

## 国産野菜の貯蔵、保存、陳列を目的としたオゾンの利用条件検討

静岡県立大学 食品栄養科学部 環境生命科学科 内藤博敬  
宮崎大学 地域資源創成学部 戸敷浩介

### 要約

野菜の安定供給要因の一つとして、収穫後の貯蔵、保存、陳列期間を延長することがある。この期間を規定する主たる要因は微生物汚染である。本研究では、オゾンの酸化力を適正に利用することで、生鮮野菜の保存期間延長が可能になると考え、オゾン水およびオゾンガスの相乗効果について検討した。流通の過程では、環境由来以外にもヒト由来の細菌が混入することもある。こうした微生物は、オゾン水洗浄によって初期付着菌量を減らすことで、保存期間の延長が図れる、さらに、オゾン曝露保存を組み合わせることで、静菌的だけでなく殺菌的な効果も得られることが明らかとなり、さらなる保存期間の延長が期待できる。しかし、密閉容器内でオゾンガスを連続して暴露した場合、野菜によってはエチレンによる追熟を加速させる場合もあることがわかり、今後、開放系での評価が必要である。

### 1. はじめに

生鮮野菜の安定供給を可能にする要件の一つに、収穫後の貯蔵期間を延長することがある。また、販売・調理時に起こる変色などの視覚的変化は、消費者の購買意欲を損なう心理的要因になる。これらを規定する主たる要因は、微生物の増殖である。その対策として、腐敗防止を目的とした付着菌量の低減、あるいは過度の追熟を防止する目的で、化学薬品を用いるポストハーベストがある。しかしながら収穫後の野菜に対して化学薬品を用いることは、生産者、消費者ともに心因的に受け入れ難いものがある。また、食の安全の視点からも、過度の化学薬品を用いることは好ましくない。そこで本研究では、酸化力が強いものの易分解性であり分解後は速やかに酸素となるオゾンの低濃度での利用に着目し、収穫後の野菜の貯蔵、保存および販売陳列時に用いる際の効果および利用の可否を検討した。

強い酸化力を持つオゾンは、常温では気体であり、酸素より水に溶けやすいことが知られている（酸素の約 15 倍、 $0.77 \text{ g/L} \cdot 20^\circ\text{C}$ ）。オゾンは酸素の 3 量体で、不安定なピラジカル構造をしているために極めて分解し易い。水中では数十分、大気中では数時間で自然分解して酸素になると報告されているが、有機物と接触すると速やかに分解するため、通常はオゾン発生とともに環境中の有機物と接触して分解する。オゾンは、強い酸化分解を行うために毒性を有する副生物を作り難く、分

解後は酸素となるため環境負荷も低い。強い酸化力を持ちながら分解し易く安全であることはオゾンの長所でもあるが、消毒に使う場合には生成後の保存が難しく、オゾン濃度が高くなると人体をも酸化し、分解で生じた酸素によって燃焼・爆発性が向上するといった欠点もある。オゾンの酸化効果は、オゾン濃度 (C) と曝露時間 (T) の積 (CT) で求めることができるため<sup>1,2)</sup>、近年ではより安全な低濃度オゾンあるいは低濃度電解オゾン水を用いるようになり、これまでの高濃度オゾンガスよりも利用可能な範囲は広がったが、個々の利用条件の報告は少ない。

オゾンガス貯蔵庫での生鮮食品保存は、ワイン用ブドウの保管やイチゴの収穫後保存などに用いられており、ヨーロッパ、東南アジアから現在では米国でも利用が進められている<sup>3)</sup>。ブドウやイチゴの保存は、主にカビ (真菌) 対策であるが、野菜を腐敗させる主な要因は野菜に付着する細菌であり、野菜の種類や季節を問わず一般的に平均値で  $10^6$  個/g 程度 (実数値で  $10^2 \sim 10^9$  個/g) 付着している<sup>4)</sup>。その多くが環境由来の細菌であると考えられるが、これについても国産野菜に付着する細菌の情報収集を第一に行う。その上で、これらに対するオゾン水洗浄、オゾンガス保存の有用性について考察する。また、道の駅や地方では無人販売所、自動販売機などの販売所の普及とともに、生産者による個々の販売時の衛生対策が進んでおり、オゾン水もその一端を担っているが使用条件やマニュアルが存在しない。緑黄色野菜の多くに、タンニンやカテキンといったポリフェノールが含まれており、販売陳列時の変色が消費者の購買意識を損なう要因となる。オゾンは酸化力が強いことから、野菜によってはポリフェノール酸化や追熟を促進することも考えられるため、本研究では、オゾン利用の基礎データに加え、ポリフェノール、ビタミン C、水分含量の変化についても考察できるよう、同時に試験を行った。

さらに、野菜に付着する細菌の中に、通性菌である *Bacillus subtilis* (枯草菌) が検出された。この菌は耐熱有芽胞菌であり、野菜原料の加熱加工や加熱真空加工においても芽胞として残存するため、加工後の常温保存ができず、冷蔵保存期間を著しく低下させるなど、野菜加工業者やこれらを利用する外食産業で大きな問題となっている。そこで、耐熱有芽胞菌を比較的多く含む輸入乾燥シイタケを試験対象とし、低濃度オゾンガス曝露による付着する耐熱有芽胞菌への効果検証を追加した。

## 2. 材料と方法

### (1) 材料と洗浄法

本研究では、静岡県静岡市で栽培されたゴーヤ、ミニトマト、ニンジンおよび市販のピーマン (高知県産)、ナス (高知県産)、キュウリ (産地不定) を試験対象とし、2017年夏～冬にかけて各野菜で2～3回の繰り返し実験を行った。また、他にも根菜のジャガイモ (山梨県産)、葉物野菜としてレタス (長野県産) についても譲り受けまたは購入し、一部の試験を行っている。

野菜の洗浄は、大量調理施設衛生管理マニュアル<sup>5)</sup>に従い、衛生害虫、異物混入、腐敗・異臭等がないか点検した後に水洗することとした。水洗は、野菜を入れたタッパー内で全体が浸る水量を1回の洗浄量とし、種類ごとに同量(100 mL~500 mL)の水道水あるいは4 mg/L オゾン水で3回ずつ洗浄した。

## (2) オゾン水およびオゾンガスの供給と濃度

洗浄用のオゾン水は、オゾン水生成装置 OPENICS-220 (日科ミクロン) を用いた。本機を用いた理由は、既存研究に従い、全ての微生物に消毒効果を示すオゾン濃度<sup>6)</sup>とされている4 mg/L (25°C) のオゾン水生成が可能であることからである。オゾン水中のオゾン濃度は、試験時にデジタルパックテスト (共立理化) で4 mg/Lであることを確認し、洗浄に用いた。

貯蔵、保存および陳列のモデルとした、恒温器内でのオゾンガス曝露には、多重リング式コロナ放電オゾンガス発生装置 (maxcell 社、MXAP-AR200WH) を用いた。オゾンガス濃度の作業環境基準として、日本産業衛生学会では許容濃度 0.1 ppm (0.2 mg/m<sup>3</sup>)、日本空気清浄協会では最高 0.1 ppm・平均 0.05 ppm、アメリカ合衆国食料医薬品局 (FDA) では24時間の最大許容濃度を0.05 ppmとしている。これらの基準値から、本研究では恒温器内のオゾンガス濃度を0.05 ppmとして実験を行うこととし、保存試験期間中は毎朝晩にオゾンガス検知管 (ガステック社) を用いて恒温器内が0.05±0.01 ppmであることを確認した。

