

食品加工・調理器具への微生物の付着と殺菌剤耐性

徳島大学大学院 生物資源産業学研究所 准教授 金丸 芳

神戸女子短期大学 食物栄養学科 教授 達 牧子

徳島大学大学院 生物資源産業学研究所 教授 横井川 久己男

1 はじめに

微生物は至る所に存在して食品に混入するため、様々な食品製造設備や調理器具に付着し、やがてバイオフィームを形成する。バイオフィームは薬品に対する抵抗性が高く物理的にも強固であるため、通常の洗浄や殺菌では完全除去が困難であり、バイオフィーム形成前の段階で防御することが必要である。微生物の各種素材に対する付着性は、素材表面の物性や汚れの種類、付着環境並びに微生物の生育環境によって異なるため、食品の製造設備に応じて対策が必要である。ここでは、我々の研究成果を中心に、食品加工・調理器具への微生物の付着性について解説する。

2 初期付着細胞の特徴

2-1 初期付着細胞の固体表面での生存性

大腸菌 O157 の懸濁液 (10^2 , 10^4 , 10^6 個/25 μ l) をステンレス (A) 及びガラス (B) 表面 (25 cm^2) に塗り広げ、室温 25°C の安全キャビネット内に置き、風速 0.294 m/s の気流下で自然乾燥に伴う生菌数変化を測定した。牛肉汁を使用

する場合は、50%牛肉汁を含む同じ細胞密度の懸濁液 25 μ l を使用した。実線は牛肉汁を含む細菌懸濁液を塗抹した場合、点線は牛肉汁を含まない細菌懸濁液を塗抹した場合の結果。付着細胞は、超音波洗浄 (38KHz, 20 秒間) で脱離させて平板培養法で計測した。

図 1 に示すように、牛肉汁のない状態での大腸菌は、ステンレス表面での乾燥 1 時間で 1/100 から 1/10000 の細胞数へ低下した。素材の種類によって死滅速度が異なるが、ガラスのように親水性の高い素材は、疎水性の高いステンレスより死滅速度が遅いと思われる。一方、牛肉汁と共に自然乾燥させた場合は、肉汁成分により乾燥しにくく、大腸菌は死滅しにくくなった。この場合も、ガラスよりステンレスの方が死滅しやすい傾向となった。

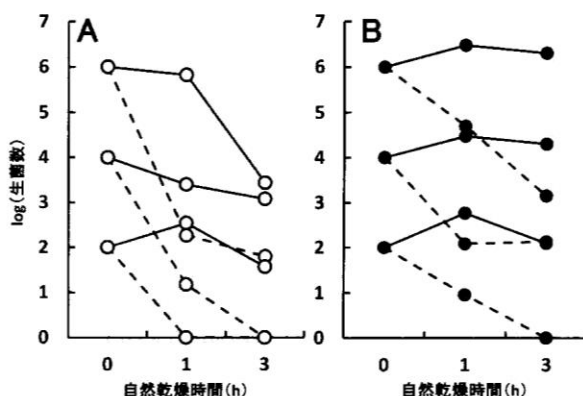


図 1 初期付着細菌の乾燥耐性

2-2 初期付着の栄養環境

一般に、栄養状態の乏しい条件下で、微生物は付着してバイオフィルムを形成する¹⁾。また、付着細胞は浮遊細胞に比べ増殖が極めて遅い。図2は、未殺菌のミネラルウォーターとステンレス片を接触させた際の付着細菌数の経時的変化を示したものである。ステンレス片 (15cm²) を22℃で未殺菌のミネラルウォーター (細菌数 約5個/ml, 全有機炭素量 35ppb) が還元する条件で浸漬し、付着する細菌数を経時的に測定した。栄養がほとんどない環境で細菌は急

