九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

次亜塩素酸ナトリウム溶液および弱酸性電解水によるBacillus属細菌芽胞の殺菌と殺菌効果に及ぼす要因

上門, 英明
九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻食品バイオ工学講座食品衛生化学研究室 | 明治乳業(株)研究本部食品開発研究所

伊藤, 晶子
明治乳業(株)研究本部食品開発研究所

青木, 史樹
明治乳業(株)研究本部食品開発研究所

遠藤, 光春
明治乳業(株)研究本部食品開発研究所

他

https://doi.org/10.15017/4322

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 59 (1), pp.15-24, 2004-02-01. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第59巻　第1号　15-24　(2004)

次亜塩素酸ナトリウム溶液および弱酸性電解水による *Bacillus* 属細菌芽胞の殺菌と殺菌効果に及ぼす要因

上　門　英　明[1, 3, *]・伊　藤　晶　子[1]・青　木　史　樹[1]
遠　藤　光　春[1]・大　塚　明　久[2]
宮　本　敬　久・飯　尾　雅　嘉
九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門食品バイオ工学講座食品衛生化学研究室
(2003年10月31日受付，2003年11月14日受理)

Studies on the Effect of Sodium Hypochlorite and Electrolyzed Oxidizing Water on the Viability of *Bacillus* Spores and the Factors Affecting the Sporicidal Action

Hideaki KAMIKADO[1, 3, *], Akiko ITO[1], Fumiki AOKI[1], Mitsuharu ENDO[1], Akihisa OHTSUKA[2], Takahisa MIYAMOTO and Masayoshi IIO
Laboratory of Food Hygienic Chemistry, Division of Food Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 812-8581, Japan

緒　　言

Bacillus 属細菌は熱や乾燥に強い芽胞を形成するため，食品の加熱殺菌後も生残し，芽胞が発芽・生育に適した条件に置かれた場合，増殖して食中毒や品質劣化を引き起こす．*Bacillus* 属細菌は土壌中に分布しているため，土壌のマイクロフローラと関係のある農作物や畜産物から検出される（中山ら，2003b）．生乳からは *Pseudomonas* 属などのグラム陰性桿菌が多く検出され，*Bacillus* 属細菌は少ないが，生乳中のグラム陰性桿菌は加熱殺菌や粉乳類などの製造工程で行われる噴霧乾燥によって死滅し，*Bacillus* 属細菌が優勢菌となる（亀井ら，1984；上門ら，投稿中）．衛生管理のため，乳処理工場では，製造ラインの洗浄および殺菌において水酸化ナトリウム溶液によるアルカリ洗浄と硝酸溶液による酸洗浄が行われ，その後蒸気殺菌される．洗浄不良により製造ラインに芽胞が残存した場合，100℃以下の蒸気では十分に殺菌できないために製品を汚染する危険性がある．近年，低温生育性の *Bacillus* 属細菌の存在が報告されており（Meer *et al.*, 1991；Vaisanen *et al.*, 1991），これらの細菌群には食品衛生法で規定されている10℃以

[1]明治乳業㈱ 研究本部 食品開発研究所，〒250-0862　神奈川県小田原市成田540
[2]明治乳業㈱ 群馬工場，〒372-0855　群馬県伊勢崎市長沼町1741-1
[3]九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻食品バイオ工学講座食品衛生化学研究室
[1]Research and Development Center, Meiji Dairies Corporation, 540 Naruda, Odawara, Kanagawa, 250-0862, Japan
[2]Gunma factory, Meiji Dairies Corporation, 1741-1, Naganumacho, Isezaki-shi, Gunma 372-0855, Japan
[3]Laboratory of Food Hygienic Chemistry, Division of Food Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University
*Corresponding author (E-mail: HIDEAKI_KAMIKADO@MEIJI-MILK.COM)

下の保存温度でも増殖する細菌が含まれている．さらに，低温生育性の *Bacillus* 属細菌群にはセレウス菌などの食中毒菌も含まれることから，製造工程における徹底した低温管理と洗浄・殺菌が必要となる．

食品製造現場における設備や食品容器の洗浄・殺菌方法としては，安全性に加えて経済的で殺菌効率の高い方法が要求される．酸洗浄はアルカリ洗浄に比べて芽胞に対して高い殺菌効果を有するが（亀井ら，1988），高温，高濃度の洗剤の使用は設備への影響（森ら，2001）や生産効率の低下が懸念される．一方，次亜塩素酸ナトリウム溶液は食品添加物として認められており，抗菌スペクトルが広く，経済的であることから食品工場で広く使用されている．しかし，次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて芽胞を殺菌するには，高濃度で使用する必要があり，そのため塩素臭の残留や作業者の安全性に対する問題がある．2000年6月，厚生労働省から水を食塩や塩酸共存下で電気分解して生成される機能水が強酸性次亜塩素酸水（強酸性電解水），微酸性次亜塩素酸水（弱酸性電解水）として食品添加物に認可された．これら電解水はその pH が酸性領域であるために有機物と反応してもトリハロメタンはほとんど生成しない．殺菌効果も次亜塩素酸ナトリウム溶液より高いといわれていることから（土井，2002），従来の次亜塩素酸ナトリウム溶液の代わりに電解水を使用すれば，塩素濃度の低減が可能になると考えられる．そこで，本研究では，生乳および粉乳類から分離した *Bacillus* 属細菌芽胞に対する弱酸性電解水と次亜塩素酸ナトリウム溶液の殺菌効果を比較し，実用上の観点から弱酸性電解水の殺菌効果に及ぼす要因について検討した．また，殺菌条件の設定に使用する指標菌としては実際に製造ラインに存在する状態のものと近い方が理想的である（亀井ら，1991）が，薬剤抵抗性に及ぼす芽胞側の要因を検討した報告は少ない．そこで，今回，芽胞の次亜塩素酸ナトリウム溶液に対する抵抗性に及ぼす芽胞形成条件の影響についても新知見を得たので報告する．