## (3) 野菜に付着する細菌の計数、単離と分子遺伝学的同定

野菜の付着細菌の計数および単離には、日水一般細菌数測定用トリプトソーヤ (SCD) 寒天培地 (1.7 g/L casein peptone, 0.3 g/L soy peptone, 5.0 g/L NaCl 2.5 g/L dextrose, 2.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 g/L agar) を用いた。洗浄前の野菜は、ふき取り検査用綿棒 (pro・media ST-25、栄研化学) を用い、野菜1個をふき取った綿棒を10 mL のリン酸緩衝生理食塩水中に浸して初期菌液を得た。水道水およびオゾン水洗浄後の野菜は、約5 gを滅菌剃刀でカットし、SCD液体培地10 mL中に入れて洗浄後菌液を得た。これらの菌液100 µLを適宜希釈して3枚の平板に塗布し、37°Cで24時間静置して、得られたコロニー数の平均に希釈率を掛けて、野菜の表面に付着する菌数を得た。また、この液を線描し、得られたコロニーを釣菌して細菌の単離を行った。

単離した細菌は、野菜毎に6個~12個をピックアップし、分子遺伝学的手法を用いて菌種の同定を試みた。単離したコロニーをSCD液体培地に接種し、37°Cの振盪恒温水槽で24時間振盪培養して培養液を得た。この培養液1 mLをマイクロチューブに分取し、15,000 rpmで10 min遠心して菌体を沈殿回収した。上清を捨て、QIAamp DNA mini kitでゲノムDNAを抽出した。DNA濃度をDNAメーター

(ATTO) で測定して濃度を算出し、20~30 ng をテンプレートとして、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 9600) で PCR 増幅した。プライマーには、16S rRNA 領域をターゲットとして真核生物と原核生物のゲノムを同時に増幅可能な 519 f / 1492 r プライマーペアを用いた<sup>7)</sup>。PCR 増幅産物は、臭化エチジウム / アガロース電気泳動法により増幅バンドを確認した後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara) を用いて精製した。精製した DNA は、DNA シーケンサーを用いて塩基配列を解読し、DNA 解析ソフト DNAsis (日立) を用いて解析した。解析データを NCBI データベース上で BLAST 検索を行い、細菌種を同定した<sup>8)</sup>。

なお、洗浄前野菜より得た初期菌液を、SCD 寒天培地同様に真菌用ポテトデキストロース寒天培地に接種したが、本研究では真菌を単離することはできなかった。

#### (4) 水分含量測定法、ポリフェノール測定法、エチレンガス測定法

野菜の保存指標の一つとして、水分含量の測定を行った。水分含量は、試験に供した野菜がポリフェノールあるいはビタミン C を含むことも考えられたため、加熱乾燥法によって行うこととし、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について (平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号)」に従った。保存試験前後に約 5.0 g の切断片を 5 片作り、70℃で 5 時間処理することでこれら野菜の水分含量を計測した。

ポリフェノールは、野菜を低速圧縮プロセッサで搾り、この搾り汁に対してパックテスト (共立理化) を用いて測定した。パックテストのポリフェノールは、ビタミン C にも反応するため、ビタミン C についてもパックテストで測定し、その値をポリフェノールパックテストの値から差し引いてポリフェノール量とした。

野菜の種類によっては、エチレンガスを多く放出することも報告されている。本研究で供試した野菜の中では、ピーマンが比較的エチレンガスを多く放出する。オゾンによるエチレンの酸化によってエチレンオキシドが生成する可能性も考えられたことから、保存試験期間中は、オゾンガス濃度とともにエチレンガス検知管 (ガステック社) を用いて毎朝晩エチレン濃度も測定した。

#### (5) オゾン水洗浄およびオゾンガス曝露による保存試験

(3) の付着細菌試験および (4) の水分含量測定等を行った野菜と同一ロットの野菜について、水道水またはオゾン水で洗浄したホールの野菜を、オゾンガス曝露、オゾンガス非曝露の条件で室温 (20±5℃) にセットしたステンレス保存庫 (20℃) に静置した。あらかじめ予備実験として任意の野菜で水分含量測定を行い、水分が保存前と比較して 10%以上減少することのなかった 7 日間を保存試験期間とした。

各野菜は、保存前、保存後にそれぞれ約 5.0 g になるよう切断して重量を計り、10 mL の SCD 液体培地に浸し、混和した。この SCD 液体培地 100 μL を直接あるいは適宜希釈して、3 枚の SCD 寒天培地にコンラージ棒で塗布し、37℃の孵卵器

で 24 時間静置培養して、発育したコロニーの平均値から生菌数を算出した。

#### (6) シイタケを用いた耐熱有芽胞菌に対するオゾンの効果検証

(3) の付着細菌試験において、有芽胞の通性菌である *Bacillus subtilis* (枯草菌) が検出された。本研究では野菜表面は空気に触れていると考えて嫌気培養を行っていないが、レンコンなどの根菜ではボツリヌスなどのクロスタリジウム属による食中毒が問題となることがある。そこで、これらの耐熱有芽胞菌を比較的多く含むことが先行研究でわかっている輸入乾燥シイタケを試験対象とし、低濃度オゾンガス曝露による付着耐熱有芽胞菌への効果を追試した。

中国産乾燥シイタケ 3–3.5 cm を、オゾンガス曝露条件で保存し、毎日 5 個ずつを水道水で 1 分間洗浄後、1 本あたり 10 mL の水道水で 1 晩水戻しする。この戻し液を 50 mL 遠沈管に入れ、沸騰水中で 1 時間加熱して有芽胞菌以外を死滅させる。放冷後、100  $\mu$ L を 3 枚の SCD 寒天培地にコンラージ棒で塗布し、37°C の孵卵器で 24 時間静置培養して芽胞菌数を計数した。

また、この液 1 mL をリン酸緩衝液で 10 倍し、クロモアガー測定用培地 (日水) およびアネロパック嫌気を用いて、37°C の孵卵器で 24 時間静置培養して嫌気性菌数を計数した。

### 3. 結果と考察

#### (1) 野菜に付着する細菌の種類

野菜に付着する細菌を単離し、分子遺伝学的手法を用いて菌種の同定を行った。初期菌液および洗浄後菌液から複数の細菌を単離し、野菜および洗浄法ごとに 6~12 個のコロニーを選択し、菌種の同定を行った。色や形状の違いに注意しながら選択したものの、同じ菌が同定される結果も多くあった。

表 1 に、ゴーヤから単離した細菌の同定結果を示す。ゴーヤは表面にイボ状突起を持つため、綿棒法によるふき取りは行わなかった。そのため、水道水およびオゾン水の洗浄効果は不明であるが、水道水洗浄後とオゾン水洗浄後では優先して生育した細菌に違いが見られた。水道水洗浄では *Pseudomonas* 属菌が、オゾン水洗浄では *Bacillus subtilis* および *Pantoea* 属菌が優先していた。

表 1 ゴーヤから単離された細菌の分子遺伝学的同定結果

洗浄	菌属	菌種		由来	相同性
水道水	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	グラム陰性桿菌	環境(土壌)	98%
水道水	<i>Pseudomonas</i>	<i>fulva</i>	グラム陰性桿菌	環境(土壌・穀物)	99%
オゾン水	<i>Acidovorax</i>	<i>oryzae</i>	グラム陰性桿菌	環境	95%
オゾン水	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	グラム陽性桿菌	環境	99%
オゾン水	<i>Pantoea</i>	<i>ananatis</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	97%

表 2 に、ミニトマトから単離した細菌の同定結果を示す。トマトでは、洗浄前と洗浄後のいずれからも *Pantoea* 属菌が検出されており、全てにおいて優先的に生育していた。検出されたいずれの細菌も環境中に多く存在する細菌であり、栽培中に付着したものと考えられる。

