

# ペットボトル飲料製造における微酸性次亜塩素酸水を利用した過酢酸耐性菌の制御

桑 原 浩 輔

(大和製罐株式会社 技術管理部 新規事業室)

## 1. はじめに

食品製造分野における微生物制御は製品品質を維持する上で非常に重要な技術である。特に常温流通における容器詰食品製造では微生物による危害がなく、安心安全で長期にわたる食品品質保持が求められている。これらを実現するには、食品自体が持つ特性（pH、粘度、AW、その他摂取可能な発育制御物質）により、一部の微生物発育制御は可能であるものの、一般的には容器・内容物含め、製造工程環境は熱、薬剤、ガス等による物理化学的手法で殺菌され、清浄な状態を保つことが必須とされる。薬剤殺菌に関しては過酸化水素、過酢酸、次亜塩素酸などを主成分とした薬剤が用いられることが一般的で、中でも過酢酸はその強い殺菌能力により古くから幅広い分野で利用され、量産製造に適した殺菌剤といえる<sup>1)2)3)</sup>。殺菌対象である微生物は通常、有芽胞細菌であり菌株によって多少異なるものの、食中毒菌である

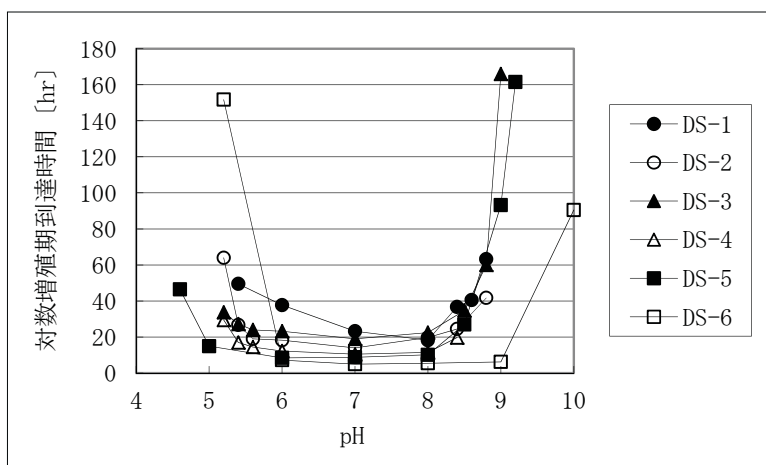
*Bacillus cereus* などが過酢酸耐性菌として知られていた<sup>4)</sup>。しかし2000年頃から *Paenibacillus* 属に分類される一部菌種に *B. cereus* など比較にならないほど過酢酸に対して強い耐性を持つものが確認され始めた。我々の調査で、これらは16SrDNA top500bpの相同性から *P. chibensis*, *P. favisporus* に類縁の菌種であり、それぞれ分離由来の異なる株についても同様の過酢酸耐性能を確認した。過酢酸による殺菌では、高い殺菌条件を適用しなくては無菌性水準（SAL $10^{-6}$ 以下、殺菌効果として>6Dと示す）を確保することは難しいことが予想された。

そこで我々は代替殺菌剤の候補として微酸性次亜塩素酸水<sup>5)6)</sup>の効果を検討した。これは次亜塩素酸を殺菌主成分として、希塩酸を無隔膜電極法で電気分解して生成される電解水で近年、工業的利用化が期待されているものの一つであり食品添加物（2002年6月10日厚労省令第75号）でもある。ペットボトル飲料製造の微生物制御に適した殺菌方法について各種試験から検討を行ったので報告する。

## 2. 一般性状試験

### 2-1. 方法

過酢酸耐性株は耐性を持たない株に比べて発育温度やpHに何か特異な点があるのかを調査した。L字試験管にSCD液体培地（和光純薬工業）を10mL分注し、オートクレーブ滅菌した。それぞれに30~100cfuの菌を無菌的に接種した。ADVANTEC社製：温度勾配振とう培



第1図 pHによる微生物のグロスカーブ

養装置 TN26-12を利用して10~60℃で7日間培養し、15秒間隔でOD660の吸光度を測定した。得られたデータより対数増殖期到達時間を算出してグロスカーブを作成した。次いでクエン酸を用いてSCD培地をpH 4~10に調整したL字管を準備し、上記で算出した至適培養温度域において同様に測定し、グロスカーブを作成した(第1図)。以下、供試菌株については第1表を参照のこと。

