

博士論文

野菜の加工における腸管出血性大腸菌
O157 の制御に関する研究

平成 26 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

潘 小軍

博士論文

野菜の加工における腸管出血性大腸菌

O157 の制御に関する研究

平成 26 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

潘 小軍

目次

| | |
|-------------------------------|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1. 細菌性食中毒 | |
| 2. 食品の微生物制御 | |
| 3. 塩素系殺菌剤 | |
| 4. ハードル理論 | |
| 5. 野菜の安全性課題 | |
| 6. 天然物の抗菌作用 | |
| 7. 本論文の目的と構成 | |
| 第2章 塩素系殺菌剤による野菜類の洗浄殺菌 | |
| I. 序言 | 14 |
| II. 材料と方法 | 15 |
| 1. 供試野菜および検体の調製 | |
| 2. 供試菌株および調製 | |
| 3. 塩素系殺菌剤 | |
| 3.1. 次亜塩素酸ナトリウム溶液 | |
| 3.2. 二酸化塩素水溶液 | |
| 4. 接種野菜の作製 | |
| 5. 洗浄殺菌処理 | |
| 6. 菌数測定 | |
| 7. 統計処理 | |
| III. 実験結果 | 17 |
| 1. 葉野菜類の洗浄殺菌における次亜塩素酸ナトリウムの効果 | |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2. 葉野菜類の洗浄殺菌における二酸化塩素の効果 | |
| 3. 次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素の葉野菜類における殺菌効果の比較 | |
| IV. 考察 | 19 |
| V. 小括 | 21 |
| | |
| 第3章 塩素系殺菌剤と物理的処理の併用効果 | |
| I. 序言 | 29 |
| II. 材料と方法 | 30 |
| 1. 大腸菌接種野菜の調製 | |
| 2. 超音波と Tween 80 の併用効果 | |
| 3. 塩素系殺菌剤と物理的処理の併用効果 | |
| 4. 菌数測定 | |
| 5. 統計処理 | |
| III. 実験結果 | 31 |
| 1. 超音波による葉野菜類の洗浄効果 | |
| 2. 物理的処理と次亜塩素酸ナトリウムあるいは二酸化塩素の併用効果 | |
| IV. 考察 | 33 |
| V. 小括 | 35 |
| | |
| 第4章 野菜の塩素洗浄殺菌における交差汚染の防止 | |
| I. 序言 | 41 |
| II. 材料と方法 | 41 |
| 1. 供試野菜および供試菌株 | |
| 2. 次亜塩素酸ナトリウムによる大腸菌 O157 菌株の不活化 | |
| 3. 連続使用した洗浄液による野菜の洗浄 | |
| 4. 菌液から野菜へ O157 の移行 | |

| | |
|----------------------------------|----|
| 5. 菌数測定 | |
| 6. 統計処理 | |
| III. 実験結果 | 43 |
| 1. 次亜塩素酸ナトリウムによる大腸菌 O157 菌株の不活化 | |
| 2. 連続使用した洗浄殺菌液の殺菌効果 | |
| 3. 洗浄殺菌溶液の連続使用に伴う交差汚染の実証 | |
| 4. 洗浄液中の O157 数と洗浄野菜から検出される菌数の関係 | |
| IV. 考察 | 45 |
| V. 小括 | 48 |
| | |
| 第5章 植物抽出液による野菜浅漬けの微生物制御 | |
| I. 序言 | 55 |
| II. 材料と方法 | 56 |
| 1. 試験菌株 | |
| 2. 供試植物 | |
| 3. 植物抽出液の作製 | |
| 4. 植物精油の調製 | |
| 5. MIC および MBC の測定 | |
| 6. 白菜乳剤での単独および併用抗菌効果 | |
| 7. 植物抽出液添加白菜浅漬けにおける細菌の挙動 | |
| III. 実験結果 | 57 |
| 1. 植物抽出液の MIC および MBC | |
| 2. 植物抽出液添加白菜乳剤での抗菌効果 | |
| 3. 植物抽出液添加白菜浅漬けでの抗菌効果 | |
| IV. 考察 | 59 |
| V. 小括 | 62 |

| | |
|-------------------------|----|
| 第6章 植物精油による野菜ジュースの微生物制御 | |
| I. 序言 | 71 |
| II. 材料と方法 | 71 |
| 1. 試験菌株 | |
| 2. 野菜ジュース | |
| 3. 植物精油の調製 | |
| 4. MIC および MBC の測定 | |
| 5. 植物精油による野菜ジュースの抗菌効果 | |
| 6. 耐熱性試験 | |
| III. 実験結果 | 73 |
| 1. 植物精油の MIC, MBC | |
| 2. 野菜ジュースにおける植物精油の抗菌効果 | |
| 3. 加熱試験 | |
| IV. 考察 | 74 |
| V. 小括 | 76 |
| 第7章 総合考察 | 83 |
| 第8章 要約 | 92 |
| 謝辞 | 97 |
| 参考文献 | 98 |

略語表

| | |
|-------|--|
| BCP | : bromocresol purple |
| BHI | : brain heart infusion |
| cfu | : colony forming unit |
| D | : decimal reduction time |
| DW | : deionized water |
| DPD | : diethyl-p-phenylenediamine |
| EO | : essential oil |
| FAO | : food and agriculture organization |
| HACCP | : hazard analysis and critical control point |
| LAB | : lactic acid bacteria |
| MIC | : minimal inhibitory concentration |
| MBC | : minimal bactericidal concentration |
| MH | : Mueller-Hinton |
| MRSA | : methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| NA | : nutrient agar |
| NB | : nutrient broth |
| PBS | : phosphate buffered saline |
| rif | : rifampicin |
| SMAC | : sorbitol MacConkey agar |
| TCC | : total coliform counts |
| TPC | : total plate counts |
| TSA | : tryptic soy agar |
| TSB | : tryptic soy broth |
| VT | : vero toxin |
| WHO | : world health organization |

第1章 序論

1. 細菌性食中毒

食品の生産から消費までの微生物制御は、食品の安全確保における重要な課題である。消費者の食品衛生への関心が高まる一方、微生物による集団食中毒が毎年発生しており、平成24年に国内で発生した食中毒事件数は1,100件、患者数は26,699人であった。病因物質別では、ノロウイルス（416件）、カンピロバクター・ジェジュニ／コリ（266件）、植物性・動物性自然毒（97件）、黄色ブドウ球菌（44件）、サルモネラ属菌（40件）の順で多かった。腸管出血性大腸菌（VT産生）による食中毒は、事件数16件、患者数392名で、死者8名であった⁵¹⁾。細菌やウイルスなどの微生物による食中毒が一番多く、食品の安全において微生物制御がいかに重要であるかがわかる。微生物性食中毒の主要な原因菌としては、病原大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ、リステリア、セレウス菌、ウェルシュ菌、ボツリヌス菌など細菌のほか、ノロウイルスによる感染症も頻発している。

病原大腸菌（pathogenic *Escherichia coli*）は、腸内常在細菌である大腸菌のうち病原性を持つもので、その症状や発症機構により腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管病原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、腸管接着性大腸菌の5種類に分けられている。その中でも腸管出血性大腸菌は、赤痢菌の毒素と同一のベロ毒素（VT1, VT2）を産生し、毒性が強く先進諸国において最も重要な食品媒介病原菌である。

大腸菌はO抗原とH抗原に基づく血清型別により分類される。O抗原は外膜のリポ多糖由来のもので、H抗原はべん毛由来のものである。例えばO157とはO抗原として157番目に発見されたものを持つ菌という意味である。さらに細かく分類するとO157でも、ベロ毒素を産生し溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome, HUS）などの重篤な症状を起こすものは、H抗原がH7（O157:H7）とべん毛を有さないもの（O157:H-）の2種類である。本食中毒の原因になっているものは血清型O157がほとんどであり、その他にO26, O111, O104, O128およびO145などがある。

腸管出血性大腸菌は1982年米国オレゴン州とミシガン州でハンバーガーによる集団食

中毒事件があり、患者の糞便から O157 が原因菌として見つかったのが最初で、その後米国を中心にヨーロッパ、アジアなど世界各地で本菌による流行が確認されてきた。さらに、2006年9～10月、米国で *E. coli* O157:H7 に汚染されたハウレンソウによる患者 200 人を超えるアウトブレイクが発生した。米国の 26 州およびカナダと広範囲に及び、また、原因食品の生産地から遠く離れた地域で多くの患者が発生した。最近でも、病原大腸菌 O104 に起因する HUS のドイツ周辺で大流行⁹⁾および日本で焼肉チェーン店が提供したユッケを原因食品とする大腸菌 O111 集団食中毒や白菜浅漬けを原因食品とする大腸菌 O157 の集団食中毒などの事件が発生した。

腸管出血性大腸菌 O157:H7 は、ウシ、シカなどの動物が保菌している場合があり、これらの腸管内容物や糞便に汚染された食肉からの二次汚染により、あらゆる食品が原因となる可能性がある。また、これら家畜の糞便により汚染された水、感染したヒトや保菌動物との接触も、感染経路として重要である。原因食品として、ハンバーガーパティやローストビーフなど牛肉が汚染源となった事例が多く、そのほか野菜類、ジュース類など広範囲の原因食品が報告されている。

一方、血清型 O157:H7 はほかの血清型の腸管出血性大腸菌とは異なり、44.5℃で発育せず、β-グルクロニダーゼを産生せず、ソルビット陰性または遅分解である。なお、発育 pH 域は 4.4～9、発育水分活性値は 0.95 以上とされている。潜伏期間は平均 3～5 日で、症状は激しい腹痛と出血を伴う水様下痢を起こすことが多い。また、赤血球の破壊による溶血性貧血、血小板の減少および急性腎不全などの症状が現れる HUS や脳障害を併発することがある。この菌は熱に弱く、75℃で 1 分間加熱すれば死滅するが、逆に低温には強く、冷蔵・冷凍庫の中でも生き残る。飲料水中でも、長期間生存可能と考えられている。また、少量菌でも感染し、特に子供、高齢者は注意すべきである。

サルモネラ (*Salmonella*) 食中毒は、代表的な感染型細菌性食中毒で、世界的に最も発生頻度が高い。この原因菌はグラム陰性桿菌で、鶏、豚、牛などの動物の腸管や河川、下水など自然界に広く分布しており、2,500 種類以上もの血清型が知られている。食肉、乳、卵やそれらの加工品を介してヒトに食中毒を起こす。特にサルモネラ・エンテリティディス (*Salmonella* Enteritidis) は、1980 年代の後半から、欧米諸国で流行し、我が国でも

1989 年以降急激に増加した。また、外国ではモヤシなどのスプラウト、レタスやトマトなどを原因とするサルモネラ食中毒が毎年多数発生しているが、わが国においても 2011 年 2 月北海道で学校給食のブロッコリーサラダによる大規模なサルモネラ食中毒が発生した。

2. 食品の微生物制御

細菌性食中毒の予防には、食品原材料やその製造環境を有害微生物で汚染させないことが理想であるが、食品原材料が自然界由来である以上、これらによる汚染を完全に防止することはできない。そこで、食品および製造環境中のこれらの微生物を死滅させること（殺菌）、増殖させないこと（静菌）が重要となる。そのために初期汚染菌数が低ければ菌の増殖制御はより容易になることから、食品の除菌や殺菌は特に重要である。

ところで、近年、消費者のライフスタイルや嗜好の変化を反映して、ready-to-eat 食品、低塩・低糖食品、マイルド加熱食品、さらに、生食用の野菜は消費者の健康志向や調理を必要とせず洗わずそのまま食べられる簡便性からその需要は増えているが、これらはとくに衛生管理対策が重要である。また、小売店や消費者段階での不適切な温度管理や取り扱いを想定して、食品自体に微生物の増殖に対する抵抗性のある程度持たせる必要が生じている。最近では、HACCP（Hazard Analysis and Critical Control Point）の食品工場への導入が積極的に進められ、「生産から最終消費まで」の一貫した食品の安全性確保が求められている。これを達成する目的で、各種の物理的、化学的あるいは生物学的手法による微生物制御法が用いられる。物理的手法には、レトルトや低温加熱などの加熱処理、紫外線照射などの冷殺菌、冷蔵あるいは冷凍、脱水（乾燥）、塩蔵・糖蔵、くん煙による水分活性の低下、真空あるいはガス置換包装などがある。化学的手法には、殺菌料、保存料、防カビ剤などの化学物質や食品の環境を調節して食品の保存性を高める水分活性低下剤、pH 調整剤などの添加によって微生物の増殖や生存を抑制する手法である。生物学的手法には、天然由来の抗菌物質や乳酸菌などの微生物を利用したものがある。

また、食品の微生物学的安全性確保において保存料等の食品添加物の使用は有効であるが、消費者の健康志向から、化学合成添加物の使用は敬遠される傾向がみられる。一方、

ある程度の期間保存される漬物等の野菜加工品には保存料などの化学合成添加物が使われることがあるが、長期的にはこれらの健康への影響が憂慮される。そして、加熱殺菌は最も広く用いられている確実な殺菌方法であるが、加熱できないものに対しては化学的殺菌が重要な役割を果たしており、特に塩素系殺菌剤が良く用いられている。さらに、オゾン、過酢酸、酸性電解水、有機酸などの使用も注目されている。

3. 塩素系殺菌剤

3.1 次亜塩素酸ナトリウム

次亜塩素酸ナトリウムが広く用いられている理由として、①広範囲の微生物に殺菌効果を示す、②維持管理がしやすい、③他の除菌剤よりも比較的安価であることなどがある。次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の主成分は次亜塩素酸 (HClO) である。次亜塩素酸 (HClO) の第一の化学的特性は、酸化作用を示すことである。HClO は、水分子 (HOH) の1つの水素が塩素に置換された物質である。HClO 分子中の塩素原子の酸化数は+1 であり、Cl⁺として強い球電子種として作用する²⁴⁾。すなわち、Cl⁺は C=C, C=N, C-N, -NH₂, -SH 等の電子密度の高い結合部位を選択的に攻撃することになる。その結果、Cl⁺は他の物質から2個の電子を奪い、自ら Cl⁻となる過程で殺菌、洗浄、漂白、脱臭等の作用を示す。

HClO の第二の特性は、弱酸であり、溶液の pH に依存して次亜塩素酸イオンと水素イオンに解離することである。



非解離型である HClO と解離型である ClO⁻の存在比率が、次亜塩素酸の洗浄・殺菌作用を支配する因子となる。HClO の解離平衡成分である HClO, ClO⁻, Cl₂ はいずれも殺菌効力を有しており、これらを総称して遊離有効塩素という。次亜塩素酸ナトリウムの希薄溶液 (pH 7.5~10) および弱酸性水溶液 (pH 5~5.6) の殺菌効果は、全遊離有効塩素濃度ではなく非解離型 HClO の濃度に強く依存する⁸⁾。これは、微生物細胞内部への HClO の透過性と密接に関係している。

しかし、次亜塩素酸ナトリウム処理による野菜の殺菌では、野菜の複雑な表面構造や細菌自体が形成するバイオフィルムなどの影響で殺菌効果は限られている⁶⁹⁾。例えば、20,000 ppm の次亜塩素酸ナトリウムで 20 分間処理しても、芽物野菜種子における病原性微生物は完全に除去できなかったとの報告もある⁷²⁾。一方、次亜塩素酸ナトリウムは有機物との反応によって不活化されたり、発がん性や催奇形性を持つ可能性があるトリハロメタンやハロ酢酸を形成すると考えられる³⁶⁾。物理的処理との併用で殺菌効果の上昇や次亜塩素酸ナトリウムの代替品として、二酸化塩素や酸性化次塩素酸ナトリウムも注目されている⁴³⁾。

3.2 二酸化塩素

二酸化塩素は次亜塩素酸ナトリウムと同じく塩素原子を分子中に含む殺菌剤である。しかし、水に溶けたときの反応や殺菌メカニズムは両者では異なる。後者の殺菌力の主体は加水分解して生成する次亜塩素酸なのに対し、前者は次亜塩素酸を生成せず、二酸化塩素分子そのものが殺菌力の主体をなすとされている⁶⁰⁾。タンパク質などの有機物のジサルファイド（-S-S-）に、二酸化塩素の酸素原子（O）が反応して構造を変化させる。

二酸化塩素は刺激臭のある赤～黄色の気体で、1850 年には欧州で市水の消毒に用いられた。二酸化塩素は塩素と比べ、有機物との反応性が低く、強い酸化性、約 2.5 倍の殺菌力を持つ³⁷⁾。世界保健機関（WHO）および国際連合食糧農業機関（FAO）では A1 クラス、使用範囲が広く、効果的、安全な化学消毒剤として推奨されている。また、有害物質は発生せず、においも残らず、処理された食品の風味は変わらず、国際的に優れた食品防腐剤として認められる^{29,34)}。しかしながら、それ自体が気体で扱いにくく、水溶液ではいくつもの塩素酸の混合物になって不安定になりやすいため、殺菌消毒剤として広く用いられるには至らなかった。近年、種々の形で安定化された製剤が開発され、二酸化塩素水溶液として利用しやすくなったということもあり、次世代の殺菌剤として注目されている。二酸化塩素の殺菌機序は、酸化作用で、菌の細胞質膜を破り、細胞質に変化を与え微生物を殺すものである。細菌のみならず芽胞やウイルスも効果的に不活化することが報告されている²¹⁾。

二酸化塩素が食品業界で注目されている理由として、まず効果的に微生物を死滅させ、

においては残らず、処理した青果物の風味は変わらないことがあげられる。Du ら¹⁸⁾は 7.2 mg/L の二酸化塩素を用いてリンゴを 10 分間洗浄したところ、表面の大腸菌 O157:H7 混合株は 5 D 以上減少した。二酸化塩素は塩素のような pH 上昇による殺菌力の低下は見られず、広範囲な pH 領域での有効性が認められているが、pH が下がると、二酸化塩素の酸化値が高いほど、殺菌効果が向上する可能性がある⁶¹⁾。次に、二酸化塩素の処理によって、人体に対する有害物質が発生しないことがあげられる。有機食品の防腐に重要な意義がある。牛肉ミンチは二酸化塩素処理で、大腸菌数およびサルモネラ菌数が減少し、食の安全性が高まる。さらに、牛肉の色や風味に影響を与えず、消費期限も延長する⁴⁰⁾。第三の理由として優れた殺菌力をもち、大腸菌、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）、レジオネラなどの細菌やインフルエンザウィルス、ペットが感染しやすいパルボウィルスの分解や食品などに発生するカビを不活化・除去する能力に優れ、除菌・防カビ効果を有することがあげられる。Noss ら⁶⁷⁾は 0.6 ppm 二酸化塩素溶液により pH 7.2, 5℃で 30 秒処理して、ウィルス f2 の殺滅率は 99%であったと述べている。

二酸化塩素の食品業界への応用価値として、①青果物の鮮度の保持：アンモニアに対する分解効果は野菜や果物の鮮度を保つためにも非常に有効である。二酸化塩素の使用により収穫後の果物における病原菌がかなり減少する。7.8 ppm の二酸化塩素でジャガイモを 10 分間処理すると、腐敗防止できる。そして、化学残留物はない、ジャガイモの色を損なうこともない⁹³⁾。②青果物表面の病原菌の制御：二酸化塩素は野菜や果物の表面における病原菌を効果的に死滅させ、野菜や果物の安全性を高める。Han ら²⁹⁾は二酸化塩素を用いて、3 mg/L、30 分処理して、ピーマン表面のリストeria 菌数が 6 Log 減少することを報告した。Rodgers ら⁷⁷⁾の研究では、リンゴ、苺、クキヂシャおよびメロンを洗浄処理すると、表面の大腸菌 O157:H7 およびリストeria 菌数は 5 Log 以上減少した。③魚介類への応用：安定化二酸化塩素による処理で、魚介類の菌数を減少できる。魚介類を二酸化塩素溶液 100 ppm で処理すると、表面の O157:H7、サルモネラおよびリストeria は、それぞれ 4.8, 2.6, 3.3 Log 減少し、安全性が高まった⁸⁴⁾。40 mg/L の二酸化塩素によるザリガニの洗浄では、好気性菌や低温菌数は 4 Log 減少し、塩素が残らなかった¹⁾。20~200 ppm の二酸化塩素は大西洋のサーモン、赤カサゴに対する 5 分間の処理で、大腸菌および

サルモネラはかなり減少した⁴⁴⁾。④飲料業界への応用：二酸化塩素は優れた殺菌力をもつことから、オレンジジュースの新鮮保持のために、ほかの殺菌剤より高い抗菌効果を示されている⁹⁵⁾。牛乳では二酸化塩素による処理で、ブドウ球菌や連鎖球菌が80%～90%減少した⁶⁾。牛乳の賞味期限の延長および微生物的安全性には有効である。

なお、二酸化塩素は、発がん性が疑われるトリハロメタンを生成しないため、米国および世界の多くの国で水道水の消毒に使用されている。また、殺菌料として鶏肉加工や生食用を除いた野菜・果物の洗浄水への使用が、残留二酸化塩素量3 ppm以下という条件で認められている。二酸化塩素の国際機関における評価として、WHOはその飲料水質ガイドラインで、二酸化塩素が水溶液中で加水分解された際に主要な分子種として亜塩素酸イオンが生成するとされ、亜塩素酸の暫定ガイドライン値が二酸化塩素の潜在的毒性に対して十分保護を与えると考えられることから、二酸化塩素のガイドライン値は設定していない。また、日本では、厚生労働省が、飲料水の前処理、プール・公衆浴場の消毒、小麦粉の漂白、一般的な抗菌、消毒などに使用許可をしている。

4. ハードル理論

食品の保存性は、食品自体に含まれる成分（食塩、有機酸、糖分、添加物など）や微生物（乳酸菌など）によって影響されるだけでなく、食品の置かれた環境（保存温度、ガス組成など）、処理法（加熱殺菌など）によっても影響される。古代から行われてきた食品の保存方法としては、乾燥、塩蔵、糖蔵、酢漬けなどがあり、近年に至っては、技術の進歩により、冷蔵、冷凍などの物理的な貯蔵技術に加え、保存料、ガス置換などの技術が駆使されるようになった。食品を保存するにあたっては、これらの要素をうまく組み合わせて実行しているのが普通である。例えば、pH調整を行った上で冷蔵することや食塩および蔗糖を加えた上で真空包装をするなどの工夫である。このような保存に係る要素をそれぞれのハードルに例えて分かりやすくしたものがハードル理論である。

食品の微生物制御において、図1-1に示すように加熱処理、水分活性、保存温度、保存料など微生物の発育を抑制する因子をハードルに例えて意図的に組み合わせ、併用効果を発揮させる手法のことをハードルテクノロジーという⁵⁵⁾。

ハードル理論はドイツの **Leistner** 博士によって 1978 年に提唱された。理論的には一つのハードルのみで微生物の発育を抑制することは可能であるが、ハードルを過酷な条件にする必要がある。しかし、食品の場合は、食味が優先されることから、そのようなハードルにも限界がある。いくつかの微生物制御因子を組み合わせ、一つ一つのハードルを低く設定しても、効果的に微生物を抑制するというハードルテクノロジーへと発展した。一つのハードルによって死滅には至らなかった微生物でも次のハードルによって発育せずに死滅する。食品の微生物制御技術としてのハードルテクノロジーは今日食品微生物を効果的に制御する理論である。さらに、**Leistner** 博士は食品中の微生物の増殖、生残性、死滅に関して、微生物のホメオスタシス (homeostasis, 生体内環境を修復する機構)、代謝消耗 (metabolic exhaustion) およびストレス反応に注目し、ハードルテクノロジーの食品の安全確保対策への導入を試み。

また、**Leistner** 博士は食品製造にあたり、安全性、品質および経済性の改善を目的として、特に微生物の発育を抑制する各種の措置やプロセス、たとえば加熱、pH の調節、水

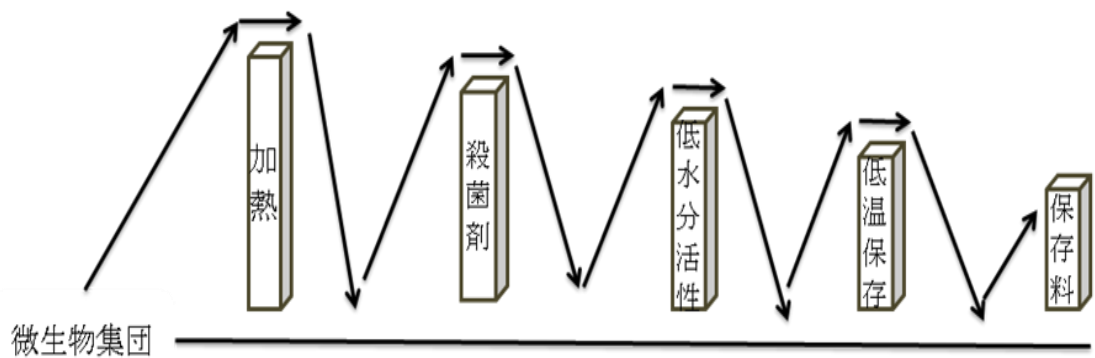


図 1-1. ハードル効果による微生物制御

分活性の低下などのハードルを理論的に組み合わせることにより、「組み合わせ技術」、「組み合わせプロセス」、「組み合わせ方法」などを提唱した。

近年の低塩分志向や無添加志向などの影響で、野菜加工品や浅漬けの日持ちはより短くなる傾向にあり、腐敗菌によるクレームや食中毒菌の潜在的危険などの問題を解決する衛生的な製造技術の開発が急務となっている。しかし、消費者が求める高い品質と、安全性

を確保する強力な殺菌処理の両立は困難である。近年、微生物の生育を抑える要素をハードルのように組み合わせることにより、食品の美味しさを低下させずに微生物制御が可能なハードルテクノロジー（ハードル理論）が、カット野菜や浅漬け類などの非加熱食品の製造に応用されることが注目されている。

5. 野菜の安全性課題

野菜は、集団給食用食品、惣菜、弁当など様々な食品に利用されている。近年、調理済み食品の消費は増加する傾向にあり、野菜または果実をカットした加工品も多く消費者に受け入れられている。しかし、加熱工程のない野菜がカットされたまま利用される野菜サラダや 3%前後の低塩分の浅漬けなどの場合には原料野菜に付着している微生物が増殖できるため、製品の品質低下を招くことがあり、それが病原微生物であった場合は食中毒の発生リスクが高くなる。一方、キュウリ、レタス、ホウレンソウおよびニンジンの外部（外葉）組織では、一般生菌数と大腸菌群数は、それぞれ 4.5～6.5 Log cfu/g, 3.3～4.3 Log cfu/g であったとの報告例がある³⁶⁾。また、野菜は土壌あるいは水耕で栽培されるが、土壌栽培の場合は土壌、灌漑用水、動物の糞尿、浮遊菌など様々なところから微生物の汚染を受ける可能性がある。野菜は病原性細菌、寄生虫、ウイルスが農場を媒介して汚染されやすい。それらが原因で、カット野菜を含む加工食品による食中毒が欧米を中心に報告されている⁴⁾。日本では、漬物を原因とする複数の食中毒事故がしばしば報告されている。また、1996年に大阪府で腸管出血性大腸菌 O157:H7 を原因とした集団食中毒が発生し、食中毒の患者あるいは死者などが被った損失だけではなく、カイワレダイコンの業界に大きな損失をもたらした。

近年、表 1-1 に示すように国内外で野菜を原因とする大規模な食中毒が発生している⁴²⁾。また、コンビニエンスストア等の業界では生菌数が低い原材料の需要が高まっている。このため生産段階での衛生管理に加え、収穫後の原料野菜の殺菌処理が重要なポイントになっている。多くの殺菌剤について、いろいろな農産物における病原性微生物に対する殺菌効果が検証されてきた。水道水による洗浄は、土やゴミなどを除くことはできるが、微生物を完全に除去したり、すでに調理した料理や台所器具、食器に対する交差汚染の危険性

表 1-1. 野菜関連食中毒事例

| 発生年 | 地域 | 原因食品 | 病原体 | 患者数 |
|------|-------------------|--------------|----------|-------|
| 1996 | 日本（大阪府） | カイワレ大根 | 大腸菌 O157 | 7,992 |
| 2000 | 日本（埼玉県） | カブの浅漬け | 大腸菌 O157 | 7 |
| 2002 | カナダ | 野菜サラダ | 大腸菌 O157 | 17 |
| 2002 | 米国 | トマト | サルモネラ | 510 |
| 2002 | 日本（福岡県） | キュウリ浅漬け | 大腸菌 O157 | 102 |
| 2003 | 米国 | レタス | 大腸菌 O157 | 40 |
| 2004 | 英国 | レタス | サルモネラ | 372 |
| 2005 | 日本（香川県） | 野菜浅漬け | 大腸菌 O157 | 43 |
| 2005 | オーストラリア | アルファルファ | サルモネラ | 125 |
| 2006 | 米国, カナダ | ハウレンソウ | 大腸菌 O157 | 205 |
| 2006 | 米国 | トマト | サルモネラ | 183 |
| 2006 | 米国 | レタス | 大腸菌 O157 | 81 |
| 2007 | 米国・ヨーロッパ | バジル | サルモネラ | 51 |
| 2007 | ヨーロッパ | ベビーハウレンソウ | サルモネラ | 354 |
| 2007 | オーストラリア・ ヨーロッパ | ベビーキャロット | 赤痢菌 | 230 |
| 2008 | 米国・カナダ | レタス | 大腸菌 O157 | 134 |
| 2008 | 米国 | ペッパー | サルモネラ | 1,442 |
| 2009 | 米国 | アルファルファスプラウト | サルモネラ | 235 |
| 2010 | 英国 | 緑豆スプラウト | サルモネラ | 219 |
| 2011 | 日本（北海道） | ブロッコリーサラダ | サルモネラ | 1,548 |
| 2011 | ヨーロッパ | フェヌグリークスプラウト | 大腸菌 O104 | 4,321 |
| 2012 | 日本（北海道） | 白菜浅漬け | 大腸菌 O157 | 169 |

