

オゾンナノバブル水を用いた食品工場における洗浄・殺菌法の開発

脇田 薫*, 小幡 透**, 安藤義則*

Development of Washing and Sterilization Method Using Ozone Nano bubbles on Food Factories

Kaoru WAKITA, Toru OBATA and Yoshinori ANDO

食品分野の殺菌に広く用いられている次亜塩素酸ナトリウム（ジアソ）やオゾン水に代わるものとしてオゾンナノバブル水に着目し、殺菌効果に関する知見を得ることを目的として微生物試験や放出オゾン濃度の測定などを行った。その結果、オゾンナノバブル水はオゾン水に比べて殺菌効果の持続時間が長いこと、オゾンナノバブル水の殺菌効果はアルカリ性や有機物を含む環境の影響を受けることを確認できた。また、10Lのテドラーパックを用いた試験では、オゾンナノバブル水からのオゾンの放出は作業環境基準を超過しないことを確認した。

Keyword : オゾンナノバブル, 殺菌, 酸化力, 酵母, 有機物汚れ

1. 緒言

食品衛生法の改正により、2020年6月から原則としてすべての食品等事業者にはHACCPに沿った衛生管理の実施が制度化され、徹底した衛生管理が求められるようになった。現状、食品工場における洗浄・殺菌には安価で入手しやすい次亜塩素酸ナトリウム（ジアソ）が広く用いられているが、ジアソ特有のにおいの残存や酸性であるために金属腐食による設備の劣化などの問題も多い。

ジアソ以外の殺菌法の一つとしてオゾン殺菌があるが、水中のオゾン（溶存オゾン）は分解が速く、長く保存できない。一方、オゾンバブルは寿命が長いことが知られており、殺菌効果の持続性が期待できる。

ファインバブルは2000年頃から養殖等の水産業や農業、食品産業など多くの分野で利用されはじめ、その応用例も報告されている^{1) 2)}。当センターでもファインバブルを用いた洗浄についての基礎研究を行ってきた^{3) 4)}。ファインバブルは製造時に使用するガスの種類を変えることにより、そのガス由来のバブルを製造することができる。したがって、オゾンガスを用いてファインバブルを製造するとオゾンバブルを含んだファインバブル水を製造することができる。水中に溶解したオゾンは半減期が10~60分と短く、分解が速い。一方、気体として存在するオゾンの半減期は約16時間と長く⁵⁾、殺菌効果の持続性が期待できる。また、ナノバブルに至っては水中に長時間とどまることができるため消滅しにくく、その効果はさらに期待できる。しかし、オゾンナノバブルの食品分野における殺菌利用に関する報告はこれまでほとんどない。

そこで本研究では、オゾンナノバブルの殺菌効果に関する知見を得ることを目的とし、オゾンナノバブルの酸化力の数値化、殺菌に必要なオゾン濃度、pHや有機物が殺菌効果に与える影響について検討した。

2. 実験方法

2.1 オゾンナノバブル水の殺菌効果の経時変化

オゾンの殺菌効果は、オゾンの酸化力に由来するものであることが知られている。よって、オゾンナノバブル水およびオゾン水の酸化力を殺菌効果の指標とすることとした。市販のオゾンナノバブル水（気泡濃度 4.8×10^8 個/mL、オゾン測定値8 ppm）を比較として実験に用いた。気泡濃度はナノ粒子解析システムNS300 (Malvern Panalytical社)、オゾン測定は溶存オゾン用液体検知管（株）ガステックを用いて行った。オゾンナノバブル水50mLにヨウ化カリウム水溶液（KI）を50mL加え、KIが酸化されて遊離したヨウ素の存在を示す287nmおよび355nmの吸光度を測定し、開封直後からの経時変化を調べた。

また、吸光度を測定した後のオゾンナノバブル水に5g/Lデンプン溶液と10%クエン酸溶液を加え、0.002mol/Lチオ硫酸ナトリウムで滴定を行うことで、オゾンの酸化力の数値化を試みた。