材料と方法

1．供試菌株

芽胞の殺菌実験には生乳から分離した *B. subtilis* B-399株，*B. cereus* B-403株，および脱脂粉乳から分離した *B. licheniformis* B-780株を用いた．

2．*Bacillus* 属細菌の10℃における生育性と芽胞の耐熱性試験

乳製品および製造ラインから分離された *Bacillus* 属細菌65株について10℃における生育性と耐熱性を調べた．10℃における生育性は，普通寒天培地平板にて30℃で1～2日間培養後のコロニー1白金耳量をトリプチケースソイブロス（TSB）［BBL 社］中に接種して10℃で2週間振とう培養した．培養後，肉眼で培養液の濁りの有無を調べ，生育性を判定した．さらに，10℃で生育性を示した菌株については，10%還元脱脂粉乳液中にその芽胞を懸濁し，ガラス管（長さ180 mm，外径8 mm，内径6 mm）に封入した．これを100℃に設定したオイルバス中で2～20分間加熱処理して生残芽胞数を測定して得られた生残曲線から D

Table 1. Composition of sporulation media.

Constituents	Amount in media (g/l)					
	TAA	AKA	NA	CNA	SMA	CSMA
Peptone	5.0[a)]	10.0[b)]	10.0[c)]	10.0[c)]	5.0[d)]	5.0[d)]
Glucose	5.0	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
Beef extract	0.0	0.0	5.0	5.0	0.0	0.0
Yeast extract	5.0	3.0	0.0	0.0	2.5	2.5
Sodium chloride	0.0	0.0	5.0	5.0	0.0	0.0
Manganese sulfate	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Dipotassium phosphate	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Calcium chloride	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0
Agar	20.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0

All the media were adjusted at pH 7.2
[a)] Proteose-peptone (DIFCO)
[b)] Gelysate (BBL) 6g + Trypticase peptone (BBL) 4g
[c)] Peptone (Eiken)
[d)] Tryptone (Eiken)

値（分）を算出した．なお，加熱処理後の生残芽胞数は，処理液を標準寒天培地平板上にスパイラルプレーターを用いて塗抹し，30℃で48時間培養して計測した．

3．芽胞液の調製方法

供試菌株を TSB に 1 白金耳接種し，80℃，10分加熱処理して芽胞を熱活性化した後，30℃で18～24時間培養した．培養液0.1ml を再度 TSB 培地に接種し，30℃で18～24時間培養後，培養液 2 ml をルー型培養ビン中の芽胞形成用寒天培地（90ml）表面に接種し，30℃で14日間培養した．芽胞形成培地には，Thermoacidurans Agar（TAA 培地）（Difco 社），AK Agar #2（AKA）培地（BBL 社），普通寒天（NA）培地（栄研化学㈱），CNA 培地（NA 培地に0.1%となるように $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ を添加），標準寒天（SMA）培地（栄研化学㈱），CSMA 培地（SMA 培地に0.1%となるように $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ を添加）を使用した（亀井ら，1991）．これらの培地組成を Table 1 に示す．なお，いずれの培地も pH は7.2±0.2に調整した．各培地で培養して調製した芽胞は培地名を冠して TAA 芽胞（TAA 培地で調製した芽胞）のように記述する．

4．イオン交換処理芽胞の調製方法

各種イオン交換処理芽胞の調製は，西原ら（1981）の方法に準じた．

（1）未処理芽胞（N 型芽胞）の調製

CSMA 培地上の菌体を滅菌水中に集菌して 3 回遠心洗浄後，菌体をろ過滅菌したリゾチーム溶液｛500 μg/ml 卵白リゾチーム（50,000 units/mg）［Sigma 社］，1/15M リン酸緩衝液（pH7.0）｝10ml 中に懸濁した．37℃で 2 時間酵素処理後，滅菌超純水で 3 回遠心洗浄し，80℃，10分加熱処理して N 型芽胞液を調製した．

（2）酸処理芽胞（H 型芽胞）の調製

N 型芽胞を10ml の0.1M クエン酸-0.2M リン酸二ナトリウム緩衝液（pH3.5）中に懸濁した．30℃，3 時間酸処理後，滅菌超純水で 3 回遠心洗浄したものを H 型芽胞とした．

（3）カルシウム，マグネシウム，マンガンイオン処理芽胞の調製

H 型芽胞を10ml の10mM 酢酸カルシウム溶液（pH6.5），10mM 酢酸マグネシウム溶液（pH6.5）および10mM 酢酸マンガン溶液（pH6.5）各々に懸濁した．60℃で 1 時間反応後，滅菌超純水で 3 回遠心洗浄したものをそれぞれカルシウム（Ca 型芽胞），マグネシウム（Mg 型芽胞）およびマンガンイオン処理芽胞（Mn 型芽胞）とした．

