

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月14日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580289

研究課題名（和文） 予測微生物学的手法による食品流通システムの衛生管理

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF PREDICTIVE MICROBIOLOGY TOOLS FOR EVALUATING FOOD SAFETY IN AGRI-FOOD CHAIN

研究代表者

田中 史彦（TANAKA FUMIHIKO）

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：30284912

研究成果の概要（和文）：本研究は、予測微生物学的手法とコンピュータ・シミュレーション手法を融合することによって食品の微生物的リスクを分析・評価し、Agri-Food Chainにおける安全性確保の高度化を目指すものである。本研究では、微生物的リスクを低減する要素技術の開発とリスク分析・評価について考究した。具体的には、(1)青果物の紫外線・赤外線照射による初発菌の抑制と相乗殺菌効果の解明、(2)マルチエージェントシステムによるバイオフィーム形成パターンの解析、(3)CFDによる生産・流通システムの空調衛生管理についてである。一連の研究を行うことで、食品流通システムにおける衛生管理をより高度化した。

研究成果の概要（英文）：Microbial food safety has been a growing consumer concern over the last ten years. In order to enhance microbial food safety and improve food quality, some predictive microbiological models were developed as follows: (1) inactivation of microorganism by using ultra violet and infrared irradiation and investigation of the UV-IR synergy effect on microbial inactivation, (2) modeling of biofilm formation by using multi-agent system, and (3) optimization of food supply system by means of CFD approach.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：食品安全、予測微生物学、シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

食品流通のグローバル化が進むなか、農場から食卓に至るまでの各段階で食の安全を確保するための要素技術の開発とそれらを統合した安全体系の確立、ならびに、これを確実に機能させるための管理プログラムの開発と人材育成が求められている。食の安全先進社会である欧米では、食品の衛生管理を機能させる上で不可欠となる ISO22000 や SQF1000/2000、GAP などの国際規格を整備・開発し、これに基づく安全確保と経営リ

スク管理、国際流通戦略の強化に努めており、安全管理には資金投入が必要であるという認識が浸透している。一方で、これを支えるべき食品の安全性向上に資する技術開発とその体系化は大幅に立ち遅れているのが現状である。周知のとおり、食品の安全を確保する上で最もリスクが高いとされるものは有害微生物の繁殖による人体への危害である。予測微生物学的手法により微生物の成長段階に応じたリスク評価を行い、安全を確保するための支援システムの開発が急がれて

いるが、実用に資する研究開発は不十分である。そこで、本研究では、予測微生物学的手法とコンピュータ・シミュレーション手法を融合することによって食品の微生物的リスクを分析・評価し、Agri-Food Chainにおける安全性確保を支援するため、以下の研究を遂行した。すなわち、(1)青果物の紫外線・赤外線照射による初発菌の抑制と相乗殺菌効果の解明、(2)マルチエージェントシステムによるバイオフィーム形成パターンの解析、(3)CFDによる生産・流通システムの空調衛生管理である。

2. 研究の目的

本研究は、農場から食卓に至るまでのAgri-Food Chainにおける微生物の成長・死滅、微生物が共生する複雑な系（バイオフィーム）の形成過程を予測するコンピュータ・シミュレーション法を確立し、これを基礎とした食の安全を支えるための要素技術を開発することを目的とする。個別に発展してきた予測微生物学と数値シミュレーション技術を融合することによって、有害な微生物の食品や機器への付着から成長、失活、除去までの一連の過程を予測し、リスク除去に生かす。具体的には、赤外線と紫外線の併用によりその殺菌効果が飛躍的に増進する電磁波殺菌法（収穫直後）、危害性の高いバイオフィームの形成解析（貯蔵・流通）、貯蔵施設内での微生物的リスク評価について考究し、食の安全を基軸とする流通システムの高度化を目指す。

