

固体表面からの芽胞の脱離性に及ぼす残存乳成分の影響

七崎裕介, 萩原知明, 崎山高明[†]

東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科

Effects of Residual Milk Components on the Removability of Spores from Solid Surfaces

Yusuke NANASAKI, Tomoaki HAGIWARA, and Takaharu SAKIYAMA[†]

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,
4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-5477, Japan

Bacterial spores attached to the surfaces of food processing equipment may lead to contamination of food to be processed. In this study, spores of *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* were attached to stainless steel (SS) and polypropylene (PP) surfaces by drying with milk, and then subjected to rinsing in water with agitation to evaluate the residual fraction of spores as a measure of their removability. Three types of milk products with different fat contents were found to give low residual fractions of spores with no significant differences. However, dilution of milk with water increased the residual fraction of spores. To identify factors affecting the removability of spores, rinsing experiments were performed for spores attached by drying with whey or lactose solutions of different concentrations. The residual fraction of spores after rinsing decreased with increasing whey concentration. However, the increase in lactose concentration gave no significant effect; approximately 90% of spores remained on SS and PP surfaces after water rinsing irrespective of lactose concentration. These results indicate that whey protein is a factor reducing adhesive interaction between spores and solid surfaces.

Keywords: bacterial spore, milk, solid surface, adhesion, cleaning

1. 緒 言

細菌が形成する芽胞は、栄養細胞よりも熱や薬剤の殺菌処理に耐性をもつため、食品製造現場では警戒される。食品機器表面に芽胞が付着して残存すると、次のロットで製造される食品またはその素材を栄養分として発芽・増殖し、当該食品の汚染を引き起こす危険性がある。実際、低温殺菌牛乳では機器表面が芽胞菌の温床となって二次汚染が起こる場合のあることが明らかになっている [1]。

細菌芽胞の各種固体表面に対する付着特性に関する研究例は少なくはない。生理食塩水に懸濁した状態からステンレス鋼、ガラス、プラスチック素材などの固体表面に対する付着特性を検討した例では、*Bacillus* 属

や *Geobacillus* 属の芽胞が各々の栄養細胞よりも多く付着すること [2] や、芽胞を形成しない大腸菌よりも多く付着すること [3] が示されている。また、*Bacillus* 属の中でも *Bacillus cereus* の芽胞はとくに付着力が強いこと [4] など、種によって芽胞の付着性に違いがあることも知られている。付着性が異なる原因としては、芽胞表面の疎水性が有力な要因とされている [2,5] が、芽胞の表面荷電による静電力の関連性も指摘されている [4]。

以上の研究例は、懸濁液からの芽胞の付着特性について検討されたものである。一方、筆者らは前報 [6] において、芽胞懸濁液がステンレス鋼 (SS) およびポリプロピレン (PP) 表面上で低湿度環境下に置かれて乾燥すると、懸濁液との接触で付着した場合よりも芽胞の付着力がはるかに強くなることをすでに明らかにしている。すなわち、付着時の水の存在の有無が芽胞の付着力の強さに大きな影響を及ぼすのである。ただし、前報ではその影響の評価は水のみが共存する場合

(受付 2011 年 2 月 9 日, 受理 2011 年 6 月 12 日)

〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

[†] Fax: 03-5463-0699, E-mail: sakiyama@kaiyodai.ac.jp

に留まっており, 水に食品成分が含まれる場合については未検討であった. 食品あるいはその成分と共存して乾燥した芽胞の脱離性を把握することは食品接触表面の芽胞による汚染リスクを検討するうえで重要である. また, European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG) が推奨する機器の洗浄性に関する標準試験法 [7] では, 特定菌株の芽胞を混入したサワーミルクを汚れモデルとして配管などの被試験部内面に塗布して乾燥し, 洗浄した後に芽胞の残存を検査する. この試験では, 構造的に洗浄不可能な部分を検出するための食品汚れのトレーサーとして芽胞が利用されており, したがって, 付着した食品汚れと芽胞の洗浄時の脱離性が同じであることを前提としている. しかし, 芽胞の付着状況や被試験部内面の材質によっては, 食品汚れと芽胞の脱離性が異なる可能性も考えられる. もし両者の脱離性が異なるのであれば, EHEDG の検査は残存食品汚れの検査とは異なる意味をもつことになる. このような芽胞を利用した洗浄試験法の意義を吟味するためにも, 食品の共存下および非共存下で乾燥された芽胞の脱離性の比較データが必要である.