2.2 微生物試験

オゾンナノバブル水およびオゾン水の殺菌効果を微生物試験で評価した。微生物には焼酎用酵母（鹿児島乾燥酵母5号）を用いた。乾燥酵母は定法により復水し、遠心分離による菌体回収、蒸留水による洗浄を繰り返すことで、残存する有機物を除去した。

あらかじめ攪拌子、オゾンナノバブル水または滅菌水を

*食品・化学部（現 企画支援部）

**食品・化学部

入れた滅菌済みの50mLスクリー管に、約 2×10^5 cfu/mL となるよう酵母懸濁液を添加し蓋を閉め、直ちにスターラーで攪拌しながら30秒または60秒間処理した(図1)。処理後の液は速やかに希釈液にて10倍希釈することで、処理を停止させた。その後、希釈液100 μ Lを標準寒天培地に塗抹し、30°C、2昼夜培養しコロニーを観察した。これらの操作により最終的に酵母が100倍に希釈されることから、コロニーの生育が認められない場合、99.9%以上の酵母が死滅したことになる。

2. 3 pHがオゾンナノバブル水の殺菌効果に与える影響評価

pHがオゾンナノバブル水の殺菌効果に与える影響を評価するため以下の微生物試験を行った。

オゾンナノバブル水または蒸留水に、10%水酸化ナトリウムまたは10%塩酸を加えることで、pHを1~12の範囲で適宜調整した。これらのpHを調整した検液について2. 2項の方法にて殺菌効果を評価した。なお、検液との接触時間は30秒または60秒とした。

2. 4 有機物がオゾンナノバブル水の酸化力に与える影響評価

有機物がオゾンナノバブル水の酸化力に与える影響を評価するため以下の試験を行った。

オゾンナノバブル水に1g/100mLとなるようグルコースを添加し、1、5、10および20分後に2. 1の方法にて酸化力を測定することで経時変化を調べた。なお、グルコー

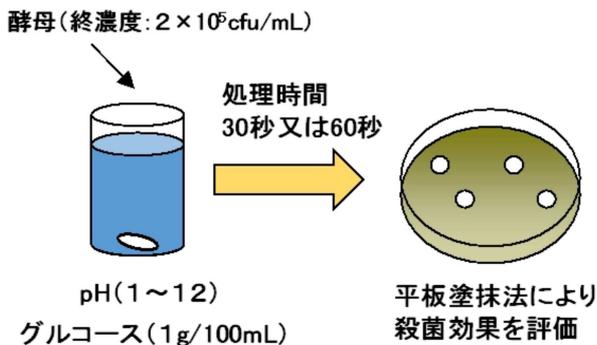


図1 微生物試験方法

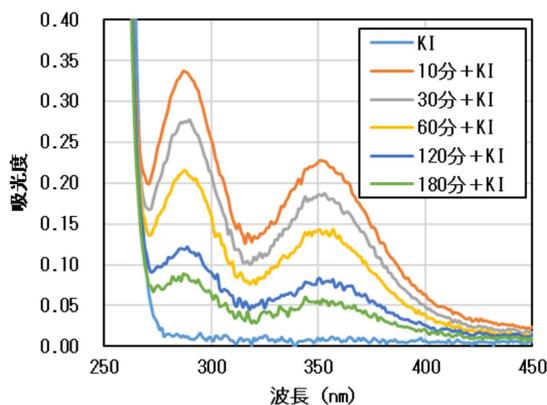


図2 KI添加後のオゾン水の吸光スペクトル

ス添加前の酸化力を100%とし、結果は相対値で示した。

2. 5 オゾンの空気中への放出量の測定

高濃度のオゾンは人体に有害であり、日本産業衛生学会により作業環境基準は0.1ppmと定められている⁶⁾。

そこで、空気10Lを含む2つのテドラーバッグ内にオゾンバブル水をシリンジで滴下し、バッグ内の空気中の30分後、90分後、210分後のオゾン濃度をオゾン用ガス検知管(ガステック(株))で測定した。オゾンバブル水の滴下量はテドラーバッグ1は10 μ L、テドラーバッグ2を1mLとした。この量はそれぞれ1000m³の空間に1L(1ppm)、100L(100ppm)のオゾンナノバブル水が存在する状況を想定したものである。

