

研究論文

非加熱食品に対する貝殻焼成水の殺菌効果

近藤温子*1

Antimicrobial Effect of Calcined Shell on Unheated Food

Atsuko KONDO*1

Food Research Center*1

非加熱食品であるカット野菜や漬物の原料となる生野菜を対象として、貝殻焼成水の殺菌効果及び有効な使用条件の検討を行った。その結果、貝殻焼成水は野菜に対しては次亜塩素酸ナトリウムと同等の殺菌効果が得られた。一部の細菌に対しては殺菌に時間を要したが、処理時間を長くすることで殺菌効果が高まることが示唆された。また、殺菌効果の発揮には適正な pH の維持管理が非常に重要であり、これにより繰り返し使用できる可能性が示唆された。

1. はじめに

カット野菜など非加熱で流通する食品は、加熱による殺菌工程が無いことから、衛生管理を行う上で原材料の洗浄や殺菌による微生物制御が非常に重要となる。現行では、それらの方法として次亜塩素酸ナトリウムや電解水が使用されることが多い。しかし、次亜塩素酸ナトリウムは漂白作用による食品の品質劣化や、塩素臭除去のために大量のすすぎ水を要することなどの問題点があり、電解水は製造機器の導入コストなどの問題点がある。

一方、貝殻の主成分である炭酸カルシウムは、高温で焼成することで抗菌作用を有する酸化カルシウムへと変化する。この貝殻焼成カルシウム(以下、貝殻焼成物)は、食品添加物としても使用されており、漂白作用などが無いことから近年天然物由来の抗菌素材として注目されている。しかし、食品に対する作用条件や殺菌効果に関する知見が少なく、普及には至っていない。そこで、本研究では貝殻焼成物の水溶液である貝殻焼成水を用い、非加熱食品の殺菌に関するデータ構築を目的として、生野菜に対する殺菌効果の検討や現行で汎用的に使用されている次亜塩素酸ナトリウムとの効果比較及び貝殻焼成水の有効的な使用条件の検討を行った。

2. 実験方法

2.1 貝殻焼成水の野菜に対する殺菌効果

2.1.1 貝殻焼成物及び貝殻焼成水の調製

ホタテ貝の粗粉砕品を、電気マッフル炉(KM-600 型、アドバンテック東洋(株))を用いて 1000℃で 10 時間焼成した(以下、貝殻焼成物)。貝殻焼成物を蒸留水に 0.02%、0.05%、0.1%及び 0.2%となるように添加し、1 時間攪

拌後に 0.45µm フィルターでろ過したものを貝殻焼成水とした(以下、0.02%貝殻焼成水、0.05%貝殻焼成水、0.1%貝殻焼成水、0.2%貝殻焼成水)。

2.1.2 次亜塩素酸ナトリウム水の調製

次亜塩素酸ナトリウム(富士フィルム和光純薬(株)製)を遊離塩素濃度 200ppm となるように蒸留水で希釈したものを次亜塩素酸 Na 水とした。なお、遊離塩素濃度は DPD 法¹⁾により測定した。

2.1.3 原料野菜の調製

カット野菜を想定し、県内の量販店で入手したネギ及びキャベツを使用した。また、漬物を想定し、県内の量販店あるいは漬物製造事業者より入手した白菜及びキュウリを使用した。これらの野菜を包丁で細断したものを原料野菜とした。

2.1.4 微生物菌数の測定

生菌数の測定には、標準寒天培地を使用した。混釈法により 35℃で 48 時間培養し、出現したコロニーの数を測定した。

2.1.5 野菜に対する殺菌作用の評価

0.2%貝殻焼成水及び次亜塩素酸 Na 水を試験液とし、原料野菜(ネギ、キャベツ)に 9 倍重量の試験液を加えて 10 分、20 分及び 30 分間静置後、水道水にて試験液を洗い流した。また、原料野菜(白菜、キュウリ)に 9 倍重量の試験液を加えて 5 分、10 分及び 30 分間静置後、水道水にて試験液を洗い流した。これらの生菌数を測定した。なお、各試験液は 25℃に調整したものを使用した。

