

平成 22 年度研究助成報告（兼、終了報告）

研究題名	食品粉体に付着した芽胞菌の殺菌操作を目的とした基礎的研究
研究期間	平成 21 年 4 月 1 日～平成 23 年 3 月 31 日
研究機関・所属 研究者名	群馬大学大学院・工学研究科環境プロセス工学専攻 大嶋 孝之

1. 平成 22 年度研究成果の概要

本研究では食品粉体として片栗粉とコンニャク粉を用い、これらのオゾンガスによる殺菌を検証した。オゾンガスは沿面放電型オゾンナイザーを用い、原料は酸素ガスを使用した。発生するオゾン濃度は $20\sim 122\text{ g/m}^3$ である。大腸菌を用いた殺菌実験では片栗粉が簡単にオゾンガスで殺菌できるのに対し、コンニャク粉は殺菌が難しいことが明らかになった。片栗粉とコンニャク粉の表面をSEM観察したところ、片栗粉が粒径数十 μm の表面が滑らかな性情なのに対し、コンニャク粉は数百 μm と大きく、表面に多数の凹凸がある性情をしていた。このような形状の違いがオゾンガスによる死滅特性に影響を与えていると考えられる。オゾンガスによる食品粉体の殺菌は有用であるが、食品の種類により効果が異なるので注意が必要である。

また芽胞のオゾンガス殺菌を片栗粉を用いて検討した。乾燥オゾンと湿潤オゾンによる殺菌効果の比較を行ったところ、湿潤させたほうが殺菌効果が高いことが明らかになった。しかし湿潤オゾンで4時間処理しても90%程度の死滅率で、十分な殺菌効果を得ることが困難であった。そこで芽胞の発芽を誘引しつつオゾン殺菌することを試みた。誘引剤としてはアラニンとジピコリン酸を検証した。この結果、ジピコリン酸による発芽促進を併用することが有効であることが実証された。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1. はじめに

小麦粉や米、香辛料等の粉体及び固体の食品原料は、植物を乾燥あるいは脱穀や粉砕することで製造され、食品の種類により大きさはさまざまであるがおおむね数十 μm から数mmの範囲である(図1)。その製造現場は微生物汚染防止等の処置が施されていない場合が多く、製品に大腸菌群やサルモネラ菌などの微生物混入を避けることができない。

また香辛料などの食品原料はソーセージやハムなど多くの加工食品に使用されており、大量の食品を製造する食品の加工工程で均一かつ十分に食品を加熱して殺菌することは不可

能である。それ故、食品原料に付着した微生物をあらかじめ殺菌しておく必要があり、殺菌しておかないと微生物の繁殖に伴う腐敗や食中毒を引き起こす。

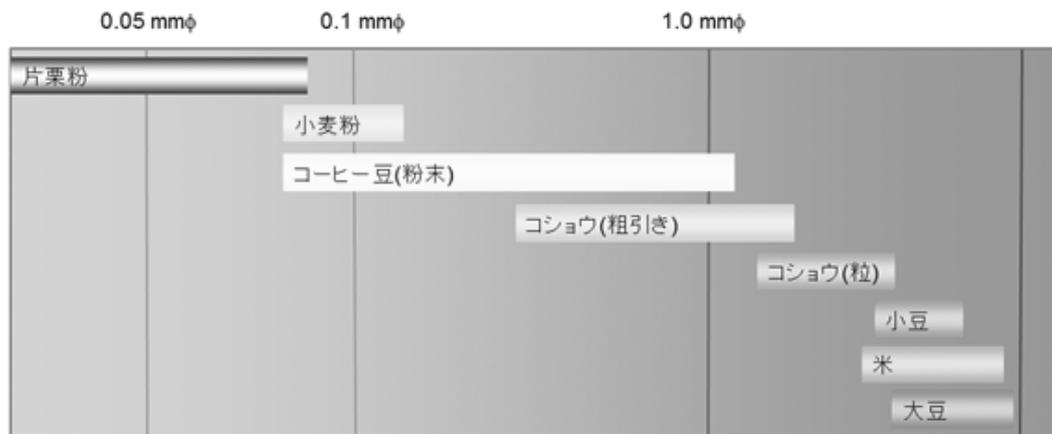


図1 様々な食品粉体とその粒径

小麦粉、香辛料などの乾燥食品原材料を汚染している微生物の多くは土壌由来の微生物や細菌孢子である。特に細菌孢子は加熱しても死滅しにくく、かつ乾燥した粉粒体は熱伝導率が悪い。そのために、粉粒状の乾燥食品原材料を加熱殺菌するには長時間加熱する必要がある。しかし、長時間加熱すると、有用成分の破壊や原料の香りや味の変化が避けられない。食品原材料を加熱殺菌することは実用上ほとんど不可能である。そのため、非加熱殺菌による殺菌方法が必要である。

