

オゾンガスを用いた食品の殺菌

岡村 澄夫, 大塚 恵*

Sterilization of the food using ozone gas

Sumio OKAMURA, Megumi OOTUKA*

(2002年11月22日受理)

Even if a mold spore is exposed to 5500ppm ozone gas for 40 minutes, it does not become extinct. The sterilizing properties of ozone gas are very weak in the state of dryness. However, coexistence of water produces a strong sterilization action. It turns out that the bean sprouts in which moisture is contained enough are expectable enough as a result of investigating the sterilization effect only in ozone gas to a model. Since the ozone gas generator itself is sharply cheaper than ozone water manufacture equipment, a large cost cut is expected.

1. 緒言

現在食品製造の中心的な殺菌剤として用いられている次亜塩素酸は、細胞核を変性させることによる殺菌作用を持つ。しかし次亜塩素酸は独特の臭気をもつため、付着臭気をのぞくために多量の水によって洗浄しなければならず、30分以上の滞留時間が必要である。さらに連続殺菌のための濃度はきわめて変動しやすい等の欠点も持つ。

そこでカット野菜の殺菌ではオゾン水製造装置が近年用いられている。オゾンは時間がたつと酸素に分解されるため、無公害であるという利点を持つ。だがオゾン水製造装置は高価でコストがかかる。

オゾンガス発生装置はオゾン水製造装置ほどコストがかからないのに加えて、装置の小型化も期待できる。

<目的>

オゾンガスを用いて殺菌実験を行い、その基礎的データを元に、野菜の殺菌への応用の可能性を探る。

2. オゾンガスによる大腸菌の殺菌

2.1 使用した大腸菌について

大腸菌は、遺伝学的・生化学的研究材料としてもっとも頻繁に使用される好気性もしくは通性嫌気性のグラム陰性菌である。今回、E.coli3068株を用いた。

2.1.1 大腸菌の培養

各種の栄養物（炭素源、窒素源、無機塩類、ビタミン類）を含有し、微生物を増殖させるために用いられる液体または固体の材料を培地という。大腸菌の培養には、腸内細菌を主対象とする一般病原菌の増殖用によく用いられるブイヨン培地を使用した。その組成を表2-1に示す。

表 2-1 ブイヨン培地の組成

成分	重量 (g/l)
肉エキス	5
ポリペプトン	5
食塩	2.5
PH 7.2	

寒天平板培地には、マッコンキー培地を使用した。これは、腸内細菌用の選択性分離培地として用いられ、大腸菌のような乳糖分解菌は、酸生成により析出した胆汁酸のために赤紫色のコロニーを作り、周囲に淡桃色か赤紫色の沈殿を生ずる。非乳糖分解菌は、透明もしくは半透明のコロニーを作り、周囲の培地は透明になる。このため、かりに他の雑菌が混入（コンタミ）しても判別しやすい。組成を表2-2に示す。

2.1.2 大腸菌の生菌数の測定法

菌数の測定には、平板塗抹法（平板培養法）を用いた。

これは、菌混濁液の一定量（場合によっては希釈液）を、寒天培地上に塗抹し、翌日、菌が生育した可視的集落（コロニー）数を数えることによって、

* 秋田高専専攻科学生

オゾンガスを用いた食品の殺菌

表 2-2 マッコンキー寒天培地の組成

成分	重量 (g/l)
胆汁酸塩	1.0
ペプトン	19.0
乳糖	10.0
食塩	5.0
クリスタルバイオレット	0.01
ニュートラルレッド	0.03
寒天	15.0
PH 7.2	

元の生菌数を求める方法である。例えば、OD（濁度）が0.3程度（濁度計により測定）の液体培地には、1mlあたりに大腸菌が約5億匹存在する。この溶液を3回100倍希釈し、寒天培地にこの希釈液を0.2mlまいて培養すると、約100個のコロニーができる。実験では、こうして求められたコロニー数と希釈倍率から、実際の1mlあたりの生菌数を計算する。

希釈液としては、生理的食塩水を用いた。これは、生理的食塩水の浸透圧が細菌の浸透圧とほぼ等しく、細菌を安定に保つためである。大腸菌は特に浸透圧の変化に弱く、水中では死にやすいため使用した。

