

パルスプラズマを用いた包装カット野菜の殺菌における 残留オゾンの利用による殺菌効率向上の検討

崔 鵬程^{*、1}, 齋藤 高輝^{*}, 南谷 靖史^{*}

(2024年9月10日受付; 2025年2月1日受理)

Study for Improvement in Sterilization Efficiency of Packaged Cut Vegetables Using Pulsed Plasma by Utilizing Residual Ozone

Pengcheng CUI^{*、1}, Koki SAITO^{*} and Yasushi MINAMITANI^{*}

(Received September 10, 2024; Accepted February 1, 2025)

We are investigating a sterilization method to kill microorganisms attaching packaged cut vegetables utilizing active species originated with plasma generated in the bag by applying pulsed voltage on it. This study evaluated a method utilizing residual ozone after disappearing plasma effectively for getting rid of thermal impact by plasma to the cut vegetables. In this study, the killing efficacy of the residual ozone on *Escherichia coli* on cabbage pieces in a plastic petri dish as instead of the package bag was evaluated. As the method utilizing residual ozone effectively, various kinds of mechanical stirring of the cabbage piece after plasma application were tested. Doing the stirring improved *E. coli* killing efficacy compared to the cabbage piece leaving at static condition because the contact surface between the cabbage piece and the petri dish that the residual ozone cannot enter was decreased by stirring. Notably, the *E. coli* killing efficacy in the case of the combination of horizontal shaking and rotation was higher, no *E. coli* could be detected after applying 500 pulses (detection limit: fewer than 50 CFU/mL). Also, the *E. coli* killing efficacy after 100 and 50 pulses reached 98.32% and 96.97%, corresponding to of 1.775 log CFU/mL and 1.518 log CFU/mL, respectively.

1. はじめに

カット野菜は、少人数の食卓でも無駄なく多種類の野菜を、袋から出したらそのまま食べられることから需要が伸びている。野菜は小さく切ってしまうと、切り口から乾燥しやすく変色等の傷みがすぐに進行し、大腸菌などの病原菌や細菌が繁殖しやすい。そのため、野菜を洗浄後に切り分け、変色防止用の特殊な袋に包装した後、すぐに殺菌することが理想的である。しかし、袋詰めしてから生野菜を殺菌できる方法は確立されていない。現状ではカット野菜は野菜を洗浄し小さく切った後に、次亜塩素酸ナトリウム水溶液等の殺菌剤で殺菌し、それから袋詰めされている。そのため殺菌後に袋詰めするまでに再度菌が野菜につく可能性を排除できていない。また、野菜の殺菌に薬剤を使うことに関して消費者の殺菌剤残留への不安が大きい¹⁾。殺

菌剤を使うと野菜の洗い流しの回数が増え、洗浄・殺菌液へ栄養素が流出して減ってしまう点も問題である。そこでパルス放電による非熱平衡プラズマを用いた殺菌が検討されている^{2,3)}。パルス印加は電極を誘電体で覆った状態でも電極間にプラズマを発生させるので、密閉された袋内でもプラズマを発生させることができ、袋詰め後の食品を殺菌できるので包装する過程での汚染にも対応でき、野菜の微生物セキュリティ性を向上できる^{4,5)}。また、非熱平衡プラズマは通常大気下では、活性酸素 ROS (Reactive Oxygen Species)、活性窒素 RNS (Reactive Nitrogen Species) 等のラジカル、紫外線などを生成し、これらを殺菌に利用する³⁾。特に ROS のヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、オゾン (O_3) は菌の細胞壁や細胞膜を破壊し、菌を死滅させる^{7,8)}。これらは自己分解により酸素等に戻るため殺菌剤残留の心配もない⁹⁾。このような利点があるので我々もパルスプラズマによる包装食品の殺菌を検討している⁶⁾。

しかしこれらの活性種等は電氣的にエネルギーを与え、発生させるため、殺菌にかかる印加パルス数が多くなると非熱平衡プラズマといえども活性種発生に使われなかった余剰のエネルギーにより温度上昇を招き、殺菌対象物に熱損傷を与えてしまう。そのためなるべく少ない印加パルス数で十分な殺菌効果を得る必要がある。その方法として本

キーワード: 包装カット野菜, オゾン, パルスプラズマ, 殺菌, 揺れ処理

* 山形大学大学院 理工学研究所

(〒992-8510 山形県米沢市城南 4-3-16 米沢キャンパス 7号館 229室)

Department of Advanced Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Room 229, Building No. 7, Yonezawa Campus, 4-3-16 Jonan, Yonezawa, Yamagata Prefecture 992-8510, Japan

¹ t236495d@st.yamagata-u.ac.jp

<https://doi.org/10.34342/iesj.2025.49.2.62>

論文ではパルスプラズマにより発生するオゾンを経菌に有効に使う方法について検討した。オゾンは他の活性種より寿命が長く、密閉された容器内では暫く残留するので、パルスプラズマ停止後でも殺菌効果が期待できる。そのため熱の影響が出ない程度のパルスプラズマ印加によりある程度の殺菌効果を得た後、オゾンにより殺菌効果を補完することを本論文の目的とする。

カット野菜で一番殺菌されにくいのはプラズマが発生しない、および周りで発生した活性種が入り込めず野菜表面と接触できない野菜と野菜、野菜と袋が重なった面積部分である。したがってここでは、カット野菜とプラズマ消失後の残留オゾンとの接触面積を増やす接触方法、接触時間に着目し、実験を行った結果について述べる¹⁰⁾。