5．次亜塩素酸ナトリウム溶液による芽胞の殺菌試験

200ml 容滅菌三角フラスコに，滅菌水にて100ppm に調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液100ml を入れ，湯浴中で所定の温度に保持した．これに10^5cfu/ml の芽胞液 1 ml を加え，反応を開始させた．経時的に処理液 1 ml を採取し，冷却した0.1N チオ硫酸ナトリウム水溶液 4 ml 中に加えて有効塩素を中和し，反応を停止させた．標準寒天培地平板上にスパイラルプレーターを用いて接種して菌数計測を行った．培養は *B. subtilis* および *B. cereus* では30℃，48時間，*B. licheniformis* は42℃，48時間行った．供試芽胞の次亜塩素酸ナトリウムに対する抵抗性は，殺菌処理前後の芽胞数（対数値）の差で示した．なお，有効塩素濃度はヨードメトリー法にて測定した．

6．弱酸性電解水による芽胞の殺菌試験

電解水はアクアチッド NDX-250KMW（㈱オーク）を用いて調製した．本装置は無隔膜槽内において電解液共存下で水道水を電気分解し，酸性電解水（電解液：塩化ナトリウム－塩化カリウム混合溶液）と弱酸性電解水（電解液：塩化ナトリウム－希塩酸混合溶液）の両方を製造できる．本実験には，金属腐蝕性が少なく安定性の高い弱酸性電解水を用いた．本装置により，有効塩素濃度65～75ppm，pH5.5～6.5，酸化還元電位1,100～1,150mV の弱酸性電解水が生成される．電解水の有効塩素濃度はヨードメトリー法で測定した．殺菌試験は，次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた場合と同様に実施した．電解水の殺菌効果は，殺菌処理前後の芽胞数（対数値）の差，または生残曲線から算出した D 値により評価した．

7．芽胞形成期間の次亜塩素酸ナトリウム溶液抵抗性に及ぼす影響

滅菌中試験管に滅菌水および0.1N-HCl にて各種濃度および pH に調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液10 ml を分注し，湯浴中で所定温度まで加温した．達温後，CSMA 芽胞懸濁液（0.1ml）を反応系内の芽胞濃度が10^5cfu/ml となるように加え，反応を開始させた．経時的に反応液1白金耳量を採り，普通ブイヨン培地（栄研化学㈱）10ml 中に接種して培養した．培養は *B. subtilis* および *B. cereus* では30℃，*B. licheniformis* は42℃で，72時間行ない，肉眼にて培養液の濁りを調べて菌の生育を判定した．

8．芽胞中の金属含量測定

芽胞中の金属含量は ICP 発光分析法により測定した．芽胞の湿式灰化は以下の手順で行った．超純水

(日本ミリポア Milli-Q 水) にて 6N に調製した有害金属測定用塩酸 (和光純薬工業㈱) で洗浄した石英皿に芽胞液 1 ml (10^9 cfu/ml) をとり精秤した．ホットプレート (約100℃) 上で予備乾燥後，赤外線ヒーターで炭化させた．さらに，電気炉 (450℃) で 1 時間灰化して放冷後，超純水で灰化物を湿潤させた後，13N の有害金属測定用硝酸 [和光純薬工業㈱] 1 ml を添加した．ホットプレート (約100℃) 上で約20分間灰化物を溶解し，完全に乾燥させた．乾燥後，電気炉 (450℃) で約30分間完全に白くなるまで灰化させて放冷し，6N の塩酸を 2 ml 添加した．ホットプレート (約100℃) 上で約30分間灰化物を溶解後，超純水で20ml に定容したものを ICP 発光分析に供試した．検量線作成用の標準液は，原子吸光分析用標準液 (和光純薬工業㈱または関東化学㈱) のカルシウム，マグネシウム，マンガンを超純水で適宜希釈して調製した．ICP 発光分析には，ICPS-7500 SEQUENTIAL PLASMA SPECTROMETER [島津製作所㈱] を使用した．

結果と考察

1．*Bacillus* 属細菌の10℃における生育性と芽胞の耐熱性

Bacillus 属細菌の10℃における生育性と芽胞の耐熱性についての結果を Table 2 に示す．*B. licheniformis* は供試菌株全てにおいて10℃での生育性を示さなかった．供試菌株の少ない菌種はあるが，同一菌種でも10℃で生育性を示す株と示さない株があり，特に *B. sphaericus* は10℃生育株の多い菌種であった．また，10℃生育性を示した20株の100℃における D 値は1.1～3.2分の範囲に分布した．細菌芽胞の Z 値を10℃とした場合 (河端・春田，1992)，牛乳の殺菌条件の130℃，2 秒と同等の殺菌時間を100℃の場合で計算すると33分に相当する．従って，理論上は10℃生育性を示した供試菌芽胞は130℃，2 秒殺菌により十分に殺菌されることになる．しかしながら，製造ラインの蒸気殺菌 (80℃，20～30分) 程度ではこれらの芽胞は殺菌できない．低温生育性 *Bacillus* 属細菌の最低生育温度は同一菌種でも研究者によって異なる値が報告されているが，少なくとも10℃以下の牛乳中でも増殖する菌株が存在し，*B. cereus* の場合は平均で1.5℃と報告されている (Meer *et al.*, 1991)．Vaisanen *et al.* (1991) は乳製品から分離した *Bacillus* 属細菌の最低生育温度は10℃より低かったが，乳処理工場の製造環境や紙容器製造工場内の機械や原紙から分離された *Bacillus* 属細菌の場合は10℃より高く，その生育下限温度の違いは菌体の脂肪酸組成に起因することを報告している．一方，低温生育性 *Bacillus* 属細菌芽胞の耐熱性は菌株によって異なるが，90℃での D 値が5.8～6.6分，Z 値が9.4～11.0℃

Table 2. Psychrotrophic *Bacillus* strains isolated from dairy products and the D-value at 100℃.