表 2 ミニトマトから単離された細菌の分子遺伝学的同定結果

洗浄	菌属	菌種		由来	相同性
	<i>Pantoea</i>	<i>eucalypti</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
	<i>Pantoea</i>	<i>wallisii</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
	<i>Serratia</i>	<i>plymuthica</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
水道水	<i>Pantoea</i>	<i>eucalypti</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	94%
水道水	<i>Pantoea</i>	<i>wallisii</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
水道水	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	グラム陰性桿菌	環境(土壌)	99%
水道水	<i>Staphylococcus</i>	<i>succinus</i>	グラム陽性球菌	動物	99%
オゾン水	<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
オゾン水	<i>Pantoea</i>	<i>wallisii</i>	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%

表 3 に、ニンジンから単離した細菌の同定結果を示す。根菜であるニンジンは、土の付いたまま農家から譲り受け、キッチンペーパー等でできるだけ土を除いてからふき取り検査を行った結果、他の野菜では検出されていない *Klebsiella* 属、*Raoultella* 属、*Stenotrophomonas* 属が検出されている。水道水洗浄後およびオゾン水洗浄後は、ゴーヤやトマトと同様に *Pseudomonas* 属菌、*B. subtilis* および *Pantoea* 属菌が優先していることから、*Klebsiella* 属、*Raoultella* 属、*Stenotrophomonas* 属はニンジンに付着している土の中に生息している可能性が示唆される。根菜は土付きの方が保存は良いとされているが、これらの細菌種と保存の関係を検討した既存研究は見当たらない。今後の検討が期待される。一方で土中には野菜表面に付着する以上の種類と数の細菌が生息していることは確実であり、喫食時には十分に洗浄することが重要である。

表 3 ニンジンから単離された細菌の分子遺伝学的同定結果

洗浄	菌属	菌種		由来	相同性
	Klebsiella	oxytoca	グラム陰性桿菌	動物(糞便)	99%
	Pantoea	eucalypti	グラム陰性桿菌	環境、動物	95%
	Raoultella	planticola	グラム陰性桿菌	環境(土壌、植物根圏)	99%
	Serratia	plymuthica	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
	Stenotrophomonas	maltophilia	グラム陰性桿菌	湿潤環境・糞便	90%
水道水	Bacillus	subtilis	グラム陽性桿菌	環境	99%
水道水	Pantoea	eucalypti	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
水道水	Pseudomonas	putida	グラム陰性桿菌	環境(土壌)	95%
オゾン水	Pantoea	eucalypti	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
オゾン水	Pseudomonas	koreensis	グラム陰性桿菌	環境(土壌)	97%

表 4 にピーマンから単離した細菌の同定結果を示す。ピーマン表面のふき取り検査から細菌の単離を試みたが、液体培地での増殖がされず同定には至らなかった。水道水洗浄後に同定された菌種の中に、農家から分けてもらったゴーヤ、ミニトマト、ニンジンでは見られなかったヒト由来と考えられる *Staphylococcus xylosus* がある。ピーマンは市販品であり、4~5 個が 1 袋に入った状態で購入しているが、袋詰めの際などにヒトとの接触があった可能性がある。

表 4 ピーマンから単離された細菌の分子遺伝学的同定結果

洗浄	菌属	菌種		由来	相同性
水道水	Arthrobacter	castelli	グラム陽性桿菌	環境(土壌)	86%
水道水	Staphylococcus	succinus	グラム陽性球菌	動物	91%
水道水	Staphylococcus	xylosus	グラム陽性球菌	ヒト	97%
オゾン水	Bacillus	subtilis	グラム陽性桿菌	環境	92%
オゾン水	Pantoea	ananatis	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
オゾン水	Rhizobium	larrymoorei	グラム陰性桿菌	環境(土壌)	99%

表 5 にナスから単離した細菌の同定結果を示す。ナスから単離された細菌は、ゴーヤ、ミニトマト、ニンジンと同様に *Pantoea* 属菌が優先していた。一方で、*Pseudomonas aeruginosa* や、ピーマンと同様に *S. xylosus* が同定されており、ナスも流通の過程でヒト由来の細菌が付着したものと考えられる。

表 5 ナスから単離された細菌の分子遺伝学的同定結果

洗浄	菌属	菌種		由来	相同性
	Pantoea	agglomerans	グラム陰性桿菌	環境(土壌、植物)	99%
	Pantoea	eucalypti	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
	Pseudomonas	aeruginosa	グラム陰性桿菌	環境、ヒト	99%
	Rahnella	aquatilis	グラム陰性桿菌	環境(土壌、淡水、特定動物)	99%
水道水	Pantoea	ananatis	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
水道水	Staphylococcus	succinus	グラム陽性球菌	動物	99%
オゾン水	Pantoea	ananatis	グラム陰性桿菌	環境、動物	99%
オゾン水	Pseudomonas	oryzihabitans	グラム陰性桿菌	環境(土壌)	98%
オゾン水	Staphylococcus	xylosus	グラム陽性球菌	ヒト	98%

表 6 にキュウリから単離した細菌の同定結果を示す。キュウリに対するオゾン水洗浄による付着細菌量の低減効果については既に公表している<sup>9)</sup>。キュウリは水分含量が高く、オゾンガス曝露の予備実験の際に水分含量の低下が激しく、特に切断時には乾燥が顕著であったことから、今回の保存試験は断念した。しかしながら、単離している細菌の中に、ピーマンおよびナスと同じようにヒト由来の細菌が含まれている。キュウリは購入毎に産地が異なっていたため産地不定としたが、決まった産地のピーマンおよびナスと比べてヒト由来の細菌が多いことと何らかの関係がある可能性がある。野菜の汚染細菌種と流通との関係をさらに明確にしていくことで、店舗および家庭での保存対策に繋がると考える。

表 6 キュウリから単離された細菌の分子遺伝学的同定結果

洗浄	菌属	菌種		由来	相同性
	Acinetobacter	calcoaceticus	グラム陰性桿菌	環境	98%
	Acinetobacter	oleivorans	グラム陰性桿菌	環境	99%
	Enterobacter	cloacae	グラム陰性桿菌	ヒト	99%
	Escherichia	hermannii	グラム陰性桿菌	ヒト	99%
	Kosakonia	cowanii	グラム陰性桿菌	ヒト	99%
	Salmonella	bongori	グラム陰性桿菌	動物	99%
	Staphylococcus	aureus	グラム陽性球菌	ヒト	99%
	Staphylococcus	sciuri	グラム陽性球菌	動物	99%



## (2) 水道水およびオゾン水洗浄による野菜に付着する細菌の除去効果

ゴーヤ、ミニトマト、ニンジン、ピーマン、ナスに付着する細菌量の、水道水およびオゾン水洗浄による変動を図1に示す。いずれの野菜においても、水道水またはオゾン水洗浄によって付着菌量は減少しており、水道水よりもオゾン水洗浄の方が減少効果は高かった。特に、ゴーヤおよびニンジンに対するオゾン水の除菌効果は顕著であり、表面が凹凸しているほど洗浄効果が見られた。