をゼロにすることは不可能であると考えられる。現在、野菜業界では食中毒防止や品質保持のため、次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬する洗浄殺菌法が主流である。しかし、かなり高い菌数の生食野菜が流通しているのが現状である。そこで、食品の品質を高いレベルで維持できるマイルドで効率的な殺菌法の開発が強く求められている。塩素の殺菌力を高めるために、物理的処理との併用に関する研究^{56,74,87)}は複数あるが、各処理手法の併用順序による効果の差に関する報告は少ない。

一方、市販される野菜加工品の中で最も多いものは漬物である。特に、浅漬けは消費者に好まれ、漬物の大半を占めている。また、浅漬けは新鮮な食感が重要な商品要素であり、過度な殺菌処理を行えない非加熱食品で、消費期限の短い食品であることから、衛生的な加工と消費期限の設定を適正にする必要がある。近年の低塩分志向や無添加志向などの影響で、浅漬けの日持ちはより短くなる傾向にあり、腐敗菌によるクレームや食中毒菌の潜在的危害などの問題を解決する衛生的な製造技術の開発が急務となっている。ある程度の期間保存される漬物等の野菜加工品には保存料などの化学合成添加物が使われることがあるが、長期的にはヒトの健康への影響が憂慮されるため、人類が長い歴史の中で摂取してきた経験のある天然食材の有する抗菌性が将来は主たる微生物制御法になると考えられる。一方、ハードル理論は非加熱食品の製造に応用され成果を上げている。そこで、野菜浅漬けにハードル理論等の新技術導入による安全性の向上と美味しさを両立させた新しい衛生的な浅漬け製造技術の開発に対する強い要望がある。ところで、2012年北海道で「白菜浅漬け」を原因とする腸管出血性大腸菌 O157 の集団食中毒が発生し、8名が死亡した。原因となった製造日には、通常の2倍程度の漬物を製造していたために殺菌液の塩素濃度が低下し殺菌が不十分であったとされている。漬物製造施設の実態調査によると、浅漬けの原料野菜を殺菌していない事業者は過半数を超えているが、これらは法令違反にあたるわけではない。浅漬けの殺菌は、厚生省が1981年に定めた「漬物の衛生規範」の中にあるが、原材料の野菜の洗浄、殺菌については、殺菌液の濃度や殺菌時間を具体的に定めていない。この事件を受け、近年、厚生労働省は「漬物の衛生規範」を改正した⁵⁰⁾。ここでは殺菌濃度と時間について、次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm の溶液で殺菌する場合の殺菌時間は10分間、200 ppm の溶液では5分間としている。さらに、この殺菌を過

信せず総合的な衛生管理が必要としている。

6. 天然物の抗菌作用

従来、食品を長期間保存するために、加熱、水分活性低下、発酵、抗菌剤添加などの処理が行われてきた。特に、抗菌剤を食品に添加することは、微生物を制御するための有効な方法の一つである。近年、化学合成品の抗菌剤ばかりではなく、天然物由来の抗菌剤も開発されている。例えば、各種有機酸、アミノ酸、リゾチーム等の酵素類、香辛料、キトサン、カラシ抽出物、ワサビ抽出物、グレープフルーツ種子抽出物、アルコール製剤などの天然物由来の抗菌性物質が、保存料や日持ち向上剤とも呼ばれ、幅広く食品に使用されている。

植物由来の抗菌物質としては、香辛料成分が多く報告されている。香辛料とは食品の調理のために用いる芳香性と刺激性を持った植物であり、食品に香り、味、色を与えて嗜好性を高めるために用いられている重要な食素材である。5 万年もの昔から使用されてきた歴史があり、香辛料は単に食品の風味を増すためだけでなく、食品の酸敗による劣化を抑え、微生物の増殖による腐敗を抑制して食品を保存する目的として使われてきた。香辛料の多くは、熱帯植物の種子、花、葉、樹皮等いろいろな部分が利用され、ヨーロッパその他の地域で古くから珍重されてきた。近年、香辛料など植物由来の抽出液やその精油 (EO) の抗菌効果に関する報告が数多くみられる^{15,19,27,41,46)}。

7. 本論文の目的と構成

本研究では、野菜の殺菌における塩素系殺菌剤の使用条件の最適化やハードルテクノロジーに基づいて効率的なマイルド殺菌法を開発するために、また、植物由来の抗菌成分による野菜加工品の微生物的安全性を高めるために、以下のテーマについて研究を行った。

- (1) 野菜の殺菌において塩素系殺菌剤である次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素を用いて種々の濃度と反応時間で洗浄殺菌効果を検討した。
- (2) Leistner 博士が提唱した“ハードル理論”に注目して、野菜表面に強固に付着している種々の細菌を遊離させて殺菌効果を高めることが出来ないかどうか、超音波、パ

ブリング処理などの物理的方法を組み合わせることで効果的に菌数を減少させる手法について検討した。

- (3) 様々な濃度の次亜塩素酸ナトリウム殺菌液を交換せず大腸菌 O157 を接種した野菜を 10 回洗浄し続けた後、この洗浄液で非接種野菜を洗浄し、大腸菌 O157 による交差汚染について塩素濃度との関連から検討を行った。
- (4) 中国産の香辛料や漢方から大腸菌 O157 に対する抗菌効果がある抽出液をスクリーニングし、これらを自製した白菜浅漬けに添加し抗菌効果の有無を確認した。
- (5) 植物 EO の大腸菌 O157 に対する MIC および MBC を調べた。野菜ジュースに植物精油を添加し、接種した大腸菌 O157 の生残について保存温度や保存時間から検討した。また、大腸菌 O157 の耐熱性 (D 値) への影響も検討した。

第2章 塩素系殺菌剤による野菜類の洗浄殺菌

I. 序言

生鮮野菜やカット野菜は美味しくて便利な食品で、ビタミンや食物繊維の供給源として重要である。しかし、これらを原因とする微生物性食中毒が国内外で多発している。この要因として、病原体に感受性の高い高齢者や生活習慣病患者の増加に加え、消費者の簡便・健康・グルメ志向を反映して、生食用の野菜の需要が増えていることが関連していると考えられている。一方、野菜は農場で堆肥や灌漑水から病原性細菌の汚染を受けることがある。弁当、惣菜、カット野菜に非加熱で使用されることが多い。非加熱食品は加熱食品に比べ、食中毒菌の一次汚染や二次汚染による食中毒発生リスクが高い。これら生食用野菜の安全性を高めるためには、生産段階での衛生管理に加え、収穫後の原料野菜の殺菌処理および食卓まで食中毒菌の汚染・増殖を抑えることは極めて重要である。特に生産段階での食中毒菌の初期汚染防止は、生鮮野菜の微生物安全性確保にとって重要である。

洗浄は野菜処理中で最も重要なステップである。水道水洗浄は野菜表面の土などの残留物の除去には有効であるが、微生物の除去や殺菌に効果はあまり認められない。殺菌剤の使用により野菜表面に付着している微生物はある程度減少する。しかし、野菜の複雑な表面構造、付着有機物などの影響で殺菌剤の殺菌効果は限られている。また、次亜塩素酸ナトリウムには、塩素臭による作業環境の悪化や有機物質との反応でトリハロメタンなどの発ガン性物質の産生などの問題点もある^{73,82)}。そこで代替殺菌剤として注目されている二酸化塩素は、塩素より高い酸化力を持ち、有機物質が残留していてもトリハロメタンをほとんど産生せず、広い pH 域で安定して殺菌効果が落ちないなどのメリットがある^{43,88)}。二酸化塩素は、欧米では飲料水や食肉の殺菌などに用いられている。日本では食品添加物としては認可されていないが、食品工場などでの器具殺菌や水道水の前処理などに使用可能である。

一方、野菜を調理、加工する施設は、中小規模の施設が大部分を占めている。そのため、一部の大規模なカット野菜工場のように専用の野菜洗浄機を利用する洗浄殺菌方法は採用しにくいことが多い。この場合、現場の作業員により希釈、調製された次亜塩素酸ナト

リウム溶液など殺菌剤に野菜を浸漬することになる。殺菌剤は迅速に原料野菜を殺菌することが可能な反面、不適切に使用した場合、野菜の品質悪化、作業者への健康被害などの悪影響を与える可能性がある。

本章では、塩素系殺菌剤である次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素を用いて種々の濃度と反応時間でレタス、ホウレンソウ、白菜の洗浄殺菌効果の最適化を試みた。

II. 材料と方法

1. 供試野菜および検体の調製

実験材料として、市販のレタス、ホウレンソウおよび白菜を使用した。これらの野菜は実験当日に東広島市内のスーパーマーケットで購入し、使用するまで冷蔵庫で保管した。土壌や有機物などの異物を除去するために、カットする前に水道水による洗浄を行った。レタスは、外葉1~2枚および芯を除去し、エタノールで消毒した包丁を用いて約3 cm×3 cmにカットした。白菜は、外葉1~2枚および芯を除去し、約2 cm×2 cm程度にカットした。ホウレンソウは根元を除去し、約3 cm×3 cmにカットした。

2. 供試菌株および調製

本研究では、食品総合研究所から譲与された腸管出血性大腸菌 O157:H7（以下 O157）4株（CR-3, MN-28, MY-29, DT-66, いずれもベロ毒素非産生, リファンピシン耐性株）を使用した。供試株を50 ppm リファンピシン添加した10 ml のBHI培地（Brain Heart Infusion, 栄研化学）で37℃, 20-24時間静置培養してから4菌株を混合し、8,000 rpm, 4℃で10分間（Kubota Corp., Tokyo, Japan）遠心洗浄した。沈渣を40 mlの滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁し、同条件でさらに遠心洗浄して、10 mlのPBSに懸濁し、これを接種原液とした。

3. 塩素系殺菌剤

3.1. 次亜塩素酸ナトリウム溶液

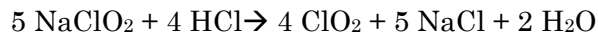
次亜塩素酸ナトリウムとして、次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光純薬）を用い、適宜正

確に希釈して使用した。

なお、有効塩素濃度は高濃度有効塩素計（HANNA HI 95701, Cl⁻+遊離塩素用 DPD 試薬 HI-93701-0）で測定した。

3.2. 二酸化塩素水溶液

二酸化塩素として、二酸化塩素水溶液（クロサキ社）を使用した。これは2種の薬剤をDWに溶解させ二酸化塩素溶液とするもので、製品マニュアルに従い、ネジ付角びんにDW 90 ml, A剤 5 ml, B剤 5 ml を換気の良い部屋で混合し、1時間放置後、冷暗所で保存した。下記の化学的反応によって3,000 ppm濃度の二酸化塩素水溶液を調製後、適宜希釈してから実験に用いた。



4. 接種野菜の作製

滅菌缶に2,500 mlの滅菌済みのDWと10 mlの接種原液を混合して接種菌液とした。調製したレタス、ホウレンソウ、白菜約100 gをそれぞれ手つきカゴ（ステンレス製、Φ139×125）に入れ、その接種菌液に3分間浸漬させた後、キムタオル上で余分な水気を軽く切り、キムタオルを敷いたステンレス製容器に移して、冷蔵庫で一晩自然乾燥させてから実験に使用した。

5. 洗浄殺菌処理

接種した野菜類および非接種野菜類を使用した。野菜50 gを手つきカゴに入れて、ポリビーカーの水道水、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度50, 100, 200, 500 ppm）あるいは二酸化塩素溶液（5, 25, 50, 100, 200 ppm）2,800 mlに5分間それぞれ浸漬して洗浄殺菌を行った。浸漬中は、ゆっくり攪拌した。また、処理時間について検討するために、野菜検体を100 ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液で1, 5, 10分間処理を行った。また、塩素濃度と一般生菌数の経時変化を検討するために、白菜50 gを、100 ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理を行い、0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20分にサンプリングした。各処理を行った後、サラダスピナーで水切りを行い、残った塩素は希釈液中のチオ硫

酸ナトリウムで中和させ、反応を停めた。

6. 菌数測定

洗浄殺菌した後の検体野菜 10 g をストマッカー袋に入れ、希釈液として 1%チオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌リン酸緩衝生理食塩水（チオ PBS）を 9 倍量（90 ml）加え、ストマッカーで約 1 分間処理したものを試料原液とした。その 1 ml を PBS 9 ml で希釈し、10 倍段階希釈液を作製した。残存大腸菌 O157 菌数の測定には、各希釈段階液 0.1 ml を 50 ppm リファンピシン添加ソルビトールマッコンキー寒天培地（rif 加 SMAC 培地，栄研化学）および rif 加 TSA（トリプトソイ寒天培地，栄研化学）培地に塗抹し、37℃で 24 時間培養し、発育集落を計数した。一般生菌数の測定には、各段階希釈液 1 ml を滅菌シャーレにとり、標準寒天培地（日水製薬）15 ml で混釈し、固化後 8 ml の同培地を重層して、35℃，48 時間培養後、出現した全集落を計数した。大腸菌群数はデソキシコレート培地（Desoxycholate，日水製薬）で 37℃，24 時間混釈平板培養後、赤色集落を計数した。

7. 統計処理

各菌数を常用対数に変換し、統計処理を行った（SPSS 17.0，IBM）。多重比較は Tukey-Kramer 法により行った（有意水準 5%）。

III. 実験結果

1. 葉野菜類の洗浄殺菌における次亜塩素酸ナトリウムの効果

葉野菜における一般生菌数，大腸菌群数および接種した腸管出血性大腸菌 O157:H7 に対する次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度の影響を図 2-1 に示す。コントロールと比較すると，次亜塩素酸ナトリウム洗浄は各菌数を有意に減少させた。レタス，ホウレンソウおよび白菜の一般生菌数の減少において，有効塩素濃度の差は認められず，各濃度（50，100，200，500 ppm）で 1 Log 以上減少させた。大腸菌群数の減少には，ホウレンソウを除いて，200 ppm と 500 ppm での差は認められなかった。50～100 ppm 濃度の次亜塩素酸ナトリウムは葉野菜類に接種した大腸菌 O157 を最大 2 Log 減少させた。しかし，50 ppm

と 200 ppm の次亜塩素酸ナトリウムで殺菌効果は変わらず、さらに 500 ppm の高濃度にしても大腸菌 O157 菌数はそれほど下がらなかった。

100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムによる葉野菜類の洗浄殺菌における処理時間の影響を図 2-2 に示す。10 分間の処理は、一般生菌数を最大 2 Log ほど減少させた。一般生菌数では、5 分および 10 分の処理は 1 分の処理より高い殺菌効果が得られた。しかし、5 分と 10 分の処理間で差は認められなかった。大腸菌群数および接種大腸菌 O157 は一般生菌数と同様に、5 分および 10 分処理では 1 分処理より高い殺菌効果が得られた。図 2-3 に、次亜塩素酸ナトリウムによる白菜の殺菌における処理時間の影響を示す。一般生菌数は、洗浄殺菌開始に大きく減少し、5 分以後ほぼ一定になった。さらに、3 分と 5 分の処理間で有意差は認められた。有効塩素濃度は時間の経過とともに減少した。

2. 葉野菜類の洗浄殺菌における二酸化塩素の効果

二酸化塩素溶液によるレタスの洗浄殺菌効果を図 2-4 に示す。非接種レタスあるいは大腸菌 O157 接種レタスにおいて二酸化塩素溶液はその濃度にかかわらず、水道水 (0 ppm) による洗浄より高い洗浄殺菌効果が得られた。二酸化塩素溶液 200 ppm での一般生菌数は、5, 25 ppm におけるそれらと比較し、1.1~1.2 Log 低い値を示したが、5 ppm と 25 ppm で顕著な差は認められなかった。しかし、二酸化塩素溶液 200 ppm での一般生菌数は、50, 100 ppm におけるそれらと比較し、0.7~0.8 Log 低い値を示したが、50 ppm と 100 ppm の間に顕著な差は認められなかった。また、レタスでの大腸菌群数に対する二酸化塩素溶液 5 ppm と 25 ppm, 25 ppm と 50 ppm および 50 ppm と 100 ppm の間の洗浄殺菌効果には、大差は認められなかったが、200 ppm 二酸化塩素処理では 100 ppm 以下の処理よりも大腸菌群数は低くなった。レタスに接種した O157 に対する二酸化塩素溶液の洗浄殺菌では、5 分間の処理で O157 菌数は、50 ppm までは、濃度の増加とともに、減少する傾向を示した。50 ppm 以上の処理での O157 菌数はほぼ一定であった。また、100 ppm 以上の二酸化塩素溶液による洗浄殺菌では、レタスが萎びたり褐変するなど、品質への悪影響が認められた。

3. 次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素の葉野菜類における殺菌効果の比較

図 2-5 に、レタス、ハウレンソウおよび白菜を 100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムあるいは 50 ppm 二酸化塩素で洗浄殺菌したときの一般生菌数および大腸菌群数を示す。次亜塩素酸ナトリウム溶液 100 ppm, 5 分間の洗浄で一般生菌数は 1 Log ほどの減少にとどまった。野菜の種類にかかわらず, 50 ppm 二酸化塩素溶液では 100 ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液よりもさらに 0.5~1 Log の一般生菌数を低下させた。

大腸菌群数は一般生菌数の減少傾向と同様に, 野菜の種類にかかわらず, 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 1~1.5 Log の減少にとどまった。50 ppm の二酸化塩素溶液のほうが 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液よりも高い殺菌力を示し, さらに 0.5 Log 大腸菌群数を低下させた。

レタス, ハウレンソウおよび白菜に接種した大腸菌 O157 に対する次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素溶液の洗浄殺菌効果を図 2-6 に示す。水道水による洗浄よりも塩素系殺菌剤のほうが大腸菌 O157 菌数を減少させた。また, 野菜の種類にかかわらず, 二酸化塩素溶液は次亜塩素酸ナトリウム溶液より高い殺菌力を示した。大腸菌 O157 の選択培地である rif 加 SMAC 培地を用いた O157 計測数は, rif 加 TSA 培地を用いた場合より約 0.1~0.3 Log 低い値を示したが, O157 の減少傾向には顕著な差は認められなかった。

IV. 考察

本研究では, 水道水だけの洗浄では, 青果物カット事業協議会の自主基準の一般生菌数の基準 5 Log 以下まで減少させることはできなかった。野菜の洗浄殺菌に次亜塩素酸ナトリウム溶液および二酸化塩素溶液を使用することで, 一般生菌数, 大腸菌群数および接種した大腸菌 O157 菌数は, 水道水による洗浄より有意に減少した。しかし, 次亜塩素酸ナトリウム溶液の有効塩素濃度 100, 200 および 500 ppm の洗浄殺菌効果には, 野菜の種類にかかわらず顕著な差は認められなかった。名塚ら⁶⁶⁾はレタス, キャベツを種々の濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄殺菌して, 有効塩素濃度 100~400 ppm の範囲では濃度差による野菜における O157 の減少には有意差は認められなかったという結果を報告している。本研究においても同様の結果が得られたことから, 野菜の洗浄殺菌で単に次亜塩

素酸ナトリウム溶液の濃度のみ高めても、期待されるほど殺菌効果は上昇しないと結論した。また、二酸化塩素による葉野菜類の洗浄殺菌では、濃度を高くすると、野菜類における一般生菌数と大腸菌群数を多く減少させたが、高濃度の二酸化塩素は葉野菜類の品質に影響を与え、塩素臭を伴った。

処理時間 1 分から 5 分に延長しても、期待されるほど一般生菌数、大腸菌群数および接種した O157 の減少は認められなかった。白菜の次亜塩素酸ナトリウム溶液での洗浄殺菌で、一般生菌数は処理時間の 5 分以降減少がほとんど認められず、むしろ有効塩素濃度は減少した。この結果から、洗浄殺菌初期に菌数は減少し、5 分間の洗浄殺菌で生残した微生物は、さらに洗浄時間を延長しても完全な殺菌は困難であると考えられた。Rahman ら⁷⁴⁾はキャベツの塩素洗浄において処理時間を 3 分、5 分および 10 分にしても、殺菌効果は同じと報告した。また、Rahman ら⁷⁵⁾によると、にんじんの洗浄殺菌では 10 分間の処理で高い殺菌効果を得られたが、3 分と 5 分の処理の差は認められなかった。

本研究では、次亜塩素酸ナトリウム溶液や二酸化塩素溶液による野菜類の洗浄殺菌効果については、野菜の種類に関係なく、一般生菌数、大腸菌群数、接種した O157 はそれぞれ 1.0~2.0 Log 程度しか減少しなかった。次亜塩素酸ナトリウム溶液より、二酸化塩素溶液は一般生菌数および大腸菌群数に対して高い洗浄殺菌効果が認められた ($p < 0.05$)。野菜表面には種々の細菌が強固に付着しており塩素系殺菌剤の単独使用での殺菌効果は既報⁶⁹⁾どおり低かった。その原因としては、野菜や果物の表面の撥水性により気泡が表面に残ること、さらに走査電子顕微鏡写真 (図 2-7) からわかるように表面には多くの微生物がバイオフィルムを形成していることや切断面、気孔などを通して植物組織内にわずかに侵入した菌が保護され、次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素と接触しにくいためなどが考えられる。

したがって、洗浄殺菌の効率や、野菜の品質、洗浄後のすすぎの水量および現場の環境などを考慮すると、現場での野菜類の洗浄殺菌では、次亜塩素酸ナトリウム溶液 100 ppm、二酸化塩素溶液 50 ppm、処理時間 5 分が適正な条件であると結論した。

V. 小括

1. 次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素溶液を用いた葉野菜の洗浄殺菌効果で、使用濃度による大きな差は認められなかった。また、高濃度の二酸化塩素は野菜の品質に悪影響を与えた。
2. 処理時間を延長しても、殺菌効果の上昇は認められなかった。逆に、有効塩素濃度は時間の経過とともに徐々に低下した。
3. 塩素系殺菌剤による野菜類の洗浄殺菌の結果、野菜の種類に関係なく、一般生菌数、大腸菌群数、接種した O157 は各 1.0~1.5 Log 程度減少した。二酸化塩素は次亜塩素酸ナトリウムより高い殺菌力を示した。
4. 野菜の洗浄殺菌では、次亜塩素酸ナトリウム溶液 100 ppm, 二酸化塩素溶液 50 ppm, 処理時間 5 分が適正な条件である。

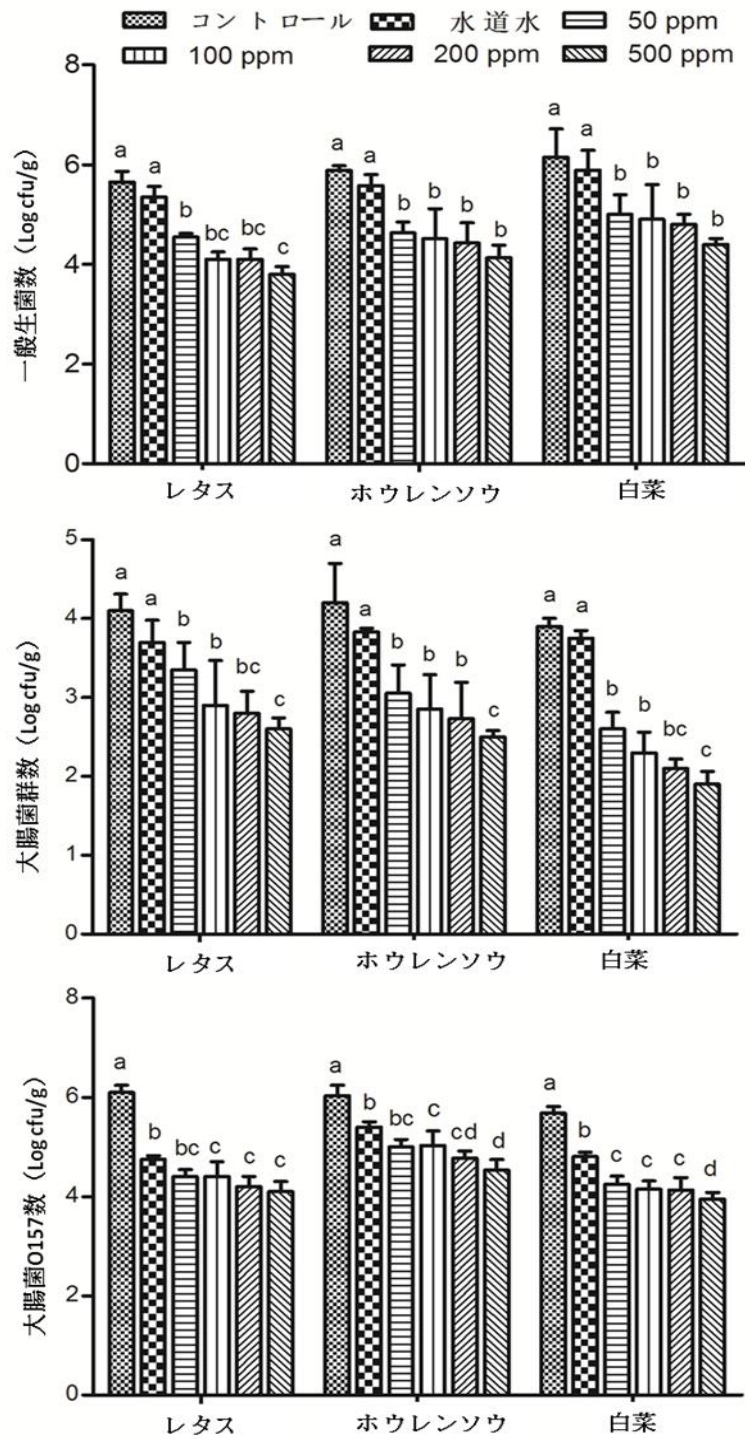


図 2-1. 葉野菜の洗浄殺菌における次亜塩素酸ナトリウムの濃度の影響
 値は 3 回の試験の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。
 各種類の野菜で異なる文字間には有意差がある ($p < 0.05$)。

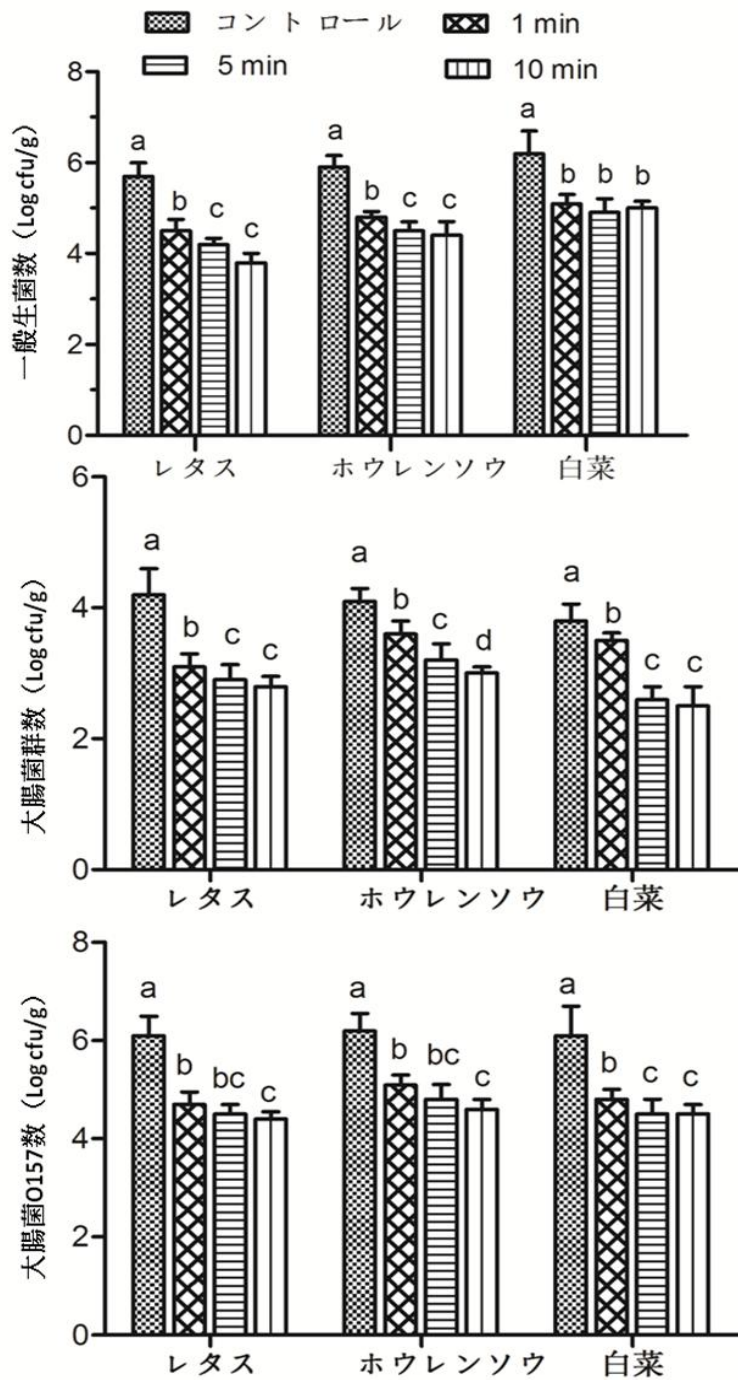


図 2-2. 葉野菜の塩素洗浄殺菌における処理時間の影響
 洗浄殺菌液として次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm を使用した。
 値は 3 回の試験の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。
 異なる文字間には有意差がある (p < 0.05)。

