

カット野菜の菌数低減に向けた付着細菌除去技術の開発

東 孝憲, 河野慎一

Development of Removal Treatments for Adherent Bacteria for Bacterial Reduction on Cut Vegetables

Takanori Azuma and Shinichi Kono

This study investigated the efficacy of the removal treatments for adherent bacteria for bacterial reduction on cut vegetables. The effectiveness of food additives on the removal of adherent bacteria was evaluated by the crystal violet staining method, using *Stenotrophomonas maltophilia* Cu1, isolated from cucumber, as a biofilm-forming indicator strain. NaClO, protamine, and polylysine significantly reduced the biofilm formation. The viable cell counts on the shredded cucumber, treated with NaClO (available chlorine concentration: 100 ppm, pH 12.0), were significantly reduced from 9.5×10^5 CFU/g to 1.3×10^4 CFU/g, after subsequent disinfection. Removal treatment with NaClO enhanced the bacterial reduction effect on the shredded cucumber, for which it has been difficult to reduce the viable cell counts, so this method could be widely applicable for other cut vegetables.

KEY-WORDS : adherent bacteria, removal treatment, bacterial reduction, cut vegetable, biofilm

キーワード : 付着細菌, 除去技術, 菌数低減, カット野菜, バイオフィーム

近年, 飲食店や給食施設, 弁当・惣菜製造施設では調理現場が省力化され, カット野菜の需要が増加している¹⁾。カット野菜など加熱工程がない食材では, 付着した細菌が生残しやすく²⁾, 流通過程での増殖リスクが高くなることから, その解決に向けた研究が必要である。

付着細菌が生残しやすい一因として, バイオフィームを形成し殺菌処理に対する抵抗性が増すことが報告されている³⁾。バイオフィームの形成は, 細菌が固体表面に可逆的に付着することに始まり, 細胞外多糖による不可逆的付着, 固体表面での細菌増殖, バイオフィームの三次元構造構築の順に行われる⁴⁾。バイオフィーム状態の細菌は, バイオフィーム内の抗菌物質の浸透・拡散が円滑に行われないことや, 浮遊状態の細菌とは異なる遺伝子発現

のため, 抗菌物質に対する抵抗性が浮遊状態の細菌よりも増していると考えられている⁵⁾。

これまで, 野菜の付着細菌の除去に関する研究は, 酵素配合洗浄剤⁶⁾ や強アルカリ性電解水^{7, 8)} を用いた方法など多数報告されている。しかし, 加工工程で付着細菌を除去し, 殺菌効果の向上につながる技術は未だ確立していない。

そこで本研究では, 非加熱殺菌技術の高度化を目指し, 殺菌効果を高める付着細菌除去技術の開発を行った。すなわち, 野菜から分離したバイオフィーム形成菌を付着指標菌として, 付着細菌除去に有効な薬剤のスクリーニングを行い, 菌数低減が難しいキュウリ⁹⁾ を対象として, 当該薬剤処理の有効性を評価した。

事業名 : 経常研究

課題名 : 非加熱殺菌技術の高度化に向けた付着細菌制御技術の開発

実験方法

1. 付着指標菌の設定

(1) 野菜からの細菌分離

供試野菜は、アスパラガス、キャベツ、キュウリ、白菜およびレタスの5種類とし、小売店または加工企業から入手した。各種野菜は、有効塩素濃度100ppmに調整した次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬株式会社）で10分間殺菌した後、10倍量の滅菌生理食塩水でストマッキングし、適宜段階希釈を行った。細菌の分離は、希釈液を標準寒天培地（日水製薬株式会社）に表面塗抹し、35°Cで48時間培養した後、形成したコロニーから形状の異なるものを釣菌することにより行った。

(2) 分離菌株の培養と菌懸濁液の調製

分離菌株は、Tryptic soy broth（以下TSB, Difco）で30°C、一晚静置培養を行った。培養液は、遠心分離（10,000×g, 5分間, 4°C）して集菌した後、上清を取り除き、ペレットを等量の滅菌生理食塩水に懸濁した。これを2度繰り返し、菌懸濁液として試験に供した。

(3) クリスタルバイオレット（CV）法によるバイオフィーム形成能の評価

バイオフィーム量の測定は、O'Tooleらの方法¹⁰⁾を参考に行った。すなわち、96穴マイクロタイタープレート（AGCテクノグラス）のウェルに各種菌懸濁液を0.1%接種したTSBを200μL分注し、30°Cで24時間静置培養した。培養後、ウェル内の培養液を取り除き、脱イオン水250μLで2回洗浄した。これを55°Cで20分間乾燥した後、ウェルに0.1% CV溶液250μLを添加した。15分間静置してバイオフィームを染色した後、溶液を取り除き、滅菌水400μLでウェルを2回洗浄した。洗浄したプレートは、55°Cで20分間乾燥した後、ウェルに99.5%エタノールを300μLを添加し、15分間抽出した。各ウェルの抽出液200μLを新たな96穴マイクロタイタープレートに移し、プレートリーダー（パワースキャンHT, DSファーマバイオメディカル株式会社）を用いて、595nmにおける吸光値（ABS595）を測定した。バイオフィーム形成能の評価は、ABS595をバイオフィーム量の指標とし¹¹⁾、ABS595>0.20をバイオフィーム形成能がある菌株と判断した。試験は、3反復で実施した。