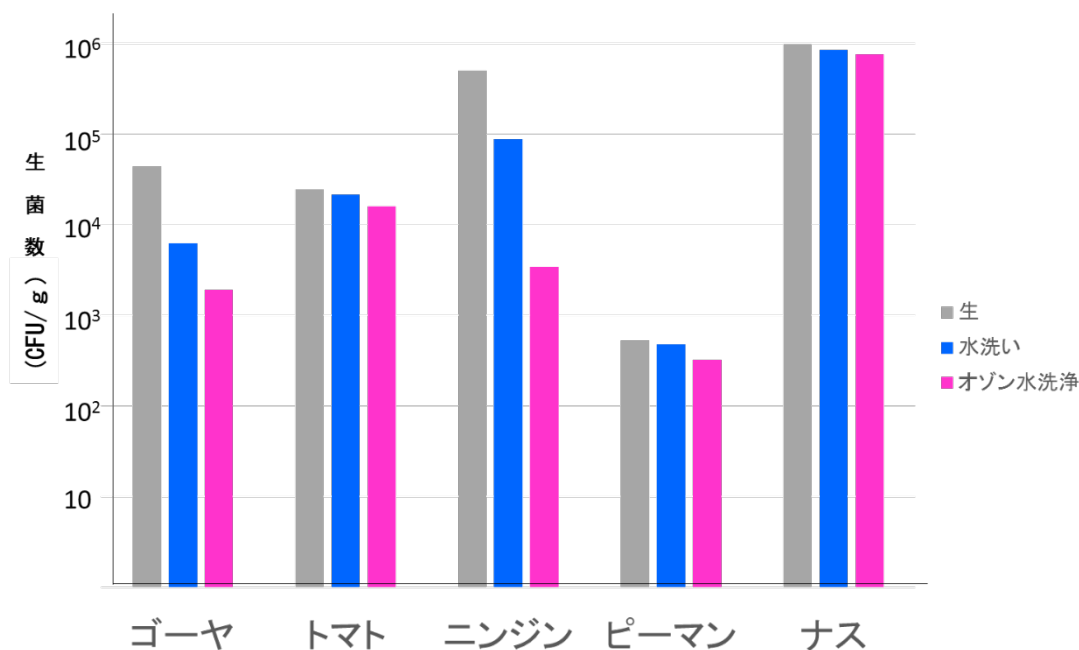


図1 水道水およびオゾン水洗浄による付着菌量の減少効果

本研究では、洗浄水量を決め、3回の浸漬によって洗浄を行った。本来、水道水、オゾン水いずれも掛け流し（オーバーフロー）によって高い洗浄能力が得られるものであるが、一定量の細菌数が残存していないとオゾンガス曝露との併用効果が検証し難くなるため、予備実験の結果からあえて効率の悪い方法で洗浄している。生産者、販売者あるいは消費者が野菜を洗浄する場合は、水道水またはオゾン水で掛け流して洗うことで高い洗浄効果が得られる。

## (3) 細菌数の変動から考察する、水道水またはオゾン水洗浄とオゾン曝露による野菜保存の相乗効果

水道水またはオゾン水で洗浄し、オゾンガス曝露の有無で4通りの洗浄&保存条件として、7日間保存後の付着菌数の変動を追究した。

図2に、ゴーヤに対する4通りのオゾン利用保存条件の効果を示した。洗浄前のゴーヤをSCD培地に浸漬して細菌数を調べた場合は10<sup>4</sup>個/gオーダー、水道水またはオゾン水で洗浄後は10<sup>3</sup>個/gオーダーであった。水道水洗浄後にオゾン曝露した場合としない場合およびオゾン水洗浄後にオゾン曝露しないで保存した場合

は、 $10^8$  個/g オーダーまで細菌量が増加していた。オゾン水洗浄後にオゾン曝露した場合は  $10^4$  個/g と 1 オーダーの増加であり、他の洗浄保存方法と比較して静菌効果が高かった。

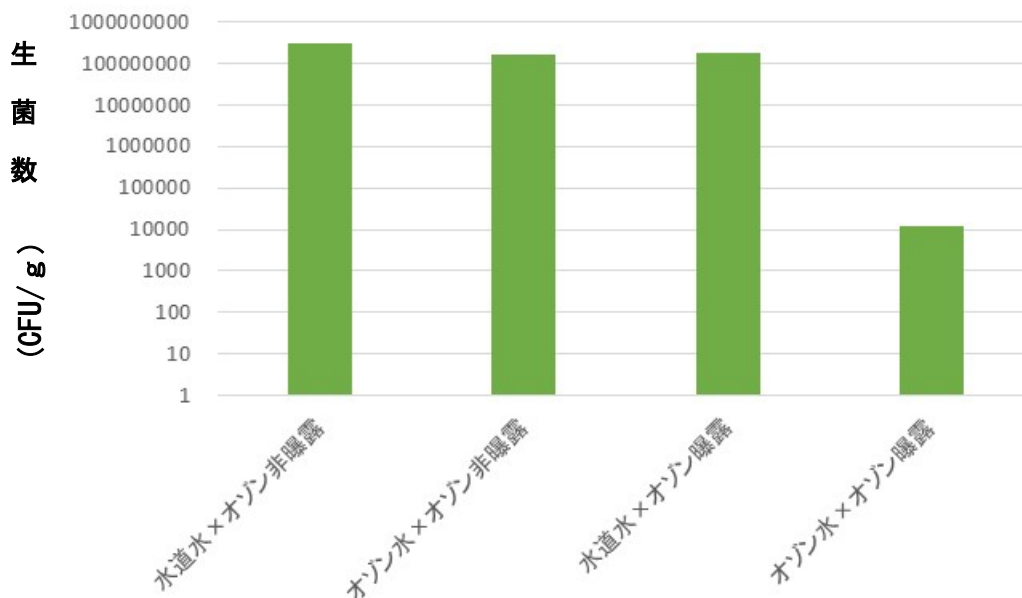


図2 ゴーヤに対する4通りの洗浄&保存条件による細菌量の変動

図3に、ミニトマトに対する4通りのオゾン利用保存条件の効果を示した。ミニトマトは、洗浄前、水道水洗浄後およびオゾン水洗浄後のいずれの菌数も  $10^4$  個/g オーダーであった。水道水洗浄後にオゾン曝露しないで7日間保存した場合は、 $10^7$  個/g オーダーまで菌量が増加していた。オゾン水洗浄後にオゾン曝露しない場合および水道水洗浄後にオゾン曝露した場合は、いずれも保存前と比べて菌数が若干増加したものの  $10^4$  個/g オーダーを維持しており、静菌効果がみられた。オゾン水洗浄後にオゾン曝露した場合は、約  $10^3$  個/g と細菌量が1オーダー減少しており、静菌効果に加えて殺菌効果が見られた。