3. 研究の方法

(1)青果物の紫外線(UV)・赤外線(IR)照射による初発菌の抑制と相乗殺菌効果の解明

①UV・IR照射装置の開発と相乗殺菌効果の解明

UV・IR相乗効果 UV・IR照射による相乗殺菌効果を確認するために、福岡県産イチジク(柳井ドーフィン)から分離した菌をSTD培地に塗布し、電磁波照射殺菌試験を行った。IR ($1.87 \mu W cm^{-2} nm^{-1}$) 15秒照射区、UV ($0.455 mW cm^{-2}$)15秒照射区、IR15秒+UV15秒照射区、IR30秒+UV30秒照射区および無照射区を設定し、培養6日目の菌の状況を観察した。また、加熱がUV殺菌に与える影響を確認するため、IR照射によって20~50°Cに昇温した後、UVを60秒照射したときの *Bacillus subtilis* 芽胞の殺菌効果について実験的に明らかにした。

UV照射後の光回復 *Escherichia coli* NBRC3301 (*E. coli*)、*Pseudomonas fluorescens* NBRC13922 (*P. fluorescens*)、*Staphylococcus aureus* NBRC10990 (*S. aureus*)、*Bacillus subtilis* NBRC3134 (*B. subtilis*) 菌懸濁(濃度約 $10^6 cfu ml^{-1}$)にUV

-Cを照射(強度 $0.550 mW cm^{-2}$)し、5°Cのインキュベータに0、24、48、72h暗所保管した。その後、UV-Aを照射することによって、光回復の度合いを調査し、暗所保管時間、照射時間との関係を明らかにした。

②数値流体力学(CFD)アプローチによるUV・IR照射殺菌モデルの構築

IR照射モデル CFDによるIR加熱予測モデルを構築した。本モデルは、流体の流れを支配する連続の式、運動量の式、エネルギーの式から構成され、また、固体表面間の輻射による熱移動をMonte Carlo法によって解析するものである(Travittayasil *et al.*, 2011)。さらに、被加熱体の水分蒸発による熱損失を考慮した見かけの比熱モデルを導入することによって、より正確な温度変化を予測した。図1に、PDA培地を被加熱体としたIR照射加熱モデルとメッシュ処理を施した結果(メッシュ数約220,000)を示す。装置上部にカバー(放射率0.04)付IRヒータ(放射率0.89)を設置し、ヒータから90、110、130、150mmの距離にPDA培地(放射率0.98)を置いたときの培地表面温度の経時変化を予測した。

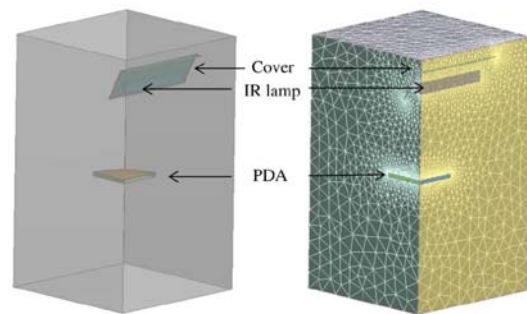


図1 IR加熱装置の概略

このモデルと殺菌モデルを組み合わせることによって4種類の菌 (*Botrytis cinerea*、*Cladosporium sp.*、*Monilinia fructigena*、*Penicillium sp.*) の殺菌時間を算出した。

$$\frac{dN}{dt} = -k_{ref} \exp \left\{ \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \right\}$$

ここで、 N : 菌密度、 t : 時間、 k_{ref} : 参照殺菌速度定数、 E_a : 活性化エネルギー、 R : 気体定数、 T : 温度、 T_{ref} : 参照温度である。表1に殺菌時間の計算に用いたパラメータを示す。