## 2-2. 結果

発育至適温度については、供試菌 DS-1から順に39℃, 38℃, 36℃, 44℃, 45℃, 40℃であり、DS-5が50℃以上の高温域でも発育可能である以外は、いずれも36~45℃付近を至適温度とする一般的な *Bacillus* 属細菌と同様であった(第2図)。発育至適 pH については、供試菌全て pH 7が至適であった。DS-1~DS-5は、pH 5~6付近でも発育できるが、DS-6は、pH 6以下では極端に発育が悪くなった。一方で、pH 9を超えるとDS-1~DS-5は発育できないが、DS-6は pH10でも発育可能であった。つまり *Paenibacillus* 属細菌は、温度指摘こそ *Bacillus* 属細菌のそれと変わらないが、pH 至適においては、より酸性側でも発育できることを示した。

## 3. 孢子懸濁液の調製

芽胞形成促進のため無機塩を少量添加した低栄養寒天培地上にそれぞれの菌を塗布し、30℃において4~7日間培養した。ここで低栄養とは市販培地の表示量の1/2量や1/4量で調整したもの。基盤とする培地の種類は菌株によって異なるため、どの培地で最も芽胞形成率が高いかについては、あらかじめ観察調査した。培養によって芽胞形成状態が良好であることを顕微鏡(1,000倍)で確認後、滅菌水を用いてコンラージ棒でコロニーを掻き取り集菌した。遠心分離と超音波処理を経て多段階ろ過により芽胞精製を行い、培地および菌体由来

第1表 供試菌株一覧

No.	菌株名	由来
DS-1	<i>Paenibacillus chibensis</i>	NBRC 15958 <sup>T</sup>
DS-2	<i>Paenibacillus chibensis</i>	製造工程環境分離株
DS-3	<i>Paenibacillus favisporus</i>	製造工程環境分離株①
DS-4	<i>Paenibacillus favisporus</i>	製造工程環境分離株②
DS-5	<i>Paenibacillus</i> sp.	酸性飲料分離株
DS-6	<i>Bacillus cereus</i>	酸性飲料分離株
DS-7	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	清涼飲料分離
DS-8	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC12980
DS-9	<i>Aspergillus niger</i>	NBRC9455

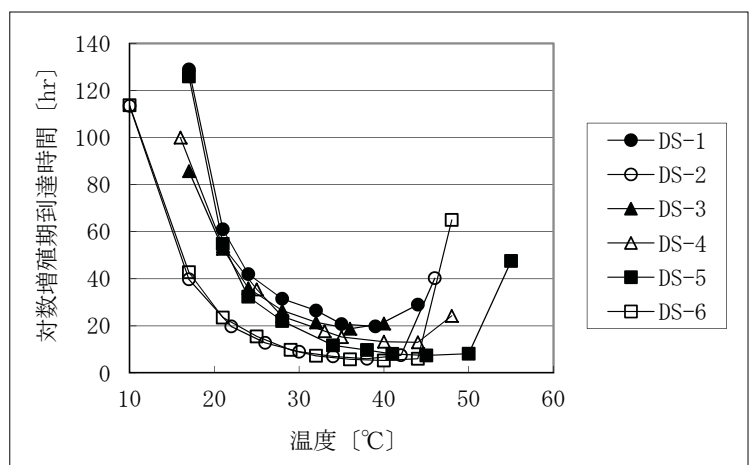
の有機物を極力取り除いた成熟芽胞のみの芽胞懸濁液を調製した。当方法は常法(渡部ら<sup>7)8)</sup>を改良し、より精製度の高い懸濁液を作成する独自の方法である。これら孢子懸濁液を試験供試液とした。なお、カビの場合は培地および培養日数を変化させ芽胞と同様に精製を行った。