しかし、非加熱殺菌の薬剤殺菌法は残留毒性があり人体への毒性があることから食品への使用は禁止されている。紫外線殺菌法や高圧殺菌法などの物理的な非加熱殺菌法はその効果が不十分であり、放射線殺菌法はジャガイモの発芽防止にのみ許可されているが、基本的には安全性に疑問があることから国内では認められていない。

そこで、本研究で着目した殺菌処理方法はオゾン殺菌処理である。オゾン(O_3)は不安定な物質で長い間存在できず、次第に酸素原子1つを放出し酸素(O_2)に戻る。又、フッ素について強い酸化作用を持ち、耐性菌を作ることなく殺菌ができる。よって、残留毒性が少なく、殺菌効果があるため、食品へ使用しても安全であると考えられる。

実験では 122 g/m^3 ($= 6.1 \times 10^4 \text{ ppm}$) という高濃度のオゾンガスを用いて、殺菌処理を行った。(自然界でオゾン濃度は最高値で 0.1 ppm) 本実験の目的は、高濃度オゾンガスによる食品粉体の表面殺菌の効果を検証することである。

2. 実験方法・手順

2.1 大腸菌粉末の調整

本実験では、乾燥状態のものがターゲットである。食品粉体に水分を含ませることなく、大腸菌を混合させたサンプルを用いる為、乾燥したままでも生きている大腸菌の作成を行った。液体培地(LB培地) 10 mL中に *Escherichia coli* K-12 を植菌し 35°C に設定したインキュ

ベーター内で15～16時間培養した。LB培地は予めpH7.0に調整した。培養液はLB培地500 mL中に5000 mL移し、同条件で再び培養を行った。培養した菌体は遠心機で4300 rpm、5 minで2度、遠心分離をし上澄み液を捨て、LB培地を洗い流すため蒸留水を加え、遠心分離を行った。2度の洗浄の後、滅菌済み蒸留水を2 mL加え、ピペットでよく混合させ、懸濁液を各マイクロチューブに1 mL移し、遠心機で5700 rpm、5 minで遠心分離をし、上澄みをすて、遠心式濃縮機に8時間ほどかけた。乾燥した大腸菌を乳鉢でよく粉砕させたものを大腸菌粉末として使用した。確認のため、大腸菌粉末10 mgに対し生理食塩水1 mLを加え、寒天培地で培養し、コロニーカウント法にて菌数を確認した。生菌数は $2.1 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^9$ CFU/gであった。

2.2 枯草菌胞子の調整

本研究で使用した菌体は、*Bacillus subtilis* NBRC3007 芽胞である。作成方法は、*Bacillus subtilis*を寒天培地に植菌し、30 °C、24 時間培養した。その後、インキュベーターからその寒天培地を取り出し、室温で7日以上静置することで、芽胞を形成させた。

上述の作成した芽胞はシャーレ1枚につき滅菌水1 mLで寒天培地表面から回収した。回収した菌体は遠心分離をして菌体を集め、生理食塩水で懸濁した後に80 °C、10 分間の加熱処理をすることで栄養細胞を除去した。作成した芽胞懸濁液の初期濃度は $10^5 \sim 10^6$ CFU/mLである。

2.3 使用粉体

使用媒体として、市販の片栗粉(馬鈴薯澱粉)とこんにやく粉を使用した。片栗粉の平均粒径は30～40 μm 、こんにやく粉の平均粒径は320～420 μm といわれている(超微粉こんにやく粉の平均粒径は200 μm)。片栗粉、こんにやく粉の各食品粉体15gに対し付着菌数が $4.0 \times 10^6 \sim 4.0 \times 10^7$ CFU/gになるように調整し、大腸菌粉末を加え、薬さじで均一になるように混ぜた。