2.1.3 実験準備

実験に用いる器具は、すべて事前に滅菌しておく。シャーレやピーカー等のガラス器具類、及びピンセットや薬じ等の金属類は、菌が入らないようアルミホイルで包み、180℃で30分間乾熱滅菌する。また、綿栓も試験管と一緒に乾熱滅菌してから使用する。

培地及び生理的食塩水は、調整後、オートクレーブに121℃で15分間かけ滅菌する。固体培地をつくる時は、乾熱滅菌しておいたシャーレに寒天(15~20g)を加えた液体培地を約20mlずつ注ぐ。固まったら、37℃の恒温槽に1日おいて、雑菌が混入していないのを確認してから使用する。なお、作業はすべてあらかじめ殺菌灯で滅菌しておいたクリーンベンチ内で行う。

2.2 オゾンガスによる大腸菌の殺菌

フラスコに、大腸菌を含むブイヨン液体培地（約OD 0.3）をいれ、その中に3通りの方法で5500 ppm/5l/minのオゾンガスを作用させ、生存率の変化を観察した。

2.2.1 実験操作

実験 1) 適当な濃度に薄めた大腸菌を含む液体培

地に、直径5mmのテフロン管またはバブラーで連続的にオゾンガスを曝露し、作用時間と大腸菌の生存率の変化を調べる。

実験 2) オゾンガスを、生理的食塩水の入ったフラスコに吹き込んでから密封し、そこに大腸菌を含む液体培地を加え、静かに攪拌し、オゾンガスの作用時間と大腸菌の生存率の変化を調べる。

なお、実験は、いずれも殺菌灯であらかじめ滅菌しておいたクリーンベンチ内で行い、以降の実験も同様とする。

生存率は、次のようにして求めた。

$$\text{生存率 (\%)} = (\text{生き残っている大腸菌数} / \text{オゾンガスを作用させていないときの} \text{大腸菌数}) \times 100$$

2.2.2 実験結果

実験 1 と実験 2 の結果をまとめたグラフを図 2-3 に示す。

密封状態にして行った方が、オゾンガスを水中に

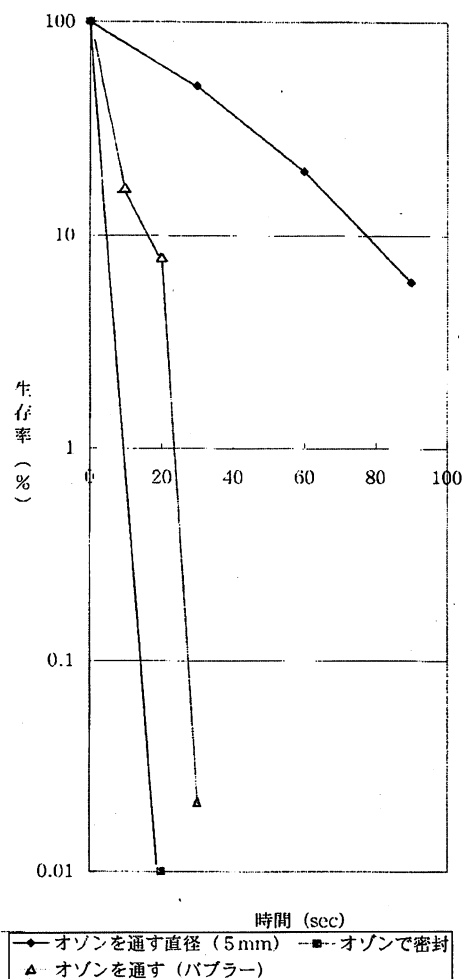


図 2-3 オゾンの殺菌比較

分散させたときよりも死滅速度は高かった。

2.2.3 考察

オゾンガスの水に対する溶解度は、101.3kPa, 0℃の条件下で3~7g/l (水の条件によって大幅に異なり、かつ、この濃度は長期的に保存される濃度ではない) とかなり低い。このため、実験1においてオゾンはほとんど水には溶けていないと考えられ、テフロン管使用時よりもバブラー使用時の方が、オゾンガスと大腸菌との接触面積が大きく死滅速度も大きくなったものと思われる。だが、接触面積が大きくとも、開放系である(クリーンベンチ内で排気をしながら行った)ため、フラスコ内のオゾン濃度は閉鎖系である実験2)よりも、低いと考えられる。実験2のほうは密封状態の閉鎖系であるため、フラスコ内のオゾンガスが長時間水と接触したことが予想され、かつ、攪拌による液内部の大腸菌の接触界面の増大により死滅速度が大きくなったのではないかと考えられる。

