

ポストハーベストへの応用を目指した アパタイト被覆二酸化チタン光触媒の殺菌特性の評価

小出章二*・村田大地**・折笠貴寛*・武田純一*

Evaluation of Disinfectant Efficacy of an Apatite-Coated Titanium Dioxide Photocatalyst for Postharvest Application

Shoji KOIDE*, Daichi MURATA**, Takahiro ORIKASA*, Jun-ichi TAKEDA*

Abstract

We used an apatite-coated titanium dioxide photocatalyst (TiO₂-Ap), and examined its disinfecting efficacy of *Escherichia coli* and *Batillus subtilis* under UVA irradiation. Changes in the microbial populations of the *E. coli* and *B. subtilis* in the 15.0 % w/v TiO₂-Ap solution were assayed at 25°C (UVA intensity of 0.8 mW cm⁻²). Microbial populations of the *E. coli* and *B. subtilis* with 15.0 % w/v TiO₂-Ap solution or with 0.0 % w/v TiO₂-Ap solution combined with or without UVA irradiation were carried out. Remarkable disinfection was indicated under the condition of 15.0 % w/v TiO₂-Ap solution with UVA irradiation, however no significant disinfectant was found in the other conditions. Results indicated that the rates of disinfection of *E. coli* and *B. subtilis* were defined as the slope of a semi-logarithmic plot of the microorganism concentrations against irradiation time, and the D-value (decimal reduction time) of *E. coli* and *B. subtilis* were determined as 23.5 and 8.4 min, respectively. The effects of radical scavenging agents of glutathione on the disinfection were examined and it was considered that OH radicals appear to play a significant role in the mechanism of disinfection. Furthermore, we trapped the airborne microorganisms into the glass bottles containing 15.0 % w/v TiO₂-Ap solution at a postharvest facility, and disinfection of bacteria, and moulds and yeasts, were examined under UVA irradiation. Results showed that most of the microbial populations in the TiO₂-Ap solution reduced to uncountable levels. Recently, new global standards such as Good Agricultural Practices (GAP) have been introduced for agricultural facilities and there are strong demands for improvements in food safety, occupational safety and environmental conservation in the facilities. Thus, our data provide basic information regarding reduction of bacteria, and it can be considered that TiO₂-Ap would be beneficial disinfection method in postharvest facilities.

[Keywords] disinfection, apatite-coated titanium dioxide photocatalyst, *Escherichia coli*, *Batillus subtilis*, postharvest

1. はじめに

農業生産管理工程 (GAP) のグローバルスタンダード化に伴い、ポストハーベスト工程でも食品の安全性向上、環境の保全、労働安全の確保などの点検・評価を行う施設が増えてきている。これまで著者らは「農産施設・食の安全性確保」の研究に力点を置き、青果物の殺菌方法の開発 (Koide et al., 2009; Koide et al., 2011) を進めてきた。近年は、農産施設内の空中浮遊菌の濃度やその同定を行うとともに (Koide et al., 2012), 電気集じん法を用いることで高い効率で空中浮遊物質や空中浮遊菌の捕集ができ (Koide et al., 2013), ま

たアパタイト被覆二酸化チタン水溶液 (光触媒) を用いれば、農産施設由来の浮遊菌を太陽光程度の紫外線強度で水中滅菌できることを報告 (村田ら, 2011; 村田ら, 2012) した。更に、光触媒溶液はバブリング装置を設けることで装置内に組み込むことができ、入気した空気は、湿度を一定として排気することができるので、特に青果物貯蔵施設など高湿度環境内での空中浮遊菌の殺菌に対して有効であり、光触媒自体は自己殺菌能を有するため太陽光などを用いてメンテナンスできることを提案した (村田ら, 2011; 村田ら, 2012)。よって光触媒溶液による殺菌法は、農業施設内の新たな空

* : 岩手大学農学部 盛岡市上田 3-18-8

** : 同上。現在、(株)シジシージャパン 東京都新宿区

気洗浄の手法としても有効であると考えられる。本研究は、この光触媒を用いた殺菌技術に関する基礎殺菌特性の収集を目的として、アパタイト被覆二酸化チタンを用いてラボスケールで殺菌測定を行い、併せてその殺菌メカニズムを検討した。更に、実際の農産施設(穀物貯蔵施設)の現場にて空中浮遊菌を捕捉した溶液に光触媒を入れてUVA照射の条件のもと光触媒水中殺菌を試みたので報告する。

2. 材料および測定方法

(1) 材料

1) 供試菌

Escherichia coli NBRC 3301 (以後、大腸菌と称す) と *Batillus subtilis* (以後、枯草菌と称す) NBRC 3009を用いた。菌株はいずれも(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから入手した。