また芽胞に付着させる食品粉体としては片栗粉を用いた。シャーレ上で市販の片栗粉10gに対し*Bacillus subtilis* 芽胞懸濁液1.5 mLを加え、薬さじで十分攪拌させた。その後シャーレの蓋をせずに、クリーンベンチ内にて室温で一晩自然乾燥させた。自然乾燥後の芽胞付片栗粉は乳鉢でよく粉砕することで均一にした。初期芽胞濃度は $10^4 \sim 10^5$ CFU/gである。

2.4 実験装置

本研究はオゾン発生装置(増田研究所 社製 OZS-HC-70-AC)を用いてオゾンガスを発生させた。実験条件は酸素流量1.0 または5.0 L/min、オゾン発生量7.3 g/hであるので、酸素流量1.0 L/minの時のオゾン濃度は122 g/m³である。

図2、図3に本研究で使用した装置図を示す。図2はサンプルが入った処理槽へ下からオゾンガスを流し、酸素流量を1.0 L/minと低流量にした固定槽である。また、図3はサンプルが入った処理槽へ酸素流量5.0 L/minで上からオゾンガスを吹き付けた流動槽である。また、各々に湿潤有無の条件を付け実験を行ったが、湿潤有りの場合には水の入った三角フラスコの装置へオゾンガスを流し、そこから出てきた湿気を含んだオゾンガスを処理槽へ流した。反応器は円筒状、アクリル製で、内径40 mm、分散板から出口までの高さは150 mmで

ある。分散板(mesh)は厚さ 1.5 mm、通過可能粒子は 2 μm のステンレス分散板を使用した。このフィルターは圧力損失が高く、ガスが均一に分散されて反応器内に流れることが期待できる。また、アクリル円筒とアクリル円板の間には厚さ 1.0 mm のシリコンシートを挟み、上下のアクリル板同士をボルトで締めることでサンプルに用いた片栗粉やオゾンガスの漏れを防いだ。

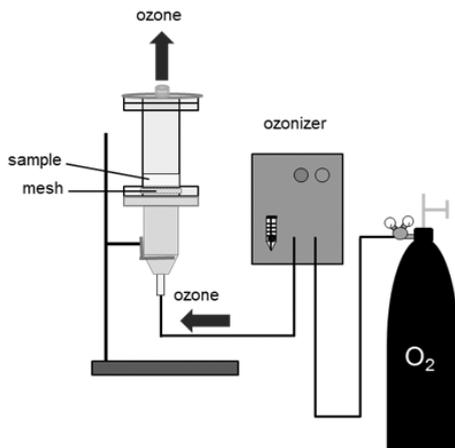


図 2 固定槽型オゾンガス殺菌装置

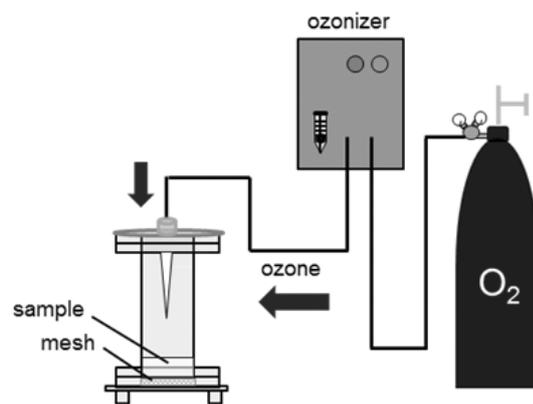


図 3 流動槽型オゾンガス殺菌装置

オゾンガス処理をする際、サンプルを反応器へ入れない空の状態でおゾン反応装置を 30 分運転させ、オゾン濃度を目的のオゾン濃度にさせ、濃度を一定にさせた後に菌を付着させた食品粉体 10~15g を測り取り、反応器内へ入れ、実験を開始した。

3. 実験結果および考察

3. 1 片栗粉とコンニャク粉に付着した大腸菌のおゾンガス殺菌

実験装置は図 2 に示した固定槽型を用い、片栗粉とコンニャク粉のおゾンガス殺菌効果を調べた。殺菌効果を図 4 に示す。縦軸は生菌率[-]、横軸は処理時間[min]である。使用した食品粉体は片栗粉とこんにゃく粉の 2 種類である。実験条件は酸素流量 1.0 L/min、オゾン濃度 122 g/m^3 、コロニーカウント法で生菌率を測定した。

