

遠赤外線照射とエタノールとの併用による微生物の殺菌

南場 毅・菊川浩史[※]・大島克己

著者らは、さきに遠赤外線加熱によるクッキー¹⁾、米菓²⁾の焼き上げ試験を行ってきたが、今回は食品の変敗、腐敗に関係するかび、酵母および細菌の懸濁液の遠赤外線照射による殺菌を試みた。遠赤外線照射による殺菌効果については、橋本らが *Escherichia coli* 745と *Staphylococcus aureus* 9779について、伝導加熱と比較した結果、遠赤外線照射の方が殺菌効果が高いと報告している³⁾。一方、著者らは、微生物の殺菌に対して加熱とエタノールを併用することにより高い殺菌効果が得られることを報告した⁴⁾。そこで、遠赤外線照射による加熱とエタノールを組み合わせることにより、殺菌効果が高まることを期待して試験し、その結果、2、3の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

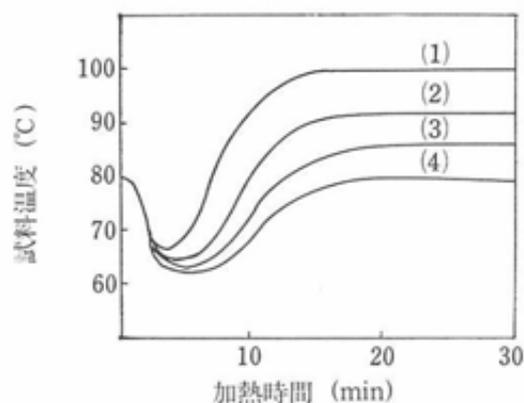
遠赤外線照射による殺菌条件の検討には、かびは *Aspergillus niger* (当所保存菌株)、酵母は *Candida persecrusei* (当所保存菌株)、細菌は煮干しから分離し *Bacillus subtilis* と同定した *Bacillus* N-1⁴⁾ を用いた。走査型電子顕微鏡による菌体表層の観察には、*Debaryomyces hansenii* (東京農大からの分譲株) を用いた。

2. 遠赤外線照射による殺菌試験

2.1 装置および設定条件 遠赤外線オーブンは遠赤外線セラミックロースター²⁾ (株ノリタケカンパニー製 PLR=II型) を用いた。熱源として上部ヒーター、下部ヒーターの両者を用い、それらの間隔は、18cmとし、試料液バックはその中間の金網の棚 (目の大きさ20mm×20mm) に置いて殺菌した。試料液バックは、厚さ60 μ m のポリプロピレンフィルム (以下、PPと略す) をポリシーラーで3辺をシールして5cm×5cmの袋を作製し、オートクレーブを用いて殺菌した。このバックに懸濁液を5ml宛て分注後、残りの1辺をシールして試料液バック (厚さは、最も厚い部分で約

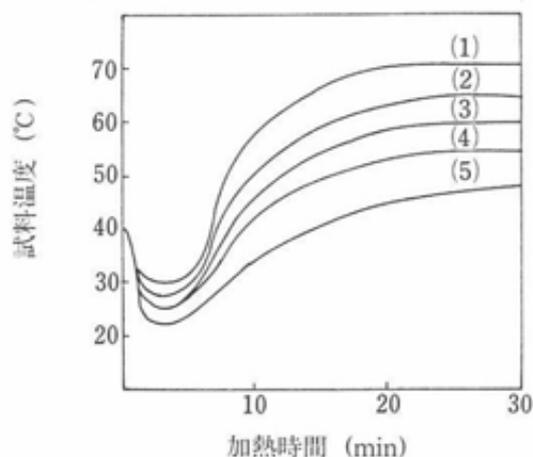
3mm) を調製した。

なお、各ヒーター設定温度での試料液温度は、懸濁液にセンサーを差し込んで自動記録した。温度経過の一例を第1、2図に示した。図で明らかなように、遠赤外線照射では試料温度が時間とともに少しずつ上昇するため、最終試料温度を温湯加熱と同温度になるようにヒーターを設定して試験した。



第1図 遠赤外線照射における試料温度変化(その1)
(予備加熱80 $^{\circ}$ C、5min)