大腸菌は37°Cの温度にて24時間BHI (Brain Heart Infusion) 液体培地で、枯草菌は37°Cの温度にて24時間NA (Nutrient agar) 液体培地で液体培養し、これを3000 rpm, 10分間で遠心分離し、上澄みの液体培地を取り除いた後、PBS (Phosphate-Buffered Salines) を加えてホモジナイズし、再度同条件で遠心分離を行って菌体を抽出し、10%グリセロールを含有させたPBSにて-20°Cでグリセロールストックして保存した。

2) 光触媒と紫外線ライト

光触媒はアパタイト被覆二酸化チタン光触媒 (Nanowave, NSP-P001, Japan) (以後、Ap-TiO₂と称す) を用いた。この光触媒は、二酸化チタン光触媒の塗膜や粒子の表面に、ナノサイズのアパタイト結晶を直接析出させた多機能性セラミックス複合材料である (Koide and Nonami, 2007)。紫外線はブラックライト (367nm, 14W) を用いてUVA照射した。本測定ではUVA紫外線強度は0.8 mW/cm² と太陽光より若干弱い強度とした。

(2) 測定方法

1) 大腸菌および枯草菌を用いた殺菌試験

a. 大腸菌の殺菌試験

グリセロールストックした大腸菌をBHI液体培地にて37°Cで24時間培養後、菌懸濁液を作成しこれを滅菌生理食塩水にて10⁵ CFU/mLとなるようにビーカー内で希釈調整した。次に、Ap-TiO₂を濃度15% w/vとなるように調整した後、ビーカー上面をラッピング用フィルムでシールした。その後、溶液の温度を25°Cに保ち攪拌しながら、以下の測定条件で菌数の経時変化を測定した。

①菌懸濁液 + Ap-TiO₂ + ブラックライト照射 (光触媒区), ②菌懸濁液 + Ap-TiO₂ + 暗黒条件 (光触媒コントロール区), ③菌懸濁液 + ブラックライト照射 (UVコントロール区), ④菌懸濁液 + 暗黒条件 (コントロール区), ⑤菌懸濁液 + Ap-TiO₂ + ブラックライト照射 + グルタチオン (グルタチオン添加区: グルタチオン濃度は50 mM)。

b. 枯草菌の殺菌試験

グリセロールストックした枯草菌をNA液体培地にて37°Cで24時間培養後、菌懸濁液を作成し滅菌生理食塩水にて10⁵ CFU/mLとなるようにビーカー内で希釈調整した。紫外線強度や、グルタチオン添加量、実験条件や実験手順は前述と同条件である。

2) 農産施設の空中浮遊菌を用いた殺菌試験

岩手県内の農産施設Aに滅菌生理食塩水300 mLの入ったデュラン瓶を持ち込み、インピンジャー法 (Koide et al., 2013) を用いて空中浮遊菌を捕集した。図1に空中浮遊菌の捕集装置の概略図を示す。実験装置は、空気流入用ビニールチューブ、インピンジャー、流量計 (Kofloc, RK1710)、エアーポンプ (テクノ高槻, C-5BH) により構成した。使用するインピンジャーおよび内部の生理食塩水300 mLは予めオートクレーブにより滅菌し、リアクタおよびチューブは75%アルコールで殺菌した。施設内の空気は、流量計により10 L/minに調整して、装置最後段のエアーポンプにより装置内に引き込んだ。捕集時間は100分とした。この微生物懸濁液を即座に実験室に搬入し、微生物懸濁液を30mL採取して、Ap-TiO₂を濃度15% w/vとなるように入れ、ブラックライト照射 (0.8 mW/cm²) したものを光触媒処理区とした。測定後0時間と24時間後の一般生菌数とカビ・酵母数を測定した。

3) 微生物の計測方法

大腸菌、枯草菌ともに測定溶液から採取した微生物懸濁液を適宜希釈し、TSA培地 (枯草菌はNA培地) に塗抹して、これを37°Cの条件下で24時間培養し、そのCFUから生菌数 (CFU/mL) を算出した。検出限界は10 CFU/mLであった。生存比 S は、次式で計算した。

$$S = \log_{10}(N / N_0)$$

ここに、 N は生菌数、 N_0 は初菌数である。

農産施設での実証試験においては、一般生菌数は微生物懸濁液を適宜希釈し、その0.1 mLを標準寒天培地に塗抹し、これを37°Cの条件下で48時間培養し、そのCFUから一般生菌数 (CFU/mL) を算出した。カビ・酵母数は、抽出液から0.1 mLをPDA培地に塗布し、これを5日間25°Cの条件下で培養し、そのCFUを計測し希釈倍率からCFU/mLを算出した。

