

滴定手法による酸性エタノールの殺菌効果の検証

大阪府立岸和田高等学校

小西 蓮

要旨

消毒用エタノールに強い殺菌作用があることは知られているが、消毒用エタノールをリン酸で酸性にすることでその殺菌効果が上がるのか検証した。乳酸菌のヨーグルト発酵に注目し、水酸化ナトリウム溶液を用いた中和滴定により、乳酸およびリン酸の総酸量を測定することによって、乳酸菌の活性を調べ、酸性エタノールの殺菌効果を調べた。ほとんどの試料で、酸性エタノールで殺菌した乳酸菌でヨーグルト発酵させたサンプルのろ液の方が、エタノールを酸性にするために加えたリン酸が少量ではあるが含まれているにも関わらず、中性エタノールで殺菌した乳酸菌でヨーグルト発酵させたサンプルのろ液より、中和滴定に必要な水酸化ナトリウム溶液の体積が少なかった。この結果から酸性エタノールで殺菌した乳酸菌のほうが中性エタノールで殺菌した乳酸菌より活性が下がったとわかり、エタノールを酸性にすると殺菌力が上がるということが明らかになった。

目的・実験手法

消毒用酸性エタノールの殺菌効果検証にあたり、(ノンエンベロープ) ウイルス^{※1}については既に効果が実証されているが、細菌(バクテリア)については通常70%エタノールでも高い殺菌力があるので具体的には実証されていない。また設備上ウイルスを扱うことが難しいので、ヨーグルト種菌の乳酸菌・ビフィズス菌(細菌)を用いて酸性エタノールの殺菌効果を検証することにした。

しかし、一般的な殺菌効果を検査する方法であるコロニーカウント法では乳酸菌用の標準寒天培地はコストが高く、自作も難しい。また殺菌効果を検証するためにはエタノールの増殖抑制効果も考慮に入れる必要がある。これらの問題を克服するため、乳酸菌が生成する物質を定量することで乳酸菌の活性を調べその効果を検証することにした。(生成物定量法と名付けた)

検証の判断基準として、ヨーグルト生成の確認による目視的指標と、酸と水酸化ナトリウムとの中和滴定による、数値的指標の二つの指標を用いることにした。

※1 <http://family.saraya.com/kansen/envelope.html>

実験に必要な知識・原理

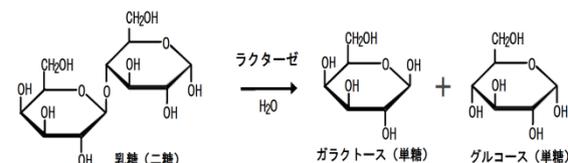
乳酸菌：ラクトース(乳糖)をラクターゼ(酵素)で加水分解してグルコースとガラクトースにする。グルコースを発酵し、乳酸などを生成。消費した有機物の50%以上を乳酸に代謝する細菌を慣用的に乳酸菌と呼ぶ。

ホモ型乳酸菌…乳酸発酵時に乳酸のみを生成。
ヘテロ型乳酸菌…乳酸発酵時にエタノール及び酢酸なども生成。

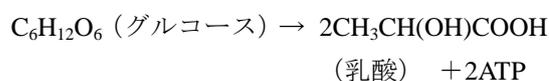
・ビフィズス菌…主な生成物は乳酸(消費した有機物の50%未満)と酢酸。

酸素存在下で働かない偏性嫌気性を示す。
(厳密には乳酸菌とは区別される)

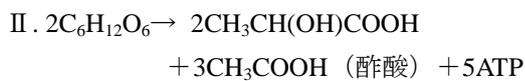
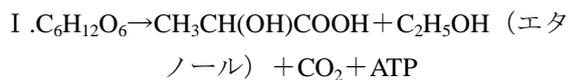
ラクトース(乳糖)の分解



ホモ型乳酸発酵



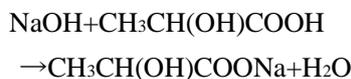
ヘテロ型乳酸発酵



・ヨーグルトのできる仕組み

乳酸発酵で生じた酸により牛乳のpHが下がる。牛乳中のタンパク質の大部分を占めるカゼインはミセルを形成するがそのカゼインの等電点pH4.6まで下がると、カゼインミセル同士が集まり、さらに巨大な構造になり凝固する。これがヨーグルトである。