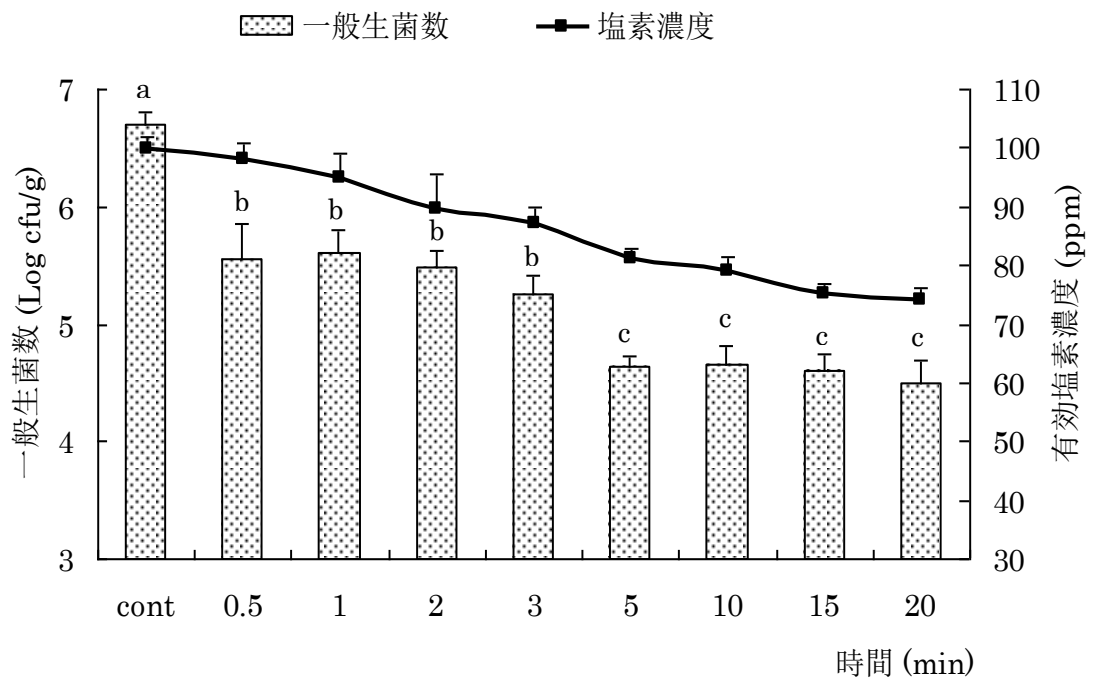


図 2-3. 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (100 ppm) による白菜の殺菌 (反応時間の影響)

異なる文字間には有意差がある ($p < 0.05$)。

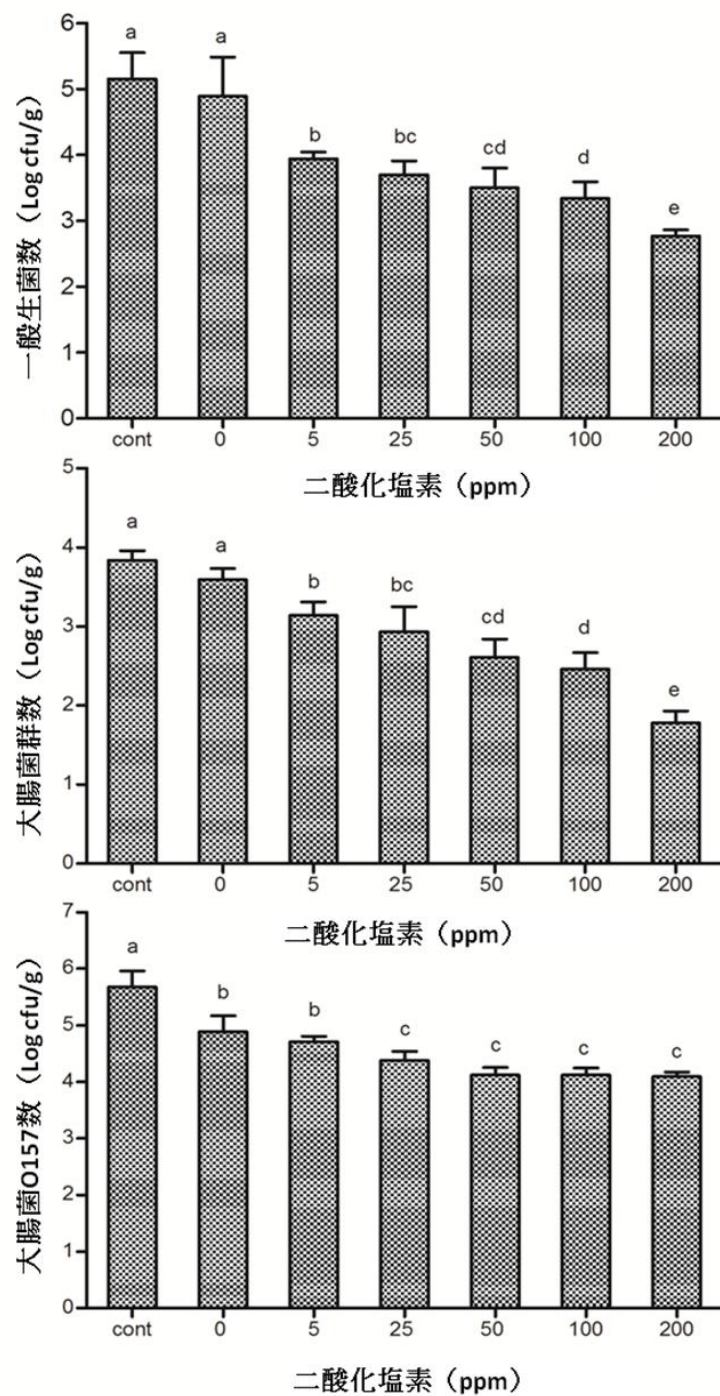


図 2-4. 二酸化塩素によるレタスの洗浄殺菌
 cont : 非洗浄野菜 ; 0 ppm : 水道水
 値は 3 回の試験の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。
 異なる文字間には有意差がある (p < 0.05)。

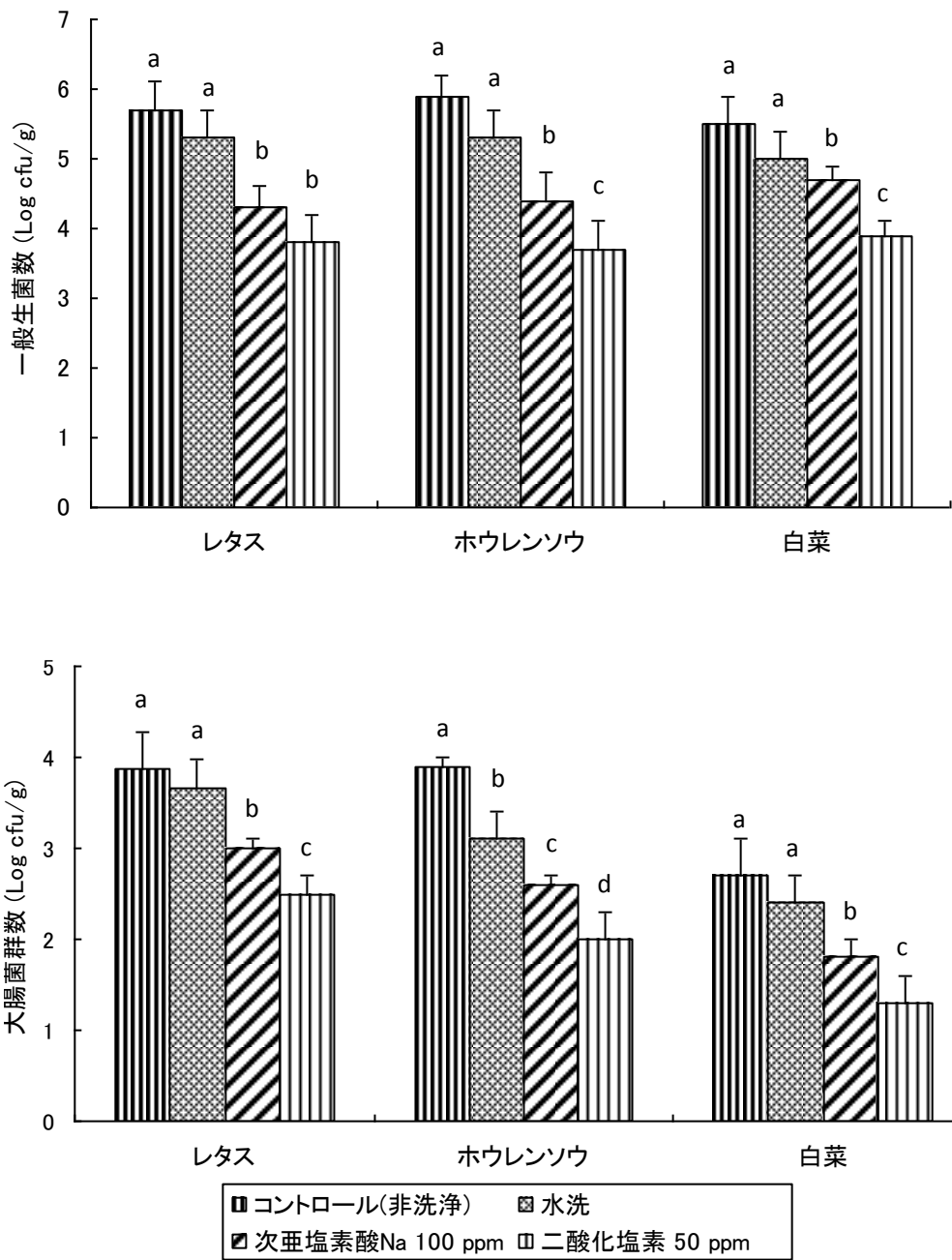


図 2-5. 塩素系殺菌剤による野菜の洗浄殺菌効果

値は 3 回の試験の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。

異なる文字間には有意差がある ($p < 0.05$)。

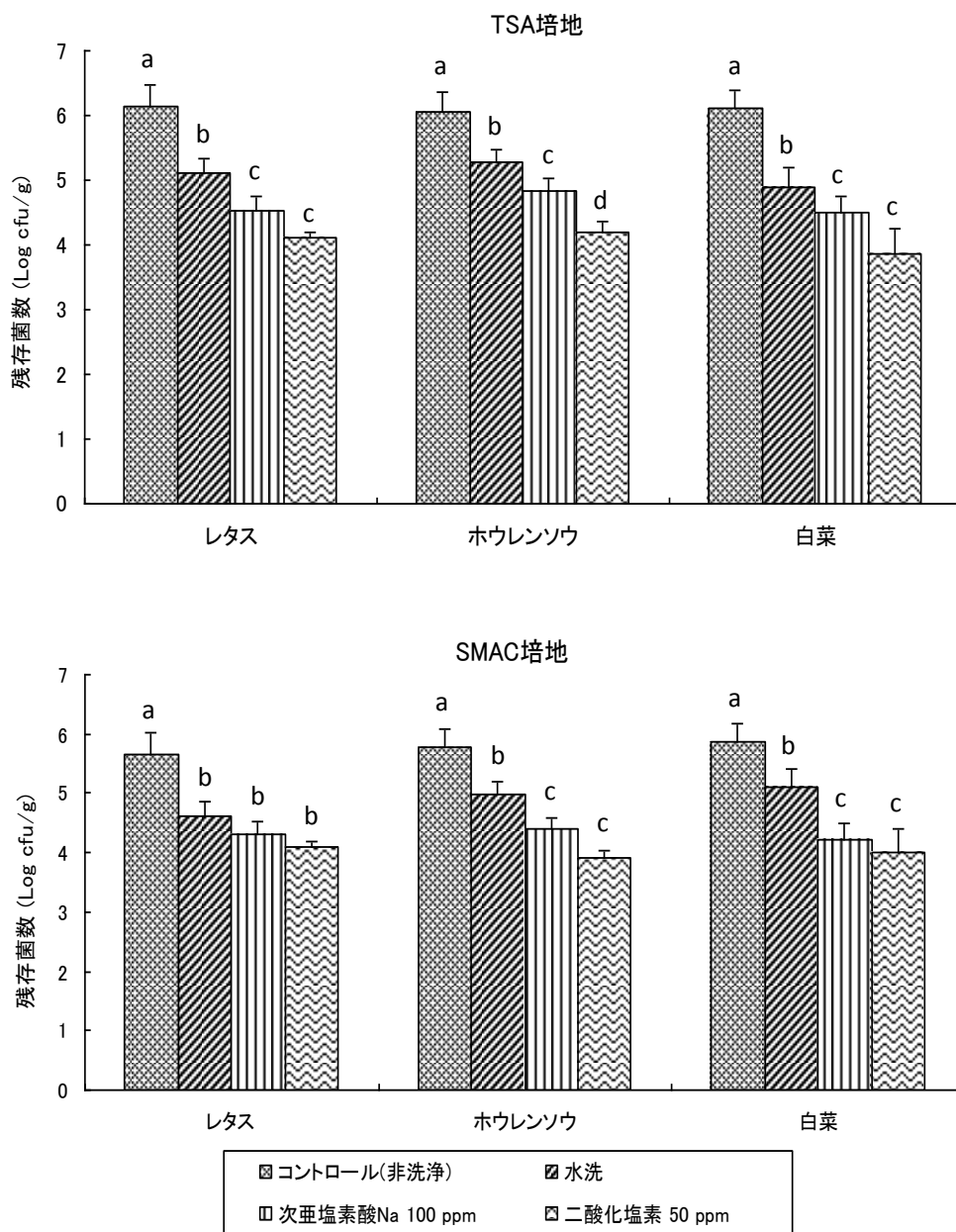


図 2-6. 野菜類に接種した大腸菌 O157 に対する塩素系殺菌剤の洗浄殺菌効果値は 3 回の試験の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。各種類の野菜で異なる文字間には有意差がある ($p < 0.05$)。

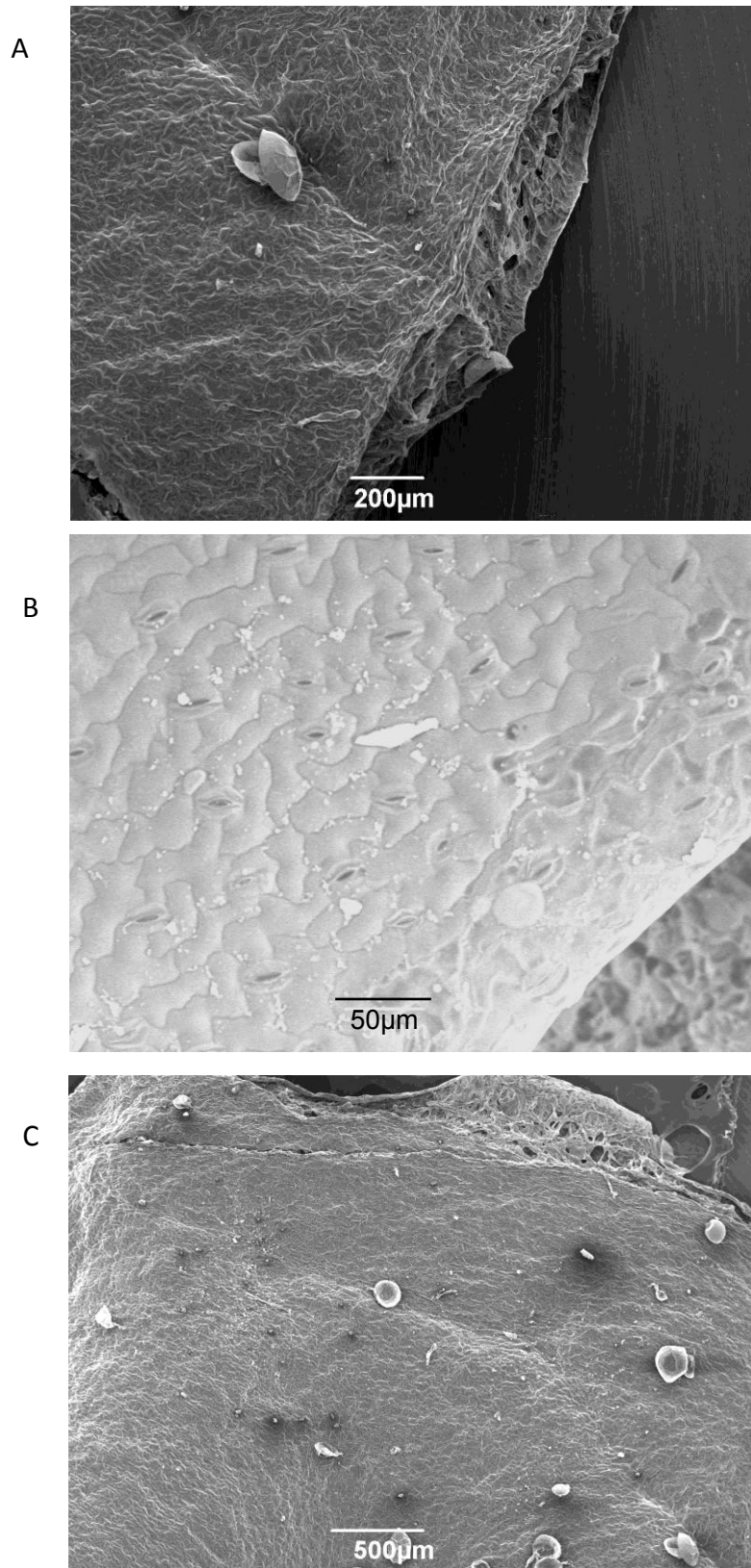


図 2-7. 走査電子顕微鏡によるホウレンソウ表面の観察

A: 切断口 B: 気孔 C: バイオフィルム

山下⁹⁶⁾原図

第3章 塩素系殺菌剤と物理的処理の併用効果

I. 序言

生鮮野菜は農場から食卓まで微生物の汚染は避けられない。とくに、農場では、汚染された灌漑水や処理不十分な堆肥などによって病原菌の汚染を受けやすい。そこで原料野菜の殺菌や野菜加工品の静菌による食中毒リスク低減は重要な課題となっている。加熱処理は効果的で確実な殺菌方法であるが、カット野菜や浅漬け類には使用することは難しい。そこで、化学的殺菌が重要な役割を果たしており、特に塩素系殺菌剤がよく使用されている。しかし、前章の結果では、葉野菜の種類にかかわらず、次亜塩素酸ナトリウムにより各菌数は1.0~1.5 Logしか減少しなかった。本章では、塩素の殺菌効果を高めるために、物理的処理と併用して野菜の洗浄殺菌処理を試みた。いくつかの微生物制御因子を組み合わせ、高い静菌や殺菌効果を果たす技術をハードルテクノロジーという。製品劣化を引き起こさない程度のマイルドな処理を複数組み合わせることで、食品中の腐敗細菌や病原菌を制御する手法である。野菜表面に強固に付着している微生物に対して超音波やバブリングは遊離効果がある可能性がある。また、低温加熱処理に伴う熱の影響によって、野菜の表面構造を変化させて表面に付着している細菌の殺菌剤との接触を促進したり、細菌の殺菌剤への抵抗性を下げる可能性もある。種子では塩素処理後47-51℃の水で継続的に処理すると単独より高い効果が得られている⁵⁶⁾。小野ら⁷¹⁾はカット野菜の弱酸性次亜塩素水による洗浄殺菌にシヨ糖脂肪酸エステル処理を組み合わせ、単独処理より高い殺菌効果が得られたことを報告した。また、レタス、ブロッコリーおよびイチゴでの塩素処理の殺菌効果はシヨ糖脂肪酸エステルやバブリング、超音波、低温加熱などとの併用により高まったとの報告もある^{32,87)}。

ところで、超音波洗浄機に使用される超音波は、周波数によってそれぞれ性格が異なる。また単周波による洗浄では、エネルギーの常に強い部分と弱い部分が発生する。これは定

在波によるもので周波数が異なるとこの位置も異なる。ダイナシヨック方式による超音波洗浄は異なる3つの周波数を高速で切り替え、それぞれの波の特長をを互いに助長し、効果的な洗浄効果が期待される。

本章では、葉物野菜（レタス、ホウレンソウ、白菜）の殺菌において、塩素系殺菌剤である次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素の殺菌効果上昇のために、低温加熱、ダイナシヨック方式の超音波などの物理的処理との併用効果について検証を行った。

II. 材料と方法

1. 大腸菌接種野菜の調製

第2章と同様の方法で大腸菌 O157 接種野菜を調製した。

2. 超音波と Tween 80 の併用効果

超音波（超音波洗浄機（Honda W-338, 爆洗）、ダイナシヨック方式、100 kHz 出力 100%）単独による非接種レタスおよび大腸菌 O157 接種レタスの洗浄効果を40分間まで調べた。また、界面活性剤として、0.1% Tween 80（ナカライテスク）との併用効果も調べた。各洗浄後、非接種レタスの一般生菌数、大腸菌群数、接種レタスの残存大腸菌 O157 数を第2章で述べた方法で測定した。

3. 塩素系殺菌剤と物理的処理の併用効果

物理的処理として、超音波、バブリング（ナフロンバブラー、気泡発生圧力：9.8 kPa, 気泡：5~100 μm）および低温加熱処理を用いた。超音波、バブリング処理については、熱湯消毒した恒温水槽に水道水を12 L（12,000 ml）、6 L（6,000 ml）それぞれ入れたものを準備した。これに検体約50 gを入れ、最大出力で5分間洗浄殺菌した。次亜塩素酸ナ

トリウム溶液 100 ppm, 二酸化塩素溶液 50 ppm と超音波, バブリングの併用は同時に行った。加熱処理 (50℃) では, 次亜塩素酸ナトリウム溶液 100 ppm あるいは二酸化塩素溶液 50 ppm で 5 分間処理を行った後, 恒温水槽にて低温加熱 5 分間処理を行った。また, 低温加熱処理後に塩素系殺菌剤処理, 低温加熱と塩素系殺菌剤の同時処理も行った。なお, 有効塩素濃度は第 2 章と同様に測定した。各試験は 3 回繰り返した。

4. 菌数測定

各処理後, 10 g のサンプルをストマッカー袋に入れ, チオ PBS を 90 mL 添加し, ホモジナイズしてから 10 倍段階希釈を行って残存菌数を測定した。

5. 統計処理

第 2 章と同様の方法で行った。

III. 実験結果

1. 超音波による葉野菜類の洗浄効果

図 3-1 に非接種レタスにおける超音波単独および Tween 80 との併用による洗浄殺菌効果を示す。超音波単独 10 分間処理で非接種レタスにおける一般生菌数, 大腸菌群数は 0.5, 1.0 Log 程度それぞれ減少した。処理時間を 40 分間に延長したところ, 処理水の温度が約 25℃から 33℃まで上昇したが, 10 分間処理と比較して, さらなる菌数の減少は認められなかった。また, 界面活性剤 (Tween 80) を添加しても, 超音波処理の洗浄殺菌効果を高める効果は得られなかった (図 3-1. B)。図 3-2 は大腸菌 O157 接種レタスにおける超音波の洗浄殺菌効果を示している。非接種レタスへの洗浄殺菌と同様に, 処理時間を延長あるいは界面活性剤を添加しても, 顕著な洗浄殺菌効果の上昇は認められなかった。

2. 物理的処理と次亜塩素酸ナトリウムあるいは二酸化塩素の併用効果

レタス、ホウレンソウおよび白菜の洗浄殺菌において、次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm あるいは二酸化塩素 50 ppm と超音波処理、バブリング処理、低温加熱の物理的処理の併用効果を表 3-1~3 に示す。いずれの野菜においても、一般生菌数および大腸菌群数は水道水による洗浄で 0.2~0.6 Log, 次亜塩素酸ナトリウム溶液による洗浄で 1 Log 程度の減少にとどまった。接種大腸菌 O157 は次亜塩素酸ナトリウム洗浄で最大 1.4 Log 減少した。二酸化塩素は次亜塩素酸ナトリウムより高い殺菌力が認められた。超音波およびバブリング単独処理では、葉物野菜における各菌数の減少は 1 Log 以内であり、水道水洗浄との有意差はみられなかった。また、次亜塩素酸ナトリウムおよび二酸化塩素は超音波やバブリング処理との併用による野菜の洗浄殺菌効果は高まらなかった。一般生菌数、大腸菌群数、接種大腸菌 O157 はそれぞれ 0.7~1.4, 1.0~1.6, 1.1~1.7 Log 減少した。

野菜の 50℃における加熱処理では、一般生菌数、大腸菌群数および接種大腸菌 O157 をそれぞれ 1.1~1.6, 2.3~2.7, 1.0~1.6 Log 減少させた。さらに、次亜塩素酸ナトリウムあるいは二酸化塩素の殺菌効果は 50℃の加熱処理との併用で上昇した。しかし、併用の順序により殺菌効果に多少の差が認められた。50℃加熱処理の後、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムあるいは 50 ppm 二酸化塩素で処理を行うと、一般生菌数は 1.9~2.8 Log 減少した。レタスでは大腸菌群数が最大 3.9 Log, 白菜では接種大腸菌 O157 が最大 2.5 Log 減少した (表 3-3)。50℃を後処理とした場合は、前処理とした場合よりも低かった。しかし、大腸菌群数や接種大腸菌 O157 の減少では同じレベルの洗浄殺菌効果が得られた。また、塩素系殺菌剤と 50℃加熱の同時処理では、さらに高い菌数減少効果が得られ、一般生菌数、大腸菌群数および接種大腸菌 O157 は、それぞれ最大 2.9, 4.1, 2.5 Log 減少した。

一方、全体的に大腸菌 O157 の計数において TSA を用いた場合は SMAC よりも若干高い大腸菌 O157 数が検出された。

IV. 考察

葉物野菜の洗浄殺菌で、世界中でよく使用されているのは次亜塩素酸ナトリウムである。しかし、野菜表面には種々の細菌が強固に付着しており塩素系殺菌剤の単独使用での殺菌効果は低かった（第 2 章）。また、野菜表面には多くの微生物がバイオフィルムを形成していることや気孔などを通して植物組織内にわずかに侵入した菌が保護され、次亜塩素酸ナトリウムなどの殺菌剤と接触しにくいことも理由の一つである。本章では葉野菜表面に強固に付着している細菌を遊離させ、殺菌剤との接触を促進するために、超音波やバブリングなど物理的処理の効果を検討した。超音波 5 分間単独処理は水道水と同じ程度の殺菌効果であった。処理時間を 40 分に延長すると、処理水の温度が 8~10℃程度高くなったが、殺菌効果の上昇は認められなかった。また、界面活性剤を添加しても、超音波の洗浄効果の上昇は認められなかった。次亜塩素酸ナトリウムと超音波の併用では、40 分間処理しても、殺菌効果の上昇は認められなかった。バブリング処理の効果を本章で評価したが、単独あるいは塩素系殺菌剤との併用効果は認められなかった。Inatsu ら³⁷⁾も超音波は塩素の殺菌効果を上昇させなかったと報告している。

また、野菜表面の撥水性を低下させ、表面などの気泡の除去できれば、塩素系殺菌剤の殺菌効果が高まるのではないかと考え、低温加熱処理と次亜塩素酸ナトリウムあるいは二酸化塩素処理を組み合わせ、野菜での殺菌効果を評価した。予備実験で 55℃加熱処理と併用した場合、強い塩素臭の残留や、野菜の軟弱化などの悪影響が認められた。葉野菜を次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理する場合、有害物質のクロロホルムの生成量は低い温度のほうが少ないことが報告されている³¹⁾。したがって、有害物質の生成を抑え、かつ野菜の食感を変えずに汚染菌を減少できる上限温度は、50℃と考えられた。

低温加熱による前処理を行い、続いて 100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムあるいは 50 ppm 二酸化塩素溶液 5 分間浸漬という複数の処理の併用は、それぞれ単独処理よりも高い殺菌