(3) 統計解析

各データ間の有意差検定は、多群間比較はTurkeyの方法を、2群間比較はstudentの t 検定を用いた。有意水準は5%とした。

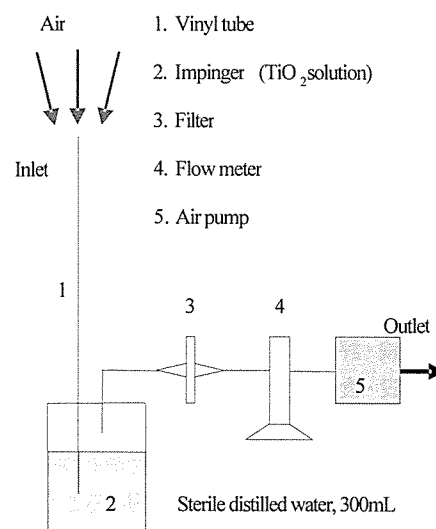


図1 農産施設の空中浮遊菌の捕集装置の概略図

3. 測定結果および考察

(1) 大腸菌および枯草菌を用いた殺菌試験の結果

Ap-TiO₂濃度15.0% w/v における殺菌試験の結果を図2 (大腸菌を供試菌株とした場合)と図3 (枯草菌の場合)に示す。図2を見ると、実験条件①の光触媒区では殺菌時間による有意な菌数の減少が見られ、他の3条件(実験条件②~④)では測定で得られた菌数は初菌と比較して有意な差は見られなかった。枯草菌の場合も、図3に見られるように実験条件①の光触媒区では、殺菌時間による有意な菌数の減少が見られた。また、他の3条件(実験条件②~④)では測定で得られた菌数は初菌と比較して有意な差は見られなかった。この図2および図3に示した各測定条件(実験条件②~④)の測定結果については以下に詳しく考察する。

1) アパタイトが殺菌に与える影響

本研究に用いたAp-TiO₂に被覆されているアパタイトはヒドロキシアパタイトCa₁₀(PO₄)₆(OH)₂であり、生物の骨や歯を構成する物質である。このアパタイトの特徴としては、タンパク質を構成するアミノ酸等の吸着機能が挙げられる(青木, 1993)。よって、細菌が大量にアパタイトに吸着すると測定結果に影響を与えることもあるため、実験条件②の測定によりアパタイトが殺菌に与える影響を検証した。実験条件②の結果を見ると、今回の測定では大腸菌および枯草菌の菌数の経時変化は初菌と比較して有意な差は見られなかった(実験条件②)。よって今回の殺菌試験では、アパタイトによる菌の吸着の影響は無視できるものと考えられる。

2) UVA紫外線が殺菌に与える影響

図2と図3を見ると、大腸菌および枯草菌の菌数の経時変化(実験条件③)は初菌と比較して有意な差は見られなかった。通常、254nm付近の波長の紫外線は最も殺菌力強いが、今回使用したUVA紫外線ライトの波長域は367nmである。60分のUVA紫外線(365nm, 15W)を照射しても大腸菌数の増減に影響を与えないという報告(Kühn et al., 2003)もあり、本研究においても同様の結果が得られた。

3) 溶液温度が測定中の微生物の増殖に与える影響

実験条件④の結果(図2と図3)を見ると、今回の測定時間では、大腸菌および枯草菌の菌数の経時変化は初菌数と比較して有意な差は見られなかった。一般に、中温域において細菌は時間とともに増殖するが、本測定温度は25℃であったことと、測定時間が最大90分であったことから大腸菌、枯草菌ともに初菌と比べ有意な増殖は見られなかった。

4) アパタイト被覆二酸化チタン光触媒の殺菌メカニズム

以上の実験条件①, ②, ③, ④の結果よりアパタイトの影響や、UVA紫外線の影響、溶液温度の影響を受けることなく、UVA照射下でAp-TiO₂は溶液内の大腸菌や枯草菌を殺菌できることが示された。次にAp-TiO₂の殺菌メカニズムを検討・考察する。一般に、二酸化チタンの水中殺菌における殺菌メカニズムはヒドロキシルラジカル等の活性酸素種を主としたラジカル生成による影響が大きいとされる(Dadjour et al., 2006)。そこで本研究で用いられるAp-TiO₂の殺菌メカニズムも二酸化チタン光触媒と同様であるかを検証することとした。すなわち、実験条件①の光触媒区にラジカルスカベンジャーであるグルタチオンを添加した実験条件⑤の結果を基に検討した。このラジカルスカベンジャーは、活性酸素種を補足する

