

## 平成 24 年度研究助成報告（兼、終了報告）

研究題名	各種粉体調製過程における微生物の死滅・生存挙動の解明とその数理モデル化
研究期間	平成 23 年 4 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日
研究機関・所属 研究者名	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品工学研究領域 小関成樹

### 1. 平成 24 年度研究成果の概要

H24 年度は H23 年度に確立した実験手法を用いて引き続き、病原性細菌の粉体中での動態変化を追跡し、粉体中における保存中の細菌生残挙動を長期間にわたり、検討することを可能とした。さらに、保存温度、保存期間、菌種をパラメータとする死滅挙動予測モデルを構築した。これによって、実際の保存環境における温度変動履歴から各種病原細菌の生残挙動を予測することが可能となった。

また、粉体調製方法が細菌の生残挙動に及ぼす影響については、H23 年度に取得したスプレードライによる粉体調製過程における細菌の生残挙動データを基礎にして、さらに詳細な実験データを蓄積して、スプレードライ過程における細菌の死滅挙動を解析した。さらに、スプレードライ中の乾燥過程を数値流体力学（CFD）を用いて熱力学的に解析を行い、細菌の死滅挙動との相関性を明らかにした。CFD 解析より噴霧乾燥中の粒子の熱履歴が明らかとなり、細菌不活化への影響が限定的であることが確認された。

### 2. 助成期間内での研究成果の概要

#### 1. 乳幼児調製粉乳中における各種病原性細菌の挙動解析

##### 1.1. はじめに

低水分の食品環境下においても食中毒細菌が生残して、食中毒を引き起こす事例が報告されている。食中毒細菌の乾燥耐性に関する研究報告の多くは、増殖可能な水分活性値の境界条件を見出すことに重点が置かれてきた。一方で、極低水分活性条件下における各種食中毒細菌の生残特性についての詳細かつ定量的な報告例は多くない。そこで、本研究では低水分活性条件下での各種食中毒細菌の死滅／生残挙動を明らかにすることを目的として、各種食中毒菌の乳幼児用調製粉乳中での長期間保存中の生残挙動を検討した。

##### 1.2. 実験方法

*Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 の 4 菌種を対象とした。菌種毎に 4-6 菌株を個別に Tryptic soy broth 中で 35°C で定常期まで増殖させた

後、混合して試験に供した。乳児用調製粉乳（ビーンスターク・スノー株式会社製，すこやか）1 kg に各菌液（ $10^8$  CFU/ml）5 ml を噴霧接種し，安全キャビネット内で2時間乾燥させた。その後，サンプルを300 g ずつガラス製容器に分注して，各容器を5°C，22°Cおよび35°Cの恒温器内にて保存し，保存中の菌数の変化を調べた。

### 1.3. 結果と考察

細菌液接種直後の調製粉乳中の食中毒菌数はいずれ食中毒細菌においても，5.1 log CFU/g 程度でバラツキは小さかった。6ヶ月経過時点までの変化をみると，菌種によって乾燥耐性が異なることから，死滅に差が現れた。特に *Salmonella* spp. と *C. sakazakii* は高い生残率を示した。一方で，保存温度が各種病原性細菌の生残に顕著に影響していることが示された。すなわち，保存温度が高いほど，菌種にかかわらず速やかに死滅する傾向にあり，4°Cの低温保存ではいずれの菌種も高い生存率を示していた。菌種別の保存中の菌数変化を図1に示した。