効果が得られた。また、低温加熱と塩素系殺菌剤の同時処理でも高い殺菌力がみられた。低温加熱することにより次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素の殺菌効果が高まる理由としては、加熱処理することにより、付着菌自身が熱の影響で損傷やストレスを受けて、殺菌剤に対する感受性が高まったものと考えられた⁴⁸⁾。また、塩素系殺菌剤の前処理として加熱すると、後処理とした場合よりも殺菌効果は多少高かったことから、付着菌を保護していたバイオフィルムが破壊され、これらの殺菌剤が菌体と接触できるようになった可能性もある²⁵⁾。さらに、熱によって野菜組織が拡張することから、表面や気孔などにいる細菌は殺菌剤との接触が促進されて、殺菌効果が高くなったとも考えられる。

野菜に残存した大腸菌 O157 の検出は本研究で非選択培地の TSA および選択培地の SMAC を使用したが、検出菌数に差が認められた。次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素および物理的処理の超音波や低温加熱などの処理は大腸菌 O157 が損傷やストレスを受けて、選択培地に増殖が遅れた、あるいは増殖できなかったと考えられる。

V. 小括

1. 超音波処理, バブリング処理の洗浄殺菌効果はあまり認められなかった。処理時間を延長しても界面活性剤を添加しても効果の上昇は認められなかった。
2. 塩素系殺菌剤である次亜塩素酸ナトリウムおよび二酸化塩素の超音波処理, バブリング処理による洗浄殺菌効果の上昇はみられなかった。
3. 50℃での低温加熱は塩素系殺菌剤の殺菌効果を高めた。50℃加熱処理と塩素系殺菌剤の併用で, 葉野菜における一般生菌数, 大腸菌群数および大腸菌 O157 は最大 2.9, 4.1, 2.5 Log それぞれ減少した。
4. 塩素系殺菌剤との併用で, 低温加熱を前処理あるいは同時処理とした場合, より高い殺菌効果が得られた。

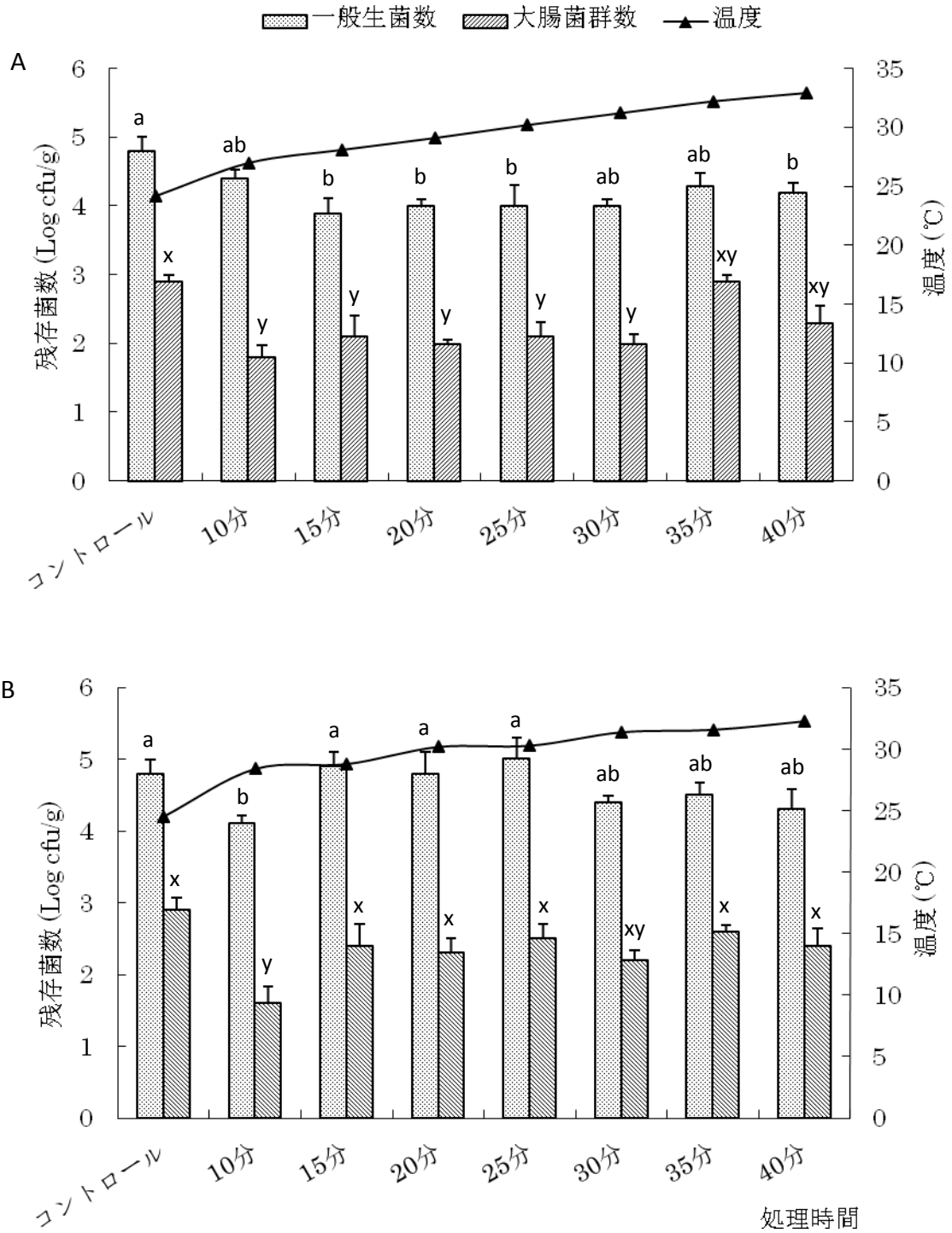


図 3-1. 超音波単独および Tween 80 との併用による非接種レタスの洗浄殺菌

A (上段) : 超音波 (単独) B (下段) : 超音波+Tween 80

コントロール : 非洗浄

異なる文字間には有意差がある ($p < 0.05$)。

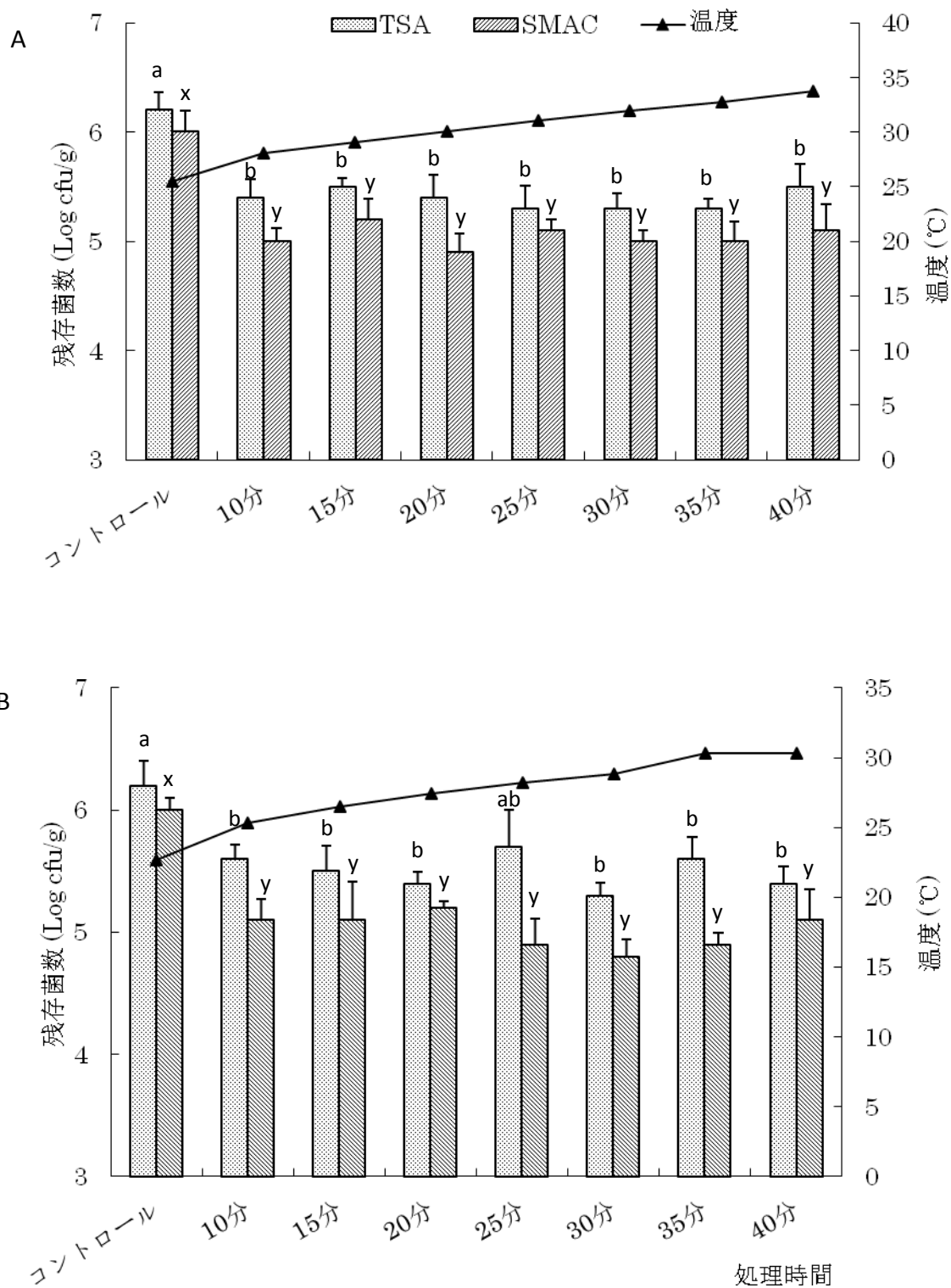


図 3-2. 超音波単独および Tween 80 との併用による大腸菌 O157 接種レタスの洗浄殺菌

A (上段) : 超音波 (単独) B (下段) : 超音波 + Tween 80

コントロール : 非洗浄

各菌数で異なる文字間には有意差がある ($p < 0.05$)。

表 3-1. 物理的処理を組み合わせたレタスの洗浄殺菌効果

| 処 理 | 菌数減少 (Log) | | | |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 一般生菌数 | 大腸菌群数 | O157 (TSA) | O157 (SMAC) |
| 水道水 | 0.2 ± 0.14 ^a | 0.4 ± 0.03 ^a | 0.7 ± 0.09 ^{a,x} | 1.0 ± 0.24 ^{a,x} |
| 100 ppm NaClO | 0.9 ± 0.35 ^b | 1.0 ± 0.30 ^b | 1.1 ± 0.07 ^{b,x} | 1.2 ± 0.05 ^{ab,x} |
| 50 ppm ClO ₂ | 1.2 ± 0.38 ^b | 1.3 ± 0.36 ^c | 1.4 ± 0.08 ^{b,x} | 1.2 ± 0.16 ^{ab,x} |
| バブリング | 0.4 ± 0.11 ^a | 0.4 ± 0.11 ^a | 0.7 ± 0.14 ^{a,x} | 0.9 ± 0.17 ^{a,x} |
| バブリング+NaClO | 1.0 ± 0.09 ^b | 0.9 ± 0.21 ^b | 0.2 ± 0.14 ^{b,x} | 1.2 ± 0.07 ^{ab,x} |
| バブリング+ClO ₂ | 1.2 ± 0.21 ^b | 1.3 ± 0.18 ^c | 1.4 ± 0.09 ^{bc,x} | 1.3 ± 0.11 ^{ab,x} |
| 超音波 | 0.4 ± 0.21 ^a | 0.4 ± 0.11 ^c | 0.8 ± 0.11 ^{a,x} | 1.0 ± 0.14 ^{a,x} |
| 超音波+NaClO | 1.1 ± 0.12 ^b | 1.1 ± 0.20 ^{bcd} | 1.2 ± 0.11 ^{b,x} | 1.2 ± 0.08 ^{ab,x} |
| 超音波+ClO ₂ | 1.3 ± 0.15 ^b | 1.4 ± 0.15 ^{cd} | 1.4 ± 0.16 ^{bc,x} | 1.5 ± 0.18 ^{ab,x} |
| 50°C | 1.1 ± 0.27 ^b | 2.3 ± 0.16 ^e | 1.2 ± 0.11 ^{b,x} | 1.4 ± 0.20 ^{b,x} |
| 50°C+NaClO | 1.9 ± 0.20 ^c | 4.0 ± 0.00 ^f | 1.6 ± 0.21 ^{e,x} | 1.9 ± 0.24 ^{df,y} |
| 50°C+ClO ₂ | 2.5 ± 0.18 ^c | 4.0 ± 0.00 ^f | 1.9 ± 0.24 ^{f,x} | 2.2 ± 0.28 ^{de,y} |
| 50°C→NaClO | 1.9 ± 0.18 ^c | 3.8 ± 0.10 ^f | 1.5 ± 0.10 ^{ce,x} | 1.7 ± 0.04 ^{cf,y} |
| 50°C→ClO ₂ | 2.4 ± 0.26 ^c | 3.9 ± 0.23 ^f | 1.7 ± 0.11 ^{de,x} | 2.1 ± 0.05 ^{d,y} |
| 50°C←NaClO | 1.3 ± 0.12 ^b | 3.4 ± 0.41 ^f | 1.3 ± 0.21 ^{bc,x} | 1.6 ± 0.24 ^{c,y} |
| 50°C←ClO ₂ | 1.4 ± 0.24 ^b | 3.6 ± 0.51 ^f | 1.5 ± 0.17 ^{c,x} | 1.6 ± 0.17 ^{c,x} |

処理時間：5分

TSA：トリプトソイ寒天培地

SMAC：ソルビトールマッコンキー寒天培地

結果は3回の平均値 ± 標準偏差を表す。

異なる文字間には有意差がある (p < 0.05)。

表 3-2. 物理的処理を組み合わせたハウレンソウの洗浄殺菌効果

| 処 理 | 菌数減少 (Log) | | | |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | 一般生菌数 | 大腸菌群数 | O157 (TSA) | O157 (SMAC) |
| 水道水 | 0.3 ± 0.02 ^a | 0.6 ± 0.15 ^a | 0.9 ± 0.15 ^{a,x} | 0.9 ± 0.07 ^{a,x} |
| 100 ppm NaClO | 0.8 ± 0.07 ^b | 1.3 ± 0.32 ^b | 1.2 ± 0.03 ^{b,x} | 1.3 ± 0.15 ^{b,x} |
| 50 ppm ClO ₂ | 1.0 ± 0.10 ^{bc} | 1.8 ± 0.06 ^c | 1.4 ± 0.13 ^{cde,x} | 1.5 ± 0.27 ^{be,x} |
| バブリング | 0.3 ± 0.11 ^a | 0.6 ± 0.12 ^a | 0.8 ± 0.23 ^{a,x} | 0.9 ± 0.14 ^{a,x} |
| バブリング+NaClO | 0.8 ± 0.09 ^b | 1.3 ± 0.25 ^b | 1.1 ± 0.18 ^{b,x} | 1.3 ± 0.11 ^{b,x} |
| バブリング+ClO ₂ | 1.1 ± 0.12 ^{bc} | 1.8 ± 0.12 ^c | 1.4 ± 0.21 ^{cde,x} | 1.5 ± 0.20 ^{be,x} |
| 超音波 | 0.4 ± 0.15 ^a | 0.7 ± 0.13 ^a | 1.0 ± 0.11 ^{a,x} | 1.0 ± 0.10 ^{a,x} |
| 超音波+NaClO | 0.8 ± 0.25 ^b | 1.3 ± 0.24 ^b | 1.3 ± 0.12 ^{bd,x} | 1.3 ± 0.14 ^{be,x} |
| 超音波+ClO ₂ | 1.2 ± 0.13 ^c | 1.8 ± 0.21 ^c | 1.4 ± 0.14 ^{de,x} | 1.5 ± 0.23 ^{be,x} |
| 50°C | 1.2 ± 0.39 ^c | 2.6 ± 0.22 ^d | 1.1 ± 0.10 ^{b,x} | 1.6 ± 0.16 ^{be,x} |
| 50°C+NaClO | 2.7 ± 0.24 ^d | 4.1 ± 0.00 ^e | 1.9 ± 0.23 ^{g,x} | 2.1 ± 0.23 ^{ce,y} |
| 50°C+ClO ₂ | 2.8 ± 0.16 ^d | 4.1 ± 0.00 ^e | 2.1 ± 0.25 ^{h,x} | 2.5 ± 0.24 ^{d,y} |
| 50°C→NaClO | 2.7 ± 0.22 ^d | 3.5 ± 0.17 ^e | 1.5 ± 0.09 ^{eg,x} | 2.0 ± 0.04 ^{c,y} |
| 50°C→ClO ₂ | 2.8 ± 0.30 ^d | 3.6 ± 0.17 ^e | 1.9 ± 0.06 ^{fhg,x} | 2.4 ± 0.18 ^{d,y} |
| 50°C←NaClO | 1.6 ± 0.15 ^e | 2.9 ± 0.75 ^e | 1.3 ± 0.21 ^{be,x} | 1.6 ± 0.21 ^{e,y} |
| 50°C←ClO ₂ | 1.6 ± 0.25 ^e | 3.3 ± 0.51 ^e | 1.4 ± 0.15 ^{be,x} | 1.7 ± 0.12 ^{e,y} |

処理時間：5分

TSA：トリプトソイ寒天培地

SMAC：ソルビトールマッコンキー寒天培地

結果は3回の平均値 ± 標準偏差を表す。

異なる文字間には有意差がある (p < 0.05)。

表 3-3. 物理的処理を組み合わせた白菜の洗浄殺菌効果

| 処 理 | 菌数減少 (Log) | | | |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | 一般生菌数 | 大腸菌群数 | O157 (TSA) | O157 (SMAC) |
| 水道水 | 0.3 ± 0.27 ^a | 0.4 ± 0.19 ^a | 0.6 ± 0.14 ^{a,x} | 0.5 ± 0.25 ^{a,x} |
| 100 ppm NaClO | 0.7 ± 0.11 ^b | 1.1 ± 0.15 ^b | 1.2 ± 0.25 ^{bc,x} | 1.4 ± 0.33 ^{b,x} |
| 50 ppm ClO ₂ | 1.4 ± 0.21 ^{cd} | 1.6 ± 0.24 ^c | 1.6 ± 0.42 ^{cde,x} | 1.6 ± 0.24 ^{bc,x} |
| バブリング | 0.4 ± 0.31 ^a | 0.3 ± 0.24 ^a | 0.6 ± 0.18 ^{ae,x} | 0.5 ± 0.21 ^{a,x} |
| バブリング+NaClO | 0.8 ± 0.21 ^b | 1.2 ± 0.12 ^b | 1.2 ± 0.14 ^{bc,x} | 1.4 ± 0.25 ^{b,x} |
| バブリング+ClO ₂ | 1.4 ± 0.24 ^{cd} | 1.6 ± 0.11 ^c | 1.6 ± 0.22 ^{de,x} | 1.7 ± 0.17 ^{bc,x} |
| 超音波 | 0.4 ± 0.15 ^a | 0.6 ± 0.14 ^a | 0.7 ± 0.13 ^{a,x} | 0.6 ± 0.24 ^{a,x} |
| 超音波+NaClO | 0.8 ± 0.16 ^b | 1.2 ± 0.21 ^b | 1.2 ± 0.21 ^{be,x} | 1.4 ± 0.21 ^{bc,x} |
| 超音波+ClO ₂ | 1.4 ± 0.21 ^{cd} | 1.6 ± 0.16 ^c | 1.6 ± 0.31 ^{be,x} | 1.6 ± 0.19 ^{bc,x} |
| 50°C | 1.6 ± 0.41 ^{cd} | 2.7 ± 0.25 ^d | 1.0 ± 0.14 ^{ab,x} | 1.3 ± 0.42 ^{bc,x} |
| 50°C+NaClO | 2.8 ± 0.15 ^e | 3.9 ± 0.00 ^e | 1.8 ± 0.19 ^{g,x} | 2.1 ± 0.24 ^{e,y} |
| 50°C+ClO ₂ | 2.9 ± 0.23 ^e | 3.9 ± 0.00 ^e | 2.1 ± 0.21 ^{f,x} | 2.5 ± 0.27 ^{d,y} |
| 50°C→NaClO | 2.7 ± 0.28 ^e | 3.7 ± 0.21 ^e | 1.6 ± 0.19 ^{eg,x} | 1.8 ± 0.26 ^{cf,x} |
| 50°C→ClO ₂ | 2.7 ± 0.18 ^e | 3.8 ± 0.24 ^e | 2.1 ± 0.16 ^{f,x} | 2.5 ± 0.21 ^{de,y} |
| 50°C←NaClO | 1.6 ± 0.21 ^d | 3.4 ± 0.46 ^e | 1.2 ± 0.15 ^{b,x} | 1.7 ± 0.16 ^{c,y} |
| 50°C←ClO ₂ | 1.6 ± 0.17 ^d | 3.5 ± 0.41 ^e | 1.6 ± 0.21 ^{ce,x} | 1.9 ± 0.18 ^{c,y} |

処理時間：5分

TSA：トリプトソイ寒天培地

SMAC：ソルビトールマッコニー寒天培地

結果は3回の平均値 ± 標準偏差を表す。

異なる文字間には有意差がある (p < 0.05)。

第4章 野菜の塩素洗浄殺菌における交差汚染の防止

I. 序言

近年、生食野菜消費の拡大により、生食野菜を原因とする食中毒リスクが高まっている。野菜の安全性を確保するためには、農場から消費までの一貫した衛生管理が必要となっている。特に、生で食される野菜の衛生管理は重要なポイントである。野菜に付着している食中毒菌の除去に洗浄殺菌は重要な方法であり、効果は殺菌剤の種類などにより異なっている。野菜加工現場では、野菜の洗浄工程で大量に用いられる殺菌剤や洗浄水の節約のため、洗浄殺菌液を繰り返して使用する実態がある。このような場合、殺菌効果の減少あるいは汚染ロットが入った場合の汚染拡大などが危惧される⁷⁰⁾。

一方、次亜塩素酸ナトリウムは安価で、野菜などの農産物の栄養および官能品質に影響をあまり与えないことから、農産物業界でよく使用されている。しかし、化学的に不安定で、野菜表面にある土壌や肥料など有機成分やカット野菜からの滲出物などと反応し、効果が急速に減少してしまうことがある。したがって、野菜洗浄殺菌中の塩素濃度の維持は重要である。

本章では、次亜塩素酸ナトリウム殺菌液を交換せずに使用し続けた場合の大腸菌 O157 による交差汚染について塩素濃度との関連から検討を行った。

II. 材料と方法

1. 供試野菜および供試菌株

実験材料として、市販のホウレンソウおよび白菜を使用した。試験菌株は第2章と同様に大腸菌 O157 の4株を使用した。

2. 次亜塩素酸ナトリウムによる大腸菌 O157 菌株の不活化

0.5, 1, 2, 3, 5 ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液を 10 ml 調製して、遠心洗浄した各大腸菌 O157 菌液を 0.1 ml 接種し（初期菌数約 10^6 cfu/ml）、5 分間反応後、1%チオ硫酸ナトリウムを添加した倍濃度の TSA 培地 10 ml と等量混釈し、残存菌数を測定した。

3. 連続使用した洗浄液による野菜の洗浄

大腸菌 O157 を接種したハウレンソウおよび白菜に対して水道水、0.25%市販の野菜洗浄用洗剤（ヤシノミ洗剤，サラヤ）および種々の濃度の次亜塩素酸ナトリウムで洗浄殺菌処理を行った。接種野菜を各洗浄殺菌液に 5 分間浸漬して軽く攪拌しながら処理した。この殺菌処理を各殺菌液を交換せずに新たな接種野菜を用いて 10 回連続して繰り返し行い、さらに、この洗浄液で非接種野菜を洗浄した際に、大腸菌 O157 による汚染が発生するかどうかについて調べた。また、20, 50 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを繰り返し使用して 1 回から 8 回まで非接種野菜を洗浄し、9 回目に接種野菜を洗浄した後、10 回目に非接種野菜を洗浄した時の交差汚染の有無も調べた。各処理の後、洗浄処理液の残留塩素濃度および O157 菌数、接種ハウレンソウや白菜の残存 O157 菌数、連続使用殺菌液で洗浄した非接種野菜に付着 O157 菌数を測定した。各実験は 3 回繰り返した。

4. 菌液から野菜へ O157 の移行

3,000 ml の大腸菌 O157 菌液に初期菌数が 1, 10, 100, 1000 cfu/ml になるよう、遠心洗浄した O157 を接種した。50 g 非接種ハウレンソウをこれらの洗浄液で 5 分間洗浄して、ハウレンソウにおける大腸菌 O157 数を測定した。

5. 菌数測定

洗浄液および野菜サンプルの残存 O157 菌数は rif 加 SMAC 培地で平板塗抹法と混釈法により調べた。検出限界以下の場合、洗浄残液 100ml をメンブレンフィルター (0.45 μm , 47 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan) でろ過した後、平板培地上で一晩培養した。また、野菜サンプル 25 g を rif 加 TSB (栄研化学) 100 ml で一晩増菌し、rif 加 SMAC 培地に画線して野菜における大腸菌 O157 の有無を確認した。

6. 統計処理

第 2 章と同様の方法で行った。

III. 実験結果

1. 次亜塩素酸ナトリウムによる大腸菌 O157 菌株の不活化

大腸菌 O157 の各菌株の様々な濃度の次亜塩素酸ナトリウムにおける残存菌数を表 4-1 に示す。大腸菌 O157:H7 DT 66 株はほかの菌株に比べて塩素への耐性を若干示したが、塩素濃度が 1 ppm 以上に上げると、検出限界以下になった。

2. 連続使用した洗浄殺菌液の殺菌効果

殺菌液を交換せずに繰り返して洗浄した大腸菌 O157 接種ホウレンソウの残存菌数を図 4-1 に示す。水道水、PBS、10 ppm および 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム殺菌液を交換せずに接種ホウレンソウの殺菌を 10 回繰り返してもそれほど大きな殺菌効果の低下は認められなかった。白菜でも同様の結果が得られ、50 ppm 次亜塩素酸ナトリウムを 10 回繰り返して使用しても白菜への殺菌効果に有意差は認められなかった (図 4-2)。

3. 洗浄殺菌溶液の連続使用に伴う交差汚染の実証

本研究では、様々な濃度の塩素殺菌液を交換せずに使用し続けた場合、溶液中の塩素濃度の変化、大腸菌 O157 菌数の増加および洗浄液から非接種野菜への交差汚染の有無を検討した (表 4-2, 4-3)。次亜塩素酸ナトリウム殺菌液を交換せずに、O157 接種ホウレンソウの洗浄を 10 回行うと塩素濃度は徐々に減少したが、初期濃度が 50, 100 ppm では、10 回使用後も 10 ppm 以上の塩素が残留し、O157 は検出されなかった。洗浄残液を 100 ml、メンブレンフィルターでろ過して試験したが、菌は全く検出されなかった。しかし、10 ppm および 30 ppm の次亜塩素酸ナトリウムでは、それぞれ 6, 8 回目の洗浄液の残留有効塩素濃度は 1 ppm 以下に低下し、O157 が検出された。また、水道水では 1 回目の洗浄液で 3.3 Log cfu/ml の O157 が検出された。これらの大腸菌 O157 接種ホウレンソウを 10 回連続処理した洗浄液で非接種のホウレンソウを洗浄処理すると、非接種野菜から、水道水では 4.1 Log cfu/g、初期濃度 10 ppm の次亜塩素酸ナトリウムでは 2.5 Log cfu/g、20 ppm の次亜塩素酸ナトリウムでは 1.9 Log cfu/g の大腸菌 O157 が検出された。しかし、初期濃度 50 ppm や 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム残液で処理した非接種ホウレンソウから大

腸菌 O157 は検出されず、25 g の増菌培養でも陰性であった。

白菜を処理したときも、洗浄処理を続けるとハウレンソウの場合と同様に塩素濃度は徐々に低下した。しかし、ハウレンソウの場合よりも減少は緩やかであり、10 ppm の初期塩素濃度で10回連続使用後も約3 ppm の有効塩素が残留していた。連続使用（10回）後の洗浄残液から大腸菌 O157 は検出されず、これで非接種白菜を洗浄しても、非接種白菜から大腸菌 O157 は検出されなかったが、25 g の増菌培養では陽性を示した。このような結果は水道水で1回使用の場合もみられ、洗浄液では検出限界以下でも洗浄野菜から O157 が検出された。水道水では2回および2回目以降の洗浄液と洗浄野菜の両方から大腸菌 O157 が検出され、非接種野菜への大腸菌 O157 の交差汚染が認められた。初期塩素濃度が20、50 ppm の場合、10回連続使用しても有効塩素は約10、30 ppm それぞれ残留していた。非接種野菜をこの洗浄残液で洗浄しても、非接種野菜への大腸菌 O157 の移行はみられなかった。一方、市販野菜洗浄用洗剤（0.25%）では1回のみ接種野菜洗浄後の洗浄液から大腸菌 O157 が検出され、これで非接種野菜を洗浄すると、O157 が検出された（表 4-4）。