図 4 より、片栗粉は処理時間が経過するに従って生菌率が下がり、7 min から菌が検出されなかった。よって、オゾンガスによる殺菌効果を得られた。こんにゃく粉は処理時間に対し生菌率の値が不安定になってしまった。よって、こんにゃく粉より片栗粉の方が殺菌効果が高い傾向は認められるが、コンニャク粉はゲル化のため均一な希釈が難しいためデータにばらつきが生じた。そこで処理後の粉体を LB 液体培地に植菌して、濁度の経時変化を測定した。図 5 は片栗粉に対しての殺菌効果を示している。縦軸は OD_{660} [-]、横軸は培養時間[min]である。図 5 より、未処理は菌が順調に培養されており、オゾンガスで処理をしたものは、未処理と比べると培養されていないことがわかった。これはコロニーカウント法での結果と同等であった。図 6 はこんにゃく粉に対しての殺菌効果を示している。未処理と処理後の違

いが現れなかったことからコンニャク粉の殺菌効果は不十分であると認められる。

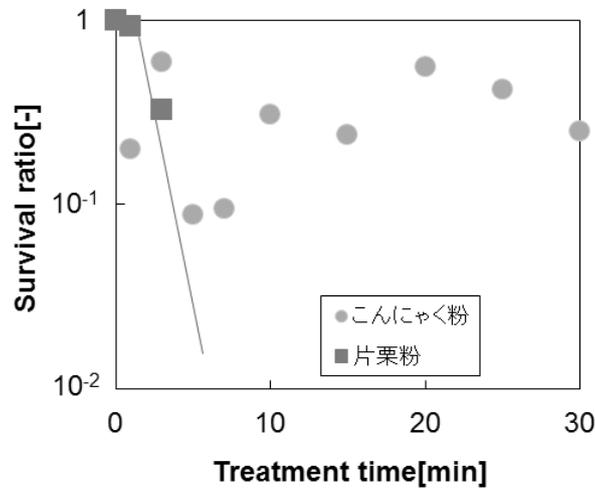


図4 コロニーカウント法によるオゾン殺菌効果

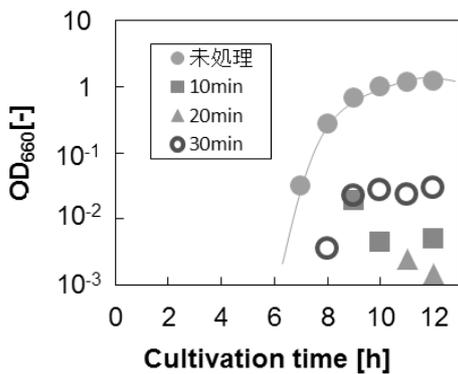


図5 濁度法によるオゾン殺菌効果
(片栗粉)

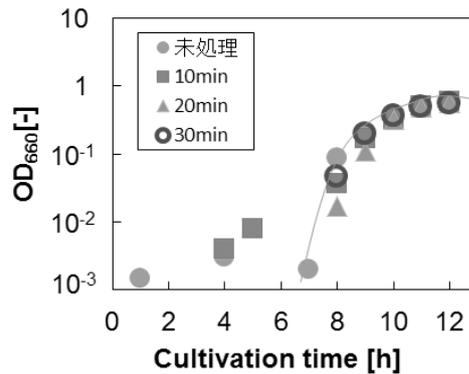


図6 濁度法によるオゾン殺菌効果
(コンニャク粉)

片栗粉とこんにゃく粉のオゾンガス殺菌効果の違いを考察するためにそれぞれの FE-SEM 観察を行った。図7は片栗粉の表面の SEM 画像である。図7から、片栗粉の表面は滑らかであり、凹凸が少ないことが分かった。また、平均粒径が 30 μm ということがわかった。図8はこんにゃく粉表面を SEM で観察したものである。こんにゃく粉は片栗粉よりも粒径が大きく、また表面には無数の凹凸があることがわかった。