物質であり、本研究においてもAp-TiO₂によって発生が想定される活性酸素種を捕捉する物質として使用した(Dadjour et al., 2006)。

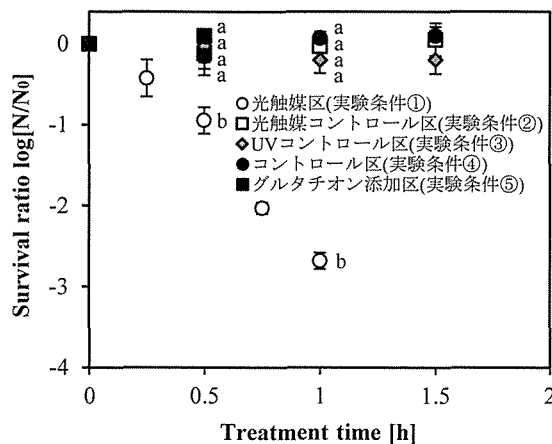


図2 光触媒水中殺菌における菌数の経時変化(大腸菌)

注: 異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

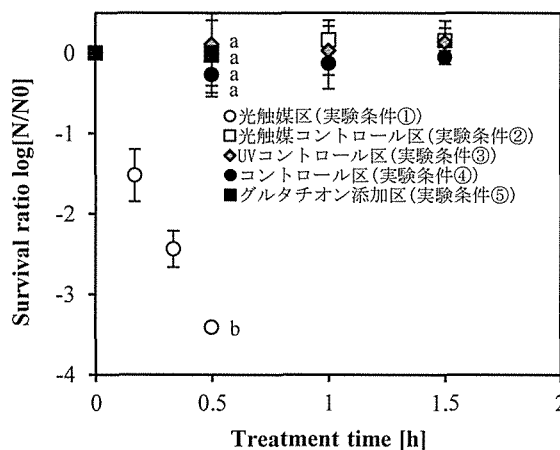


図3 光触媒水中殺菌における菌数の経時変化(枯草菌)

注: 異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

表1 農産施設の空中浮遊菌を捕捉した菌懸濁液を用いたAp-TiO₂の水中殺菌試験の結果

	初菌	光触媒区
一般生菌数 (log ₁₀ CFU/mL)	3.23 ± 0.30	ND (9/10)
カビ酵母数 (log ₁₀ CFU/mL)	3.10 ± 0.02	ND (8/10)

注: NDの()内は全測定培地数に対するNDの割合を示す

注: NDとは菌が全く検出されなかったことを示す

実験条件⑤の測定結果を見ると、グルタチオン添加区では菌数が初菌に比較して有意な差が見られなかった(図2)。また、枯草菌の菌数も初菌に比較して有意な差が見られなかった(図3)ことから、グルタチオンの添加は、殺菌反応を阻害したといえる。このことから、 Ap-TiO_2 も二酸化チタン光触媒と同様、殺菌の主要メカニズムはヒドロキシラジカル等の活性酸素種を主としたラジカル生成であることが推察される。

5) D値について

図2より殺菌試験のデータを指数関数で近似して大腸菌のD値を求めたところ、23.5 minと算出された。また図3より枯草菌のD値は8.4 minと計算された。これまで、我々は、農産施設内由来の塵埃や糞殻をUVA照射下で Ap-TiO_2 を用いて殺菌したときに、 Ap-TiO_2 濃度によって殺菌結果が異なると報告(村田ら, 2011)したが、今後は Ap-TiO_2 濃度が殺菌効率に与える影響についてUVA強度や溶液温度を含めて詳細に検討し、最適な殺菌手法について検討したいと考える。

(2) 農産施設の空中浮遊菌を用いた殺菌試験の結果

表1に農産施設内での空中浮遊菌の光触媒を用いた殺菌試験の結果を示す。表1の結果を見ると、採取した溶液中の一般生菌およびカビ・酵母は、24時間の Ap-TiO_2 による水中殺菌でほぼ滅菌できたことが分かる。