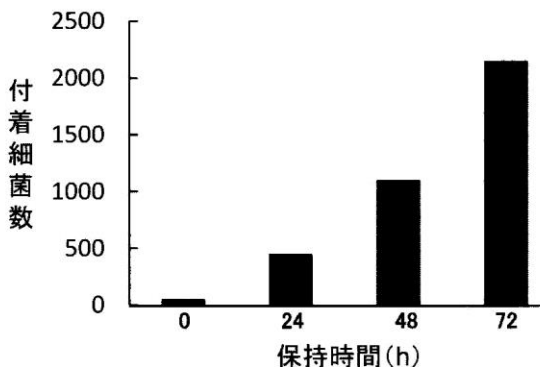


図2 ミネラルウォーターと接触したステンレスの付着細菌数

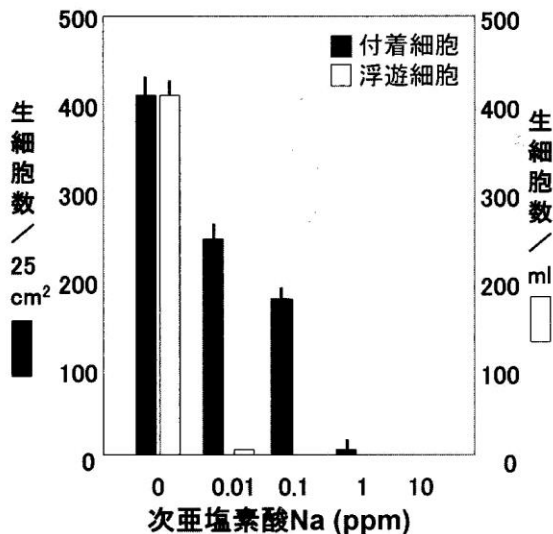


図3 浮遊細胞と初期付着細胞の殺菌剤耐性

速に付着する。従って、食品加工・調理器具を水に漬けることは細菌の付着数を高めバイオフィルムを形成させると考えられる。

2-3 殺菌剤耐性

食品加工・調理器具に形成されたバイオフィルムは極めて高い殺菌剤耐性を示すが、その耐性を獲得する時期は意外に早い。図3は、浮遊細胞とステンレスに付着した直後の大腸菌細胞の次亜塩素酸ナトリウム耐性を示したものである。ステンレス表面に大腸菌懸濁液を室温で30分間接触させて付着した細胞を、各種濃度の次亜塩素酸ナトリウムで25℃、5分間処理した後の生菌数を測定。対照として、0.85%塩化ナトリウム液に懸濁した大腸菌 (浮遊細胞) を使用した。浮遊細胞は、0.01ppmの次亜塩素酸ナトリウムで99%以上が殺菌されるが、付着細胞は付着直後でも99%以上の殺菌効果を得るためには1ppm濃度の次亜塩素酸ナトリウムが必要である。すなわち、付着しただけで次亜塩素酸ナトリウムに対する耐性が約100倍増大したことになる。

そして付着細胞の殺菌剤耐性を、付着後の時

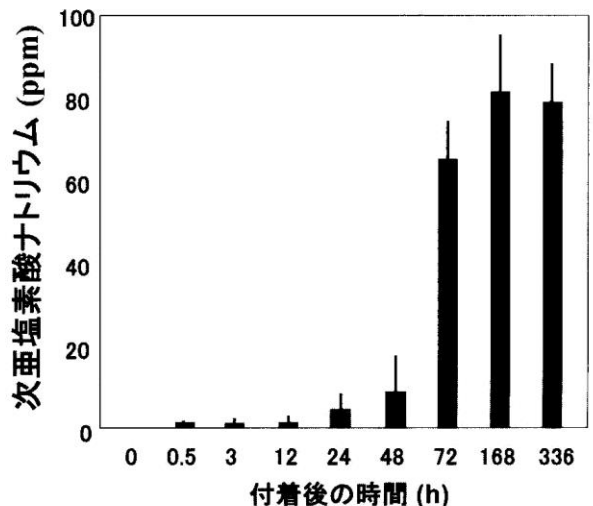


図4 付着後の時間と殺菌に必要な次亜塩素酸ナトリウム濃度

間経過と共にステンレス表面に大腸菌懸濁液を室温で30分間接触させて付着した細胞を、ステンレス片と共に低濃度の栄養培地（0.1%大豆加水分解物、0.05%酵母エキス、0.05%塩化ナトリウム）に25℃で浸漬し、99%以上の殺菌効果を示す次亜塩素酸ナトリウム濃度を経時的に測定した。図4に示すように、殺菌剤耐性は付着時間の経過と共に急激に増大することが分かる。