## 4. 薬剤耐性試験

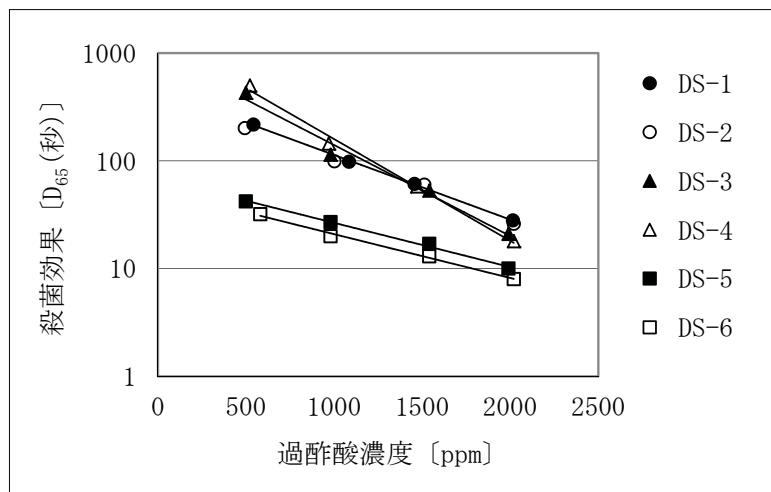
*Paenibacillus* 属細菌は一般的な *Bacillus* 属細菌に比べ、どのくらい過酢酸に耐性があるのか。また *Paenibacillus* 属細菌のどのような種が耐性を持つのか。そして芽胞菌にも多くの種属が存在するが、薬剤の種類で耐性はどのように変わるのか。これらを調べる目的で実施した。

### 4-1. 方法

各薬剤に対して孢子を形成する微生物がどの程度、抵抗性を示すのかを確認するため実施し



第2図 培養温度による微生物のグロスカーブ



第3図 65℃における過酢酸濃度別の殺菌効果

た。適宜、所定濃度に調製した薬剤を滅菌済みの100mL フラスコへ99mL 入れ湯浴した。液が所定温度に到達後、調製した芽胞懸濁液を1mL 添加し試験を開始した。所定時間毎にフラスコから1mL サンプルングし、即座にチオ硫酸ナトリウム-リン酸緩衝液で薬剤の反応を停止させた。適宜段階希釈しSCD 寒天培地（和光純薬工業）による混釈培養法で生残菌数を測定した。平板は30℃で5日間培養後、出現したコロニーを計測して各微生物の死滅曲線を得た。反応停止液は、薬剤の種類により濃度を変更したものを用い、チオ硫酸濃度で過酢酸製剤の場合5%、微酸性次亜塩素酸水の場合0.5%とした。過酢酸製剤としてエコラボ社 オキシニアアクティブ110を滅菌水で所定濃度に希釈し使用（以下、オキシニア）。また微酸性次亜塩素酸水は森永エンジニアリング社ピュアスター水生成装置 Mp-240を用いて生成したもので、pHが5～6.5にあり、有効塩素濃度

第2表 65℃における殺菌効果結果 [D<sub>65</sub>(秒)]

No.	過酢酸濃度 [ppm]				ピュアスター水
	500	1,000	1,500	2,000	
DS-1	217	98	61	28	6
DS-2	201	99	60	26	4
DS-3	229	114	53	21	4
DS-4	502	145	58	16	6
DS-5	42	27	17	11	4
DS-6	32	20	13	8	3

が20～40ppmの範囲にあるものを使用した（以下、ピュアスター水）。過酢酸濃度は理工協産社過酢酸過酸化水素モニター RK-POX II を、有効塩素濃度は笠原理化学工業社 有効塩素濃度計 RC-2Z で測定した。

#### 4-2. 結果

オキシニアを用いた65℃における死滅曲線を第3図に示す。*P. chibensis* および *P. faavisporus* の結果に着目すると、①D値は *B. cereus* のおよそ10倍近くあることが分かった、②それぞれ来源の異なる菌株間でも耐性に差は見られなかつた、③耐性が高い *P. chibensis* と *P. faavisporus* では、*P. chibensis* の方がわずかに高い耐性を示した。同様の微生物を用い、ピュアスター水で試験した結果を（第3図）と併記し第2表に示す。結果、ピュアスター水ではいずれも速やかに殺菌された。つまり過酢酸耐性株は、ピュアスター水で極めて短時間で殺菌できることが分かった。

しかしペットボトル飲料製造のみならず食品製造環境では、食品危害を防ぐための制御対象とする有芽胞細菌は多種多様である。従って我々はさらに *Bacillus* 属細菌を中心に、微生物種を増やし、それぞれの薬剤を用いた同様の耐性試験を実施した。計72株の微生物種から得られた結果を第3表に示す。これによるとオキシニアの殺菌効果は広域で使用される殺菌剤ということもあり、*Paenibacillus* 属細菌の一部菌株以外は、多種の芽胞・胞子に対して高い殺菌効果があることを確認した。一方、微酸性次亜塩素酸水の殺菌効果に着目すると過酢酸耐性株を含む他の *Bacillus* 属細菌も65℃という高温域では容易に死滅させることができた。ただし、果汁酸性食品などで危害菌として認識されている高温性好酸性細菌 *Alicyclobacillus* 属細菌や高温性細菌である *Geobacillus* 属細菌には全く効果がなかった（D<sub>65</sub>は前者で8～10分、後者で1～3分であった）。つまり、製造する飲料種や危害微生物によっては、いずれかの薬剤単独での殺菌を適用できるが、あらゆる飲料種を製造するようなマルチラインでは、