以上、本研究はラボスケールにて Ap-TiO_2 の殺菌メカニズムを解明し、また Ap-TiO_2 の光触媒殺菌の基礎的殺菌特性について基礎的知見を収集したものである。これまで著者らは実際の農産施設から採取した塵埃中の菌に対して光触媒殺菌試験を行い、 Ap-TiO_2 を用いることにより農産施設から採取した塵埃由来微生物を十分に殺菌できることを報告している(村田ら, 2011)。本実験は、それに加えて実際の農産施設の現場にて空中浮遊菌をトラップし、 Ap-TiO_2 を用いて光触媒水中殺菌の実証試験を行い、パブリック装置(Ap-TiO_2 とUVA照射をハイブリッドとした装置)を想定した現場での応用が可能かを検証したものである。 Ap-TiO_2 を用いた水中殺菌は、農産施設の場での殺菌手法として応用が可能であると考えられる。

4. 摘要

大腸菌と枯草菌を供試菌としてアパタイト被覆二酸化チタン光触媒(Ap-TiO_2)の殺菌メカニズムの解明を解明するとともに、殺菌特性の評価をラボスケールで行った。更に、実際の農産施設(穀物貯蔵施設)の現場にて空中浮遊菌を捕捉した菌懸濁液に対して、 Ap-TiO_2 を用いてUVA照射のもと光触媒水中殺菌を試みた。その結果、以下の知見を得た。

- 1) Ap-TiO_2 を用いた光触媒殺菌の主要な殺菌メカニズムは、活性酸素種によるものと推察された。
- 2) 本測定条件における大腸菌、枯草菌の光触媒殺菌のD値はそれぞれ23.5 min, 8.4 minであり、 Ap-TiO_2 の殺菌特性は指数関数を用いて近似できることが示された。
- 3) 実際の穀物貯蔵農産施設の現場にて空中浮遊菌を捕捉した菌懸濁液に対して、 Ap-TiO_2 を用いてUVA照射のもと光触媒水中殺菌を試みた結果、溶液中の一般生菌およびカビ・酵母は、24時間の Ap-TiO_2 による水中殺菌でほぼ滅菌できた。

今回得られた知見は、今後の農産施設内の環境改善を想定した光触媒の殺菌技術の開発に資する知見を与えるものとする。

5. 謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金(基盤研究(C), 70292175)の助成により実施されたものである。また、ナノウェイヴ株式会社にはアパタイト被覆二酸化チタン光触媒の提供、および関連の情報提供等の協力を得た。更に、岩手大学農学部農産物流通科学研究室の専攻生には多大な協力を頂いた。ここに記して謝意を表す。

6. 参考文献

- 1) Koide, S., Takeda, J., Shi, J., Shono, H., Atungulu, G.G., 2009. Disinfection efficacy of slightly acidic electrolyzed water on fresh cut cabbage., *Food Control*, 20, 294-297.
- 2) Koide, S., Shitanda, D., Note, M., Cao, W., 2011. Effects of mildly heated, slightly acidic electrolyzed water on the disinfection and physicochemical properties of sliced carrot., *Food Control*, 22, 452-456.
- 3) Koide, S., Yasokawa, D., Omoe, K., Uchino, T., 2012. Concentration of airborne microorganisms in a rice storage facility., *Journal of JSAM*, 74(3), 244-246.
- 4) Koide, S., Nakagawa, A., Omoe, K., Takaki, K., Uchino, T., 2013. Physical and microbial collection efficiencies of an electrostatic precipitator for abating airborne particulates in postharvest agricultural processing., *Journal of Electrostatics*, 71, 734-738.
- 5) 村田大地, 小出章二, 武田純一, 村上 光, 2011. 農産施設における空中浮遊菌の殺菌に関する基礎的研究, 平成23年度農業機械学会東北支部大会講演要旨, 13-14.
- 6) 村田大地, 小出章二, 折笠貴寛, 内野敏剛, 2012. アパタイト被覆二酸化チタン光触媒殺菌の基礎的特性の解明と、そのポストハーベストへの応用, 農業環境工学関連学会2012年合同大会講演要旨集(PDF-version, ISSN 1880-2087)
- 7) Koide, S., Nonami, T., 2007. Disinfecting efficacy of a plastic container covered with photocatalyst for postharvest., *Food Control*, 18, 1-4.
- 8) 青木幸子, 1993. ヒト唾液タンパク質の合成ハイドロキシアパタイトへの吸着, *歯科医学誌*, 56, 459-474.
- 9) Kühn, K.P., Chaberny, I.F., Massholder, K., Stickler, M., Benz, V.W., Sonntag, H.G., Erdinger, L., 2003. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light., *Chemosphere*, 53, 71-77.
- 10) Dadjour, M.F., Ogino, C., Matsumura, S., Nakamura, S., Shimizu, N., 2006. Disinfection of *Legionella pneumophila* by ultrasonic treatment with TiO_2 ., *Water Research*, 40, 1137-1142.