表1 殺菌速度式のパラメータ

	k_{ref}, s^{-1}	$E_a, kJ mol^{-1}$	T_{ref}, K
<i>Cladosporium sp.</i>	4.08×10^{-2}	259	316
<i>Penicillium sp.</i>	9.05×10^{-2}	63.7	326
<i>Botrytis cinerea</i>	2.05×10^{-3}	336	316
<i>Monilinia fructigena</i>	5.98×10^{-3}	425	316

UV 照射モデル DO モデルによる UV 照射モデルを構築した。流体の流れを解析する方法は IR 照射モデルと同様である。照射解析について、IR 照射モデルでは MC 法によって照射 photon の追跡を行い、固体表面間の熱移動を解析したが、UV 照射モデルでは球状のデカルト座標系においてそれぞれの方向ベクトルと関連した有限数の立体角に対して輻射輸送伝達方程式を解き、照射分布を予測する DO モデルを用いて解析した。このため、計算時間が短縮された。イチゴを市販の輸送容器（商品名‘ゆりかご’、3個×3個詰、紫外線透過率 0.76）に詰め、UV-C によって上下から照射殺菌する際の装置の概略を図 2 に示す。ランプからの照射距離は上下方向からそれぞれ 150、131mm とした。ランプ数を 2、4、8 本としたときのイチゴ表面における照度分布を予測した。

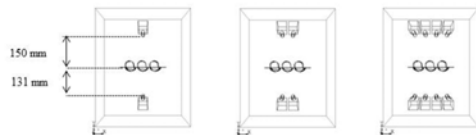


図 2 UV-C 照射モデルの概略

(2) マルチエージェントシステムによるバイオフィーム形成パターン解析

セルオートマトン法を用いることによってバイオフィーム(BF)形状シミュレーションを行った。セルオートマトンは格子状のセルで構成されている。各セルは有限種類の内部状態を持ち、時間の経過とともに内部状態は変化していく。また、ここでの時間は離散的なものであり、時刻 $t+1$ におけるひとつのセルの内部状態は、時刻 t におけるセル自体および近傍のセルの内部状態と系に適用された規則によって決定される。ここでは、格子状のセルを BF 形成の場、すなわち、付着表面とし、各セルに内部状態とし、BF 量、栄養基質量、EPS 量の値を格納できる 2 次元セルオートマトンとしてモデルを構築した。本モデルは、Xavier *et al.*, 2009)の方法を改良して構築したもので、細胞増殖、基質消費、EPS 産生といった微生物的挙動を表現するシステムと栄養素の拡散、流入といった環境の変化を表現するシステムを含む。詳細は学会発表③、⑦を参照されたい。

(3) CFD による生産・流通システムの空調衛生管理

貯蔵施設内における温湿度環境を知ることが微生物管理にとって不可欠な課題である。ここでは、貯蔵施設内温湿度分布を予測する CFD モデルを構築し、微生物が発生しやすい位置の特定を行うことでリスク管理に役立つツールを開発した。CFD モデルは空

気と調湿装置から施設内に供給される水蒸気の混合気体の流れを解析の対象とするものである。図 3 に解析に用いた貯蔵庫システム(前川製作所製、3.47m×2.33m×2.13m)の概略を示す。庫内には温湿度制御用の冷凍機ならびに調湿装置(超微細ミスト発生装置)が設置されている。冷凍機吹出口および調湿機吹出口風速および温度を実験によって測定し、inlet 境界条件とした。なお、吹出口風速はファン境界条件によって設定した。両装置の流入口をゼロ圧力の outlet 境界条件とし、物理表面はすべて non-slip 境界条件とした。また、壁からの熱貫流を仮定し、熱移動を解析した。表 2 に解析に用いた条件を示す。

