

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：27101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780073

研究課題名（和文） アルギン酸膜への光触媒複合化と新規種子殺菌法の構築

研究課題名（英文） Antibacterial activity of alginate gel supported photo-catalytic and application to seed sterilization.

研究代表者

森田 洋 (MORITA HIROSHI)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：30321524

研究成果の概要（和文）：

本研究では、アルギン酸ゲルの三次元的な網目構造が光触媒の接触効率を高めることに着目をし、可視光応答型光触媒をアルギン酸ゲルに包括固定化することにより、高殺菌機能性を有する光触媒固定化膜の創生を行い、本膜の種子殺菌への応用について検討を行った。本膜の殺菌機能は S-TiO₂ に銅を共存させることにより相乗的な殺菌効果が認められ、ビーズ状に成型加工することで、種子殺菌性能を飛躍的に向上させることが可能となった。また本光触媒は、従来法である次亜塩素酸ナトリウムによる種子殺菌法では困難であった、種子の発芽や成長に影響を与えることなく種子殺菌が可能となったことから、種子殺菌以外にも防菌防黴分野などへの幅広い利用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

The antibacterial activity of immobilized photo-catalytic in alginate gel was investigated under visible light illumination. TiO₂ or S-TiO₂ in the alginate gel did not reveal visible light-induced antibacterial activity. The antibacterial activity increased when copper was added to the S-TiO₂ as supplements. The immobilized S-TiO₂+Cu 7% (w/w) in alginate gel beads were showed high antibacterial activity by photo-catalytic activity. This result showed alginate gel beads were usefulness as the photo-catalytic carrier. In addition, when the immobilized S-TiO₂+Cu in alginate gel beads applied to seed sterilization, it was possible to sterilize without affecting the germination and the sprout length.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物制御学、環境微生物学、食品衛生学

1. 研究開始当初の背景

1996年に大阪府堺市を中心に全国的に発生した腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事件によりカイワレ大根がクローズアップされ、以来種子殺菌が徹底されるようになった。この事件を契機に農林水産省もカイワレ大根の農家に対して、衛生管理マニュアルの作成を指示するなど、積極的な指導を行っている。またカイワレ大根だけでなく、ミズナ、ミツバなどの加熱調理しない水耕栽培野菜類についても、同様に厳しい種子殺菌法の構築が望まれている。

種子殺菌法で日本も含めて世界で広く用いられているのが次亜塩素酸処理法である。しかしながら次亜塩素酸による種子殺菌は、抗菌効果の持続性が短く、発芽率の低下、成長遅延など大きな問題を抱えている。これまで申請者らは次亜塩素酸ナトリウムや天然系抗菌剤（ピロ種抽出液）を用いて、大腸菌数、カイワレ大根全長、発芽率の3ファクターについて最適化試験を行った結果、いずれも濃度をあげることで大腸菌の制御が可能であったが、発芽率の低下や成長遅延が認められ、種子殺菌法としては大きな問題点を孕んでいた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、新しい種子殺菌法の構築を目的として、2段接触法（特願2009-014483）によりアルギン酸膜の調製し、これに可視光応答型光触媒(S-TiO₂+Cu)を複合化することにより、殺菌機能性を付与した新しい高機能性膜の創出を行った。アルギン酸膜の三次元的な網目構造が光触媒の接触効率を高めることで、高い殺菌効果の付与が可能となる。更にこの高機能性膜を用いて、カイワレ大根種子表面に非病原性大腸菌を人為的に付着させた汚染種子を用いた種子殺菌作用を明らかとすることで、本高機能性膜の種子殺菌への利用可能性について検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 光触媒のアルギン酸膜への複合化

2段接触法の1段目（低濃度の2価金属塩とアルギン酸塩を接触させて、弱いゲルを調製するプロセス）に可視光応答型光触媒(S-TiO₂)を複合化させた。複合化後、2段目（高濃度の2価金属塩と1段目のアルギン酸塩ゲルを接触させて、高い強度の膜を生成するプロセス）により、アルギン酸膜の高機能化を行った。また、光触媒に銅を複合化させることによる殺菌機能性の強化についても検討を行った。更に、光触媒担持体の標準物質であるナフィオン（デュポン社）との殺菌効果比較について評価を行った。