ヒーター温度 (1) 160 $^{\circ}$ C; (2) 150 $^{\circ}$ C; (3) 140 $^{\circ}$ C; (4) 130 $^{\circ}$ C



第2図 遠赤外線照射における試料温度変化(その2)
(予備加熱40 $^{\circ}$ C、1min)

ヒーター温度 (1) 120 $^{\circ}$ C; (2) 110 $^{\circ}$ C; (3) 100 $^{\circ}$ C; (4) 90 $^{\circ}$ C; (5) 80 $^{\circ}$ C

※ 日本食品分析センター大阪支所

2. 2 微生物懸濁液の調製と殺菌方法

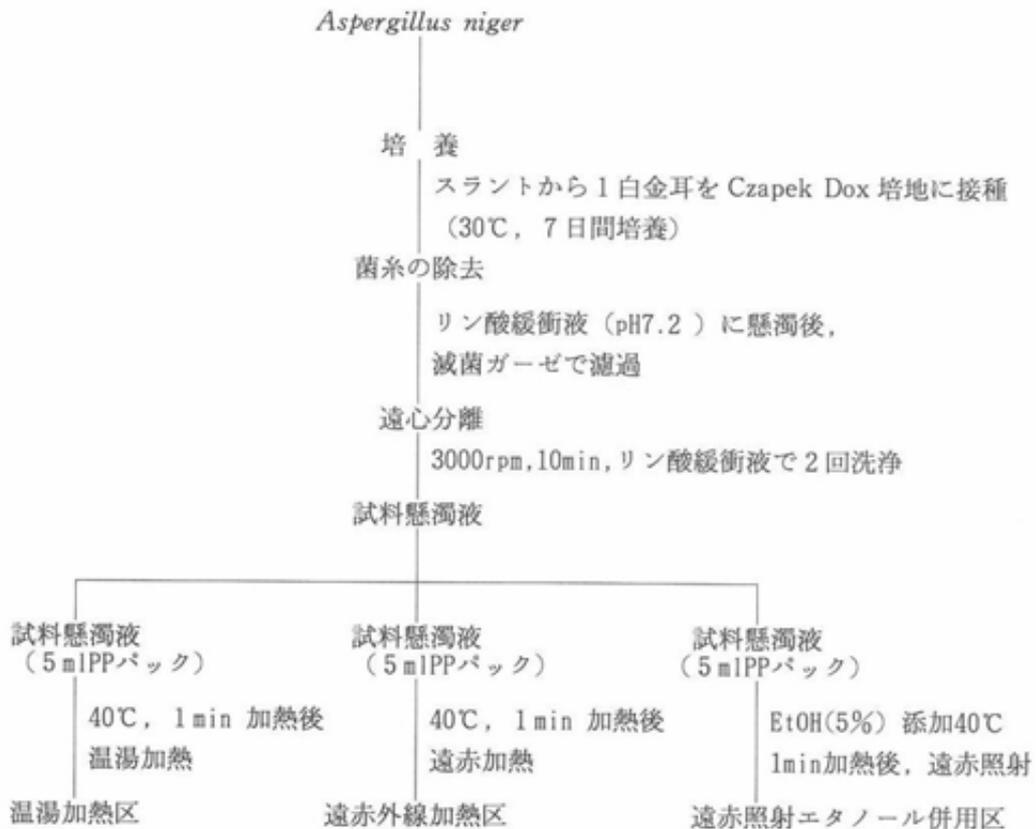
A.niger の孢子懸濁液の場合は第3図に従って懸濁液を調製し、試料液バックに 10^6 /mlレベルの孢子懸濁液5ml宛を分注し、これを温湯中で40℃、1分間の予備加熱後、ヒーター温度を80℃、90℃、100℃、110℃および120℃に調整した遠赤外線オープンに入れ、それぞれ10分間照射（遠赤外線照射区：以下同じ）した。また、遠赤外線照射・エタノール併用区（以下エタノール併用区）は、エタノールの濃度を5%（v/v）にした。

