

【解説】

食品産業におけるオゾン利用(4)

—食品変敗防止へのオゾンの利用技術—

内藤茂三

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.7, No.2, 8-12. (2000)

## 食品産業におけるオゾンの利用（４）

## － 食品変敗防止へのオゾンの利用技術－

愛知県食品工業技術センター 内藤 茂三

## １．はじめに

現在、食品業界で食品の腐敗、変敗菌として問題になっている細菌に乳酸菌がある。乳酸菌は防腐剤にも抵抗性があり、さらに低温でも増殖するため食品加工業界では大きな問題となっている。乳酸菌は食品の低温下での主要な原因菌であり、特に洋菓子や和菓子の主要な変敗原因菌である<sup>1) 2)</sup>。また乳酸菌は食品工場の床や側溝に多く存在するため食品製造工程における主要な汚染菌となっている<sup>3) 4)</sup>。乳酸菌は炭水化物を多く含む食品によく生育し、発酵生産物として主として乳酸を50%以上生産する細菌類をいう。これらの乳酸菌に対して糖類等の炭水化物を多く使用する工場では次亜塩素酸ナトリウムを100～300ppm添加して殺菌を行っているが、乳酸菌は他の微生物に比較して抵抗力が強い。また次亜塩素酸の使用方法についても問題がある。水に希釈することによって発生する次亜塩素酸は、容易に細胞壁や細胞膜を通過して酵素を破壊する。このためアルカリ域では次亜塩素酸イオンとなり殺菌効果は弱い。解離しない次亜塩素酸はpHが6.5 から 5.5 ではじめて100%近くなり、最大の殺菌効果を示す。このため次亜塩素酸ナトリウムの殺菌力は、濃度よりも pHが低いほど殺菌力が強力となる。しかし、強酸性を帯びるほど、塩素ガスが発生して不安定になる。そこで今回、乳酸菌による食品の変敗及び食品工場の汚染防止にオゾンを用いて検討を行った結果を取りまとめた。

## ２．乳酸菌による食品の変敗及び食品工場の汚染

## (１) 乳酸菌の種類とその性質

乳酸菌は乳酸を作る細菌であり、グラム陽性であり、細胞の形態は桿菌と球菌があり、カタラーゼ反応は陰性であり、酸素要求性は全く無しかまたは極微量要求（通性嫌気性）であり、運動性は無であるが若い細胞では稀にあり、内生孢子を形成せず、ブドウ糖の代謝は50%以上乳酸に転換し、栄養要求は従属栄養に属する。現在、細菌の種類は287属に分類されるが、そのうち食品の変敗に関与する乳酸菌は大きく分けると *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* の5つの属である。*Lactobacillus*属は桿菌で、ホモ発酵型とヘテロ発酵型の両者がある。発酵によってできる乳酸の光学異性体は、ホモ発酵型 *Lactobacillus* ではL(+), D(-)、DLと菌種ごとに異なり、ヘテロ型の *Lactobacillus* ではDL乳酸が大多数である。運動性は通常みられない。*Lactobacillus*は発酵形式、生育温度、糖の発酵などにより59種が登録されている。この菌は食品、動物腸内、動物糞、土壌、食品工場等に生息し、二次汚染菌の原因となる。なお人間に対しては病原性がない。

*Enterococcus*属は、球菌であり食塩6.5%で生育し、生育温度は10～45℃であり、また生育pHは4.4以上である。他の多くの乳酸球菌と同様にホモ発酵型を行い、L-乳酸を生成する。もともと *Streptococcus*属に含まれていたもので、その中から腸管由来のものが *Enterococcus*属として分離され分類されたため手作業の多い食品製造工程における汚染は最も多い。*Lactococcus*属は球菌であり、ホモ発酵型を行いL-乳酸を生成する。本菌も従来 *Streptococcus*属に含まれていたものであるが、乳性由来のものが分離され分類されたものである。乳製品や植物原材料における汚染は多い。*Leuconostoc*属はヘテロ発酵型の球菌であり、その生産する乳酸はすべてD-乳酸である。本菌は糖類を資化して高分子多糖類を生産するので、極めて殺菌が困難である。このため食品工場でも最も汚染の多い乳酸菌である。