本実験では片栗粉とこんにゃく粉に大腸菌を付着させ、オゾンガスによる殺菌効果を確認した。片栗粉は比較的容易に殺菌できるのに対し、こんにゃく粉は殺菌が困難であることが判明した。この原因は表面構造によるものなのか、こんにゃく粉のほうがオゾンと反応しやすいためなのかはわからないが、対象とする食材によってオゾン殺菌効果が異なることは注

意する必要がある。

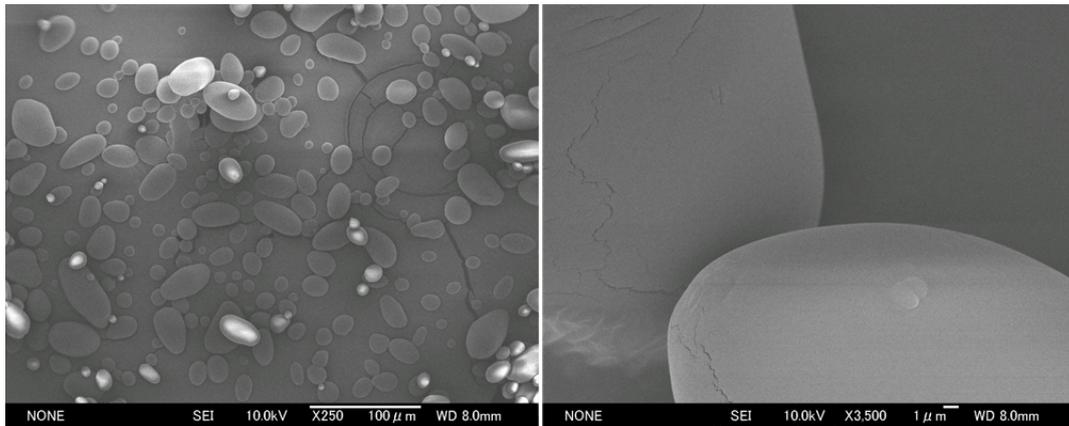


図7 片栗粉のSEM写真 (左250倍、右3,500倍)

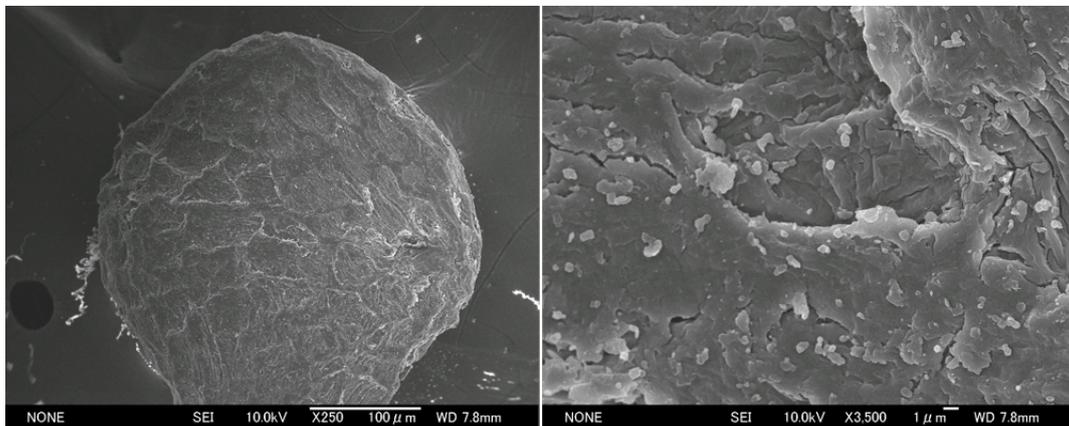


図8 コンニャク粉のSEM写真 (左250倍、右3,500倍)