遠赤外線照射による効果の測定は、照射処理後の試料液バックを流水で急冷し、生菌数を標準寒天培地を用いた希釈平板培養法で測定した。この操作を3回繰り返し、その平均値を処理後の生菌数とした。対照の伝導加熱（以下、対照区）は、同様に試料液バックを40℃、1分間の予備加熱後、40℃、50℃、60℃および70℃の温湯中で10分間の加熱を行なった試料液バックについて、生菌数を測定した。この操作を同様に3回繰り返し、その平均値を対照の生菌数とした。なお、

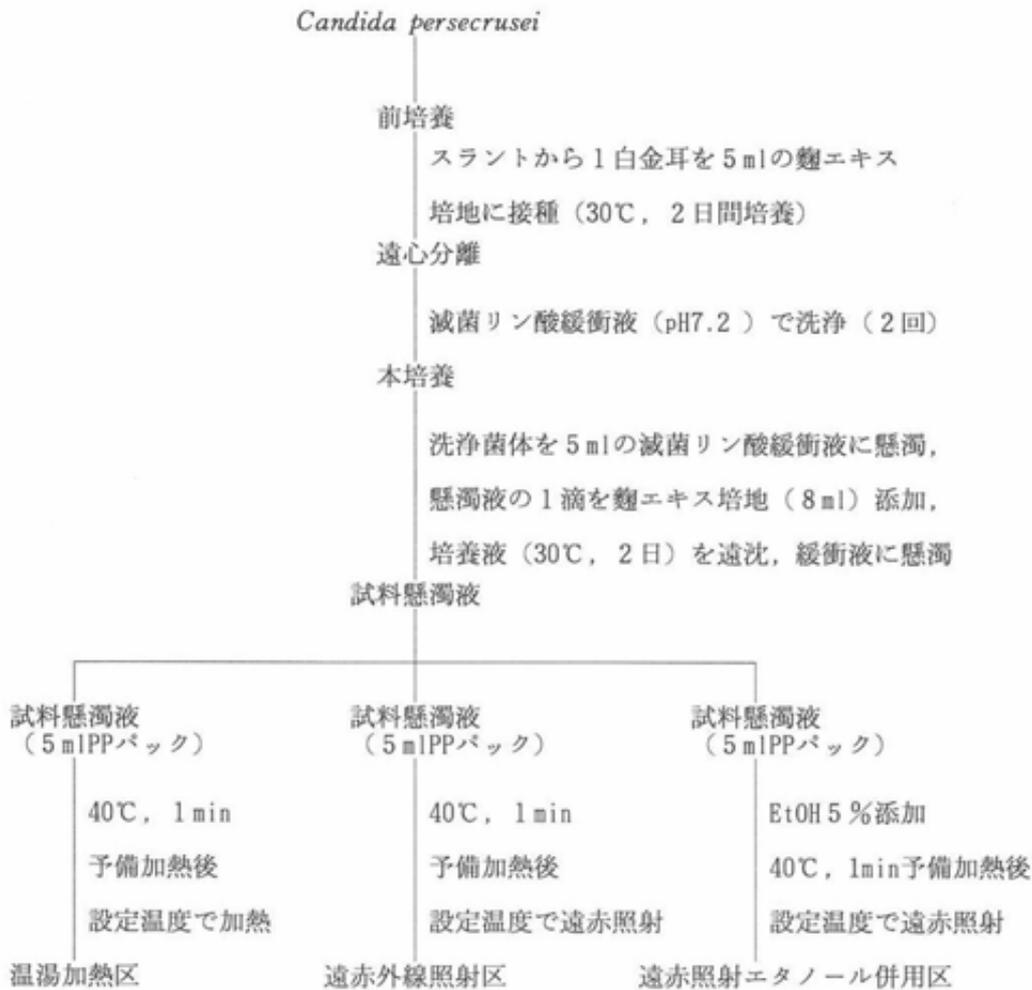
初発菌数は1分間の予備加熱後の生菌数を測定して求めた。

C.persegrusei の懸濁液は第4図に従って殺菌試験を行った。この場合、 10^7 /mlレベルの *C.persegrusei* の菌懸濁液を用いて試料液バックを作成し、その後の処理は、*A.niger* の場合と同様の設定条件で試験した。