(4) バイオフィーム形成菌株の同定

バイオフィームを形成した分離菌株について同定を行った。同定は、16SrDNAの5'末端から約500bpの塩基配列を決定し、NCBIのNucleotide BLASTにより相同性の高い属種名を推定した。なお、最もバイオフィーム形成量

の高い菌株は、付着指標菌として以後の試験に供した。

2. 付着細菌除去に有効な薬剤のスクリーニング

(1) 薬剤の調製

スクリーニングには、20種類の薬剤を使用した。界面活性剤として、炭素数12, 14および18のポリグリセリン脂肪酸エステル（以下C12PG, C14PG, C18PG）、炭素数10のジグリセリン脂肪酸エステル（以下C10DG）、炭素数8, 10および12のモノグリセリン脂肪酸エステル（以下C8MG, C10MG, C12MG）、炭素数12のショ糖脂肪酸エステル（以下C12SE）を使用した。グリセリン脂肪酸エステルは太陽化学株式会社製、ショ糖脂肪酸エステルは三菱ケミカルフーズ株式会社製を用いた。また、市販の野菜洗浄用の界面活性剤として、製剤A（太陽化学株式会社）、製剤B（三菱ケミカルフーズ株式会社）および製剤C（ライオンハイジーン株式会社）を用いた。食品添加物として、次亜塩素酸水、次亜塩素酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム（和光純薬株式会社）、過酢酸製剤（小津産業株式会社）、貝殻焼成カルシウム（主成分：Ca(OH)₂、北海道石灰化工株式会社）、プロタミン（上野製薬株式会社）およびポリリジン（チッソ株式会社）を使用した。次亜塩素酸水は、電解水生成装置（SUPER OXSEED LABO, アマノメンテナンスエンジニアリング株式会社）を用いて0.2%食塩水を電気分解することにより調製した強酸性次亜塩素酸水を用いた。次亜塩素酸ナトリウムは、必要に応じてpH9.0-12.0の0.02Mリン酸緩衝液でpH調整を行った。

(2) 付着細菌除去に有効な薬剤のスクリーニング

試験方法1.(2)と同様に、96穴マイクロタイタープレートのウェルに付着指標菌懸濁液を0.1%接種したTSBを200μL分注し、30°Cで24時間静置培養した。培養後、ウェルから培養液を取り除き、脱イオン水で2回洗浄後、55°Cで20分間乾燥した。これに各種薬剤200μLを分注し、振盪機（E-36, タイテック株式会社）で10分間処理した。振盪後は、試験方法1.(3)と同様に、薬剤溶液を取り除き、脱イオン水洗浄、乾燥、CV染色およびエタノール抽出を行い、残存するバイオフィーム量を測定した。なお、薬剤に脱イオン水を用いた区を対照区とし、対照区と各薬剤処理後のバイオフィーム量を比較し、対照区よりも5%水準で有意に減少した薬剤を付着細菌除去に有効な薬剤として選定した。試験は、4反復以上実施した。

3. 付着細菌除去技術の菌数低減効果の検証

(1) 付着細菌除去に有効な薬剤処理が野菜の非加熱殺菌効果に及ぼす影響

対象には、野菜の中でも菌数低減が難しいキュウリを

用いた。キュウリは、両端を切り取り、5等分に切断し、試料として用いた。選定した薬剤は、適宜濃度およびpH調整し、試験に供した。キュウリ試料は、各種薬剤200mLに浸漬し、130rpmで10分間振盪した後、水道水で2回洗浄した。これを次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度100ppm, pH6.0）200mLに浸漬し、130rpmで10分間振盪することにより殺菌した後、水道水で2回洗浄した。キュウリの一般生菌数は、標準寒天培地を用いた表面塗抹法（35℃, 48時間）により測定した。なお、洗浄に脱イオン水を用いた区を対照区とし試験は、8反復で実施した。

(2) キュウリの色調および物性評価

試験方法3. (1)と同様に処理したキュウリを用いた。

色調評価は、色彩色差計（CR-300, コニカミノルタジャパン株式会社）でL*a*b*を測定することにより行った。物性評価は、2cm厚で輪切りにしたキュウリを用い、クリーブメーター（RE2-33005S, 株式会社山電）で破断応力を測定することにより行った。測定は、円柱型プランジャー（φ3mm）を用い、移動速度1mm/秒で行った。なお、色調測定は7ヶ所、物性測定は15反復実施した。

