

# 食品工場におけるバイオフィルムの評価と除去剤の検証

三上加奈子, 東 孝憲, 河野慎一

## Evaluation of Formation and Chemical Removal of Biofilm in Food Processing Factories

Kanako Mikami, Takanori Azuma, Shinichi Kouno

To investigate biofilm formation in food-processing factories, a *Pseudomonas* strain with potent biofilm-forming activity was isolated and used as a biofilm-forming indicator. Materials in the food-processing environment were selected as biofilm-forming surfaces, and biofilm densities were compared. Further, the effects of some detergents on biofilm removal were examined. Our findings indicate that alkaline chemical agents with pH 12 and higher were significantly effective in removal of biofilms.

**KEY-WORDS :** *Pseudomonas*, biofilm-forming activity, material, cleaning agents

**キーワード :** シュードモナス, バイオフィルム形成能, 材料, 洗浄剤

厚生労働省が進めるHACCP制度化を背景として、道内の食品製造企業では製造現場における衛生管理への関心が高まっている。カット野菜や浅漬けなど非加熱食品および豆腐など加熱工程後に直接製造ラインと接触する食品は、微生物の増殖リスクが高い。これら食品の微生物制御には、製品の初発菌数の低減が重要であり、殺菌方法の最適化と併せて、製造工程における二次汚染の防止が必要不可欠である。製造時に食品と直接接触する器具や容器、食品機械に使用される金属や樹脂などの材料（以下、各種材料）に形成するバイオフィルムは、洗浄殺菌に抵抗性を有し、二次汚染の発生原因となることが知られている。しかし、バイオフィルムの性状把握やその制御に関する報告は少ないことから、製造工程で問題となるバイオフィルム形成菌とそのバイオフィルム形成能を把握し、効果的なバイオフィルム除去方法を明らかにすることが必要である。

本研究では、非加熱食品および加熱工程後に二次汚染のリスクのある食品の製造工程において問題となるバイオフィルム形成菌とそのバイオフィルム形成能に関する知見を得るとともに、従来の洗浄方法よりもバイオフィルム除去効果の高い方法を明らかにした。

### 実験方法

#### 1. 製造現場からの細菌分離

非加熱食品および加熱工程後にバイオフィルム形成菌による二次汚染が想定される食品の製造企業として、カット野菜製造企業および豆腐製造企業を対象とし、洗浄殺菌後の製造ラインおよび器具類のふき取り試験を実施した。細菌の分離は、ふき取りを行ったリン酸緩衝生理食塩水を標準寒天培地（日水製薬株式会社）に表面塗抹し、35℃で48時間培養した後、形成したコロニーから形状の異なるものを釣菌することにより行った。

事業名：経常研究

課題名：食品工場におけるバイオフィルムの評価と除去方法の検証

## 2. 分離菌株の培養と菌懸濁液の調製

分離菌株は、Tryptic soy broth (以下、TSB, Difco) で30°C, 一晚静置培養 (以下、前培養) を行った。培養液は、遠心分離 (10,000×g, 5分間, 4°C) して集菌した後、上清を取り除き、ペレットを培養液と等量の滅菌生理的食塩水に懸濁し、洗浄した。洗浄を2度繰り返し、菌懸濁液として試験に供した。

## 3. クリスタルバイオレット (CV) 法によるバイオフィルム形成能の評価

バイオフィルム形成量の測定は、O'tooleらの方法<sup>1)</sup>を参考に行った。96穴マイクロプレートのウェルに各種菌懸濁液を0.1%接種したTSBを200 $\mu$ L分注し、30°Cで24時間静置培養した。培養後、ウェル内の培養液を取り除き、脱イオン水250 $\mu$ Lで2回洗浄した。これを55°Cで20分間乾燥した後、ウェルに0.1% CV溶液250 $\mu$ Lを添加した。15分間静置してバイオフィルムを染色した後、溶液を取り除き、滅菌水400 $\mu$ Lでウェルを2回洗浄した。洗浄したプレートは、55°Cで20分間乾燥した後、ウェルに99.5%エタノールを300 $\mu$ Lを添加し、15分間抽出した。バイオフィルム量の測定は、各ウェルの抽出液200 $\mu$ Lを新たな96穴マイクロプレートに移し、プレートリーダー (パワースキャンHT, DSファーマバイオメディカル株式会社) を用いて、595nmの吸光値 (以下、A595) を測定することにより行った。試験は、3反復で実施し、A595>0.20をバイオフィルム形成能がある菌株と判断した。なお、バイオフィルム量の最も多かった菌株は、16SrDNAの塩基配列から相同性の高い属種名を推定し、バイオフィルム形成細菌の指標菌として以後の試験に供した。