(2) アルギン酸のビーズ加工化

種子の殺菌機能性強化を目的として、光触媒を複合化したアルギン酸ゲルをビーズ状に成型加工した。光触媒には、S-TiO₂+Cu(7wt%)を用いた。2%アルギン酸ナトリウム水溶液100 mLに、光触媒粉末を2.0 g/Lとなるよう添加し、5分間超音波処理を行うことで光触媒粉末を分散させた。チューブの先端に注射針(0.63×25 mm)を取付けたペリスタポンプを用いて、この光触媒-アルギン酸ナトリウム混合液を、15 mL/hで20 g/Lに調製した塩化カルシウム水溶液中に滴下した。滴下後、4°Cで24時間静置し、蒸留水で洗浄したものを光触媒担持アルギン酸ゲルビーズ（粒径平均2.16 mm）として種子殺菌試験に使用した。

(3) 種子殺菌法

種子の汚染指標菌にはグラム陰性菌である *Escherichia coli* NBRC 3972 およびグラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 を用いた。種子殺菌法は以下のように行った。シャーレに、滅菌水12 mL、光触媒担持アルギン酸ゲルビーズ約1000粒および汚染種子、あるいは未処理種子50粒を添加し、25°C、60 rpmにおいて振とうしながら20000 Lxの光を照射して種子の殺菌を行った。

(4) 発芽・成長に影響を受けない種子殺菌法の構築

殺菌した種子は、ろ紙上に出して水分を取り、シャーレ上に並べて40°Cの乾燥機内で1時間乾燥させた。滅菌済みガーゼを敷き、滅菌水30 mLを添加したシャーレ上に、殺菌処理後の種子をそれぞれ20粒ずつ播種し、室温(19°C±1)において栽培3日目までは発芽を促すために暗所で、4日目以降は光照射下で栽培して緑化させた。また4日目以降は、1日1回滅菌水を添加しながら栽培を行った。種子殺菌の検討項目として、栽培2日後の生菌数、栽培3日後の発芽率、栽培7日後の全長の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 光触媒のアルギン酸膜への複合化

光触媒のアルギン酸膜への複合化では、2段接触法（特許2009-014483）を応用することで、分散性の高いアルギン酸膜の創製に成功した。つまり、1段目（低濃度の2価金属塩とアルギン酸塩を接触させて、弱いゲルを調製するプロセス）に可視光応答型光触媒(S-TiO₂)を複合化させた後、スプレーガンによりガラス板にコーティングを行った後に乾燥を行い、高濃度の2価金属塩と1段目の

アルギン酸塩ゲルを接触させて、高い強度の膜を生成するプロセス（2 段階目）を行うことで得た。本膜の殺菌機能は S-TiO₂ に銅を共存させることにより相乗的な殺菌効果が認められ、30000 Lx 及び 1700 Lx の光強度において、3 時間の接触で最大 7 オーダー程度の大腸菌数の低下が確認された (Fig. 1)。この殺菌活性は、光触媒の固定化担体として市場において広く使用されているナフィオン樹脂（デュポン社）と比べても、はるかに高い殺菌機能性であった (Fig. 2)。

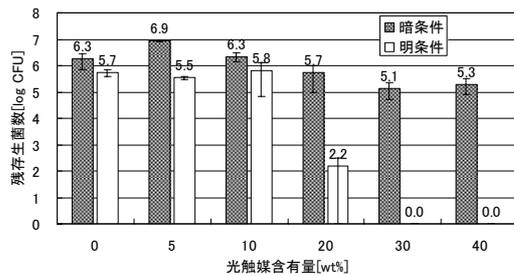


Fig. 1 アルギン酸膜に複合化した光触媒の殺菌機能性(1700 Lx)

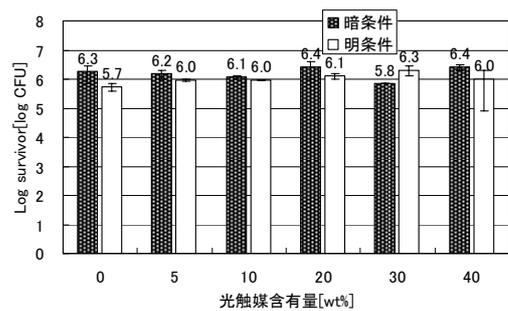


Fig. 2 ナフィオンに担持した光触媒の殺菌機能性(1700 Lx)