2. 実験方法及び実験内容

本実験は通常大気圧下で包装カットキャベツを模擬した蓋付のプラシャール内に入れたキャベツ片に対して行った。プラシャール内に置いたカットキャベツ片に付けられた大腸菌に対してプラシャール内でプラズマを生成した後、暫くキャベツ片を入れたままにして、残留オゾンによる殺菌率を測定した。キャベツ片のシャールと接した底面はプラズマが発生しにくく、周りのオゾンも入り込みにくく殺菌されにくいため、入れたままの間、残留オゾンとキャベツ片底面との接触面積、接触時間を増やす方法を種々試し、殺菌効果に与える影響を検討した。

2.1 実験装置およびパルス印加条件

本研究では3 nsのパルス幅のパルスを使用した。3 nsパルス発生器等価回路を図1に示す。図2に3 nsパルス発生器で発生した電圧電流波形を示す。

パルス電圧は、印加条件を通常大気圧下において印加ピークパルス電圧50 kV、パルス繰り返し数10 ppsに設定し、プラシャール(材質:ポリスチレン、高さ:18 mm、厚さ:1 mm、直径:92 mm)を電極(材質:銅、直径:80 mm)の間にしっかり挟んで印加した。シャール内のキャベツ片への放電様子は図3(d)に示す。印加パルス数は50, 100, 500 shotsとした。

放電後、オゾンがプラシャール内に残留している時間を加味して印加後のキャベツ片をシャールに入れたままにする時間を決定した。シャール内のオゾン濃度の測定は採取器(AP-20光明理化学工業株式会社)と検知管(182U, 182SB, 182SA北川式ガス検知管、検知範囲:0.025-3.0, 2.5-100, 50-1000 ppm)で行った。

2.2 カットキャベツ片の実験処理方法

実験に用いたキャベツはスーパーで実験日に玉で売られていたものを購入し、2日以内に使用した。キャベツ玉に元々

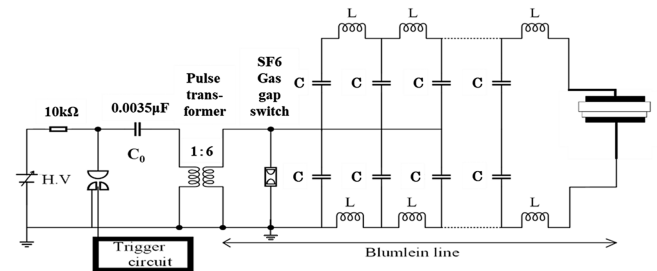


図1 パルス発生器等価回路 (3 ns)

Fig.1 Equivalent circuit of pulse generator (3 ns).

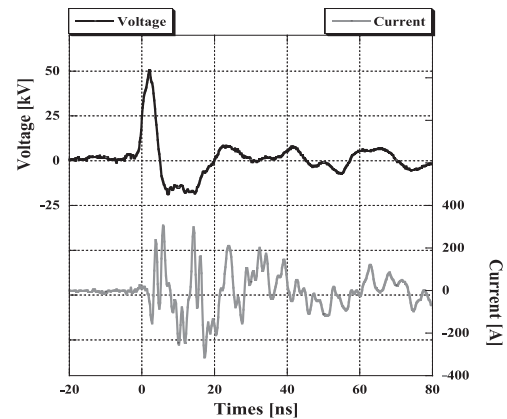


図2 パルス電圧電流波形 (3 ns)

Fig.2 Pulsed voltage and current waveforms (3 ns).

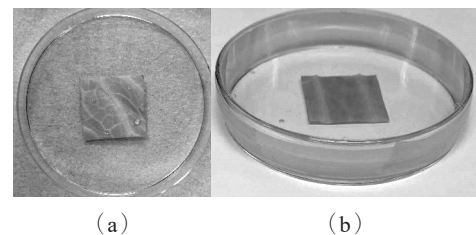


図3 キャベツ片を入れたシャールの様子と電極への設置と放電状況

(a) 大腸菌を付けた3 cm × 3 cm キャベツ片のシャールへの密封状況, (b) テープで密封されたシャール, (c) 電極へのシャールの設置状況, (d) シャール内での放電の様子

Fig.3 Appearances of the cabbage piece inside the petri dish, and it placed between electrodes and discharged.

(a) 3 cm × 3 cm cabbage piece with *E. coli* inside the petri dish. (b) The petri dish sealed with tape. (c) The petri dish with cabbage piece placed between electrodes. (d) Appearance of the discharge inside the petri dish.

についている菌は産地、季節、葉の場所によって菌種、数が異なるため、実験日によるロットの異なりによる結果のばらつきが大きくなり比較しづらくなる。そのため、ここではキャ

ベツに元々ついている菌をほぼなくした後、大腸菌を付加するという方法をとった。以下にサンプルの用意手順を示す。

キャベツの玉は最外側の4枚の葉を取り除いた後、外側の葉を剥き、葉の中部を3 cm × 3 cmのキャベツ片に切り分けた。キャベツ片の土汚れ、化学殺菌剤の残留、元からついている菌の数を減らすため、300 mLのビーカーに超純水を入れ、その中に切り分けたキャベツ片を入れ、ボルテックスミキサー (AS ONE TM-1N 2500 rpm) の上に載せ30秒間洗浄した。ビーカーから取り出したキャベツ片はUV滅菌済みのワイパー (キムワイプ S-200) で水分を拭き取った後、クリーンベンチで10分間表面を乾燥させた。この段階のキャベツ片に残留している菌数を確認のため15個サンプル測定してみたが1個サンプルにコロニーが確認されたのみであった。表面を乾燥させたキャベツ片には培養した大腸菌 (ATCCNumber 11229) 液を超純水で 10^6 CFU/mLまで希釈した液に1分間浸漬することで大腸菌を付加した。各キャベツ片サンプルには0.1 g (10^6 CFU/mL) 大腸菌菌液が付くよう、キャベツをシャーレに入れる際に分析用天びん (エー・アンド・デイ GR202) で付いた菌液の重量を調整した。包装食品の処理を模擬するため、菌付きのキャベツ片をプラスチックシャーレに入れた。シャーレ内雰囲気は、室内通常大気 (温湿度: 20°C, 40% (Xiaomi Thermohygrometer IIIにより測定)) そのままとした。密封された状態を作るため、シャーレの蓋を閉めた後、蓋と容器壁との隙間をアズフロンテープ (AS ONE TF15-02 13 mm × 10 m × 0.08 mm) で2回巻いてオゾンが漏れないよう密封した。テープで密封した様子を図3 (b)に示す。

