電解水によるカットネギの殺菌処理および 共焦点蛍光レーザー顕微鏡による表面観察[†]

吉田恭一郎[§], 阿知波信夫, 片寄政彦, 木澤由美子, 小関成樹*,
五十部誠一郎*, 阿部一博**

ホシザキ電機株式会社

* 食品総合研究所

** 大阪府立大学大学院

Decontamination of Pre-cut Green Onion Using Electrolyzed Water and
Observations of Its Surface by Confocal Scanning Laser Microscope
(Enhancement of Sterilization Effect on Pre-cut Vegetable
Using Electrolyzed Water Part I)

Kyoichiro Yoshida[§], Nobuo Achiwa, Masahiko Katayose, Yumiko Kizawa,
Shigenobu Koseki*, Seiichiro Isobe* and Kazuhiro Abe**

Hoshizaki Electric Co., Ltd., 3-16, Minamiyakata, Sakae-cho, Toyoake-shi, Aichi 470-1194

* National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tukuba-shi, Ibaraki 305-8642

** Osaka Prefecture University, 1-1, Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 599-8531

Foodborne diseases caused by microorganisms occur with numerous incidents and patients every year. It is believed that most of the incidents are caused by cross-contamination of microbes at the stage of food processing. In this research, we studied about microorganism control by using electrolyzed water for pre-cut vegetable. We carried out studies as follows; observation of microorganism's behavior on food surface with confocal scanning laser microscope, consideration of decontamination effect by using alkaline electrolyzed water, and utilization of treatment temperature variation. Difference in diminution of available chlorine concentration was found depending on treatment part of green onion. On grounds of available chlorine concentration, volume of treatment water, decontamination effect, and simplified operation, it could be concluded that soaking for 2 minutes in acidic electrolyzed water was the optimum condition in this case. Decontamination on green onion using alkaline electrolyzed water as pre-cleaning was also found useful. According to the result of confocal microscopy of lettuce surface, it was revealed that numerous microbes existed in parts with structural change such as stomas and bounds of plant cells. Therefore, it was considered that no significant sterilization effect was accomplished because it was difficult to expose microbes to electrolyzed water. Similarly, numerous microorganisms were observed in parts of green onion with irregular surfaces. We also found that the clump of microbes had thickness and penetrated into cells of green onion in some depth. It was considered that it is difficult to achieve sterilization effect against microbes existing in inaccessible parts, such as stomas and damaged cells.

(Received Jul. 14, 2004 ; Accepted Mar. 11, 2005)

近年、食の安全に対する人々の関心が非常に高まっている。しかしながら、食の安全と言っても様々な側面があり、生産・加工・流通・消費の各段階における安全を確保することが必要となる。その中でも微生物による汚染が引き起

こす食中毒事故は発生件数、患者数ともに例年多数発生している¹⁾。それら食品の微生物汚染の多くは交差汚染など加工段階によって生じていると考えられるため、本研究では、加熱殺菌処理のできない食品としてカット野菜に着目し、その加工段階における菌数制御に関して電解水を使用した場合について検討した。著者らはこれまでも電解水を使用した食品等の殺菌に関する報告を行っており、対象食材の選択や使用方法の工夫等が安定した効果を得るために

[†] 電解水によるカット野菜の殺菌処理の高度化 (第1報)

〒470-1194 豊田市栄町南館 3-16

* 〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12

** 〒599-8531 大阪府堺市学園町 1-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), yoshida-kyoichiro@hoshizaki.co.jp

は重要であることを明らかにした^{2)~4)}。本報告では、電解水による殺菌処理を高度化させるべく共焦点レーザー顕微鏡による微生物挙動の観察、前処理としての強アルカリ性電解水の併用や加温効果等を利用した検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 電解水生成装置