3. 結果と考察

3. 1 オゾンバブル水の製造および評価

KI添加後のオゾン水の吸光スペクトルを図2、KI添加後のオゾンナノバブル水の吸光スペクトルを図3に示す。図2より、オゾン水の酸化力は120分後には殆ど消失していることがわかる。対して、図3よりオゾンナノバブル水の酸化力は120分後も殆ど変化していないことが分かる。また、KI添加前のオゾンナノバブル水の吸光スペクトル(図4)より、オゾンナノバブル水には溶存オゾンの存在

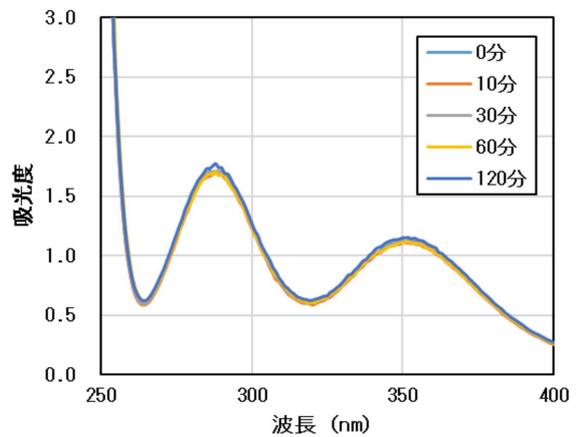


図3 KI添加後のオゾンナノバブル水の吸光スペクトル

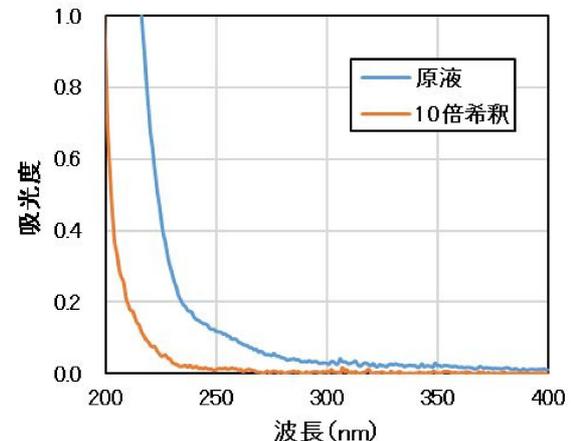


図4 KI添加前のオゾンナノバブル水の吸光スペクトル

を示す260nmの吸収が見られないことが分かる。以上のことから、オゾンナノバブル水の酸化力は溶存オゾンに由来するものではなく、オゾン水の酸化力より安定に持続していることがわかった。次に、オゾンナノバブル水のチオ硫酸ナトリウム (STS) による滴定結果を表1に示す。

オゾン量は、滴定値より以下の式で求めた。

オゾン量 (mg)

=STS消費量(mol) × オゾン分子量 × 0.5 × 1000 / 液量(L)

今回用いた滴定法は溶存オゾンの定量に用いられる方法であるが、指標としているのはオゾンの酸化力である。そのため、十分な反応時間があれば、気泡中のオゾンも溶存オゾンも評価可能であると考えられる。

この結果から、今回用いたオゾンバブル水は3.19ppmのオゾン水と同等の酸化力を示すことが分かった。

表1 オゾンナノバブル水のチオ硫酸ナトリウムによる滴定結果

	原液	2倍希釈	4倍希釈
オゾン量(ppm)	3.19	1.56	0.05

3. 2 殺菌効果の検討

3. 2. 1 殺菌力の評価

市販のオゾンナノバブル水 (気泡濃度 4.8×10^9 個/mL) を用いて、酵母懸濁液 (約 2×10^8 cfu/mL) の殺菌に必要なオゾン濃度と接触時間を明らかにするため、以下の試験を行った。