各キャベツ片は、キャベツ片を含むシャーレをパルスプラズマに暴露した後、残留オゾンとの反応時間をとるため一定時間放置した。プラズマ暴露後にキャベツ片を入れたままにする時間はオゾンの残留時間内で変化させ、プラズマ暴露後の時間経過による殺菌率の変化を測定した。キャベツ片に付けた菌の回収は、まずシャーレからキャベツ片を取り出しチューブ (FALCON 50 mL) に入れた。それからキャベツ片を取り出したシャーレには5 mLの超純水を入れ、揺れによりシャーレおよびシャーレ蓋内に飛んだ菌を回収するため、内部に水で回転させながら十分洗浄した後、その洗浄した水をキャベツ片が入れたチューブに移した。その後、チューブをボルテックスミキサー (AS ONE TM-1N 2500 rpm) で30 s間攪拌し、キャベツ片表面の大腸菌を洗い落とした。その洗浄後の水を寒天培地 (CM0003B, Nutrient Ager : OXOID) に100 μL接種してインキュベーター内 (37°C) で24時間の培養を行った後に、寒天培地表面の大腸菌のコロニーの数を計数して計算した。これを、プラズマを印加せず同様の操作を行ったものと比較し、パ

ルスプラズマ処理によるキャベツ片表面の大腸菌の殺菌率を測定した。

2.3 残留オゾンとの接触面積、接触時間を増やす方法の検討

本実験では2.2の実験方法に基づいて、大腸菌と残留オゾンとの接触面積、接触時間を増やし、オゾンをより効果的に利用するため、プラズマ印加した直後に4種類の接触面積接触時間増加方法で残留オゾンの殺菌効果を検討する。

(1) キャベツ片を左右に揺らしてオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法

図4にこの方法のイメージを示す。パルス電圧印加後にキャベツ片を入れたプラスチックシャーレを電極間から外し、横揺れするように設置した振盪装置 (万能シェーカー、振盪幅: 40 mm, US-200 : AS ONE) の上に固定した。その後、シャーレ内のキャベツを揺らすために、振盪装置を300 rpmに設定し、左右揺れ実験を行い、キャベツ片に対する殺菌効果について検討した。

(2) キャベツ片を上下に揺らしオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法

図5にこの方法のイメージ図を示す。パルス電圧印加後にプラスチックシャーレを電極から外し、上下揺れするように設置した振盪装置の上に固定した。振盪装置を300 rpmに設定し、上下揺れ実験を行い、キャベツ片に対する殺菌効果について検討した。

(3) シャーレを回転させてオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法

図6にこの方法のイメージ図を示す。回転操作はミニローター (ACR-100 : AS ONE) を用いて、ミニローターにプラスチックシャーレを取り付け、回転速度40

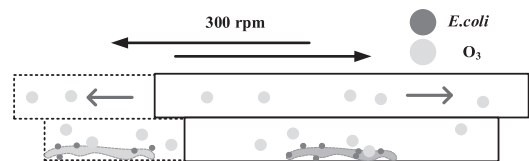


図4 左右揺れのイメージ
Fig.4 Image of horizontal shaking.

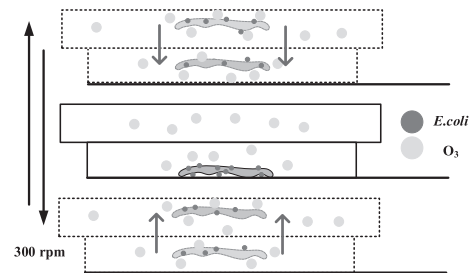


図5 上下揺れのイメージ
Fig.5 Image of vertical shaking.

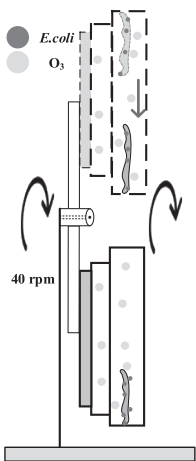


図6 回転のイメージ
Fig.6 Image of rotation.

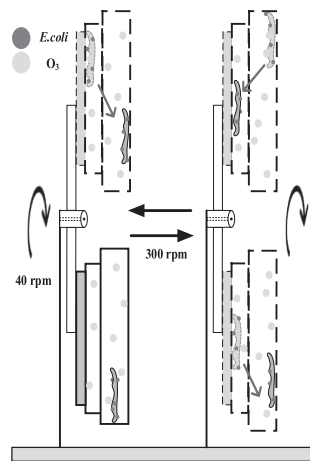


図7 3D揺れのイメージ
Fig.7 Image of 3D shaking.

rpm で半回転 (回転半径 : 5 cm) 毎にシャーレの上下が入れ替わるよう回転させて実験を行い、キャベツ片に対する殺菌効果について検討した。

(4) 回転と左右揺れを同時に行いオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法

(1)と(3)を組み合わせて、単一平面の揺れから、立体的に揺れる3D揺れという形の揺れ方式にした。この揺れ方のイメージは図7に示す。ミニローターを左右揺れするようにした振盪装置の上に固定して、回転速度40 rpmで、同時に揺れ速度が300 rpmの左右揺れも行い、キャベツ片の殺菌効果について検討した。