3 付着性に影響を与える因子²⁾

3-1 食品加工・調理器具の素材

食品加工や調理の目的に応じて種々の素材の器具が使用される。ステンレスは鉄とクロムの

合金であるが、クロムが酸素と結合して不動態皮膜を形成するため錆びにくい。この皮膜は物理的に壊されても、酸素があれば再度形成される。また、加工性、耐熱性、強度においても優れているため、食品加工・調理器具の素材として広く使用されている。アルミニウムは、軽く、耐食性や加工性に優れているため、調理器具や包材等に広く使用されている。チタンは、鉄の約半分の比重で、強度は鉄と同等であり、酸化チタンの不動態皮膜を形成し酸塩基にも耐性となる。そのため、調理器具素材として広く使用されている。ガラスやプラスチックは、安価で様々な形状に加工することが容易である。

これらの素材に対する微生物の付着性を述べる。食品製造設備等の汚れは、微生物汚染を促進すると考えられるが、汚れがない状態でも製

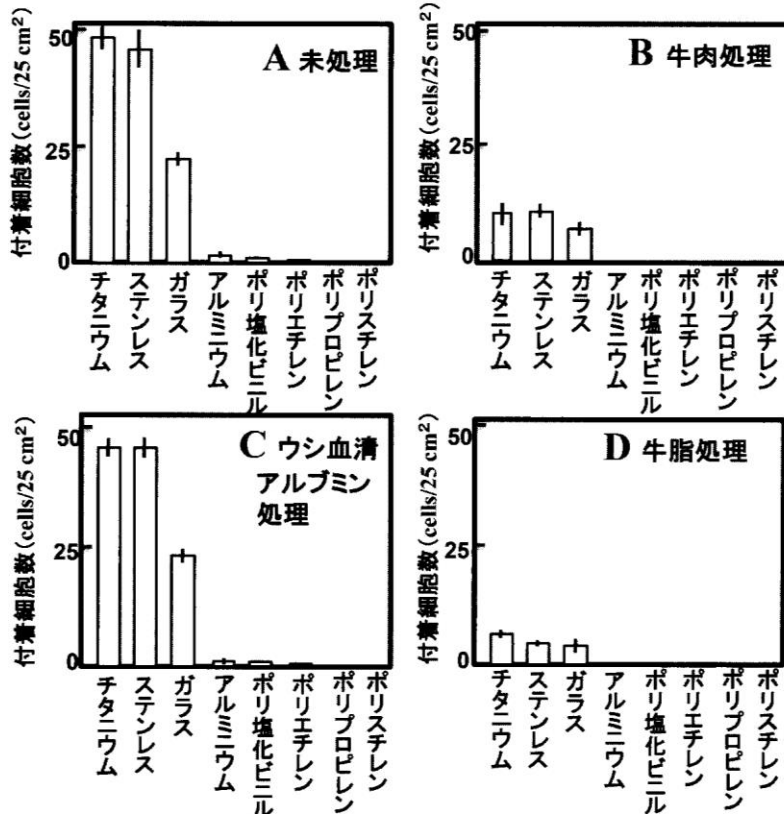


図5 食品加工・調理器具素材に対する大腸菌の付着性

造設備等に対して微生物は付着性を示す。

図5は、大腸菌 O157 (約 100 個 /ml) の懸濁液を各種素材と 25℃ で 30 分間接触させた時の付着細胞数を測定した。各種素材は事前に、以下の A - D の条件で前処理を行った後に使用した。A: 未処理の素材表面, B: スライス牛を素材表面に置き 25℃ で 20 分間放置した後、スライス牛を除き、自然乾燥 (25℃, 20 分間) したもの, C: 牛血清アルブミン (10mg/ml) と 25℃ で 20 分間接触させた素材を自然乾燥 (25℃, 20 分間) したもの, D: 牛脂 (40 μ l/cm²) と 25℃ で 20 分間接触させた素材を自然乾燥 (25℃, 20 分間) したものである。

