

学 位 論 文 題 名

# A Fundamental and Applied Researches on Control of Microorganisms Using Electrolyzed Water

（電解水による微生物制御に関する基礎ならびに応用研究）

## 学位論文内容の要旨

食品産業における微生物制御の必要性は異物混入阻止と同様に非常に高まっている。最近の微生物制御技術に関連した研究としては、加熱殺菌の最適化や死滅予測（予測微生物学）などとともに汚れの付着とその洗浄技術の検討、洗浄による除菌効果、非熱的微生物制御技術が注目されている。食品の安全性には、従来の加熱殺菌処理のみならず、汚れや微生物の洗浄・除菌、生鮮原料の微生物制御などが重要である。野菜や畜肉類、魚介類などは本来無傷の組織内には病原菌等は存在しない。収穫から1次処理、貯蔵・流通における微生物の付着・繁殖による2次汚染が主であり、対策としてはいかに品質を損なわずに表面の微生物制御を行うかが、生鮮食品加工の微生物学的安全性確保の鍵となる。従来の加熱殺菌にかわるものとして非加熱殺菌技術の一つである電解水が注目されている。そこで、基礎的な検討として強酸性電解水の殺菌効果の測定や、安定的な効果を得るための電解水の生成条件や保存方法について検討を行ない、さらに、非熱的な処理として電解水を使用した材料表面の微生物制御法について、モデル系での検討および農水産物へ適用した実用的見地からの実験により得られた結果を報告する。

第1章において、電解水に関する基礎研究として *in vitro* で代表的な食品媒介疾患の原因微生物に対する殺菌効果を検討し、殺菌効果が強酸性電解水の有効塩素濃度に依存することを確認した。しかし、殺菌効果は微生物と強酸性電解水の混合割合や存在状態に影響された。つまり、総量で等量の電解水でも一度に混合した場合と、2回以上に分けて混合した場合では異なる殺菌効果を示し、有機物が強酸性電解水の効果を低下させることが明らかとなった。

近年、食中毒原因物質に加えられ、魚介類を汚染し腸炎を引き起こす小型球形ウィルス（SRSV）に対する不活化試験を行った。同じ pH、有効塩素濃度において、次亜塩素酸ナトリウムと強酸性電解水の SRSV に対する不活化効果を比較検討した結果、有効塩素濃度 34ppm の強酸性電解水または次亜塩素酸ナトリウムで処理した SRSV はアガロース電気泳動によるバンドは認められず、SRSV の RNA が両処理によって断片化され

たかもしくは、構造タンパクが破壊されることが示唆された。また、有効塩素濃度 17ppm 以下の強酸性電解水処理も SRSV 不活化効果を有することが明らかとなり、その効果は有効塩素濃度 2ppm 以下でも認められた。一方で、次亜塩素酸ナトリウムは 17ppm 以下では不活化効果を示さなかった。これらの結果は次亜塩素酸が次亜塩素酸ナトリウムより効果的であることを示しており、その効果は、強酸性電解水に含まれる低 pH の次亜塩素酸から生成するフリーラジカルによるものと考えられた。

第 2 章において、殺菌剤としての電解水の信頼性および保存性を検討した。電解の妨害物質をほとんど含まない RO 水を使用することで信頼性のある電解水の生成を確保出来ることが判った。電極素材の殺菌効果への影響を比較した結果、Pt 電極を使用した電解は Pt-Ir 電極に比べて高い塩素過電圧を有するために、適度な有効塩素濃度を得るためには Pt-Ir 電極が Pt 電極より優れていることが明らかとなった。原水や強酸性電解水の成分分析によって、原水、電解水のいずれも水道法の規定に適合していた。

電解水の安定性の確保には、高い有効塩素濃度の維持が特に重要である。殺菌活性の高い状態で強酸性電解水を保存するにはヘッドスペースを小さく保ち、低温暗所での保存の重要性が再確認された。