(2) アルギン酸のビーズ加工化

本研究の最終目的でもある種子殺菌を考えると、光触媒と種子の接触効率を上げることが重要な課題となることから、光触媒を複合化したアルギン酸ゲルをビーズ状に成型加工を行ったものについて殺菌機能性を評価した。その結果、高機能性アルギン酸ゲルをビーズ状（平均粒径：2.16 mm）に成型加工することで、光触媒 S-TiO₂+Cu(7 wt%)におけるカイワレダイコン種子の種子殺菌性能を飛躍的に向上させることが可能となった。グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌とグラム陰性菌である大腸菌の2種の汚染種子をそれぞれ調製し、25°Cで20000 lxの可視光を照射した結果、11時間以上処理することにより大腸菌を、12時間以上処理することにより黄色ブドウ球菌を完全に制御することが可能であった (Fig. 3)。この殺菌効果は暗条件に比べて明条件の方が高かったことから、本ビーズの殺菌効果は光触媒に起因しているこ

とが明らかとなった。

また、磁器タイルおよびアルマイト板に S-TiO₂+Cu を高速フレーム溶射した光触媒で、同様に大腸菌の汚染種子を調製して種子殺菌を試みたところ、20000 lx、15時間の接触では殺菌効果がほとんど認められなかった。これは磁器タイル表面が平面に対して、アルギン酸ゲルビーズは種子と同じ球状であったことから、種子表面とアルギン酸ゲルビーズ表面との接触効率が上がり殺菌効果が上回ったものと推察された。

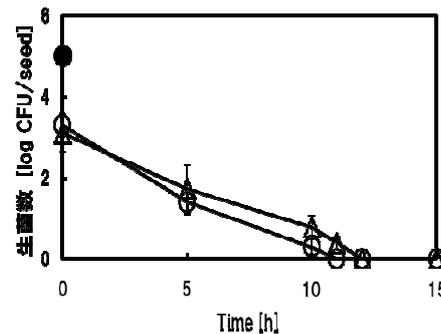


Fig. 3 光触媒包括固定化アルギン酸ゲルビーズによる種子殺菌

○ ; *E. coli* △ ; *S. aureus* ● ; 未処理種子

(3) 発芽・成長に影響を受けない種子殺菌法の構築

S-TiO₂+Cu(7 wt%)担持アルギン酸ゲルビーズによる発芽・生長への影響を Fig. 4 及び Fig. 5 に示す。その結果、S-TiO₂+Cu(7 wt%)担持アルギン酸ゲルビーズと種子の処理時間の経過に伴う発芽率の低下や生長阻害は認められなかった。さらに、未処理の種子を栽培した場合の発芽率・カイワレダイコン全長と比較しても、本ビーズによる影響は認められなかった。以上の結果より、S-TiO₂+Cu(7 wt%)担持アルギン酸ゲルビーズは発芽・生長に影響を及ぼすことなく種子に付着させた大腸菌および黄色ブドウ球菌を殺菌できることが明らかとなった。

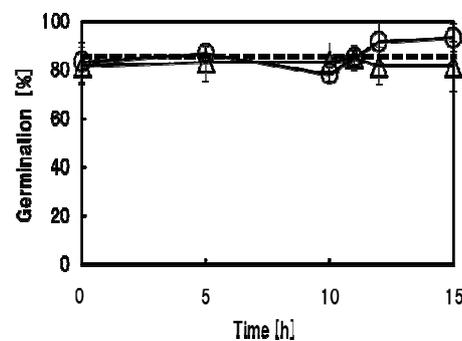


Fig. 4 種子殺菌後の種子の栽培3日後の発芽率

○ ; *E. coli* △ ; *S. aureus* --- ; 未処理種子

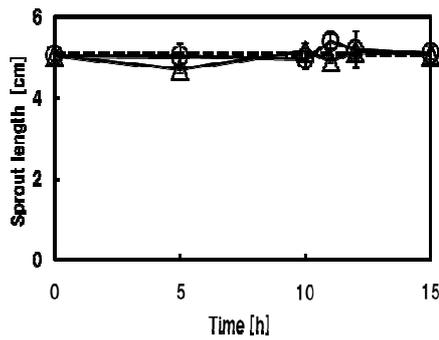


Fig. 5 種子殺菌後の種子の栽培7日後の
カイワレダイコン全長

○; *E. coli* △; *S. aureus* —; 未処理種子

(4) 従来法との比較検討

①次亜塩素酸ナトリウム

従来法である次亜塩素酸ナトリウムを用いた殺菌法では、米国食品医薬品局推奨値である 20000 ppm, 1 時間の接触で、大腸菌汚染種子の栽培2日後の生菌数は検出されなかったが、同時に大幅な発芽率の低下や成長阻害が認められた。以上の結果より、アルギン酸ゲルに包括固定化した光触媒の種子殺菌への利用の有用性が示唆された。