第3表 薬剤耐性試験総評と懸案事項

分類	計	65℃殺菌結果		備考
		オキシニア	ピュアスター	
<i>Bacillus</i> 属細菌	38株	A～B	A～B	特になし
<i>Brevibacillus</i> 属細菌	4株	A	A	特になし
<i>Paenibacillus</i> 属細菌	14株	C	A	オキシニアでは中性食品製造に懸念
<i>Geobacillus</i> 属細菌	3株	A	D	ピュアスター水ではホット販売食品製造に懸念
<i>Alicyclobacillus</i> 属細菌	5株	B	D	ピュアスターでは酸性食品製造に懸念
真菌類 (カビ胞子)	8株	A	A	特になし

※A…短時間(数秒)で-6log以上の効果, B…大半はA, 一部株に若干の耐性あり.  
C…耐性株が多数存在する, D…当該条件で1分以上でも殺菌できない

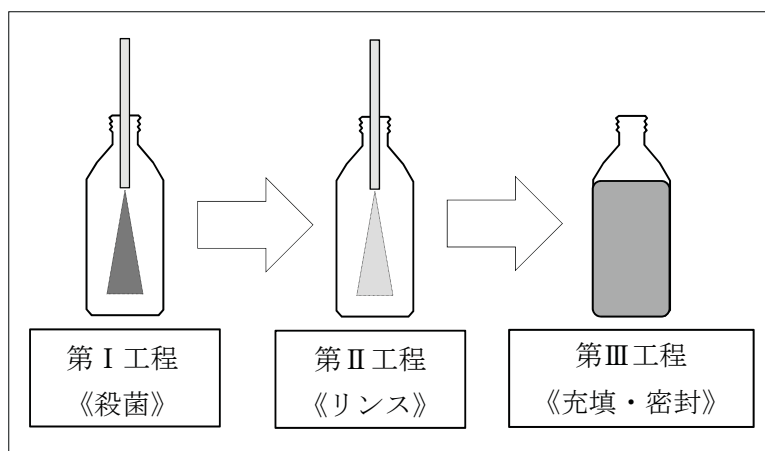
いずれも選択できないということになる。過酢酸耐性菌を除外すればオキシニアによる殺菌で問題ないため、殺菌方法を変更しない場合は、オキシニア濃度を高くすることなどが対策として挙げられる。

### 5. ボトルチャレンジテスト

ラボにおける薬剤耐性試験の結果より、いずれの薬剤もお互いの弱点を補完するように見えた。例えば、オキシニアリンスの工程で、水洗の代わりに食品添加物であるピュアスター水で行えば、殺菌効果が、より広範囲の微生物に対して高くなるのではないかと考えた。そこでペットボトルの連続生産現場で行われる殺菌工程において(第4図)、オキシニアのみで殺菌を行った場合と、薬剤を併用した場合の殺菌効果を比較した。

#### 5-1. 方法

あらかじめ殺菌したPETボトル容器内面全体に、胞子数が $10^6$ cfuとなるよう接種し乾燥させたものを準備した(以下、菌接種ボトルとする)。菌接種ボトルを下記の2条件で処理し、SCD培地を充填後、キャップを巻締めた。所定温度で7日間培養後、外観検査による培地変敗確認より、微生物残存の有無を調べた。条件Aとして、65℃、1,500ppmのオキシニアで第I工程を処理し、第II工程では65℃の水洗処理を行い、第III工程で充填・密封した。条件Bとして、条件Aの第II工程：水をピュアスター水に替えて実施した。



第4図 ボトルチャレンジテストにおける殺菌工程模式図

第4表 ボトルチャレンジテスト結果 (N=10)

菌株名	塗布菌数 (cfu/bottle)	条件A	条件B
DS-1	$1.1 \times 10^6$	10	0
DS-3	$2.4 \times 10^6$	8	0
DS-6	$1.4 \times 10^6$	2	0
DS-7	$1.7 \times 10^6$	0	0
DS-8	$1.5 \times 10^6$	0	0
DS-9	$1.9 \times 10^6$	0	0