実験結果および考察

1. 付着指標菌の設定

次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌したアスパラガス、キャベツ、キュウリ、白菜およびレタスの5種類の野菜

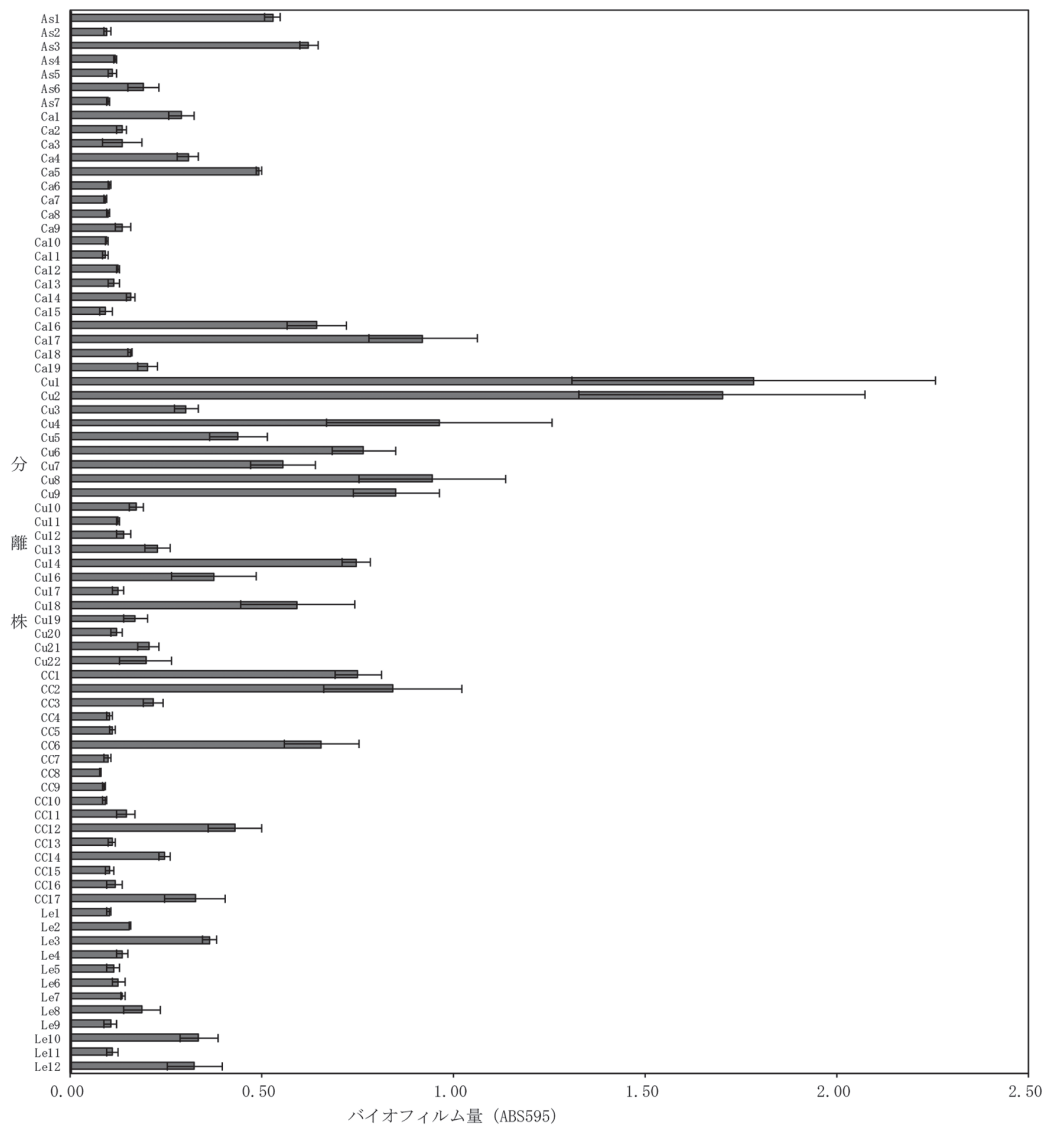


図1 各種野菜から分離した細菌のバイオフィルム形成量

エラーバーは標準誤差を示す。

As1-7はアスパラガス, Ca1-19はキャベツ, Cu1-14およびCu16-22はキュウリ, CC1-17は白菜, Le1-12はレタス由来の分離株を示す。