・水酸化ナトリウムと乳酸の中和反応



・目視的指標について

ヨーグルトが生成されていれば、サンプルをろ過したとき、ろ紙に残滓が残る。さらにろ液には牛乳の白濁色の原因である脂肪やカゼインミセルは、ほぼ含まれず、ホエイなどの可溶性で小さな粒子が主なため、ろ液は透明になる。したがって、この2点が観察できればヨーグルトが生成したと判断できる。

・数値的指標について

滴定量は菌の酸生成量、すなわち菌の活性に依するため、滴定量の違いで殺菌力の強さを比較することができる。滴定量が少ないほど、働いた菌はより少ないため、殺菌力が強いと判断できる。

実験の準備

各溶液の調製

- ① 0.1mol/L シュウ酸標準溶液を調製。
- ② 1%水酸化ナトリウム溶液を調製。
- ③ ②で調製した水酸化ナトリウムをシュウ酸標準溶液で中和滴定し、濃度を調べる^{※2}。
- ④ 表1のような配合で各濃度中性エタノールを調製する。
- ⑤ リン酸原液を100倍希釈する。
- ⑥ ⑤のリン酸を用いて、表2のよう配合で各濃度酸性エタノールを調製する。

表1 エタノール濃度別の溶液の混合体積

vol%	10	20	30	40	50	60	70
エタノール(mL)	10	20	30	40	50	60	70
純水(mL)	90	80	70	60	50	40	30

表2 酸性エタノール濃度別の溶液の混合体積

vol%	10	20	30	40	50	60	70
リン酸(mL)	10	10	10	10	10	10	10
エタノール(mL)	10	20	30	40	50	60	70
純水(mL)	80	70	60	50	40	30	20

※2 各実験で水酸化ナトリウム溶液の濃度を調べたが、ほぼ変化はなかった。

以下、これらの中性エタノール及び酸性エタノールを殺菌剤とする。

実験

以下の実験はすべて4回繰り返した。

- ① 器具を煮沸し、滅菌する。
- ② ヨーグルト種菌^{※3}0.2gをサンプル管に入れる。
- ③ 各殺菌剤2mLをサンプル管に入れ、時々攪拌しながら、10分間放置する。(今回は室温で放置)
- ④ 牛乳を48g入れ、殺菌操作を停止する。その後アルミホイルで軽く蓋をする。
- ⑤ ヨーグルトメーカーに40℃、9時間でセットし、乳酸発酵させる。
- ⑥ 発酵後、各サンプル管の内容物をろ紙をセットした、漏斗に移し、ビーカーにろ液を集めた。
- ⑦ ⑥の残滓や、ろ液から判断しヨーグルトが生成したか確認する。その結果を表3に示す。
- ⑧ ⑥の各ろ液を5倍希釈^{※4}し、その溶液10[mL]中のすべての酸を1%水酸化ナトリウム溶液で中和滴定し、滴定量を記録する。繰り返し数を3とし、その平均値を表4に示す。

※3 ヨーグルト種菌…乳酸菌のコロニーの集ま

り。今回使用した種菌（メイトー・ヨーグルト種菌）はブルガリア菌（ホモ型）、サーモフィラス菌（ホモ型）、ビフィズス菌（偏性嫌気性）が混合されたもの。したがって今回の空気が含まれる状態での乳酸発酵で生成されるのは乳酸のみ。

※4 サンプルのろ液の量が少ないため、希釈なしでは十分量を確保できない。

結果

表3 各サンプルのヨーグルト生成の確認

	第1回 11/17		第2回 11/25		第3回 12/21		第4回 1/12	
	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
10%	○	○	○	○	○	○	○	○
20%	○	○	○	○	○	○	○	○
30%	○	○	○	○	○	○	○	○
40%	○	○	○	○	○	○	○	○
50%	○	○	○	○	×	×	○	○
60%	○	×	×	×	×	×	○	○
70%	×	×	×	×	×	×	×	×

○：ヨーグルトが生成

表4 各ろ液（5倍希釈）の中和滴定量

	第1回 11/17		第2回 11/25		第3回 12/21		第4回 1/12	
	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
10%	0.78	0.83	0.98	0.81	0.79	0.86	0.81	0.88
20%	0.84	0.83	0.86	0.80	0.81	0.82	0.84	0.81
30%	0.77	0.65	0.83	0.82	0.83	0.72	0.82	0.81
40%	0.60	0.50	0.70	0.59	0.52	0.44	0.54	0.58
50%	0.50	0.49	0.69	0.56	0.47	0.42	0.49	0.49
60%	0.47	0.20	0.36	0.24	0.24	0.19	0.53	0.45
70%	0.16	0.14	0.23	0.21	0.18	0.21	0.28	0.19

