

微酸性電解水を用いて(Ready-to-eat)の日本マスタードグリーン(日本水菜)の大腸菌汚染からの浄化について

Abdulsudi Issa-Zacharia (鹿児島大学)、他、略

本研究では、微酸性電解水:以下 SAEW と略(pH 5.6 ± 0.21 , 22 ± 1.4 mg/L 有効塩素濃度:ACC)で日本水菜について、大腸菌での汚染除去を評価し、次亜塩素酸ソーダ溶液 (NaClO pH 9.8 ± 0.01 , 110 ± 2.3 mg/L:ACC)との有効性を比較検討した。

除染水菜に大腸菌を接種したサンプルを、SAEW、次亜塩素酸ソーダ溶液、水道水に、攪拌しながら 2分、5分、10分、15分浸すことで実施した。

SAEW は $1.29 - 1.64 \log_{10}$ CFU/g の E. Coli の減少を達成したが、次亜塩素酸ソーダ溶液による削減結果と著しい差を生じなかった。

さらす時間の増加は浄化の有効性に顕著な影響はなかった。本研究の結果、食品産業において、果物や野菜から病原菌の個体数を減らすのにほぼ中性で有効塩素濃度の低い、SAEW が次亜塩素酸ソーダ溶液の代替的な食品消毒剤として使え得ることを示唆している。

[序論]

新鮮な果物や野菜から連想される、健康志向は RTE 果物や野菜を外食したり、消費したりするという消費者の傾向に結びつき、RTE 野菜の人気の増加に寄与している。Ready-to-eat(RTE)野菜とは未調理であり、消費されるまで調理されることのない野菜(生食野菜)である。

この傾向に伴い、増加する新鮮な RTE 果物や野菜の消費に関連して、微生物の感染力と野菜について、たとえば、近年の、以下の論文(日本:略、米国 FDA:略、英、他)によって、立証されている。

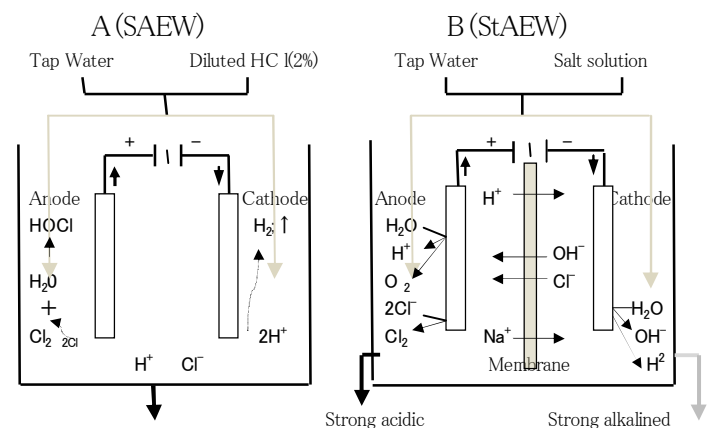
RTE 野菜は、肥料として使用される農場の堆肥(IFST.1999)や、農場で働く人々によって、容易に汚染され得る。新鮮な生野菜と結びつけて考えられる幾つかの微生物病原体の中の一部に、E.coli、Literia monocytogenes、Salmonella spp.や Shigella spp.を含んでいる。

それらの(RTE 野菜)の高い水分含有量、微生物病原体を除去するための殺菌(致死させる)プロセスが不足していること、そして料理、流通、出荷の間の不適切な温度による発生の可能性、さらに、食品から生じる病気のリスクを避けるために、RTE 野菜の浄化(汚染除去)は、人間による消費のため、RTE 野菜の品質と安全性を保証する点で、不可欠である。

このような、汚染からの清浄化という目的のために長く用いられてきた、塩素を基礎とする殺菌剤、特に次亜塩素酸ソーダ溶液は、生食品や農産物 (Suslow,2001)に対する消毒の有効性が十分ではないとの批判されており、その

効果(有効性)を増すための高濃度は食品(生産物)を痛ませる原因(アダムス他、1989)となることがある。

このような、理由により、電解水が、環境にもユーザーにも安全であるとして、農業と食品産業の次亜塩素酸ソーダ溶液の代替となる新しい消毒剤として採用された(AI-Haq, and Sugiyama,2005)。酸性電解水(AEW)は、この目的で他の種類(方式)よりも広く用いられてきた。AEW は強酸性電解水 (StAEW,pH 2.5 ± 0.2)と微酸性電解水(pH 5-6.5)がある。