から各々7株 (As1-7), 19株 (Ca1-19), 21株 (Cu1-14, 16-22), 17株 (CC1-17) および12株 (Le1-12) の計76株を分離した。図1に分離株をTSBで24時間培養したときのバイオフィーム形成量を示した。バイオフィーム量がABS595>0.20となるバイオフィーム形成菌株は、分離した76株のうち32株であり、分離株全体の約40%であった。

バイオフィームを形成した菌株の同定結果を表1に示した。殺菌した野菜から分離したバイオフィーム形成菌株の主体はグラム陰性菌であり、*Stenotrophomonas*属や*Pseudomonas*属などのブドウ糖非発酵菌 (non fermenting gram negative bacilli, 以下NFGNB) であった。NFGNBは、栄養要求性が低く、栄養分の乏しい環境でも増殖可能であるため、水や土壌など自然界に広く分布しており、野菜からの分離例も報告されている¹²⁾。横山は、5種類の野菜を用いたサラダについて、加工工程毎の細菌叢を調査した結果、殺菌前後においてNFGNBが優勢であることを報告しており¹³⁾、本研究においても同様の結果が得られた。

分離したバイオフィーム形成菌株のうち、最もバイオ

表1 各種野菜から分離したバイオフィーム形成細菌

分離株	野菜	属種
As1	アスパラガス	<i>Serratia plymuthica</i>
As3	アスパラガス	<i>Pseudomonas veronii</i>
Ca1	キャベツ	<i>Achromobacter sp.</i>
Ca4	キャベツ	Not identify
Ca5	キャベツ	<i>Pseudomonas putida</i>
Ca16	キャベツ	<i>Pseudomonas koreensis</i>
Ca17	キャベツ	<i>Pseudomonas koreensis</i>
Ca19	キャベツ	<i>Rahnella sp.</i>
Cu1	キュウリ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Cu2	キュウリ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Cu3	キュウリ	<i>Enterobacter cloacae</i>
Cu4	キュウリ	<i>Pseudomonas putida</i>
Cu5	キュウリ	<i>Enterobacter cloacae</i>
Cu6	キュウリ	<i>Pseudomonas putida</i>
Cu7	キュウリ	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
Cu8	キュウリ	<i>Pseudomonas putida</i>
Cu9	キュウリ	<i>Pseudomonas putida</i>
Cu13	キュウリ	<i>Pantoea agglomerans</i>
Cu14	キュウリ	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
Cu16	キュウリ	<i>Pseudomonas putida</i>
Cu18	キュウリ	Not identify
Cu21	キュウリ	<i>Chryseobacterium sp.</i>
CC1	白菜	<i>Pseudomonas sp.</i>
CC2	白菜	<i>Pseudomonas sp.</i>
CC3	白菜	<i>Acidovorax wautersii</i>
CC6	白菜	<i>Pseudomonas sp.</i>
CC12	白菜	<i>Delftia acidovorans</i>
CC14	白菜	<i>Agrobacterium sp.</i>
CC17	白菜	<i>Agrobacterium sp.</i>
Le3	レタス	<i>Rahnella aquatilis</i>
Le10	レタス	<i>Pantoea agglomerans</i>
Le12	レタス	<i>Pseudomonas poae</i>

フィルム形成量の多い菌株は、*Stenotrophomonas maltophilia* Cu1であった。したがって、本菌株を付着指標菌として、以後の試験に用いた。

2. 付着細菌除去に有効な薬剤のスクリーニング

表2に、付着指標菌のバイオフィームを界面活性剤で処理したときの残存バイオフィーム量を示した。その結果、界面活性剤を用いた処理は、炭素数や種類によらず、対照区である脱イオン水処理に対して、5%水準で有意差は認められなかった。すなわち界面活性剤処理は、バイオフィーム除去効果がないことが示唆された。

野菜の洗浄には、汚れや付着細菌の除去を目的としてポリグリセリン脂肪酸エステルやショ糖脂肪酸エステルなど界面活性剤が使用される。しかし、磯部は、界面活性剤による洗浄は、日持ち向上につながる除菌効果が得られないことを報告している⁶⁾。本研究においても、使用した界面活性剤は、いずれもバイオフィーム除去効果が認められなかったことから、過去の知見を支持するものであった。

表3に、付着指標菌のバイオフィームを各種食品添加物で処理したときの残存バイオフィーム量を示した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム、プロタミンおよびポリリジンの3種類の食品添加物でバイオフィーム除去効果が認められ、有効塩素濃度100ppmの次亜塩素酸ナトリウム、125ppmのプロタミンおよびポリリジンで処理した場合の残存バイオフィーム量は、各々対照区の約1/2, 1/15および1/25となった。アルギニンを中心とする塩基性タンパク質であるプロタミンおよび塩基性アミノ酸のポリマーであるポリリジンは、共に水溶液中で正に荷電して