表 4-5 は、20、50 ppm の次亜塩素酸ナトリウムで、1回から8回まで非接種野菜を洗浄し、9回目に接種野菜を洗浄した後、10回目に非接種野菜を洗浄した結果である。非接種ハウレンソウを連続洗浄した際の塩素濃度低下は、接種ハウレンソウの場合と同様に徐々に減少した。塩素洗浄液を8回連続使用して非接種野菜を洗浄処理後、初期塩素濃度が50 ppm の場合は約10 ppm に、20 ppm の場合は1 ppm 以下まで低下した。この洗浄液を連続して、9回目に大腸菌 O157 接種ハウレンソウを洗浄すると、初期塩素濃度が50 ppm の洗浄液から O157 は検出されず、10回目に洗浄した非接種ハウレンソウからも O157 は検出されなかった。これに対し、初期塩素濃度が20 ppm の洗浄液からは O157 が検出され、続いて洗浄処理した非接種ハウレンソウからも O157 が検出された。

4. 洗浄液中の O157 数と洗浄野菜から検出される菌数の関係

図 4-3 に各菌数の大腸菌 O157 菌液から非接種ハウレンソウへの洗浄による移行菌数を示している。洗浄液中1 ml あたりに1個の O157 がいても、野菜への汚染が認められた。

IV. 考察

本章では、大腸菌 O157 の 4 菌株に対する次亜塩素酸ナトリウムの殺菌濃度、すなわち洗浄液中の大腸菌 O157 をすべて死滅させるために必要な有効塩素濃度を調べた。1 ppm 以上で、5 分間後、試験した菌株はすべて不活化された。塩素溶液中における微生物の死滅は、有効塩素濃度に大きく依存している。一方、本研究での処理時間は 5 分間であり、菌の不活化に十分な時間であったと言える。しかし、野菜洗浄加工では、汚染ロットが混入した場合、すみやかに野菜内部に入り込んで、殺菌剤との接触ができなくなる可能性がある。このような短時間でも発生する交差汚染の防止に、塩素濃度を一定以上維持することは重要と思われた。

次亜塩素酸ナトリウム溶液を繰り返して、接種および非接種野菜を洗浄処理すると、塩素濃度は徐々に減少した。初期塩素濃度が低い場合、連続使用後、塩素濃度は 1 ppm 以下まで減少したが、初期濃度高くすると、連続使用しても一定の塩素が残留していた。しかし、次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いてハウレンソウを洗浄処理した場合、白菜の場合より塩素が大きく減少する傾向がみられた。次亜塩素酸ナトリウムは有機物質との反応により塩素はすみやかに消費され、接種野菜を塩素洗浄した場合の塩素濃度の減少は、野菜表面にある有機物質、接種用菌液に含まれる培地成分および野菜自身からの滲出液などに影響されたと考えられる^{2,37,77}。洗浄液の塩素濃度が低い場合、野菜を投入すると、塩素は有機物質との反応によりほとんど消費される。しかし、塩素濃度の減少傾向は野菜の種類によって異なり、また、同じ野菜でも検体によってばらつくこともあった。野菜の産地や季節などによって、野菜の品質や栄養など差が多少異なると考えられる。本章では、塩素の減少傾向はほかの研究者による報告より小さい。これは本研究で使用した野菜検体はすべて接種前に、水道水で前洗浄を行い、また、接種用の菌液も 2 回遠心洗浄して、培地由来の有機物を除去したことに関係していると考えられる。

初期塩素濃度が 50, 100 ppm の洗浄液は繰り返し 10 回連続接種野菜を洗浄しても、洗浄液から大腸菌 O157 は検出されず、続いて非接種野菜を洗浄しても O157 の移行は認められなかった。十分な初期塩素濃度があれば、万一、汚染を受けたロットが混入した場

合でも洗浄液を介した交差汚染は阻止できることが本研究で実証された。50 ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液を繰り返し連続使用後も 10 ppm 程度の有効塩素が残留し、接種野菜から洗浄液中に遊離した O157 の不活化には十分な塩素量と考えられた。Luo ら⁵⁹⁾は 10 ppm 以上の塩素は野菜洗浄殺菌中の交差汚染を防止したと報告した。この研究では、初期塩素濃度 5 ppm の場合は洗浄液から O157 が検出されなかったが非接種レタスから O157 が検出され、初期塩素濃度 10 ppm 以上の場合は処理後の洗浄液や非接種レタスからも O157 が検出されず交差汚染を阻止したとしている。これは、接種レタス 30 g を 3 L の洗浄液に浸漬し、すぐに 120 g の非接種レタスを同じ洗浄液で洗浄して交差汚染の有無を検討したものである。これに対して、本研究では、接種野菜を 50 g を 10 回繰り返して洗浄してから非接種野菜を洗浄した場合の交差汚染の有無を検討した。この場合、洗浄した野菜の量は 500 g に相当し、Luo ら⁵⁹⁾より現場に近い試験条件であったと思われる。20 ppm の低濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液や水道水、市販の野菜洗剤を繰り返し連続使用すると、洗浄液中に大腸菌 O157 が検出され、続いて洗浄した非接種野菜へ O157 の交差汚染を引き起こすことを実証した。

また、接種白菜の洗浄処理では、有効塩素の消費は低く、10 回連続使用した 10 ppm の塩素溶液や水道水で 1 回接種白菜を処理しても洗浄液や非接種白菜から O157 が検出されなかったが、25 g 野菜の増菌培養では陽性であった。Luo ら⁵⁹⁾は野菜洗浄用次亜塩素酸ナトリウム溶液の有効塩素が低く、O157 がすべて死なない微環境があったためと考察している。洗浄液中に微量 (<1 cfu/ml) の O157 が微環境に残存していても、検出できないことがあると考えられる。また、非接種野菜 25 g を増菌培養した場合、わずかの O157 が生残しても、増殖が認められた。一方、野菜への交差汚染が一旦発生すると、続いて殺菌剤で再洗浄しても、この交差汚染を完全に除去できない。野菜に付着した菌が野菜の切り口やクレバスから中に入り込んで、殺菌剤の接触を逃れたと考えられる。野菜洗浄処理過程では、交差汚染の防止はもっとも重要となる。

一方、市販の野菜洗剤は 1 回だけ接種白菜を洗浄しても、洗浄液から O157 が検出され、非接種白菜への交差汚染を引き起こした。したがって、50~100 ppm 程度の次亜塩素酸ナトリウムによる野菜の洗浄殺菌処理は、野菜洗浄時の交差汚染の防止には大きく役立って

いる。野菜の殺菌効果に大差がないからと言って使用濃度を下げたり，殺菌効果が十分検証されていない代替品や市販洗剤などの使用は汚染ロット混入時に汚染拡大のリスクが高まるので注意すべきである。

V. 小括

1. 次亜塩素酸ナトリウム洗浄溶液を繰り返し使用して、大腸菌 O157 接種野菜や非接種野菜を洗浄殺菌すると塩素濃度が徐々に低下し、殺菌効果も低下した。
2. 初期濃度が 50, 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウムでは、10 回洗浄後も 10 ppm 以上の塩素が残留し、洗浄液から O157 は検出されなかった。また、これらで非接種野菜を洗浄しても交差汚染は認められなかった。
3. 初期濃度が 10, 20 ppm の次亜塩素酸ナトリウムでは洗浄回数には塩素濃度は 1 ppm 以下に低下し、洗浄液に O157 が残った。また、これらを用いて非接種野菜を洗浄すると O157 が検出され、交差汚染を実証した。
4. ホウレンソウの方が白菜より塩素低下が大きく交差汚染しやすかった。野菜の洗浄殺菌において野菜の種類や汚染菌数を考慮して、次亜塩素酸ナトリウムの使用濃度は交差汚染の防止の観点から 100 ppm, 5 分が必須条件である。

表 4-1. 各濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液における大腸菌 O157 の死滅

| Strain | 残存大腸菌 O157 数 (cfu/ml) | | | | | |
|--------|-----------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 ppm | 0.5 ppm | 1 ppm | 2 ppm | 3 ppm | 5 ppm |
| CR-3 | 2.4×10^6 | — | — | — | — | — |
| MY-29 | 9.7×10^5 | — | — | — | — | — |
| MN-28 | 1.7×10^6 | — | — | — | — | — |
| DT-66 | 1.8×10^6 | 1.3×10 | — | — | — | — |

— : 陰性 (<0.1 cfu/ml)

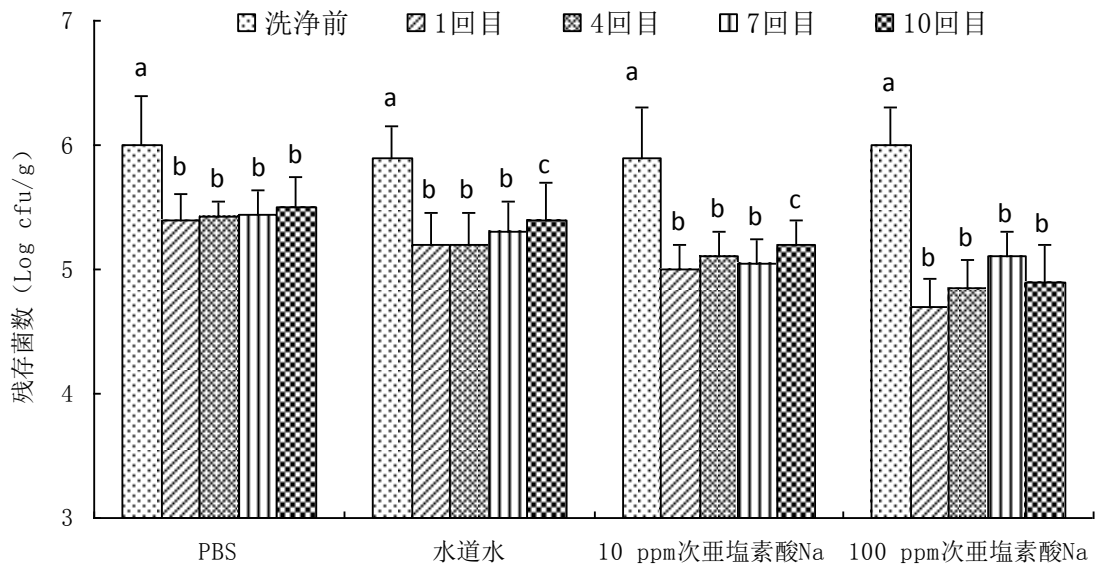


図 4-1. 繰り返し使用した洗浄液による大腸菌 O157 接種ハウレンソウの殺菌効果

各処理条件で異なる文字間には有意差がある ($p < 0.05$)。

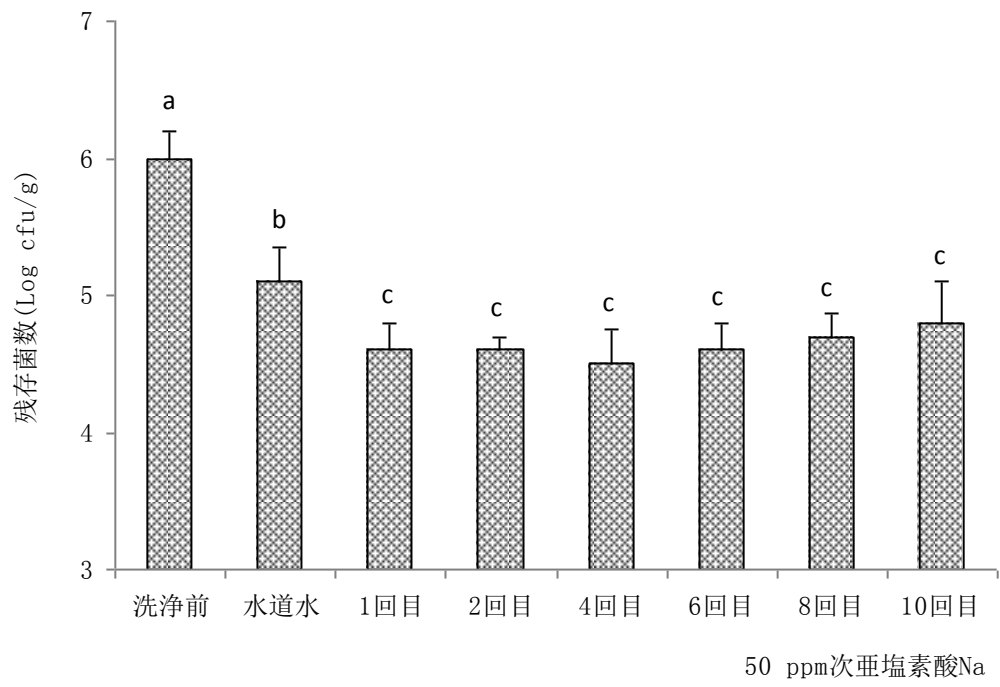


図 4-2. 繰り返し使用した洗浄液による O157 接種白菜の殺菌効果

異なる文字間には有意差がある (p < 0.05)

表 4-2. 洗浄液の連続使用における塩素濃度，残存菌数の変化および非接種ハウレンソウへの交差汚染

| 初期塩素 (ppm) | 洗浄液と野菜の品質のパラメータ | 連続使用の回数 | | | | | |
|---------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 0 | 有効塩素濃度 (ppm) | 0.2 ± 0.04 | 0.1 ± 0.08 | 0.1 ± 0.08 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 (Log cfu/ml) | 3.3 ± 0.10 | 4.3 ± 0.15 | 4.8 ± 0.06 | 4.9 ± 0.12 | 5.1 ± 0.12 | 5.3 ± 0.10 |
| | 非接種ハウレンソウへの移行大腸菌 O157 数 (Log cfu/g) ¹ | ND | ND | ND | ND | ND | 4.1 ± 0.10 |
| 10 | 有効塩素濃度 | 6.9 ± 0.81 | 4.1 ± 1.56 | 0.8 ± 0.34 | 0.2 ± 0.04 | 0.1 ± 0.05 | 0.1 ± 0.02 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 | <1.0 | 100 ml (-) | 100 ml (-) | 3.4 ± 0.70 | 3.6 ± 0.55 | 4.0 ± 0.56 |
| | 非接種ハウレンソウへの移行大腸菌 O157 数 | ND | ND | ND | ND | ND | 2.5 ± 0.79 |
| 20 | 有効塩素濃度 | 16.2 ± 0.53 | 13.1 ± 1.68 | 5.8 ± 3.36 | 1.4 ± 0.91 | 0.3 ± 0.06 | 0.2 ± 0.06 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 | <1.0 | <1.0 | 100 ml (-) | 100 ml (-) | 2.4 ± 0.45 | 3.2 ± 0.21 |
| | 非接種ハウレンソウへの移行大腸菌 O157 数 | ND | ND | ND | ND | ND | 1.9 ± 0.26 |
| 50 | 有効塩素濃度 | 43.9 ± 2.69 | 39.6 ± 2.87 | 32.5 ± 4.22 | 24.5 ± 4.32 | 16.8 ± 7.46 | 12.3 ± 5.73 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | 100 ml (-) | 100 ml (-) |
| | 非接種ハウレンソウへの移行大腸菌 O157 数 | ND | ND | ND | ND | ND | 25 g (-) |
| 100 | 有効塩素濃度 | 92.5 ± 0.90 | 90.7 ± 1.87 | 84.5 ± 5.22 | 74.0 ± 3.82 | 62.0 ± 5.41 | 44.8 ± 6.96 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 ^a | 100 ml (-) |
| | 非接種ハウレンソウへの移行大腸菌 O157 数 | ND | ND | ND | ND | ND | 25 g (-) |

¹ 洗浄液から非接種ハウレンソウへの交差汚染 ND : not done

表 4-3. 洗浄液の連続使用における塩素濃度, 残存菌数の変化および非接種白菜への交差汚染

| 初期塩素 (ppm) | 洗浄液と野菜の品質のパラメータ | 連続使用の回数 | | | | | |
|---------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 0 | 有効塩素濃度 (ppm) | 0.2 ± 0.02 | 0.01 ± 0.05 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 (Log cfu/ml) | <1.0 | 2.7 ± 0.21 | 3.5 ± 0.08 | 3.7 ± 0.20 | 4.0 ± 0.34 | 4.2 ± 0.50 |
| | 非接種白菜への移行大腸菌 O157 数 (Log cfu/g) ¹ | 25 g (+) | 1.3 ± 0.15 | ND | ND | ND | 2.3 ± 0.41 |
| 10 | 有効塩素濃度 | 9.8 ± 0.81 | 8.3 ± 0.78 | 7.3 ± 0.35 | 6.8 ± 0.40 | 5.5 ± 0.46 | 3.3 ± 0.50 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 |
| | 非接種白菜への移行大腸菌 O157 数 | ND | ND | ND | 25 g (-) | 25 g (-) | 25 g (+) |
| 20 | 有効塩素濃度 | 18.1 ± 0.58 | 17.4 ± 0.10 | 16.2 ± 2.41 | 13.4 ± 0.68 | 12.1 ± 1.15 | 9.0 ± 2.30 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 |
| | 非接種白菜への移行大腸菌 O157 数 | ND | ND | ND | <1.0 ^b | 25 g (-) | 25 g (-) |
| 50 | 有効塩素濃度 | 45.6 ± 1.23 | 44.2 ± 2.35 | 43.0 ± 2.54 | 38.2 ± 0.94 | 37.2 ± 1.76 | 32.2 ± 4.31 |
| | 洗浄液の大腸菌 O157 数 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | 100 ml (-) | 100 ml (-) |
| | 非接種白菜への移行大腸菌 O157 数 | ND | ND | ND | ND | 25 g (-) | 25 g (-) |

¹ 洗浄液から非接種白菜への交差汚染 ND : not done

表 4-4. 連続使用した市販野菜洗剤 (0.25%) から非接種野菜への O157 移行菌数

| O157 数 | 連続使用の回数 | | | | | |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 洗浄液 (Log cfu/ml) | 3.1 ± 0.05 | 3.3 ± 0.14 | 3.3 ± 0.25 | 3.5 ± 0.06 | 3.8 ± 0.21 | 3.8 ± 0.12 |
| 非接種野菜 (Log cfu/g) | 1.3 ± 0.10 | — | 2.1±0.16 | — | — | 2.8±0.08 |

— : not done

表 4-5. 繰り返し使用した洗浄液から野菜への O157 の交差汚染

| 次亜塩素酸ナトリウム | | 連続使用の回数 | | | |
|------------|------------------|---------|----|-------------------------|------------|
| | | 1~7 | 8 | 9 | 10 |
| 50 ppm | 洗浄液 (Log cfu/ml) | ND | — | — | — |
| | 野菜 (Log cfu/g) | ND | ND | 5.5 ± 0.11 [*] | — |
| 20 ppm | 洗浄液 (Log cfu/ml) | ND | — | 2.5 ± 0.21 | 1.8 ± 0.24 |
| | 野菜 (Log cfu/g) | ND | ND | 5.6 ± 0.16 [*] | 1.5 ± 0.18 |

ND : not done

— : 陰性 (洗浄液 : <1 Log cfu/ml, 野菜 <0 Log cfu/g)

^{*} 洗浄後の O157 接種野菜の菌数

1~8 回目 : 非接種野菜を洗浄

9 回目 : O157 接種野菜を洗浄 (汚染源)

10 回目 : 非接種野菜を洗浄 (交差汚染の検証)

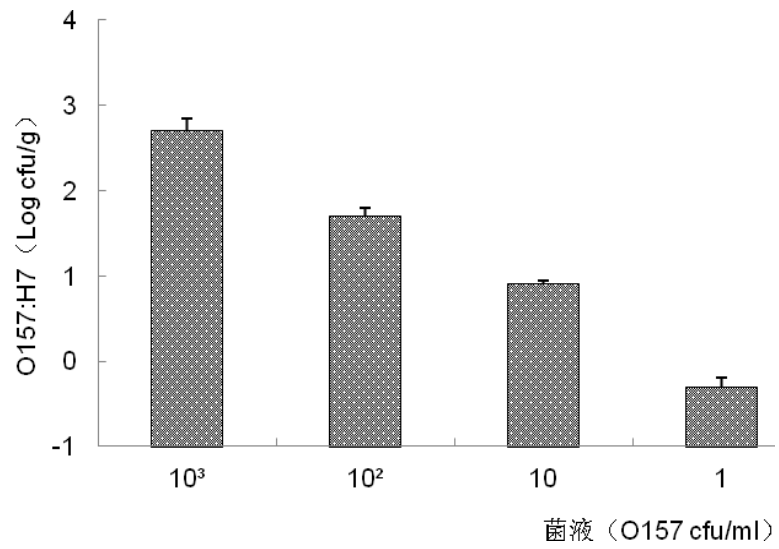


図 4-3. 菌液中の O157 数と洗浄野菜から検出される菌数の関係

洗浄野菜 (ホウレンソウ) : 50 g

菌液 : 3,000 ml

第5章 植物抽出液による野菜浅漬けの微生物制御

I. 序言

本来の漬け物は、乳酸発酵により通常 pH が 4 以下に低下し、このような酸性条件では一般的に食中毒菌は殺菌される。近年のいわゆる「浅漬け」は、原材料の加熱等の工程がなく、塩分濃度が低く、野菜に調味料と酸味料を加えたものであり、本来の発酵食品ではなく、酸性度が低い。そのため、原材料から入り込んだ食中毒菌の増殖を抑える効果も低いため、保存性はあまり高くなく、むしろ野菜サラダなどの生野菜に近い食品と考えられる。一方、畑や農場には、水、土壌や堆肥、野生動物などに由来するさまざまな微生物が存在しており、その中には、食中毒の原因となる細菌も存在している。1996 年に堺市で学校給食により発生した腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事件以来、本血清型の危険性については、多くの人の認知するところとなっている。2000 年以降、「かぶ浅漬け」「和風キムチ」および「キュウリ浅漬け」による病原大腸菌 O157:H7 食中毒事件が続発した。また、2012 年 8 月、札幌市内で製造された浅漬けを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 による大きな集団食中毒事件が発生した。これらにより、浅漬け類製造における衛生管理の重要性が再確認された。

野菜漬物や浅漬けの微生物の安全性確保において保存料などの食品添加物の使用は有効であるが、長期的にはこれらの健康への影響が憂慮されるため、人類が長い歴史の中で摂取してきた経験のある天然食材の有する抗菌性を利用した微生物制御法が注目されている。

本章では、中国の漢方用植物やハーブの抽出液から大腸菌 O157 へ抗菌活性があるサンプルをスクリーニングした、これらの組み合わせ効果も調べた。また、自製した白菜浅漬けに植物抽出液および植物精油を添加して一般生菌、大腸菌群、乳酸菌および接種した大腸菌 O157 の菌数変化を調べた。

II. 材料と方法

1. 試験菌株

食品総合研究所より譲与を受けた大腸菌 O157 の 3 菌株 (CR-3, MN-28, MY-29) を使用した。各菌株をそれぞれ TSB 培地で一晚培養 (35℃) したものを遠心洗浄してから接種菌液として実験に用いた。

2. 供試植物

本研究では、表 5-1 に示す香辛料および漢方薬などの植物 15 種類を試験した。

3. 植物抽出液の作製

植物サンプルをネジ付容器にそれぞれ入れ重量を測定し、エタノール (ナカライテスク, 99.5%) を適量加え、室温で 2 日間振とうして抽出を行った。ろ紙でろ過してから、9,500 rpm で 15 分間遠心分離し、その上清を別の滅菌ネジ付容器に移し、エタノール抽出液とした。なお、検体の 9 倍量のエタノールを添加して作製した抽出液を 10%濃度溶液とみなした。

4. 植物精油の調製

シナモン、クローブ、八角の精油 (essential oil, EO) (Tree of Life, Co. Ltd., Japan) およびオイゲノール (ナカライテスク) 1ml を 9ml エタノールと混合して、10%の植物 EO とした。

5. MIC および MBC の測定

液体希釈法 (broth dilution method) により測定した。ミュラー・ヒントン (Mueller-Hinton, MH) 液体培地を小試験管に 1 ml ずつ分注し、0.8%濃度になるように植物抽出液を添加してから、マイクロピペットを用いて、それぞれの 2 倍希釈列を作製した。一晚培養した 3 菌株の大腸菌 O157 mixture を初期菌数が $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml になるよう接種した。一晚培養後、菌の増殖が認められなかった最小濃度を MIC とした。また、

増殖が認められない希釈系列については MH 寒天培地に 1 白金耳量を塗抹して培養し、コロニー形成が認められなかった最小濃度を MBC とした。

6. 白菜乳剤での単独および併用抗菌効果

白菜漬物を模擬し、3%食塩を添加した白菜乳剤で植物抽出液の抗菌効果を検討した。白菜の 9 倍量の 3%の食塩水を加え、ストマッカーで 2 分間ホモジナイズして、滅菌試験管に 10ml を分注した。所定の濃度の植物抽出液を添加し、初期菌数が約 10^5 cfu/ml になるように調製した大腸菌 O157 液を添加し、15℃あるいは 35℃で 24 時間培養後の菌数を測定した。また、植物抽出液を併用して、白菜乳剤での抗菌効果も調べた。

7. 植物抽出液添加白菜漬物における細菌の挙動

水道水で洗浄後、3センチにカットした白菜の重さの 3% (30 g/kg) の食塩を加え、よく混ぜて塩を全体になじませた。その後、3%の食塩水を添加した (500 ml/kg)。4℃で 5 時間漬けてから、所定の濃度の植物抽出液あるいは植物 EO を加え、接種菌液を初期菌数が約 10^5 cfu/g になるように接種した。15℃で 7 日間保存し、1, 2, 3, 7 日目にサンプリングして、大腸菌 O157 の残存菌数を rif-SMAC で測定した。大腸菌 O157 を接種しないサンプルは非接種群とし、一般生菌数を標準寒天培地、大腸菌群数をデソキシコレート培地、乳酸菌数を BCP 加プレートカウントアガール培地 (日水製薬) で測定した。

III. 実験結果

1. 植物抽出液の MIC および MBC

全般的に今回試験した植物抽出液単独では大腸菌 O157 に対して大きな抗菌効果はみられなかった (表 5-2)。これら中で最も一番効果がみられたのは八角で、MIC と MBC は 0.4%であった。烏梅 (うばい)、ガランガルおよびクローブの MIC は 0.8%であったが、MBC は 0.8%以上であった。それ以外の試験した植物抽出液は MIC, MBC とともに 0.8%以上であった。

2. 植物抽出液添加白菜乳剤での抗菌効果

表 5-3 は植物抽出液による白菜乳剤（ホモジナイズ液）における大腸菌 O157 の抗菌効果を示す。白菜乳剤の食塩濃度は 3%であった。植物抽出液非添加のサンプルをコントロールとした。初期菌数約 5.0 Log cfu/ml, pH は 6.1 であった。35℃で一日培養後、O157 は 6.0 Log cfu/ml まで増殖した。植物抽出液の添加は白菜乳剤の pH への影響がほとんどみられなかったが、烏梅は白菜乳剤の pH を 3.1 に低下させた。15 種類の抽出液を白菜乳剤に 0.5%添加すると、接種した大腸菌 O157 の増殖が抑制される例がみられた。とくに、八角、烏梅は O157 へ強い抑制効果が認められた。一日培養後、八角添加の場合 O157 菌数は検出限界以下になった (<1.0 Log cfu/ml)。烏梅の添加によっても O157 菌数はかなり減少し、一日後 2.3 Log cfu/ml になった。また、ガランガル、八角、烏梅の併用効果も調べた (表 5-3)。烏梅+ガランガル、烏梅+八角、ガランガル+八角で、一日後 O157 菌数はすべて検出限界以下になった。また、八角や烏梅は 0.1%の濃度でも、表 5-4 に示すように白菜乳剤における大腸菌 O157 を減少した。

一方、植物抽出液を併用して試験を試みた。表 5-5 に 0.1%あるいは 0.05%の八角、烏梅、ガランガルをそれぞれ組み合わせた白菜乳剤での抗菌効果を示す。すべての組み合わせで高い抗菌効果が得られた。八角 0.1%、烏梅 0.1%、ガランガル 0.05%の組み合わせは白菜乳剤における大腸菌 O157 を顕著に減少させ、コントロールより約 3.5 Log 低下した。15℃で 7 日間保存すると、大腸菌 O157 数は検出限界になった (表 5-6)。白菜浅漬けにおける大腸菌 O157 の生残にガランガルより、八角および烏梅の添加が大きく影響した。

3. 植物抽出液添加白菜浅漬けでの抗菌効果

自製白菜浅漬けに八角 0.1%、烏梅 0.1%、ガランガル 0.05%の添加により、一般生菌数、大腸菌群数、乳酸菌数および接種した大腸菌 O157 の増殖抑制に効果が認められた (表 5-7)。コントロールの一般生菌数および乳酸菌数は保存時間の延長により増加したが、大腸菌群数は始めの 3 日まで増加したが、7 日目には低下した。植物抽出液を添加した場合の菌数変化の傾向はコントロールと類似していたが、各菌数はコントロールよりも低かった。特に、7 日目の乳酸菌数はコントロールのより 1.2 Log 低かった。コントロールの浅漬けで