2.2 微生物の分離と同定試験

2.2.1 野菜付着菌と貝殻焼成水処理後の生存菌の分離

原料野菜(ネギ、キャベツ、白菜、キュウリ)に 9 倍重

*1 食品工業技術センター 保蔵包装技術室

量の滅菌生理食塩水を加えてストマッカー処理した。これを0.2%貝殻焼成水9 mlに1 ml添加して1分、10分、20分及び30分後の生菌数を測定し、検出したコロニーを貝殻焼成水処理後の生存菌(以下、生存菌)とした。なお、ストマッカー処理直後に生菌数を測定し、検出したコロニーを貝殻焼成水処理前の付着菌(以下、野菜付着菌)とした。

2.2.2 MALDI-TOF MSによる同定試験

AXIMA 微生物同定システム((株)島津製作所)を使用した。試料調製は70%エタノール処理後25%ギ酸処理を行った。解析は、ソフトウェアSARAMIS Premium(データベース Version4.13、バイオメリュー、(株)島津製作所)を使用した。

2.2.3 16S rDNA 配列による同定試験

第十七改正日本薬局方の参考情報「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に準じて行った。PrepMan ULTRA(ライフテクノロジー社)を用いて細菌コロニーのDNAを抽出し、約1.5 kbpの16S rDNA領域をPCR増幅した後、前半約500 bpの塩基配列を決定した。得られた配列をNCBI(National Center for Biotechnology Information)²⁾のBLASTNプログラムに供し、相同性検索により種を推定した。

2.3 貝殻焼成水の有効的な使用条件の検討

2.3.1 貝殻焼成水の温度が殺菌作用に及ぼす影響

試験液(0.2%貝殻焼成水及び次亜塩素酸Na水)を10℃、20℃及び30℃に調整した。原料野菜(ネギ、キャベツ)に9倍重量の試験液を加えて各温度で10分静置後、水道水にて試験液を洗い流した。これらの生菌数を測定した。

2.3.2 貝殻焼成物の添加量が殺菌作用に及ぼす影響

0.02%貝殻焼成水、0.05%貝殻焼成水、0.1%貝殻焼成水及び0.2%貝殻焼成水を試験液とし、試験液のpHをpH計(HM-40P型、東亜ディーケーケー(株))により測定した。原料野菜(ネギ、キャベツ)に9倍重量の試験液を加えて10分静置後、水道水にて試験液を洗い流した。これらの生菌数を測定した。なお、各試験液は25℃に調整したものを使用した。

2.3.3 貝殻焼成水の反復使用の検討

原料野菜(ネギ、キャベツ)に9倍重量の0.2%貝殻焼成水を加えて1分、10分、20分及び30分後に試験液のpHを測定した。また、原料野菜(ネギ、キャベツ)に9倍重量の次亜塩素酸Na水を加えて1分、10分、20分及び30分後に試験液の遊離残留塩素と結合残留塩素の濃度をDPD法により測定した。なお、各試験液は25℃に調整したものを使用した。

3. 実験結果及び考察

3.1 貝殻焼成水の野菜に対する殺菌効果

漬物の衛生規範には「原材料の殺菌方法の一つとして、次亜塩素酸ナトリウム溶液(100mg/Lで10分間又は200mg/Lで5分間)又はこれと同等の効果を有する亜塩素酸水(きのこ類を除く。)、次亜塩素酸水並びに食品添加物として使用できる有機酸溶液等で殺菌した後、飲用適の流水で十分すすぎ洗いすること」と記載されている³⁾。そこで、0.2%貝殻焼成水と次亜塩素酸Na水の原料野菜に対する殺菌効果を比較した。その結果を図1に示す。

対照の次亜塩素酸Na水は、いずれの野菜でも処理時間5分あるいは10分と30分では生残した生菌数にほとんど差が無かった。0.2%貝殻焼成水は(a)ネギ、(c)白菜、(d)キュウリにおいて、処理時間5分あるいは10分より30分で生菌数が減少した。また、(a)ネギ、(b)キャベツ、(c)白菜において0.2%貝殻焼成水は処理時間30分で次亜塩素酸Na水よりも生菌数が減少し、(d)キュウリでは次亜塩素酸Na水の方がより減少したが差は小さかった。これらの結果より、貝殻焼成水は生野菜に対して次亜塩素酸ナトリウムと同等の殺菌効果を有し、浸漬時間を長くすることにより効果を高めることができると考えられた。

