、酸性電解水1,000mlに5分間漬けた。そして、各区2lの滅菌水でリンスし水切りした後に、綿棒で野菜表面約1cm<sup>2</sup>を拭き取り2mlの生理食塩水にケン濁して一般生菌数を測定した。試験に供した強酸性電解水及び微酸性電解水の有効塩素濃度は、それぞれ16.0ppm及び30.0ppmであった。

測定は1試験区につき、任意に選んだ3箇所について行った。生理食塩水で漬けたのみの試験区からは、全ての箇所から一般生菌が検出された。また、一般生菌数は測定する部位によって大きく異なった。次亜水及び電解水で処理した試験区では一般生菌は検出されなかった(表4)。

表4 野菜の次亜水及び電解水処理

| 処理液           | 一般生菌数(個 / cm <sup>2</sup> ) |    |         |
|---------------|-----------------------------|----|---------|
| 生理食塩水         | 2.1 × 10 <sup>2</sup>       | 68 | 16 (NQ) |
| 20ppm 酸性次亜水   | ND                          | ND | ND      |
| 20ppm アルカリ次亜水 | ND                          | ND | ND      |
| 強酸性電解水        | ND                          | ND | ND      |
| 微酸性電解水        | ND                          | ND | ND      |

ND: Not Detectable, NQ: Not quantitative (60個未満)

## 4. 考 察

次亜塩素酸塩液中で塩素種は、アルカリ性では主に次亜塩素酸イオン(OCL<sup>-</sup>)として、酸性では主に次亜塩素酸(HOCL)として存在している。次亜塩素酸は次亜塩素酸イオンよりも酸化力が強く、このため、酸性次亜水、または、強酸性並びに微酸性電解水の殺菌能力はアルカリ次亜水のそれよりも強いとされている。本研究で、野菜から任意に分離したグラム陰性細菌4株を次亜水で処理したところ、全ての菌株について、酸性次亜水で処理した方が残存菌数が少なかったが、これはpHの低下により次亜塩素酸塩液の殺菌効果が高まったためと考えられる。

岩田ら<sup>1)</sup>は、次亜塩素酸ナトリウムのpHを塩酸及び水酸化ナトリウムを用いて調整し、殺菌試験を行ったところ、pHが低いほど、低い有効塩素濃度で速効的な殺菌効果が得られたとしている。ま

た、強酸性電解水並びに微酸性電解水の使用マニュアル<sup>2,3)</sup>には、強酸性電解水が幅広い微生物に対してアルカリ次亜水より高い殺菌効果を持つこと、また、微酸性電解水が細菌芽胞の殺菌に対して有効であることが示されている。

No.4株を用いた残存菌数の経時変化についても、酸性次亜水を用いた方が菌の減り方が速かった。しかし、2ppm次亜水処理試験において、殺菌により有効塩素が消費され、その濃度が0.5ppm以下になると、一般生菌数の減少が止まり、その後はほぼ一定の菌数で推移した。

竹下ら<sup>4)</sup>は、黄色ブドウ球菌を様々な有効塩素濃度の酸性電解水で処理してその殺菌能力を検討し、電解水の殺菌能力が有効塩素の減少及びpHの上昇によって低下することを示している。また、電解水が即効的な殺菌効果を有するには、pH2.3で1.0ppm以上、pH2.5~2.7の範囲で2.0ppm以上、pH3.0~5.0の波にて3.0ppm以上、pH6.0~7.0の範囲で5ppm以上必要としている。実際の食品殺菌では食品から溶出するまたはその表面に存在する有機物と次亜塩素酸または次亜塩素酸イオンが反応し有効塩素は低下する。pHの低下によって次亜水殺菌能力は高まるが、殺菌や有機物との反応により有効塩素濃度が低下すれば殺菌能力は消失してしまう。従来、次亜塩素酸塩使用の留意点として残留塩素濃度が低くならないことが揚げられているが、殺菌能力の高い酸性次亜水や酸性電解水を利用する際もその留意点は重要であり、使用する酸性次亜水、または、酸性電解水の有効塩素濃度は、処理工程において、どれだけの有効塩素が残留するかを指標に決めなければならないだろう。また、小関ら<sup>5)</sup>は、酸性電解水によるカット野菜の表面殺菌効果にばらつきがあるのは、表面汚染度、表面組織の違いが原因であるとしている。酸性次亜水、酸性電解水を用いて微生物の殺菌を効果的に行うには、残留塩素濃度に加え、これらのことにも注意して処理を行う必要がある。本研究で、レタスを用いた野菜の表面殺菌試験では、次亜水及び電解水で処理したレタスからは一般生菌は検出されなかったが、これは、①十分に野菜を洗浄し汚染度が低かった、②レタスの表面に凹凸が少なく処理液との接触が良好だった、③表面に存在したのが処理液で殺菌できる微生物だった、④残留塩素濃度が高く十分に殺菌できた、からと思われる。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、酸性電解水の調製、及び、これを用いた技術指導についてホシザキ電機(株)、並びに、ホクティ(株)に多大な御協力いただきました。また、研究推進及び結果の取りまとめにあたり、独立行政法人食品総合研究所製造光学研究室 五十部誠一郎 研究室長、北海道立食品加工研究センター柿本雅史 機能開発科長より多くの助言をいただきました。この場で御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 岩沢篤郎, 中村良子. “酸性電解水と疑似的酸性水との殺菌効果の比較検討”, 感染症学雑誌, Vol. 70, pp. 915-922, 1996.
- 2) 強電解水企業協議会編. 強酸性電解水使用マニュアル, 東京, 強電解水企業協議会, p. 5, 2002.
- 3) 強電解水企業協議会編. 微酸性電解水使用マニュアル, 東京, 強電解水企業協議会, p. 5, 2002.
- 4) 竹下朱美, 安藤茂. “電解水の殺菌効果に及ぼす遊離残留塩素濃度とpHの影響”防菌防黴, Vol. 29, pp. 69-72, 2001.
- 5) 小関成樹, 伊藤和彦. “強酸性電解水を用いたカット野菜の殺菌”日本食品科学工学会誌, Vol. 47, pp. 722-726, 2000.