

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580297  
 研究課題名（和文）予測微生物学的手法による食料生産システムの体系化に関する研究  
 研究課題名（英文）DEVELOPMENTS OF SAFE FOOD PRODUCTION SYSTEM BASED ON PREDICTIVE MICROBIOLOGY  
 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）：本研究では、食品や農産物を生産流通させる工程で、いかに微生物を制御しリスクを低減させるかを目的に、これを支える要素技術の開発と微生物リスク評価を行う方法について考究した。具体的には、(1)微生物リスク低減化のための貯蔵施設内空調設計、(2)確率予測微生物学モデルの開発、(3)微生物付着・成長のパターンの観察と解明、(4)微生物の除去・失活に有効な技術の開発を行うことで、食料生産流通システムの安全確保技術の開発とその体系化を行った。

研究成果の概要（英文）：Food safety is a public concern increasing in recent years. For achievement of microbiological food safety, the combination of predictive microbiology and heat transfer modeling is an emerging and important new field with broad applications to the food processing industries. Based on the concept of dynamic prediction, we developed some food safety assessment tools in food processing as follows: (1) development of design optimization method for cold store from a food safety standpoint; (2) development of a stochastic prediction model for microbial growth/inactivation; (3) investigation of biofilm formation on food processing surfaces; (4) development of microbial inactivation and removal methods in food processing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
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：食の安全、予測微生物学、リスク分析、リスク除去、リスク評価、数値流体力学（CFD）、シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

食の安全・安心は 21 世紀を貫く重要課題

であり、快適で健康な社会を根底から支えるためにも、食生産システムにおける安全性を

確保するための早急なる技術体系の確立が求められている。これまで我が国の食生産システムは、食料供給力及び品質の向上を目指した機械による自動化と効率化によって高度化されてきた。しかしながら、今後、食生産システムの高度化を推進する上においては、生産性及び品質向上の方向性を堅持しつつも、食の安全・安心確保という新しい基軸を組み込む必要に迫られている。農場から食卓に至るまでの食の安全を確保する各種要素技術の開発とこれらを統合した安全管理システムの体系化を図らなければならない。このためには、システムアプローチの立場から食品の微生物的リスクを分析し、安全性を評価するエキスパートシステムの開発が必須となる。微生物が食品等に付着し、複雑な系（バイオ・フィルム）を形成して行く過程や除去・失活などの生態的挙動をコンピュータ・シミュレーションにより予測し、科学的根拠に裏付けされたリスク評価を行うことが、安全を基軸とする食生産システムの高度化につながると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、微生物の成長・死滅の動的予測シミュレーション技法の開発と微生物の生態的挙動解析、微生物的リスク除去技術の開発に至る多面的アプローチによって、食の安全を基軸とする食生産システムの高度化を目指したものである。これら一連の研究で得られた成果をもとに、食の安全性の確保に必要な個別要素技術の開発と統合化に努めた。

本研究では、実験とコンピュータ・シミュレーションにより、微生物の挙動を定量化・予測し、微生物リスクの評価を行うことを目的とした。具体的には、次の4点について多面的なアプローチを行った。すなわち、(1)微生物リスク低減化のための貯蔵施設内空調設計、(2)確率予測微生物学モデルの開発、(3)微生物付着・成長のパターンの観察と解明、(4)微生物の除去・失活に有効な技術の開発である。以下に、それぞれの研究について目的を記す。

### (1) 微生物リスク低減化のための貯蔵施設内空調設計

食品や農産物貯蔵施設内の空調の最適化に資する熱物質移動モデルを構築し、微生物の増殖を抑制するための最適冷却法について検討する。結露の発生の原因となる温度ムラや空気流れ淀みの発生を防止することにより腐敗や食中毒の原因となる微生物増殖を抑えるための空調設計を行う。

### (2) 確率予測微生物学モデルの開発

確率予測微生物学的予測技術の導入により、微生物の確率的振る舞いを予測する。本手法の確立により、例えば生菌数の評価を平均値としてのみではなく、最大・最小生菌数

でリスク評価するツールを作成する。

(3)微生物付着成長のパターンの観察と解明  
食品や食品機器表面に形成されるバイオ・フィルムの構造を観察し、形成パターンを明らかにするとともに、モンテ・カルロ法による成長予測を行う。

(4)微生物の除去・失活に有効な技術の開発  
電磁波加熱による殺菌モデルを構築するとともに、洗浄によるバイオ・フィルム除去について検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 微生物リスク低減化のための貯蔵施設内空調設計