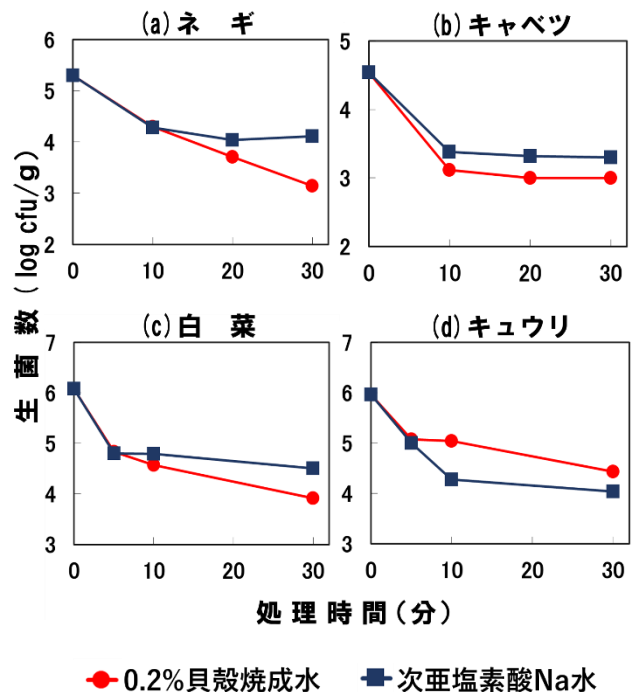


図1 貝殻焼成水の野菜に対する殺菌効果

3.2 微生物の分離と同定試験

貝殻焼成水処理前の野菜付着菌及び処理後の生存菌約300個について、MALDI-TOF MSによる微生物同定及

びクラスター解析を行った。その結果、野菜付着菌では野菜ごとに異なる菌が多種類付着しているが、生存菌では野菜の種類に関わらず類縁種が生存していると推測される結果であった(データ省略)。

MALDI-TOF MS で生存菌の菌名がヒットしなかったことから、クラスター解析により検出率が高いと推測された生存菌を選択し、16S rDNA 配列を解析した。その結果、*Paenarthrobacter* 属、*Glutamicibacter* 属、*Kocuria* 属、*Cellulosimicrobium* 属、*Rhodococcus* 属、*Gordonia* 属、*Microbacterium* 属など放線菌に分類される細菌が多数検出された。また、検出頻度は低いが耐熱性芽胞菌である *Bacillus* 属も検出された。検出した細菌の中には薬剤耐性が報告されている種も含まれており、貝殻焼成水処理直後から 30 分後までの生存菌に対する殺菌作用を検討したところ処理時間が長いほど生菌数が減少する傾向が得られている(データ省略)。このことから、貝殻焼成水はこれらの細菌に対して殺菌に時間を要するが、処理時間を長くすることで殺菌できる可能性が考えられた。

3.3 貝殻焼成水の有効的な使用条件の検討

3.3.1 貝殻焼成水の温度が殺菌作用に及ぼす影響

過去に行った研究⁴⁾により、貝殻焼成水の殺菌効果は温度の影響を受け、10℃、25℃及び 40℃では 10℃で最も効果が低く、40℃で最も効果が高い結果が得られている。この結果より、夏場と冬場で野菜に対する殺菌効果に差が生じる可能性が考えられた。そこで、ネギとキャベツを用い、貝殻焼成水の温度が原料野菜の殺菌作用に与える影響を検討した。その結果を表 1 に示す。

ネギでは未処理の生菌数が 10^5 オーダーであるのに対し、10℃と 25℃では 10^4 オーダーに減少し、40℃では 10^3 オーダーに減少した。キャベツでは、いずれの温度試験区でも未処理の 10^4 オーダーから 10^3 オーダーに減少した。これらの結果より、野菜では 10℃と 25℃で同程度の効果を示し、野菜の種類によっては 40℃程度に加温することで、効果が高まる可能性が考えられた。