表2 各種界面活性剤がバイオフィーム量に及ぼす影響

界面活性剤	バイオフィーム量 (ABS595)	
対照区	1.38 ± 0.17	
C12PG	1.05 ± 0.02	n.s.
C14PG	1.56 ± 0.07	n.s.
C18PG	1.29 ± 0.10	n.s.
C8MG	1.33 ± 0.03	n.s.
C10MG	1.02 ± 0.02	n.s.
C12MG	1.65 ± 0.13	n.s.
C10DG	1.43 ± 0.11	n.s.
C12SE	1.41 ± 0.06	n.s.
製剤A	1.49 ± 0.13	n.s.
製剤B	1.40 ± 0.11	n.s.
製剤C	1.65 ± 0.15	n.s.

各種薬剤の濃度は2,000ppmとした。

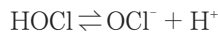
対照区は脱イオン水を用いた。

バイオフィーム量は、平均値±標準誤差を示す。

n.s. は対照区と比較して、5%水準で有意差がないことを示す (Dunnett法)。

おり、カチオン性界面活性剤としての性質を有する^{14, 15)}。一般に細菌表面は、負に荷電しているため、これら薬剤は電氣的に吸着すると考えられている。本研究におけるバイオフィーム除去メカニズムは明らかではないが、これら薬剤の細菌表面への吸着によるバイオフィーム構造の脆弱化や二分子膜形成による静電的反発力の増加に起因すると推察される。

次亜塩素酸ナトリウムは、殺菌剤として野菜の非加熱殺菌に広く用いられる薬剤である。次亜塩素酸ナトリウムの水溶液は、非解離型の次亜塩素酸 (HOCl) と次亜塩素酸イオン (OCl⁻) の間に次式の解離平衡が存在する (解離定数: pKa=7.5, 25°C)。



分子量あたりの殺菌力はOCl⁻よりもHOClの方が強い¹⁶⁾ため、殺菌効果は、HOCl比率が高い弱酸性領域 (pH4-6) で高まる¹⁶⁾。一方、次亜塩素酸ナトリウムは、洗浄効果を有することも知られており、福崎らは、セラミックスに付着した有機物や微生物の除去効果は、OCl⁻濃度に依存して増加することを報告している¹⁷⁾。

そこで、次亜塩素酸ナトリウムの濃度およびpHがバ

表3 各種食品添加物がバイオフィーム量に及ぼす影響

食品添加物	濃度 (ppm)	バイオフィーム量 (ABS595)	
対照区	-	1.26 ± 0.06	
強酸性次亜塩素酸水	40 *	0.80 ± 0.03	n.s.
次亜塩素酸ナトリウム	100 *	0.55 ± 0.04	**
亜塩素酸ナトリウム	100	1.02 ± 0.01	n.s.
炭酸水素ナトリウム	2000	1.14 ± 0.02	n.s.
炭酸ナトリウム	2000	1.59 ± 0.09	n.s.
過酢酸	80	1.00 ± 0.02	n.s.
貝殻焼成カルシウム	2000	1.81 ± 0.28	n.s.
プロタミン	125	0.10 ± 0.01	***
	2000	0.09 ± 0.00	***
ポリリジン	125	0.06 ± 0.00	***
	2000	0.05 ± 0.00	***