2.4 パルス印加後の残留オゾンとの接触時間の決定

パルス印加後の放置時間を決定するため、印加後静置したシャーレ内のオゾン濃度およびその時間変化を測定した。図8に500 shots, 100 shots および 50 shots の印加回数

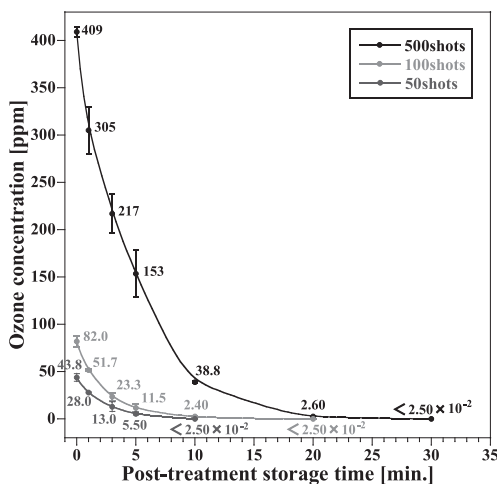


図8 シャーレ内のキャベツ片へのパルス電圧印加後の放置時間に対するオゾン濃度変化

Fig.8 Ozone concentration for storage time after applying pulsed voltage to the petri dish that has the cabbage pieces in inside.

によるオゾン発生量とその時間変化を示す。測定はそれぞれ3回行い平均値を記録した。図の各プロットについての上下の線はエラーバーで標準偏差の大きさを表している。500 shots は印加回数が最も多いので、プラズマ暴露後に410 ppmのオゾンが発生し、10分後にもある程度の濃度が残存しており、オゾンが検出されなくなった(0.025 ppm以下)のは30分後であった。100 shots は82 ppmのオゾンが発生し、10分後に残留オゾン量がかなり減少し、20分後に検出されなくなった(0.025 ppm以下)。50 shots は印加回数が最も少ないので、プラズマ暴露後のオゾン濃度が最も薄い43.8 ppmであり、5分後には5 ppmのオゾンが検出されたが、10分後に検出されなくなった(0.025 ppm以下)。このオゾンの減衰速度は低濃度オゾン水と同等であり、オゾンと水分の反応がオゾン濃度の減衰速度に効いていると考えられる¹¹⁾。これらの結果より、パルス印加後の放置時間は30分までとして殺菌特性を測定した。

3. 実験結果

測定はそれぞれ3回行い平均値を記録した。図の各プロットについての上下の線はエラーバーで標準偏差の大きさを表している。但し、各図の0分のプロットについては揺らす前で全て同じ条件であるので、全てを平均して(12回分)プロットしている。

3.1 シャーレ内に静置したキャベツ片に対するプラズマ暴露後の時間経過による残留オゾンの殺菌効果

(1)~(4)の操作を行わずシャーレ内に静置したキャベツ片のパルスプラズマ暴露後の大腸菌の経過時間における生存率変化を図9に示す。500 shots 印加時の殺菌率が最も高く、パルスプラズマを印加するだけで大腸菌の生存率3.56

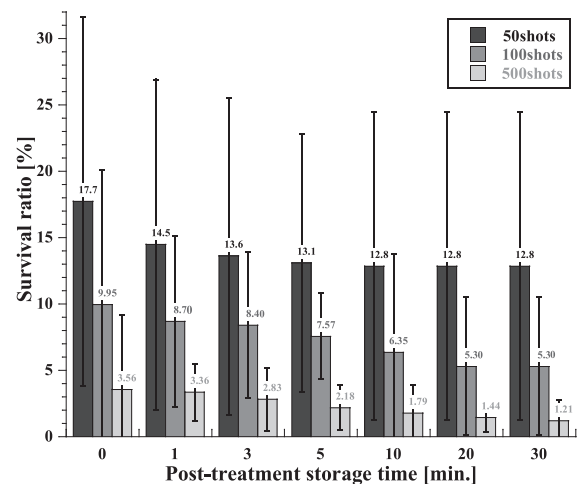


図9 キャベツ片の入ったシャーレへのパルス電圧印加後の放置時間での大腸菌の生存率

Fig.9 E. coli survival ratio for storage time after applying pulsed voltage to the cabbage pieces in the petri dish.

%と、96.44%の殺菌率が得られた。100 shots では90.05%の殺菌率(生存率9.95%)が得られ、50 shots では82.3%(生存率17.7%)の殺菌率が得られ、パルスプラズマの印加回数が減るとともに、殺菌率も減少した。その後、残留オゾンがなくなるまで殺菌率は時間経過により向上し、500 shots では30分後に98.79%(生存率1.21%)と2.35%高くなりほぼ2桁の殺菌効果が得られた。100 shots は20分後まで4.65%向上し、94.7%(生存率5.3%)の殺菌率、50 shots は10分後まで4.9%向上し、87.2%(生存率12.8%)の殺菌率が得られた。また、エラーバーが非常に大きく各測定におけるばらつきが非常に大きい結果となった。

3.2 キャベツ片に対して印加後の時間経過による種々残留オゾンの利用方法による殺菌効果の検討

3.2.1 キャベツ片を左右に揺らしてオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法

図4の左右揺れによる大腸菌のパルスプラズマ暴露後の生存率変化を図10に示す。500 shots の殺菌率は1分後に99.29%(生存率0.71%)になり、5分後に菌が観測されなくなった(菌数が50個以下/mL)。100 shots と50 shots の殺菌率はそれぞれ1分後に96.87%(生存率3.13%)、93.25%(生存率6.75%)に増え、残留オゾンがなくなるまでに殺菌率が97.39%(生存率2.61%)、95.33%(生存率4.67%)になった。各プロットのエラーバーは静置サンプルと比較すると、かなり小さくなった。