第 3 章において、各食品素材表面の除菌に適した洗浄方法を設定するためには、試料表面上の微生物への除菌効果の評価系の確立が必要不可欠と考え、表面の微生物の状態や表面形状を調整できる寒天ブロック表面に大腸菌を植菌したものを食品モデルに用い、除菌効果の評価および表面における微生物の挙動について調べた。その結果、接触時間と共に除菌効果も高くなり、20 分処理した場合には大腸菌の生育は認められなかった。また、10 分間接触させたときの寒天ブロック上の大腸菌の走査電子顕微鏡像は、強酸性電解水洗浄によって大腸菌の外観に違いが認められ、Control に対して 10 分間の処理では大腸菌表面の乱れや一部溶菌が認められた。さらに、栄養成分を含まない寒天ブロックを使用し除菌処理した結果、栄養成分を含む寒天ブロックの場合に比べて高い除菌効果が認められた。また、強アルカリ性電解水にて前洗浄した後、強酸性電解水に接触させたところ、最も高い除菌効果が得られた。また、走査電顕の観察の他、正確な生死判別を目的に蛍光染色細胞を観察した結果、菌密度の減少が認められ、強アルカリ性電解水併用処理による洗浄効果も明らかとなり、除菌の効果が最終的な殺菌効果の向上をもたらしていることが明らかとなった。

第 4 章において、実際の食品素材としてマグロ魚肉を試料に強酸性電解水による除菌効果の評価および電解水のマグロ魚肉表面への影響について調べた。その結果、水道水洗浄と比較して 10 分間洗浄処理までは顕著な効果は認められなかった。しかし、強酸性電解水 30 分間の洗浄処理では菌の生育は全く認められなかった。走査電顕観察で、マグロ表面には微細な凹凸など複雑な構造が認められ、菌も強酸性電解水と接触しにくい部位に存在していた。また、表面の色彩変化として L 値（輝度）、a 値（赤味）とも

に流水洗浄では大きな変化が認められ、マグロ表面に対する脱色・タンパクの変性等の損傷も大きかった。また、SDS-PAGEによる溶出タンパク質量を比較した結果、流水電解水洗浄処理では水道水洗浄に比べて前者では明らかな溶出タンパク量の減少を認めた。これは強酸性電解水の低pHによるマグロ表面のタンパク凝集等による溶出量の減少によるものと考えられた。強酸性電解水を用いたマグロ表面に対する影響評価の結果、除菌効果は表面形状が複雑であるために低下しており、除菌効果を上げる処理は品質劣化を招きやすいことも明らかとなった。

白身魚肉に対する強酸性電解水の除菌効果についても検討した。この実用試験においても、前処理として強アルカリ性電解水洗浄が保存性を向上させた。また、大量の強酸性電解水の使用が揮発性トリメチルアミン（TMA）を制御することを確認し、強酸性電解水の消臭効果発現メカニズムを明らかにした。これらの結果から、電解水は食品衛生管理だけでなく、より快適な作業環境を提供することを明らかにした。

さらに、農薬汚染による水圏環境の悪化を改善するため、種籾を用い植物病原菌であるもみ枯細菌の洗浄消毒を試みた結果、強酸性電解水の消毒効果を確認した。SEM観察により、もみ枯細菌の溶菌等を認め、さらに、より高い消毒効果が、脱穀籾殻除去種籾に対して認められた。様々な検討結果から、強酸性電解水は、その高い消毒活性や水圏環境への低残留性を利用することで、既存の薬品の代用農薬として利用可能であると考えられた。

強酸性電解水（次亜塩素酸水）が食品添加物として認可されたことにより、食品や農水産物の除菌・殺菌処理に利用する場合、確実な処理方法の確立も必要であるが、食品成分等との反応により生成される副産物等の安全性について検討することも今後の重要な課題であると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

|     |                                   |         |
|-----|-----------------------------------|---------|
| 主 査 | 教 授                               | 鈴 木 鐵 也 |
| 副 査 | 教 授                               | 吉 水 守   |
| 副 査 | 教 授                               | 宮 下 和 夫 |
| 副 査 | 助教授                               | 山 崎 浩 司 |
| 副 査 | 独立行政法人・食品総合研究所・<br>食品工学部・製造工学研究室長 | 五十部 誠一郎 |

## 学 位 論 文 題 名

### A Fundamental and Applied Researches on Control of Microorganisms Using Electrolyzed Water

(電解水による微生物制御に関する基礎ならびに応用研究)