Bacillus N-1 孢子懸濁液の場合は、第5図に従って懸濁液を調製して殺菌試験を行った。なお、YT培地はペプトン5g、酵母エキス2.5g、グルコース1gおよびTween 80 0.5gを脱イオン水に溶解して1ℓにメスアップ（pH7.2）後、オートクレーブによって殺菌して用いた。孢子形成用培地は肉エキス10g、ペプトン10g、塩化ナトリウム5g、グルコース10gおよび硫酸マンガンを10mgを脱イオン水1ℓに溶解後（pH7.2~7.4）、オートクレーブによって殺菌して用いた。試料液バックは 10^5 /mlレベルの *Bacillus N-1* 孢子懸濁液を分注し、これを温湯中で80℃、5分間、予備加熱を行った後、ヒーターの設定温度を130℃、140℃、150℃および160℃に調整した遠赤外線



第3図 *Aspergillus niger* 孢子懸濁液の遠赤外線照射法による殺菌方法



第4図 *Candida persegrusei* 懸濁液の遠赤外線照射法による殺菌方法

オープンに入れ、それぞれ10分、20分、30分間の3段階に照射時間を変えて試験した。照射処理後、流水で急冷し、生菌数を測定した。対照の伝導加熱区は試料液バックを80℃、5分の予備加熱後、80℃、85℃、90℃、95℃および100℃の温湯中で、10分、20分および30分間の加熱を行った試料液バックについて生菌数を測定した。なお、この場合の初発菌数は5分間の予備加熱後の生菌数を測定して求めた。これらの操作は、いずれも3回繰り返し、その平均値を生菌数とした。