②焼成カルシウム

焼成カルシウムによる種子殺菌では、1000 ppm において5時間、または250 ppm において12時間以上処理を行うことで大腸菌は検出されなかったが、1000 ppm、5時間の殺菌は、発芽率を40%程度まで低下させる結果となった。しかし、250 ppm における殺菌では、12時間以上の処理を行っても、発芽率は90%以上を維持していた。すなわち、低濃度焼成カルシウムによる長時間の殺菌は、発芽率を大きく低下させることなく大腸菌を殺菌できた。このように焼成カルシウムは濃度や接触時間を制御すれば、種子殺菌として有効な手法であるが、ハンドリングの容易さという観点から考えれば、光触媒による種子殺菌の方が優位であると思われる。

(5) 水耕栽培農家を対象とした種子殺菌実証的研究

カイワレ生産農家が使用している種子を用いて、種子に含まれる一般細菌を対象として同様に種子殺菌の実証的研究を行った (Fig. 6)。その結果、 10^6 CFU/seed もの細菌に汚染されていた種子の菌数を 20,000 lx, 12 時間の接触により、約 4.5 オーダーの殺菌効果が認められた。また光触媒がカイワレ農家使用種子の発芽・生長に与える影響はほとんど認められなかった。

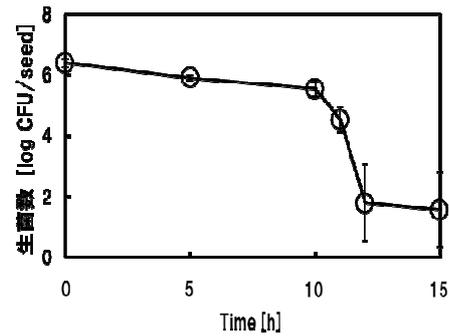


Fig. 6 カイワレ生産農家が使用する種子の殺菌

以上の結果より、アルギン酸膜に包括固定化した光触媒は、従来法である次亜塩素酸ナトリウムによる種子殺菌では困難であった、種子の発芽や成長に影響を与えることなく種子殺菌が可能となった。

ビーズ状に成型加工した光触媒包括固定化アルギン酸ゲルは繰り返し利用が可能であり、ゲルのサイズと種子のサイズの違いにより、殺菌処理後も比較的容易に種子の分離が可能であることから、これらの特性を加味した殺菌処理装置の開発が今後の課題としてあげられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- 1) Tsubasa Fukuda, Megumi Maeda, Yuki Imamura, Takahiro Satou, Mariko Oonaka, and Hiroshi Morita; Visible-Light Induced Antibacterial Activity of Copper-supplemented Sulfur-doped TiO₂, *Indoor Environment*, 査読有, **13**(1), 21-30 (2010)
- 2) 田部井陽介、山平真由、小川あかね、恵良真理子、福田 翼、森田 洋; 金属担持 S-TiO₂ による *Legionella pneumophila* の抗菌効果、防菌防黴、査読有、**40**(3)、135-142 (2012)
- 3) 伊勢田弘太郎、大中真莉子、二宮純子、森田 洋; 焼成カルシウムによる発芽・成長に配慮した種子殺菌法の構築、防菌防黴、査読有、印刷中 (2012)

[学会発表] (計20件)

- 1) 森田 洋、伊勢田弘太郎、石野靖浩、恵良真理子、田部井陽介、「可視光応答型光触媒担持アルギン酸膜の殺菌効果、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会 (東北大学)、2010 年 6 月
- 2) 森田 洋、石野靖浩、伊勢田弘太郎、田部井陽介、恵良真理子、光触媒を複合化させたアルギン酸膜の殺菌効果、日本食