※数値はろ液（5倍希釈）中のすべての酸の中和滴定量。単位は mL

・エタノールの殺菌効果と抑制効果について

エタノールには殺菌効果の他にも菌の増殖抑制効果があるため、乳酸菌の活性が見られないからといって、単純にエタノールが乳酸菌を殺菌したとは限らず、乳酸菌の増殖を抑制している可能性もある。そこで今回は乳酸菌が殺菌されていることを確認するため、牛乳 48g に中性エタノール及び酸性エタノールを各 2mL ずつ入れた後、種菌 2g を入れ、同様に乳酸発酵させ、ヨーグルトの生成及び総酸量を調べる実験を行いエタノールの抑制効果を検証することにした。（この手順ではエタノールは乳酸菌を殺菌しない）その結果を表5に示す。（これらのサンプルを後入れサンプルとする。）

表5 後入れろ液（5倍希釈）の中和滴定量

	第1回 12/1		第2回 12/21		第3回 1/12	
	中性	酸性	中性	酸性	中性	酸性
70%	0.47	0.54	0.57	0.58	0.47	0.48

表4と表5を比較することにより（12/21 と 1/12）、通常の実験ではエタノールは乳酸菌の増殖を抑制しているのではなく、乳酸菌を殺菌していると明らかになった

考察

すべての酸（リン酸の分も）を滴定しているのに関わらず、酸性の方が中性よりも滴定量が少ない箇所では酸性にしたことにより、殺菌作用が上がっている。ほとんどの実験で酸性のほうが滴下量が少ない。

以下、他に考察すべき点を述べた。

・低濃度では酸性にしても効果が上がらないのか。滴定量にはリン酸自体の滴定量も含まれているため今回の実験では断定できない。

そのためには、リン酸分の滴下量を調べる必要があるが、単純に、加えたリン酸の量から滴定量の理論値を算出してもよいかは不明である。（リン酸と牛乳が反応している恐れがあるため）したがって、リン酸分滴下量を調べるために、リン酸と牛乳をだけを入れたサンプル管を 40℃、9 時間で

放置した後、中和滴定し、滴定量を調べる必要がある。その滴定量を表4の酸性の数値からひくことにより、乳酸だけの酸濃度を測定でき、より正確に菌の活性を調べることができる。

・なぜ同濃度でも滴定量が変わるのか。

大きな原因として、殺菌時の温度が考えられる。今回の実験では室内で殺菌していたため、殺菌時のサンプル管の温度はほぼ室温であった。そのために殺菌時の温度が一定に保てなかった。今後は殺菌効果と温度の関係性を調べるとともに、殺菌時の温度を一定保つ方法を考える必要がある。(たとえば氷水につけるなど) 実験条件を一定にできれば、検証方法をより一般的に標準化することが可能になる。(今回の実験では回ごとに殺菌温度が異なったため、全実験のデータの平均値は取ることができなかった。)

・滴定誤差

滴定が数滴で終了した場合、一滴の体積はある程度決まっているため、滴定量と実際の酸濃度の誤差が大きくなる。その誤差を小さくするためには、一滴よりさらに少ない量を滴下したり、水酸化ナトリウムの濃度を薄くする、あるいはヨーグルト発酵の量を増やし、すべてのサンプルのろ液を希釈なしで滴定する方法が考えられる。

結論

幅広いエタノール濃度で、エタノールを酸性にすると殺菌力が上がる。消毒用酸性エタノールはノンエンベロープウイルス同様、乳酸菌に対しても中性エタノールより殺菌効果が上がることが明らかになった。

参考文献

- 1) 山下 勝 エチルアルコールによる微生物の増殖阻害と殺菌 日本防菌防黴学会誌 vol.36 No.4 pp.241-262 (2008)
- 2) 新名 史典[編著] サラヤ株式会社 隈下祐一 加藤信一 「[ビジュアル図解]洗浄と殺

菌のはなし」同文館出版 (2013)

- 3) 高麗 寛紀 「図解入門よくわかる最新抗菌と殺菌の基本と仕組み」秀和システム (2012)
- 4) 日本乳酸菌学会編 「乳酸菌ビフィズス菌のサイエンス」京都大学学術出版会 (2010)
- 5) 杉山政則 「基礎と応用 現代微生物学」共立出版 (2010)

謝辞

本研究に際して製品についての問い合わせについて丁寧に回答をくださったメイトーお客さまセンター、およびサラヤ株式会社バイオケミカル研究所の隈下祐一様から、学術文献の紹介やアドバイスをいただきました。