表 1 貝殻焼成水の温度が野菜の殺菌に及ぼす影響

	生菌数(cfu/g)			
	未処理	10℃	25℃	40℃
ネギ	1.7×10^5	2.5×10^4	2.3×10^4	1.6×10^3
キャベツ	3.5×10^4	2.1×10^3	2.2×10^3	1.1×10^3

3.3.2 貝殻焼成物の添加濃度が殺菌作用に及ぼす影響

貝殻焼成物は、水に対して添加濃度 0.1%から 0.2%で飽和状態となる。そこで、貝殻焼成物の添加濃度 0.02%、0.05%、0.1%及び 0.2%にて貝殻焼成水を調製し、試験

液の pH 測定及び原料野菜に対する殺菌作用を試験した。各試験液の pH と処理後の生菌数測定結果を図 2 に示す。

試験液の pH 測定結果では、貝殻焼成物の添加濃度の増加に伴い貝殻焼成水の pH が高くなった。処理後の生菌数測定結果では、(a)ネギは未処理の生菌数が 10^5 オーダーであったのに対し、0.02%から 0.2%貝殻焼成水処理後はいずれも 10^4 オーダーに減少し、添加濃度が大きいほど生菌数は減少した。(b)キャベツは、未処理の生菌数が 10^5 オーダーであり、0.02%から 0.2%貝殻焼成水処理では添加濃度が大きいほど生菌数は減少し、0.05%から 0.2%では 10^3 オーダーに減少した。試験液の pH と処理後の生菌数を比較すると、pH12.0 と pH12.7 では処理後の生菌数に 1 桁差が生じた。これらの結果より、貝殻焼成水の殺菌作用は貝殻焼成物の添加濃度の影響を受け、pH12 から pH13 の高アルカリ性であっても pH の値により殺菌効果が変わると考えられた。

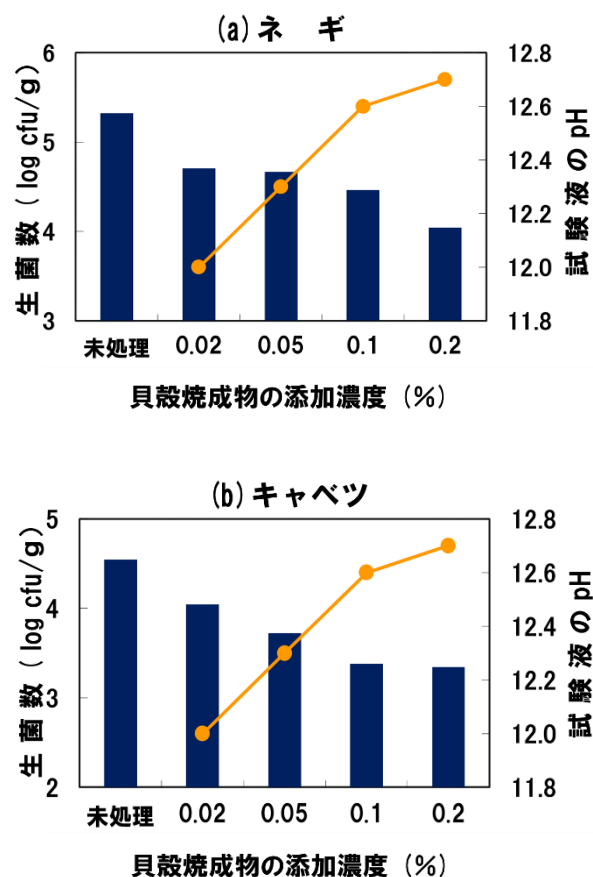


図 2 貝殻焼成物の添加濃度が野菜の殺菌に及ぼす影響

棒グラフ：生菌数、折れ線グラフ：pH

3.4 貝殻焼成水の反復使用の検討

0.2%貝殻焼成水及び次亜塩素酸 Na 水に原料野菜(ネ

ギ、キャベツ)を添加し、処理後の成分変化を測定した。**表 2** の(a)に貝殻焼成水の pH 測定結果、(b)に次亜塩素酸 Na 水の遊離残留塩素と結合塩素濃度の測定結果を示す。なお、次亜塩素酸ナトリウムの結合残留塩素は一般に遊離残留塩素より殺菌力が弱く、同じ殺菌速度を得るためには濃度比で数十倍を要するといわれている¹⁾。