図 5A は、各種素材に対する大腸菌 O157 の付着性を示したものである。汚れのない未処理の素材に対しても本菌は付着し、付着の高い順番は、チタニウム=ステンレス>ガラス>アルミニウム>プラスチック類となった。これらの傾向は、非病原性大腸菌 (NBRC3301 株, ATCC8739 株) や他の腸内細菌 (クレブシエラ属: *K. pneumoniae* NBRC 14940, *K. oxytoca* ATCC 8724, エンテロバクター属: *E. cloacae* NBRC 12935, シトロバクター属: *C. freundii* ATCC 43864, プロテウス属: *P. mirabilis* ATCC 21100) 並びに乳酸菌 (ラクトバシラス属: *L. casei*, *L. bulgaricus*) においても同様に見られた。

3-2 食品成分～食品加工・調理器具の汚れ～

食品加工・調理器具の汚れは、以下のような問題を引き起こす。①素材の種類と食品成分の組合せにもよるが、一般に汚れは微生物の付着を促進し、バイオフィーム形成の引き金となる。②汚れや匂いが食品へ移行し、食品の品質を低下させる。③設備の腐食・機能低下の原因となる。④汚れは殺菌剤の有効濃度を低下さ

せ、殺菌効率を低下させる。従って、汚れは可能な限り早く除去することが必要である。

まず、脂質やタンパク質の汚れを想定して、素材表面にスライスした牛肉を置き、室温で 20 分間接触させた後に牛肉を取り除いた場合は付着する菌数が低下し (図 5B), 1% 牛血清アルブミン溶液 (40 μ L/cm²) と接触させた後に室温で 20 分間自然乾燥させた場合は未処理と付着菌数に違いが見られず (図 5C), また加熱溶解した牛脂 (40 μ L/cm²) と接触させた後に室温で 20 分間放置した場合は最も低い付着菌数となった (図 5D)。以上のことから、食肉成分の汚れにより付着菌数が増加することはないと考えられた。ただし、汚れはバイオフィームの形成を促進することに留意すべきである。

3-3 微生物の生育温度が付着性に与える影響

大腸菌 O157 は低温で培養すると、酸に対する耐性が低下することを我々は報告した³⁾。付着についても、培養温度が影響すると考え、いくつかの温度で培養した大腸菌 O157 の付着性を調べた。図 6 は、異なる温度で生育した大腸菌 O157 のステンレス、チタン、ガラスに対する

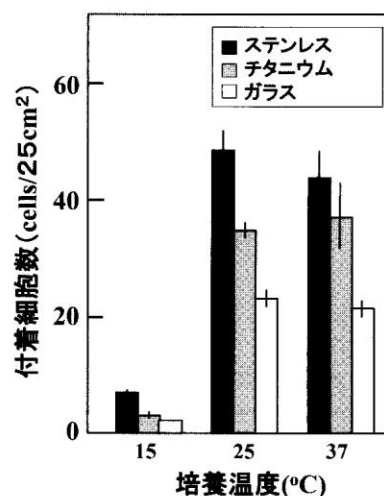


図 6 大腸菌の生育温度が付着性に与える影響

る付着性を示したものである。大腸菌 O157 を、15℃、25℃、37℃で生育させた後、それぞれを約 100 個 /ml の細胞密度に調整し、各種素材と 25℃で 30 分間接触させ、付着細胞数を測定した。