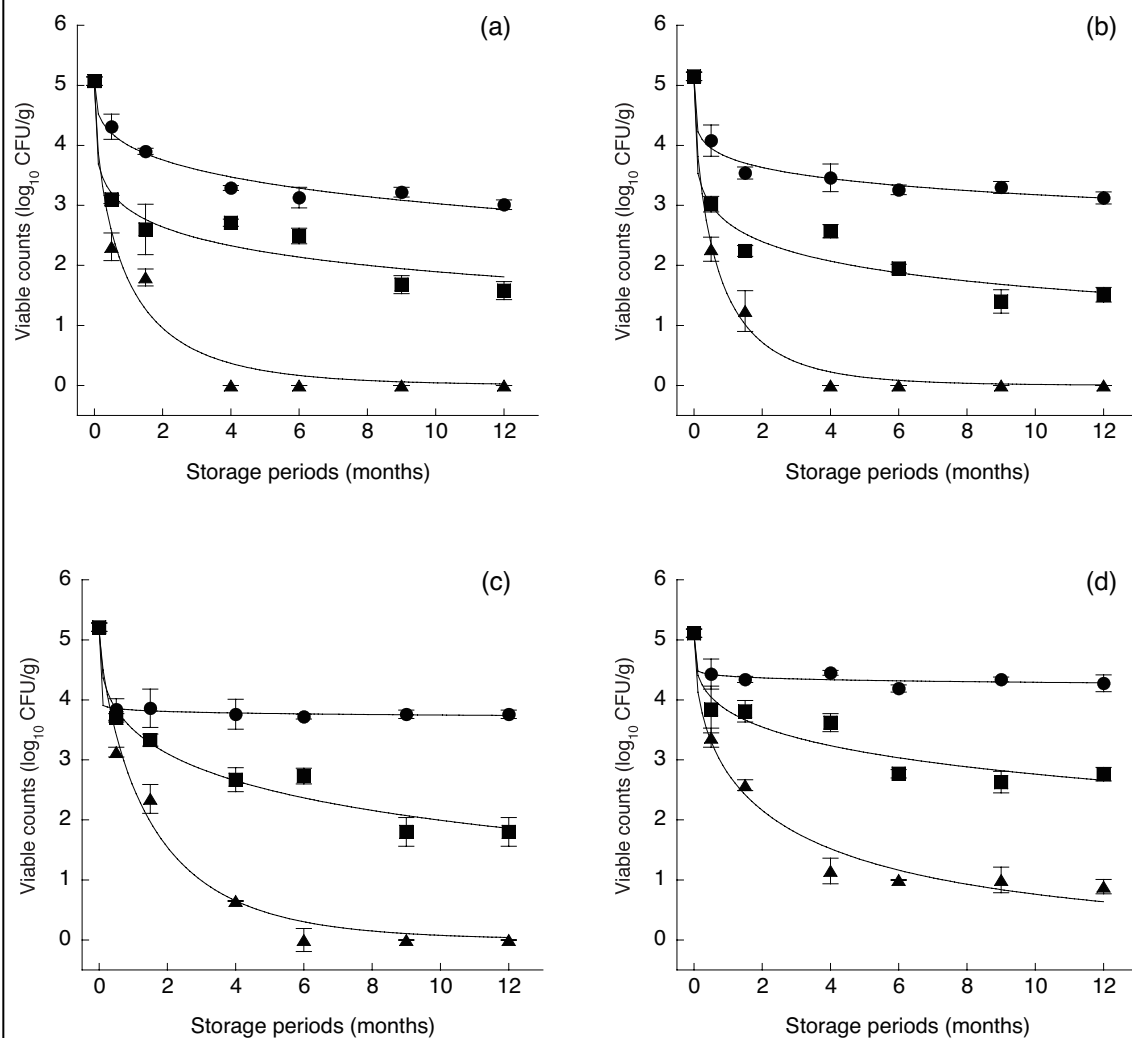


Figure 1. Survival curves of *L. monocytogenes* (a), *E. coli* O157:H7 (b), *Salmonella* (c), and *C. sakazakii* (d) at 5°C (●), 22°C (■) and 35°C (▲) during one year period. The curves were represented by the best fitted Weibull model.