低温貯蔵庫内の気流・温度解析については、3次元超音波風速計、熱電対を接続した温度データロガーにより実測を行うとともに、数値流体力学を駆使して庫内温度、積荷温度、風速分布変化の予測を行い、モデルの妥当性を検証するとともに、微生物の繁殖しやすい部位やこの回避について検討した。予測モデルの開発では、ナビエ・ストークス方程式と連続の式およびエネルギー収支式から構成される方程式群を数値解析的に解き、空気流れを算出した。一方、庫内に積付けされた食品表面と流体間での熱の授受解析には共役条件を用い、内部における熱移動は熱伝導方程式を解くことにより予測した。なお、乱流解析には標準  $k-\epsilon$  モデルを用いた。微生物的リスクを低減化するためには、速やかかつ均一な冷却が望まれるため、温度ムラの発生しにくい食品の積付法についてもモデルシミュレーション法により検討した。図1に実験に用いた低温貯蔵庫の概略図を示す。貯蔵庫はふたつの吹出口とひとつの吸込口を持つ。境界条件となる吹出口には測定で得られた風速データを当てはめ、吸込口は自由開放条件とした。壁面からの熱流束は予備実験により決定した。図2にモデル食品容器を積荷した6つの積付パターンを示す。積付法の違いによる冷却速度、冷却ムラノ発生を調査することで微生物的リスクの低減を検討した。

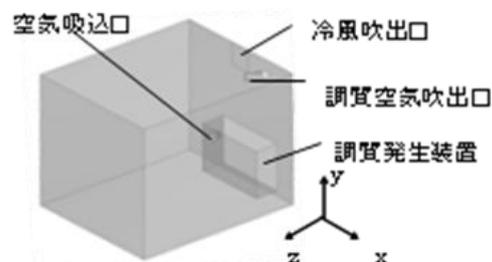


図1 貯蔵装置の概略

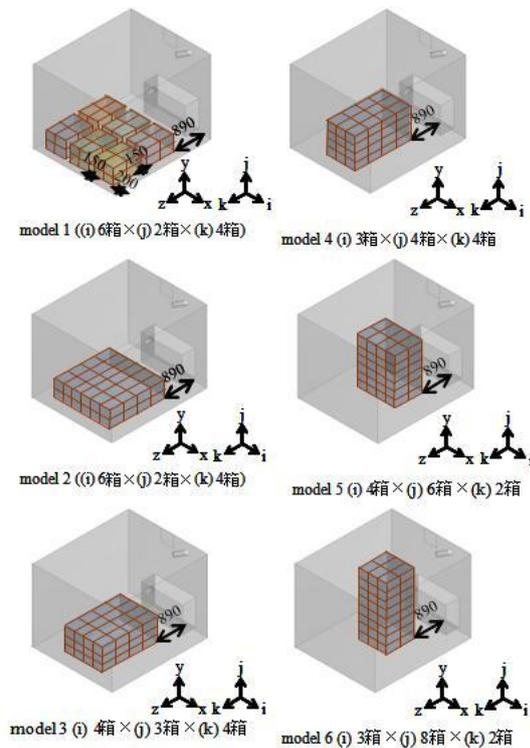


図2 モデル食品容器の積付パターン

## (2) 確率予測微生物学モデルの開発

環境要因が微生物の成長に与える影響を実験的に明らかにし、このデータを基に統計処理によって改良型 Gompertz モデルの速度論的パラメータを整理した。

$$\log N = A + (N_{\max} - A) \exp \left\{ - \exp \left[ - \left( \frac{R_G e}{N_{\max} - A} \right) (t_L - t) + 1 \right] \right\}$$

ここで、 $N$ : 菌数、 $A$ : 初菌数対数値、 $N_{\max}$ : 最大菌数、 $R_G$ : 最大増殖速度、 $t_L$ : 誘導期。パラメータ  $N_{\max}$ 、 $R_G$ 、 $t_L$  には確率的なばらつきが含まれる。このため、統計処理によってパラメータ毎の確率分布関数を決定し、確率モデルによる微生物挙動予測を行った。対象菌として病原性 *Bacillus cereus* NBRC13494 を選び、確率予測モデルによる *B. cereus* の成長予測を行った。本予測では、改良型 Gompertz モデル中の速度論的パラメータを確率分布関数に従うようにランダム発生させ、成長曲線を平均値、平均値  $\pm \sigma$ 、 $\pm 2 \sigma$  で決定した。