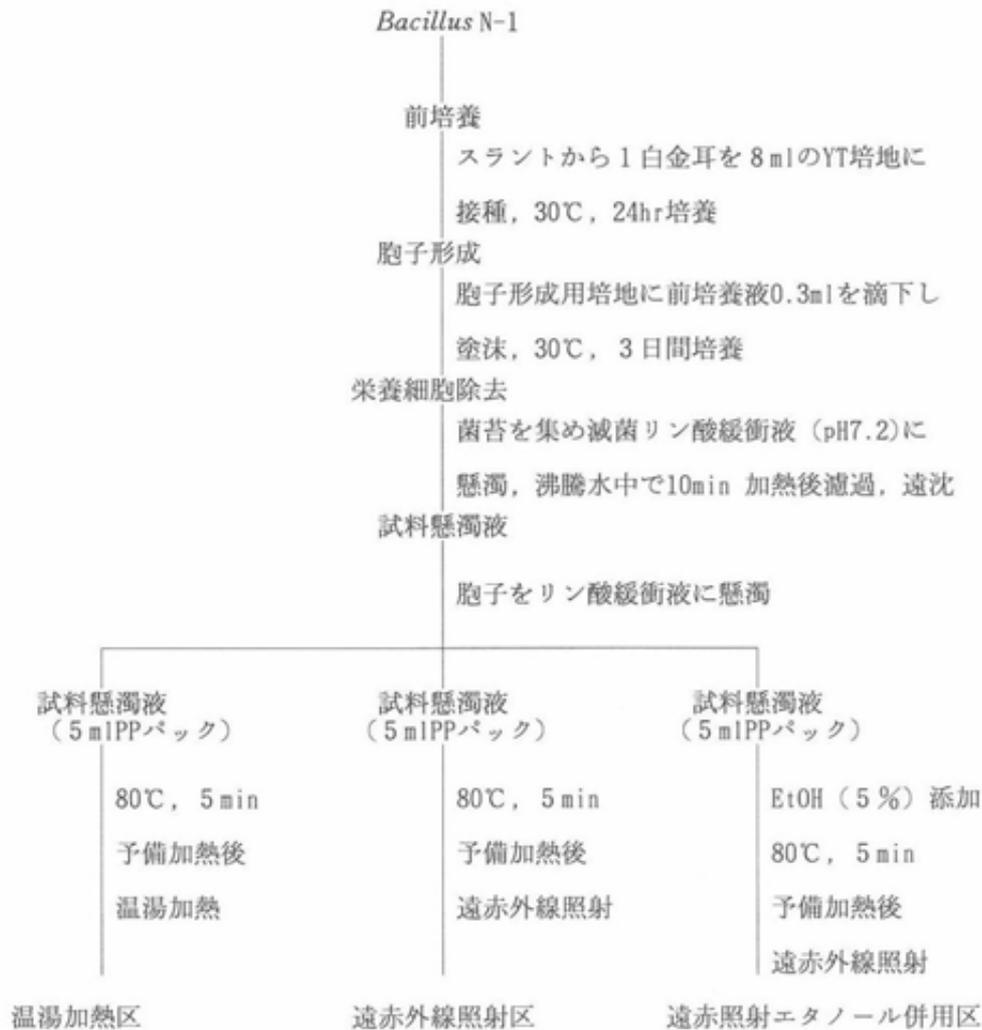
3. 走査型電子顕微鏡による菌体表層の観察

Debaryomyces hansenii を遠赤外線照射処理後、懸濁液を遠沈、リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁させ、ポリリジン処理したガラス片に滴下した後、グルタルアルデヒドで3時間、さらにオスミウム酸で2時間固定した。エタノールによる脱水後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥させた。この試料をイオンスパッタリング装置 (日本電子株式会社 SFC-1100E 型) を用い

て10mA、4分の条件で金蒸着させた後、走査型電子顕微鏡 (日本電子株式会社 JSM-820 型) を用いて観察した。

実験結果および考察

1. *Aspergillus niger* 胞子懸濁液に対する殺菌効果
各種条件で殺菌したときの菌数の変化を第1表に示した。遠赤外線照射区の場合、ヒーター温度90℃ (最終試料温度43.1℃) では菌数の減少はみられなかったが、ヒーター温度100℃ (最終試料温度45.5℃) では菌数はほぼ1/10に、ヒーター温度110℃ (最終試料温度51.3℃) 以上の条件では、菌数が10以下/mlとなり、強い殺菌効果が認められた。またエタノール併用区では、ヒーター温度80℃ (最終試料温度37.5℃) で菌数が約1/2に、ヒーター温度90℃ (最終試料温度43.1℃) 以上で10以下/mlの菌数となり、エタノール



第5図 *Bacillus* N-1 孢子懸濁液の遠赤外線照射法による殺菌方法

第1表 *Aspergillus niger* 孢子懸濁液の遠赤外線照射による殺菌結果

	ヒーター温度 (℃) 最終試料温度 (℃)*	初発菌数 (Viable cell counts/ml)	照射後菌数 (Viable cell counts/ml)
遠赤	80 (37.5)	8.4×10^4	7.8×10^4
	90 (43.1)	9.5×10^4	3.4×10^4
	100 (45.5)	7.1×10^4	8.4×10^3
	110 (51.3)	1.6×10^5	10以下
	120 (58.0)	1.7×10^5	10以下
遠赤 + EtOH	80 (37.5)	1.7×10^5	9.3×10^4
	90 (43.1)	2.0×10^5	10以下
	100 (45.5)	1.9×10^5	10以下
温湯	(40)	3.5×10^6	3.4×10^5
	(50)	2.1×10^6	5.5×10^5
	(60)	2.2×10^6	1.0×10^6
	(70)	2.7×10^6	1.0×10^6

*表中の括弧内の数字は最終試料温度 (℃) を示す。

の添加により殺菌効果が高まった。これに対して、対照区では、試料温度50℃、10分間の保持で菌数が 10^6 /mlレベルが 10^5 /mlレベルと初発菌数の約1/10に、60℃、10分間の保持でも 1×10^6 /ml程度の菌数の残存が認められた。

以上の結果、遠赤外線照射区は、対照区に比べて約10℃低い温度で同程度の殺菌効果が得られ、また、エタノール併用区では、同程度の殺菌効果をさらに約5℃低い温度で得ることができると考えられた。