電解水生成装置にはホシザキ電機製 ROX-20TA を使用した。本装置は水道直結式（流水式）で、強酸性電解水（AcEW）および強アルカリ性電解水（AlEW）をそれぞれ 2 L/min で生成する。電解質には NaCl を使用し、電解電流値と電圧を調整して、pH 2.7、有効塩素濃度 30~50 ppm に調整した強酸性電解水と pH 11.3 に調整した強アルカリ性電解水を用いた。pH の測定は pH メーター（HORIBA 製、D-22）、有効塩素濃度の測定は DPD 吸光光度法（HACH 製、POCKET COLORIMETER）にて行った。

2. 供試カット野菜

愛知県豊明市内のスーパーにて市販の長ネギを購入し、上部 10 cm および下部 10 cm を切り落とした後、スライサー（シンガー・ハッピー・ジャパン製、OHC-50）により約 2 mm 幅の小口切りとして供試した。

3. 測定項目および方法

(1) 部位別の有効塩素濃度消失量および処理方法と殺菌効果

(i) 強酸性電解水の殺菌効果を確保するためには、有効塩素濃度の保持が重要であるため、ネギを浸漬処理したときの有効塩素濃度の低下挙動を調べた。ネギは、上部 10 cm および下部 10 cm を切り落とした後、部位分けするために下部から 15 cm 間隔にカットしてから小口切りし、サンプルとした。各サンプル 10 g を室温にてビーカー中で強酸性電解水（50, 100, 200, 500, 1000 mL）で 5 分間浸漬処理もしくは強酸性電解水（100, 200, 500 mL）で 2 分間浸漬処理したときの有効塩素濃度の変化を測定した。

(ii) 最適な処理方法と処理水量を検討するために、小口切りしたネギ 10 g をビーカーに入れ、各種の処理水を用いて静置の状態に浸漬処理した。処理水には、水道水、

強酸性電解水、次亜塩素酸ナトリウム（pH 9.5、有効塩素濃度 200 ppm）を用いた。強酸性電解水については強アルカリ性電解水との併用効果も検討した。すなわち、まず 200 mL の強アルカリ性電解水による 5 分間の浸漬処理後、液を排出し、新たに 200 mL の強酸性電解水を加え 5 分間の処理を行った。なお、このような連続操作については以後「→」を用いて表す。これら一連の実験は、500 mL の液量についても同様に行い、処理液量が殺菌効果へ及ぼす影響も検討した。生菌数測定は、処理が終了したサンプルをストマッカーにて粉碎し、希釈段階ごとに一般生菌数は標準寒天培地（ニッスイ）、大腸菌群数はデゾキシコレート培地（ニッスイ）でそれぞれ 37℃、48 時間培養後に形成されたコロニーをカウントし生菌数とした。以後、同様な方法で生菌数測定を行った。

(iii) (i) の結果をもとに加温効果を利用した処理方法と処理時間を変化させたときに殺菌効果へ及ぼす影響を検討した。処理区は、5℃ に冷却した水道水 10 分、流水処理として強酸性電解水を 2 L/min でビーカーからオーバーフローさせる処理 10 分、5℃ に冷却した強酸性電解水（以後、冷強酸性電解水）10 分（攪拌あり、なし）、50℃ に加温した強アルカリ性電解水（以後、温強アルカリ性電解水）（1, 5 分）（攪拌あり、なし）→冷強酸性電解水（2, 5 分）（攪拌あり、なし）、次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm, 10 分とした。なお、すべての処理区において供試材料はこれまでと同様にネギ 10 g、処理水量は 500 mL（流水処理区は除く）とし、攪拌処理はスターラーにより緩やかに行った。

(2) 共焦点蛍光レーザー顕微鏡による表面観察

共焦点レーザー顕微鏡（Nikon 製、DIGITAL ECLIPSE C1）を用いて付着状態を観察した。観察部位としては、小売店で購入した市販のレタスの外葉 2~3 枚と芯を除去したのち、レタス葉の内側（無処理および 10 g を強酸性電解水 500 mL に 5 分間浸漬）、(1) (iii) と同様の方法で長ネギの下部（白い部分）および上部（緑の部分）の無処理、温強アルカリ性電解水 1 分→冷強酸性電解水 2 分浸漬したサンプルをそれぞれ供試した。また、染色は Molecular Probe, L-7007 を用いて、約 5×5 mm にメスで切り取った各サンプル小片を暗所で 20 分間染色した。

