

次亜塩素酸ナトリウム溶液で前処理した *Paenibacillus* sp. 芽胞の耐熱性

小林 哲也

Thermal Resistance of *Paenibacillus* sp. Strain No.1
Spores Pretreated with Sodium Hypochlorite Solution

Tetsuya Kobayashi

In this study, the effects of pretreatment with sodium hypochlorite solution on the thermal resistance of spores of the *Paenibacillus* sp. strain No. 1 were investigated. While heating at 95°C for 15 minutes resulted in an approximately 2.5-log reduction in viability of spores pretreated with a pH 10 solution, the corresponding value was approximately 4.0 log reduction pretreated with solutions at pH 6 and 8. The concentration of hypochlorous acid in the sodium hypochlorite solution used for pretreatment affected spore thermostability. These results indicated that pretreatment with a solution adjusted to a pH range in which hypochlorous acid is dominant is effective in reducing the thermal resistance of bacterial spores, and that pretreatment with sodium hypochlorite solution supports bacterial spore control.

次亜塩素酸ナトリウムは、食品製造現場において、原材料や器具類、周辺環境などの洗浄、殺菌に広く使用される殺菌剤である。その殺菌スペクトルは広く、細菌の栄養細胞やウイルス、多くの細菌の芽胞や真菌類に対して作用することが知られている¹⁾。一方、固体表面に付着した微生物を洗浄、殺菌する際には、浮遊微生物を対象としたときよりも殺菌効果が低減することも知られており、その対策として、次亜塩素酸ナトリウムの効果を高める様々な方法が提唱されてきた²⁾。

次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄、殺菌方法に関する技術開発が進む一方、洗浄後に生残した微生物の性状に着目することも重要と言われている²⁾。亜致死濃度の次亜塩素酸ナトリウムで処理した大腸菌などは、菌体機能に何らかの損傷を受けていることが報告されている³⁾。

一般的に、損傷菌は非損傷菌と比較すると種々のストレスに対する感受性が高まる⁴⁾ことから、この特性を利用した微生物制御によって食品の保存性向上が検討さ

れてきた⁵⁾。

保存性向上が期待される食品の一つに10°C以下で保存、流通する冷蔵食品が挙げられる。冷蔵食品を変敗させる微生物は、10°C以下でも発育できる細菌や真菌類である。このうち、細菌の栄養細胞や多くの真菌類は加熱殺菌で十分に死滅するが、細菌芽胞は耐熱性が高く、殺菌が困難である。10°C以下でも発育する低温性の細菌芽胞を10D殺菌するための加熱条件 ($F_{100^\circ\text{C}}$) は、40分と報告されている⁶⁾。高品質を特徴とした冷蔵食品においては、殺菌時の加熱による品質への影響を最小限に留めるため、より低温、短時間での加熱殺菌が好ましい。これらのことから、次亜塩素酸ナトリウムによって細菌芽胞の発芽機能や耐熱性機能に損傷が生じれば、高温、長時間の加熱殺菌に依存しない制御が期待できる。

そこで本研究では、次亜塩素酸ナトリウム溶液による洗浄殺菌後に生残した細菌芽胞を想定し、次亜塩素酸ナトリウム溶液で前処理した細菌芽胞の耐熱性を評価した。

1. 実験方法

(1) 供試菌株と芽胞懸濁液の調製

供試菌株には、道内企業の製造するホワイトアスパラガス水煮（要冷蔵、賞味期限約1ヶ月）から分離した *Paenibacillus* sp. No. 1 株⁷⁾ を用いた。

供試菌株を普通液体培地（栄研化学）に接種し、30°Cで24時間培養した。この培養液を普通液体培地に1.5% (w/v) 寒天（細菌用、和光純薬）を加えた普通寒天培地に塗抹し、30°Cで10日間程度培養し、芽胞を形成させた。微分干涉顕微鏡にて十分に芽胞を形成したことを確認した後、滅菌蒸留水で回収し、遠心分離（2 000×g, 10分間, 5回）により夾雑物を除いて芽胞懸濁液（約8 log spore/mL）とした。