3.2 片栗粉表面の芽胞のオゾンガス殺菌

次に片栗粉に芽胞を付着した食品粉体のオゾンガスによる殺菌効果に関する実験を行った。固定槽 (図2) を用いた実験の実験条件は酸素流量 1.0 L/min、オゾン濃度 122 g/m³、オゾン発生量 7.3 g/h、処理時間 60 minで行った。また、流動槽 (図3) を用いた場合の実験条件は酸素流量 5.0 L/min、オゾン濃度 59 g/m³、オゾン発生量 17.7 g/h、処理時間 120 minで行った。どちらも処理量 10 gで実験を行った。しかしどちらの場合にも生菌率の低下は一桁以下で、明確な殺菌効果は観察されなかった。比較的殺菌効果が高かった固定槽・湿潤有りの条件で、処理時間を 4 hrまで延ばし実験した結果を図9に示す。図9より 4 hrで約 1.3桁の不活化をした。右下がりのグラフになったことから、処理時間を長くすることで不活化効果の向上が見られた。しかし不活化率は低く、効果的な結果ではないと考えられる。芽胞の表面は硬い殻に覆われているので、結果からやはり芽胞のまま不活化することは容易でないことが伺える。

次に芽胞を栄養細胞化してから殺菌することを試みた。芽胞が発芽し栄養細胞化するメカ

ニズムは完全には解明されていないが、L-アラニンやジピコリン酸が発芽を促進することが報告されている。L-アラニン水溶液(1, 5, 10, 25 mM)とジピコリン酸+塩化カルシウム水溶液(0.1, 0.5, 1, 2.5 mM)を作成し、芽胞懸濁液と混合した。混合後 30 分静置したことで発芽を誘導させた。その後、80 °C, 10 分間の加熱処理したものと加熱処理なしのもので比較をした。発芽が誘導されて、芽胞が発芽し栄養型の菌(細胞)になっていれば、加熱処理によって除去されるので、この前後の生菌率の変化を観察した。L-アラニンは明確な差異が観察できなかったが、ジピコリン酸を用いた場合、特に 2.5mM のジピコリン酸で処理したものは顕著な生菌率の低下、つまり芽胞の発芽が促進されていることが明らかになった。

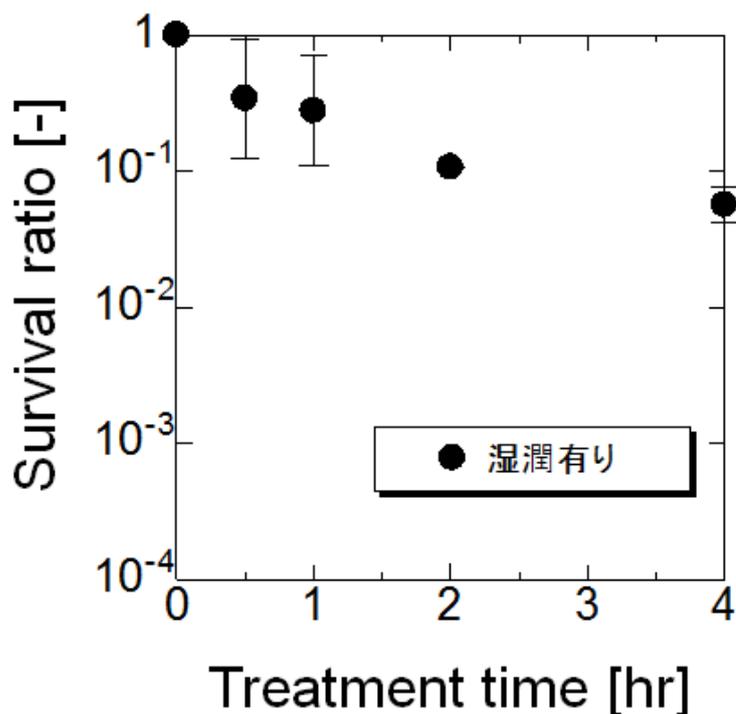


図9 固定槽・湿潤有りて4 hr オゾンガス処理した時の芽胞菌生菌率変化

そこで芽胞を付着させた片栗粉のサンプルを処理槽へ入れる直前に、サンプルへジピコリン酸水溶液 (2.5mM) を噴霧し、オゾンガス殺菌を試みた。結果を図 10 に示す。▲は芽胞を付着させた片栗粉のサンプルにジピコリン酸水溶液を噴霧した後、オゾン処理をしないでドラフト内に置いた結果である。また、■は芽胞を付着させた片栗粉のサンプルに同量の滅菌水を噴霧した後にオゾンガス処理をした結果である。前述 2 点を比較対象にし、芽胞を付着させた片栗粉のサンプルにジピコリン酸水溶液を噴霧した後にオゾンガス処理を行った結果が○である。図 10 より、ジピコリン酸を噴霧しオゾンガス処理をしなかった結果、120 min 後でも殆ど不活化がされなかった。これは、ジピコリン酸により芽胞の発芽が促され、栄養細胞になったことが考えられるが、その後何も処理をしなかった為、栄養細胞がそのまま残