表 1 処理水量と残留塩素濃度の関係（左：5 分浸漬、右：2 分浸漬）

ネギ下部からの長さ (cm)	処理水量 (mL)					ネギ下部からの長さ (cm)	処理水量 (mL)		
	50	100	200	500	1000		100	200	500
10~25	0.0	0.1	0.1	0.7	6.0	10~25	0.1	0.1	10.1
25~40	0.0	0.1	0.0	1.7	6.5	25~40	0.1	0.1	10.3
40~55	0.0	0.2	0.0	1.4	6.3	40~55	0.1	0.4	7.5
全体	0.0	0.1	0.0	1.4	8.1	全体	0.1	0.2	3.2

単位 (ppm)

単位 (ppm)

図 1 処理水の違いによる殺菌効果の比較 (処理水量 200 mL)

処理区：無処理，水道水処理 5 分，AcEW 処理 5 分，AIEW 処理 2.5 分→AcEW 処理 2.5 分，NaOCl 処理 5 分

図 2 処理水の違いによる殺菌効果の比較 (処理水量 500 mL)

処理区：無処理，水道水処理 5 分，AcEW 処理 5 分，AIEW 処理 2.5 分→AcEW 処理 2.5 分，NaOCl 処理 5 分

実験結果および考察

1. 部位別の有効塩素濃度消失量および処理方法と殺菌効果

カットしたネギの部位別に処理水量と処理時間を変化させたときの有効塩素濃度の変化を測定した結果を表 1 に示す。表 1 より，長ネギの上端および下端の 10 cm を除去したネギを各部位ごとに強酸性電解水に浸漬したときの有効塩素濃度の残存量を測定した結果，5 分間浸漬において最も消失の早いネギ下部 10 g を処理する場合には 1000 mL 以上の処理水が必要であることが明らかとなった。また，部位の違いによって有効塩素の消失量に違いが認められた。同様に，部位別に 2 分間浸漬したときの有効塩素濃度を測定した結果，500 mL 必要であることが明らかとなった。有効塩素濃度を維持するためには，2 分程度の浸漬処理であれば 500 mL，5 分程度の浸漬処理では 1000 mL と処理時間を長くするほど，被殺菌対象物（菌体や食品等の有機物）によって有効塩素が消費されるため，処理水量も多くする必要があると考えられた。

次に，処理方法と処理水量について検討した結果を図 1，2 に示す。図 1 より，処理水量が 200 mL では全体的に低い殺菌効果となった。殺菌効果を得るためには 200 mL では不足していると考えられたため，図 2 に 500 mL の水量で処理したときの殺菌効果について示す。その結果，強アルカリ性電解水で前処理した後，強酸性電解水で処理した場合が最も高い殺菌効果を示した。次亜塩素酸ナトリウム処理に関しては処理水量 200 mL と比較して 500 mL もほとんど違いが見られず，次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm で 5 分間処理という条件では，処理水量 200 mL を 500 mL に変化させても殺菌効果に大きな違いはないという結果となった。これは，強酸性電解水と次亜塩素酸ナトリウムでは含有する有効塩素濃度や pH の違いによる有効塩素の反応性が異なり，強酸性電解水の場合には反応性が高い次亜塩素酸が有機物と接触し速やかに消失してしまうためと考えられた。