そこで, 本研究では食品の例として牛乳を取り上げ, 牛乳またはその成分と共存した状態で乾燥された芽胞の付着力について検討することを目的とした. すなわち, 牛乳などの試験液に懸濁した細菌芽胞を SS 表面または PP 表面に塗布して乾燥し, 水中で攪拌洗浄した後に表面に残存する芽胞数を計数して比較した. なお, プレリンスなどの過程で希釈された牛乳とともに芽胞が機器表面上に残存してそのまま乾燥する場合も想定し, 芽胞と共存する牛乳または乳成分の濃度を下げた場合の芽胞の付着力の変化についても検討した.

実験には, *Geobacillus stearothermophilus* と *Bacillus subtilis* の芽胞を使用した. この両菌種は乳製品製造工程における汚染例が報告されている. *G. stearothermophilus* については, その栄養細胞自体が好熱性ゆえに熱交換器やエバポレータの内面で増殖可能 [8] であり, 粉乳中で細菌叢の優占種となりやすく [9,10], バイオフィルムを形成すること [11] が知られている. *B. subtilis* については, ホエイ製造に使用された配管のフィルタに形成されたバイオフィルムから検出された例 [5] が報告されている.

2. 実験方法

2.1 芽胞の調製

G. stearothermophilus JCM12216 と *B. subtilis* NBRC3134 を BBL Trypticase Soy Agar (TSA) 培地 (pH 7.3) (Becton, Dickinson and Co., Maryland, USA) 上に接種し, 58°C (*G. stearothermophilus*) または 37°C (*B. subtilis*) で 6 日間培養した. TSA 上に形成された

芽胞をかき取って 1 ml の滅菌水中に懸濁した. 芽胞懸濁液を 100°C で 10 分間加熱して栄養細胞を死滅させ, 8,700×g で 30 秒間遠心分離して, 上澄みを除去した. 滅菌水を加えて遠心分離を行った後に上澄みを除去する処理を 2 回以上繰り返して洗浄した. このように集菌した芽胞を滅菌水に懸濁して 4°C で保存し, 使用直前に約 3×10⁴ CFU/ml の濃度に希釈して以下の実験に用いた. なお, 希釈した懸濁液については, その 0.1 ml を Modified Shapton and Hindes Agar (MSHA) 培地 (pH 7.0) [11] に塗布して 58°C (*G. stearothermophilus*) または 37°C (*B. subtilis*) で 24 時間培養し, 形成されたコロニーを計数して芽胞濃度を求めた.

なお, 本実験で使用した *G. stearothermophilus* JCM12216 は, EHEDG の洗浄試験法 [7] で使用される菌株 (旧名で *B. stearothermophilus var calidolactis* NIZO C953) と由来の同じ菌株である.

2.2 芽胞懸濁試料による平板の汚染

牛乳試料として市販の成分調整牛乳, 低脂肪牛乳および無脂肪牛乳 (いずれも小岩井乳業株式会社) を用いた. いずれも UHT 処理 (130~140°C, 2 秒) されたものであり, Table 1 に示すように, 乳脂肪分以外の成分組成に大きな差はなかった. 3 種の牛乳試料以外に, 成分調整牛乳を滅菌水で適宜希釈した試料, ホエイパウダー (明治乳業株式会社) を滅菌水で溶解した試料 (固形分濃度 7×10⁻³~7 g/L), ラクトース一水和物 (和光純薬工業株式会社) を滅菌水に溶解した試料 (濃度 0.48~48 g/L) も用いた. なお, 使用したホエイパウダーの主な成分は, 糖質が 75.5%, タンパク質が 12.0% であった.

上記の各試料 0.9 ml に, 2.1 で調製した芽胞懸濁液 (約 3×10⁴ CFU/ml) 0.1 ml を加えて芽胞懸濁試料を作製した. この結果, 懸濁試料中の牛乳および乳成分の濃度は, 初期調製濃度の 10 分の 9 になっている. 以下, 乳および乳成分濃度は懸濁試料中の終濃度で示す. このように調製した芽胞懸濁試料 0.1 ml を SS または PP の平板表面 (50×50 mm²) に塗布して室温で 60 分間放置した. この間に平板表面上の試料は乾燥した. このように芽胞と供試液固形分で汚染した平板を 2.3 に記す水洗浄実験に供した.

Table 1 Composition^a of milk products used in this study.