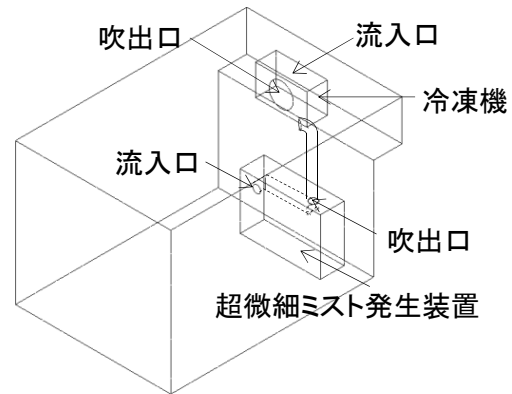


図 3 低温高湿貯蔵庫の概略

表 2 CFD による庫内温湿度解析条件

解析手法	非定常乱流解析	
計算ステップ	1 秒	
コンテナ壁熱貫流率	$5.10 \times 10^{-1} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$	
水蒸気供給速度	$6.53 \times 10^{-2} \text{ kg m}^{-3} \text{ s}^{-1}$	
コンテナ外部温度	298 K	
圧力上昇値	冷凍機	40 Pa
	超微細ミスト発生装置	450 Pa
初期条件	コンテナ内部温度	298 K
	水の質量分率	1.20×10^{-2}

4. 研究成果

(1) 青果物の紫外線・赤外線照射による初発菌の抑制と相乗殺菌効果の解明

① UV・IR 照射装置の開発と相乗殺菌効果の解明

UV・IR 相乗効果 図 4 にイチジク由来菌の UV・IR 照射殺菌結果を示す。図は殺菌処理後 6 日間培養した菌の発生状況であるが、併用照射では単独照射に比べ殺菌効果が高いことが示された。特に、IR30 秒+UV30 秒照射区においてその効果が顕著であった。

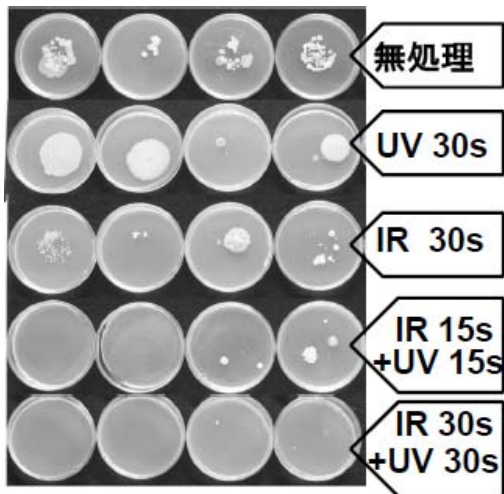


図4 IR+UVの相乗殺菌効果

IR照射によって20~50℃に昇温した後、UVを60秒照射したときの*Bacillus subtilis*芽胞の殺菌効果については、IR照射によって培地温度を50℃まで昇温し、UVを60秒照射すると生菌数が4.1log減少した。IRによる昇温は20~50℃としたが、30℃昇温時が最も殺菌効果が低くなった。

UV照射後の光回復 *E. coli*のみについて顕著な菌の回復が認められ、照射時間と生存率は次式で表すことができた： $dS/dt = k(S_m - S)$ 。ここで、 S は生存率、 t はUV-A照射時間、 k は光回復速度定数、 S_m は最大光回復生存率である。暗所保管期間が長くなるほど光回復速度定数 k は増加する傾向を示しが、 S_m は減少した($p \leq 0.05$)。UV照射後に暗所保管すれば*E. coli*の回復を抑制できることが明らかとなった。本結果から、青果物をUV照射によって殺菌した後、直ちに暗所保管・流通すれば光回復が抑制され、棚保ち期間の延長につながることを示された。

②数値流体力学(CFD)アプローチによる

UV・IR照射殺菌モデルの構築

IR照射モデル IR加熱予測モデルによる温度予測精度は蒸発を仮定した場合と仮定しない場合でそれぞれ1.15℃、1.79℃となり、見かけの比熱を仮定した蒸発モデルの有用性が確認された。図5に本モデルを用いて予測した4種類の微生物の殺菌時間と照射距離、培地表面温度の関係を示す。菌密度が2log、3log、4log、5log減少する時間をそれぞれ、*、◆、■、▲で示した。例えば、農産物の耐熱温度を50℃と仮定したとき、品質に影響を及ぼさず*Cladosporium sp.*を2log減らすためにはヒータとの距離を110mm以上離して処理する必要があることが分かる。