さらに，一般的にカット野菜加工工程では野菜の品温を低く保つ目的でチラー水を利用するため，冷却した水道水や強酸性電解水を利用した殺菌効果の測定を実施した。処理は，併用処理による効果を検討するために，強酸性電解水で単独処理した場合と，併用処理した場合の総処理時間を 10 分間に統一して比較した。殺菌効果を向上させる目的で加温した強アルカリ性電解水や冷却した強酸性電解水等を利用したときの結果を図 3，処理方法として攪拌を加えた場合や処理時間を変化させた場合の結果を図 4 にそれぞれ示す。Koseki *et al.*⁵⁾ によるレタスに対する殺菌効果においても報告されているが，常温の強アルカリ性電解水と強酸性電解水による併用処理よりも，加温した強アルカリ性電解水と冷却した強酸性電解水による併用処理が高い殺菌効果につながることが明らかとなっている。同様にネギにおいても処理方法を変化させたときの殺菌効果について測定した結果を図 3 に示す。5℃に冷却した強酸性電解水による単独処理よりも前処理として 50℃に温めた強アルカリ性電解水を利用することで殺菌効果の向上が認められ，次亜塩素酸ナトリウム処理よりも高い殺菌効果を示すことが明らかとなった。次に，図 4 に冷強酸性電解水を攪拌したときと流水処理したときの殺菌効果の違いを測定すると同時に，温強アルカリ性電解水処理と冷強酸性電解水の処理時間を変化させた場合の殺菌効果について測定した結果を示す。その結果，初発菌数のばらつきが大きいためこれまでの試験と一概には比較できないが，強酸性電解水処理を行う場合には，バッチ式で攪拌処理を行うよりも流水式で処理を行うほうが連続的に強酸性電解水を供給でき，有効塩素濃度を維持することが可能であるため⁴⁾，高い殺菌効果につながることが示唆された。さらに，温強アルカリ性電解水と冷強酸性電解水の処理時間を変化させたところ，それぞれ 5 分ずつ処理した場合が高い殺菌効果となり，ここには示していないが処理時間が長くなるほどに殺菌効果が高まった。しかし，温強アルカリ性電解水 1 分→冷強酸性電解水 2 分処理の場合も合計処理時間は短縮されたにもかかわらず，比較的高い殺菌効果を示した。本研

図3 処理温度と処理水の違いによる殺菌効果の比較

処理水量：無処理，冷水道水（5℃）処理10分，冷AcEW（5℃）処理10分，温AIEW（50℃）処理5分→冷AcEW（5℃）5分，NaOCl処理10分

図4 処理水や処理方法の違いによる殺菌効果の比較（攪拌処理）

処理水量：無処理，冷水道水（5℃）攪拌処理10分，冷AcEW（5℃）攪拌処理10分，流水AcEW処理10分，温AIEW（50℃）攪拌処理5分→冷AcEW攪拌処理（5℃）5分，温AIEW（50℃）攪拌処理1分→冷AcEW（5℃）攪拌処理2分

究は実際の現場での衛生管理に利用することが大前提であるために，有効塩素濃度，処理水量，殺菌効果の関係や作業の簡便さを考慮し，前処理として強アルカリ性電解水処理を行った後，強酸性電解水による浸漬（攪拌処理）が最適処理条件であると考えられた。その場合も，温強アルカリ性電解水（50℃）1分以上→冷強酸性電解水（5℃）2分以上の処理が菌数的に満足を得る最適処理であると考えられた。

2. 共焦点蛍光レーザー顕微鏡による表面観察

確実に野菜の殺菌処理を行う上で，野菜表面での微生物の存在状態の把握は必要不可欠であり，効率よく電解水と微生物を接触させることが野菜付着菌に対して高い殺菌効果につながると考え，共焦点レーザー顕微鏡を用いてレタスの表面を観察した結果を図5に示す。その結果，気孔周辺や細胞の境界部分など変化がある部分に緑色に発色している多数の菌が存在していることが明らかとなった。そのため，強酸性電解水で処理を行っても菌との接触が容易ではないために高い殺菌効果につながっていないと考えられた。次に，ネギの顕微鏡観察像を図6に示す。ネギに関しても同様に，表面の変化がある部分（赤線で囲まれた部分）に多数の菌の付着が認められた。また，その付着している菌塊をZ軸方向に焦点深度を変化させて観察したところ，その分布もある程度の深度（菌の厚み）まで達しているこ