*Pediococcus*属はホモ発酵型の4連球菌（分裂面が交互に直角に入る）であり、L-型乳酸を生成する。発酵食品に多く検出され、変敗の原因となる場合もある。これらの乳酸菌を分類する最も重要な指標が細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸配列である。細菌の細胞壁の硬さをつかさどる基本骨格をペプチドグリカンという。ペプチドグリカンはN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸が交互に一直線に並んだ糖鎖と、その糖鎖と糖鎖の間を結ぶ8～20のアミノ酸の短鎖ペプチドで構成され、全体で強固な網目構造となっている。乳酸菌の細胞壁ペプチドグリカンは大別してリジン型、オルニチン型、ジアミノピペリン酸型がある。*Lactobacillus*属乳酸菌はほとんどがリジン型であるが、一部オルニチン型 (*L. fermentum*) やジアミノペメ

リン酸型 (*L.plantarum*)もある。*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 属ではほとんどがリジン型である。このため*Lactobacillus* 属乳酸菌の分類には細胞壁ペプチドグリカンが重要な指標となっている。また乳酸菌のDNAの塩基含量は約28~53%の間に分布しており、その最大と最小はともに*Lactobacillus* 属細菌であり、*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 属細菌はおよそ35~45%である。乳酸菌による食品の変敗の特徴は、食品のpHが9.0以上の生ラーメン、コンニャクからpH4.0~4.5の漬物、LL麺、フルーツシロップ漬の広い範囲にわたっていることである。一般的な加熱食肉製品のハム、ソーセージにおいて乳酸菌 (*Lactobacillus viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis* 等)に汚染されれば、乳酸菌は炭水化物を資化し、有機酸やデキストランあるいは炭酸ガスを生じ、酸敗、ネット生成、包装容器の膨張現象が発生する。乳酸菌によって清酒の酸度の増加や異臭が発生する現象を腐造といい、その腐造乳酸菌として確認されたのは耐アルコール性のホモ発酵型桿菌の*Lactobacillus delbruekii subsp. lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* 及びヘテロ発酵型球菌の*Leuconostoc mesenteroides* である。清酒中で乳酸菌が増殖し、白濁、異臭、酸度の増加を起こす現象は、火落ちと呼ばれる。清酒のみに生育する菌は真性火落ち菌、一般の乳酸菌培地にも生育する菌は火落ち性乳酸菌と呼ばれている。真性火落ち菌は好アルコール性、好酸性、特定の糖資化性を有する菌であり、*Lactobacillus homiohiochii*, *Lactobacillus*