食品産業や農産業での AEW 利用に関連する文献の大部分は強酸性電解水(StAEW)タイプを用いた病原菌の不活性化(Kim et al.,2000)を扱っている。

SAEW の使用についての商業レベルでの生体外(vitro)の研究に於いて、強い殺菌性やカビやウイルスの活動 (Okamoto et al.,2006)が見られたにも関わらず、農産業や食品産業でば消毒剤として、SAEW の利用は、比較的新しい概念であり、十分に調査されていない。従って、日本水菜で、E.coli からの浄化(汚染除去)するという研究は、SAEW (pH 5-6.6, 10-30mg/L 有効塩素濃度)の有効性の評価を意図したものである。

日本水菜は最近、日本、中国、台湾や韓国で、リーフサラダとして人気になってきました。又、しばしば新鮮な testing salad として、大根と対にされます。

水菜は、また、スープや日本のシチュー(ジャガイモと羊肉、の煮込み料理の、様々な料理のつま(付け合わせ)としてみられる。

[材料と方法]

処理水溶液の準備について

微酸性電解水は、1.0L/min で、SAEW 生成装置(Apia 60, HOKUTY 社、神奈川、日本)を使用して、HCL(2%)と水道水の薄い混合溶液の電解で作られています。

SAEW 生成装置は、電解槽に陽極、陰極及び無隔膜で構成されています。

次亜塩素酸ソーダ水溶液は 10%次亜塩素酸ソーダを蒸留水で希釈して、最終濃度 110mg/L ACC(Wako,Tokyo,Japan,製、Beuchat,1998)に調整されたものである。水道水は対照実験ために使用しました。

[分析測定装置]

処理溶液の ORP,pH,ACC は、調合の直後と、浄化(汚染除去)実験の前に重複して測定するという。

pHは pH 組み合わせ電極(GST-2419C)を使用した、pHメーター(HM-14p, TOA エレクトロニクス(株)、東京、日本)で測定した。

そして、ORPはORP電極(太平洋標準の 2019C)を用いた ORP メーター(RM-12P,TOA エレクトロニクス(株)、東京、日本)で測定しました。

pHメーターは、商業規格の緩衝溶液で pH:4.01 と 6.886(Nacalia Tesque ,Inc,京都、日本)を使用して校正しました。

処理液の ACC は分光光度計(DR/4000V,HACH 社、Loveland,U.S.A)を使用して、有効塩素濃度を測定(決定)しました。

検出限界は 0-2mg/L 塩素である。故に、サンプルは最初に、測定前に脱イオン水を使用して ACC の希望の濃度レベルに希釈しました。

E..Coli (E. 大腸菌接種)の日本マスタードグリーン(水菜) E..Coli NBR 3301 の純粋で L-Dry(凍結乾燥)された培養品は NITE Biological Resource Center(微生物資源センター:NBRC)で得られ、NBRC より提供され、L-Dry 培養品の復活(活性化)手順により、到着後、直ぐに蘇らせ、この実験に使用しました。

日本マスタードグリーン(水菜)のサンプルは、鹿児島市の地元のスーパーマーケットで購入し、10°Cで保存し、2日以内に使用しました。

水菜の 100g サンプルは、接種の過程を容易にするため、胃洗浄バッグ(30×20cm)に置きました。

水菜を入れた各サンプルバッグは、準備してある E..coli サスペンション(ca. 8 log₁₀CFU/ml)500ml と一緒にして、確実に一様分布にするため、適切にゆっくり振動させた状態で、予防接種をさせて、15 分間行いました。

資料は一時間、生物学的安全性のある部屋で、無菌の空気で乾燥しました。

大腸菌(E.coli)を接種された日本マスタードグリーン(水菜)の処理

接種されたサンプル野菜は野菜と処理溶液を 1:5 の比率で、SAEW、NaClO,水道水に、2、5、10及び 15 分間浸漬し、かき混ぜを行いました。

浸漬時間の終わりに、処理水は排出され、サンプルは微生物分析の 5 分間前に、無菌下でドリップドライしました。

[微生物分析]