は、接種した大腸菌 O157 数は 7 日間ほぼ一定であった。植物抽出液を添加することにより、大腸菌 O157 数は 7 日目にコントロールよりも 1.4 Log 低かった。なお、7 日間保存後、植物抽出液添加した白菜漬物と添加しなかった検体の pH はそれぞれ 4.16, 4.74 であった (表 5-8)。

一方、植物 EO あるいは植物成分を白菜漬物に添加して、接種した大腸菌 O157 の増殖抑制効果の検討を試みた。八角 EO, シナモン EO およびオイゲノールを 0.05% 添加すると、O157 の増殖を強く抑制した。シナモン EO, オイゲノール添加した場合、7 日間保存後 O157 菌数は検出限界以下となった。八角 EO 添加の場合もコントロールより 2.3 Log 低かった。

IV. 考察

本研究では、中国からの香辛料や漢方薬などから抗菌作用があるサンプルを選択した。白菜乳剤で抗菌効果を示した植物抽出液を組み合わせ大腸菌 O157 への抗菌効果を調べた。これで、強い抗菌効果を示す組み合わせ (八角 0.1%, 烏梅 0.1%, ガランガル 0.05%) を選択し、自製した塩分 3.0% の白菜漬物に添加して、15°C での抗菌効果を調べた。

八角のエタノール抽出液による大腸菌 O157 の MIC, MBC は、ともに 0.4% であった。このことから、八角抽出液は O157 に対して殺菌的に働いていると考えられた。八角以外の植物抽出液の大腸菌 O157 に対する MIC および MBC は $\geq 0.8\%$ となった。このようにグラム陰性菌である大腸菌 O157 への植物抽出液の抗菌効果は既報のとおり低かった。グラム陰性菌はペプチドグリカン層の外側に外膜を持っている。この外膜は二重膜で、内側の膜はリピドで、外側の膜はリポ多糖体 (LPS) で、親水性物質も疎水性物質も通さない。グラム陰性菌は栄養物質を外膜にあるポーリンを通して取り込む。この外膜が透過障害となり植物抽出液などの抗菌物質からグラム陰性菌は保護される。そこでキレート剤によりグラム陰性菌への抗菌効果が高まる可能性がある。崔⁸⁰⁾はグラム陰性菌の外膜の透過性を増加させるキレート剤を用いて植物成分の細胞内へ侵入を促進して静菌を試みた。キレート剤として、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) およびクエン酸ナトリウムはグラム陰性菌に対するシナモン、オレガノ、ローズマリーなどの植物抽出液の静菌作用を高

めたことを報告した。

一方、厚朴は八角、烏梅以外のサンプルよりはやや高い抗菌効果が得られたが、白菜乳剤や白菜浅漬けを白濁させ、食品に添加するとその品質に影響すると思われたため、以後の実験には使わなかった。また、本研究では、八角、烏梅、ガラシという組み合わせにおいて白菜乳剤に非常に強い抗菌効果が認められた。白菜浅漬けにおける一般生菌数、大腸菌群数、乳酸菌数および接種大腸菌 O157 にも抑制効果が認められた。非接種の場合、保存時間の延長に伴って乳酸菌が増殖し、白菜浅漬けの pH が低下し、それにより大腸菌群数が減少したとも考えられる。しかし、このような酸味の上昇は、浅漬けの色調変化、風味の低下を招き、品質を低下させる。白菜乳剤では高い抗菌効果が得られたことから、微生物は白菜浅漬けの内部へ侵入して、植物抽出液の抗菌成分との接触ができなくなったと思われた。一方、本研究では、白菜浅漬けの保存温度を 15℃ とした。白菜浅漬けはさらに低い温度、例えば 10℃ で保存すると、各菌数の増殖の抑制効果が高くなると考えられた。浅漬けは漬物の中では微生物の影響を最も受けやすいものの一つである。市販浅漬けの生菌数についての報告をみると少ないものでは 10^3 cfu/g のものもあるが、大部分のものは 10^4 から 10^6 cfu/g で、 10^8 cfu/g に達しているものも時にみられる。生菌数が 10^7 cfu/g 以上になってくると調味液は白濁し、浅漬けとしての商品性は急速に低下する⁶²⁾。本研究では、八角 0.1%、烏梅 0.1%、ガラシ 0.05% を組み合わせて白菜浅漬けに添加することによって、15℃ で 7 日間保存しても生菌数は 10^7 cfu/g 以下に抑えられた。一方、高濃度の植物抽出液の添加により、白菜乳剤や白菜浅漬けの漬け汁は白濁し、匂いが残ったので、食品への添加にはできる限り低い濃度が望ましい。

八角やシナモン EO、オイゲノールは低濃度でも白菜浅漬けにおける大腸菌 O157 を効果的に減少した。植物抽出液より強い抗菌効果が得られたことから、抗菌成分は原材料から抽出不十分であると考えられた。

本研究では、烏梅の添加により、白菜乳剤および白菜浅漬けの pH を低下した。一般細菌は pH 4.5 くらいまで発育でき、pH が低下すると細菌細胞は損傷を受け、増殖が抑制される。低 pH と植物抽出液の併用で抗菌性が増強することは低 pH により損傷を受けた細菌細胞にさらに植物の抗菌成分が作用し併用効果を示したと考えられる。また、食塩は保

存性を高めるもので、塩辛、野菜の漬物など古くから用いられてきた。細菌は水分活性が低下した高塩分の環境では、増殖に必要な水分を利用できなくなる同時に、浸透圧が高くなり菌体内の水分が外へ出て、細菌は原形質分離を起こして死滅させたり増殖が抑制される。植物抽出液と食塩の併用で抗菌性が增强するのは塩分濃度の増加により細菌細胞の水分活性が低下し、さらに植物抽出液の抗菌成分が細菌細胞に作用し、併用効果を示したと考えられる。低温保存は微生物の増殖を抑え、植物抽出液や植物 EO の溶解性への影響もあると考えられた。

以上、植物抽出液と低 pH あるいは食塩併用で、それぞれ単独では発育を抑制できない条件でも両者を併用することで抑制が可能になった。一方、白菜浅漬けでは植物抽出液の抗 O157 効果がみられ、白菜浅漬けの微生物的安全性を高めるには有効であると思われた。

V. 小括

1. 15種類の植物抽出液の大腸菌 O157 に対する静菌および殺菌効果は全般的に低かった。
2. 八角, 烏梅のエタノール抽出液はそれぞれ 0.4%, 0.8%濃度で大腸菌 O157 の増殖を完全に抑制した。
3. 八角の MIC と MBC は同じであったことから, 殺菌的に働いていることがわかった。
4. 八角 0.1%, 烏梅 0.1%, ガランガル 0.05%という組み合わせは白菜乳剤で高い抗 O157 効果が認められた。
5. 白菜浅漬けに八角 0.1%, 烏梅 0.1%, ガランガル 0.05%を添加すると, 一般生菌数, 大腸群数, 乳酸菌数および接種大腸菌 O157 数はコントロールより低くなった。
6. 八角, シナモン EO およびオイゲノールは白菜浅漬けにおける大腸菌 O157 を効果的に減少した。

表 5-1. 供試植物

| 植物 | 学名 | 使用部 |
|-------------|--------------------------------------|-----|
| 丹参 (タンジン) | <i>Salvia miltiorrhiza</i> | 実 |
| 苦参 (クジン) | <i>Sophora flavescens</i> | 実 |
| 厚朴 (コウボク) | <i>Magnolia hypoleuca</i> | 皮 |
| 八角 (ハッカク) | <i>Illicium verum</i> | 実 |
| シナモン | <i>Cinnamomum verum</i> | 皮 |
| 甘草 (カンゾウ) | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> | 茎 |
| 孜然 (ズーラン) | <i>Cuminum cyminum</i> | 実 |
| 烏梅 (ウバイ) | <i>Prunus mume</i> | 実 |
| クローブ | <i>Syzygium aromaticum</i> | 実 |
| ガラנגアル | <i>Alpinia officinarum</i> | 実 |
| サンショウ | <i>Zanthoxylum piperitum</i> | 実 |
| 陳皮 (チンピ) | <i>Citri reticulatae pericarpium</i> | 皮 |
| ねぎ | <i>Allium fistulosum</i> | 実 |
| ニンニク | <i>Allium sativum</i> | 実 |
| 唐辛子 (トウガラシ) | <i>Capsicum annuum</i> | 実 |

表 5-2. 植物抽出液による大腸菌 O157 mixture の MIC および MBC

| 植物抽出液 | MIC (%) | MBC (%) |
|-------|---------|---------|
| 丹参 | >0.8 | >0.8 |
| 苦参 | >0.8 | >0.8 |
| 厚朴 | >0.8 | >0.8 |
| 八角 | 0.4 | 0.4 |
| シナモン | >0.8 | >0.8 |
| 甘草 | >0.8 | >0.8 |
| 孜然 | >0.8 | >0.8 |
| 烏梅 | 0.8 | >0.8 |
| クローブ | 0.8 | >0.8 |
| ガランガル | 0.8 | >0.8 |
| サンショウ | >0.8 | >0.8 |
| 陳皮 | >0.8 | >0.8 |
| ねぎ | >0.8 | >0.8 |
| ニンニク | >0.8 | >0.8 |
| 唐辛子 | >0.8 | >0.8 |

表 5-3. 植物抽出液による白菜乳剤における大腸菌 O157 mixture の抗菌効果

| 植物抽出液 | pH | O157 数 (Log cfu/ml) |
|----------|-----|---------------------|
| コントロール | 6.1 | 6.0 ± 0.1 |
| 丹参 | ND | 6.0 ± 0.1 |
| 苦参 | ND | 5.5 ± 0.2 |
| 厚朴 | ND | 4.9 ± 0.2 |
| 八角 | ND | — |
| シナモン | ND | 5.1 ± 0.0 |
| 甘草 | ND | 5.0 ± 0.1 |
| 孜然 | ND | 5.0 ± 0.1 |
| 烏梅 | 3.1 | 2.3 ± 0.1 |
| クローブ | ND | 5.8 ± 0.2 |
| ガランガル | 6.1 | 4.9 ± 0.1 |
| サンショウ | ND | 5.5 ± 0.2 |
| 米酢 | 3.7 | 4.4 ± 0.1 |
| 陈皮 | ND | 5.5 ± 0.1 |
| ねぎ | ND | 5.0 ± 0.2 |
| ニンニク | ND | 5.5 ± 0.1 |
| 唐辛子 | ND | 5.6 ± 0.2 |
| 烏梅+八角 | 3.1 | — |
| 烏梅+ガランガル | 3.1 | — |
| ガランガル+八角 | 6.1 | — |

使用濃度：0.5% 食塩濃度：3% 初期菌数：4.5 Log cfu/ml

保存温度：35℃ 保存時間：1 日

ND : not done — : 陰性 (<1.0 Log cfu/ml)

表 5-4. 植物抽出液による白菜乳剤における大腸菌 O157 mixture の抗菌効果

| 植物抽出液 | 使用濃度% | pH | 残存菌数 (Log cfu/ml) |
|--------|-------|------|-------------------|
| コントロール | | 6.1 | 6.0 ± 0.1 |
| ----- | | | |
| 烏梅 | 0.4 | 3.28 | 2.8 ± 0.1 |
| | 0.2 | 3.71 | 4.2 ± 0.1 |
| | 0.1 | 4.16 | 4.3 ± 0.2 |
| | 0.05 | 4.90 | 4.4 ± 0.1 |
| ----- | | | |
| 八角 | 0.4 | 6.21 | — |
| | 0.2 | ND | 1.0 ± 0.1 |
| | 0.1 | ND | 4.6 ± 0.1 |
| | 0.05 | ND | 5.8 ± 0.1 |
| ----- | | | |
| ガラシ | 0.4 | 6.15 | 4.9 ± 0.1 |
| | 0.2 | ND | 5.3 ± 0.1 |
| | 0.1 | ND | 5.5 ± 0.1 |
| | 0.05 | ND | 5.6 ± 0.2 |
| ----- | | | |
| 厚朴 | 0.4 | 6.09 | 4.5 ± 0.1 |
| | 0.2 | ND | 5.0 ± 0.1 |
| | 0.1 | ND | 5.5 ± 0.0 |
| | 0.05 | ND | 5.8 ± 0.1 |

食塩濃度：3% 初期菌数：5.0 Log cfu/ml
 保存温度：15℃ 保存時間：1 日
 ND：not done —：陰性 (<1.0 Log cfu/ml)

表 5-5. 植物抽出液の併用による白菜乳剤の抗菌効果

| 植物抽出液の使用濃度 (%) | | | 残存菌数 (Log cfu/ml) |
|----------------|------|------|----------------------|
| 八角 | 烏梅 | ガラシ | |
| 0 | 0 | 0 | 5.2 ± 0.10 |
| 0.05 | 0.05 | 0.05 | 4.4 ± 0.05 |
| 0.05 | 0.05 | 0.1 | 4.3 ± 0.11 |
| 0.05 | 0.1 | 0.05 | 4.3 ± 0.16 |
| 0.05 | 0.1 | 0.1 | 4.4 ± 0.43 |
| 0.1 | 0.05 | 0.05 | 3.3 ± 0.26 |
| 0.1 | 0.05 | 0.1 | 3.5 ± 0.33 |
| 0.1 | 0.1 | 0.05 | 1.8 ± 0.34 |
| 0.1 | 0.1 | 0.1 | 1.7 ± 0.41 |

食塩濃度 : 3% 試験菌 : 大腸菌 O157 mixture 初期菌数 : 4.5 Log cfu/ml

保存温度 : 15°C 保存時間 : 1 日

表 5-6. 白菜乳剤中の大腸菌 O157 に対する八角と鳥梅とガラングルの併用効果

| 検体 | pH | O157 数 (Log cfu/ml) | |
|------------------|------|---------------------|------------|
| | | 1 日 | 7 日 |
| コントロール (無添加) | 6.10 | 5.5 ± 0.21 | 6.0 ± 0.05 |
| コントロール (pH 4.2) | 4.20 | 5.3 ± 0.10 | 5.7 ± 0.17 |
| コントロール (3% EtOH) | 6.10 | 5.2 ± 0.12 | 5.8 ± 0.11 |
| 鳥梅+八角 | 4.21 | 1.7 ± 0.02 | — |
| ガラングル+八角 | 6.14 | 2.8 ± 0.11 | 2.3 ± 0.05 |
| ガラングル+鳥梅 | 4.18 | 3.1 ± 0.06 | 2.8 ± 0.07 |
| ガラングル+鳥梅+八角 | 4.20 | 1.5 ± 0.03 | — |

植物抽出液の使用濃度：八角 0.1%，鳥梅 0.1%，ガラングル 0.05%

食塩濃度：3% 初期菌数：4.5 Log cfu/ml

保存温度：15℃ 保存時間：7 日

—：陰性 (<1.0 Log cfu/ml)

表 5-7. 植物抽出液および植物精油による白菜浅漬けの抗菌効果

| 検体 | 指標菌 | 培地 | 残存菌数 (Log cfu/g) | | | | |
|---------------|------|------|------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | 0 日 | 1 日 | 2 日 | 3 日 | 7 日 |
| Control | TPC | S | 6.1 ± 0.05 | 6.1 ± 0.11 | 6.5 ± 0.12 | 7.4 ± 0.06 | 7.5 ± 0.07 |
| | TCC | Deso | 4.4 ± 0.04 | 4.5 ± 0.09 | 4.6 ± 0.10 | 5.2 ± 0.12 | 3.0 ± 0.04 |
| | LAB | BCP | 4.1 ± 0.03 | 4.0 ± 0.05 | 4.5 ± 0.04 | 6.0 ± 0.01 | 7.3 ± 0.08 |
| 八角 0.1% | TPC | S | 6.1 ± 0.05 | 5.7 ± 0.14 | 5.8 ± 0.07 | 5.8 ± 0.15 | 7.0 ± 0.21 |
| 鳥梅 0.1% | TCC | Deso | 4.4 ± 0.07 | 2.7 ± 0.11 | 2.9 ± 0.04 | 3.1 ± 0.09 | 2.6 ± 0.11 |
| ガラシ 0.05% | LAB | BCP | 4.1 ± 0.11 | 3.5 ± 0.08 | 3.5 ± 0.13 | 3.9 ± 0.09 | 6.3 ± 0.08 |
| Control | O157 | SMAC | 5.0 ± 0.11 | 5.4 ± 0.17 | 5.2 ± 0.05 | 5.6 ± 0.03 | 5.3 ± 0.14 |
| 八角 0.1% | | | | | | | |
| 鳥梅 0.1% | O157 | SMAC | 5.0 ± 0.8 | 5.2 ± 0.21 | 5.0 ± 0.14 | 4.8 ± 0.05 | 3.9 ± 0.07 |
| ガラシ 0.05% | | | | | | | |
| 八角 EO 0.05% | O157 | SMAC | 5.1 ± 0.07 | 4.9 ± 0.08 | 5.0 ± 0.09 | 5.1 ± 0.13 | 3.0 ± 0.07 |
| シナモン EO 0.05% | O157 | SMAC | 5.1 ± 0.14 | 5.0 ± 0.08 | 4.8 ± 0.11 | 4.5 ± 0.16 | — |
| オイゲノール 0.05% | O157 | SMAC | 5.1 ± 0.17 | 4.3 ± 0.16 | 4.6 ± 0.06 | 2.7 ± 0.22 | — |

保存温度：15℃

—：陰性 (<2 Log cfu/g)

TPC：一般生菌数 TCC：大腸菌群数 LAB：乳酸菌数 O157：大腸菌 O157 数

S：標準寒天培地 Deso：デソキシコレート培地

BCP：BCP 加プレートカウントアガール培地 SMAC：ソルビトールマッコンキー寒天培地

表 5-8. 白菜漬の保存中の pH の変化

| 検体 | | 保存時間 | | | |
|---------------------------------------|--------|------|------|------|------|
| | | 0 日 | 1 日 | 3 日 | 7 日 |
| コントロール | 白菜の pH | 6.01 | 6.04 | 5.00 | 4.74 |
| | 漬汁の pH | 6.00 | 5.69 | 4.53 | 4.51 |
| 八角 (0.1%) 鳥梅 (0.1%) ガラシ (0.05%) | 白菜の pH | 5.81 | 5.97 | 5.66 | 4.16 |
| | 漬汁の pH | 4.91 | 5.54 | 5.38 | 3.89 |

保存温度 : 15℃

第6章 植物精油による野菜ジュースの微生物制御

I. 序言

海外では野菜ジュースやリンゴ果汁などの飲料を摂取することにより、腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラを原因とした食中毒が頻発している³⁰⁾。日本では、牛乳のように、65℃で10分間加熱もしくは、それと同等以上の殺菌をすることが規定されている。野菜や果汁の種類、透明か粒状かによって製造工程がやや異なる。ただし、普通に容器に充填して市販されているものは、ほぼ全て加熱殺菌されている。絞った直後に含まれる酵素は、ジュースを保存しているときに、ジュースの成分を変化させる働きをするため、加熱処理で酵素が働かなくなるようにする。

加熱処理をするときの問題点としては、香りの成分が失われやすいこと、ビタミンCなど熱に弱い成分が壊れやすいことである。密閉した殺菌装置を使って香りの成分が失われないようにしたり、殺菌温度と殺菌時間を調節して、ビタミンなどができるだけ壊れないような条件で品質を維持しながら菌数を減少させる技術が必要である。

近年、植物 EO は新鮮食材やその製品の抗菌剤として注目されている。シナモン、クローブ、ローズマリー、オレガノ、アズノ EO などは *in vitro* および食品モデルでの抗菌効果が報告されてきた^{19,23,28,46)}。しかし、植物 EO、特に八角 EO を使用した野菜ジュースの静菌や殺菌に関する報告はあまりなかった。本研究ではシナモン、クローブ、八角 EO およびクローブの主成分であるオイゲノールの大腸菌 O157 に対する MIC および MBC を調べるとともに、野菜ジュースにおける大腸菌 O157 の抑制効果を EO の添加濃度や保存温度から検討した。また、大腸菌 O157 の耐熱性 (D 値) への影響についても検討した。

II. 材料と方法

1. 試験菌株

第5章と同様に大腸菌 O157 の3菌株を用いた。

2. 野菜ジュース

KAGOME の野菜生活 (100) という野菜・果実ミックスジュース (野菜ジュース) を試験に用いた。砂糖や食塩など無添加で、野菜汁 50%と果汁 50%合計 100%の野菜ジュースである。にんじん、ホウレンソウ、レタス、白菜、キャベツなど 21 種類の野菜、りんご、オレンジ、レモンの 3 種類のフルーツがこの野菜果汁に含まれている。

3. 植物精油の調製

第 5 章と同様に植物 EO を調製した。

4. MIC および MBC の測定

第 5 章と同様に植物 EO の MIC および MBC を測定した。培地の pH は無調整 (pH 7.0), および pH 4.5, pH4.0 に調整して試験を行った。

5. 植物精油による野菜ジュースの抗菌効果

野菜ジュースに植物 EO を添加し、4, 20, 35℃で保存して接種した大腸菌 O157 の挙動を調べた。口径 24 mm の試験管に 40 ml の野菜スジュースを入れ、0.05%あるいは 0.1%の植物 EO を添加し、遠心洗浄した大腸菌 O157 を初期菌数約 10^5 cfu/ml になるように接種した。保存温度の 4℃の検体は冷蔵庫, 20℃は恒温水槽で、0, 1, 2, 3, 7 日目にサンプリングして、O157 菌数を測定した。保存温度の 35℃はふ卵器で 1 日保存後、残存菌数の測定を行った。植物 EO を添加しない試験管をコントロールとした。また、PBS での植物 EO の抗菌効果を検討したが、35℃のみ 1 日保存して残存菌数を測定した。

6. 耐熱性試験

植物 EO による野菜ジュースにおける大腸菌 O157 の耐熱性への影響を検討した。30ml の野菜ジュースに所定濃度の植物 EO を添加し、初期菌数約 10^6 cfu/ml になるように遠心洗浄した O157 を接種し、小試験管に 3ml 分注して、前準備した 55℃の恒温水槽で加熱試験を行った。小試験管中心部の温度が 53℃になると、計時を始めた。加熱後氷冷してか

ら、大腸菌 O157 の残存菌数を測定した。D値は検体における目標菌を 90%死滅させる必要な時間となる。

III. 実験結果

1. 植物精油の MIC, MBC

pH 無調整 (pH 7.2) の培地の場合、シナモン以外の MIC は 0.05%で、シナモンの MIC は 0.025%であった。シナモン、クローブおよびオイゲノールの MBC は 0.1%であったが、八角の MBC は 0.2%であった (表 6-1)。

培地の pH を 4.5 に調整した場合、無調整の場合より、MIC, MBC はかなり低下した。シナモンと八角の MIC は 0.0063%, MBC はそれぞれ 0.05%, 0.0125%であった。クローブはオイゲノールと同じ MIC と MBC が得られた。その MIC は 0.025%, MBC は 0.1%であった (表 6-1)。

培地の pH を 4.0 に調整した場合、0.0031%の植物 EO あるいはオイゲノールを添加しても、接種した大腸菌 O157 の増殖は認められなかった。MBC はシナモンが 0.0125%, 八角が 0.0063%, クローブとオイゲノールが 0.05%であった (表 6-1)。

2. 野菜ジュースにおける植物精油の抗菌効果

4℃では、野菜ジュースに接種した大腸菌 O157 の増殖は認められなかった (表 6-2)。7 日後、残存菌数は初期菌数と同じで 5.3 Log cfu/ml であった。植物 EO を添加すると、O157 菌数は徐々に減少した。とくに、シナモン 0.1%添加で、7 日目に O157 菌数は検出限界以下となった。クローブ、オイゲノールを 0.1%添加した場合、1 日 4℃で保存後、残存 O157 は検出されなかった。八角 EO を 0.05%添加した場合、7 日目の残存 O157 数はコントロールより 2.1 Log 低下した。

表 6-3 に野菜ジュースにおける大腸菌 O157 に対する 20℃での植物 EO の抗菌効果を示す。コントロールの菌数は保存時間の延長により、徐々に減少した。植物 EO を添加した場合、0.05%あるいは 0.1%で、7 日目にすべて検出限界以下となった。クローブ、オイゲノールを 0.1%を添加した場合、1 日目から O157 は検出されなかった。

保存温度を 35℃にすると、1 日後、コントロールの菌数は変わらなかったが、植物 EO を添加した野菜ジュースから O157 は検出されなかった (表 6-4)。また、PBS に低い濃度の植物 EO を添加しても、接種した大腸菌 O157 は減少した。とくに、シナモンを 0.025% 添加すると、O157 数は検出限界以下となった (表 6-5)。

3. 加熱試験

大腸菌 O157 接種野菜ジュースに植物 EO を 0.01%, 0.05% 添加して 55℃で加熱試験を行った。加熱試験の結果から得られた D₅₅ を表 6-6 に示した。コントロールでは、D₅₅ は 5.69 min であった。植物 EO を添加すると、O157 の耐熱性は低下した。0.01% のシナモン、クローブ、八角 EO およびオイゲノールを添加した野菜ジュースにおける大腸菌 O157 の D₅₅ はそれぞれ 3.41, 4.09, 2.95, 4.05 min であった。さらに、添加濃度を 0.05% にすると、短時間加熱しても、顕著的な殺菌効果を認められた。とくに、0.05% の八角を添加した場合、D₅₅ は 0.38 min であった。

IV. 考察

本研究に使用した野菜ジュースの pH は 3.8-3.9 であった。表 6-1 に示したように、植物 EO およびクローブの主成分であるオイゲノールは低 pH の併用で、酸耐性を持っている大腸菌 O157 に対しても高い抗菌効果が得られた。特に、八角 EO は酸性培地では大腸菌 O157 に対して非常に低い MIC および MBC を示した。本研究で植物 EO の溶解に使用したエタノールは大腸菌 O157 の増殖に影響を与えない濃度であった。シナモン、クローブ、八角 EO の主成分はそれぞれシナモンアルデヒド、オイゲノール、アネトールである。これらの成分の抗菌作用は、現在でもまだ不明な点が多いが、静菌や殺菌のメカニズムは単一ではないと思われる。一方、植物 EO は pH 低下との併用効果が認められた。

Knight と McKellar⁴⁷⁾は大腸菌 O157 に対して 9 種類の植物 EO およびその成分の抗菌効果を検討し、シナモンおよびクローブの MIC はそれぞれ 0.025, 0.075% としている。Smith-Palmer ら⁸⁶⁾もシナモンおよびクローブ EO の大腸菌 O157 への MIC がそれぞれ 0.05% および 0.04% であったことを報告した。本研究では、八角 EO はシナモンやクロー

ブと同等以上の抗菌効果があることを認められた。

本章では、野菜ジュースに 0.05%および 0.1%の植物 EO を添加して種々の温度で保存し、接種した大腸菌 O157 の増殖や死滅状況を調べた。大腸菌 O157 はすべての条件で菌の増殖が認められなかった。EO などの殺菌効果は添加濃度、保存温度および保存時間によって大きく影響された。保存温度を高く、保存時間を長くすると、EO が低い濃度で添加しても、同じレベルの殺菌効果が得られると考えられる。Ceylan ら¹²⁾はアップルジュースに接種した大腸菌 O157 は 8℃で 14 日間保存しても増殖を認められなかったと報告した。温度は膜の流動性に大きく影響するため、抗菌物質の抗菌効果に影響したものと考えられる。一方、Gabriel ら²⁶⁾の報告では、加熱処理する前に酸適応させた大腸菌 O157 は、より高い耐熱性を示した。

一方、野菜ジュースでクローブやオイゲノールはより高い殺菌効果を得られたが、pH 4.0 での MBC は 0.05%であり、シナモンおよび八角より高かった。本研究に使用した野菜ジュースの糖度は約 8.2 度 (Brix) であり、植物 EO の抗菌効果に影響したと推察した。

また、植物 EO は大腸菌 O157 の耐熱性を非常に低下させた。特に、八角 EO は低温加熱との併用で高い殺菌効果が得られた。Cui ら¹⁶⁾は 12 種類の植物エタノール抽出液により *Clostridium* 属芽胞に対する 80℃と 100℃における耐熱性低下作用を調べたところ、甘草とレモンユーカリは効果的であったことを報告している。また、芽胞の耐熱性低下に対して甘草抽出液と低 pH の併用作用も認められた。本研究では、植物 EO は低温加熱との併用で野菜ジュースの安全性を高めることがわかった。効果的に野菜ジュースの微生物学的安全性を確保するだけでなく、また、低温処理ではビタミンなどの栄養素の損失を防止することができる。

一方、八角は強い芳香をもつ、星型のスパイスであり、さまざまな料理に利用されている。料理以外に食品、医薬品、練り歯磨きおよび風味の製品に広く使用されている。クローブやシナモン EO はスパイスりんごドリンクおよびジュース製品に添加されることが知られていて、八角 EO はジュース産業に風味剤または抗菌物質として使用することが可能であると思われる。