オゾンナノバブル水原液および2, 4, 10倍希釈液に酵母懸濁液を添加し、30または60秒間処理した後の酵母生菌数を平板塗抹法により計測した。その結果を表2に示す。処理時間30秒では、オゾンナノバブル水原液は酵母の生育が認められず殺菌効果を確認できた。2倍希釈液, 4倍希釈液は、わずかに酵母の生育が認められ、殺菌効果が低下した。10倍希釈液は、酵母が対照区である蒸留水と同程度生育しており、酵母に対する殺菌効果は消失していると推察された。

次に、処理時間60秒では、原液および2倍希釈液は酵母の生育が認められず殺菌効果を確認できた。4倍希釈液は、わずかに酵母の生育が認められ、殺菌効果の低下を確認した。10倍希釈液は、酵母が対照区である蒸留水と同程度生育しており、酵母に対する殺菌効果は消失していると推察された。

以上のことから、オゾンナノバブル水を用いて99.9%以上の殺菌効果を得るには、2倍希釈したオゾンナノバブル水、すなわちオゾン水約1.6mg/L相当の酸化力および処理時間60秒以上が必要であることが分かった。

3. 2. 2 pHがオゾンナノバブル水の殺菌効果に与える影響

水に溶解したオゾン (溶存オゾン) は、温度、pHなどの環境によって安定性が異なることが知られている^{7)~9)}。そこで、pHがオゾンナノバブルの安定性に与える影響を評価するため、各種pHに調整したオゾンナノバブル水に酵母を30または60秒間処理し、残存する酵母生菌数を培養法にて計測した。その結果を表3に示す。オゾンナノバブル水のpH1, 3, 7では、酵母の生育は認められず、酸化力の低減は認められなかった。一方、pH9, 12では、蒸留水と同程度に酵母が生育しており、殺菌効果は消失していることが分かった。なお、データは示さないが、対照である蒸留水ではすべてのpH試験区で酵母の生育が認められ、pHによる影響がないことを確認している。

高橋ら⁹⁾によると、溶存オゾンの安定性はpHに左右され、酸性から中性では比較的安定であるが、アルカリ性では不安定であると報告されている。詳しいメカニズムは不明ではあるが、今回の結果から、オゾンナノバブルも溶存オゾンと同様の性質を有することが明らかとなった。

このことから、実際の食品工場で、オゾンナノバブル水を利用する際には、アルカリ洗剤と併用しないなどの運用が必要であると考えられる。

3. 2. 3 有機物がオゾンナノバブル水の酸化力に与える影響

一般に、溶存オゾンは速やかに分解し、有機物の存在はそれを促進するとされている⁹⁾¹⁰⁾。

表2 微生物試験による殺菌力の評価

		原液 〔オゾン3.2mg/L 相当の酸化力〕	2倍希釈 〔オゾン1.6mg/L 相当の酸化力〕	4倍希釈 〔オゾン0.8mg/L 相当の酸化力〕	10倍希釈 〔オゾン0.32mg/L 相当の酸化力〕
処理時間 (秒)	30	○	△	△	×
	60	○	○	△	×