## 4. 各種材料におけるバイオフィルム形成量の評価

材料として食品製造工場の製造ラインや器具に用いられるシリコン (Si), ポリウレタン (PU), ステンレス (SUS), ポリエチレン (PE), ポリエチレンテレフタレー

ト (PET) およびポリプロピレン (PP) の6種を選定した。この材料のうち樹脂5種は、スライドガラスサイズ (76×26mm) に切断しガンマ線滅菌したものを試験に用いた。ステンレスは同様に切断したものをオートクレーブ滅菌して試験に用いた。指標菌の前培養液を0.1%接種したTSBをバイオフィルム形成培地とし、滅菌2Lビーカーに200mL加えた。これにスライドガラスラック (以下、ラック) に立てた各種材料を投入し、滅菌アルミ箔で蓋をして30°C, 24時間静地培養することによりバイオフィルムを形成させた。バイオフィルムを形成させた材料は、脱イオン水で2回洗浄後、55°C 1時間乾燥し0.1% CVで15分間染色した。これを再度洗浄および乾燥した後、チャック付き袋 (ラミジップLZ-9, セイニチ) に入れ、99.5%エタノール2mL添加して30分から1時間CVを抽出した。抽出液200 $\mu$ Lを96穴マイクロプレートに移し、プレートリーダーでA595を測定し、各種材料のバイオフィルム量を比較した。なお、材料毎にバイオフィルム未付着材料のA595を測定し、ブランク値とした。

## 5. 各種洗浄液の種類と濃度

バイオフィルムに対する洗浄液のpH, 有効塩素濃度による除去効果を明らかにするため以下のような洗浄液を調整し試験に用いた。pH調整した0.2Mリン酸緩衝液4種 (pH 7, 10, 12, 13), NaOHおよびKOH溶液を各3種 (pH 10, 12, 13), 次亜塩素酸ナトリウム溶液で有効塩素濃度を調整した0.2Mリン酸緩衝液 (pH 10) 3種 (有効塩素濃度 0, 200, 600, 1200 ppm) を用いた。また、業務用洗浄剤として食品製造工場で一般的に用いられている中性洗剤 (クリーンキーパー, 花王 (株)) に加え、バイオフィルム洗剤 (バイオガード, 花王 (株)) およびアルカリ性洗剤 (クリアロンワイドフォーム低腐食タイプ, 花王 (株)) を用いた。各洗浄剤は表1に示したとおり適宜希釈して試験に供した。

表1 市販洗浄液および希釈倍率

洗剤種類	pH	希釈倍率				
中性洗剤	7.3 (原液)	1000	500	200	100	50
バイオフィルム洗剤	6.5 (原液)	2000	1000	500	200	
アルカリ性洗剤	12.0 (1%水溶液)	200	100	50	25	10



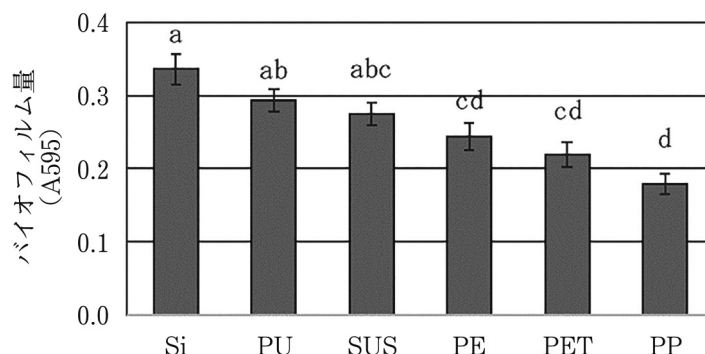


図1 各種材料における指標菌が形成するバイオフィルム量

異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。

エラーバーは標準誤差を示す ( $n=12$ , Si, PUは $n=11$ )。

を測定し、SiおよびPUのバイオフィルム形成量が他の材料に比べて多いことを示しており<sup>2)</sup>、本試験と同様の結果であった。

### 3. SUSに形成させたバイオフィルムに対する各種洗浄液の除去効果

洗浄液によるバイオフィルム除去効果の検討は、6種の材料の中でバイオフィルムが形成されやすく、かつ食品工場の製造工程や調理器具への使用頻度が高い材料であることからSUSを用いた。

pH10の0.2Mリン酸緩衝液において、有効塩素濃度によるバイオフィルム除去効果を比較した。食品製造で通常用いられる200ppmまでの実用的な塩素濃度では0 ppmと全く差が見られなかった。このため、高い塩素濃度で試験を行った結果、1200ppmでは0 ppmおよび600ppmに比べてバイオフィルム除去率が高い傾向を示したものの、いずれの濃度においても有意差は認められず、有効塩素によるバイオフィルム除去効果は認められなかった (図省略)。