Component	Milk	Low-fat milk	Fat-free milk
Carbohydrate	5.0 g	5.1 g	5.1 g
Protein	3.4 g	3.4 g	3.5 g
Fat	4.2 g	1.5 g	0 g
Calcium	115 mg	107 mg	117 mg
Sodium	47 mg	40 mg	41 mg

^a Contents in 100 ml

2.3 水洗浄実験

1000 mlの滅菌水の入ったステンレス製の円筒容器(直径135 mm,高さ148 mm)を一定温度(25℃)に保った恒温槽内に置いた。芽胞を付着させた平板表面と攪拌羽根(4枚羽)を互いに45 mmの距離をおいて滅菌水中に設置した。平板表面に働く応力が変化しないように実験装置の配置をしっかりと固定し、攪拌羽根により2,000 rpmで10分間攪拌して平板表面を洗浄した。その後、2.4に記す方法で洗浄後の残存芽胞数を測定し、洗浄前に塗布した芽胞数(約 3×10^2 CFU)との比として残存率を算出した。

2.4 芽胞数の測定

各平板に残存した芽胞数は次のように計測した。SS平板については、芽胞を塗布した表面が上になるようにシャーレに置き、溶解したMSHA培地[12]を流し込んでSS平板を培地中に包埋した。PP平板については、平板をまずMSHA培地上に固定し、その上に溶解したMSHA培地を流し込んで平板を培地中に包埋した。いずれも58℃(*G. stearothermophilus*)または37℃(*B. subtilis*)で24時間培養し、形成されたコロニーを計数した。

3. 結 果

3.1 牛乳およびその希釈液の共存の影響

まず、市販の成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳を用いて芽胞懸濁液を調製し、平板に乾燥付着させ、攪拌方式で10分間の水洗浄を行うことにより、芽胞の付着力を比較した。実験結果をFig. 1に示す。実験は3回行い、その平均値と標準偏差を示した。いずれの場合についても、水洗浄後は10%以下の低レベルながら芽胞が表面上に残存した。乳脂肪含有レベルと菌種とを要因として表面素材別に二元配置分散分析(two-way ANOVA)を行なった結果、芽胞残存率に対する乳脂肪含量の主効果は、SS平板($F(2,12)=0.063$, ns)とPP平板($F(2,12)=0.131$, ns)のいずれにおいても有意ではなかった。すなわち、乳脂肪レベルは芽胞残存率に影響を及ぼさないことが示された。菌種の主効果については、Fig. 1 (a)に示すSS平板に対する結果では有意でなかった($F(1,12)=2.67$, ns)が、Fig. 1 (b)に示すPP平板に対する結果では有意($F(1,12)=40.3$, $P < 0.001$)であり、PP平板における芽胞残存率は*B. subtilis*の方が*G. stearothermophilus*よりも高いことが示された。

芽胞と共存する牛乳の濃度が芽胞の付着力に及ぼす影響を検討するために、2倍または4倍希釈した成分調整牛乳を用いて調製した芽胞懸濁試料を平板上で乾燥した後、平板を10分間水洗浄した。比較のため、滅菌

水に芽胞を懸濁した場合についても同様に洗浄実験を行った。洗浄後の芽胞残存率をFig. 2に示す。実験は3回行い、その平均値と標準偏差を示した。未希釈の成分調整乳を用いた場合(90%)の結果は、Fig. 1にすでに示した結果ではあるが、比較のためにあわせて示した。*B. subtilis*の芽胞の芽胞残存率については、牛乳濃度90%で付着させた場合にはすでに述べたようにSS平板とPP平板のいずれにおいても0.04~0.05と低かったが、牛乳濃度45%および22.5%で付着させた場合には芽胞残存率が増加し、とくにPP表面上では高い芽胞残存率が得られた。また、滅菌水に芽胞を懸濁して付着させた場合の芽胞残存率はほぼ1であった。このように、付着時に共存する牛乳濃度の低下は芽胞の脱離性の低下をもたらすことが示された。同様の傾向は*G. stearo-thermophilus*の芽胞でもみられたが、牛乳を22.5%まで希釈しても、芽胞残存率の増加の程度は*B. subtilis*ほどには大きくなかった。また、牛乳濃度45%および22.5%の場合については、両種の平板において*G. stearothermophilus*よりも*B. subtilis*の方が残存しやすいことが示された(t -test, $P < 0.05$)。