微生物学的分析は、Gomez-Lopez-et al.(2007)の方法に幾つか変更して行った。

それは、それぞれの処理時間と未処理サンプルから、25 の日本マスタードグリーン(水菜)サンプルについて、無菌の胃洗浄バックの中に 0.1%の 225ml の peptone 水と一緒にし、次に 2 分間胃洗浄器(stomacher:モデル 22、TUL.Instruments、バルセロナ、スペイン)で均質化するように変更したものである。

10培希釈シリーズは、0.1% peptone 水に、標準方法の複製品寒天プレート(NISSUI Phamaceutical 社、Ltd,日本)を注いで作られ、細かく切ったサンプルに於ける総実行可能なカウントを決めるため、37±2°Cで 24±3 時間細菌培養させた。

微生物数は、サンプルについて log₁₀ CFU/g として表す。

[統計解析]

計算された細菌の log₁₀ CFU/g 総細菌数は、SAEW、NaClO 溶液、及び水道水を使用処理した結果について、さらに統計解析を考慮した。

プレート上のカウント数の報告は、個々の 16 サンプルについて重複しての±標準偏差の平均値である。

データは一つの方法として、分散分析(ANOVA)と Tukey's HSD test を用いて、P ≤ 0.05 の違い SPSS の 13.0(SPSS の Windows ソフトウェア:13.0SPSS 社製)を決定した。

[検討及び結果]

処理水の物理化学的な特性は表1に示した。

本研究で、SAEW(pH 5.6 22mg/L ACC で 940mV ORP)は日本マスタードグリーンを大腸菌から浄化(汚染除去)するために使用され、SAEW の有効性は、水道水で調整されている、一般的な食品殺菌剤(NaClO; pH 9.8 110mg/L ACC 650mV ORP)として使われている次亜塩素酸ソーダの有効性と比較された。

日本マスタードグリーン(マスタード)の汚染除去について、SAEW、次亜塩素酸ソーダ溶液及び水道水で処理し、大腸菌の減少を、<表2>に示した。

SAEW、NaClO 溶液及び水道水での汚染除去の有効性の比較を行った。

水道水のみでの洗浄では一般的に要求される細菌による安全性を達成出来なかった。

本研究で、水道水では2分と15分間で、0.84と1.0

\log_{10} CFU/gの大腸菌削減しか得られなかった。

Koseki et.al.(2004)の報告では、水での洗浄は

キュウリやイチゴについて

細菌の負荷量は期待に反して減少しなかった。

類似の結果は Izumi(1999)でも報告されており、その報告の中では、人参、カブ、ジャガイモの水洗浄は、0.4, 0.6 \log_{10} CFU/gの細菌減少しかなかった。

全ての処理時間に於いて、SAEWは水道水と比較して、著しく高い($P < 0.05$)大腸菌 \log_{10} CFU/g 削減量を示している

<表 2>参照

SAEWは、2分間処理で、1.29 \log_{10} CFU/g及び15分間処理で、1.64 \log_{10} CFU/gの削減を達成した。

SAEWを使用する、本研究での達成結果は、Izumi(1999)で得られた結果と同様であった。尚この論文では、刻みホウレン草を500mlの中性電解水(pH 6.8 20mg/L ACC)の中に浸し、1分間、水道水で洗浄することで、細菌総数のうち、1.4 \log_{10} CFU/gの減少結果となった。

このことは、SAEWが他の電解水と同じくらい有効(効果)かも知れないことを示し、そして中性に近いpHのため、金属表面を腐食せず、保存の有効期間がより長く、環境や操作者に安全であるというメリットから、SAEWは農業や食品産業によりふさわしいかも知れないことを示している。

汚染除去の有効性の観点から、NaClO 溶液と比較して、NaClO 溶液はSAEWの5倍以上の高い有効塩素濃度にも関わらず、SAEWの汚染除去の有効性(効果)には重要な違い($P > 0.05$)はなかった。

Adam et al.(1989)は100mg/L ACCより高いレベル(濃度)だと、生産物を傷めたり、機器の腐食を引き起こす原因となるため、実用的な濃度として、100mg/L ACCを提唱している。

従って、本研究で用いたSAEWはたったの22mg/L ACCで、その著者ら(Adam 他 1989)により述べられた、潜在的な問題はSAEWを農業や食品産業で使う際には重要な事ではなくなった。

故に、本研究による知見は、SAEWはNaClO溶液の代わりに、日本マスタードグリーンから病原菌の固体数を減らすための殺菌剤として使用できる事を明らかにしている。

低いACCのSAEWで、観察された効果(有効性)は、Sapers(2006)によると、このpHの於いて約97%のHClOを含むと報告され、そして、Parish et al.(2003)では、HClOの高い含有量により、塩素処理水での殺菌活性に対して、信頼できる最も活性な抗菌成分であると確認された。