Table 1 Weibullian ( $\log(N/N_0) = -bt^n$ ) fitted survival parameters

	<i>b</i>			<i>n</i>		
	5°C	22°C	37°C	5°C	22°C	37°C
<i>Salmonella</i>	1.38	1.71	2.81	0.03	0.28	0.28
<i>L. monocytogenes</i>	1.08	2.11	3.34	0.28	0.18	0.20
<i>E. coli</i> O157:H7	1.35	2.43	3.63	0.16	0.16	0.17
<i>C. sakazakii</i>	0.72	1.29	2.41	0.06	0.26	0.25

各菌種ともに以下の Weibull model  
で良好に記述することができた。

$$\log_{10} S(t) = \log_{10} \left( \frac{N(t)}{N_0} \right) = -bt^n \quad (1)$$

ここで  $S(t)$  はある任意の時間  $t$  における生残割合を表し,  $N(t)$  は時間  $t$  における菌数,  $N_0$  は初期菌数を表す。  $b$  と  $n$  は温度依存性のパラメータである。

推定されたパラメータ  $b$  と  $n$  の値を Table 1 に, 温度との関係性を図 2 にそれぞれ示した。パラメータ  $b$  は死滅速度を, パラメータ  $n$  は曲線形状を表すパラメータである。パラメータ  $b$  は温度の上昇に伴い指数関数的に増加することが明らかとなり, 各菌種以下の式で近似することができた。

*E. coli* O157:H7

$$b = 1.18 \times \exp(0.03 \times \text{Temp})$$

$$R^2 = 0.99476$$

*Salmonella*

$$b = 1.17 \times \exp(0.02 \times \text{Temp})$$

$$R^2 = 0.94$$

*L. monocytogenes*

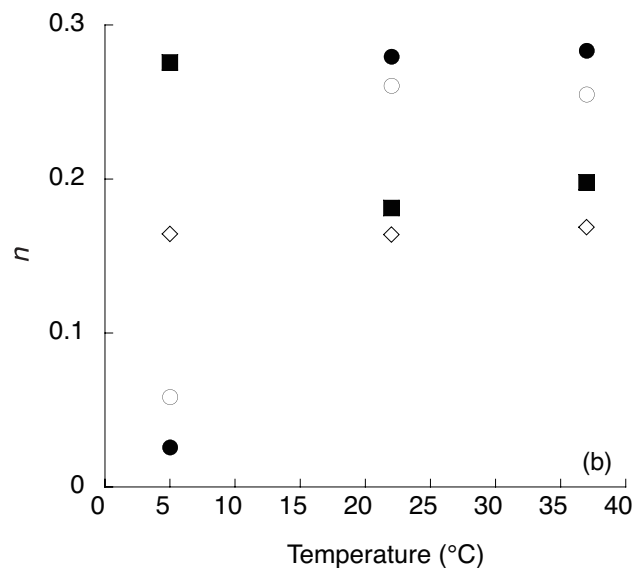
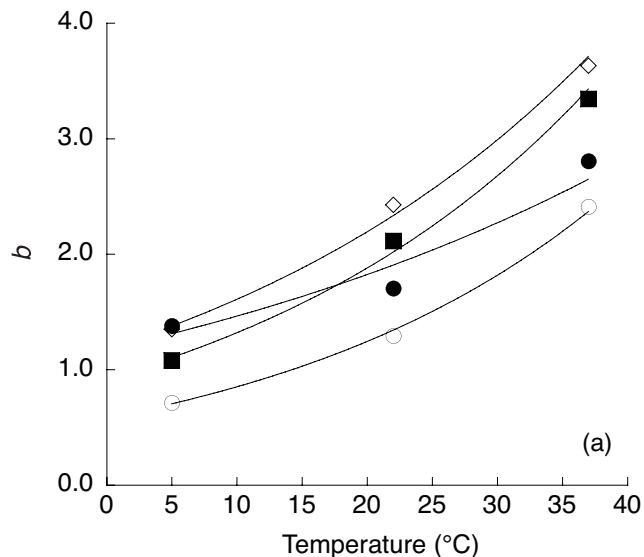
$$b = 0.93 \times \exp(0.03 \times \text{Temp})$$

$$R^2 = 0.99$$

*C. sakazakii*

$$b = 0.58 \times \exp(0.04 \times \text{Temp})$$

$$R^2 = 0.99$$



●— *Salmonella*      ■— *L. monocytogenes*  
◇— *E. coli* O157:H7      ○— *C. sakazakii*

Figure 2. Temperature dependence of the Weibullian survival parameters  $b$  (a) and  $n$  (b) of *L. monocytogenes* (■), *E. coli* O157:H7 (◇), *Salmonella* (●), and *C. Sakazakii* (○), respectively.