3.2.2 キャベツ片を上下に揺らしオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法

上下揺れによる大腸菌のパルスプラズマ暴露後の生存率変化を図11に示す。500 shots の殺菌率は1分後に99.65%(生存率0.35%)になり、20分後に菌が観測されなくなっ

た(菌数が50個以下/mL)。100 shots と50 shots の殺菌率は1分後に97.12%(生存率2.88%)、93.81%(生存率6.19%)に増え、残留オゾンがなくなるまでに殺菌率は97.92%(生存率2.08%)、96.31%(生存率3.69%)になった。各プロットのエラーバーは静置サンプルと比較すると、やはりかなり小さくなった。

3.2.3 シャーレ回転させてオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法

図12にパルスプラズマ印加後、シャーレを回転させた場合の生存率変化を示す。回転により残留オゾンをキャベツ片と接触させることで、1分後には500 shots、100 shots、50 shots の殺菌率はそれぞれ98.16%(生存率1.84%)、97.46%

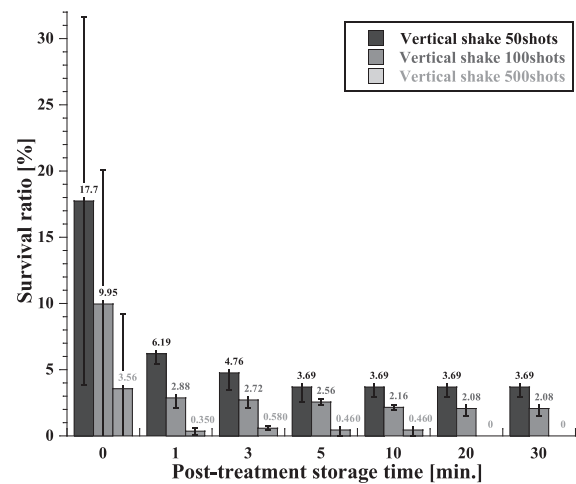


図11 パルス電圧印加後にキャベツ片の入ったシャーレに上下揺れを行った場合の大腸菌の生存率
Fig.11 *E. coli* survival ratio for storage time while vertical shaking after applying pulsed voltage to the cabbage pieces in the petri dish.

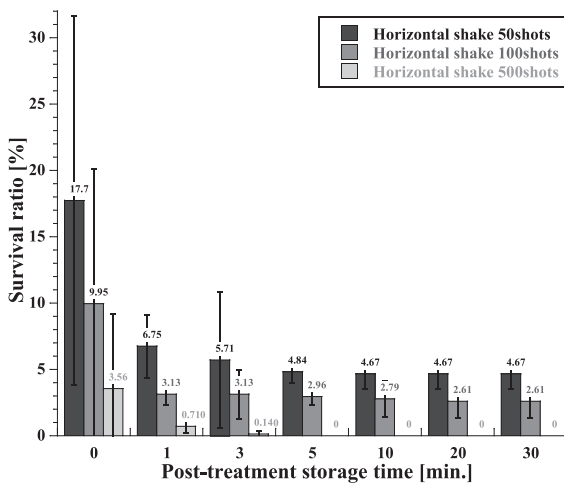


図10 パルス電圧印加後にキャベツ片の入ったシャーレに左右揺れを行った場合の大腸菌の生存率
Fig.10 *E. coli* survival ratio for storage time while horizontal shaking after applying pulsed voltage to the cabbage pieces in the petri dish.

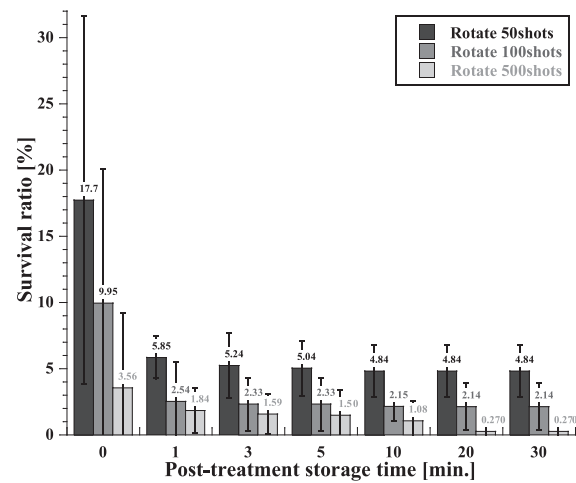


図12 パルス電圧印加後にキャベツ片の入ったシャーレを回転させた場合の大腸菌の生存率
Fig.12 *E. coli* survival ratio for storage time while rotation after applying pulsed voltage to the cabbage pieces in the petri dish.

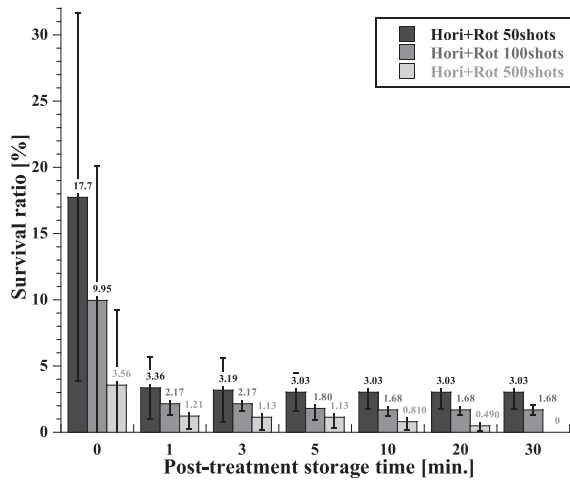


図 13 パルス電圧印加後にキャベツ片の入ったシャーレに 3D 揺れを行った場合の大腸菌の生存率

Fig.13 *E. coli* survival ratio for storage time while 3D shaking after applying pulsed voltage to the cabbage pieces in the petri dish.