対照区は脱イオン水を用いた。

*は有効塩素を示す。

バイオフィーム量は平均値±標準誤差を示す。

*, **および***は、それぞれ対照区に対し、5%、1%および0.1%で有意であり、n.s.は5%水準で有意でないことを示す (Dunnnett法)。

バイオフィーム除去に及ぼす影響の検討を行った。図2に有効塩素濃度の異なる次亜塩素酸ナトリウムで処理したときのpHと残存バイオフィーム量の関係を示した。有効

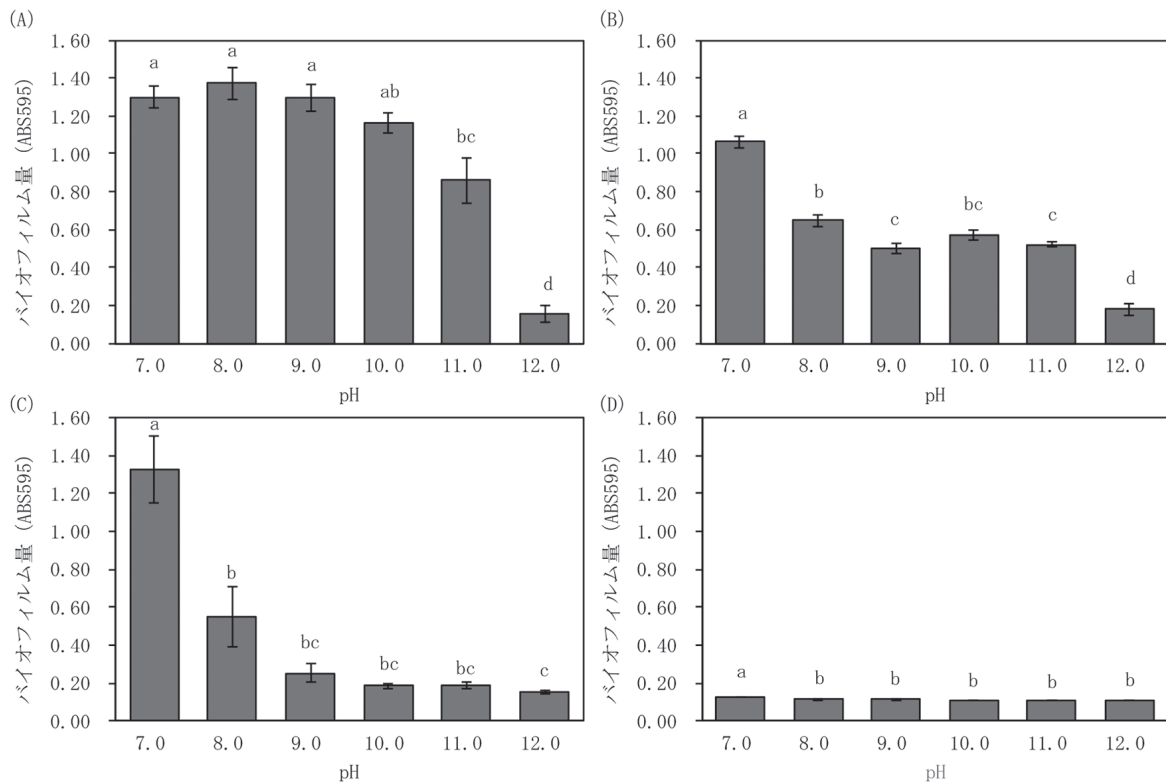


図2 次亜塩素酸ナトリウムの濃度およびpHがバイオフィーム量に及ぼす影響

有効塩素濃度は、(A), 0ppm; (B), 100ppm; (C), 200ppm; (D), 400ppmとした。

エラーバーは標準誤差を示す。

同一アルファベット間には5%水準で有意差がないことを示す (Tukey法)。

塩素を含まない場合、pH7.0-10.0では、除去効果は認められず、pH11.0以上の強アルカリ条件で残存バイオフィルム量が顕著に低下した。一方、有効塩素濃度100ppmおよび200ppmの次亜塩素酸ナトリウムはpH8.0以上、400ppmではpH7.0以上でバイオフィルム量が減少し、温和なアルカリ条件においてもバイオフィルムが除去された。したがって、バイオフィルム除去効果の主体は、殺菌効果の高いHOClではなく、洗浄力を有するOCIであることが示唆された。

以上の結果から、バイオフィルム除去効果が認められた次亜塩素酸ナトリウム、プロタミンおよびポリリジンに付着細菌の除去に有効な薬剤として選定した。

3. 付着細菌除去技術の菌数低減効果の検証

次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度100ppm, pH12.0または200ppm, pH9.0）、プロタミン（125ppm）およびポリリジン（125ppm）でキュウリを処理したときの一般生菌数を図3に示した。無処理区および脱イオン水で処

理した対照区のキュウリの一般生菌数は、各々 9.5×10^5 CFU/g および 1.9×10^5 CFU/g であった。各種薬剤処理後のキュウリの一般生菌数は、 8.2×10^4 - 2.5×10^5 CFU/g となり、全ての試験区において対照区と5%水準で有意差は認められなかった。

薬剤処理後、有効塩素濃度100ppmの次亜塩素酸ナトリウム（pH6.0）で殺菌したキュウリの一般生菌数を図4に、色調および破断応力を表4に示した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度100ppm, pH12.0）で処理後に殺菌したキュウリの一般生菌数は、 1.3×10^4 CFU/g に減少し、脱イオン水で処理した対照区と5%水準で有意差が認められた。また、キュウリの色調および物性は、いずれの試験区においても対照区と5%水準で有意差は認められず、各種薬剤処理が品質に影響を及ぼさないことが明らかになった。