式 (1) から死滅の速度を求めると、

$$\frac{d \log_{10} S(t)}{dt} = -b(\text{Temp}) \cdot n(\text{Temp}) \cdot t^{n(\text{Temp})-1} \quad (2)$$

今、式 (1) からある時点  $t^*$  における死滅割合を求めると

$$t^* = \left[ -\frac{\log_{10} S(t)}{b(\text{Temp})} \right]^{\frac{1}{n(\text{Temp})}} \quad (3)$$

式 (2), (3) を統合すると、

$$\frac{d \log_{10} S(t)}{dt} = -b[\text{Temp}(t)] \cdot n[\text{Temp}(t)] \cdot \left[ -\frac{\log_{10} S(t)}{b(\text{Temp})} \right]^{\frac{n[\text{Temp}(t)]-1}{n[\text{Temp}(t)]}} \quad (4)$$

式 (4) の微分方程式を前述の  $b$ ,  $n$  の温度の関数を代入することで、保存中の温度変動に対応して各種病原菌の生残割合を算出することができる。

乾燥ストレス負荷条件下では 35°C の生育至適温度がストレスとなり死滅に至ることが示唆された。一方、4°C の低温条件下では細胞活動が抑制されることで、乾燥ストレスに抵抗するための代謝活動が抑えられたため、死滅にまで至らなかったものと推測された。本研究では粉体中における細菌の状態を生菌数として評価して、乾燥状態における損傷菌の発生は考慮していない。そのため、実際には寒天平板上でのコロニー形成能を失ってはいるものの、生命体としては生きている状態の細胞が存在していた可能性は否定できず、損傷菌の回復までを香料に入れた食中毒リスクを的確に捉えているとは言えない。今後、乾燥条件における損傷菌の発生ならびに損傷回復機構についての詳細な検討が必要であると考えられる。

## 2. スプレードライによる *Cronobacter sakazakii* の死滅挙動解析

### 2.1 はじめに

*Cronobacter sakazakii* は自然界に広く分布するグラム陰性桿菌の一つである。*C. sakazakii* は健康な人にとっては感染症を引き起こすリスクは低いが、乳幼児等においては重篤な感染症を発症することが報告されている。その感染経路として、乳幼児乾燥調製粉乳 (Powdered Infant Formula: PIF) が認識されている。しかしながら、PIF が *C. sakazakii* に汚染される経路については不明な点が多い。

PIF の主成分である脱脂粉乳は噴霧乾燥によって調製される。原料乳から粉末への細菌の移行程度は不明な点が多い。原料乳から粉体への移行動態が解明できれば、粉体における細菌汚染経路の特定につながる。特に PIF の *C. sakazakii* 汚染経路の特定には重要な知見となる。そ

ここで、本研究では噴霧乾燥過程における *C. sakazakii* の生残について詳細に検討した。

## 2.2. 実験方法

Tryptic soy broth 中にて 37°C で定常期にまで培養した *C. sakazakii* (ATCC 12868, ATCC 29004, ATCC 29544, and ATCC 51329) 4 株を混合した懸濁液を殺菌試験に供した。

モデル実験系として、ペプトン溶液 (12.5% w/w) を用いた。*C. sakazakii* をペプトン溶液に  $10^7$  CFU/g 程度接種して噴霧乾燥 (スプレードライヤ ADL311-A, ヤマト科学) に用いた。噴霧乾燥の入口温度を 130°C~200°C まで変化させて、乾燥温度が死滅に及ぼす影響を検討した。スプレードライヤの運転条件は、乾燥空気量を 0.4 m<sup>3</sup>/min, 噴霧空気圧力を 0.6 MPa, 試料送液量を 9~10 g/min とした。

また、原料溶液の溶質濃度の影響を検討するために、種々の濃度のペプトン溶液 (6~40 % w/w) を入口温度 150°C の条件で噴霧乾燥した際の、*C. sakazakii* の生残を検討した。