Species	No. of strains		D-value(min) of psychrotrophic strains		
	Total	Psychrotrophic (Grown at 10℃)	Min.	Max.	Ave.
B. badius	1	1	1.12	1.12	1.12
B. brevis	2	0	NT	NT	NT
B. cereus	17	6	1.16	3.23	1.87
B. circulans	2	0	NT	NT	NT
B. coagulans	2	0	NT	NT	NT
B. firmus	1	1	ND	ND	ND
B. licheniformis	21	0	NT	NT	NT
B. megaterium	2	1	1.12	1.12	1.12
B. polymyxa	1	1	1.97	1.97	1.97
B. pumilus	6	3	1.38	1.87	1.55
B. sphaericus	8	6	1.48	3.23	2.44
B. subtilis	2	1	2.22	2.22	2.22

Psychrotrophic strains: the strains grown at 10℃ in TSB.
NT : Not Tested
ND : Not Determined

と報告されており（Meer *et al.*, 1991），本実験の供試菌株の中には，文献値より耐熱性の約5倍高い芽胞が存在した．今回の結果でも *B. licheniformis* は10℃以下に温度管理されていれば製造工程や流通段階で増殖する可能性は低いと考えられる．しかし，本菌は粉乳中や生乳中からの分離頻度も高く（上門ら，投稿中），クリーム分離工程や濃縮工程およびヨーグルトの製造工程において増殖可能な温度帯があるため，本菌の制御は必要であると思われた．以上より，10℃発育性を示す *Bacillus* 属細菌の耐熱性は低いことから，殺菌を確実に行い，殺菌後の二次汚染に注意することが衛生管理上必要であると考えられる．一方，生育上限が10℃より高い細菌は，製造工程の中に増殖可能な温度帯があるため，ラインの洗浄・殺菌により工程内の菌数を可能な限り低く維持することが必要と考えられた．

2．次亜塩素酸ナトリウム抵抗性に及ぼす芽胞形成条件と交換性カルシウムの影響

（1）芽胞形成培地の影響

芽胞形成培地の違いが次亜塩素酸ナトリウム抵抗性に与える影響について検討した．供試芽胞として生乳および粉乳から分離された *B. subtilis*, *B. cereus*, および *B. licheniformis* 芽胞を用いた．Table 3 に示すように，3菌種のなかでは *B. subtilis* の次亜塩素酸ナトリウム抵抗性が最も高かった．芽胞形成培地による抵抗性の違いは菌種によって異なり，*B. licheniformis* は TAA 芽胞で最も抵抗性が高く，NA 芽胞で最も低かった．*B. subtilis* は AKA 芽胞の抵抗性が最も高く，TAA 芽胞は低かった．*B. cereus* は *B. subtilis* と同様に AKA 芽胞が高い次亜塩素酸ナトリウム抵抗性を示し，TAA 芽胞が最も低かった．カルシウム添加による抵抗性の違いを SMA と CSMA ならびに NA と CNA 間で比較した場合，*B. licheniformis* の NA 芽胞のみ抵抗性が明らかに高かった．

（2）交換性の2価金属イオンの影響

前項の結果より，NA 培地および SMA 培地にカルシウムを添加した培地で芽胞形成させると *B. licheniformis* では芽胞の次亜塩素酸ナトリウム抵抗性が上昇した．芽胞形成培地に含まれる2価の金属イオンは，菌種によって耐熱性に与える影響が異なり，マンガンイオンは *B. coagulans* 芽胞の耐熱性を著しく高めるが，*B. megaterium* に対しては逆に低下させたとの報告がある（蜂須賀，1988）．また，交換性のカルシウム，マグネシウムおよびマンガンイオンなどの二価の金属イオンが芽胞の耐熱性に関与していることも報告されている（蜂須賀，1988）．そこで，次に次亜塩素酸ナトリウム抵抗性と交換性の2価金属イオンとの関連性について検討した．Table 4 に示すように N 型芽胞を H 型芽胞に変換した場合，*B. cereus* の4分後の生残芽胞数は N 型芽胞と比べて低く，抵抗性が弱まったが，逆に *B. licheniformis* と *B. subtilis* の抵抗性は増大した．金属含量測定結果より，酸処理後には *B. cereus* のマグネシウム含量のみ変化せず，カルシウムおよびマンガン含量は低下した．H 型芽胞の陽イオン交換処理により得られた Ca 型芽胞は全菌種で H 型より抵抗性が上昇した．*B. cereus* の Ca 型芽胞の抵抗性は N 型芽胞と同程度であったが，*B. licheniformis* および *B. subtilis* の Ca 型芽胞では N 型以上に抵抗性が上昇した．このときのカルシウム含量は *B. subtilis* の場合 N 型

Table 3. NaClO resistance of *Bacillus* spores sporulated in various media.