% (生存率 2.54%), 94.15% (生存率 5.85%) となった。残留オゾンがなくなるまでに殺菌率は 99.73% (生存率 0.27%), 97.86% (生存率 2.14%), 95.16% (生存率 4.84%) に向上した。各プロットのエラーバーは静置サンプルと比較すると、かなり小さくなっている。

3.2.4 シャーレ回転と左右揺れを同時に行いオゾンとキャベツの接触部分を増やす方法 (3D揺れ)

図 13 に、回転に加えて左右の揺れを組み合わせた 3D 揺れの殺菌率を示す。500 shots の殺菌率は 1 分後に 98.79% (生存率 1.21%) になり、30 分後に菌が観測されなくなった (菌数が 50 個以下/mL)。100 shots と 50 shots の殺菌率はそれぞれ 1 分後に 97.83% (生存率 2.17%), 96.64% (生存率 3.36%) に増え、残留オゾンがなくなるまでに殺菌率が 98.32% (生存率 1.68%), 96.97% (生存率 3.03%) になった。回転だけの場合よりも全体的に殺菌効果が高いことがわかる。各プロットのエラーバーは静置サンプルと比較すると、他と同様にかなり小さくなった。

3.3 殺菌前後のキャベツ片の様子

図 14 に印加パルス数 500 shots, 100 shots でのキャベツ片の外観を示す。100 shots では殺菌前後、カット野菜の消費期限程度である 3 日経過後でキャベツ片に見た目の変化はなく、目視ではプラズマおよびオゾンによるキャベツ片の損傷は確認出来なかった。500 shots では処理直後にキャベツ片に微妙な収縮が見られ、3 日経過後は完全な縮みが見られた。これは、プラズマ印加時の熱、およびオゾン等の活性種によるダメージが考えられ、参考文献^{12,13)}においてオゾン水による結果ではあるが、オゾン処理によるカットキャベツの明確な変化は観測されていないことからプラズマ印加時のダメージの可能性が高い。プラズマ印加がキ

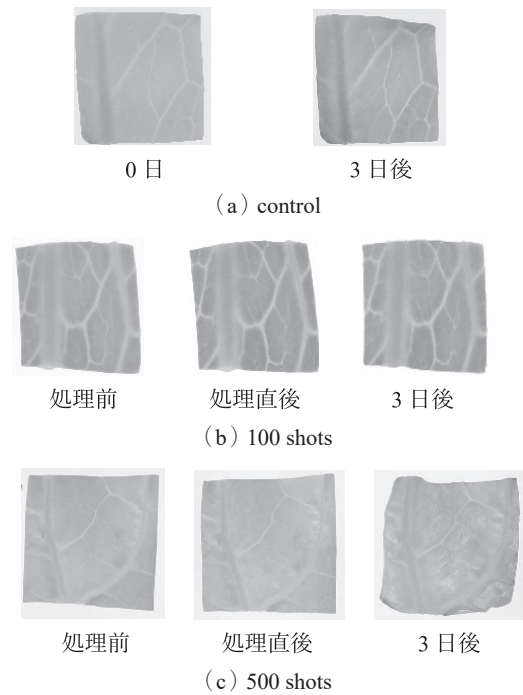


図 14 カット野菜の消費期限程度である殺菌処理後 3 日経過での見た目の変化

Fig.14 Visual changes in cabbage pieces three days after applying.

ャベツ片に与える影響については現在、視覚的、物理的な測定方法で計測中であり、今後報告予定である。

4. 考察

4.1 殺菌結果に対する考察

殺菌効果は、パルスプラズマ印加後に静置したサンプルよりも、全ての印加数で印加後にキャベツ片をシャーレ内で動かし、残留オゾンと良く接触させたサンプルの方が高かった。これは、静置ではキャベツ片とシャーレとの接触面のようなプラズマが発生しにくい場所、残留オゾンが入り込みにくい場所があったためと考えられる。そのため、静置サンプルではプラズマ暴露後殺菌率はオゾンが残留している間のみゆっくり上昇しているが、キャベツ片をシャーレ内で動かした 4 つの場合は揺らし始めた 1 分後には大きく殺菌率が上昇している。

また、静置サンプルではエラーバーが非常に大きいですが、これは静置しているためキャベツ片のしわ、うねりによりオゾンの入り込めないキャベツ片とシャーレとの間の面の大きさがキャベツ片ごとに大きく異なるため、殺菌できる場所の面積と殺菌できない場所の面積がキャベツ片ごとに異なり偏差が大きくなっていると考えられる。これに対して揺らした (1)~(4) の場合においてはエラーバーが小さくなっている。これは揺らすことでキャベツ片が動き、オゾンの入り込めないところが減ったためと考えられ、揺らすことの効果を示している。

殺菌結果について、正規分布に従うデータには T 検定を、従わないデータには Mann-Whitney U 検定を用いて、有意水準を 0.05 に設定し、0.05 未満で有意差があると判断し検定を行った¹²⁾。500 shots の場合、静置グループ内での検定では、0分と1分から30分の比較において有意な差異は見られなかった。一方で、4つの揺れ方法を使用したグループでは、0分と1分の比較において有意な差異が認められ、0分に対しては30分までの比較においてすべて有意な差異が見られた。一方、1分から30分の比較では有意な差異は見られなかった。