食品産業における微生物制御の必要性は異物混入阻止と同様に非常に高まっている。野菜や畜肉類、魚介類などは本来健康な組織内に病原菌等の存在は認められないことから、収穫から 1 次処理、貯蔵・流通において微生物の付着・繁殖による 2 次汚染が主であり、これらを原料とした食品加工の微生物的安全性確保には、表面の微生物制御が大きな鍵となる。現在、従来の加熱殺菌にかわる非加熱殺菌技術の一つである電解水が注目されており、本学位論文は、基礎的な検討として強酸性電解水の殺菌効果の測定、安定な効果を示す電解水の生成条件や保存方法について検討を行ない、さらに、電解水を使用した材料表面の微生物制御手法についてモデル系での検討および農水産物への適用結果について記述している。

まず、電解水に関する基礎研究として *in vitro* で代表的な食性病害の原因である微生物に対する殺菌効果を検討し、殺菌効果が強酸性電解水の有効塩素濃度に依存することや殺菌効果は微生物と強酸性電解水の混合割合や存在状態に影響され、有機物が強酸性電解水の効果を消滅させることを明らかにしている。また、魚介類を汚染し腸炎を引き起こす食中毒原因物質に加えられた小型球形ウイルス (SRSV) に関する不活化試験を行い、有効塩素濃度 34ppm の強酸性電解水または次亜塩素酸ナトリウムで処理した SRSV は RNA が両処理によって断片化されたか構造タンパクが破壊されることを明らかにしている。また、有効塩素濃度 17ppm 以下での強酸性電解水処理も SRSV 不活化効果を有する一方で、次亜塩素酸ナトリウムは 17ppm 以下では不活化効果を示さ

なかったことから、強酸性電解水に含まれる低 pH での次亜塩素酸由来のフリーラジカルの関与を指摘している。

本論文は、電解水の信頼性や保存性についても検討し、電解の妨害物質をほとんど含まない RO 水を使用することで信頼性の高い電解水が確保されること、適度な有効塩素濃度を得るためには Pt-Ir 電極が Pt 電極より適していることを明らかにしている。また、活性の高い状態で強酸性電解水を保存するためにはヘッドスペースを小さく保ち、低温・暗所保存の重要性を指摘している。

さらに、各食品素材表面に適した殺菌方法の設定に、大腸菌を植菌した寒天ブロックを食品モデルに殺菌効果の測定および表面における微生物挙動を検討し、処理時間と殺菌効果との関係を調べ、その効果を微生物学・顕微鏡学的手法で確認している。本論文は、強アルカリ性電解水による前処理が強酸性電解水の殺菌効果を高めること、菌密度の減少や強アルカリ性電解水併用洗浄効果を蛍光染色観察による生死判別の検討から明らかにしている。

また、マグロ魚肉を試料に強酸性電解水の殺菌効果およびマグロ魚肉表面が受ける影響について検討し、30 分処理において強酸性電解水処理では菌の生育は全く見られなかったものの、走査電顕観察によりマグロ表面の複雑構造部に菌が存在していることを確認している。また、流水処理でマグロ表面に対する脱色・タンパクの変性等のダメージが大きくなることを明らかにしている。さらに、SDS-PAGE により流水処理では強酸性電解水処理で溶出タンパク量が減少することも明らかにしている。

最後に、白身魚肉に対する強酸性電解水の除菌効果を検討し、強アルカリ性電解水処理で前処理したものが保存性を上げること、大量の強酸性電解水を使用し揮発性 TMA を制御することにより消臭効果があることを確認している。また、農薬による水圏環境の悪化を減らすため、種籾に関して植物病原菌であるもみ枯細菌の消毒を試み、強酸性電解の消毒効果を確認している。より高い消毒効果は、脱穀後の種籾を処理することで得られ、その消毒活性や環境への低残留性から、強酸性電解水が既存の薬品の一部代用農薬として使用可能であると提案している。

強酸性電解水が食品添加物として認可されたことにより、食品や農水産物の殺菌処理に利用される場合、確実な殺菌処理方法の確立も必要であるが、食品成分等との反応により生成される副産物等の安全性について検討することも重要な課題であると指摘している。