## 2.3. 結果と考察

スプレードライヤの入口温度が噴霧乾燥時の *C. sakazakii* の生残に及ぼす影響を検討した (Fig. 3)。試験毎のバラツキが大きいが、入口温度の上昇に伴い、菌数の減少が大きくなることを示された。しかしながら、菌数減少量としては 130°C で 1.2 log 程度、200°C まで温度を上昇させた場合でも最大で 2.5 log の低下にとどまっていた。

次に、噴霧乾燥原料となるペプトン溶液中の溶質濃度が *C. sakazakii* の生残に及ぼす影響を検討した (Fig. 4)。入口温度を 150°C に固定した場合、溶質濃度の上昇に伴い、菌数減少量は低下することが明らかとなった。溶質濃度の上昇に伴い、噴霧乾燥時に細菌細胞が受ける熱量が低下したことが原因と考えられる。

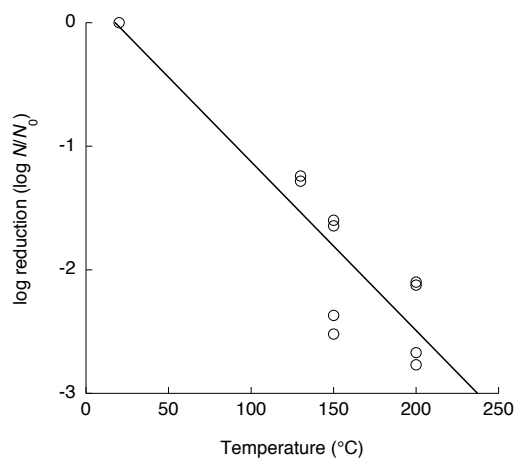


Figure 3 Effect of outlet temperature on the inactivation of *C. sakazakii* in peptone water (12.5 %w/w/) during spray.

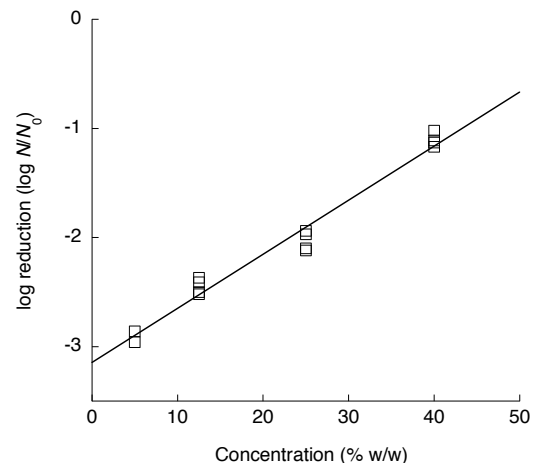


Figure 4 Effect of peptone concentration of the sample on the inactivation of *C. sakazakii* during spray drying at 150°C.

さらに、噴霧乾燥行程中の液滴への熱負荷を推定するために、Computer Fluid Dynamics (CFD)による液滴の乾燥工程のシミュレーションをおこなった。CFD 解析には Fluent (ver. 14.0.0 Ansys) を用いて、 $k-\epsilon$ 乱流モデルによって解析を行った。CFD による解析結果の一例として、噴霧乾燥としてノズルから噴射された液滴の温度変化ならびに液滴からの水蒸気発生量をシミュレートした結果を Fig. 5 に示した。

シミュレーションの結果から、噴霧乾燥行程中における液滴の加熱過程が明らかとなり、噴霧乾燥チャンバーの出口付近にまで到達したところで、 $100^{\circ}\text{C}$ 程度にまで加熱されることが示された。しかし、出口付近に到達するまでには、液滴中の水分は蒸発してしまい(蒸気生成量のシミュレーション結果から)、乾熱で粉体に熱が加わっていることが推察された。

CFD によるシミュレーションの結果から、入口温度  $200^{\circ}\text{C}$ においても、過剰な加熱がなされていないことが示されたことで、図 3 に示したような軽微な菌数減少にとどまったことが示唆された。

したがって、噴霧乾燥過程では液滴が過剰に加熱されないことが改めて示されたことから、殺菌効果は極めて限定的であることが実験および数値シミュレーションの両面から確認することができた。