表1 乳酸菌による食品の変敗とpH

| pH     | 食品      | 変敗現象   | 共存原因微生物                | 乳酸菌                  |                      |
|--------|---------|--------|------------------------|----------------------|----------------------|
| 12     | コンニャク   | 軟化、液化  | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| 10     | 生中華麺    | 軟化、着色  | <i>Corynebacterium</i> | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| 9      | 焼きそば    | 軟化、着色  | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| 8      | 厚焼たまご   | ネット、異臭 | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | 錦糸たまご   | 異臭、着色  | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| 7      | たまご豆腐   | 軟化、着色  | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
|        | おぼろ     | 異臭     | <i>Lactobacillus</i>   | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | カニ巻たまご  | 異臭     | <i>Pseudomonas</i>     | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | シュークリーム | 酸敗     | <i>Enterococcus</i>    | <i>Enterococcus</i>  |                      |
|        | 蒸しケーキ   | 酸敗     | <i>Saccharomyces</i>   | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | ショートケーキ | 異臭     | <i>Enterococcus</i>    | <i>Enterococcus</i>  |                      |
|        | 大福餅     | 軟化     | <i>Saccharomyces</i>   | <i>Enterococcus</i>  |                      |
|        | 大島饅頭    | 酸敗     | <i>Torulopsis</i>      | <i>Enterococcus</i>  |                      |
|        | 6       | 蒸しとり   | 酸敗                     | <i>Bacillus</i>      | <i>Lactobacillus</i> |
|        |         | どら焼き   | 膨脹                     | <i>Saccharomyces</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| 生めん    |         | 軟化     | <i>Saccharomyces</i>   | <i>Lactobacillus</i> |                      |
| ゆで麺    |         | 酸敗     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
| 生そば    |         | 異臭     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
| おにぎり   |         | 異臭     | <i>Bacillus</i>        | <i>Enterococcus</i>  |                      |
| シホンケーキ |         | 酸敗     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
| 生ハム    |         | 着色     | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| ソーセージ  |         | 着色     | <i>Bacillus</i>        | <i>Weissella</i>     |                      |
| 焼肉     |         | 着色     | <i>Micrococcus</i>     | <i>Weissella</i>     |                      |
| 蒲鉾     |         | 軟化、ネット | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| 竹輪     |         | 軟化、ネット | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| 5      | はんぺん    | 軟化、ネット | <i>Bacillus</i>        | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
|        | 生切餅     | 酸臭     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | 食パン     | 酸臭     | <i>Micrococcus</i>     | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | なま野菜    | 異臭     | <i>Micrococcus</i>     | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | 生めん     | 膨脹     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | ゆで麺     | 膨脹     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | ポテトサラダ  | 異臭     | <i>Micrococcus</i>     | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | 蜜豆      | 膨脹     | <i>Saccharomyces</i>   | <i>Lactobacillus</i> |                      |
|        | 4       | 漬物     | 膨脹                     | <i>Micrococcus</i>   | <i>Lactobacillus</i> |
|        |         | スープ    | 膨脹                     | <i>Micrococcus</i>   | <i>Lactobacillus</i> |
| タレ     |         | 膨脹     | <i>Micrococcus</i>     | <i>Lactobacillus</i> |                      |
| 干し柿    |         | 斑点     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
| 干しいも   |         | 斑点     | <i>Bacillus</i>        | <i>Lactobacillus</i> |                      |
| グミ     |         | 斑点     | <i>Micrococcus</i>     | <i>Leuconostoc</i>   |                      |
| 水晒     |         | 軟化     | <i>Micrococcus</i>     | <i>Lactococcus</i>   |                      |

fructivoransが含まれる。清酒では、殺菌及び残存酵素の失活のために火入れ（65～70℃）が行われるため、火落ちした清酒からは耐熱性の比較的強い*Lactobacillus fructivorans*のようなヘテロ発酵型乳酸菌が多く検出されている。ワインやアルコール添加したワインの*Lactobacillus fructivorans*や*Lactobacillus hilgardii*による汚染もよく知られている。ビールはアルコール度数は低いが、炭酸ガスによって嫌気性状態を維持し、ホップの成分が抗菌性を有しているところから微生物汚染は起こりにくいが、乳酸菌は増殖して変敗を起こすことが知られ、その主な菌種は、*Lactobacillus brevis*、*Pediococcus cerevisiae*である。また現在食品の主な変敗菌種は*Lactobacillus*属、*Enterococcus*属、*Leuconostoc*属、*Pediococcus*属である。加工食品のpHと変敗乳酸菌等の関係を表1に示した。