以上のことより、オゾンガスが水と共存している状態であれば、殺菌効果は十分発揮されるのではないかと考えた。そこで、水の存在の有無による殺菌効率への影響を調べてみた。

3. オゾンガスによるコウジカビの殺菌

3.1 使用したコウジカビについて

Aspergillus oryzae (日本コウジカビ) を用いた。これは、不完全菌類である *Aspergillus* 属の代表的菌種で、清酒、甘酒、みりん、みそ、しょうゆなどの製造に古くから用いられてきた。黄~黄緑色の分生孢子(細胞核の融合なしに分裂だけで無性的にできる孢子)をつけ、古くなると褐色を呈する。

3.1.1 コウジカビの培養

コウジカビの培養には、マルツエキス寒天培地を用いた。この培地は、一般に酵母、及び糸状菌の検出に用いられている。真菌の保存培地にも適す。その組成を表3-1に示す。

マルツエキスには、真菌の発育に必要な栄養素が全部含まれている。培地の酸性は細菌を抑制し、酵母及び糸状菌の分離を促進する。

表3-1 マルツエキス寒天培地の組成

成分	重量 (g/l)
マルツエキス	20
酵母エキス	2
寒天	15.0
PH 5.0	

実験では、この培地にコウジカビを植菌し、約3週間培養して孢子をよく生育させ、これをスパチュラでかきとり、シャーレで常温保存したものをその都度使用した。

3.1.2 コウジカビの生菌数の測定

菌数の測定には、大腸菌の時と同様に、平板塗抹法を用いた。ただし、コウジカビは、疎水性の表層構造を持つため、水中に均一分散せず、小さな凝集体になって分散したり沈殿したりする。よって、界面活性剤として Triton X-100 を用い、水中に分散させてから、平板培養法を行った。Triton X-100 は、非イオン性界面活性剤であるトリトン系界面活性剤の一つであり、膜可溶性に優れ、蛋白質の活性失活が少ないという特徴を持つ。