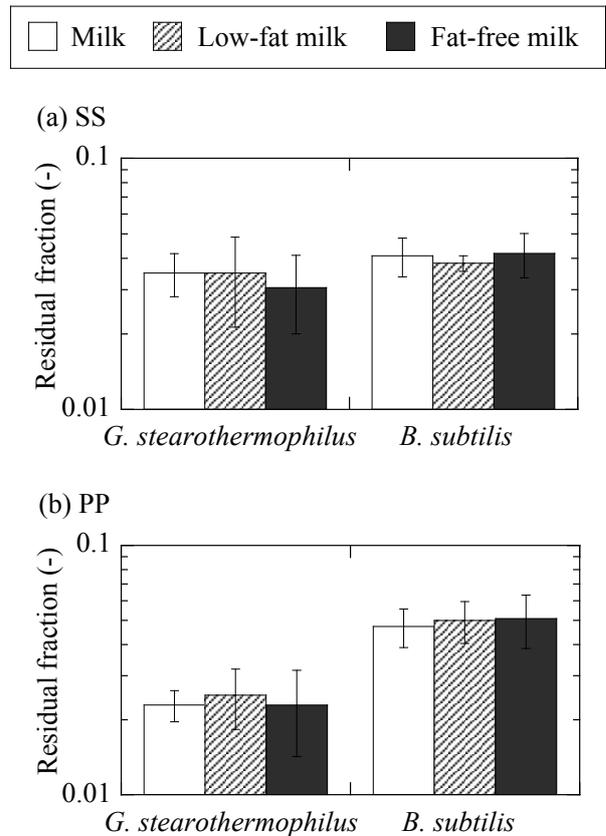


Fig. 1 Residual fraction of *G. stearothermophilus* and *B. subtilis* spores after water rinsing. Spores were attached to surfaces of (a) SS and (b) PP by drying with commercially available milks of different fat contents. Bars show standard deviation ($n=3$).

以上の結果, 両芽胞ともに乾燥付着する際に共存する牛乳濃度が高いと SS 表面および PP 表面への付着力が低下するが, その効果は濃度に依存することが示された。

3.2 ホエイパウダー水溶液または乳糖水溶液の共存の影響

芽胞の付着力に影響を及ぼす成分について検討するために, ホエイパウダー水溶液と乳糖水溶液に芽胞を懸濁し, SS 平板および PP 平板に塗布して乾燥後, 10 分間の水洗浄を行って平板上の芽胞残存率を測定した。

ホエイパウダー水溶液 (ホエイ固形分濃度 6.3×10^{-3} ~ 6.3 g/L) に芽胞を懸濁した場合の実験結果を Fig. 3 に示す。実験は 3 回行い, その平均値と標準偏差を示

した。 *G. stearothermophilus* (a1, b1) と *B. subtilis* (a2, b2) のいずれについても, 表面材質の種類に関わらず, 芽胞残存率はホエイ固形分濃度の増加により低下した。固形分濃度 6.3×10^{-3} g/L では残存率が 0.9 以上であり, 水に懸濁した場合に近かった。

乳糖水溶液 (乳糖濃度 0.43~43 g/L) に芽胞を懸濁した場合の実験結果を Fig. 4 に示す。実験は 3 回行い, その平均値と標準偏差を示した。 *G. stearothermophilus* (a1, b1) と *B. subtilis* (a2, b2) のいずれの芽胞についても, 表面材質の種類に関わらず, 共存する乳糖の濃度が増加しても残存率は 0.9 程度でほぼ一定であった。すなわち, 乳糖が共存しても, その濃度の増加は芽胞の付着力に影響を及ぼさないことがわかった。なお, 牛乳中の糖質のほとんどは乳糖である [13] ことから, 3.1 の実験で用いた 90% 牛乳中の乳糖濃度は約 45 g/L であり, 本実験で用いた乳糖濃度の最大値はこれにほぼ匹敵する。