浦野らは、セラミックス表面に吸着したタンパク質汚れ（BSA）を対象として、pH調整した次亜塩素酸ナトリウ

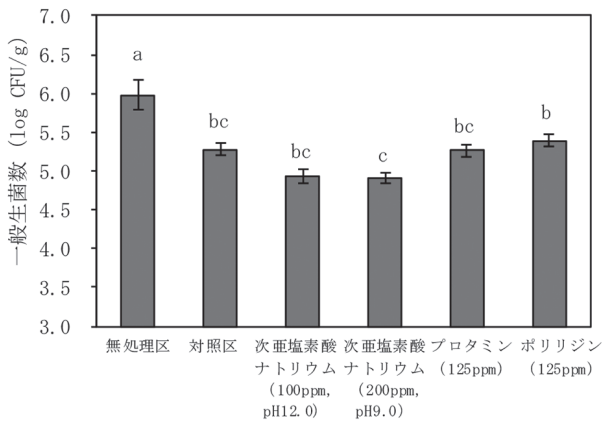


図3 各種薬剤処理したキュウリの一般生菌数

対照区は、脱イオン水を用いた。エラーバーは、標準誤差を示す。同一アルファベット間には、5%水準で有意差がないことを示す (Tukey法)。

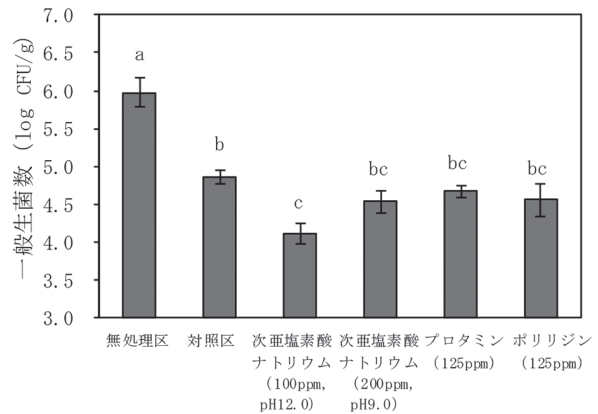


図4 各種薬剤処理後に次亜塩素酸ナトリウム殺菌したキュウリの一般生菌数

対照区は脱イオン水を用い、殺菌は有効塩素100ppm, pH6.0に調整した次亜塩素酸ナトリウムを用いた。エラーバーは、標準誤差を示す。同一アルファベット間には、5%水準で有意差がないことを示す (Tukey法)。

表4 各種薬剤処理後に次亜塩素酸ナトリウム殺菌したキュウリの色調および破断応力

試験区	L*	色調		破断応力 (Pa)
		a*	b*	
対照区	35.8 ± 1.0	-12.9 ± 0.5	15.4 ± 0.9	3.1 ± 0.3 × 10 ⁵
次亜塩素酸ナトリウム (200ppm, pH12.0)	35.5 ± 1.1	n.s. -13.7 ± 0.9	n.s. 16.1 ± 1.3	2.7 ± 0.4 × 10 ⁵ n.s.
次亜塩素酸ナトリウム (200ppm, pH9.0)	33.6 ± 1.1	n.s. -12.8 ± 0.7	n.s. 14.7 ± 1.0	2.4 ± 0.4 × 10 ⁵ n.s.
プロタミン (125ppm)	35.4 ± 1.0	n.s. -14.5 ± 0.7	n.s. 17.7 ± 1.3	3.0 ± 0.4 × 10 ⁵ n.s.
ポリリジン (125ppm)	34.9 ± 1.0	n.s. -13.7 ± 1.1	n.s. 16.5 ± 1.7	3.0 ± 0.3 × 10 ⁵ n.s.

対照区は脱イオン水を用い、殺菌は有効塩素100ppm, pH6.0に調整した次亜塩素酸ナトリウムを用いた。対照区は、洗浄に脱イオン水を用いた。数値は、平均値±標準誤差を示す。n.s. は、対照区と比較して、5%水準で有意差がないことを示す (Dunnnett法)。

ムによる洗浄効果を評価した結果、BSAの除去量は、pHの増加に伴い増加したことを報告している¹⁸⁾。BSA除去量の増加は、高pH条件でBSA分子が膨潤し、有効塩素が分子内部へ拡散し易くなることにより、有効塩素と構成アミノ酸の反応性が向上し、BSAの分解が促進されることに起因すると推察している。

本研究においても同様に、キュウリを高pHの次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度100ppm, pH12.0）で処理することにより、汚れやバイオフィーム成分が分解除去され、殺菌時の次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素が付着細菌に接触しやすい状態となったため、殺菌効果が向上したと考えられた。

次亜塩素酸ナトリウムの付着細菌除去効果は、OCIが効果の主体であると推察されることから、有機物の接触などにより効果が低下すると考えられる。したがって、カット野菜などの製造工程に適用する場合は、図5に示した通り、有機物などの汚れを除去した後に、高pHの次亜塩素酸ナトリウム処理を行うことが望ましい。