2. *Candida persegrusei* の懸濁液に対する殺菌効果

殺菌効果は第2表に示すように、遠赤外線照射区の場合、ヒーター温度80℃（最終試料温度37.2℃）では菌数が 10^7 /mlレベルから 10^5 /mlレベルに、ヒーター温度90℃（最終試料温度42.5℃）では 10^6 /mlレベルから 10^4 /mlレベルに、ヒーター温度100℃（最終試料温度44.7℃）では菌数が 10^7 /mlレベルから 10^4 /mlレベルにそれぞれ大きく減少した。更に、ヒーター温度110℃（最終試料温度51.6℃）では10以下/mlとなり、強い殺菌効果が認められた。なお、菌懸濁液を直径3cmのプラスチックシャーレに直接添加して、上部ヒーターから照射（試料液の温度はバック法と同温度に調整）しても、試料液バックの場合と同様な殺菌結果が得られた。更に、エタノール併用区の場合、ヒーター温度80℃（最終試料温度37.5℃）では菌数が 10^7 /mlレベルから 10^2 /mlレベルに減少し、ヒーター温度90℃（最終試料温度42.8℃）では菌数が 10^6 /mlレベルから10以下/mlとなり、殺菌効果をさらに高めることができた。一方、対照区の場合は、試料温度50℃

では、 10^6 /mlレベルが 10^4 /mlレベルに、60℃では 10^6 /mlレベルから 10^2 /mlレベルに減少した。

以上の結果、遠赤外線照射区では対照区よりも約10℃低い温度で同程度の殺菌効果が得られ、エタノール併用区では、同程度の殺菌効果をさらに約10℃低い温度で得ることができると考えられる。このような遠赤外線照射による殺菌効果は、菌懸濁液表層部における赤外線エネルギーの吸収とバルク温度とに起因するものと考えられているが³⁾、殺菌の機序についてはさらに検討を要する。

3. *Bacillus N-1* 孢子懸濁液に対する殺菌効果

殺菌効果は第3表に示すように、遠赤外線照射区においては、ヒーター温度130℃、30分照射（最終試料温度80.3℃）では、ほとんど生菌数の減少は認められなかったが、ヒーター温度140℃30分照射（最終試料温度87.6℃）では 10^5 /mlレベルが 10^4 /mlに、ヒーター温度150℃30分照射（最終試料温度92.4℃）では 10^4 /mlレベルが 10^3 /mlレベルと初発菌数のほぼ1/10に減少した。ヒーター温度160℃（最終試料温度100.4℃）では、10分間照射により初発菌数が 10^4 /mlレベルから 10^3 /mlレベルとなり、ほぼ1/10に減少した。さらに、20分間照射により、さらに菌数は 10^2 /mlレベルとなり、初発菌数のほぼ1/100にまで減少させることができた。しかし、この場合は、エタノール併用区でも、遠赤外線照射単独区と同様な殺菌効果しか得られず、エタノールの添加効果はほとんど認められなかった。また、温湯加熱による殺菌効果は遠赤外線照射と同様な菌数の減少傾向を示しており、

第2表 *Candida persegrusei* の懸濁液の遠赤外線照射による殺菌結果

	ヒーター温度 (℃) 最終試料温度 (℃)* (Viable cell counts/ml)	初発菌数 (Viable cell counts/ml)	照射後菌数 (Viable cell counts/ml)
遠赤	80 (37.2)	1.2×10^7	8.0×10^5
	90 (42.5)	1.2×10^6	2.2×10^4
	100 (44.7)	1.2×10^7	6.6×10^4
	110 (51.6)	1.2×10^6	10以下
	120 (57.2)	1.2×10^6	10以下
遠赤 + EtOH	80 (37.5)	1.0×10^7	9.0×10^2
	90 (42.8)	9.8×10^6	10以下
	100 (45.5)	1.1×10^7	10以下
温湯	(40)	5.6×10^6	4.1×10^6
	(50)	7.1×10^6	5.4×10^4
	(60)	6.9×10^6	1.0×10^2
	(70)	6.9×10^6	2.0×10^2