## （２）乳酸菌による食品工場の汚染

木綿豆腐は、豆乳を凝固剤（硫酸カルシウム、塩化マグネシウム、 $\gamma$ -グルコノ $\delta$ -ラクトン等）で凝固させてから上澄みを除き、くずした後、これを布に敷いた孔のある型箱に移し、上から重しをして成型し、スチロールトレイに入れ密封して低温に保存され販売される。しかし、凝固剤に塩化マグネシウムを用いた木綿豆腐は製造後、1～2日で液化する現象が生じることがある。その液化の程度は製造後の時間の経過とともに増大するところから凝固剤の添加量不足ではなく、微生物に起因することが認められた。原因菌の一つに工場の汚染由来の乳酸菌が関係していた<sup>5)</sup>。その経過について説明する。液化現象が発生した木綿豆腐より2菌株の*Bacillus*、3菌株の*Micrococcus*、1菌株の*Leuconostoc mesenteroides*、1菌株の*Trichosporon pullulans*が検出された。また正常品より2菌株の*Bacillus*、3菌株の*Micrococcus*が検出された。これらの液化豆腐及び正常豆腐から分離した微生物の菌数を測定した結果、豆腐の液化は、*Leuconostoc mesenteroides*と*Trichosporon pullulans*が関与していることが考えられた。これらの微生物は豆腐製造工場からの汚染が考えられたため、木綿豆腐製造工場の落下菌及び空中浮遊菌を測定した。その結果、好気性細菌（*Bacillus*、*Micrococcus*）が最も多く、次いで乳酸菌（*Leuconostoc mesenteroides*）、酵母（*Trichosporon pullulans*）、カビであった。微生物の生育は塩類によって著しく影響を受け、塩化マグネシウムが微生物の生育及び著しい影響を与えることが知られている。液化豆腐では*Leu.mesenteroides*が $2.4 \times 10^9$  / g、*Tr. pullulans*が $8.2 \times 10^6$  / gが検出されたことから、これらの微生物は塩化マグネシウムの影響により著しく増殖したものと考えられる。塩化マグネシウム又は硫酸カルシウムを凝固剤として用いて製造した木綿豆腐に液化豆腐より分離した*Leu.mesenteroides*及び*Tr. pullulans*を添加して豆腐の液化現象の発生について検討を行った結果、凝固剤として塩化マグネシウムを使用した場合、*Leu. mesenteroides*及び*Tr. pullulans*を同時に添加したものは貯蔵2日

表2 食品工場から分離した乳酸菌

| 食品工場     | 製造食品  | 検出場所                | 主要微生物   |
|----------|-------|---------------------|---|
| 納豆製造工場   | 納豆    | 浸漬タンク床              | <i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Leuconostoc mesenteroides</i>  |
| 豆腐製造工場   | 豆腐    | 水槽<br>箱盛、压榨床        | <i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Leuconostoc mesenteroides</i>                                |
| 洋菓子製造工場  | ケーキ   | 仕上げ台床               | <i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecalis</i>  |
| 和菓子製造工場  | まんじゅう | 冷蔵庫<br>仕上げ台床<br>殺菌剤 | <i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecalis</i>            |
| 加工みそ製造工場 | 味みそ   | 調合室<br>ポッパ<br>貯蔵室床  | <i>Lactobacillus</i> sp.<br><i>Lactobacillus fructivorans</i><br><i>Lactobacillus fructivorans</i><br><i>Lactobacillus fructivorans</i> |
| 調味料製造工場  | スーブ   | 調合機周辺<br>充填機周辺床     | <i>Lactobacillus</i> sp.<br><i>Lactobacillus fructivorans</i><br><i>Lactobacillus fructivorans</i>                                      |
| 食肉製造工場   | ひき肉   | 加工場所<br>冷蔵庫床        | <i>Lactobacillus</i> sp.<br><i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Lactobacillus</i> sp.  |

後、*Tr. pullulans* のみ添加したものは貯蔵4日後で一部液化が生じ、*Leu. mesenteroides* のみ添加したものは液化現象は生じなかった。凝固剤として硫酸カルシウムを使用した場合、*Leu. mesenteroides* 及び *Tr. pullulans* を同時に添加したものは貯蔵6日後、*Tr. pullulans* のみを添加したものは貯蔵7日後で一部液化が生じ、*Leu. mesenteroides* のみ添加したものは液化現象は生じなかった。以上のことより木綿豆腐の液化現象は *Tr. pullulans* が主原因であり、*Leu. mesenteroides*、塩化マグネシウム、硫酸カルシウムが *Tr. pullulans* の生育やプロテアーゼ等の酵素の生産に影響を与えているものと考えられる。*Leu. mesenteroides* 及び *Tr. pullulans* は工場のすべての落下菌及び空中浮遊菌より検出された。このため工場全体を殺菌する目的で工場の天井にオゾン発生器を取り付け、夜間のみ5~8時間、オゾン濃度約0.5~3ppmで約6ヶ月作動させた。その結果、落下菌及び空中浮遊菌より *Leu. mesenteroides* 及び *Tr. pullulans* はほとんど検出されなくなった。