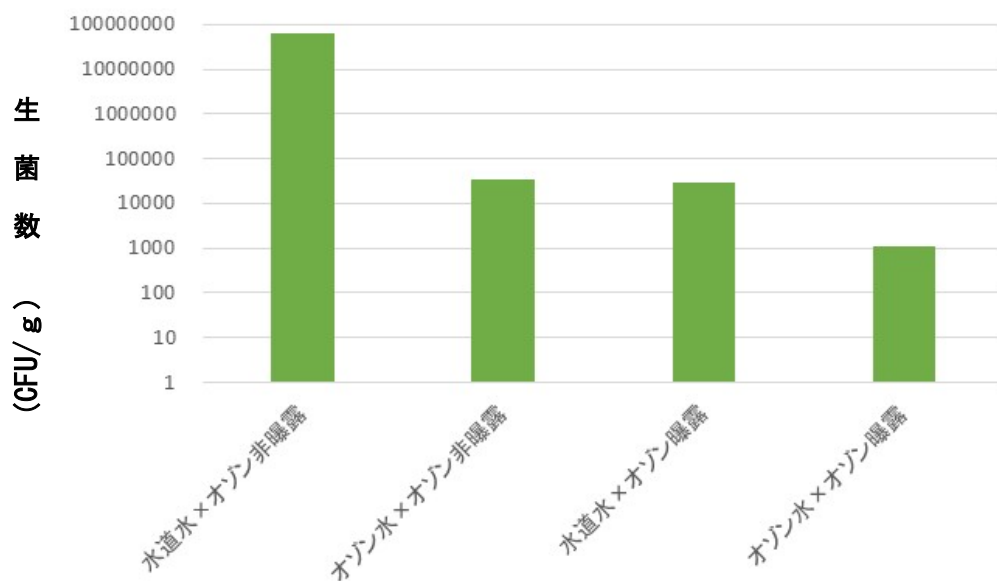


図3 ミノトマトに対する4通りの洗浄&保存条件による細菌量の変動

図4に、ニンジンに対する4通りのオゾン利用保存条件の効果を示した。ニンジンに付着する菌数は、洗浄前に  $10^5$  個/g オーダー、水道水洗浄後は  $10^4$  個/g オーダー、オゾン水洗浄後には  $10^3$  個/g オーダーであった。水道水またはオゾン水で洗浄後にオゾン曝露しないで7日間保存した場合は、いずれも  $10^7$  個/g オーダーまで菌量が増加していた。水道水洗浄後にオゾン曝露した場合は、保存前より若干菌数が減ったものの  $10^4$  個/g オーダーであり、静菌効果と若干の殺菌効果がみられた。オゾン水洗浄後にオゾン曝露した場合は、保存前より若干増加して  $10^4$  個/g オーダーとなった。殺菌効果は示されなかったものの、静菌効果は見られた。

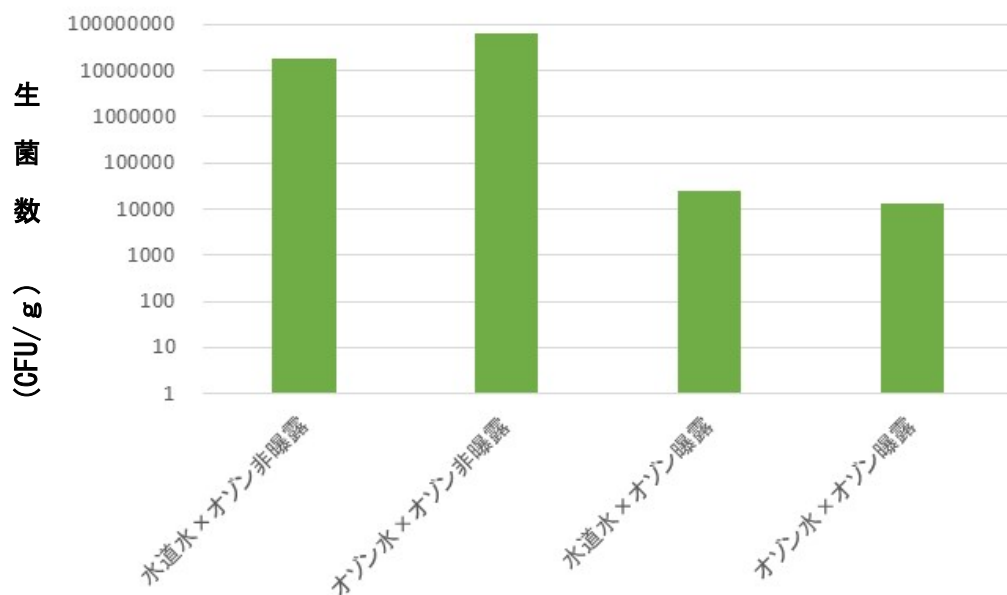


図4 ニンジンに対する4通りの洗浄&保存条件による細菌量の変動

図 5 に、ピーマンに対する 4 通りのオゾン利用保存条件の効果を示した。ピーマンに付着する菌数は、洗浄前に  $10^2$  個/g オーダーと少なく、水道水またはオゾンスイ洗浄後も若干減少したものの  $10^2$  個/g オーダーのままであった。水道水またはオゾン水で洗浄後にオゾン曝露しないで 7 日間保存した場合は、いずれも  $10^4$  個/g オーダーまで菌量が増加しており、水道水洗浄の方がオゾン水洗浄と比べると 2 倍程度菌数が増加していた。水道水洗浄後にオゾン曝露した場合は、約  $10^3$  個/g と保存前の 2 倍ほど菌数が増えた。オゾン水洗浄後にオゾン曝露した場合は、複数回の実験において細菌の生育がみられなかった。初期の付着菌量が極めて少ないため、強い殺菌効果が示されなかったものと推察される。

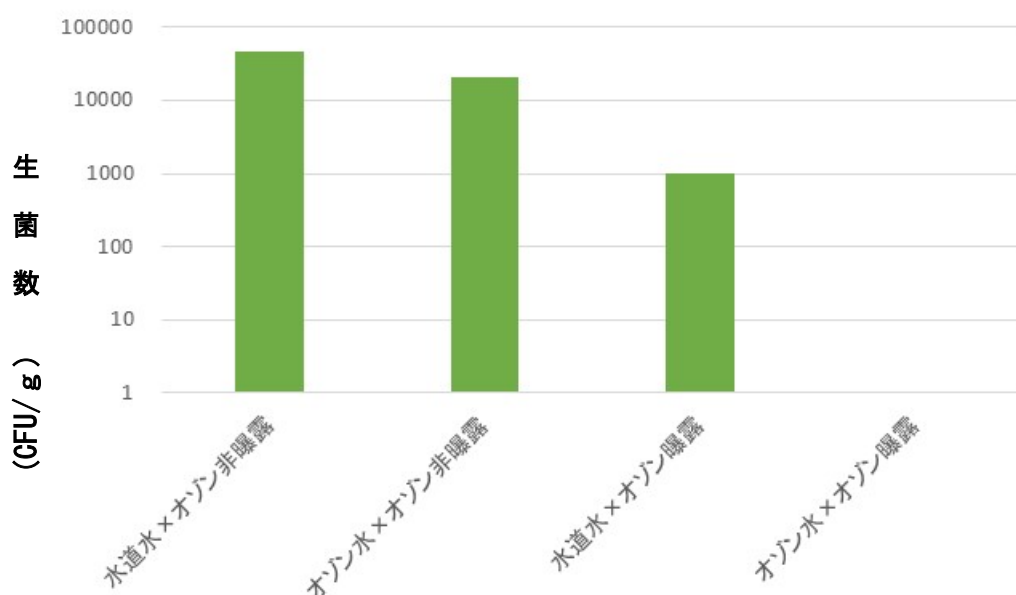


図 5 ピーマンに対する 4 通りの洗浄&保存条件による細菌量の変動

図 6 に、ナスに対する 4 通りのオゾン利用保存条件の効果を示した。ナスに付着する菌数は、洗浄前に約  $10^6$  個/g であり、水道水またはオゾン水洗浄後には  $10^5$  個/g オーダーに若干減少した。水道水またはオゾン水で洗浄後にオゾン曝露しないで 7 日間保存した場合は、いずれも  $10^7$  個/g オーダーまで菌量が増加しており、水道水洗浄の方がオゾン水洗浄と比べると 3 倍以上菌数の増加がみられた。水道水洗浄後にオゾン曝露した場合は、約  $10^4$  個/g と保存前より 1 オーダー程菌数が減少しており、静菌効果に加えて殺菌効果も見られた。オゾン水洗浄後にオゾン曝露した場合は、ピーマン同様に細菌の生育がみられなかった。市販品であるため収穫後処理の有無は不明であるが、洗浄前の細菌量から考えると施している可能性は極めて低く、オゾン水洗浄とオゾン曝露の相乗効果が顕著に表れたものと考えられる。