*表中の括弧内の数字は最終試料温度 (℃) を示す。

第3表 *Bacillus* N-1 孢子懸濁液の遠赤外線照射による殺菌結果

	ヒーター温度 (°C) 最終試料温度 (°C)* (Viable cell counts)	初発菌数 (Viable cell counts)	照射後菌数 (Viable cell counts/ml)		
			10	20	30 (min)
遠赤	130 (80.3)	5.1×10^4	4.3×10^4	4.5×10^4	4.1×10^4
	140 (87.6)	1.1×10^5	7.2×10^4	5.8×10^4	1.5×10^4
	150 (92.4)	2.1×10^4	5.5×10^3	1.1×10^3	2.5×10^3
	160 (100.4)	2.5×10^4	5.0×10^3	3.0×10^2	4.8×10^2
遠赤 + EtOH	130 (80.3)	4.4×10^4	3.7×10^4	3.0×10^4	3.0×10^4
	140 (87.6)	5.3×10^4	2.3×10^4	6.3×10^3	6.0×10^3
	150 (92.4)	3.0×10^4	1.2×10^4	2.0×10^3	2.6×10^3
	160 (100.4)	4.4×10^4	7.9×10^3	5.2×10^2	3.9×10^2
温湯	(95)	3.0×10^5	2.1×10^5	8.3×10^4	3.3×10^4
	(100)	2.1×10^4	5.8×10^3	1.0×10^3	3.3×10^2

*表中の括弧内の数字は最終試料温度 (°C) を示す。

Bacillus N-1 では *A.niger*, *C.persegrusei* の場合と異なり、遠赤外線照射により特に高い殺菌効果を得ることはできなかった。

4. 走査型電子顕微鏡による *D.hansenii* の菌体表層の観察

D.hansenii に遠赤外線照射 (ヒーター温度約100°C, 15分間照射, 最終試料温度約55°C) して菌体表層の変化を走査型電子顕微鏡観察した結果を写真1~3に示した。無処理の場合に比べて遠赤外線照射処理では、

やや菌体表層の損傷がみられるが、遠赤外線照射とエタノールを併用することにより、菌体表層のひび割れ、あるいは菌体の原形をとどめないほどの損傷がはっきりと観察されて、遠赤外線照射とエタノールの併用が菌体の破壊に激しく作用していることが確認された。なお、この場合の *D.hansenii* の遠赤外線照射による殺菌結果は、初発菌数 10^7 /ml レベルが 10^3 /ml レベルに減少し、遠赤外線照射とエタノールとの併用により10以下/ml となった。

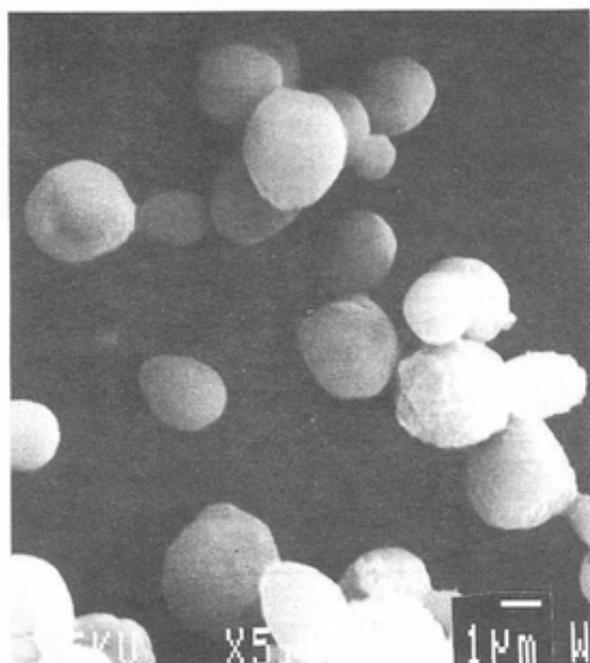


写真1 *D.hansenii* の走査型電子顕微鏡写真 (無処理)

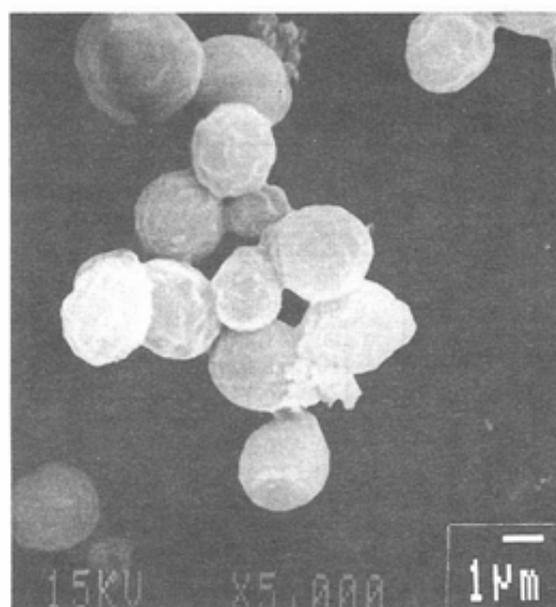


写真2 *D.hansenii* の走査型電子顕微鏡写真 (遠赤処理後)