SUSに形成されたバイオフィルムの洗浄液pHによる除去効果を表3に示した。分散分析の結果、pH10~12の洗浄液において、洗浄液によるバイオフィルム除去効果に違いが認められなかった一方、pHによるバイオフィルム除去効果に違いが認められた。さらに、多重比較検定により除去効果に違いが認められたpHは、pH10とpH12およびpH10とpH13であった (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。このことから、本付着指標菌株により形成されたバイオフィルムは、有効塩素よりもpH12以上のpHによって効率的に除去できることが明らかとなった。

SUSに形成されたバイオフィルムに対する市販洗剤

3種の希釈倍率とバイオフィルム除去効果の関係を調べたところ、中性洗剤およびバイオフィルム洗剤では500倍希釈、アルカリ性洗剤では10倍希釈で洗浄が最もバイオフィルム除去率が高かったことから、以下の洗浄試験はこの希釈倍率で実施した (図省略)。

表3 SUSに形成されたバイオフィルムの洗浄液pHによる除去効果

洗浄液	pH	バイオフィルム除去率 (%)		
0.2Mリン酸緩衝液	10	72.3	± 5.5	c
	12	91.7	± 0.6	ab
	13	93.1	± 1.2	ab
NaOH	10	76.9	± 2.6	c
	12	92.8	± 0.6	ab
	13	92.2	± 0.7	ab
KOH	10	82.5	± 1.2	bc
	12	93.9	± 0.5	a
	13	93.4	± 0.2	a
分散分析		p値		
pH		<0.001		
洗浄液		0.074		
pH×洗浄液		0.228		

バイオフィルム除去率は平均値±標準誤差を示す ( $n=3$ )。異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。



#### 4. 各種材料に形成されたバイオフィルムの市販洗剤による除去効果の検証

各種材料に形成されたバイオフィルムの市販洗剤による除去効果を表4に示した。材料毎に洗浄液間のバイオフィルム除去効果について多重比較した結果、PU、PE、PETおよびPPでは洗剤によるバイオフィルム除去効果はアルカリ性洗剤、バイオフィルム洗剤、中性洗剤の順に高く各洗剤間に有意差が認められた (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。また、SUSではアルカリ洗剤のバイオフィルム除去率が他の2種の洗剤に比べて有意に高かった (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。Siは、中性洗剤のバイオフィルム除去率が他の洗剤2種に比べて有意に低く、アルカリ洗剤とバイオフィルム洗剤には有意な差は認められなかった (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。その上Siはアルカリ耐性が低い材料であるため、バイオフィルム洗剤の使用が適していると考えられた。また、PUについてもSi同様にアルカリ耐性が低い材料であり、アルカリ洗剤の次にバイオフィルム除去率が89%と高かったバイオフィルム洗剤の使用が適していると考えられた。一方、その他の材料では、アルカリ洗剤によるバイオフィルム除去率はいずれも99%以上であり、工場で広く使用されている中性洗剤のバイオフィルム除去率36~60%に比べて著しく高いことからアルカリ性洗剤の使用によりバイオフィルム除去効果が著しく改善されることが期待

表4 各種材料に形成されたバイオフィルムの市販洗浄剤による除去効果

材料	洗剤種類	バイオフィルム除去率 (%)			
Si	中性	79	±	3.8	b
	バイオフィルム	96	±	0.6	a
PU	アルカリ性	89	±	0.7	a
	中性	72	±	3.6	c
	バイオフィルム	89	±	2.7	b
SUS	アルカリ性	100	±	0.8	a
	中性	60	±	6.8	b
	バイオフィルム	67	±	4.1	b
PE	アルカリ性	100	±	0.6	a
	中性	36	±	0.3	c
PET	バイオフィルム	85	±	2.6	b
	アルカリ性	99	±	0.2	a
PP	中性	54	±	1.4	c
	バイオフィルム	79	±	1.9	b
PP	アルカリ性	100	±	0.1	a
	中性	48	±	3.7	c
PP	バイオフィルム	88	±	0.9	b
	アルカリ性	100	±	0.1	a