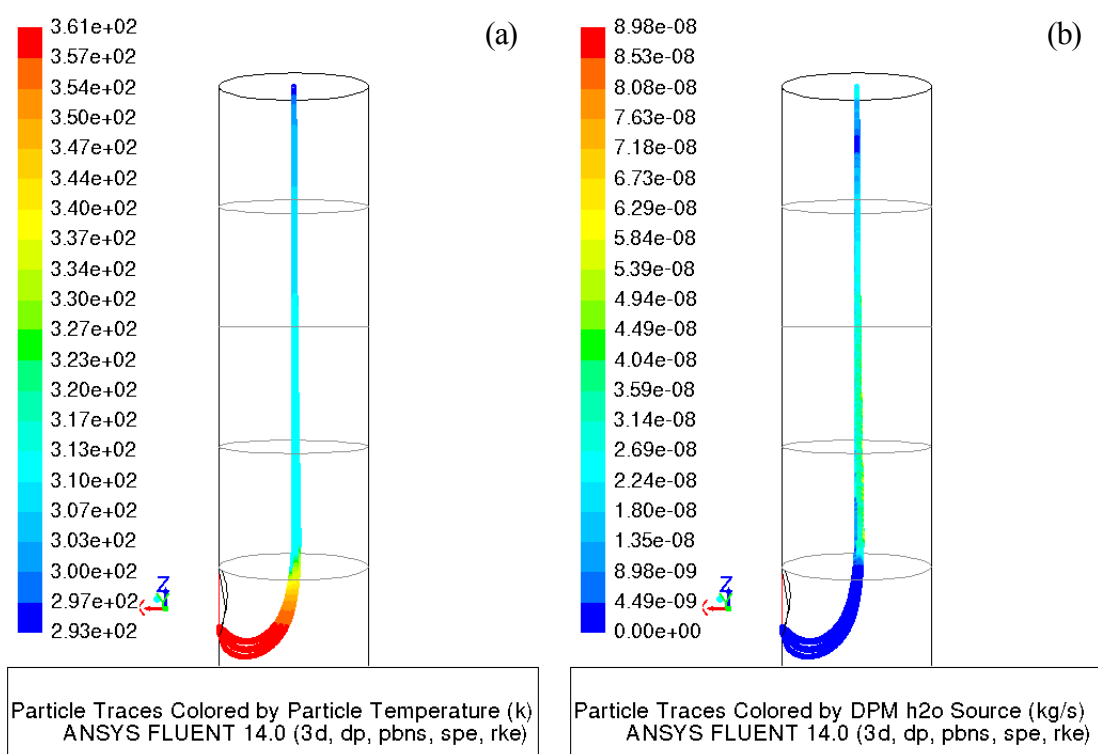


Figure 5. CFD simulation of the particle temperature (a) and the amount of water evaporation (b) during spray-drying at  $200^{\circ}\text{C}$  of the outlet temperature.

平成 23 年度から 24 年度の 2 年間にわたり研究助成を頂き、上記のように粉体中ならびに粉体調製工程における各種病原性細菌の死滅挙動に関する基礎知見を得ることができた。助成を頂きました粉体工学情報センターに記して感謝の意を表します。

### 3. 研究発表

#### 【学会発表】

- 1) 小関成樹, 中村宣貴, 椎名武夫. スプレードライによる*Cronobacter sakazakii* の死滅挙動解析, 日本食品工学会 第13回 (2012年度) 年次大会, p. 38, 2012/8/9, 札幌
- 2) Koseki, S., Nakamura, N., and Shiina, T. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* during spray drying process, 23rd International ICFMH Symposium, FoodMicro 2012, p. 228, 3-7 September 2012 in Istanbul, Turkey.
- 3) 小関成樹, 中村宣貴, 椎名武夫. 乳幼児調製粉乳中における各種病原性細菌の挙動解析, 第33回日本食品微生物学会学術総会, p. 127, 2012/10/26, 福岡

#### 【論文発表】

- 1) Koseki, S. Comparison of desiccation tolerance among *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formulae. (in submission)
- 2) Koseki, S. Analysis of inactivation of *Cronobacter sakazakii* during spray drying process. (in submission)