(2) *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の次亜塩素酸ナトリウム溶液処理

加熱活性化（75°C, 15分間）した芽胞懸濁液0.15mLを集菌（10 000×g, 5°C, 2分間）し、上清を除いた後に次亜塩素酸ナトリウム溶液0.5mLで再懸濁した。水浴にて15°C, 10分間処理した後、直ちに1%チオ硫酸ナトリウム溶液を0.5mL加え有効塩素を失活させた。なお、供試した次亜塩素酸ナトリウム溶液には、遊離有効塩素（以下、FAC）濃度15～270mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウム溶液（化学用、和光純薬）を希釈し、5N塩酸もしくは5N水酸化ナトリウムでpH 6, 8, 10に調整したものをを用いた。また、FAC濃度はハンディ水

事業名：職員研究奨励事業（シーズ探索型）

課題名：農産物チルド食品のロングライフ化に向けた微生物制御技術に関する研究

質計 (AQ-202, 柴田科学) にて測定した。

(3) *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の耐熱性測定

芽胞の耐熱性は、TDTチューブ法で測定した⁸⁾。次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した芽胞は、集菌洗浄 (10 000×g, 5℃, 2分間, 2回) した後、0.85M塩化ナトリウムおよび0.08Mショ糖を添加したクエン酸緩衝液 (pH 4.0) 3 mLで再懸濁した。この芽胞懸濁液0.5mLをTDTチューブ (9×110mm, 岩田硝子工業) に溶封し、オイルバスにて95℃で15分間加熱した。処理後は直ちに氷冷し、生残芽胞数を測定した。なお、芽胞数の測定は標準寒天培地 (日水製薬) を用いた表面塗抹培養法 (30℃, 3日間) にて行った。

2. 実験結果および考察

次亜塩素酸ナトリウム溶液で15℃, 10分間処理した *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞を95℃, 15分間加熱した時の生残率を図1に示した。滅菌蒸留水 (FAC濃度0mg/L) で処理した場合には、加熱によって芽胞数が2.6 log減少した。pH 6の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (FAC濃度15, 30および45mg/L) で処理した場合、芽胞数がそれぞれ2.8, 3.2および4.0 log減少した。pH 8の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (FAC濃度60, 90および120mg/L) で処理した場合には、芽胞数がそれぞれ2.5, 3.3, 3.9 log減少した。pH 10の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (FAC濃度90, 180および270mg/L) で処理した場合には、芽胞数がいずれも2.4 log減少した。

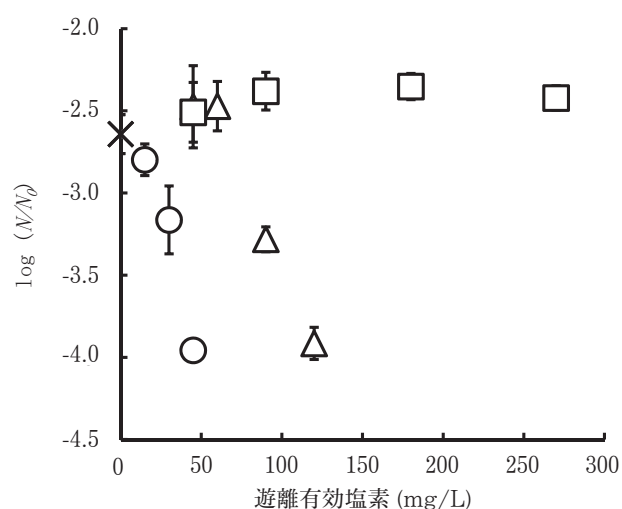


図1. *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の耐熱性に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液前処理の影響

シンボルはそれぞれ滅菌蒸留水 (×), pH 6 (○), pH 8 (△), pH 10の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (□) で前処理したときの結果を示す。NとN₀はそれぞれ95℃, 15分間の加熱処理前後の生残芽胞数を示す。

前処理を行っていない芽胞を95℃, 15分間加熱した場合には、芽胞数が2.5 log減少した (データ未記載)。滅菌蒸留水処理やpH 10の次亜塩素酸ナトリウム溶液処理した芽胞を加熱した場合の芽胞数の減少は、それぞれ2.6, 2.4 logであり、上記と同程度であったことから、これらの処理は *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の耐熱性には影響しないことが推察された。一方、pH 6 および 8 の次亜塩素酸ナトリウム溶液処理では、FAC濃度依存的に加熱による殺菌芽胞数が増加した。このことから、特定のpHにおける次亜塩素酸ナトリウム溶液処理は、 *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の耐熱性を低下させることが推察された。また、pH 6 の次亜塩素酸ナトリウム溶液で前処理した方が、低濃度のFACで芽胞の死滅が増加したことから、芽胞の耐熱性低下に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液の影響は、酸性側で強くなることが推察された。