3.2 オゾンガスによるコウジカビの殺菌

コウジカビ孢子小匙1杯をフラスコに加え、そこに前回同様オゾンガスを作用させ、生存率の経過を観察する。

3.2.1 実験操作

実験1) あらかじめ乾熱滅菌した乾燥フラスコをオゾンガスで密封し、そこに孢子を加え、オゾンガスの作用時間と生存率の経過を調べる。

実験2) 生理的食塩水の入ったフラスコをオゾンガスで密封し、そこに孢子を加え、同様に調べる。コウジカビは生理的食塩水の表面に浮いた状態で実験を行った。

3.2.2 実験結果

実験1と実験2の実験結果をまとめたグラフを図3-2に示す。

実験1は40分たってもほとんど死滅しなかったが、実験2は2分半でほぼ死滅した。

3.2.3 考察

水の有無によるオゾンガスの殺菌力の違いが顕著に現れた。

このことから、水が共存している状態なら、オゾンガスの殺菌効果は十分発揮されることが確認された。

4. オゾンガスによる野菜の殺菌

以上の結果をふまえて、実際に野菜を用いてオゾンガス殺菌を行った。

4.1 使用した野菜について

実験操作3より、水の存在によってオゾンガスの殺菌力が増大することが確かめられたので、水分含

量の多い野菜を使って実験を行うことにした。野菜は、水分含量が90%以上含まれているモヤシを用いた。

4.2 オゾンガスによる野菜の殺菌

4.2.1 実験操作

検定菌として大腸菌を用いた。モヤシを、大腸菌を含むブイヨン液体培地に浸して表面に大腸菌を付着させ、その後数分おいて、やや乾燥状態にさせたものを用いた。

実験は、コウジカビの時と同様に、次の2つの条件について調べた。

実験1) あらかじめ乾熱滅菌しておいた乾燥フラスコをオゾンガスで密封し、そこにモヤシを加えて、オゾンガスの作用時間と生存率の経過を調べた。

実験2) 生理的食塩水の入ったフラスコをオゾンガスで密封し、そこにモヤシを加えて、同様に調べた。

4.2.2 実験結果

実験1と実験2の実験結果をまとめたグラフを図4-1に示す。

乾燥状態では、30秒で生存率は1%にまで減少した。生理食塩水中では、30秒でほぼ死滅した。

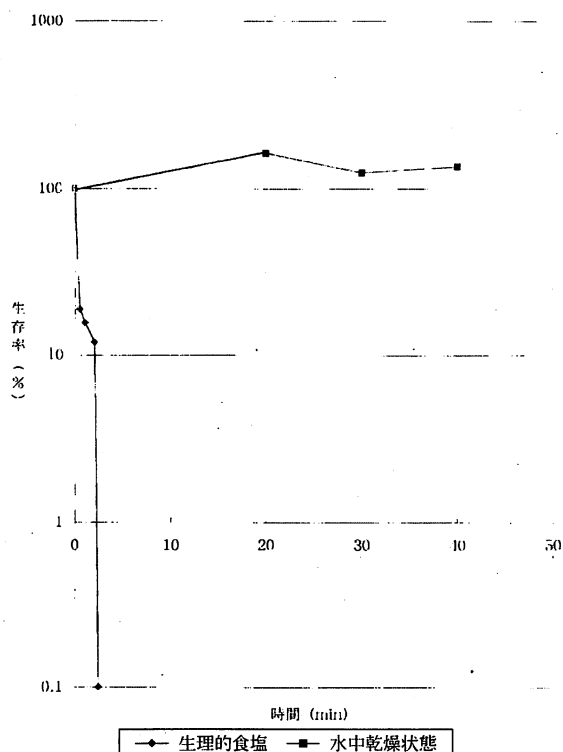


図3-2 コウジカビのオゾン殺菌

4.2.3 考察

乾燥状態のモヤシは、水の中のモヤシに比べると、死ににくいですが、コウジカビの時の結果と比較すると、水分含量の高い野菜へのオゾンガスの殺菌力は増大している。また、生理的食塩水中にあるモヤシが瞬時に殺菌されることをみても、市販のカット野菜は表面がぬれた状態なので、オゾンガスによる野菜の殺菌は、有効なのではないかと思われる。

5. オゾンによる殺菌の反応機構

5.1 オゾンについて

オゾンは酸素の同位体で分子式 O_3 で表される、独特の生臭い刺激臭を持つ物質である。常温では気体であり、通常酸素または空気と混ざった希薄な状態で存在し、一般的に空気中のオゾン濃度は0.005ppm程度である。15%以上の高濃度になると、青みがかかった色を呈する。固体では、暗紫色を呈する。オゾン及び酸素値を表5-1に示す。

表5-1に示すように、オゾン分子は反磁性であり、鋭角が $116^\circ 49'$ 、酸素-酸素間の距離がどちらも 1.278 \AA で $0.49 \sim 0.58$ デバイの双極子モーメントを持

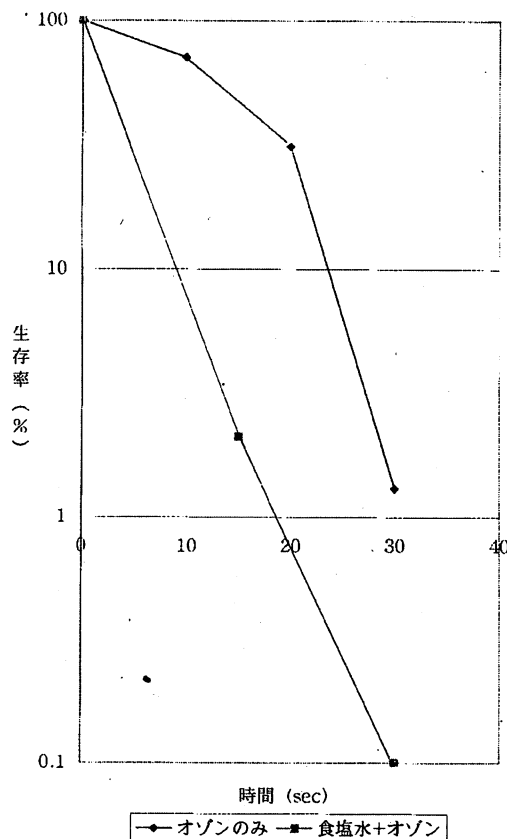


図4-1 モヤシの殺菌 (密閉)