V. 小括

1. シナモン, クローブ, 八角 EO およびオイゲノールは大腸菌 O157 に対する MIC, MBC がそれぞれ 0.025-0.05%, 0.1-0.2%であった。酸性条件ではさらに低い MIC, MBC が得られた。
2. 野菜ジュースに接種した大腸菌 O157 の生残は, 植物 EO の添加濃度, 保存温度および保存時間により大きく影響された。
3. 野菜ジュースに植物 EO を添加すると, 大腸菌 O157 の D_{55} 値はかなり減少した。最大 5.69 分 (コントロール) から 0.38 分 (八角 EO, 0.05%) まで減少した。

表 6-1. 大腸菌 O157 mixture に対する植物 EO および成分の MIC と MBC

| pH | サンプル | MIC (%) | MBC (%) |
|--------------|--------|---------|---------|
| 無調整 (pH 7.2) | シナモン | 0.025 | 0.1 |
| | クローブ | 0.05 | 0.1 |
| | 八角 | 0.05 | 0.2 |
| | オイゲノール | 0.05 | 0.1 |
| pH 4.5 | シナモン | 0.0063 | 0.05 |
| | クローブ | 0.025 | 0.1 |
| | 八角 | 0.0063 | 0.0125 |
| | オイゲノール | 0.025 | 0.1 |
| pH 4.0 | シナモン | <0.0031 | 0.0125 |
| | クローブ | <0.0031 | 0.05 |
| | 八角 | <0.0031 | 0.0063 |
| | オイゲノール | <0.0031 | 0.05 |

表 6-2. 植物 EO 添加野菜ジュースでの大腸菌 O157 の挙動 (4°C)

| サンプル | 濃度 | 保存日数 (Log cfu/ml) | | | | |
|--------|-------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 7 |
| コントロール | | 5.3 ± 0.02 | 5.2 ± 0.02 | 5.3 ± 0.11 | 5.3 ± 0.04 | 5.3 ± 0.16 |
| シナモン | 0.1% | 5.3 ± 0.07 | 5.3 ± 0.04 | 4.7 ± 0.11 | 2.7 ± 0.07 | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.01 | 5.3 ± 0.05 | 5.2 ± 0.03 | 5.2 ± 0.10 | 4.1 ± 0.01 |
| クローブ | 0.1% | 4.9 ± 0.17 | — | — | — | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.03 | 5.3 ± 0.04 | 5.2 ± 0.01 | 5.2 ± 0.02 | 5.0 ± 0.11 |
| 八角 | 0.1% | 5.3 ± 0.06 | 4.0 ± 0.16 | 3.0 ± 0.05 | 2.5 ± 0.14 | 1.6 ± 0.05 |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.04 | 5.0 ± 0.17 | 4.5 ± 0.06 | 4.3 ± 0.21 | 3.2 ± 0.07 |
| オイゲノール | 0.1% | 4.8 ± 0.27 | — | — | — | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.08 | 5.1 ± 0.12 | 4.9 ± 0.09 | 4.9 ± 0.17 | 3.7 ± 0.10 |

— : 陰性 (<0 Log cfu/ml)

表 6-3. 植物 EO 添加野菜ジュースでの大腸菌 O157 の挙動 (20℃)

| サンプル | 濃度 | 保存日数 (Log cfu/ml) | | | | |
|--------|-------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 7 |
| コントロール | | 5.3 ± 0.02 | 5.0 ± 0.21 | 5.3 ± 0.10 | 5.3 ± 0.02 | 3.8 ± 0.05 |
| シナモン | 0.1% | 5.3 ± 0.07 | 4.1 ± 0.04 | — | — | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.01 | 5.0 ± 0.21 | 5.3 ± 0.10 | 5.3 ± 0.02 | — |
| クローブ | 0.1% | 4.9 ± 0.17 | — | — | — | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.05 | 5.1 ± 0.08 | 4.9 ± 0.12 | 4.5 ± 0.15 | — |
| 八角 | 0.1% | 5.3 ± 0.06 | 2.4 ± 0.13 | 1.0 ± 0.12 | — | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.04 | 4.2 ± 0.12 | 3.0 ± 0.03 | 2.5 ± 0.07 | — |
| オイゲノール | 0.1% | 4.8 ± 0.27 | — | — | — | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.08 | 4.3 ± 0.06 | 3.9 ± 0.08 | 3.4 ± 0.09 | — |

— : 陰性 (<0 Log cfu/ml)

表 6-4. 植物 EO 添加野菜ジュースでの大腸菌 O157 の挙動 (35℃)

| サンプル | 使用濃度 | 保存日数 (Log cfu/ml) | |
|--------|-------|-------------------|------------|
| | | 0 日 | 1 日 |
| コントロール | | 5.3 ± 0.02 | 5.2 ± 0.05 |
| シナモン | 0.1% | 5.3 ± 0.07 | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.01 | — |
| クローブ | 0.1% | 4.9 ± 0.17 | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.05 | — |
| 八角 | 0.1% | 5.3 ± 0.06 | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.04 | — |
| オイゲノール | 0.1% | 4.8 ± 0.27 | — |
| | 0.05% | 5.3 ± 0.08 | — |

— : 陰性 (<0 Log cfu/ml)

表 6-5. PBS での植物エッセンシャルオイルの抗菌効果

| サンプル | 使用濃度 | 残存菌数 (Log cfu/ml) |
|--------|---------|-------------------|
| | コントロール | 5.1 ± 0.04 |
| シナモン | 0.1% | — |
| | 0.05% | — |
| | 0.025% | — |
| | 0.0125% | 1.5 ± 0.06 |
| クローブ | 0.1% | — |
| | 0.05% | — |
| | 0.025% | 2.8 ± 0.04 |
| | 0.0125% | 4.7 ± 0.01 |
| 八角 | 0.1% | — |
| | 0.05% | — |
| | 0.025% | 2.2 ± 0.13 |
| | 0.0125% | 3.3 ± 0.08 |
| オイゲノール | 0.1% | — |
| | 0.05% | — |
| | 0.025% | 2.1 ± 0.05 |
| | 0.0125% | 3.6 ± 0.12 |

保存温度：35℃ 保存時間：1日

—：陰性 (<0 Log cfu/ml)

表 6-6. ジュース中での大腸菌 O157 の耐熱性に及ぼす植物 EO の影響

| 濃度 | 植物 EO | D ₅₅ (分) |
|-----------------|--------|---------------------|
| コントロール (野菜ジュース) | | |
| ----- | | |
| 0.01% | シナモン | 3.41 ± 0.09 |
| | クローブ | 4.09 ± 0.05 |
| | 八角 | 2.95 ± 0.15 |
| | オイゲノール | 4.05 ± 0.14 |
| ----- | | |
| 0.05% | シナモン | 0.79 ± 0.03 |
| | クローブ | 0.67 ± 0.02 |
| | 八角 | 0.38 ± 0.10 |
| | オイゲノール | 0.60 ± 0.05 |

加熱温度 : 55℃

第7章 総合考察

近年、健康志向の高まりとライフスタイルの変化に伴い、サラダなどで生食される野菜、アルファルファ等のスプラウト（芽もの野菜）は食生活の重要な部分であり、その消費量は日々拡大してきた。その一方で、これら加熱しない生食用野菜を原因食とする大規模食中毒が国内外で多発し、大きな問題となっている。

生鮮野菜を汚染する主要な食中毒菌としては、腸管出血性大腸菌、サルモネラおよびリステリアである。特に、野菜に関する食中毒の多くは大腸菌 O157 を原因菌としている。生鮮野菜における優占微生物は、腐敗細菌、酵母やかびであり、食中毒菌が実際に分離される頻度は一般的に低い。食中毒菌の生鮮野菜への汚染は、生産段階の農場あるいは収穫後の一次加工・流通段階のいずれか、あるいは両方で起こる可能性がある。

野菜は農場から食卓までの過程で汚染される可能性がある。農場の汚染源としては、家畜・野生動物の糞尿、未熟堆肥、汚染河川、下水、灌漑水、保菌の動物、鳥、昆虫および農業従事者などである。健康な牛では腸管出血性大腸菌、家禽ではサルモネラの保菌率が高く、土壌細菌でもあるリステリアの保菌率はいずれの家畜でも高いことが知られている。これらの保菌家畜からの排泄物とその未熟堆肥により、土壌が食中毒菌で汚染される。大腸菌 O157 やサルモネラは、土壌の種類、水分含量や気温に依存するものの一般に数週間から数ヶ月間生存可能である。このような汚染土壌で栽培された生鮮野菜では、食中毒菌の根圏を介した植物体への内部侵入や土の跳ね返り等による食中毒菌の茎葉への表面付着による汚染リスクは高くなる。飼育場からの汚水が流出する河川などを用いた灌漑によっても、生鮮野菜で食中毒菌の表面付着や気孔を介した内部侵入の汚染リスクは高くなる。生鮮野菜の収穫後の汚染源としては、収穫用器具・装置、輸送コンテナ、昆虫、洗浄水、冷却用氷、輸送車および加工装置などである。なお、作業者はほ場同様に汚染源となる。

一度、食中毒菌が野菜の根元や表面の傷や気孔などから内部侵入すると加熱以外での殺菌は極めて難しくなる。一方、食中毒菌は野菜で長い期間生存できる。例えば、大腸菌 O157 は低温保存の野菜では増殖が認められないが、長期間生存する¹³⁾。リステリアは 0℃でも徐々に増殖できる¹¹⁾。加熱せずに生で食べる野菜では、洗浄や消毒によって

食中毒を起こす微生物を減らすことはできても、完全に除くことはできない。また、温度や栄養などがこれらの微生物にとって都合の良い条件になると増殖したり、少量で食中毒を起こしたりすることもある。水道水による野菜の洗浄では、野菜にある土壌などの汚染物質を除去できるが、食中毒細菌を効果的には減少できない。また、洗浄水を介して野菜へ交差汚染する可能性も高い。殺菌剤を使用する洗浄は現実的な方法である。しかし、殺菌剤の種類、処理時間などにより効果が違うことが多い。塩素系殺菌剤である次亜塩素酸ナトリウムは野菜業界でよく使用されているが、殺菌効果は限られている。

本研究では、レタス、ホウレンソウおよび白菜の洗浄殺菌において次亜塩素酸ナトリウムを用いて種々の濃度と反応時間で洗浄殺菌効果の検証を行った。水道水より、次亜塩素酸ナトリウムによる洗浄は高い殺菌効果が得られた。有効塩素濃度の 100, 200 および 500 ppm の洗浄殺菌効果には、野菜の種類にかかわらず顕著な差は認められなかった。一般生菌数、大腸菌群数、接種した O157 は各 1.0~1.5 Log 程度減少した。また、処理時間を延長しても、期待されるほど殺菌効果の上昇は認められず、時間の経過とともに、塩素濃度は徐々に減少した。したがって、野菜の洗浄殺菌では、次亜塩素酸ナトリウムの使用濃度を高くしても処理時間を延長してもそれほど高い殺菌効果が得られなかった。野菜表面の複雑な構造が付着した細菌を保護したこと、野菜の傷や気孔、切口から組織内に入り込んで殺菌剤と接触を逃れたこと、菌体自身が形成したバイオフィルムで菌体を保護したことなどがその原因と推定された^{20,57,58,59,64,88,89}。洗浄殺菌時間については、殺菌剤を使用した場合、洗浄殺菌開始の早い段階で菌数が減少することから、5分程度で十分であり、10分間以上の洗浄殺菌は効率的ではないと考えられた。一方、世界中ほとんどの野菜加工工場では、野菜がスライスしてから洗浄処理を行うのが一般的である。Nou と Luo⁶⁸)は、レタスを実験材料に用い、洗浄殺菌を行ってからスライスすると、先にスライスする場合より低い菌数であったことを報告している。また、野菜を洗浄殺菌液に浸漬したままスライスする場合、生菌数や接種 O157 数の減少には、洗浄殺菌後スライスあるいはスライスしてから洗浄殺菌を行うパターンより高い殺菌効果が得られたとの報告もある⁹¹。

野菜の洗浄殺菌には、次亜塩素酸ナトリウムへの浸漬洗浄が主流であるが、有機物との反応に伴う殺菌効率の低下やトリハロメタンの発生などの問題点がある。代替殺菌剤とし

て、レモン汁、電解水、二酸化塩素、タイム精油、オゾン水、亜塩素酸ナトリウム、過酢酸、また放射線や加熱処理などが報告されている^{35,75,79,80,83}。ハウレンソウとレタスにおけるリステリア、サルモネラおよび大腸菌 O157 に対して、エアゾールリンゴ酸の有効性も評価されている¹⁴。二酸化塩素は次亜塩素酸ナトリウムより高い酸化力を持ち、安定性が高く、トリハロメタンなどの有害物質が発生しないメリットがある^{43,88}。米国、カナダ、ドイツ、イタリア、韓国などではすでに飲料水などへの殺菌方法として普及している。本研究でも、二酸化塩素は次亜塩素酸ナトリウムより高い殺菌効果が得られた。

次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素の殺菌効果を高めるために、超音波、バブリングおよび低温加熱（50℃）処理と併用して、野菜への殺菌効果を調べた。しかし、超音波およびバブリングは野菜に強固に付着していた細菌を離脱させることができず、殺菌効果の上昇は認められなかった。一方、低温加熱は塩素系殺菌剤の殺菌効果を高めた。低温加熱処理と塩素系殺菌剤の併用で、葉野菜における一般生菌数、大腸菌群数および接種大腸菌 O157 数は最大 2.9, 4.1, 2.5 Log それぞれ減少した。Klaiber ら⁴⁵は 50℃、200 ppm の塩素水はカットニンジンにおける好気性中温細菌を 2.3 Log 減少したことを報告した。Inatsu ら³⁷は、酸性化亜塩素酸ナトリウムが 25℃あるいは 4℃より 50℃のほうが高い殺菌効果（白菜、大腸菌 O157）を得られたとしている。Kondo ら⁴⁹は 50℃の塩素水による 1 分間の処理でレタスにおける大腸菌 O157 を 1.5 Log 減少したと報告した。加熱処理との併用では、5~50℃の範囲において温度が 10℃上昇すれば、塩素の殺菌作用は約 2 倍になる。また、付着菌自身が熱の影響で損傷やストレスを受けて、殺菌剤に対する感受性が高まったと考えられる。また、熱によって、野菜表面の構造を変化させたり、付着菌を保護していたバイオフィルムを破壊させたりして、野菜中の微生物を洗浄液中に離脱させて殺菌効果を高める可能性もあると考えた。一方、低温加熱処理によって、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（phenylalanine ammonia lyase）の活性が低下し、野菜の官能品質が高まったとの報告もある^{65,78}。

各処理した野菜に残存した大腸菌 O157 の菌数測定において、本研究では選択培地の SMAC より非選択性培地の TSA のほうが高い検出率が認められた。ほかの研究でも同様の結果が報告されている^{37,52}。一般的には、選択性が低い培地は損傷やストレスを受けら

れた菌の検出率が高い^{27,33,54,94})。野菜洗浄処理中の攪拌、超音波、バブリング、低温加熱などは野菜における大腸菌 O157 に多少の損傷を与えるかもしれないと考えて研究を行った。次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素および物理的処理の超音波や低温加熱などにより大腸菌 O157 が損傷やストレスを受けて、選択培地での増殖が遅れたあるいは増殖できなかったと考えられる。

ところで、次亜塩素酸ナトリウム処理で産生するクロロホルムは、塩素が残存している間に野菜成分との反応により増加したが、塩素消滅後には変化が認められなかった(船渡川ら, 1999)。野菜に残留した次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素の反応を停止させるため、塩素系殺菌剤を除去あるいは中和しなければならない。本研究では、次亜塩素酸ナトリウムや二酸化塩素を中和するのに、検体の試料乳剤には 1%チオ硫酸ナトリウムを含むチオ PBS を用いた。理論的には、チオ硫酸ナトリウム 1 mol が塩素分子 4 mol を中和することから推測して、本研究で、二酸化塩素の中和に用いたチオ硫酸ナトリウムは十分な量であったと考えられる。

第 4 章では、10~100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム洗浄液を交換せずに 10 回目までホウレンソウや白菜を洗浄し、腸管出血性大腸菌 O157 による非接種野菜への交差汚染の有無を実証した。洗浄殺菌液を繰り返して使用して野菜を洗浄すると遊離有効塩素は徐々に減少して、殺菌効果も低下した。初期濃度が 50, 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウムでは、10 回洗浄後も 10 ppm 以上の塩素が残留し、洗浄液から O157 は検出されなかった。また、これらで野菜を洗浄しても交差汚染は認められなかった。初期濃度が 10, 20 ppm の次亜塩では洗浄回数には塩素濃度は 1 ppm 以下に低下し、洗浄液に O157 が残った。また、これらを用いて非接種野菜を洗浄すると O157 が検出された。ホウレンソウの方が白菜より塩素濃度の低下が大きく汚染しやすかった。野菜洗浄殺菌する際に、野菜の表面にある有機物質などの品質や種類差を考慮して、適切な濃度の塩素の使用することは交差汚染の防止に役立つ。低い塩素濃度を使用すると、遊離塩素はほとんど野菜表面にある有機物質や野菜汁などと反応して、消費されと考えられる⁵⁹)。報告によると、塩素による野菜の洗浄殺菌効果は、野菜と洗浄液の比率、野菜表面にある有機物質の量、野菜の調製方法、接種菌液の有機物質量、浸漬法およびスポットの接種方法などにより影響されること

が知られている^{5,22,49,53,85})。本研究では、カットする前に2-3回水道水で洗浄したり、接種菌液も2回遠心洗浄し、野菜における有機物の量を抑えた。

一方、市販の野菜洗剤では1回のみ接種野菜を洗浄しても、洗浄液からO157が検出され、非接種野菜への交差汚染を引き起こした。現場で常用される100 ppm程度の次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理は、野菜洗浄時の交差汚染の防止には大きく役立っている。野菜の殺菌効果に大差がないからといって使用濃度を下げたり、殺菌効果が十分検証されていない代替品の使用は汚染ロット混入時に汚染拡大のリスクが高まるので注意すべきである。一方、洗浄殺菌液中には食中毒菌のすべては殺菌されない微環境⁵⁹)がある可能性があり、菌は洗浄液中に長い時間生存できることから¹³)、洗浄液から菌が検出されなくても非接種野菜を洗浄すると交差汚染が起こる可能性もあることは注意すべきである。

漬物の衛生規範⁵⁰)には、「野菜を加熱せずに供する場合には、流水で十分洗浄し、必要に応じて次亜塩素酸ナトリウム（生食用野菜にあつては、亜塩素酸ナトリウムも使用可）の200 ppmの溶液に5分間（100 ppmの溶液の場合は10分間）又はこれと同等の効果を有するもの（食品添加物として使用できる有機酸等）で殺菌を行った後、十分な流水ですすぎ洗いをを行うこと」と記載されている。本研究の結果からみると、次亜塩素酸ナトリウム溶液を200 ppmあるいはそれ以上の高濃度にしても菌数低減効果は期待できない。また、高濃度にした場合に野菜の品質への悪影響が予想される。さらに、すすぎの水量の増加や加工現場の環境への影響なども問題になる。それらのことから、野菜の洗浄殺菌では次亜塩素酸ナトリウム100 ppmが適正であると思われる。一方、100 ppmでは5分と10分で同じ殺菌効果であったので5分間の処理が適正である。また、二酸化塩素の殺菌効果を検討した結果、二酸化塩素は多くの場合で低濃度でも次亜塩素酸ナトリウムよりも優れた殺菌効果を示し、さらに有機物の存在が懸念される環境の殺菌においても同時にトリハロメタンを生成しない。そこで日本でも次亜塩素酸ナトリウムによる野菜や果物の洗浄、および水道水の殺菌の代替殺菌剤として二酸化塩素は期待される。

一方、食中毒菌の汚染があった場合、殺菌剤の濃度にかかわらず完全な殺菌が困難であるため、洗浄殺菌効果を過信することは危険である。そのため、一般的衛生管理の適切な実施、低温管理など総合的な衛生管理が欠かせない。また、野菜の微生物的な汚染は、栽

培方法や栽培地域、季節、不要部分の除去方法の違い等により菌数の変動が予想されることから、一般生菌数などの衛生指標菌数の定期的な検査データを参考に処理濃度や時間を設定することが望ましいと考えられる。

次亜塩素酸ナトリウム溶液、二酸化塩素は、有効な洗浄殺菌剤であるが、使用方法を間違えると前述のように野菜の品質低下など悪影響の原因となる。また、次亜塩素酸ナトリウム溶液に、万一、酸を混ぜると塩素ガスが発生しとても危険である。次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄殺菌を常に適切に実施するために、作業者の経験に頼ることなく、製造現場で働く作業者の誰にでも同様の作業が行えるよう作業内容を文書化することが必要である。さらに、希釈等の操作が常に適切に実施されているか、管理者等により定期点検することなど、現場の作業者まかせにすることを避けるべきである。

食品工場や集団給食施設などで野菜・果実を次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬する際、あまり大量の野菜を浸漬することは有効塩素の急激な減少により十分な洗浄殺菌効果が得られない可能性もある。また、野菜・果実を洗浄殺菌する際、次亜塩素酸ナトリウム溶液を繰り返し使用すること、あるいは野菜浸漬中にさらに野菜を加えることは、次亜塩素酸ナトリウム溶液の失活を考慮すると避けるべきであると考えられた。そのために殺菌剤の希釈時と同様に作業手順を作成し遵守すること、あわせて作業内容を定期点検することが必要である。

加熱できない生食用野菜および加工品の衛生管理には、洗浄殺菌により有害菌を殺菌、除去することと、製造現場における汚染防止が食中毒リスクの低減にとっても重要である。Bolin ら⁷⁾はカットレタスを用いて、初発菌数を抑制することが貯蔵性の向上に結び付くことを報告している。すなわち、野菜の殺菌処理が、その後の貯蔵中にまで菌数低下の効果を持続させる。細菌の増殖を防ぐために、洗浄殺菌処理後は迅速に低温保存することが重要である。さらに、切断した野菜は品質が低下し易く、細菌が増殖し易い条件にあるため、製品の流通、販売、そして消費に至るまでの低温管理、衛生的管理が必要である。このように、野菜・果実を加工調理する施設では、原料の生産から製造、消費まで様々なリスクがあることを常に念頭におき、総合的かつ一貫した衛生管理に努める必要がある。

浅漬けや漬物等の野菜加工品には保存料などの化学合成添加物が使われることがある

が、長期的にはこれらの健康への影響が憂慮されるため、人類が長い歴史の中で摂取してきた経験のある天然物質の有する抗菌性が主たる微生物制御法になってきた。乳酸菌が生産する代表的なバクテリオシンであるナイシンは、食品の利用について多くの検討がなされ、世界の 50 カ国以上で、チーズ、ヨーグルト、乳、野菜野缶詰、食肉製品などに微生物制御を目的として許可されている。クエン酸、ソルビン酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸は食品保存の目的でよく使用されている³⁾。動物由来の抗菌物質であるキトサンは大腸菌に対して効果を示し、野菜の浅漬けなど漬物での保存料として使用されている⁹²⁾。

植物由来の抗菌物質としては、香辛料の成分が多く報告されている。Cui ら¹⁵⁾は約 90 種類の植物から熱水抽出液とエタノール抽出液について抗ボツリヌス活性を有する植物の探索を行い、カレープランツ、レモンユーカリ、メース、甘草などの高い抗菌活性を示している。しかし、大腸菌 O157 などのグラム陰性菌の感受性は低かった。本研究でも同様の結果が得られており、食塩添加の白菜乳剤ではコントロールより植物抽出液添加した場合、低い大腸菌 O157 数であった。とくに、八角や烏梅は高い抗菌効果が得られた。また、自製した白菜浅漬けに八角 0.1%、烏梅 0.1%およびガラシ 0.05%を添加し、15℃で 7 日間まで保存した場合の生菌数、大腸菌群数、乳酸菌数および接種した大腸菌 O157 数の変化を検討した。保存期間において、各菌数ともコントロールより低い菌数となった。Inatsu ら³⁸⁾はキトサンおよびイソチオシアン酸アリル (AIT, Allyl isothiocyanate) が白菜浅漬けにおいて品質変化なく抗菌効果を示したことを報告した。2012 年、北海道で「白菜浅漬け」を原因とする腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒が発生し、浅漬け製造際の原料野菜の洗浄や殺菌法の確立が緊急の課題となった。一方、浅漬けの原材料である白菜を効果的な殺菌を行ってから漬けると、製品における食中毒菌の菌数は低い傾向を保持したという報告もみられる³⁹⁾。

EO は植物に含まれ、揮発性の芳香物質を含む有機化合物である。本研究ではシナモン、クローブ、八角 EO およびクローブの主成分であるオイゲノールの大腸菌 O157 に対する MIC, MBC を調べた。また、野菜ジュースにおける大腸菌 O157 の殺菌効果を添加濃度や保存温度から検討するとともに、大腸菌 O157 の耐熱性への影響についても調べた。酸

性の培地ではかなり低い MIC と MBC が得られた。シナモン、クローブおよび八角精油の主成分はそれぞれシナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールであり、酸性条件下では、細菌質膜の脂質に良好に溶解する可能性がある^{47,90)}。一方、植物 EO の抗菌や殺菌のメカニズムはまだ完全には明らかにされていないが、単一の抗菌成分ではなく複数の成分が関係していると考えられる。これまで、植物 EO は細菌の酵素生産の阻害や、細胞質膜の損傷、電子輸送および栄養摂取の中断、エネルギー代謝の干渉、核酸合成の影響などを引き起こして殺菌するとの報告がある^{10,17,63)}。

一般的に、食品システムにおいて *in vitro* 試験で得られたデータと同様の効果を得るためにはより高い濃度が必要となる。さらに、低温条件下ではその溶解性が低下するため、より高い濃度の EO の添加が必要になるかもしれない。室温あるいはさらに高い温度では、EO は優れた効果が得られると思われる。なぜなら、温度は細菌の膜流動性に大きく影響し、低温では、リン脂質が密に剛性ゲル構造となることが報告されているからである⁷⁶⁾。植物 EO は野菜ジュースにおける大腸菌 O157 の耐熱性をかなり低下させた。特に、八角精油はシナモンやクローブなどより優れた効果が認められた。八角は甘い香りで、シナモンおよびクローブと同様によく使用されているスパイスである。シナモンやクローブはよくスパイス・リンゴジュースなどに添加されていることから、八角も低濃度であれば保存性を持たせたジュースとして応用可能と考えられた。植物 EO は pH、温度条件などとの併用で高い抗菌効果が認められ、相乗効果あるいはハードル効果が認められたとの報告もある⁹⁷⁾。

以上、本研究では、野菜およびその加工品の微生物的安全性を高めることを目的として、野菜の洗浄殺菌における塩素系殺菌剤である次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素の適切な処理条件を明らかにした。低温加熱との併用では同時使用でより高い殺菌力があることも証明した。また、50 ppm 以上の塩素は野菜の洗浄殺菌において腸管出血性大腸菌 O157 の交差汚染を防止することを実証した。一方、八角抽出液および八角精油について *in vitro* および食品モデルでの抗大腸菌 O157 作用を初めて評価した。さらに、これらは大腸菌 O157 に対して耐熱性低下作用があることも確認した。

本研究の結果はカット野菜産業で野菜の安全性と品質を高めるために行う塩素ベース

洗浄処理の設計に科学的データを提供するものである。今回は、次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm, 5 分間の処理が最適条件と結論したが、野菜の一般生菌数などの初発菌数や殺菌剤に対する品質低下の程度などを考慮し、野菜の種類別に適切な濃度を設定することが望ましい。

一方、植物抽出液あるいは植物 EO が食品の味や香りに負の影響を与えない濃度で野菜加工品の安全性を高めるために有効と思われ、その応用が期待できる。また、消費者の嗜好の変化により食品製造では新たな風味と食感の要求から、ハーブや香辛料の多様な食品への応用がさらに期待される。

第8章 要約

食品の生産から消費までの微生物制御は、食品の安全確保における重要な課題である。近年、消費者の簡便・健康・グルメ志向を反映して、ready-to-eat 食品、低塩・低糖食品、マイルド加熱食品が増えているが、これらは特に衛生管理対策が必要である。また、流通・消費段階での不適切な温度管理や取り扱いを想定して、食品自体に微生物の増殖に対する抵抗性を持たせる必要が生じている。近年、野菜を原因とする食中毒が日本や欧米諸国で頻発し、その安全性を確保する衛生管理が急務となっている。特に、生食用野菜の消費は拡大しており、業界では、鮮度とともに低い生菌数が要求されている。カット野菜や浅漬けなどの野菜加工品は加熱工程や十分な発酵工程がないため、食材が病原菌の汚染を受けていた場合、これらが増殖して食中毒を起こす可能性がある。それゆえ、野菜の洗浄殺菌は食中毒リスクを低減する重要なポイントとなっている。また、野菜処理場において、洗浄殺菌液を連続使用すると殺菌効果が減少したり汚染ロットが混入した場合に交差汚染を引き起こす恐れがある。