そのほか食品工場より乳酸菌が検出された事例を表2に示した。

### 3. 食品工場における乳酸菌防止へのオゾンの利用技術

#### (1) 乳酸菌増殖防止への原材料のオゾン処理

小麦粉のオゾン処理による生めんの乳酸菌抑制効果について検討した結果について説明する<sup>3)</sup>。オゾン濃度 5.0ppm、流量100L、温度10℃で1時間オゾン通気を行った小麦粉を用いて生めんを製造し、製造工程中の微生物数の変化、特に乳酸菌数の変化を測定した結果を表3に示した。

表3 オゾン処理小麦粉で製造した生めんの乳酸菌の変化

| 製造工程及び試料               | 菌数 (/g)           |                   |                   |                   |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                        | 対照                |                   | オゾン処理             |                   |
|                        | 生菌数               | 乳酸菌               | 生菌数               | 乳酸菌               |
| 小麦粉                    | 300以下             | 300以下             | 300以下             | 300以下             |
| 食塩                     | 300以下             | 300以下             | 300以下             | 300以下             |
| 水                      | 300以下             | 300以下             | 300以下             | 300以下             |
| 攪拌, 混合<br>(60rpm, 20分) | $1.2 \times 10^3$ | 300以下             | $1.0 \times 10^3$ | 300以下             |
| 混合                     | $5.1 \times 10^3$ | $3.2 \times 10^3$ | $2.2 \times 10^3$ | 300以下             |
| 圧延                     | $7.2 \times 10^3$ | $1.2 \times 10^3$ | $3.2 \times 10^3$ | 300以下             |
| 細断                     | $1.5 \times 10^4$ | $3.5 \times 10^3$ | $7.8 \times 10^3$ | $3.7 \times 10^3$ |
| 包装                     | $3.2 \times 10^4$ | $5.8 \times 10^3$ | $8.8 \times 10^3$ | $4.6 \times 10^3$ |
| 製品                     | $3.5 \times 10^4$ | $6.2 \times 10^3$ | $1.4 \times 10^4$ | $5.2 \times 10^3$ |

無処理小麦粉で製造した場合、工程が進行するに伴い微生物が増加したが、オゾン処理した小麦粉を用いた場合は製造工程中の微生物は若干増加したが、乳酸菌の増殖は著しく抑制された。また無処理及びオゾン処理した生めんの保存中における微生物変化を測定した結果、20℃で保存した場合、オゾン処理小麦粉を使用した生めんでは細菌、特に乳酸菌 (*Lactobacillus fructivorans*) の増殖は約7日間抑制された。

#### (2) オゾンによる工場環境の殺菌

食品工場で食品が腐敗、変敗する原因の90%が空中浮遊菌による二次汚染である。このため食品工場をクリーン化できれば食品の腐敗、変敗は著しく減少できると考えられる。ほとんどの食品工場では作業中あるいは作業後に工程の洗浄で多くの水を使用するが、工場の気温が高いとこの水が水蒸気となり、これにより揮散した微生物が工場全体を汚染する。これを防止する方法としてオゾンガスを用いる方法とオゾン水を用いる方法がある。オゾンガスを用いる方法では工場の上部に設置したオゾンナイザーから落下するオゾンガス(分子量48、空気の1.7倍の重さ)に接触させて殺菌を行う。これによると工場の空気、機械、床等が殺菌され、朝一番に製造された食品の空中浮遊菌による二次汚染される率が著しく減少する。オゾンは水分があると自然に分解され全く残存しない。またオゾン殺菌は表面殺菌のみであり浸透力は全くないため、品質を著しく損傷させることは少ないと考えられる。また現在では常温で容易にオゾンを分解するオゾン分解剤が多く開発されているのでオゾンの瞬間的な分解は極めて容易である。工場内の空気をオゾンガスにより殺菌する場合は、効率は工場の湿度及び温度の影響を受ける。一般に製品の冷却、充填、包装室等を中心に行