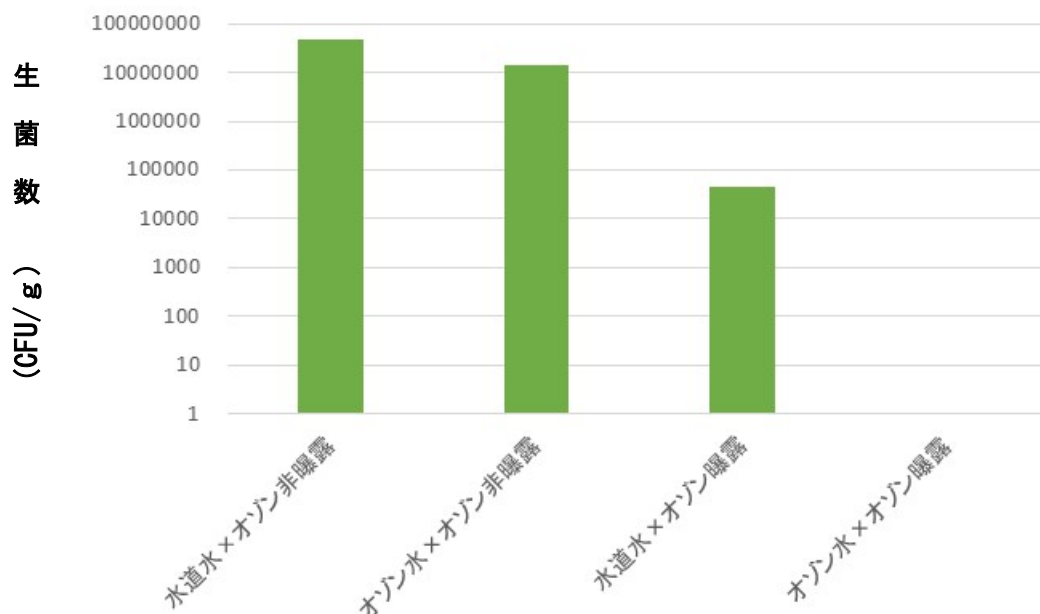


図 6 ナスに対する 4 通りの洗浄&保存条件による細菌量の変動

(4) 水分含量、ポリフェノールおよびエチレン量から考察する、水道水またはオゾン水洗浄とオゾン曝露による野菜保存の相乗効果

任意に準備した複数種の野菜を室温下に放置した予備実験において、元の水分含量の 10%以上の水分が消失することなく、また変色や腐敗が見られなかった 7 日を、本研究では保存試験期間とした。結果 (3) に示した、水道水またはオゾン水洗浄とオゾン曝露による野菜保存試験の前後で、試験に供した野菜の水分含量を測定した結果を図 7 に示す。

水道水またはオゾン水で洗浄した後に 7 日間オゾン曝露したニンジンで、元の含水量の 10%近くを消失したが、他の野菜では数%の消失に抑えられていた。今回の実験では、オゾン曝露した場合のみ空気の対流が生じており、これによってオゾン曝露しない場合よりも水分含量の消失が大きくなったと考えられる。また、葉物野菜のレタスを対象として同様の実験を繰り返したが、水分含量の急激な低下および切断面からの褐変化が著しく、保存試験に至っていない。また、ジャガイモについては、土付のジャガイモの水分含量と比較して洗浄後は急激に水分が失われてしまい、こちらも保存試験までに至っていない。

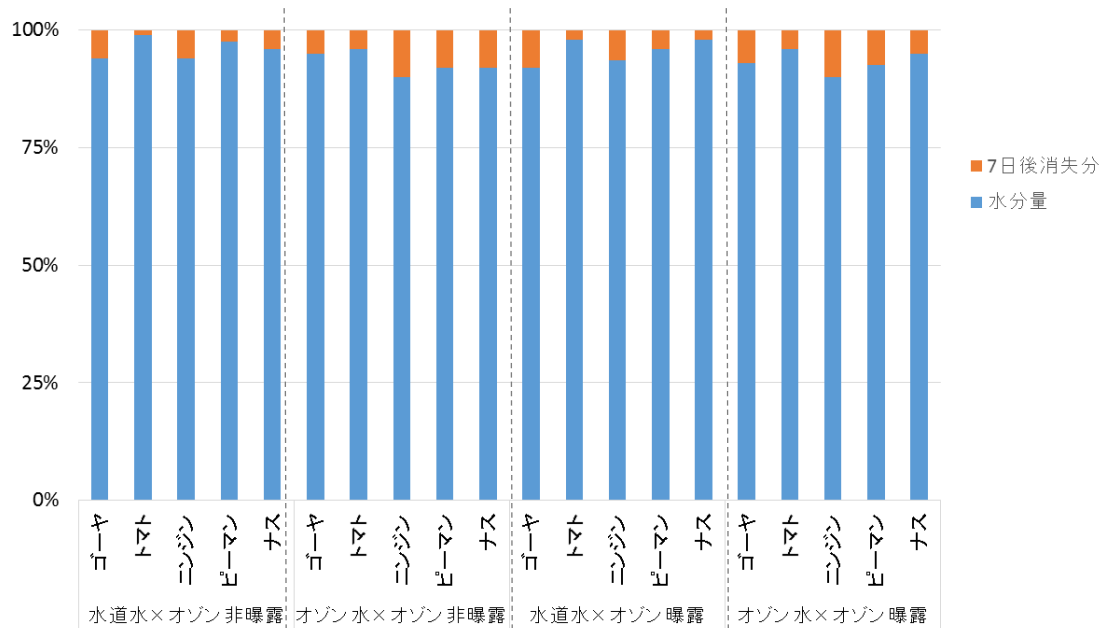


図7 7日間保存試験における水分量の消失

野菜搾り汁中のポリフェノール量およびビタミンC量を、パックテストを用いて追及したが、今回用いた野菜では保存前後で変化はみられなかった。また、糖度についても糖度計で測定したが、水分含量と反比例する程の上昇は得られていない。しかしながら、7日間の保存で水分含量は低下しており、今回の試験法では捉えきれない微妙な成分変化が起こっている可能性がある。今後は、日本食品成分表 七訂（医歯薬出版）に従った成分評価を行いたい。

今回、保存試験中のエチレンに対する検知管測定では、エチレンガスを検出することはできなかった。7日間保存後の野菜の写真を写真1~5に示す。ガス検知管でエチレンは検出されなかったものの、写真1に示したゴーヤ、写真4に示したピーマンでわかるように、オゾン曝露による保存によってこれらの野菜では追熟が進行して変色しており、エチレンオキシドの存在が示唆された。オゾンガスはエチレンオキシドをも分解すると報告されているが、低濃度のオゾンガスでは野菜表面の細菌（有機物）を優先的に処理し、エチレンを酸化させるまでに留まったものと考えられる。

写真2のミニトマトおよび写真5のナスでは、オゾン水洗浄した野菜の方が水道水洗浄した野菜より光沢が強かった。微生物を含め、野菜表面に付着する有機物をオゾン水およびオゾンガスが除去し静菌していることで、光沢を維持していると推察される。