カット野菜に対する法的な衛生管理基準はないが、青果物カット事業協会の自主基準では 10^5 CFU/g以下の流通を推奨している¹⁹⁾。したがって、洗浄殺菌工程において、できる限り菌数を低減することが必要である。製造企業の多くは、殺菌に有効塩素濃度100-200ppmの次亜塩素酸ナトリウムを使用している²⁾。しかし、菌数の低減が困難な野菜であるキュウリを対象とした場合、図4に示した通り、有効塩素濃度100ppmの次亜塩素酸ナトリウム処理で安定的に 10^5 CFU/g以下とすることは難しい。また、

高濃度の有効塩素では、変質や塩素臭の残存が問題となる。本研究で開発した非加熱殺菌効果をも高める付着細菌除去技術である高pHの次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度100ppm, pH12.0）処理は、殺菌後の色調や物性に影響を及ぼすことなく、一般生菌数を 10^5 CFU/g以下に低減した。以上のことから、本技術は、野菜の中でも菌数低減が難しいキュウリに対して有効であったことから、他の野菜に対しても広く応用可能な技術であると考えられる。

要 約

カット野菜の菌数低減に有効な付着細菌除去技術を開発した。キュウリ由来の*S. maltophilia* Cu1株を付着指標菌とし、20種類の薬剤についてマイクロプレートを付着対象としたスクリーニング試験を実施した結果、次亜塩素酸ナトリウム、プロタミンおよびポリリジンが高いバイオフィーム除去効果を示した。また、キュウリを対象として、これら薬剤の菌数低減効果を検証した結果、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度100ppm, pH12.0）処理後に殺菌した一般生菌数は、脱イオン水で処理した対照区と5%水準で有意差が認められ、高い菌数低減効果を示した。本技術は、野菜の中でも菌数低減が難しいキュウリに対して有効であったことから、他の野菜に対しても広く応用可能な技術であると考えられる。

文 献

- 1) 独立行政法人農畜産業振興機構 (2015). 「平成27年度惣菜用野菜の需要構造実態調査報告書」.
- 2) 稲津康弘 (2008). 生鮮食材の微生物危害要因, 「フレッシュ食品の高品質殺菌技術」, 第1版, サイエンスフォーラム, 千葉, pp.37-50.
- 3) 土戸哲明 (2000). 付着細菌とバイオフィームの薬剤・熱抵抗性と食品における制御. 防菌防黴, **10**, 623-633.
- 4) Coughlan, LM., Cotter, PD., Hill, C., and Alvarez-Ordóñez, A. (2016) New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (Bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.*, **7**, 1641.
- 5) Stewart, PS., and Costerton, JW. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.*, **358**, 135-138.
- 6) 磯部賢治 (2001). 食品の洗浄と除菌. 防菌防黴, **29**, 567-577.



図5 高pHの次亜塩素酸ナトリウムを用いた付着細菌除去技術のカット野菜製造工程への応用

- 7) 小関成樹, 伊藤和彦 (2000). カット野菜の電解水殺菌における強アルカリ性電解水の前処理効果. 日本食品科学工学会誌, **47**, 907-913.
- 8) 小関成樹, 伊藤和彦 (2000). 電解水によるカット野菜の洗浄・殺菌における物理的補助手段の併用効果. 日本食品科学工学会誌, **47**, 914-918.
- 9) 小関成樹, 伊藤和彦 (2000). 強酸性電解水を用いたカット野菜の殺菌. 日本食品科学工学会誌, **47**, 722-726.
- 10) O'Toole, GA., Pratt, LA., Watnick, PI., Newman, DK., Weaver, VB., and Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.*, **310**, 91-109.
- 11) Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., and Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 381-386.
- 12) Oie, S., Kiyonaga, H., Matsuzaka, Y., Maeda, K., Masuda, Y., Tasaka, K., Aritomi, S., Yamashita, A., and Kamiya, A. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and their disinfection. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1902-1905.
- 13) 横山佳子 (2013). 野菜サラダ加工過程における細菌叢の変化に関する検討. 日本食生活学会誌, **24**, 21-27.
- 14) 西則雄 (1989). プロタミンの抗菌性について. 高分子, **38**, 217.
- 15) 新藤徹 (2000). ポリアミノ酸 (食品保存料). 高分子, **49**, 384.
- 16) 福崎智司 (2010). 次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄・殺菌操作の理論と実際. 調理食品と技術, **16**, 1-14.
- 17) Fukuzaki, S., Urano, H., and Yamada, S. (2007). Effect of pH on the efficacy of sodium hypochlorite solution as cleaning and bactericidal agents. *J. Surf. Finish. Soc. Jpn.*, **58**, 465-469.
- 18) Urano, H., and Fukuzaki, S. (2005). The mode of action of sodium hypochlorite in the cleaning process. *Biocontrol Sci.*, **10**, 21-29.
- 19) 山下市二 (1996). 生鮮食品, 「食品の腐敗変敗防止対策ハンドブック」, 第1版, サイエンスフォーラム, 千葉, pp.203-209.