UV照射モデル 図6にUV-Cランプ本数を2、4、8本とした場合のイチゴ表面におけるUV照射強度分布の計算結果を示す。図から明らかのように、本数の増加に伴い照射強度

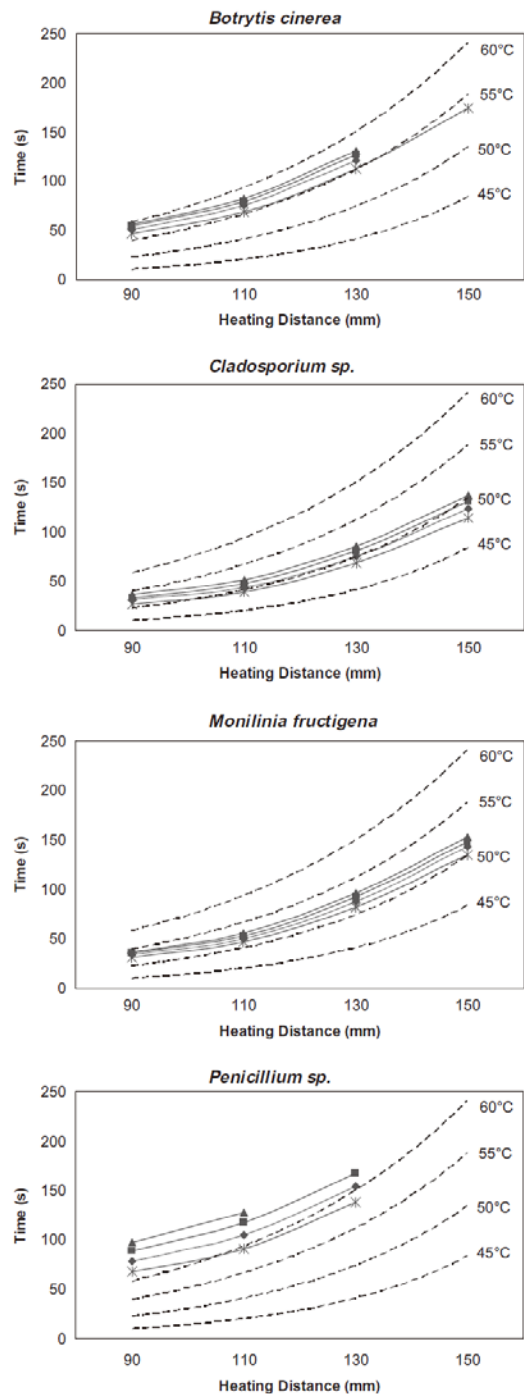


図5 IRモデルによって予測された殺菌時間と照射距離、培地表面温度の関係

分布の幅は広がる結果となった。分布幅を小さくする方法として、上下それぞれに設置したランプ間の距離を300mmとしたとき未照射部位が0%かつ紫外線強度範囲が最小となり、より均一な分布に近づいた。ここで、イチゴ表面における照射強度 $I(x,y,z)$ が算出されたことから、これをもとに各部位における照射量を算出すれば、殺菌予測が可能となると考える。