ったことが考えられる。また、滅菌水を噴霧しオゾンガス処理をした結果、120 min の処理で約 1 桁の不活化をした。これは滅菌水を噴霧してオゾンガス処理を行っても、オゾンガス処理のみを行った場合と変わらないことがわかった。

これに対しジピコリン酸を噴霧した後にオゾンガスを処理した結果をしてみると、60 min で約 1.8 桁、120 min で約 2.8 桁の不活化をした。これはオゾンガス処理の不活化に比べて、ジピコリン酸を噴霧することで明らかに不活化率が向上した。これはオゾンガスでの芽胞の不活化に加え、ジピコリン酸を添加剤にすることで芽胞が発芽し栄養細胞となって、より不活化しやすくなったと考えられる。

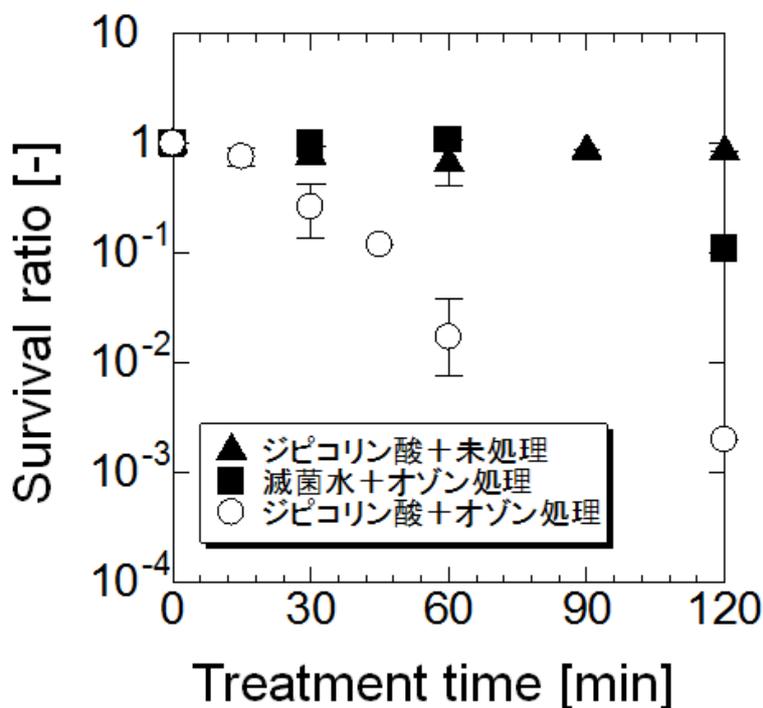


図 10 ジピコリン酸を噴霧した後、オゾンガス処理をした時の芽胞菌生菌率変化

4. おわりに

本研究では食品粉体として片栗粉とコンニャク粉を用い、これらのオゾンガスによる殺菌を検証した。大腸菌を用いた殺菌実験では片栗粉が簡単にオゾンガスで殺菌できるのに対し、コンニャク粉は殺菌が難しいことが明らかになった。オゾンガスによる食品粉体の殺菌は有用であるが、食品の種類により効果が異なるので注意が必要である。また芽胞のオゾンガス殺菌も試みたが、オゾン単独で十分な殺菌効果を得ることが困難であることがわかった。芽胞の殺菌にはジピコリン酸による発芽促進を併用することが有効であることが実証された。