次亜塩素酸ナトリウムは、水溶液中では主に次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンとして存在している。次亜塩素酸は、 $pK_a=7.6$ (15℃) の弱酸であるため⁹⁾, pH 6, 8 および10の次亜塩素酸ナトリウム溶液における次亜塩素酸の存在比率は、それぞれ97.5, 28.5および0.4%である。 *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の耐熱性の低下は、前処理に用いた次亜塩素酸ナトリウム溶液のpHが低いほど、低濃度のFACでも効果が得られた。そこで、FAC中の次亜塩素酸濃度と加熱処理後の *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の生残率との関係を図2に示した。耐熱性低下作

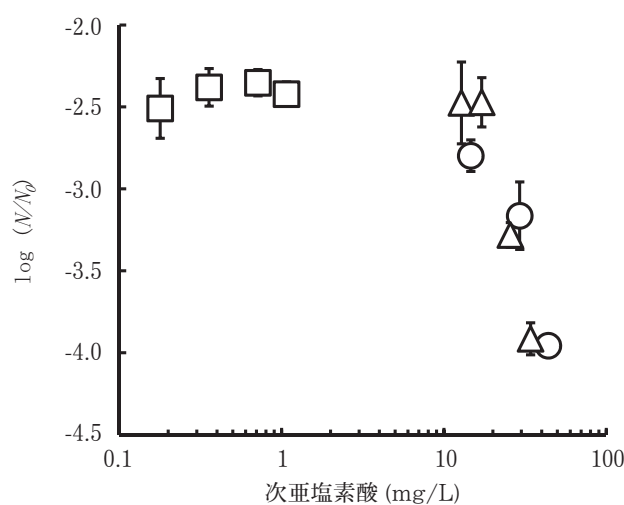


図2. 次亜塩素酸ナトリウム溶液前処理した *Paenibacillus* sp. No. 1 株芽胞の耐熱性低下における次亜塩素酸の影響

シンボルはそれぞれpH 6 (○), pH 8 (△), pH 10の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (□) で前処理したときの結果を示す。NとN₀はそれぞれ95℃, 15分間の加熱処理前後の生残芽胞数を示す。

用が全く見られなかったpH 10の次亜塩素酸ナトリウム溶液では、FACのほとんどは解離型の次亜塩素酸イオンとして存在しており、非解離型の次亜塩素酸は、最大でも約1 mg/L程度であった。一方、pH 6および8の次亜塩素酸ナトリウム溶液では、次亜塩素酸が約10～40mg/L程度存在しており、この間で濃度依存的に芽胞の生残率が低下していることが明らかになった。これらのことから、次亜塩素酸ナトリウム溶液による前処理で生じる*Paenibacillus* sp. No. 1株芽胞の耐熱性低下は、次亜塩素酸の作用が主因であることが示唆された。

次亜塩素酸および次亜塩素酸イオンの細菌に対する作用特性は、その構造に依存する¹⁰⁾。解離型である次亜塩素酸イオンは、リン脂質で構成される疎水性の細胞膜を透過できず、細胞表層への作用に留まる。一方、非解離型である次亜塩素酸は、細胞膜を通過し、菌体内部に作用する。そのため、次亜塩素酸の殺菌効果は次亜塩素酸イオンよりも大きく、低濃度で効果を示す。この傾向は細菌芽胞に対しても同様で、pH 6および9の次亜塩素酸ナトリウム溶液の殺菌効果を比較すると、次亜塩素酸の存在比率が高くなるpH 6の次亜塩素酸ナトリウム溶液の方が細菌芽胞に対して高い殺菌効果を示す¹¹⁾。本研究において、pH 6の次亜塩素酸ナトリウム溶液（FAC濃度15, 30および45mg/L）で処理した後の芽胞数は、それぞれ6.7, 6.5, 6.3 log spore/mL、pH 8（FAC濃度60, 90および120mg/L）では、それぞれ6.5, 6.6, 6.2 log spore/mL、pH 10（FAC濃度90, 180および270mg/L）では、それぞれ6.5, 6.5, 6.7 log spore/mL、滅菌蒸留水処理（FAC濃度0mg/L）では、6.7 log spore/mLであった。すなわち、本研究の前処理条件は、*Paenibacillus* sp. No. 1株芽胞に対して、ほとんど殺菌効果を示さない。しかし、加熱による生残芽胞数の減少が顕著であった前処理（pH 6, FAC濃度45mg/LおよびpH 8, FAC濃度120mg/Lの次亜塩素酸ナトリウム溶液処理）では、加熱による減少がほとんどなかった前処理よりも、前処理後の生残芽胞数が0.5 logほど減少した。このことから、生残芽胞は何らかの損傷を受けていると推察された。筆者らは、これまでにpH 4～6に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液で好熱性好酸性菌芽胞細菌芽胞を処理すると、加熱により大幅に生残芽胞数が低下することを報告している⁸⁾。この際にも、加熱により生残芽胞数が大幅に減少したpH 4～6の次亜塩素酸ナトリウム溶液前処理区では、前処理後に生残芽胞数が0.6 log程度減少している。Cortezzoら¹²⁾は、次亜塩素酸ナトリウム溶液前処理が*Bacillus subtilis* PS533株芽胞の内膜を損傷させ、