100 shots の場合、静置グループ内検定ではやはり、0分と1分から20分の比較において有意な差異は見られなかった。4つの揺れ方法を使用したグループにおいては、0分と1分の比較においては左右揺れと上下揺れで有意な差異が見られなかったが、0分と20分の比較においては全てで有意な差異が確認された。一方、1分と20分の比較では有意な差異は見られなかった。

50 shots の場合、静置グループ内検定では、0分と1分から10分の比較において有意な差異は見られなかった。4つの揺れ方法を使用したグループでは、0分と1分から10分の比較においてすべて有意な差異が認められ、1分と10分の比較では上下揺動においてのみ有意な差異が見られた。

以上の統計解析の結果から揺れによって殺菌効果が向上することが示された。また、1分後とそれ以降の殺菌効果の比較において統計的には有意差は見られなかったことから、パルス印加停止後1分が、残留オゾンが目に見える効果を発揮できる時間であることがわかった。但し、パルス印加後の残留オゾンとの反応のための放置時間については、応用において必要とされる殺菌時間の安全係数を考え、決定する必要がある。

シャーレ内の残留オゾン濃度の時間変化についても揺らさない場合と比較した。図15に左右揺れでの500 shots, 100 shots および50 shots の印加回数によるオゾン発生量とその時間変化を示す。100 shots, 50 shots ではオゾン濃度の減衰が速くなっている。キャベツとオゾンの接触面積が増えたことによりオゾンとの反応が増え、減衰が速くなったと考えられる。500 shots はオゾン濃度減少に差異はないが濃度が高いため影響が出なかったと考えられる。

4つの揺れ方を比較した結果、500 shots では左右揺れ、上下揺れ、3D揺れの3つの揺れ方において96.44%から最終的に菌が観測されない状況(菌数が50個以下/mL)に達した。100 shots では全ての揺れ方で、プラズマ印加直後90.05%の殺菌率が97%以上に7%以上向上した。特に3D揺れにより、98.32% (1.775 log CFU/mL) の殺菌効果が達成した。50 shots ではパルスプラズマによる直接的な殺菌

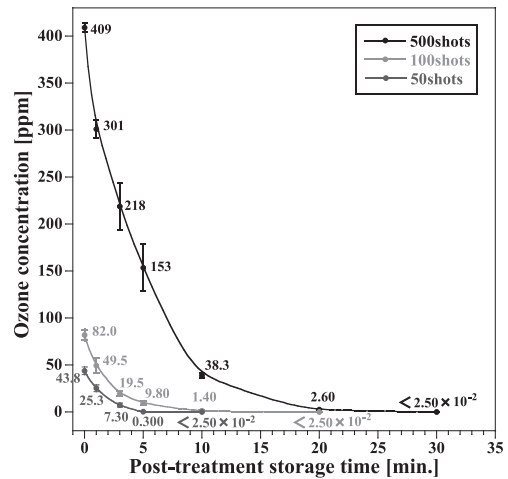


図15 シャーレ内のキャベツ片へのパルス電圧印加後に左右揺れを行った場合の時間に対するオゾン濃度変化

Fig.15 Ozone concentration for storage time while horizontal shaking after applying pulsed voltage to the petri dish that has the cabbage pieces inside.

効果は最も弱いですが、残留オゾンの殺菌効果が最も顕著であり、全て82.3%から95%以上に12%以上向上し、3D揺れは96.97% (1.518 log CFU/mL) の殺菌効率に達成した。プラズマによる直接殺菌効果が弱かった分、動かしたことによる残留オゾンとの接触面積が大きかったことを示している。

50~500 shots を総合して見てみると、揺らし方の中で最も高い殺菌効果が得られた揺らし方は3D揺れであった。これは、いろいろな方向に揺らすことで、残留オゾン濃度が高いうちに、キャベツ片のあらゆるところについている大腸菌に対してオゾンが接触したためであると考えられる。そのため、揺らし始めて1分後に殺菌率が他の揺らし方より大きく上昇したが、その後の殺菌率の変化は他の3つの揺らし方と違いはほとんどなく、揺らし始めた直後に残留オゾンとの反応はほぼ終了していると考えられる。

次に、本実験において殺菌に効果が認められるオゾン曝露量について考察する。図8のオゾン濃度変化と対応する図9の殺菌結果より、それぞれのショット数ともオゾンが検出限界(0.025 ppm)以下になるまで殺菌がわずかではあるが継続されていることがわかる。オゾンガスによる殺菌率はCT値(=濃度(ppm)×接触時間(min))で決まることが示されている¹⁴⁾。50 shots でのパルス印加5分後のオゾン濃度は5.5 ppmであるが、10分後には検出限界以下になっており、10分後からは全く殺菌は進んでいない。100 shots ではパルス印加10分後のオゾン濃度は2.4 ppmであるが、20分後には検出限界以下になっており、20分後からは全く殺菌は進んでいない。500 shots ではパルス印加20分後のオゾン濃度は2.6 ppmであるが、30分後には検出限界以下になっている。これらのCT値はオゾンが減衰していっていることを三角形近似で考慮すると、おおよ

そ13ほどとなる。これに対応する菌の減少量については減少率をlogで表すと、50 shotsが0.032, 100 shotsが0.039, 500 shotsが0.041とほぼ同程度となっている。これより本実験においては2.5 ppm程度の低濃度でも、オゾンがなくなるまでの暴露時間がとれることで僅かではあるが殺菌が進行することがわかる。