Sporulation media	N log reduction (log CFU/ml)		
	B. licheniformis 100ppm·50℃	*B. subtilis* 100ppm·50℃	*B. cereus* 100ppm·40℃
TAA	1.46	0.84	>4.98
CNA	2.92	0.39	1.24
CSMA	3.23	0.79	2.44
AKA	3.54	0.06	0.69
NA	>5.88	0.50	1.23
SMA	3.51	0.61	2.00

N log reduction: log (initial spore counts) −log (spore counts after treatment for 4 min)

Table 4. Amounts of metal ions in various types of spores and the susceptibility of the spore to NaClO.

Strains	Type of spore	Content (μmol/10^9 spores)			N log reduction (log CFU/ml)[b] after 100ppm NaClO
		Mg	Ca	Mn	
B. licheniformis B-780	N[a]	0.0463	1.1142	0.0008	3.23
	H	0.0202	0.4312	0.0004	2.38
	Ca	0.0217	0.4107	0.0004	1.43
	Mg	0.0358	0.4148	0.0005	1.85
	Mn	0.0263	0.4260	0.0332	2.40
B. cereus B-403	N[a]	0.1948	2.9947	0.0025	2.44
	H	0.1953	1.7479	0.0015	3.36
	Ca	0.2592	0.8284	0.0001	2.43
	Mg	0.2216	1.0618	0.0017	2.28
	Mn	0.1480	1.1268	0.3788	>4.83
B. subtilis B-399	N[a]	0.1745	0.9893	0.0018	0.79
	H	0.0550	0.5597	0.0011	0.44
	Ca	0.0763	1.1932	0.0017	0.35
	Mg	0.1161	0.4315	0.0026	0.34
	Mn	0.0618	0.7253	0.2209	1.18

[a] N - spores of each strains were prepared with CSMA.
[b] N log reduction : log(initial spore counts) −log(spore counts after treatment for 4 min)
Temperature of NaClO treatment: 50℃ for B-780, 40℃ for B-403, 50℃ for B-399

芽胞と同程度であったが，*B. licheniformis* では回復しなかった．よって，*B. subtilis* の次亜塩素酸ナトリウム抵抗性は交換性のカルシウムと関係があるが，*B. licheniformis* と *B. cereus* では関係は低いと考えられた．H 型芽胞のマグネシウムイオン処理により，マグネシウム含量は H 型芽胞より高くなったが，*B. cereus* 以外では N 型芽胞の含量まで回復しなかった．Mg 型芽胞の抵抗性は *B. subtilis* 以外は H 型芽胞より高くなり，特に *B. licheniformis* では N 型芽胞より高くなった．交換性のマグネシウムイオンも菌種によっては次亜塩素酸ナトリウム抵抗性を高めることが確認された．これに対して，マンガンイオンは最も交換率の高い金属イオンで，H 型から Mn 型に交換した場合，*B. licheniformis* の抵抗性は変化しなかったが，*B. cereus* と *B. subtilis* の抵抗性は低下した．特に *B. cereus* は 4 分間の接触により生残芽胞数が大幅に減少した．本実験により，交換性のマンガンイオンは菌種によっては酸処理以上に次亜塩素酸ナトリウム抵抗性を弱めることが明らかになった．イオン交換型芽胞の各種薬剤に対する抵抗性は，薬剤や金属イオンの種類によって異なることが報告されているが（Tawaratani *et al.*, 1987），さらに殺菌の対象となる菌種によっても薬剤抵抗性が異なることが本研究により明らかとなった．牛乳中には 2 価の金属イオンとしてカルシウムとマグネシウムが多い．マンガンは初乳中には多く含まれるが，常乳期には急激に低下すると言われている（足立・伊藤，1987）．よって，製造ライン中に存在する芽胞の次亜塩素酸ナトリウム抵抗性が乳中のマンガンによって左右される可能性は低いと考えられる．芽胞形成培地についての検討において，AKA 培地中のマンガンは菌種によっては次亜塩素酸ナトリウム抵抗性を強める傾向を示したが，本結果では交換性のマンガンイオンは次亜塩素酸ナトリウム抵抗性を大幅に低下させた．今回の実験では CSMA 培地で調製した芽胞を用いて交換性イオンの影響を調べたが，芽胞の抵抗性には芽胞形成培地の影響も大きいと思われるので，この交換性マンガンイオンの芽胞の抵抗性への関与については，今後，AKA 培地で調製した芽胞を用いて調べる必要があると考えられる．

(3) 芽胞形成期間の影響

B. subtilis, *B. cereus* および *B. licheniformis* 芽胞の次亜塩素酸ナトリウム抵抗性に及ぼす芽胞形成期間の影響を調べた結果を Table 5 に示す．*B.*

Table 5. Effect of sporulation periods on the resistance of spores to NaClO.

Strains	NaClO A.C.(ppm)[a]	pH	Reaction temperature			
			30℃		40℃	
			Sporulation periods		Sporulation periods	
			5d	17d	5d	17d
B. licheniformis B-780	180	9.6	10<[b]	10<	10<	10<
	60	9.0	10<	10<	10<	10<
	60	7.0	5	5	2	5
B. cereus B-403	180	9.6	10<	10<	10	10
	60	9.0	10	10	10	10
	60	7.0	<2	<2	<2	<2
B. subtilis B-399	180	9.6	10<	10<	10<	10<
	60	9.0	10<	10<	10<	10<
	60	7.0	10	5	5	2

[a] A.C.: available chlorine
[b] Values in table indicate the time (min) needed for killing the spores by NaClO treatment.