明らかに、15℃で生育した菌は付着性が低下している。この理由の一つとして、大腸菌の運動性が低温では増大することが考えられる。また、大腸菌細胞の表層には粘着性カーリ（繊毛）と呼ばれる繊維状構造物が存在し、細胞や組織への付着性に関与することが報告されているが、その量は低温で増大することが知られているため、食品加工・調理器具への付着には関与しないと考えられる。

3-4 細菌のクオラムセンシングと付着性

ある種の細菌類は、自らの細胞集団の密度や他の細胞の密度を感知するシステム（クオラムセンシング）をもっている。大腸菌は自らの細胞密度を知るためにインドールを産生し、その濃度によって自らの細胞密度を感知している。

また、他のグラム陰性菌が自らの細胞密度を知るために産生するアシルホモセリンラクトンを感じ取る能力も大腸菌は備えている。

アシルホモセリンラクトン類は大腸菌のバイオフィーム形成を抑制するという報告もある⁴⁾が、付着性に与える影響については報告がなかった。そこで、各種アシルホモセリンラクトンの存在下で、大腸菌 O157 の付着性を調べた（図 7）。大腸菌 O157 を、50μM 濃度の各種アシルホモセリンラクトン（AHL）を含む栄養培地で 37℃2 時間培養した後、0.85% 塩化ナトリウム溶液で細胞を洗浄し、100 個 /ml の細胞密度でステンレス片に接触させ（25℃、30 分間）、付着細胞数を測定した。その結果、N-ヘキサノイル-DL-ホモセリンラクトンを添加した場合には付着性が抑制され、大腸菌 O157 の付着性が他の細菌の存在によって影響を受けることが判明した。

4 おわりに

微生物は至る所に存在し、微生物が混入していない食品はほとんどない。食品と接触する製造機械や調理器具は、微生物とも頻繁に接触する。微生物は小さく、その存在を肉眼で認識することは困難であるが、ステンレスなどに付着した微生物がフィルム状になったバイオフィームは、ヌメリとして容易に認識できる。また、バイオフィームを完全に除去することは困難であり、落としきれない一部が、再度バイオフィームを容易に形成させる繰り返しとなる。微生物が付着できない素材もやがて開発されると思われるが、初期の付着細胞は容易に除去できるため、洗浄や点検等の日常の保守管理が極めて重要と思われる。

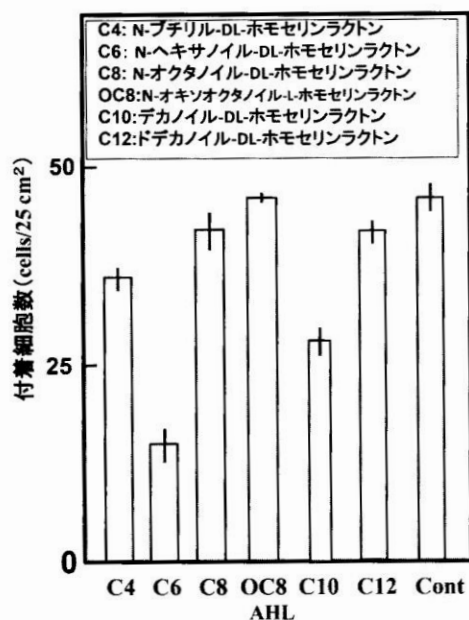


図 7 大腸菌の付着性に対するアシルホモセリンラクトン類の影響

■参考文献

- 1) Florjanić M and Kristlb J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *Int J Pharm*, 405, 16-22 (2011).
- 2) Tsuji M and Yokoigawa K. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to abiotic surfaces of cooking utensils. *Journal of Food Science*, 77 (4), 194-199 (2012).
- 3) Yokoigawa K, Takikawa A, Okubo Y, Umesako S. 2003. Acid Tolerance and *gad* mRNA Levels of *Escherichia coli* O157:H7 Grown in Foods. *Int J Food Microbiol* 82:203-211 (2003).
- 4) Lee J, Jayaraman A and Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology* 7:issue 42. (2007).