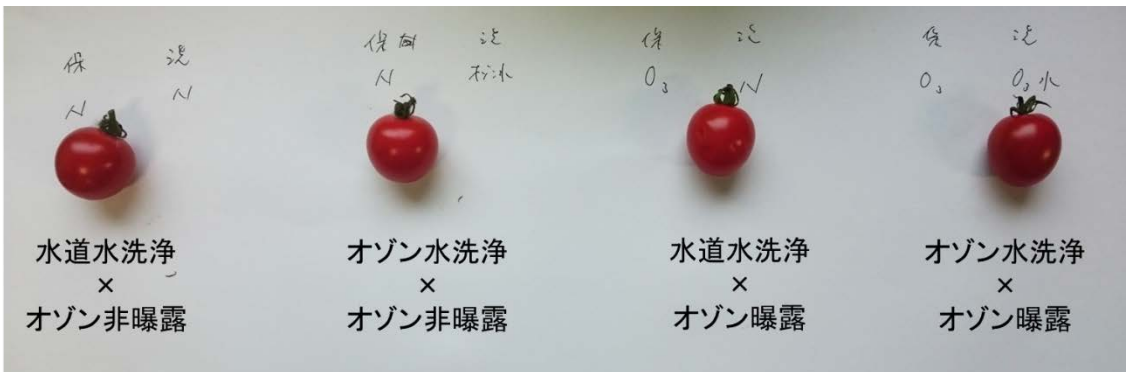
水道水洗浄  
×  
オゾン非曝露

オゾン水洗浄  
×  
オゾン非曝露

水道水洗浄  
×  
オゾン曝露

オゾン水洗浄  
×  
オゾン曝露

写真1 7日間保存試験後のゴーヤの視覚変化



水道水洗浄  
×  
オゾン非曝露

オゾン水洗浄  
×  
オゾン非曝露

水道水洗浄  
×  
オゾン曝露

オゾン水洗浄  
×  
オゾン曝露

写真2 7日間保存試験後のミニトマトの視覚変化



写真3 7日間保存試験後のニンジンの視覚変化

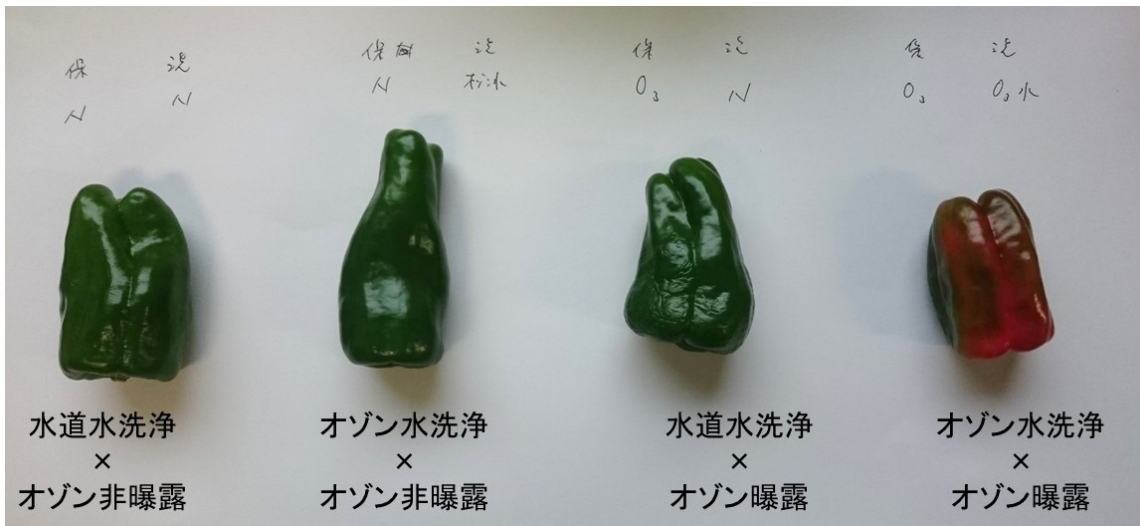


写真4 7日間保存試験後のピーマンの視覚変化





写真 5 7日間保存試験後のナスの視覚変化

写真 3 に示したニンジンでは、7 日目には水道水洗浄してオゾン曝露せずに保存した場合で表面に痛みが生じており、細菌数の測定結果も  $10^7$  個/g オーダーに増加していた。オゾン水洗浄およびオゾン曝露保存のいずれかあるいは両方を行ったニンジンでは痛みがみられないことから、オゾン水洗浄によって付着細菌量を低減し、オゾン曝露保存によって細菌の増殖を静菌的に抑えたと考えられる。

追熟は悪いことではないが、商品価値が下がるため、保存や陳列時には避けたい。今回の結果から、エチレン放出量の多い野菜については、密閉保存時にオゾン曝露することで細菌量は抑えられるものの、追熟が急速に進行するため、開放容器での保存試験を行う必要がある。今回の試験では密閉容器を用いて行ったが、実際の販売空間あるいは冷蔵ショーケースなどでオゾンガス曝露する開放系のモデル実験を行うとともに、密閉容器内での保存についてはオゾン水の噴霧や、これまでには考えられないオゾン水循環槽の中での保存についても、今後検討していきたい。

#### (5) シイタケを用いた耐熱有芽胞菌に対するオゾンの効果検証

野菜付着細菌の中には、*B. subtilis* に代表される、耐熱有芽胞細菌も存在する。先行研究で、中国産乾燥シイタケがこれらの耐熱有芽胞菌を比較的多く含むことがわかっていたことから、これを試験対象とし、低濃度オゾンガス曝露による付着耐熱有芽胞菌への効果を追試した。結果を図 8 に示す。好気培養および嫌気培養いずれも、低濃度オゾンガス曝露 2 日目までは初期付着菌量とほぼ変わらない菌数が計数されたが、3 日目を以降激減した。これまでに 2 回試験を行い、いずれの結果も  $10^2 \sim 10^3$  個/本程度の菌数まで減少すると、好気培養および嫌気培養のどちらも横ば

いになった。オゾンガスの殺菌効果が得られる湿度はRH45～90%であるが、今回用いた保管庫では湿度コントロールができなかったため、オゾンの殺菌力を十分に生かし切れていない可能性がある。オゾンガス消毒は現在のところ薬器法で認められた消毒法であるが、芽胞にも顕著な効果を示すことからオゾンガス濃度高めるあるいは長時間曝露することで滅菌レベルまでに達することも不可能ではないと考えられている。今後、さらなる研究が必要であるが、オゾン水洗浄とオゾンガス曝露を組み合わせることで、野菜の保存だけでなく加工野菜の消費および賞味期限延長が可能になることが推察された。

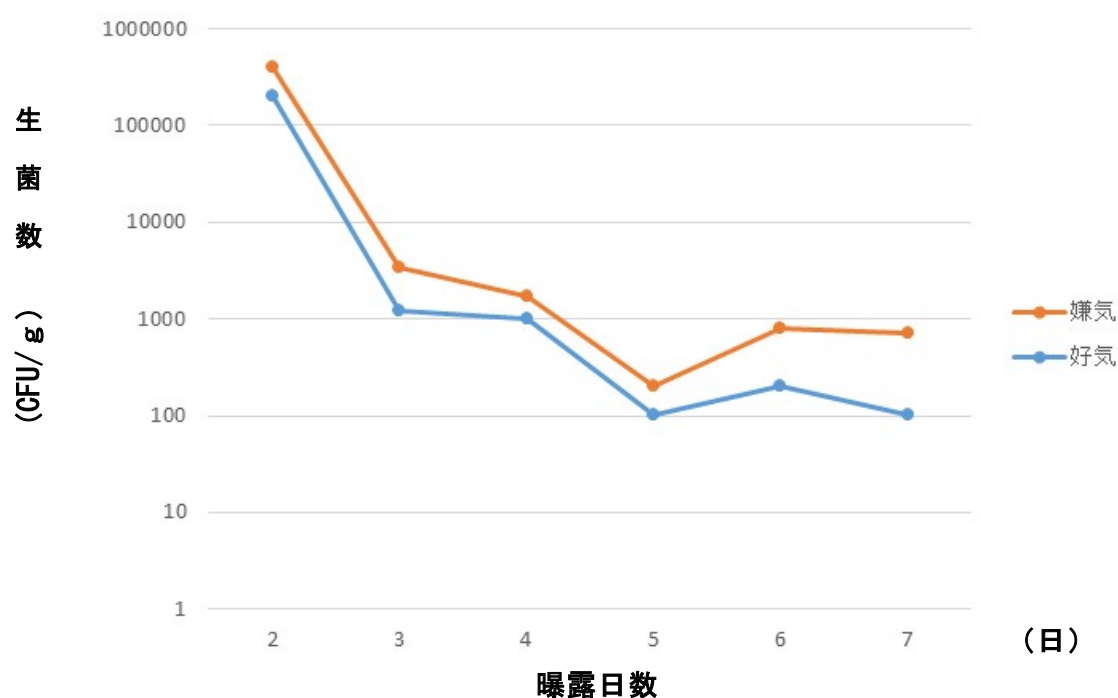


図8 乾燥シイタケのオゾン曝露による耐熱有芽胞菌への効果検証

#### 4. まとめ

本研究では、野菜の貯蔵、保存、陳列期間の延長を目的として、近年消毒器として汎用されているオゾンガスと、電極技術の進歩により小型化が進むオゾン水による洗浄消毒の併用による相乗効果を検証した。