とが明らかとなった。そのために簡単に電解水と菌とが接触できないような状態，いわゆるバイオフィーム状に付着している場合には殺菌処理に工夫が必要であると考えられた。さらに図7より，レタスの場合と同様に，気孔周辺（写真内の拡大部分）に存在している菌に対しては電解水との接触が困難であるために殺菌されにくい状態であることが明らかとなった。また，図8より，無処理のネギの細胞内においても菌の生存が確認されたため，収穫後に損傷を受けたり，カットしたりすることによる細胞損傷によって細胞内部へ侵入した菌に対しても殺菌は困難であると考えられた。これらのことから，野菜付着菌の存在状態を把握し，野菜の細胞損傷等へも配慮し，加工方法や殺菌処理を行う方法やタイミングを工夫することで，電解水を利用したレタスやネギの殺菌効果を向上させることが可能であると考えられた。

要 約

電解水の殺菌処理の高度化について検討した。

(1) ネギの部位によって有効塩素の消失量に違いが認められた。有効塩素濃度，処理水量，殺菌効果の関係や作業の簡便さを考慮し，強酸性電解水による2分間浸漬が最適であると考えられた。前処理として強アルカリ性電解水処理を行うことがネギでも有効であることが明らかとなっ

図 5 強酸性電解水処理したときのレタス葉面（内側）の共焦点レーザー顕微鏡像
無処理（左），強酸性電解水処理 5 分（右）

図 6 ネギ表面付着菌の共焦点レーザー顕微鏡観察像

微分干渉像（左上）および微分干渉像+蛍光像（左下）とその Z 軸方向の切片像（右 4 コマ）（写真内のスケールは焦点深度）

た。その場合も、温強アルカリ性電解水で 1 分以上の処理を行った後、冷強酸性電解水で 2 分以上の攪拌を行う処理が最適であると考えられた。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いてレタスの表面を観察

した結果、気孔周辺や細胞の境界部分など変化がある部分に多数の菌が存在していることが明らかとなった。そのため、強酸性電解水で処理を行っても菌との接触が容易ではないために高い殺菌効果につながっていないと考えられ

図 7 電解水処理したときのネギ表面の共焦点レーザー顕微鏡観察像
無処理（左）および電解水処理（温 AIEW 1 分→冷 AcEW 2 分）（右）（写真内の四角は気孔部分の拡大図）

図 8 ネギ細胞内へ微生物が侵入している様子（円内）

た、ネギに関しても同様に、表面の変化がある部分に多数の菌の付着が認められ、その分布もある程度の深度まで達していることが明らかとなった。またレタスと同様に、気孔周辺に存在している菌や損傷細胞等の中へ侵入している菌に対する高い殺菌効果は得にくいと考えられた。

本研究は、農林水産省の助成事業「食の安全・安心」としてフード・セーフティ・イノベーション技術研究組合（FSI）の平成 15 年度成果の一課題として実施された研究である。

文 献

- 1) 厚生労働省まとめ, 年次別食中毒発生状況 (2003).
- 2) 小関成樹, 伊藤和彦, 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, 食科工, **47**, 907-913 (2000).
- 3) 小関成樹, 伊藤和彦, 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, 食科工, **47**, 914-918 (2000).
- 4) 吉田恭一郎, LIM Kyung-Il, CHUNG Hee-Chul, 植村邦彦, 五十部誠一郎, 鈴木鐵也, 強酸性電解水の殺菌効果と試料表面に及ぼす影響, 食科工, **48**, 827-834 (2001).
- 5) Koseki, S., Yoshida, K., Kamitani, Y., Isobe, S. and Ito, K., Effect of mild heat pre-treatment with alkaline electrolyzed water on the efficacy of acidic electrolyzed water against *Escherichia coli* O157 : H7 and Salmonella on Lettuce., *J. Food Micro.*, **21**, 559-566 (2004).

(平成 16 年 7 月 14 日受付, 平成 17 年 3 月 11 日受理)