## (3) 微生物付着成長のパターンの観察と解明

### ① 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィーム (BF) 構造の観察

キュウリ果実から単離、同定し、高い BF 形成能を有することが確認された *Pseudomonas oleovorans* を供試し、振盪培養した。その後、培養液を適度に希釈して作成した菌懸濁液を 24 穴プレートに入れた 2 ml TSB (培地濃度 100 %、5 %) に同量ずつ接種

し、30 °C および 5 °C で 5 日間培養した。このとき、各穴にポリスチレン板 (10 × 10 mm) を投入し、このポリスチレン板表面に付着している菌を BF 形成菌とした。BF の観察は、接種後 1 日ごとに行った。ポリスチレン板に付着している BF を 0.1 % safranin 水溶液、細胞外多糖類染色に FITC-ConA (fluorescein isothiocyanate 標識 concanavalin A) (50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) を用いて染色した。染色後、滅菌蒸留水で軽く洗浄し、ポリスチレン板が濡れたままの状態ですライドガラス上に置き、共焦点レーザー顕微鏡 (FV300-IX71, OLYMPUS) で観察した。各断層における細胞および細胞外多糖類の二重染色画像を取得し、画像処理によってそれぞれ抽出し、観察視野における細胞および細胞外多糖類の断層分布を把握した。

### ② モンテ・カルロ法による BF 成長シミュレーション

BF の形成過程をコンピュータ上でシミュレーションするためのモデルを構築した。BF の形成シミュレーションでは、初期付着菌を平面上にランダムに振り、これを核として成長方向、分裂時期、直線成長時間、微生物誘導物質の拡散に関するパラメータ等をランダムに振り、BF の形成を確率的に解析した。

## (4) 微生物の除去・失活に有効な技術の開発

### ① 電磁波照射による食品表在菌の殺菌

赤外線照射によるイチジク (福岡県産、とよみつひめ) の加熱殺菌モデルを構築した。図 3 に赤外線照射装置の断面図を示す。装置上部に、長さ 160 mm、半径 7.5 mm、温度 700 °C の赤外線ランプ、ランプ用カバー、装置下部に照射用トレイを設置した。加熱実験では、赤外線ランプからイチジク開口部までの距離が 165 mm になるようにサンプルを設置した。材料温度の測定は検定済みの携帯型赤外線サーモグラフィ (MobIR M4、(株) アイ・アール・システム、東京) を用いて行い、イチジク開口部の温度を計測した。赤外線加

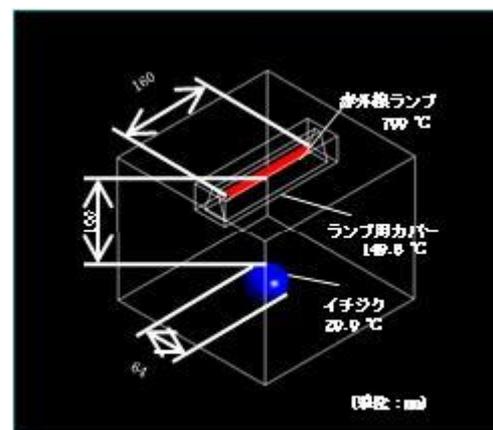


図3 イチジクの赤外線加熱装置概略

熱モデルは熱流体解析ソフトウェア ANSYS CFX 11.0 (ANSYS、米)により開発し、実験結果と比較してその妥当性を検証した。本モデルの特徴的な点は、複雑な形状を持つイチジクの形態係数をモンテ・カルロ法により算出し、放射伝熱解析を行う点である。流体の運動や熱の伝導、伝達解析は(1)と同様である。ただし、ここでは相流モデルを仮定した。

その他、ニューラルネットワークを利用した鶏肉のマイクロ波殺菌予測も行った。

#### ②洗浄によるBFの除去と付着力評価

図4にBF剥脱装置の概略図を示す。剥脱装置は、ポリタンク、マグネットポンプ(イワキ, MD-20R-N), ポンプ専用インバータ(三菱電機, FR-S500), 流量計(愛知時計電機, NW20-PTN), アクリル水槽(50×50×500 mm), 整流格子から構成されている。ポリスチレン板はアクリル水槽中央部分の底面に設置し、水流に対して垂直方向および水平方向に設置して洗浄(処理時間10秒、流速10 cm s<sup>-1</sup>)実験を行った。洗浄前後の付着量の確認は、0.1%クリスタルバイオレット染色後、吸光度分析を行い、これをBF量の指標とした。洗浄前後の付着量変化から、BFの付着能の強弱が評価され、洗浄評価の指標となることも期待される。