(b)次亜塩素酸 Na 水は、ネギ添加 1 分後から遊離残留塩素が減少し、30 分後には 0ppm となった。キャベツでは、添加 10 分後には遊離残留塩素が 140ppm まで低下し、30 分後には 70ppm まで低下した。一方、(a)0.2%貝殻焼成水はネギとキャベツの双方において、添加 30 分経過しても pH12.7 から pH12.6 に変化する程

表 2 野菜添加後の貝殻焼成水と次亜塩素酸 Na の成分変化

(a)0.2%貝殻焼成水

原料野菜	測定項目	処理時間 (分)				
		0分	1分	10分	20分	30分
ネギ	pH	12.7	12.7	12.6	12.6	12.6
キャベツ	pH	12.7	12.7	12.7	12.6	12.6

(b)次亜塩素酸Na水

原料野菜	測定項目	処理時間 (分)				
		0分	1分	10分	20分	30分
ネギ	遊離Cl(ppm)	200	120	70	10	0
	結合Cl(ppm)	0	60	60	20	20
キャベツ	遊離Cl(ppm)	200	200	140	100	70
	結合Cl(ppm)	0	0	40	30	20

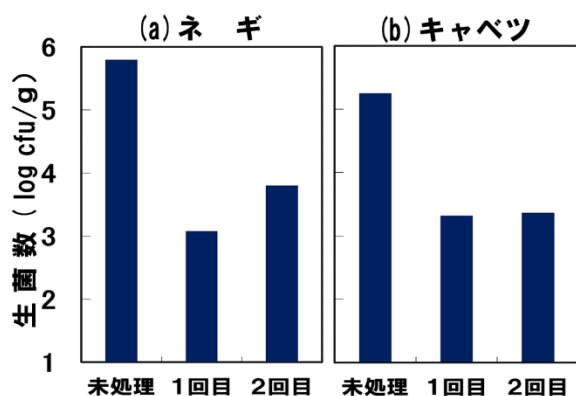


図 3 貝殻焼成水を再使用したときの殺菌効果

度であった。これらの結果より、貝殻焼成水は野菜との接触による pH の変化が少なく、繰り返し使用しても殺菌効果を発揮する可能性が考えられた。

そこで、貝殻焼成水の再利用による殺菌作用を検討した。その結果を**図 3**に示す。試験の結果、ネギ及びキャベツのどちらも初発で 10^5 オーダーあったものが、浸漬 1 回目、2 回目どちらも 10^3 オーダーまで減少した。

4. 結び

本研究では、貝殻焼成水の殺菌作用に対して以下の結果が得られた。

- (1) 野菜に対して、次亜塩素酸ナトリウムと同等の殺菌効果が得られた。
- (2) 一部の細菌に対して殺菌に時間を要するが、処理時間を長くすることで殺菌効果が高まることが示唆された。
- (3) 野菜に対して低温(10℃)による殺菌効果の低下は起こらず、野菜の種類によっては 40℃程度に加温することで効果を高められる可能性が示唆された。
- (4) 殺菌作用は貝殻焼成物の添加濃度の影響を受け、0.2%貝殻焼成水(pH12.7)は 0.02%貝殻焼成水(pH12.0)より殺菌効果が高かった。
- (5) 野菜との接触による pH の変化は少なく、繰り返し使用できる可能性が考えられた。

付記

本研究は、公益財団法人内藤科学技術振興財団 2019 年度研究助成により実施した。

文献

- 1) 公益財団法人日本薬学会：衛生試験法・注解 2015, 768(2015), 金原出版
- 2) ホームページアドレス: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (2020/6/8)
- 3) 厚生労働省：漬物の衛生規範, https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/130201_9-1.pdf (2020/5/25)
- 4) 近藤温子, 鳥居貴佳, 安田(吉野)庄子: あいち産業科学技術総合センター研究報告, 6, 76(20)