現在、野菜加工現場では次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) による殺菌が主流であるが、高濃度や長の処理の場合、野菜の品質の劣化や塩素臭による作業環境の悪化が問題になる。消費者が求める高い品質と、安全性を確保する強力な殺菌処理の両立は困難である。ハードル理論に基づいて、いくつかの微生物制御因子を組み合わせると、一つ一つのハードルを低く設定しても、全体としては十分な効果が期待できる。一方、野菜漬物や浅漬けなどの野菜加工品の微生物安全性確保において保存料などの食品添加物の使用は有効であるが、長期的にはこれらの健康への影響が憂慮されるため、人類が長い歴史の中で摂取してきた経験のある天然食材の有する抗菌性を利用した微生物制御法が期待される。

このような背景の中で、本論文では、野菜の殺菌に塩素系殺菌剤である NaClO あるいは二酸化塩素 (ClO₂) を用いて種々の濃度と反応時間で洗浄殺菌効果を検証するとともに、効果的に菌数を減少させる他の殺菌法との組み合わせについても検討した。また、野菜の洗浄殺菌液を連続使用した場合の腸管出血性大腸菌 O157:H7 による交差汚染について塩素濃度との関連から検討した。一方、野菜浅漬けやジュースなどの加工品の微生物的安全

性を高めるために、植物抽出液および植物精油の利用についても検討した。

1) 塩素系殺菌剤による野菜類の洗浄殺菌

野菜の洗浄殺菌効果は殺菌剤の濃度や処理時間などにより影響される可能性がある。一方、高濃度の殺菌剤や長時間処理は野菜の品質に悪影響を及ぼす。野菜の殺菌における塩素系殺菌剤である NaClO あるいは ClO₂ を用いて種々の濃度と処理時間でレタス、ホウレンソウ、白菜に対する洗浄殺菌効果を検証した。

NaClO あるいは ClO₂ による野菜の洗浄殺菌により、一般生菌数、大腸菌群数および接種した大腸菌 O157 数は、水道水による洗浄より有意に減少した。しかし、100, 200, 500 ppm NaClO の洗浄殺菌効果には、野菜の種類にかかわらず顕著な差は認められず、いずれの菌数も 5 分間で 1.0~1.5 Log しか減少しなかった。ClO₂ は 50 ppm 濃度で NaClO を上回る殺菌がみられた。野菜の洗浄殺菌で単に NaClO の使用濃度を高くしたり各処理時間を延長しても、殺菌効果は高くないことがわかった。また、洗浄殺菌開始の直後、菌数は減少し、5 分以降ではほとんど菌数減少は認められなかった。高濃度の ClO₂ ではさらに高い効果が得られたが、野菜の色調などの品質に影響した。野菜に付着した細菌は野菜表面の撥水性やバイオフィルムの形成、さらには切断面や気孔から組織内に菌体が侵入し、殺菌剤との接触を逃れ、殺菌効果が限定されたものと考えられた。

2) 塩素系殺菌剤と物理的処理の併用効果

塩素処理単独による野菜の殺菌効果は低かったため、本章では、ハードル理論に基づいて、超音波、低温加熱（50℃）などの物理的処理との併用効果について検討した。超音波やバブリングとの併用効果は余り認められなかった。100 ppm NaClO および 50 ppm ClO₂ では 50℃の加熱処理との併用で殺菌効果が上昇したが、処理の順序により殺菌効果に多少の差が認められた。塩素と加熱処理は同時併用の場合、より高い殺菌効果が得られ、一般生菌数、大腸菌群数および接種大腸菌 O157 数は最大 2.9, 4.1, 2.5 Log それぞれ減少した。50℃加熱により、付着菌自身が熱の影響で損傷やストレスを受けて、殺菌剤に対する感受性が高まったものと考えられた。

3) 野菜の塩素洗浄殺菌における交差汚染の防止

野菜加工現場では、洗浄工程で大量の水が使用されている。水の再利用によって水の消費量が抑えられているが、一方では交差汚染の発生も懸念される。洗浄殺菌液を繰り返して使用すると、殺菌効果の減少あるいは汚染ロットが入った場合の交差汚染などが危惧される。そこで本章では、野菜の洗浄殺菌液を交換せずに使用し続けた場合の大腸菌 O157 による交差汚染について塩素濃度との関連から検討を行った。初期濃度が 50, 100 ppm の NaClO では、大腸菌 O157 接種野菜を 10 回洗浄後も 10 ppm 以上の塩素が残留し、洗浄液から O157 は検出されなかった。これらで非接種野菜を洗浄しても交差汚染は認められなかった。一方、初期濃度が 10~20 ppm では洗浄数回目に塩素濃度は 1 ppm 以下に低下し、洗浄液に O157 が残った。また、これらを用いて非接種野菜を洗浄すると交差汚染を起こし、O157 が検出された。塩素濃度の減少は野菜表面の有機物質や滲出液などによるものと推察された。また、市販の野菜用洗剤の場合、1 回の接種野菜の洗浄で、洗浄液から O157 が検出され、非接種野菜への交差汚染を引き起こした。したがって、50 ppm 以上の NaClO による野菜の洗浄殺菌処理は、交差汚染の防止には大きく役立っている。野菜の殺菌効果に大差がないからといって使用濃度を下げたり、殺菌効果が十分検証されていない代替品や市販洗剤などの使用は汚染ロット混入時に汚染拡大のリスクが高まる。

4) 植物抽出液による野菜浅漬けの微生物制御

浅漬けは野菜に調味料と酸味料を加えたものであり、本来の発酵食品ではなく、酸性度が弱い。そのため、食中毒菌は生残り、増殖することもある。日本では、白菜の浅漬けによる病原大腸菌 O157:H7 食中毒事件が発生し、浅漬け類製造における衛生管理が非常に重要となっている。浅漬けや漬物等の野菜加工品には保存料などの化学合成添加物が使われることがあるが、これらの長期摂取によるヒトの健康への影響が憂慮されるため、天然物質の有する抗菌性が注目されている。本研究では、中国産の香辛料や漢方薬から大腸菌 O157 に対する抗菌サンプルをスクリーニングして、エタノール抽出液で自製した白菜浅漬けに添加し、抗菌効果を確認した。植物抽出液はグラム陰性菌である大腸菌 O157 への

抗菌効果が既報のとおり低かった。八角、烏梅の抽出液の大腸菌 O157 増殖抑制効果は高まった。植物抽出液の併用効果を検討したところ、八角 0.1%/烏梅 0.1%/ガラंगル 0.05% の組み合わせは白菜乳剤で強い抗 O157 効果が認められた。この組み合わせを白菜浅漬けに添加すると、15℃で7日間保存中の一般生菌数、乳酸菌および接種した大腸菌 O157 数はコントロールより低かった。植物抽出液を組み合わせで野菜加工品などに添加すると、製品の安全性を高めるのに有効であると思われた。

5) 植物精油による野菜ジュースの微生物制御

海外では野菜ジュースやリンゴ果汁などの飲料による腸管出血性大腸菌 O157 等の食中毒が頻発している。HACCP の食品工場への導入が積極的に進められ、米国 FDA では果汁の製造工程において 5 Log (5D) の殺菌を要求している。近年、エッセンシャルオイル (EO) は生鮮食品やその製品の抗菌剤として注目されている。本章では、シナモン、クローブ、八角 EO およびクローブの主成分であるオイゲノールの大腸菌 O157 に対する MIC (最小発育阻止濃度) および MBC (最小殺菌濃度) を調べるとともに、野菜ジュースにおける大腸菌 O157 の抑制効果を EO の添加濃度や保存温度から検討した。また、大腸菌 O157 の耐熱性 (D 値) を低下させる効果についても検討した。EO の大腸菌 O157 に対する MIC, MBC はそれぞれ 0.025-0.05%, 0.1-0.2%であった。酸性条件 (pH 4.0, pH 4.5) ではそれぞれもっと低い値が得られた。野菜・果実ミックスジュースに接種した大腸菌 O157 はすべての保存条件で増殖が認められなかったが、EO の添加濃度、製品の保存温度および保存時間により接種大腸菌 O157 の残存は大きい影響を受けた。また、野菜・果実ミックスジュースに EO などを添加すると、大腸菌 O157 の D₅₅ 値は大きく低下した。最大 (八角 EO, 0.05%) 5.69 分 (コントロール) から 0.38 分までに減少されたことを得られた。EO は酸性 pH および低温加熱との併用では、相乗あるいはハードル効果が認められた。

本研究では、野菜の殺菌に NaClO と ClO₂ を用いて種々の濃度と反応時間で洗浄殺菌効果を検証するとともに、効果的に菌数を減少させる手法について検討した。また、野菜の

洗浄殺菌液を連続使用した場合の腸管出血性大腸菌 O157 による交差汚染について塩素濃度との関連からも検討した。一方、野菜加工品の微生物的安全性を高めるために、天然物の抗菌効果を検討した。野菜の生菌数や接種 O157 数は NaClO 単独処理で、顕著的に減少したが、ClO₂ はより高い殺菌効果を示した。超音波やバブリングとの併用効果は認められなかった。一方、塩素系殺菌剤は低温加熱処理により殺菌力は高まり、約 3.0 Log の菌数減少が認められた。さらに、処理の順序により洗浄殺菌の効果差がみられた。一方、初期濃度が 50, 100 ppm の NaClO では、10 回洗浄後も 10 ppm 以上の塩素が残留し、洗浄液から O157 は検出されなかった。これらで非接種野菜を洗浄しても交差汚染は認められなかった。また、植物精油は酸性 pH や低温加熱との併用効果が認められた。特に、精油と 55℃ 加熱処理との併用でジュースにおける大腸菌 O157 の D₅₅ 値は大きく減少した。植物抽出液の八角 0.1%、烏梅 0.1%、ガランガル 0.05% の組み合わせは白菜乳剤や白菜浅漬で強い抗 O157 効果が認められた。

本研究では、野菜の洗浄殺菌における NaClO と ClO₂ の適切な処理条件を明らかにした。さらに、50 ppm 以上の塩素は野菜洗浄殺菌中に腸管出血性大腸菌 O157 の交差汚染を防止することを実証した。一方、植物抽出液や精油は野菜加工品における大腸菌 O157 の制御には有効であることも明らかにした。

謝辞

本研究を遂行するあたり、広島大学生物圏科学研究科食品衛生学研究室の中野宏幸教授には、多方面からの温かいご指導、ご鞭撻をいただきました。特に、留学生である私の言葉表現力と文章力の不足に対して常に丁寧にご指導いただき、最初の論文原稿から一字一句直しながらご指導いただきました。さらに、厳しい留学生活においても、優しく温かいご支援をいただきました。私が異国で研究の道を歩む中での大きな心の支えであり、日本人の勤勉さや真面目の精神を学びました。中野教授に心より深く御礼申し上げます。

本論文を完成するにあたり、多方面にわたり貴重なご指導、ご助言をいただいた食品衛生学研究室の島本整教授、食品工学研究室の羽倉義雄教授に心より深く御礼申し上げます。

また、日本語の指導および外国生活でも温かいご助言をいただいた中野和子さんに深く感謝いたします。食品衛生学研究室の崔海英, Alonzo A. Gabriel, 麦莉敏, 甲斐理恵, 包红彬, 加藤義啓さんにはご協力をいただき、心より感謝いたします。

そして、学生支援室の皆様には多面にわたりお世話になりました。特に厚井晶子さんは、私の留学生活に大きな心の支えとなり、研究や生活の悩みの相談に乗っていただき、心より感謝いたします。

本研究は農林水産省「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発（検出制御）DI-7203」の一部として行われたものです。独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所の稲津康弘主任研究員に心より感謝いたします。

最後に、これまで私を温かく応援してくれた家族に心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Andrews, L. S., Key, A. M., Martin, R. L., Grodner, R. and Park, D. L.: Chlorine dioxide wash of shrimp and crawfish an alternative to aqueous chlorine. *Food Microbiol.*, **19**, 261-267 (2002).
- 2) Baert, L., Vandekinderen, I., Devlieghere, F., Coillie, E. V., Debevere, J. and Uyttendaele, M.: Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce murine norovirus 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce and in residual wash water. *J. Food Prot.*, **72**, 1047-1054 (2009).
- 3) Beuchat, L. R.: Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spice and organic acids. *J. Food Sci.*, **41**, 899-902 (1976).
- 4) Beuchat, L. R.: Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.*, **59**, 214-216 (1996).
- 5) Beuchat, L. R.: Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *J. Food Prot.*, **62**, 845-849 (1999).
- 6) Boddie, R. L., Nickerson, S. C. and Adkinsont, W.: Efficacies of chlorine dioxide and iodophor teat dips during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *J. Dairy Sci.*, **83**, 2975-2979 (2000).
- 7) Bolin, H. R., Stafford, A. E., King JR, A. D. and Huxsoll, C. C.: Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. *J. Food Sci.*, **42**, 1319-1321 (1977).
- 8) Brazis, A. R., Leslie, J. E., Kabler, P. W. and Woodward, R. L.: The inactivation of spores of *Bacillus globigii* and *Bacillus anthracis* by free available chlorine. *Appl. Microbiol.*, **6**, 338-342 (1958).
- 9) Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M.M., Remschmidt, C., Wilking, H., Deleré, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., *et al.*: German outbreak

- of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. N. Engl. J. Med., **365**, 1763-1770 (2011).
- 10) Burt, S.: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-a review. Int. J. Food Microbiol, **94**,223-253 (2004).
 - 11) Carrasco, E., F. Perez-Rodriguez, F., Valero, A., Garcia-Gimeno, R. M. and Zurera, G.: Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. Food Control, **19**, 487-494 (2008).
 - 12) Ceylan, E., Fung, D. Y. C. and Sabah, J. R.: Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. J. Food Sci., **69**, 102-106 (2004).
 - 13) Chang, J.-M. and Fang, T.-J.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. Food Microbiol., **24**, 745-751 (2007).
 - 14) Choi, M.-R., Lee, S.-Y., Park, K.-H., Chung, M.-S. and Ryu, S.-R.: Effect of aerosolized malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce. Food Control, **24**, 171-176 (2012).
 - 15) Cui, H., Gabriel, A. A. and Nakano, H.: Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. Food Control, **21**, 1030-1036 (2010).
 - 16) Cui, H., Gabriel, A. A. and Nakano, H.: Heat-sensitizing effects of plant extracts on *Clostridium spp.* spores. Food Control, **22**, 99-104 (2011).
 - 17) Cutter, C. N.: Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium associated with beef. J. Food Prot., **63**, 601-607 (2000).
 - 18) Du, J., Han, Y. and Linton, R. H.: Efficacy of chlorine dioxide gas in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on apple surfaces. Food Microbiol., **20**, 583-591 (2003).

- 19) Du, W.-X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E. and Friedman, M.: Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. *J. Food Sci.*, **74**, 372-378 (2009).
- 20) Durak, M. Z., Churey, J. J. and Worobo, R. W.: Efficacy of UV, acidified sodium hypochlorite, and mild heat for decontamination of surface and infiltrated *Escherichia coli* O157:H7 on green onions and baby spinach. *J. Food Prot.*, **75**, 1198-1206 (2012).
- 21) Foegeding, P. M., Hemstapat, V. and Giesbrecht, F. G.: Chlorine dioxide inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *J. Food Sci.*, **51**, 197-201 (1986).
- 22) Francis, G. A. and O'Beirne, D.: Effects of vegetable type and antimicrobial dipping on survival and growth of *Listeria innocua* and *E. coli*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **37**, 711-718 (2002).
- 23) Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E. and Mandrell, R. E.: Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6042-6048 (2004).
- 24) Fukuzaki, S.: Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, **11**, 147-157 (2006).
- 25) 船渡川圭次, 鬼柳麗子, 秋田光洋, 大島徹, 荒井正美, 長則夫, 杉山みゆき : 生野菜の効果的な殺菌方法と中性洗剤の病原菌に及ぼす影響. *食品衛生研究*, **49**, 71-78 (1999).
- 26) Gabriel, A. A. and Nakano, H.: Effects of culture conditions on the subsequent heat inactivation of *E. coli* O157:H7 in apple juice. *Food Control*, **22**, 1456-1460 (2011).
- 27) Gündüz, G. T., Gönül, S. A. and Karapinar, M.: Efficacy of myrtle oil against *Salmonella* Typhimurium on fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.*, **130**, 147-150 (2009).

- 28) Gündüz, G. T., Gönül, S. A. and Karapinar, M.: Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. Food Control, **21**, 513-517 (2010).
- 29) Han, Y., Linton, R. H., Nielsen, S. S. and Nelson, P. E.: Reduction of *Listeria monocytogenes* on green peppers (*Capsicum annuum* L.) by gaseous and aqueous chlorine dioxide and water washing and its growth at 7°C. J. Food Prot., **64**, 1730-1738 (2001).
- 30) Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H. and Busta, F. F.: Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. Comp. Rev. Food Sci. Food Saf., **2** (Supplement), 78-141(2003).
- 31) 日高利夫, 桐ヶ谷忠司, 上條昌弥, 木川 寛, 河村太郎, 河内佐十: 次亜塩素酸ナトリウム処理野菜における残留塩素の消失とクロロホルムの生成. 日食衛誌, **33**, 267-273 (1992).
- 32) Huang, T.-S., Xu, C.-L., Walker, K., West, P., Zhang, S. and Weese, J.: Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. J. Food Sci., **7**, 134-139 (2006).
- 33) Huang, Y. and Chen, H.: Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. Food Control, **22**, 1178-1183 (2011).
- 34) Hwang, E.-H., Cash, J. N. and Zabik, M. J.: Determination of degradation products and pathways of mancozeb and ethylenethiourea (ETU) in solutions due to ozone and chlorine dioxide treatments., J. Agric. Food Chem., **51**, 1341-1346 (2003).
- 35) Izumi, H.: Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. J. Food Sci., **64**, 536-539 (1999).
- 36) 泉秀実: カット野菜の安全性と微生物制御技術. 日食微誌, **26**, 60-67 (2009).
- 37) Inatsu, Y., Bari, M. L., Kawasaki, S., Isshiki, K. and Kawamoto, S.: Efficacy of

- acidified sodium chlorine treatment in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese cabbage. *J. Food Prot.*, **68**, 251-255 (2005a).
- 38) Inatsu, Y., Bari, M. L., Kawasaki, S. and Kawamoto, S.: Effectiveness of some natural antimicrobial compounds in controlling pathogen or spoilage bacteria in lightly fermented Chinese cabbage. *J. Food Sci.*, **70**, 393-397 (2005b).
- 39) Inatsu, Y., Maeda, Y., Bari, M. L., Kawasaki, S. and Kawamoto, S.: Prewashing with acidified sodium chlorite reduces pathogenic bacteria in lightly fermented Chinese cabbage. *J. Food Prot.*, **68**, 999-1004 (2005c).
- 40) Jimenez-Villarreal, J. R., Pohlman, F. W., Johnson, Z. B. and Brown Jr, A. H.: Effects of chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride, lactic acid and trisodium phosphate on physical, chemical and sensory properties of ground beef. *Meat Science*, **65**, 1055-1062 (2003).
- 41) Joshi, S. C., Verma, A. R. and Mathela, C. S.: Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 37-40 (2010).
- 42) 川本伸一：生鮮野菜の安全確保のための微生物対策（特集 最近の食中毒事故とその対策）。*食品と開発*, **48**, 4-7 (2013).
- 43) Keskinen, L. A., Burke, A. M. and Annous, B. A.: Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.*, **132**, 134-140 (2009).
- 44) Kim, J. M., Marshall, M. R., Wen-Xian Du, Otwell, S. W. and Wei, Cheng-I.: Determination of chlorate and chlorite and mutagenicity of seafood treated with aqueous chlorine dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3586-3591 (1999).
- 45) Klaiber, R. G., Baur, S., Wolf, G., Hammes, W. P. and Carle, R.: Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6**, 351-362 (2005).

- 46) Klančnik, A., Guzej, B., Hadolin Kolar, M., Abramovič, H. and Smole Možina, S.: In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *J. Food Prot.*, **72**, 1744-1752 (2009).
- 47) Knight, K. P. and McKellar, R. C.: Influence of cinnamon and clove essential oils on the D- and z-values of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider. *J. Food Prot.*, **70**, 2089-2094 (2007).
- 48) 小林修, 多田幸代, 加藤邦和, 吉田淳, 住谷保治, 松尾佑子, 檜山圭一郎, 米虫節夫 : 次亜塩素酸ナトリウムと化学的・物理学的処理を組み合わせたキャベツ付着菌の効果的な減少. 防菌防黴, **36**, 143-151 (2008).
- 49) Kondo, N., Murata, M. and Isshiki, K.: Efficiency of sodium hypochlorite, fumaric acid, and mild heat in killing native microflora and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Staphylococcus aureus* attached to fresh-cut lettuce. *J. Food Prot.*, **69**, 323-329 (2006).
- 50) 厚生労働省 : 漬物の衛生規範の改正について (平成 25 年 12 月 13 日食安食安監発 1213第2号) (2013).
- 51) 厚生労働省医薬食品局 : 平成 24 年食中毒発生状況. 食品衛生研究, **63** (9), 76-162 (2013).
- 52) Lang, M. M., Ingham, B. H. and Ingham S. C.: Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *Int. J. Food Microbiol.*, **58**, 73-82 (2000).
- 53) Lang, M. M., Harris, L. J. and Beuchat, L. R.: Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. *J. Food Prot.*, **67**, 1092-1103 (2004).
- 54) Lee, S. Y. and Kang, D. H.: Combined effects of heat, acetic acid, and salt for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media. *Food Control*, **20**, 1006-1012 (2009).

- 55) Leistner, L.: Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.*, **25**, 151-158 (1992).
- 56) Lewis Ivey, M. L. and Miller, S. A.: Evaluation of hot water seed treatment for the control of bacteria leaf spot and bacterial canker on fresh market and processing tomatoes. *Acta Horticulturae (ISHS)*, **695**, 197-204 (2005).
- 57) Lin, C.-M., Moon, S. S., Doyle, M. P. and McWatters, K. H.: Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. *J. Food Prot.*, **65**, 1215-1220 (2002).
- 58) López-Gálvez, F., Gil, M. I., Truchado, P., Selma, M. V. and Allende, A.: Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. *Food Microbiol.*, **27**, 199-204 (2010).
- 59) Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E. and Feng, H.: Determination of free chlorine concentrations needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination during fresh-cut produce wash. *J. Food Prot.*, **74**, 352-358 (2011).
- 60) 松田敏生: ハロゲン系殺菌料. 食品微生物制御の化学, p. 64-80, 幸書房, 東京 (1998).
- 61) McDonnell, G. and Russell, A. D.: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 147-179 (1999).
- 62) 宮尾茂雄, 青木睦夫: 浅漬キャベツのシェルフライフと微生物の挙動について. 日食工誌, **25**, 327-332 (1978).
- 63) Moreira, M. R., Ponce, A. G., del Valle, C. E. and Roura, S. I.: Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Sci. Technol.*, **38**, 565-570 (2005).
- 64) Morris, C. E., Monier, J.-M. and Jacques, M.-A.: Methods of observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable

- microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1570-1576 (1997).
- 65) Murata, M., Tanaka, E., Minoura, E. and Homma, S.: Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanine ammonia-lyase activity, and improvement on sensory evaluation during storage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 501-507 (2004).
- 66) 名塚英一, 稲津康弘, Bari, M. L., 川崎晋, 宮丸雅人, 川本伸一: レタス, キャベツ及びキュウリに接種した大腸菌 O157:H7 の次亜塩素酸ナトリウム溶液による洗浄殺菌効果. *日食微誌*, **22**, 89-94 (2005).
- 67) Noss, C. I., Hauchman, F. S. and Olivieri, V. P.: Chlorine dioxide reactivity with proteins. *Wat. Res.*, **20**, 351-356 (1986).
- 68) Nou, X. and Y. Luo.: Whole-leaf wash improves chlorine efficacy for microbial reduction and prevents pathogen cross-contamination during fresh-cut lettuce processing. *J. Food Sci.*, **75**, 283-290 (2010).
- 69) 太田義雄, 高谷健市, 中川禎人: 次亜塩素酸ナトリウムによるキュウリの洗浄殺菌効果. *日食科工誌*, **42**, 661-665 (1995).
- 70) Ölmez, H. and Kretzschmar, U.: Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Sci. Technol.*, **42**, 686-693 (2009).
- 71) 小野朋子, 三宅真名, 山下光治: 非イオン界面活性剤を添加した弱酸性次亜塩素酸水の野菜に対する殺菌効果. *防菌防黴*, **33**, 257-262 (2005).
- 72) Pandrangi, S., Elwell, M. W., Anantheswaran, R. C. and LaBorde, L. F.: Efficacy of sulfuric acid scarification and disinfectant treatments in eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *J. Food Sci.*, **68**, 613-618 (2003).
- 73) Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N. and Busta, F. F.: Method to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2** (supplement), 161-173 (2003).
- 74) Rahman, S. M. E., Jin, Y. G. and Oh, D. H.: Combined effects of alkaline

- electrolyzed water and citric acid with mild heat to control microorganisms on cabbage. *J. Food Sci.*, **75**, 111-115 (2010).
- 75) Rahman, S. M. E., Jin, Y. G. and Oh, D. H.: Combination treatment of alkaline electrolyzed water and citric acid with mild heat to ensure microbial safety, shelf-life and sensory quality of shredded carrots. *Food Microbiol.*, **28**, 484-491 (2011).
- 76) Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J. and Martin-Belloso, O.: Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control*, **20**, 105-112 (2009).
- 77) Rodgers, S. L., Cash, J. N. and Siddiq, M.: A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J. Food Prot.*, **67**, 721-731 (2004).
- 78) Roura, S. I., Pereyra, L. and del Valle, C. E.: Phenylalanine ammonia lyase activity in fresh cut lettuce subjected to the combined action of heat mild shocks and chemical additives. *Food Sci. Technol.*, **41**, 919-924 (2008).
- 79) Ruiz-Cruz, S., Luo, Y., Gonzalez, R., Tao, Y. and González-Aguilar, G. A.: Acidified sodium chlorite as an alternative to chlorine to control microbial growth on shredded carrots while maintaining quality. *J. Sci. Food Agric.*, **86**, 1887-1893 (2006).
- 80) Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M.A. and González-Aguilar, G. A.: Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*, **18**, 1383-1390 (2007).
- 81) 崔海英：植物抽出液を用いた食中毒細菌の制御に関する研究。広島大学生物圏科学研究科博士論文（2010）。

- 82) Sapers, G. M., Miller, R. L., Pilizota, V. and Mattrazzo, A. M.: Antimicrobial treatments for minimally processed cantaloupe melon. *J. Food Sci.*, **66**, 345-349 (2001).
- 83) Sengun, I. Y. and Karapinar, M.: Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). *Int. J. Food Microbiol.*, **96**, 301-305 (2004).
- 84) Shin, J.-H., Chang, S. and Kang, D.-H.: Application of antimicrobial ice for reduction of foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*) on the surface of fish. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 916-922 (2004).
- 85) Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A., K. and Stroschine, R. L.: Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *Food Microbiol.*, **19**, 183-193 (2002).
- 86) Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L.: Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 118-122 (1998).
- 87) Soli, K. W., Yoshizumi, A., Motomatsu, A., Yamakawa, M., Yamasaki, M., Mishima, T., Miyaji, N., Honjoh, K. and Miyamoto, T.: Decontamination of fresh produce by the use of slightly acidic hypochlorous water following pretreatment with sucrose fatty acid ester under microbubble generation. *Food Control*, **21**, 1240-1244 (2010).
- 88) Stevens, A. A.: Reaction products of chlorine dioxide. *Environmental Health Perspectives*, **46**, 101-110 (1982).
- 89) Takeuchi, K., Matute, C. M., Hassan, A. N. and Frank, J. F.: Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *J. Food Prot.* **63**, 1433-1437 (2000).
- 90) Tassou, C. C., Drosinos, E. H. and Nychas, G. J. E.: Effects of essential oil from

- mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 593-600 (1995).
- 91) Toivonen, P. M. A., Lu, C., Delaquis, P. and Bach, S.: Slicing under chlorinated water improves the disinfection of fresh-cut romaine lettuce. *J. Food Prot.*, **74**, 2142-2147 (2011).
- 92) Tsai, G.-J. and Su, W.-H: Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, **62**, 239-243 (1999).
- 93) Tsai, L. S., Huxsoll, C. C. and Robertson, G.: Prevention of potato spoilage during storage by chlorine dioxide. *J. Food Sci.*, **66**, 472-477 (2001).
- 94) Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M. P.: Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2567-2570 (1996).
- 95) Winniczuk, P. P. and Parish, M. E.: Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against micro-organisms related to citrus juice. *Food Microbiol.*, **14**, 373-381 (1997).
- 96) 山下拓未：野菜における非加熱殺菌に関する研究。広島大学生物生産学部卒業論文 (2008)。
- 97) Yossa, N., Patel, J, Millner, P. and Lo, Y. M.: Essential oils reduce *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on spinach leaves, *J. Food Prot.*, **75**, 488-496 (2012).