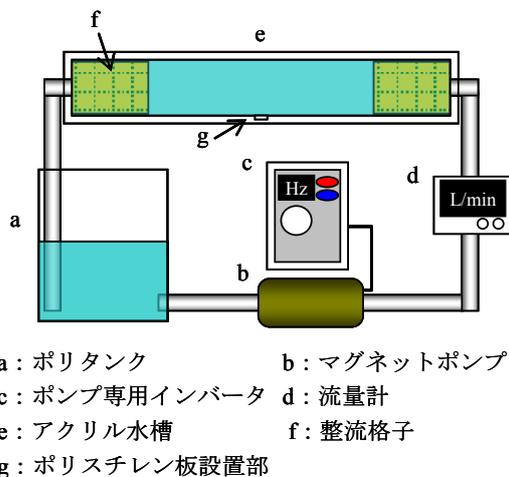


図4 水流洗浄式BF付着能測定装置の概略

#### 4. 研究成果

##### (1)微生物リスク低減化のための貯蔵施設内空調設計

積付無しの空の貯蔵庫内の風速分布を3次元超音波風速計を用いて64点で計測した。モデル解析結果と比較したところ平均誤差0.36ms<sup>-1</sup>で両者は極めてよく一致した。積付したモデル食品(熱物性値は既知)の温度変化の実測値と数値解析モデルによる予測値は平均誤差1.7℃で一致し、モデルの妥当性が検証された。このモデルを用いて積付法の違いによる冷却速度、温度分布への影響を検討した。図5に6つの異なる積付パターンに

おける風速分布の比較を示す。図より積付法の違いによる風速分布の影響が顕著に示されている。高く積付された積荷では(model 5, 6)では、気流が左右で分断され、庫内空気の温度ムラの発生が危惧される。高温空気と低温空気が混合される場合、霧の発生が懸念され、貯蔵容器や食品表面での結露が発生する可能性がある。これを回避するためには積付法の検討が重要であることが明確となった。図6は積付法の違いによる冷却27時間後の積荷平均温度(黒)と最大温度差(白)の比較である。積荷の高さが低い積付パターン(model 1, 2)では食品モデル内部の温度差が小さく、より均一な冷却が達成されやすいことが明確となった。また、積荷間に空隙を設けたモデルでは比表面積が増大するため速やかな冷却が達成されることが分かった。微生物の活動を速やかに低下させる観点から、model 1が最適な積付パターンであることが分かる。しかしながら、積荷間に空隙を設けることはスペース確保の点から敬遠されがちである。食の安全を確保する上では段ボール箱等に工夫を施し、冷気の流れる空隙を設けることが重要である。

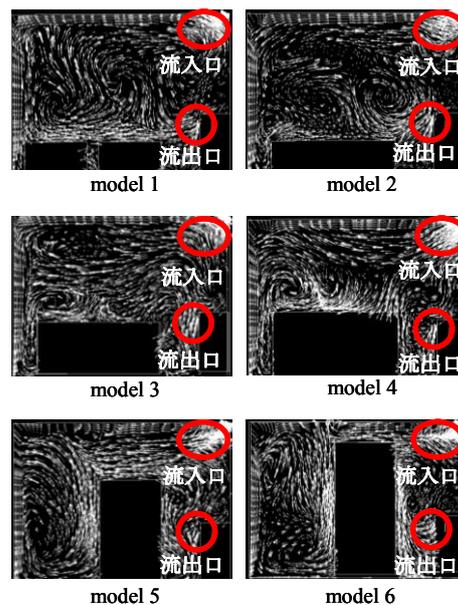


図5 積付法の違いによる気流への影響

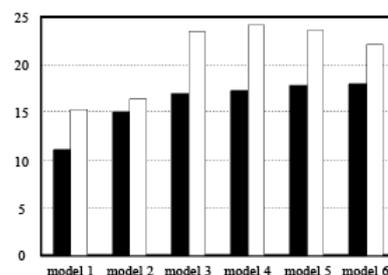


図6 積付法の違いによる冷却への影響

## (2) 確率予測微生物学モデルの開発

実験データを基に修正 Gompertz 式中の 3 つのパラメータ最大増殖速度  $R_0$ 、誘導期  $t_L$  および最大菌数  $N_{max}$  を整理した。この結果、最大増殖速度  $R_0$ 、誘導期  $t_L$  はアレニウス型の温度依存性を持ち、いずれも 30°C 付近に変曲点を持つことが明らかとなった。この基礎データを基に温度変動下における *B. cereus* の増殖挙動を確率モデルにより予測した。図 7 は確率予測モデルによる予測値と実験値の比較例であるが、実験値はモデル予測による 68%信頼区間内にほぼ収まり精度の高い予測が可能となった。確率予測モデルは平均値のみ予測ではなく、成長曲線（死滅曲線も含む）を確率的に予測することが可能であり、リスクを確率的に評価する新しい手法として、さらなる発展が期待される。