生鮮野菜の鮮度を低下させる要因として、付着微生物の増殖と乾燥がある。野菜に付着する微生物量は、平均  $10^6$  個/g であり、微生物の増殖は腐敗だけでなく野菜表面の乾燥にも関与することから、付着する初期菌量を低減することで鮮度維持の一助となる。そこで本研究では、野菜に付着する細菌を任意に単離して遺伝学的な同定を試み、問題となる微生物の由来を明らかとした。農家から譲渡された野菜

から単離した細菌は、全て環境由来であった。市販の野菜から単離した細菌は、環境由来の細菌およびヒト由来の細菌であった。流通経路のどこかで、あるいは小売店で消費者によって、ヒト由来の細菌が付着した可能性がある。野菜の腐敗や食中毒を考えると、小売店で購入した野菜は速やかに洗浄消毒することが望ましく、可能であればオゾン水のような機能水による洗浄が望ましい。

オゾンは強い酸化力を有しており、消毒対象である微生物の種類を選ばずに著効を示す。このオゾンを水に溶解、あるいは電解して作成したオゾン水の酸化効果は、オゾン濃度 (C) と曝露時間 (T) の積 (CT) で示すことができる。野菜の洗浄時には流水を用いて掛け流し洗浄が可能であるため、ヒトに対して安全な低濃度のオゾン水を用いても高い効果が得られる。本研究では、 $4 \text{ mg/L}$  のオゾン水  $100 \text{ mL}$  (最低量) に 1 分間浸漬し、3 回洗浄した。故に、CT 値は  $4 \times 0.1 \times 1 \times 3 = 1.2 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  となる。汎用されている一般向けオゾン水生成装置のオゾン濃度は、 $0.6 \sim 1 \text{ mg/L}$  であり、2 分以下の流水洗浄あるいは  $2 \text{ L/分}$  の水流で 1 分洗浄することで同等の洗浄効果が得られることとなる。この条件は、実際の野菜加工業者が最初にオゾン水洗浄を行う際の条件と等しい。また、オゾンガス濃度は、小売店などでも利用可能な上限値として、作業環境基準を考慮した  $0.05 \text{ ppm}$  とした。

上記の条件で、オゾン水洗浄とオゾンガス曝露を併用して野菜を気密容器に保存した場合、7 日後の付着細菌数は有意に減少した。全ての野菜で、保存時にオゾンガスを曝露することで、付着細菌に対して静菌的あるいは殺菌的な効果がみとめられた。また、オゾン水洗浄は水道水洗浄と比較して初期の付着菌量を低減できることから、保存時にオゾンガス曝露を併用することで、付着微生物に対して静菌的あるいは殺菌的に働き、微生物を原因とする腐敗、劣化を低減し、保存期間を延長できることが明らかとなった。また、オゾンガス曝露しな場合でも 7 日後の付着細菌数は水道水洗浄よりも少ない野菜が多く、オゾン水洗浄だけでも期間延長に効果を示すことが示唆された。

一方で、気密容器の中でオゾンガスを当て続けると、何もしない場合と比較して水分の揮発が促進され、乾燥してしまうことが危惧された。この対策として、定期的にオゾン水を噴霧したり、開放系で保存、陳列することが考えられる。また、未成熟で販売する野菜や、エチレンを多く放出する青果については、密閉容器で保存することでエチレンオキシドが追熟を促進させることが本研究からも明らかである。これらの野菜についても、開放系で保存、陳列するなどの工夫が必要となる。

生鮮野菜の貯蔵、保存期間に影響する微生物の多くは好気性と考えられるが、同定された細菌の中には、通性嫌気性の有芽胞菌もあった。芽胞は耐熱性であり、野菜の加工業者において最も問題となる細菌である。この有芽胞菌を多く含む外国産乾燥シイタケをオゾンガス曝露保存し、有芽胞菌に対するオゾン曝露保存の効果検証を追試した。その結果、オゾンガス曝露 3 日目から 5 日目にかけて経時的に有芽

胞菌数が減少し、その後は7日目まで横ばいとなった。0.05 ppmの低濃度オゾン曝露であるため、滅菌レベルにまでは達していないものの、芽胞そのものにもオゾンガスが効果を示すことが明らかとなり、加工野菜洗浄や原料野菜保存時に、オゾン水あるいはオゾンガスを用いることで、付着する有芽胞菌を含む微生物量を低減させることが可能となり、貯蔵、保存、陳列期間を延長できる可能性が示唆された。

今後は、冷蔵保存との相乗効果や、オゾン水流水中での保存法について検討を加えたい。

## 5. 参考文献

- 1) 内藤博敬、谷 幸則、西 真吾：ベトナムでのクルマエビ科養殖に用いる海水のオゾン処理効果、*Bull. Med. & Hyg. Ozone Res., Japan Vol.21 No.3*, 83-87 (2014)
- 2) 内藤博敬、谷 幸則、上條章雄、城井康弘、辻 むつみ：スプレー型オゾン水生成装置の除菌効果評価法の検討、*Bull. Med. & Hyg. Ozone Res., Japan Vol.24 No.4*, 114-122 (2017)
- 3) Colm O' Donnell, B.K. Tiwari, P.J. Cullen, Rip G. Rice : *Ozone in Food Processing*, Wiley-Blackwell, New Jersey, USA, (2012)
- 4) Bureau of Social Welfare and Public Health: Hygiene survey of eaten raw vegetables, Tokyo Metropolitan Government, (2014.12).  
(<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/hyouka/files/24/jyoho1/shiryo2-3-1.pdf>)
- 5) Ministry of Health, Labour and Welfare: Sanitary management of large scale cooking facilities manual, (2012.05.18). (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/01.html>.)
- 6) 赤堀幸男、村上篤司、星昭二：オゾン水の殺菌効果と院内感染予防への応用。日本集中治療医学会雑誌、7: 3-10 (2000)
- 7) Y. Shinoda, N. Kato, N. Morita: Systematic classification of bacteria by 16S rRNA gene analysis, *Shimadzu hyouron*, 57: 121-131 (2000).
- 8) H. Naitou, D. Kawaguchi, Y. Nishimura, M. Inayoshi, F. Kawamori, T. Masuzawa, M. Hiroi, H. Kurashige, H. Kawabata, H. Fujita, N. Ohashi: Molecular Identification of Ehrlichia species and 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' from Ticks and Wild Rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, *Microbiol. Immunol.*, 50(1): 45-51 (2006).
- 9) Naitou H., Tani Y., Hiyoshi- Arai K. : Verification of the efficacy of ozonated water in preventing food poisoning from cucumbers., *Bull. Med. & Hyg. Ozone Res., Japan Vol.22 No.4*, 97-104 (2015)