- 品工学会第 11 回年次大会（東京海洋大学）、2010 年 8 月
- 3) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、新規製膜法を用いたアルギン酸の光触媒担体としての利用、日本農芸化学会西日本支部大会（崇城大学）、2010 年 9 月
 - 4) 森田 洋、大中麻莉子、伊勢田弘太郎、惠良真理子、田部井陽介、発芽及び生長に配慮したカイワレダイコン種子の殺菌、日本防菌防黴学会（きゅりあん）、2010 年 9 月
 - 5) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、アルギン酸の新規製膜法と光触媒担体としての利用、日本防菌防黴学会（きゅりあん）、2010 年 9 月
 - 6) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、光触媒を担持したアルギン酸膜の殺菌効果、日本生物工学会九州支部大会（琉球大学）、2010 年 12 月
 - 7) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、新規製膜法を用いたアルギン酸の光触媒担体としての利用と抗菌活性、平成 22 年度室内環境学会学術大会（横浜市開港記念会館）、2010 年 12 月
 - 8) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、新規製膜法を用いたアルギン酸の光触媒担体としての利用と殺菌効果、日本農芸化学会中国四国支部第 29 回講演会（徳島大学）2011 年 1 月
 - 9) 伊勢田弘太郎、鷲巢 孝、森田 洋、アルギン酸ゲルビーズによる光触媒の包括固定化と殺菌効果、日本農芸化学会 2011 年度大会（京都女子大学）2011 年 3 月
 - 10) 鷲巢 孝、伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、アルギン酸の新規製膜法と光触媒担体としての利用、日本農芸化学会 2011 年度大会（京都女子大学）2011 年 3 月
 - 11) 森田 洋、光触媒担持アルギン酸膜の殺菌効果、日本家政学会第 63 回大会（和洋女子大学）2011 年 5 月
 - 12) 伊勢田弘太郎、大中真莉子、田部井陽介、惠良真理子、森田 洋、発芽・成長に影響を及ぼさない新規種子殺菌法の構築、環境バイオテクノロジー 2011 年度大会（東京大学弥生講堂）2011 年 6 月
 - 13) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、田部井陽介、惠良真理子、森田 洋、アルギン酸ゲルビーズの光触媒担体としての利用と殺菌効果、日本食品工学会第 12 回年次大会（京都テルサ）2011 年 8 月
 - 14) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理

- 子、田部井陽介、森田 洋、光触媒を担持したアルギン酸ゲルビーズの殺菌効果、日本防菌防黴学会 第 38 回年次大会（千里ライフサイエンスセンター）2011 年 8 月
- 15) Koutaro ISEDA, Yasuhiro ISHINO, Mariko Era, Yosuke TABELI and Hiroshi MORITA, Application of alginate gel to the photo-catalytic carrier and antibacterial materials, International Union of Microbiology Societies 2011, 6-10 September 2011 Sapporo Convention Center, Hokkaido, Japan
 - 16) 伊勢田弘太郎、大中真莉子、田部井陽介、惠良真理子、森田 洋、発芽・成長を考慮したカイワレダイコン種子の殺菌、日本農芸化学会西日本支部、中四国支部合同大会（宮崎大学）2011 年 9 月
 - 17) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、新規製膜法を用いたアルギン酸膜の光触媒担体利用と殺菌効果、第 63 回日本生物工学会大会（東京農工大学）2011 年 9 月
 - 18) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、森田 洋、アルギン酸膜の光触媒担体への利用、日本家政学会九州支部第 58 回大会（九州女子大学）2011 年 10 月
 - 19) 伊勢田弘太郎、惠良真理子、田部井陽介、森田 洋、銅添加 S-TiO₂ を担持したアルギン酸ゲルビーズの殺菌効果、日本生物工学会第 18 回九州支部福岡大会（九州大学）2011 年 12 月
 - 20) 伊勢田弘太郎、石野靖浩、大中真莉子、田部井陽介、惠良真理子、二宮純子、森田 洋、光触媒担持アルギン酸ゲルビーズの殺菌効果と種子殺菌利用、日本農芸化学会 2012 年度大会（京都女子大学）2012 年 3 月

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：光触媒皮膜の製造方法及び光触媒皮膜

発明者：原賀久人、樋口友彦、永吉英昭、

吉永 宏、梅田陽平、山崎健之、

横野照尚、森田 洋

権利者：株式会社フジコー、

国立大学法人九州工業大学、

財団法人北九州産業学術推進機構

種類、番号：特願 2010-184988

出願年月日：2010 年 8 月 20 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 洋 (MORITA HIROSHI)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：30321524