本研究で使用したSAEWは940mVという高い正のORP値であった。Jay,(1996)にあるように、より高い正のORP値は、より強い酸化能力を表している。

Jay(1996)に有るように+200から+800mVのORPは、嫌気性でない微生物の成長にある一方、最適範囲は+200~+400mVのORPは嫌気性の微生物の成長に好まれる。

本研究で用いたSAEWのORPがより高く(940mV)、大腸菌が機能として嫌気性であることから、大腸菌を殺す際に、ORPもまた、HClOの含有量とあいまって、重要な役割を果たしていることは、かなりありそうなことである。

これらの事実は、塩素に関連する物質、特にHClOや高いORPがSAEWの主ような殺菌要素である可能性があることを示唆している。

図1は、各処理溶液の汚染除去の有効性について、処理時間の効果を示している。

日本マスタードグリーンを2分、5分、10分、15分間、水道水で、洗浄したとき、大腸菌の個体数の減少に重要な差はなかった。しかしながら、SAEWと次亜塩素酸ソーダ溶液は処理時間15分のときのみ、著しく高い減少効果が見られた($P < 0.05$)が、他の(2分、5分、10分)の処理時間では差がなかった。

15分の処理時間は著しく高い汚染除去の有効性を示したが、そのような長時間の処理は、製品の品質に適していないと報告されており、従って、それは除外する。

さらに、家で、普通に行うような野菜の洗浄には、それ程の時間を掛けないだろう。

2分、5分10分の処理時間においては、重要な差を示さなかったため、日本マスタードグリーンの病原菌を除去又は削減するためには、2分間の洗浄が経済的であり十分に足りるであろう。

同様の結果はIssa Zacharia et al.(2009a)で報告されており、彼らは、ホウレン草の葉にもともと存在する好気性の病原菌に対するSAEWの有効性を評価した。

彼らの研究では、5分から20分への洗浄時間の延長は、実験した溶液の全てにおいて、バクテリアの数を、それ以上減少されなかった。

結びに、本研究は、ほぼ中性のpHのSAEWがNaClO溶液と比較して、日本マスタードグリーンに対する同等の汚染除去の有効性を示していることを説明した。

SAEWの利点は、腐食性でないこと、さらに、作、そして、化学薬品の濃度調整溶液の使用を必要としないことで作業者の潜在的な健康への有害性がより少ないことである。

従ってSAEWは次亜塩素酸ソーダの代わりにready-to-eat野菜の効果的な殺菌剤として使用し得る。

実験された溶液の物理化学上の特性

<表-1>

	n	pH	ORP ^a	ACC ^b
SAEW ^c	10	5.6±0.2	920±10	22±1.4
NaClO ^d	10	9.8±0.01	650±6	(10±2.30)
水道水	10	6.9±0.05	625±2	<1

数値は n = 10 の時の各サンプルの重複平均値の標準差

- a: 酸化還元電位 (mV)
- b: 有効塩素濃度 (mg/L)
- c: 微酸性電解水
- d: 次亜塩素酸ソーダ溶液

各処理時間における、それぞれの微酸性電解水と NaClO 溶液の汚染除去 (清浄化) 効果の比較を (log₁₀CFU/g) で表す

<表-2>

処理時間 (分)	大腸菌(E.coli)体数減少(log ₁₀ CFU/g)		
	TW	SAEW	NaClO
2	0.84±0.06	1.29±0.05	1.51±0.05
5	0.88±0.05	1.46±0.04	1.60±0.04
10	0.98±0.06	1.46±0.04	1.59±0.03
15	1.02±0.04	1.64±0.09	1.79±0.04

数値は平均値の±標準誤差である。異なるより低いケースについて、同じ最低値で書かれた平均値は P<0.05 と著しく異なる。

大腸菌を接種させた日本マスタードグリーンサンプルは、SAEW、NaClO 溶液及び水道水に、2 分、5 分、10 分、15 分間浸す処理をした。

TW: 水道水

SAEW: 微酸性電解水 (pH 5.6, 22mg/L ACC)

NaClO: 次亜塩素酸ソーダ溶液 (pH 9.8, 110mg/L ACC)

以上