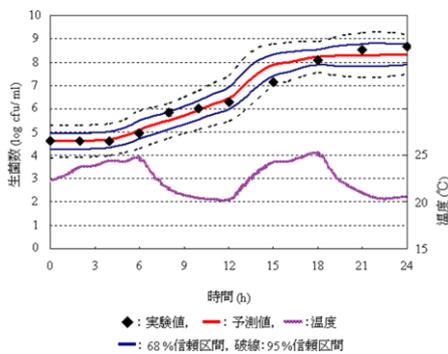


図 7 *B. cereus* の増殖挙動を確率予測

## (3) 微生物付着成長のパターンの観察と解明 ① 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオ・フィルム (BF) 構造の観察

30°C で 5 日間培養した *P. oleovorans* BF の細胞および細胞外多糖類の断層分布を図 8 に示す。図は培地濃度 5% の結果であるが、培地濃度が低い貧栄養状態において細胞外多糖類が BF 表層側に多く分布し、内部の菌を守るシェルター構造を形成し易いことが明らかとなった。また、5°C における両栄養条件でも BF は細胞外多糖類に覆われた構造を形成し、低温条件下、または栄養状態が悪い場合に強固で剥がれにくいバイオ・フィルムを形成することが示された。

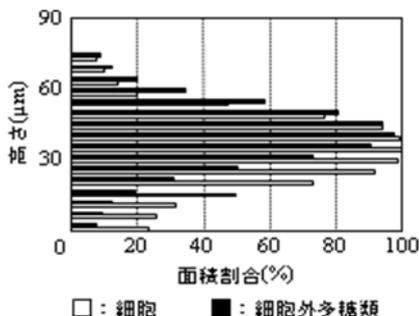


図 8 *P. oleovorans* 及び多糖類断層分布

## ② モンテ・カルロ法による BF 成長シミュレーション

図 9 に微生物が生成する誘引物質が拡散し、これに引き寄せられる形で BF が成長するシミュレーション例を示す。この結果は共焦点レーザー顕微鏡による BF の観察結果を模倣するものであるが、不確定要素も多いため、BF 形成に関する種々のパラメータの定量化が今後の課題となる。

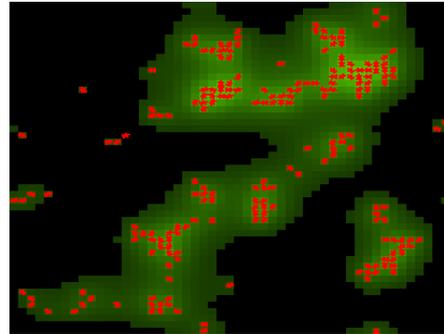


図 9 BF 成長シミュレーション例 (赤: 微生物; 緑: 細胞外多糖類)

## (4) 微生物の除去・失活に有効な技術の開発

① 電磁波照射による食品表在菌の殺菌  
イチジク開口部温度の実測値と計算値の比較を行った。イチジク開口部温度は照射開始から経時的に上昇し、120 秒後に実測値は約 56.1 °C、計算値は 58.9 °C となった。また、実測値と計算値の RMSE は 1.99 °C となり、モデルの妥当性が検証された。この結果、本モデルによる数値シミュレーションは複雑な形状を持つ青果物の熱評価に有効であることが示された。ここで開発したモデルにより、多様な条件下における加熱シミュレーションを行うことで、実用的かつ最適な殺菌法を確立できると考える。その他、鶏胸肉のマクロ加熱殺菌では、ニューラルネットワーク利用による *Salmonella* spp. 及び *Listeria innocua* の殺菌時間予測を行い、誤差 3% 以内での予測が可能であることを示した。