われているが、工場全体をオゾン処理している例も見られる。乳酸菌 (*Lactobacillus fructivorans*) により膨張現象がみられた生めん工場のオゾン殺菌を行った例について説明する<sup>3)</sup>。オゾン処理前の生めん工場について6月と12月における空中浮遊微生物の数とその種類について測定した。結果、*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, 大腸菌群、酵母、カビについて製造工程毎の6月と12月の比較では、明らかに12月より6月の高温高湿期に菌数が多い傾向が認められた。生めんは最終製品が無加熱であるため大腸菌群、乳酸菌、カビの二次汚染が問題となる場合が多い。本検終了後直ちにオゾン発生装置を天井に設置し、経時的にオゾン濃度と空中浮遊微生物を測定した。オゾン処理中の各工程のオゾン濃度を測定した結果、オゾン濃度は平均0.05~0.18ppmであった。またオゾン処理後の空中浮遊微生物は全体的に*Lactobacillus*, *Micrococcus*, 大腸菌群、酵母が減少する傾向を示した。オゾン処理開始6ヶ月後の6月と、12ヶ月後の12月の空中浮遊微生物を測定した結果、オゾン処理前は優勢菌であった大腸菌群、*Lactobacillus*, *Micrococcus* がオゾン処理後著しく減少する傾向を示した。乳酸菌はオゾンにより効果的に殺菌された。

## 文献

- 1) 内藤茂三：食品の包装, 18 (2), 91 (1987)
- 2) 内藤茂三：洋菓子製造の基礎と実際 (菓子総合技術センター編)、pp. 322~340、光琳 (1991)
- 3) 内藤茂三：愛知食品工技年報、38, 36 (1997)
- 4) 内藤茂三：愛知食品工技年報、37, 39 (1996)
- 5) 内藤茂三：愛知食品工技年報、36, 63 (1995)

## 研究会からのお知らせ

### 会員の變動

- 入会：個人 富岡 克行、永晃産業(株) (専門) オゾンを利用した殺菌装置の製造、販売  
〒571-0003 大阪府門真市下馬伏203-1
- 新井 浩一、明海大学歯学部歯科材料科学講座 (専門) 歯科理工学  
〒350-0283 埼玉県坂戸市けやき代1-1
- 古賀 実、熊本県立大学環境共生学部 (専門) 環境分析化学  
〒862-8502 熊本市月出3丁目1-100
- 五十嵐稔明、真駒内歯科 (専門) 歯科一般、口腔外科、矯正科  
〒005-0021 札幌市南区真駒内本町7-2-1-113
- 杉浦 創、NOSAI埼玉家畜診療所 (専門) 臨床獣医  
〒369-1246 埼玉県大里郡花園町小前田 840
- 岡田 和久、神鋼プラント建設(株)オゾン事業部 (専門) オゾン利用技術  
〒657-0846 神戸市灘区岩屋北町4-5-22
- 神山 五郎、烏山診療所 (専門) 言語障害者対策、高齢者対策  
〒157-0062 世田谷区南烏山6-7-19
- 山岸 忠雄、(株)ソーラーテクノジャパン (専門) オゾン活用の機器開発  
〒373-0056 群馬県太田市八幡町1-6
- 新村 秀雄、医療法人社団全生会 江戸川病院 (専門) 精神科  
〒278-0022 千葉県野田市山崎2702
- 奥井 恒明、(有)ワールドメデイカルサービス (専門) オゾンによる殺菌、浄化  
〒215-0013 川崎市麻生区王禅寺2758-13
- 古田 昌俊、快整院(治療院) (専門) オゾン物理療法(手技療法)  
〒084-0909 釧路市昭和南5丁目24-12
- 退会：個人 飯野 亮太、田中 秀治、作本 仁志、坂井 達夫