熱感受性を低下させることを報告している。このようなことから、本研究においても、*Paenibacillus* sp. No. 1株芽胞は次亜塩素酸による損傷を受け、加熱による影響を受けやすくなったと推察された。

次亜塩素酸は、pHを酸性に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液だけでなく、弱酸性電解水や微酸性電解水にも高い比率で存在する。このような殺菌料を原材料の洗浄殺菌に用いれば、細菌芽胞を完全に殺菌することは難しくても生残した細菌芽胞は損傷を受けており、その後の工程で容易に加熱殺菌できると推察される。特に、10℃以下でも発育できる細菌芽胞に対して効果が得られたことから、温和な加熱殺菌条件が求められる冷蔵食品における細菌芽胞の制御に関する研究の一つの手がかりとなり得る。

3. 要 約

Paenibacillus sp. No. 1株芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液による前処理は、芽胞の耐熱性を低下させた。この効果は、アルカリ性よりも酸性の次亜塩素酸ナトリウム溶液で前処理した場合に大きくなったことから、酸性域（pH 4～6）で存在比率が大きくなる次亜塩素酸が主因であることが示唆された。また、次亜塩素酸ナトリウム溶液前処理前後で生残芽胞数に大きな変化はなかったことから、生残した芽胞の多くは、耐熱性が低下する程度の損傷が生じていることが推察された。

文 献

- 1) 藤上朝生 (2005), 食料および工場環境殺菌剤, 現場必携・微生物殺菌実用データ集, 山本茂貴編, サイエンスフォーラム, 東京, pp.113-121.
- 2) 福崎智司 (2014), 野菜の洗浄・殺菌の最新技術と見落としがちな盲点, 日本食品微生物学会誌, **31**, 76-81.
- 3) Tandon P., Chhibber S. and Reed R. H. (2007), The enumeration of chlorine-injured *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* is enhanced under conditions where reactive oxygen species are neutralized, *Lett. Appl. Microbiol.*, **44**, 73-78.
- 4) 土戸哲明 (2003), 殺菌プロセスにおいて発生する損傷菌の特性, 日本食品微生物学会誌, **20**, 141-149.
- 5) Zhao W., Yang R. and Wang M. (2009), Cold storage temperature following pulsed electric fields treatment to inactivate sublethally injured

- microorganisms and extend the shelf life of green tea infusions, *Int. J. Food Microbiol.*, **129**, 204-208.
- 6) 松田典彦 (1985), チルド食品と低温殺菌, 食品と低温, **11**, 31-37.
- 7) 小林哲也, 八十川大輔, 中川良二, 川上 誠 (2016), 農産物チルド食品から分離した低温性細菌芽胞の発育特性と耐熱性, 日本防菌防黴学会誌, **44**, 509-514.
- 8) 小林哲也, 青山好男 (2014), 次亜塩素酸ナトリウムで前処理を受けた好熱性好酸性菌芽胞の耐熱性, 日本防菌防黴学会誌, **42**, 117-120.
- 9) Morris J. C. (1966), The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°, *J. Phys. Chem.*, **70**, 3798-3805.
- 10) 福崎智司 (2009), 次亜塩素酸による洗浄・殺菌機構と細菌の損傷, 日本食品微生物学会誌, **26**, 76-80.
- 11) 小野朋子, 山下光治, 佐藤利夫 (2010), 弱酸性次亜塩素酸水溶液の各種芽胞に対する殺菌効果, 防菌防黴, **38**, 509-514.
- 12) Cortezzo D. E., Koziol-Dube K., Setlow B. and Setlow P. (2004), Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress, *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 838-852.