バイオフィルム除去率は平均値±標準誤差を示す ( $n=3$ )。異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。

される。以上のように市販洗剤のうちアルカリ性洗剤のバイオフィルム除去効果が最も高かった (Si除く) 理由として、バイオフィルムは多糖類、脂質、タンパク質などから構成されており、高pH下ではこれらの溶解性が向上するため、バイオフィルムを効率よく除去できたと考えられた。また、バイオフィルム洗剤が中性洗剤よりバイオフィルム除去効果が高かった (SUS除く) 理由として、中性洗剤の成分に加え、保湿剤にも用いられる溶剤成分が入っており、中性でも有機汚れを溶解させることによりバイオフィルムを効率よく除去できたと推察した。

#### 5. 調理器具に形成されたバイオフィルムの市販洗剤による除去効果の検証

調理器具に形成されたバイオフィルムの市販洗浄剤による除去効果を図2に示した。4.の結果から、一般的に食品工場で用いられている中性洗剤を対照とし、SUS製のヘラおよびPE製のまな板ではアルカリ性洗剤を、Si製のスクレイパーおよびPU製のコンベアベルトではバイオフィルム洗剤によるバイオフィルム除去効果を比較した。その結果、ヘラおよびまな板ではアルカリ性洗剤によるバイオフィルム除去率は中性洗剤に比べて有意に高く、97%および98%であった。特にまな板ではアルカリ性洗剤によるバイオフィルム除去率は中性洗剤の1.8倍であった。一方、スクレイパーおよびコンベアベルトでは中性洗剤とバイオフィルム洗剤によるバイオフィルム除去率に有意差は認められなかった。このように、表4の結果と異なり洗剤間のバイオフィルム除去率で有意差が認められなかった理由として、Si製スクレイパーでは中性洗剤でもバイオフィルム除去率が高かったこと、PU製コンベアベルトでは試料間の標準誤差が大きかったことが考えられた。以上のことから、バイオフィルムによる二次汚染が懸念される食品製造工場においては、使用する製造ラインおよび調理器具の素材や洗剤の選定に際してバイオフィルムの性質を十分に考慮し選択することが重要であると考えられた。

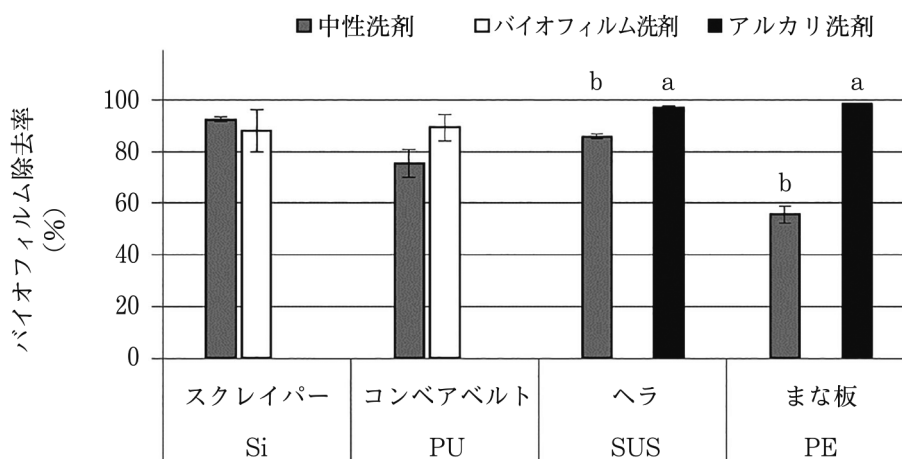


図2 調理器具に形成されたバイオフィルムの市販洗浄による除去効果

異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ).  
エラーバーは標準誤差を示す ( $n = 2$ , または  $3$ ).

## 要 約

食品工場からバイオフィルム形成能の高い *Pseudomonas* 属細菌を分離した。この菌株をバイオフィルム形成指標菌株として、製造ラインや調理器具に使用されている各種材料によるバイオフィルム形成量の違いを明らかにした。また、各種洗浄液による洗浄後のバイオフィルムの除去率を比較した結果、pH12以上の高アルカリ性の洗浄液で著しくバイオフィルムが除去されることを明らかにした。

## 文 献

- 1) O'Toole, GA., Pratt, LA., Watnick, PI., Newman, DK., Weaver, VB., and Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.*, **310**, 91-109.
- 2) 森川正章, (2012) 生物工学, バイオフィルムを調べてみよう, 第5号, 246-250.