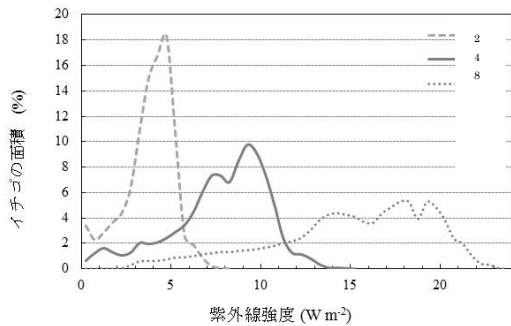
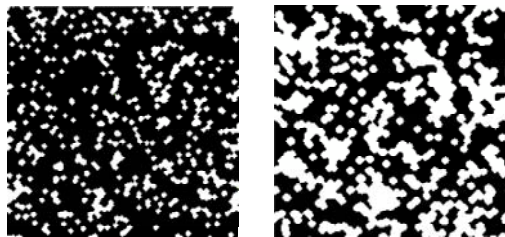


図6 UV-C ランプ本数(2、4、8)とイチゴ表面における UV 強度分布の関係

(2)マルチエージェントシステムによるバイオフィーム形成パターンの解析

図7に EPS 産生量 E_p を 0.2 および 0.8 としたときのシミュレーション結果を示す。なお、初期付着菌数 I_0 は 500(seeds)とした。図から、EPS 産生量 E_p が小さい場合、BF が十分に発達せず、また、EPS 産生量 E_p が大きいと枝状のパターンを形成することが確認された。このことから、EPS 産生量 E_p は、BF 形状に影響を及ぼすことが示され、EPS 産生量 E_p が大きいほど BF が発達しやすいことがシミュレーションにより確認された。



(a) $E_p = 0.2$ (b) $E_p = 0.8$

図7 MA システムによる BF 形成シミュレーション(EPS 生産量の影響)

(3)CFD による生産・流通システムの空調衛生管理

図8に冷凍機システム起動から 60 分後の貯蔵庫中央断面における(上図)庫内温湿度分布の計算結果を示す。中図に示すように相対湿度は貯蔵庫奥(右側)で 87%以下になるものの、青果物を積載する庫内中央部で 87~90%前後の値を示した。本シミュレーションでは調湿装置の停止条件を相対湿度 90%としたため、蒸散を抑制する条件である 95%以上には至っていないが、この改善は可能である。下図に示した温度分布から、吹出口付近温度は低くなるものの庫内中央部付近では温度ムラが無く、5℃前後で均一の冷却が可能であることが確認された。計算の結果、庫内温湿度分布は均一で、かつ、安定することが分かり、微生物汚染の原因となる結露の発生が