4.2 本実験における殺菌効果の有用性について

参考文献¹⁵⁾によると、同じように大腸菌を接種したキャベツを100 mg/Lの次亜塩素酸ナトリウムで洗浄した場合、水洗と比較した殺菌効果は0.3~1.0 log CFU/g程度であると示されており、プラズマを用いた本方法でも水洗を行った後にプラズマ殺菌を行うことを加味すると本実験の結果は1.0 log以上の殺菌効果が得られており、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌以上の結果が得られていることになり、現状の殺菌処理との置き換えということに関していえば今回の実験結果でも十分実用性があると言える。しかし、殺菌効果に関してはまだ向上の余地があると考えているので、プラズマ印加数、残留オゾンの利用法についてさらに研究を進める予定である。

5. まとめ

本研究では、パルスプラズマ印加後にキャベツ片を動かして残留オゾンとの接触面積と接触時間を増やすことで、殺菌効果が向上することが明らかにした。袋詰めされた食品をパルスプラズマ殺菌する際には、プラズマ暴露後の残留オゾンを積極的に使用することで、印加するパルス数を抑さえ、食材へのダメージを抑えつつ殺菌効果を高めることができる。

プラズマ殺菌は、袋詰め後の食品を殺菌することが可能そのため、包装過程での汚染にも対応できる。また、殺菌剤を使用せずに殺菌できるので、殺菌物の無残留殺菌が可能である。

本論文ではプラズマ印加後にキャベツ片を動かしたが、実際の処理ではキャベツ片を動かしながらプラズマを印加することを検討している。さらには、プラズマ殺菌処理の利点である袋内部の殺菌ができる利点を生かし、インターバルを置いてプラズマを間欠点灯させて殺菌率を向上させる処理についての実験も行う。袋内にオゾンを直接注入して殺菌を行う方法では、インターバルをおいて再度オゾンを注入して殺菌を行うことはできないため、インターバルをおいて殺菌効果を上げることはプラズマ殺菌処理の利点であると言える。

本研究の一部は「令和6年度みちのくGAPファンド」の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) S.C.Min, S.H.Roh, G.Boyd, J.E.Sites, J.Uknalis, X.Fan and B.A.Niemira: Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and aerobic microorganisms in romaine lettuce packaged in a commercial polyethylene terephthalate container using atmospheric cold plasma. *Journal of Food Protection*, **80** [1] (2017) 35
- 2) Z.B.Jildeh, P.H.Wagner and M.J.Schöning: Sterilization of objects, products, and packaging surfaces and their characterization in different fields of industry: The status in 2020. *physica status solidi (a)*, **218** [13] (2021) 2000732
- 3) A.Niveditha, R.Pandiselvam, V.A.Prasath, S.K.Singh, K.Gul and A.Kothakota: Application of cold plasma and ozone technology for decontamination of *Escherichia coli* in foods-a review. *Food Control*, **130** (2021) 108338
- 4) S.K.Pankaj, C.Bueno-Ferrer, N.N.Misra, V.Milosavljević, C.P.O'donnell, P.Bourke and P.J.Cullen: Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, **35** [1] (2014) 5
- 5) D.Ziuzina, N.N.Misra and P.J.Cullen: Demonstrating the potential of industrial scale in-package atmospheric cold plasma for decontamination of cherry tomatoes. *Plasma Medicine*, **6** (2016) 3
- 6) S.Koki, T.Onuma, D.Ota, Y.Sato and Y.Minamitani: Investigation of Sterilization Effect for Overlapping Pieces in Non-Thermal Sterilization Method of Packaged Fresh Foods Using Pulsed Barrier Discharge. *agronomy*, **12** [4] (2022) 1
- 7) A.Niveditha, R.Pandiselvam, V.A.Prasath, S.K.Singh, K.Gul and A.Kothakota: Application of cold plasma and ozone technology for decontamination of *Escherichia coli* in foods-a review. *Food Control*, **130** (2021) 108338.6
- 8) C.Suriyasak, K.Hatanaka, H.Tanaka, T.Okumura, D.Yamashita, P.Attri and Y.Ishibashi: Alterations of DNA methylation caused by cold plasma treatment restore delayed germination of heat-stressed rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *ACS Agricultural Science & Technology*, **1** [1] (2021) 5
- 9) D.Ziuzina, S.Patil, P.J.Cullen, K.M.Keener and P.Bourke: Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside a sealed package. *Journal of applied microbiology*, **114** [3] (2013) 778
- 10) T.Liu, D.Wang, H.Liu, W.Zhao, W.Wang and L.Shao: Rotating packed bed as a novel disinfection contactor for the inactivation of *E. coli* by ozone. *Chemosphere*, **214** (2019) 695
- 11) 中室克彦, 土井 均, 肥塚利江, 枝川亜希子: *Legionella* の低濃度オゾン水殺菌効果に及ぼす温度及び pH の影響. *Bokin Bobai*, **40** [2] (2012) 75
- 12) 飯田 礼, 西村園子, 鍋田 優, 梅原仁美, 中村宣貴, 吉田 誠, 椎名武夫: ファインバブルオゾン水処理がカットキャベツの品質と保蔵性に及ぼす影響. *日本食品保蔵学会誌*, **46** [3] (2020) 115
- 13) C.Liu, C.Chen, A.Jiang, Y.Zhang, Q.Zhao and W.Hu: Effects of aqueous ozone treatment on microbial growth, quality, and pesticide residue of fresh-cut cabbage. *Food Science & Nutrition*, **9** [1] (2021) 52
- 14) 田中 沿, 櫻井美棠, 石井浩介, 松澤克明: インフルエンザウイルスのオゾンガスによる不活化. *IHI 技報*, **49** [2] (2009) 74
- 15) 稲津康弘: 生野菜の洗浄殺菌. *日本食品微生物学会雑誌*, **38** [3] (2021) 107