※表中数字は陽性(変敗)本数を表す。

#### 5-2. 結果

オキシニア単独による殺菌では、過酢酸に高い耐性を示した *Paenibacillus* 属細菌と、従来過酢酸耐性菌として考えられた *B. cereus* が殺菌しきれず残存した。ところが、水洗工程にピュアスター水を適用する併用殺菌では、第4表に示す通りいずれも-6log以上の殺菌効果が確認された。

## 6. おわりに

*Paenibacillus* 属細菌は新種の微生物群ではなく、十数年前より分離事例がある微生物株である。薬剤耐性獲得の機構についても諸説はあるが、劣悪環境に適応するため世代を経て何らかの抵抗因子を獲得したと予想される。本報の結果では過酢酸および微酸性次亜塩素酸水のいずれにも耐性を示す微生物株は存在しなかったため、これらの薬剤を併用することで多様な微生物種を殺菌でき、また永続的に微生物が薬剤耐性を獲得する可能性を削減できるのではないかと考えている。ここでピュアスター水は食品添加物であるということと、有効塩素濃度が20~40ppmと低濃度であるが故、薬剤間の接触による不具合（例えば塩素発生による周辺環境への危険）を問題としなくとも良いということが、工業的利用の可能性を広げた。他の塩素系殺菌剤、酸性電解水や次亜塩素酸ソーダなどでは、設備および人体負荷、ペットボトル容器への塩素残留などの悪影響が避けられないことに加え、著者らの別比較試験では同濃度域で微酸性次亜塩素酸水の殺菌効果が最も高かったことが選定した理由にもあたる。

本試験結果では低酸性飲料製造に特化した製造ラインにおいて、容器・ラインの殺菌としてオキシソニア・ピュアスター水いずれも単独での適用が可能と判断する。ただし型替えなどによって低酸

性、酸性、ホット販売飲料などに対応するマルチ製造ラインでは、単一の薬剤による殺菌は微生物種によって残存する可能性があるという不安が残るため、これらの併用殺菌は多種の微生物群に対して有効な殺菌方法と考える。また、例えば定期的に容器殺菌以外でラインの実液配管や充填設備内外面の殺菌工程で2種の薬剤を使い分けることで、耐性菌が発生するリスクを抑えることができるとも考えられる。

本来、食品製造においては品質向上の面から清浄環境を維持することは当然のことであり、容器、内容物、充填設備など熱、薬剤、ガスによってこれらを実現するが、長期にわたる単一薬剤での殺菌を進めることで耐性菌を産み出す可能性が高まると推測される。特に金属缶やPETボトル容器などのように量産製造する製造工程においては、内容物品種による危害菌の分析を行うことは勿論、永続的に清浄環境を維持すると共に、短時間での殺菌を確保しなければならない。本試験において紹介したデータは事例の一部に過ぎず、多様化した製造工程への展開方法・組み合わせは無数に存在すると思われる。耐性菌を産み出さない、若しくはその可能性を限りなくゼロへと近づけられる仕組み作りに、本報の考えが一助となることを期待したい。安全かつ高品質な食品製造に繋げるため、工業的利用に向けた殺菌システムの構築を目指したい。

## 参 考 文 献

- 1) Seymour S.Block,DISINFECTION,STERILIZATION, and PRESERVATION 4,Lea G Febiger hiladelphia-London, p.176 (1991)
- 2) M. G. C. Baldry,*Journal of Applied Bioteriology* **54**, pp.417-423 (1983)
- 3) 浜本典男,食品衛生学雑誌 **52**, (2), pp.99-105 (1984)
- 4) 勝野仁智, 茂呂昇,唐沢真知子,新谷英晴:防菌防黴誌 **33**, 4, pp.161-166 (2005)
- 5) 土井豊彦, 食品工業別冊, **45**, (10), pp.40-46 (2002)
- 6) 鈴木潔, 中村悌一, 小久保貞之, 富田守, 防菌防黴, **33**, (2), pp.63-71 (2005)
- 7) 渡部一仁, *PDA Journal of GMP and Validation in Japan* **3**, (2), (2001)
- 8) 近藤雅臣, 渡部一仁 (編), スポア実験マニュアル, 技報堂, pp.19-41 (1995)