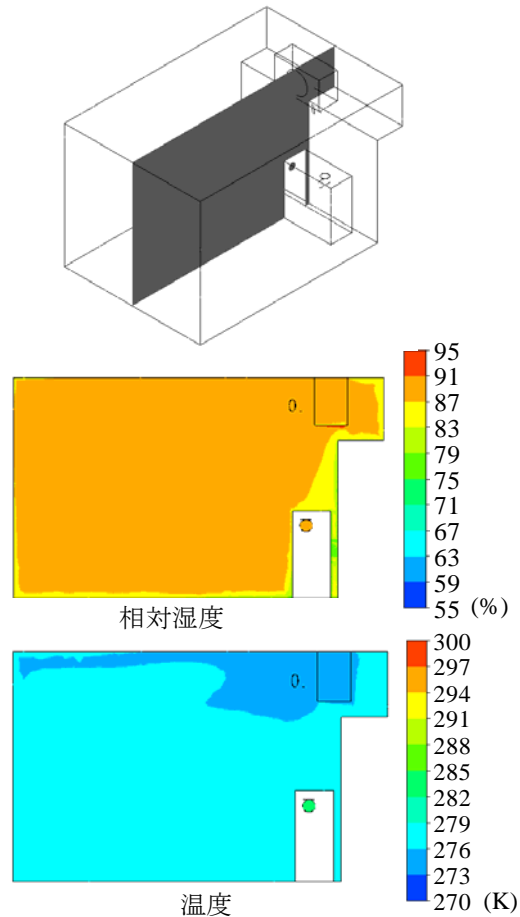


図8 貯蔵庫内温湿度分布の予測結果

抑えられることが明らかとなった。今後は、積荷を積載した際の温湿度分布予測を行うとともに、最適な積付法についても検討して行く必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① 内野敏剛、農産物の物理的殺菌、農業機械学会誌、査読無、75(2)、2013、56-61.
- ② Hamanaka, D., Onishi, M., Genkawa, T., Tanaka, F., Uchino, T., Effects of temperature and nutrient concentration on the structural characteristics and removal of vegetable-associated *Pseudomonas* biofilm. Food Control, 査読有, 24(1-2), 2012, 165-170.
- ③ 渡邊建士、田中史彦、内野敏剛、液相-バイオフィーム間の物質移動を考慮したシミュレーションモデルの構築、日本食品科学工学会誌、査読有、58(7)、2011、318-323.
- ④ Hamanaka, D., Yamada, H., Trivittayasil,

V., Kadoyanagi, T., Tanaka, F., Uchino, T., Effect of different heat treatment on *Bacillus subtilis* spores inactivation by ultraviolet irradiation. Food Science and Technology Research, 査読有, 17(4), 2011, 289-293.

- ⑤ Hamanaka, D., Norimura, N., Baba, N., Mano, K., Kakiuchi, M., Tanaka, F., Uchino, T., Surface decontamination of fig fruit by combination of infrared radiation heating with ultraviolet irradiation, Food Control, 査読有, Vol. 22, No.3-4, 2011, 375-380.
- ⑥ Trivittayasil, V., Tanaka, F., Uchino, T., Investigation of deactivation of mould conidia by infrared heating in a model-based approach, Journal of Food Engineering, 査読有, Vol. 104, No. 4, 2011, 565-570.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Vipavee, T., 田中史彦, 内野敏剛, 濱中大介, DO モデルによるイチゴの紫外線照射分布予測、農業環境工学関連学会合同大会、2012年9月12日、宇都宮大学.
- ② Vipavee, T., Tanaka, F., Uchino, T., Effects of infrared heating intensity on microbial deactivation on fig surface using CFD simulation, International Conference on Agricultural Engineering, 4th, April, 2012, Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- ③ 田中史彦, 渡邊建士, 内野敏剛, バイオフィルム形成シミュレーションモデルの構築、第70回農業機械学会年次大会、2011年9月27日、弘前大学.
- ④ Vipavee, T., Tanaka, F., Uchino, T., Modeling of UV dose distribution on fresh fruits for surface decontamination, 第70回農業機械学会年次大会、2011年9月27日、弘前大学.
- ⑤ 黒木禪, 田中史彦, 内野剛敏, CFDを用いた青果物における冷却最適化、第70回農業機械学会年次大会、2011年9月27日、弘前大学.
- ⑥ 久保苑加, 田中史彦, 内野敏剛, 紫外線殺菌処理後の微生物増殖挙動の把握、第65回農業機械学会九州支部例会、2011年8月26日、沖縄県男女共同参画センター.
- ⑦ 渡邊建士, 森松和也, 田中史彦, 内野敏剛, 濱中大介, シミュレーションモデルを用いたバイオフィルム形成メカニズムの検討、第69回農業機械学会年次大会、2010年9月15日、愛媛大学.
- ⑧ Vipavee, T., Kadoyanagi, T., Tanaka, F.,

Hamanaka, D., Uchino, T., Inactivation modeling of moulds by IR heating as a surface decontamination technique、第69回農業機械学会年次大会、2010年9月15日、愛媛大学.

[その他]

ホームページ等

九州大学大学院農学研究院生産流通科学研究室ホームページ

<http://www2.bpes.kyushu-u.ac.jp/~www-postharvest/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 史彦 (TANAKA FUMIHIKO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：30284912

(2) 研究分担者

内野 敏剛 (UCHINO TOSHITAKA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70134393

(3) 連携研究者

濱中 大介 (HAMANAKA DAISUKE)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：60399095