Table 6. Sporicidal effects of NaClO and LAEW[a]

Sanitizer	A.C.[b] (ppm)	Temp. (℃)	N log reduction (log CFU/ml)[c]		
			B. licheniformis	*B. subtilis*	*B. cereus*
NaClO	100	40	0.00	0.48	2.00
		50	2.23	1.32	>5.98
LAEW[a]	20	20	0.00	0.08	0.00
		40	0.13	0.00	1.35
		50	2.79	1.80	>5.86

[a] LAEW : low-acidic electrolyzed oxidizing water
[b] A.C.: available chlorine,
[c] N log reduction : log(initial counts) −log(counts after treatment for 4 min)

licheniformis および *B. cereus* は，芽胞形成期間の違いによって殺菌時間に大差はなかった．一方，*B. subtilis* では芽胞形成期間が5日より17日間の方が短時間で殺菌される傾向があり，長期間の培養により次亜塩素酸ナトリウム抵抗性が弱まる傾向が認められた．*B. subtilis* 芽胞は長期間の芽胞形成によって芽胞表層部の構造が変化し，次亜塩素酸ナトリウム感受性が増大したものと推察された．以上より，実験に使用する芽胞の芽胞形成期間は1週間程度が適当と考えられた．

3．弱酸性電解水による *Bacillus* 属細菌芽胞の殺菌方法とその殺菌効果に及ぼす要因

(1) 次亜塩素酸ナトリウム溶液と弱酸性電解水との殺菌効果の比較

畜肉エキススープから分離された *Bacillus* 属細菌芽胞（中山ら，2003a）および小型球形ウイルス（SRSV）に対する酸性電解水の殺菌効果（川崎ら，2003）は，いずれの場合も次亜塩素酸ナトリウム溶液より高いことが報告されている．そこで，*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* 芽胞に対する殺菌効果を次亜塩素酸ナトリウム溶液と弱酸性電解水とで比較した（Table 6）．最も殺菌効果の高く現れた菌種

は *B. cereus* であり，次いで *B. licheniformis*, *B. subtilis* の順であった．同じ反応温度で比較すると，20ppm 弱酸性電解水の殺菌効果は100ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液の効果よりやや高かった．したがって，弱酸性電解水は細菌芽胞に対して次亜塩素酸ナトリウムの1/5程度の有効塩素濃度でも同等以上の殺菌効果を示すことが示唆された．

(2) pH の影響

製造現場において，酸性電解水の目的とするレベルの殺菌効果を安定的に発揮させるには，殺菌効果に影響する要因を明らかにする必要がある．そこで，殺菌効果に及ぼす pH と有機物（乳成分）の影響を検討した．まず，溶液の pH の影響を調べるために，電解水と次亜塩素酸ナトリウム溶液を0.1N 塩酸または0.1N 水酸化ナトリウム溶液により pH 2～8に調整した．指標菌には *B. subtilis* B-399芽胞を用い，殺菌効果を D 値で示した．この結果を Fig. 1に示す．次亜塩素酸ナトリウム溶液，電解水ともに酸性側では D 値が低く，殺菌効果は高かった．pH が7よりアルカリ側になると D 値が急激に上昇し，殺菌効果の低下が認められた．この現象は土井らの報告（土井，2002）とも一致した．次亜塩素酸（HOCl）はアルカリ側になる程解離しやすく，殺菌力の低い次亜塩素酸イオン（ClO^-）に変化することから，電解水の高い殺菌効果は次亜塩素酸に由来すると考えられている．殺菌力の高い次亜塩素酸（HOCl）の存在比率は pH 5付近が最も高く（土井，2002），弱酸性電解水の pH が5～6.5の範囲と規定されていることからも，現場における殺菌時の pH の管理はきわめて重要と考えられる．

(3) 有機物の影響

弱酸性電解水の殺菌効果に及ぼす乳固形分の影響を検討した結果，乳固形分量の増加に伴い有効塩素濃度は緩やかに低下し，0.06%以上になると殺菌効果は急激に低下した（Fig. 2）．さらに，乳成分の組成の影響を調べるために，弱酸性電解水中に脱脂粉乳，全脂粉乳およびクリームを乳固形分量として0.07%になるように加え，*B. subtilis* 芽胞に対する殺菌効果を調べた．その結果を Fig. 3に示す．弱酸性電解水に脱脂粉乳を加えた場合，生残芽胞数の低下は少なかったが，クリームを加えた場合には無添加と同様に低下した．以上の結果より，乳脂肪は弱酸性電解水の殺菌効果に影響せず，カゼインタンパク質は殺菌力を低下させることが示唆された．従って，製造現場で弱酸性電解水を使用する場合は，他の薬剤と同様に有機物を除去してから使用することが必要であると考えられる．例えば，パイプラインの殺菌に使用する場合は，ラインをアルカリ洗剤等で洗浄後，最終すすぎ水の吸光度あるいは有機炭素量などをモニタリングし（森ら，2001），乳固形分量が基準値（例えば0.05%）以下であることを確認した上で弱酸性電解水を使用する必要があると考えられる．本研究の殺菌試験は，溶液中に浮遊した芽胞に対して行った試験である．製造環境中の微生物は設備表面にバイオフィルムを形成して棲息し，菌体が有機物によって囲まれているため，浮遊状態の菌に比べて熱や殺菌剤に抵抗力があると言われている（Zottola and Sasahara, 1994）．このような