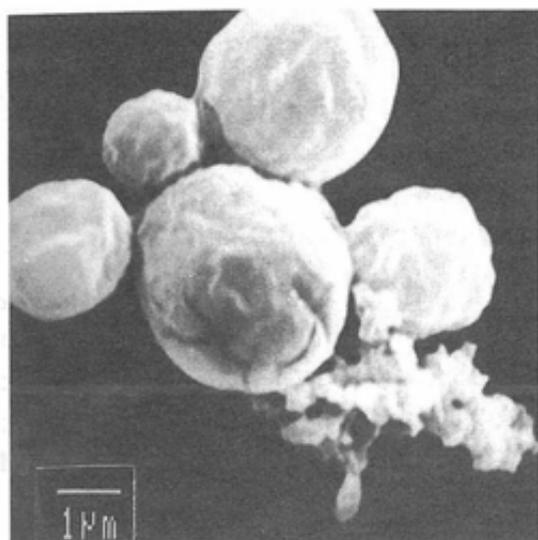


写真3 *D.hansenii*の走査型電子顕微鏡写真
(遠赤+EtOH処理後)

要 約

遠赤外線照射法によって微生物の懸濁液の殺菌試験を行った。伝導加熱として温湯加熱を用い、遠赤外線照射法と比較した。また、微生物懸濁液にエタノールを添加して遠赤外線照射との併用効果についても試験した。

1. *A.niger* 孢子懸濁液では、遠赤外線照射10分間の場合、ヒーター温度110℃(最終試料温度51.3℃)で初発菌数 10^5 /mlレベルが10以下/mlとなり、遠赤外線照射とエタノールを併用すると、ヒーター温度90℃(最終試料温度43.1℃)で初発菌数 10^5 /mlレベルが10以下/mlとなった。なお、対照となる伝導加熱として用いた温湯殺菌では、60℃、10分間保持で初発菌数

10^6 /mlレベルが 10^1 /mlレベル程度残存した。

2. *C.persegrusei*の懸濁液では、遠赤外線照射10分間の場合、ヒーター温度110℃(最終試料温度51.6℃)の照射処理により初発菌数 10^6 /mlレベルが10以下/mlとなり、さらにエタノールとの併用により、ヒーター温度90℃(最終試料温度42.8℃)の照射処理により初発菌数 10^6 /mlレベルが10以下/mlとなった。対照となる温湯殺菌では70℃、10分間保持で初発菌数 10^6 /mlレベルが処理後 10^1 /mlレベル残存しており、遠赤外線照射法および遠赤外線照射とエタノールとの併用が有効であった。

3. *Bacillus N-1* 孢子懸濁液では、遠赤外線照射30分間で、ヒーター温度160℃(最終試料温度100.4℃)で 10^4 /mlレベルが 10^2 /mlレベルとなり、エタノールを併用してもほぼ同様な結果であった。100℃の温湯殺菌でも遠赤外線照射とはほぼ同じ結果となり、*Bacillus N-1*では遠赤外線照射による殺菌効果は得られなかった。

4. 走査型電子顕微鏡で*D.hansenii*の菌体表層を観察した結果、遠赤外線照射とエタノールとの併用処理をした場合、著しい菌体の破壊、損傷が認められた。

文 献

- 1) 南場 毅・牧野勝幸・国末達也・大島克己：愛知食品工技年報，33，34-41 (1992)
- 2) 南場 毅・西 一郎・加藤 熙：愛知食品工技年報，33，56-64 (1992)
- 3) 橋本 篤・清水 賢・五十嵐英夫：化学工学論文集，17，627-633 (1991)
- 4) 南場 毅・戸谷精一・金田陸美・加藤 熙：日本食品工業学会第39回大会講演集，p. 97 (1992)