3. 研究発表

平成 21 年度

- 1) 大嶋孝之, 堀野太希, 柴田義幸, 長谷川優子, 佐藤正之, :「水中パルス放電による可溶性タンパク質の分解」静電気学会第 32 回全国大会講演要旨 19aC-2, p.175-180 (2008 年 9 月 18-19 日, 大分大学)
- 2) 吉田 智貴, 坂井 一貴, 大嶋 孝之, :「パルス電界によるバクテリオファージの不活化」化学工学会第 74 年会講演要旨 Q203, (2009 年 3 月 18-20 日, 横浜国立大学)
- 3) 大嶋孝之, 紙谷瑠利子, 谷野孝徳, :「食品粉体のプラズマ殺菌のための基礎研究」日本食品工学会第 10 回年次大会, P60, pp. 160 (2009 年 8 月 1-2 日, 石川県立大学)
- 4) 谷野孝徳, 小野里諒, 大嶋孝之, :「高電圧パルス処理による線虫不活性化と植物への影響」日本食品工学会第 10 回年次大会, P62, pp. 162 (2009 年 8 月 1-2 日, 石川県立大学)
- 5) 成毛由典, 谷野孝徳, 大嶋孝之, :「水中バブルのパルス放電の形成とその応用」静電気学会第 33 回全国大会講演要旨 11aC-6, p.259-260 (2009 年 9 月 10-11 日, 東京都市大学)
- 6) 谷野孝徳, 中村ふみ, 大嶋孝之, :「マイクロバブルを用いた水中放電プラズマによる界面活性剤の分解」静電気学会第 33 回全国大会講演要旨 11aC-8, p.265-270 (2009 年 9 月 10-11 日, 東京都市大学)

平成 22 年度

- 1) 谷野孝徳, 吉田智貴, 坂井一貴, 大嶋孝之:「高電圧パルス電界によるバクテリオファージの不活性化及びメカニズムの解析」日本食品工学会第 11 回年次大会, 2D10, pp. 115 (2010 年 8 月 4-5 日, 東京海洋大学)
- 2) 岡田拓也, 谷野孝徳, 大嶋孝之:「線虫の運動性に与える高電圧パルス処理の影響」日本食品工学会第 11 回年次大会, P43, pp. 159 (2010 年 8 月 4-5 日, 東京海洋大学)
- 3) 嶋原里嗣, 谷野孝徳, 大嶋孝之:「グラファイト電極を用いた高電圧パルス電界殺菌法の開発」日本食品工学会第 11 回年次大会, P43, pp. 162 (2010 年 8 月 4-5 日, 東京海洋大学)
- 4) 安部 友規, 成毛 由, 谷野 孝徳, 大嶋 孝之:「水中バブルを用いたパルス放電の形成とその応用」化学工学会宇都宮大会講演要旨 PD115, (2010 年 8 月 19-20 日, 宇都宮大学)
- 5) 奈良 洋平, 坂井 一貴, 谷野 孝徳, 大嶋 孝之:「パルス電界処理のタンパク質に与える影響」化学工学会宇都宮大会講演要旨 PD120, (2010 年 8 月 19-20 日, 宇都宮大学)
- 6) 入野 綾子, 谷野 孝徳, 大嶋 孝之:「培養条件の操作による、クロレラの物質生産の変化」化学工学会宇都宮大会講演要旨 PD126, (2010 年 8 月 19-20 日, 宇都宮大学)
- 7) 坂井 一貴, 佐藤 翔子, 谷野 孝徳, 大嶋 孝之:「パルス処理による酵母のストレス応答に関する研究」化学工学会第 42 回秋季大会 S-27, (2010 年 9 月 6-8 日, 同志社大学) (予定)
- 8) 柳澤 美貴, 谷野 孝徳, 大嶋 孝之:「新規電極を用いた水中パルス放電による大腸菌の殺菌効果検討」化学工学会第 42 回秋季大会 S-27, (2010 年 9 月 6-8 日, 同志社大学) (予定)
- 9) 大嶋孝之, 谷野孝徳, 佐藤翔子:「高電圧パルス電界下の酵母のストレス応答」静電気学会第 34 回全国大会講演要旨 15pC-3, (2010 年 9 月 14-15 日, 鳥取大学)
- 10) 大嶋孝之, 谷野孝徳, 成毛由典:「投げ込み式水中バブルパルス放電装置の試作と放電特性」静電気学会第 34 回全国大会講演要旨 15aA-7, (2010 年 9 月 14-15 日, 鳥取大学)
- 11) 谷野孝徳, 吉田智貴, 大嶋孝之:「高電圧パルス電界によるファージの不活性化」静電気学会第 34 回全国大会講演要旨 15aC-1, (2010 年 9 月 14-15 日, 鳥取大学)