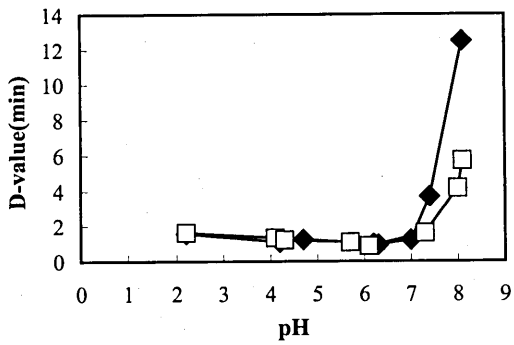

Fig. 1. Effects of pH on the sporicidal action of NaClO and low acidic electrolyzed oxidizing water to the *B. subtilis* B-399 spore. Symbols: □, NaClO; ◆, low acidic electrolyzed oxidizing water

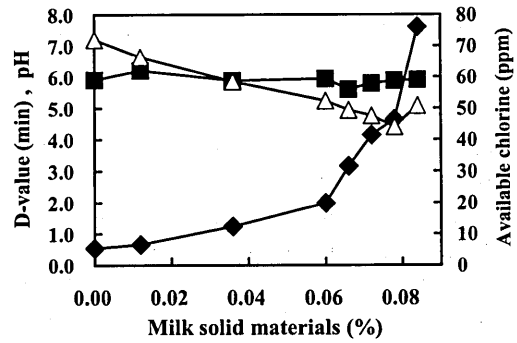

Fig. 2. Effects of milk solid materials on the sporicidal action of low-acidic electrolyzed oxidizing water. Symbols: ◆, D-value; △, available chlorine; ■, pH

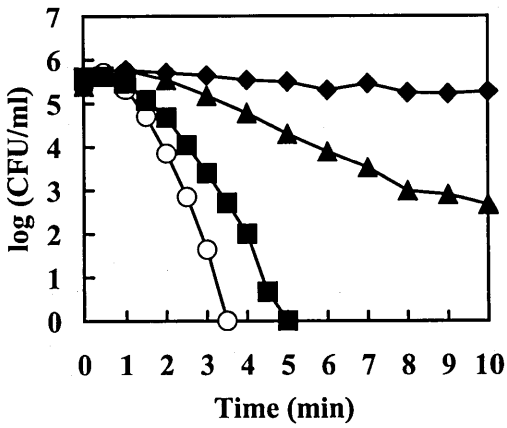

Fig. 3. Sporicidal effects of low-acidic electrolyzed oxidizing water on *B. subtilis* B-399 spore in the presence of various milk components.
Symbols: ○, control; ■, cream; ▲, whole dry milk; ◆, non-fat dry milk

食品加工設備のバイオフィルム細菌に対する実用的な制御法については，今後の検討課題と思われる．

要　　約

乳製品由来の *Bacillus* 属細菌のうち，10℃での生育能を有する菌株の耐熱性は100℃でのD値が1.1～3.2分の範囲内であったことから，120～130℃，2秒のUHT殺菌で殺菌されると考えられた．生乳や粉乳から高頻度に検出された *B. licheniformis* は10℃で生育しなかった．

B. subtilis, *B. cereus* および *B. licheniformis* 芽胞の次亜塩素酸ナトリウムに対する抵抗性は，耐熱性の場合と同様に芽胞形成に使用する培地の種類により影響を受けた．カルシウム添加の影響を調べた結果，*B. licheniformis* を普通寒天培地にカルシウムを添加した培地上で芽胞形成させた場合にのみ次亜塩素酸ナトリウム抵抗性が高くなった．また，AKA培地で形成された *B. cereus* および *B. subtilis* 芽胞では，次亜塩素酸ナトリウム抵抗性が高かった．芽胞中の交換性陽イオン含量の次亜塩素酸ナトリウム抵抗性に与える影響も，2価陽イオンの種類によって異なった．交換性のカルシウムイオンは *B. subtilis* 芽胞の次亜塩素酸ナトリウム抵抗性を，マグネシウムイオンは *B. licheniformis* 芽胞の抵抗性をそれぞれ高めることが認められた．マンガンイオンと交換した場合には3菌種ともに次亜塩素酸ナトリウム抵抗性が低下し，特に *B. cereus* において低下が著しかった．*B. subtilis* 芽胞は長期間の芽胞形成によって次亜塩素酸ナトリウムに対する抵抗力が弱まる傾向が認められた．有効塩素濃度20ppmの弱酸性電解水は，*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* 芽胞に対して100ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液と同等以上の殺菌効果を示した．弱酸性電解水の殺菌効果は *B. cereus* 芽胞に対して最も高く，40℃および50℃では4分間の接触により，それぞれ1.35 log CFU/ml および>5.86 log CFU/ml の芽胞数低減効果が認められた．弱酸性電解水の殺菌効果の本体は次亜塩素酸であり，pHが7以上になると *B. subtilis* 芽胞に対する殺菌効果が著しく低下した．さらに，有機物として乳固形分が0.06%以上では弱酸性電解水の殺菌効果は急激に低下した．