表 5-1 オゾン及び酸素の物性値

項目	オゾン	酸素
分子量	48.0	32.0
沸点 (°C) *1	-119.9±0.3	-182.96
融点 (°C) *1	-192.7±0.2	-218.4
臨界温度 (°C)	-12.1	-118.6
臨界圧力 (Mpa)	5.57	5.043
臨界密度 (g/cm ³)	0.540	0.436
気体密度 (g/dm ³) *2	2.114	1.429
水への溶解度 (g/l) *2	3~7*3	0.043
磁性	反磁性	常磁性
結合エネルギー (eV)	1.5	5.1
イオン化エネルギー (eV)	12.3	12.1

*1: 101. 3kPa下での値

*2: 101. 3kPa, 0°C下での値

*3: 水の条件によって大幅に異なり、この濃度は長期に保持される値ではない

つ。したがって、オゾンの結合は単結合と二重結合の間であると考えられ、共鳴混成体として表される。

オゾンの結合エネルギー (= 解離エネルギー) は酸素に比べて非常に小さい。結合エネルギーが小さいと言うことは、オゾンが非常に分解しやすい性質であることを意味する。オゾンはそのままでも自然に分解を起し、次式の反応によって酸素原子を分解生成する。



酸素分子は、オゾンよりも酸化力の強い物質であり、オゾン及び酸素分子が種々の物質と反応して、様々なフリーラジカルが生じ、連鎖反応が起こる。このように、酸素分子より酸化力の強い酸素原子から構成された原子、分子、イオンを活性酸素と呼ぶ。オゾンによる酸化反応は、従って、

- ・オゾンによる直接酸化
- ・その反応物から発生したフリーラジカルによるラジカルの酸化

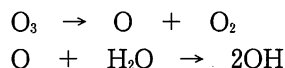
この2つによって進行する。後者は選択性は低いですが、酸化力は強力である。

5.2 オゾンによる殺菌の反応機構

オゾンによる殺菌は、細胞壁・細胞膜の脂質の二重結合の酸化・破壊によって内部の成分が外に漏れでて死滅すること (溶菌作用と呼ぶ) が主な原因であると考えられる。このオゾンの殺菌作用は、一定温度では濃度と接触時間に比例する。

実験結果では、オゾンガスのみよりも、水と共存状態の方が、殺菌力が高いことが確認された。このことについて説明する。

オゾンは、水が存在すると、酸素原子が水と次式のように反応して、ヒドロキシラジカルを生じる。



これは、電子を受け取ってヒドロキシイオンになりやすい (還元されやすい)、求電子的性質をもつ強い酸化剤である。そして活性酸素種の中でもっとも酸化力の高い酸素種で、その反応速度定数は、オゾンの $10^5 \sim 10^7$ 倍、酸素原子の $10^2 \sim 10^4$ 倍と非常に大きい。この大きな違いが実験操作 3.2.1 の時の水の有無による殺菌力の格差を生んだものと思われる。

6. まとめ

以上の結果より、

- ・オゾンガスは水と共存させている状態であれば、その殺菌効果は十分発揮される
- ・殺菌能力の向上・殺菌時間の短縮には水の存在が不可欠である
- ・オゾンガスのみによる殺菌は、野菜がぬれた状態にある実際の製造現場でも十分有用であるということがわかった。

さらに、オゾンガス製造装置はオゾン水製造装置に比べてコストは50分の1以下と安価なため、大幅なコストダウンが期待できる。

ただし、その酸化力の高さ故、共存物としてある有機物とも反応してしまう (= オゾンのロス) ことも考えられる。このため、共存物としての有機物を除去する必要があると思われる。例えばカット野菜では、カット後の野菜汁はオゾンとの反応性に富むため、よく水洗した後に作用させるかもしくはオゾン殺菌後にカットするなどの操作をする必要があると思われる。

参考文献

日本微生物学協会編, 微生物学辞典, 技報堂出版 (1992)

オゾンガスを用いた食品の殺菌

- 今堀・山川, 生化学辞典, 東京化学同人 (1998) (1988)
日本化学会編, 活性酸素種の化学, 学会出版センター 神力就子, 新版オゾン利用の新技术, サンユウ書房
(1999) (1993)
伊藤泰郎, オゾンの不思議, 講談社 (1999) 杉光英俊, オゾンの基礎と応用, 光琳出版 (1996)
柳田友道著, 微生物科学 1, 学会出版センター