## ② 洗浄による BF の除去と付着力評価

図 10 に 5 日間培養した *P. oleovorans* BF の吸光度と洗浄処理後の吸光度を示す。剥脱処理後においては、垂直置きおよび水平置きの場合ともに、培地濃度 100% の場合、剥脱処理前と比較して吸光度の値は減少した。その減少率は 1 日目では 30% であったが、4 日目では 73% まで増加した。BF 剥脱量が経時的に増加し剥脱されやすくなった。一方、培地濃度 5% の場合、吸光度の値の減少率は常に 30% 程度で経時変化は見られなかった。以上のことから、培地濃度 100% では *P. oleovorans* は固体表面を移動しながら活

発に拡散増殖するため、BF 形成量は大きく増加するが固体表面への付着能は低く、剥脱割合が増加した。一方、培地濃度 5 % の場合、僅かに増殖はするものの、栄養状態が悪く *P. oleovorans* は固体表面に強固に付着していたため、剥脱は見られなかったと考えられる。完全除去のためには BF 付着能を低下させる等の対策が必要であることが示された。

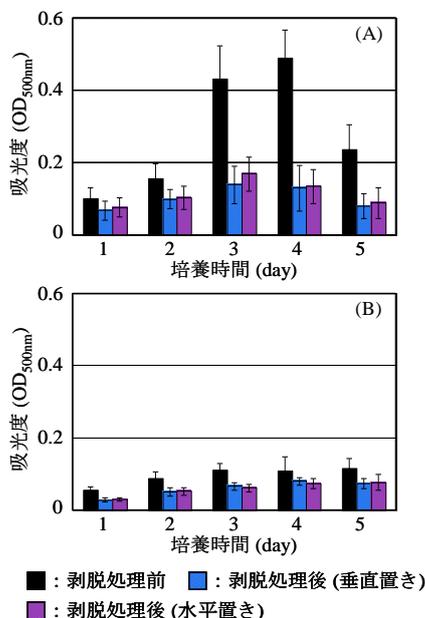


図 10 洗浄操作による BF の剥脱試験結果

## 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)

Hamanaka, D., Atungulu, G. G., Tanaka, F., Uchino, T. (2010): Effect of Combining Infrared Heating with Ultraviolet Irradiation on Inactivation of Mold Spores. *Food Science and Technology Research*, 16(2), (印刷中).

森松和也、濱中大介、内野敏剛、田中史彦 (2009): 温度変動がサルモネラおよび黄色ブドウ球菌の表面付着に及ぼす影響. 防菌防黴誌, 37, 565-571.

小西慶浩、田中史彦、内野敏剛、濱中大介 (2009): CFD を用いた低温輸送時の青果物および冷凍車荷室の温度予測. *日本冷凍空調学会論文集*, 26(2), 159-165.

Tanaka, F., Uchino, T., Hamanaka, D., Miyamoto, S. (2009): ANN Prediction of the Thermal Inactivation Time of Microorganisms during Microwave Heating of Chicken Meat. *Journal of the Japanese Society of Agricultural Technology Management*, 15(3), 152-158.

Tanaka, F., Uchino, T., Hamanaka, D., Atungulu, G. G. (2008): Mathematical Modeling of Pneumatic Drying of Rice Powder. *Journal of Food Engineering*, 88(4), 492-498.

Tanaka, F., Maeda, Y., Uchino, T., Hamanaka, D., Atungulu, G. G. (2008): Monte Carlo Simulation of the Collective Behavior of Food Particles in Pneumatic Drying Operation. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1567-1574.

[学会発表] (計 3 件)

Tanaka, F., Uchino, T., Hamanaka, D. (2009): Monte Carlo Simulation of Figs (*Ficus carica*) Heating with Far-infrared Radiation. Postharvest Pacifica, Nov., 16-19, 2009, Napier, New Zealand.

茶谷基行、田中史彦、内野敏剛、濱中大介 (2008): CFD を用いた青果物表在菌の赤外線殺菌予測モデルの構築. 農業機械学会九州支部例会、2008 年 8 月 20 日、熊本県立大学.

田中史彦、内野敏剛、濱中大介 (2008): 確率予測モデルによる食品乾燥工程の解析. 農業機械学会年次大会、2008 年 3 月 28 日、宮崎市.

[図書] (計 2 件)

Tanaka, F., Uchino, T. (Ed. by Pan, Z.) (2010): Chapter 3, Heat and mass transfer modeling in “*Infrared Heating for Food and Agricultural Processing*”. Taylor & Francis Group. (in press).

Hamanaka, D., Tanaka, F. (Ed. by Farid, M. M.) (2010): Chapter 26, Infrared Heating in “*Mathematical Modeling of Food Processing*”. CRC Press. 677-687 (in press).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 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  
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