○:コロニーの生育なし △:コロニーの生育少数 ×:蒸留水と同程度にコロニーの生育

表3 pHが殺菌力に与える影響

反応時間 (秒)	pH				
	1	3	7	9	12
30	○	○	○	×	×
60	○	○	○	○	×

○：コロニーの生育なし
 ×：蒸留水と同程度にコロニーの生育

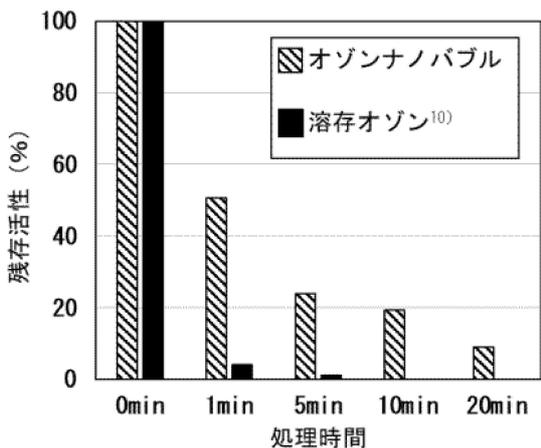


図5 グルコースが酸化力に与える影響

有機物がオゾンナノバブル水の殺菌効果に与える影響を評価するため、1 g/100mLグルコース存在下での酸化力の推移（残存活性）について評価した。その結果を図5に示す。グルコース存在下では、酸化力が徐々に低下し、1分後には残存活性約50%、10分後には約20%、20分後には約10%であった。一方、オゾン水は、永島らの報告⁷⁾によると、1分後には残存活性が5%未満まで低下しており、オゾン水よりオゾンナノバブルの方がグルコース存在下であっても比較的活性が安定していることが分かった。

永島らによると、有機物や微生物の種類により差異はあるものの、水に溶解したオゾンは1%程度の有機物存在下で急激なオゾン濃度の低下が起こることが示されている⁹⁾。今回の結果から、オゾンナノバブル水の活性低下が緩やかであったことから、有機物（汚れ）存在下であっても一定程度殺菌効果は持続することが示唆された。しかし、効果的な殺菌を行うには、オゾン水と同様に、有機物汚れを除去してからの使用が必要であると考えられた。

3. 3 オゾンの空気中への放出量の測定

2. 5項に記した2つのテドラーバッグ内気体のオゾン濃度を測定した結果、210分経過後も0.05ppm以下であることが分かった。

また、オゾン水は特有の臭気を発するが、オゾンナノバブ

ル水についてはこの実験中臭気を感じることはなかった。

以上の結果から、今回の実験ではオゾンナノバブル水からのオゾンの放出は室温では作業環境基準未満であったため、安全性が高いと考えられる。

4. 結 言

オゾンナノバブル水の殺菌効果について検討を行い、以下の結果を得た。

- (1) オゾンナノバブル水はオゾン水に比べて殺菌効果が持続する時間が長いことを示す結果が得られた。
- (2) pHがオゾンナノバブル水の殺菌効果に与える影響については、中性から酸性域では殺菌効果への影響はなかったが、アルカリ性域では殺菌効果が消失した。
- (3) 有機物がオゾンナノバブル水の酸化力に与える影響については、グルコース存在下では酸化力が徐々に低下したものの、活性低下が溶存オゾンより緩やかであり、有機物（汚れ）存在下であっても一定程度殺菌効果は持続することが示唆された。
- (4) 1000m³の空間に1 L（1 ppm）、100 L（100ppm）のオゾンナノバブル水が存在する状況を想定した実験では、オゾンナノバブル水からのオゾンの放出は210分まで作業環境基準未満であった。

参 考 文 献

- 1) 寺坂宏一，氷室昭三，安藤景太，秦隆志，ファインバブル学会連合編：“ファインバブル入門”，日刊工業新聞社，19-33(2016)
- 2) 経済産業省九州経済産業局：ファインバブル活用事例集，5-9(2018)
- 3) 脇田薫，向吉郁朗，東みなみ，小幡透，尾前宏，五島崇，二井晋：鹿児島県工業技術センター研究報告，32，25-28(2018)
- 4) 脇田薫，小幡透，安藤義則，安藤浩毅：鹿児島県工業技術センター研究報告，34，17-20(2020)
- 5) 日本食品工業学会誌，38，360-367(1991)
- 6) 日本産業衛生学会：産業衛生学雑誌，63(5)，179-211(2021)
- 7) 高橋信行，香月収：日本化学会誌，4，486-493(1981)
- 8) 松居正樹：色材，64，29-33(1991)
- 9) 内藤茂三，志賀一三：日本食品工業学会誌，29，1-10(1982)
- 10) 永島俊夫，高野克己，松本信二，鴨居郁三：日本食品低温保蔵学会誌，16，16-20(1990)