文　　献

足立　達・伊藤敞敏　1987　乳とその加工．建帛社，東京，p.90

土井豊彦　2002　微酸性次亜塩素酸水の機能と食品への利用．防菌防黴，**30**(12)：813-819

蜂須賀養悦　1988　芽胞学—芽胞をめぐる形態学と生物学—．東海大学出版会，東京，p.173

上門英明・伊藤晶子・杉本泰子・鈴木敦子・辻本義憲・遠藤光春・松永恵美子・宮本敬久・飯尾雅嘉　2003　生乳および粉乳類のマイクロフローラの特徴．防菌防黴，投稿中

亀井俊郎・中山欣右・中井芳江・佐藤　順・野田勝彦　1984　生乳中の *Bacillus* 属細菌胞子の分布．缶詰時報，**67**(3)：282-285

亀井俊郎・中井芳江・佐藤　順・夏目朱美・杉本泰子・野田勝彦　1988　生乳由来 *Bacillus sphaericus* 胞子に対する水酸化ナトリウム，硝酸および過酸化水素の殺菌効果．防菌防黴，**16**(9)：411-418

亀井俊郎・上門英明・金子京子・中井芳江・中山欣右・佐藤　順　1991　生乳から分離された *B. subtilis* と *B. cereus* 胞子の耐熱性に及ぼす胞子形成培地の影響．防菌防黴，**19**(2)：61-66

川崎　晋・川崎友美・林　志直・吉田恭一郎・五十部誠一郎・一色賢司　2003　酸性電解水によるノーウォーク様ウィルス（NLV；Norwalk-like viruses）の不活性化．防菌防黴，**31**(10)：529-535

河端俊治・春田三佐夫　1992　HACCPこれからの食品工場の自主衛生管理．中央法規出版㈱，東京，p.152

Meer, R. R., J. Baker, F. W. Bodyfelt and M. W. Griffiths 1991 Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review, *J.*

Food Protect., **54**(12) : 969-979
森 信二・田中 孝・豊田 活・遠藤光春 2001 乳業工場の洗浄における管理ポイント. 乳業技術, **51** : 45-57
中山素一・藤本章人・樋口 彰・渡辺 誠・飯尾雅嘉・宮本敬久 2003a 微酸性次亜塩素酸水の *Bacillus* 属細菌芽胞及び乳酸球菌に対する効果と特性. 防菌防黴, **31**(8) :421-425
中山素一・藤本章人・樋口 彰・渡辺 誠・貞苅季代子・飯尾雅嘉・宮本敬久 2003b 畜肉エキススープから分離された *Bacillus* 属の頻度と保存中の変化. 防菌防黴, **31**(9) : 473-478
西原 力・加納佳枝・打田良樹・近藤正臣 1981 細菌芽胞殻に関する研究 (10) *Bacillus megaterium* 芽胞殻の陽イオンの発芽における役割について. 日細菌誌, **36** : 767-774
Tawaratani, T., Y. Yamano and I. Shibasaki 1987 Resistance of cation-exchanged *Bacillus subtilis* var. niger spores to antibacterial agents and their germination property, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **15**(6) : 273-280
Vaisanen, O. M., N. J. Mwaisumo and M. S. Salkinoja-Salonen 1991 Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis, *J. Appl. Bacteriol.*, **70** : 315-324
Zottola, E. A., K. C. Sasahara 1994 Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.*, **23** : 125-148

Summary

Some strains of *Bacillus* spp. isolated from dairy products grew at 10℃. The D-value at 100℃ of the spores of psychrotrophic *Bacillus* strains ranged from 1.1 to 3.2 min, suggesting that the spores of the psychrotrophic *Bacillus* are killed by UHT heating at 120 to 130℃ for 2 sec. *B. licheniformis* strains isolated from raw milk and powdered milk did not grow at 10℃.

The components of sporulation media affected the resistance of *B. subtilis*, *B. cereus* and *B. licheniformis* spores to sodium hypochlorite(NaClO). Only *B. licheniformis* spores formed by the cultivation on the nutrient agar supplemented with 0.1% $CaCl_2$ largely increased the resistance against NaClO. *B. cereus* and *B. subtilis* spores formed on AKagar showed high resistance against NaClO. The resistance of cation-exchanged spores against NaClO was dependent on the kinds of exchanged divalent cation. The Ca and Mg ion treatments increased the resistance of *B. subtilis* and *B. licheniformis* spores against NaClO, respectively. Conversion of spores of *B. licheniformis*, *B. cereus* and *B. subtilis* to Mn-spores, especially in *B. cereus* spores, resulted in the decrease of the resistance against NaClO. The resistance of *B. subtilis* spores against NaClO was decreased by the prolonged incubation (17 days) for sporulation.

The sporicidal effect of low-acidic electrolyzed oxidizing water (LAEW, pH5.5~6.5) with 20 ppm of available chlorine (A.C.) on spores of *B. licheniformis*, *B. cereus* and *B. subtilis* was higher than that of 100 ppm NaClO. *B. cereus* spores were most susceptible to LAEW. The *B. cereus* spores reduced viability by 1.35 log CFU/ml and >5.86 log CFU/ml after LAEW treatment for 4 min at 40 and 50℃, respectively. The sporicidal activity of LAEW to *B. subtilis* spores decreased drastically at pH higher than 7.0 and in the presence of 0.06% milk solid materials. Hypochlorous acid (HClO) in LAEW seemed to be a main factor for the sporicidal action of LAEW.