4. 考 察

本研究では, 牛乳およびその成分と共存したまま乾燥した場合の芽胞の付着特性について検討した。共存する牛乳濃度の低下によって水洗浄後の芽胞残存率が増加した (Fig. 2) ことから, 加工乳に含まれる成分が芽胞の固体表面への付着力を弱めることがわかる。芽胞以外でも同様な現象として, 牛乳中の黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* の SS 表面に対する付着の際に, 牛乳濃度を減少させると付着する菌の割合が増加することが報告されている [14]。このような付着抑制効果の原因を本研究の結果から考察してみる。まず, 乳脂肪含量の異なる 3 種の加工乳を共存させた場合の結果 (Fig. 1) から, 牛乳中の乳脂肪は芽胞の付着力に影響を与えないことがわかる。また, ホエイ固形分は濃度依存的に芽胞の付着力を弱めた (Fig. 3) が, ホエイ固形分の主成分である乳糖は芽胞の付着力にほとんど影響を与えなかった (Fig. 4)。以上の結果から, 少なくともホエイ固形分のもう 1 つの主成分であるホエイタンパク質は芽胞の付着力を弱めているものと考えられる。

他に牛乳の主要成分としてカゼインがある。カゼインはミセル状態で牛乳中に存在しており, カゼイン単独でそのミセル状態を再現して芽胞の付着に及ぼす影響を直接検討することは困難と考えられる。ただし, その影響の程度については, 今回の実験結果から以下のように考察できる。一般に牛乳に含まれるタンパク質の約 80% がカゼインとされる [13]。芽胞懸濁試料に用いた最低濃度レベルである 22.5% 牛乳では, タンパク質濃度は 7.8 g/L で, その 80% がカゼインであるとすれば, ホエイタンパク質含量は 1.6 g/L となる。これに対して, 用いたホエイ液試料の最高固形分濃度 6.3

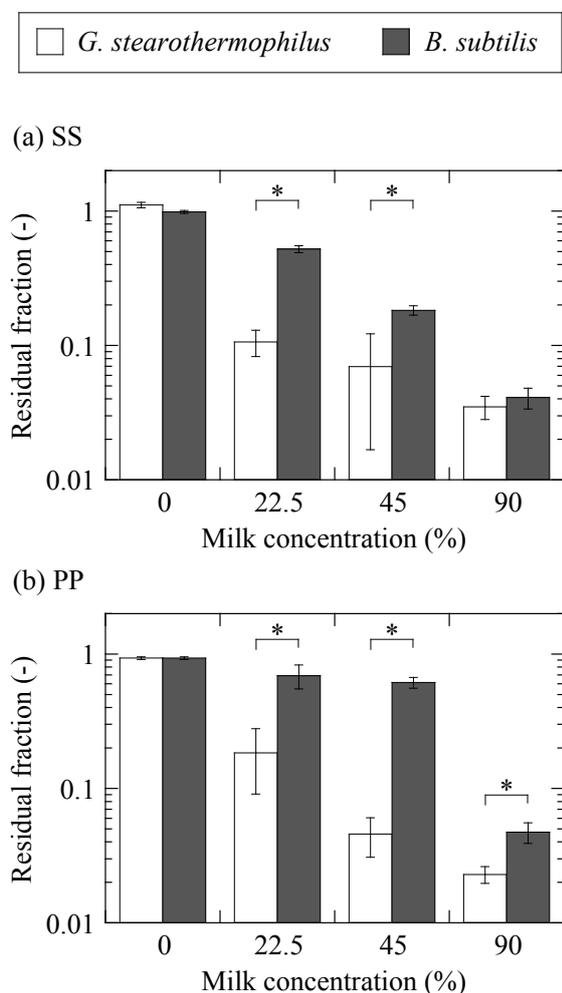


Fig. 2 Effect of milk concentration on residual fraction of *G. stearothermophilus* and *B. subtilis* spores after water rinsing. Spores were attached to surfaces of (a) SS and (b) PP by drying with milk (90%), its dilutions (45%, 22.5%), and water (0%). Bars show standard deviation ($n=3$). Significance of difference between the mean values obtained for the two bacterial species under the same conditions was assessed by *t*-test (* $P<0.05$).

g/Lでは、タンパク濃度は0.76 g/Lで、約半分のホエイタンパク質濃度となっている。糖質濃度で比較しても同様に、固形分6.3 g/Lのホエイ液試料の糖質濃度は22.5%牛乳の約半分となる。しかるに、Fig. 2とFig. 3を比較すると、両菌種について、固形分6.3 g/Lのホエイ液共存時の残存率は22.5%牛乳共存時の残存率に比べて同程度以下である。より詳細な検討の必要はあるが、これらのことからカゼインが芽胞の脱離性を高める可能性は小さいものと推察できる。ではどのような性質のタンパク質が芽胞の脱離性を高めるのか。この点は、付着機構解明のために、化学的特性や分子量などの観点から今後検討が必要な課題である。

固体表面に微生物が付着してバイオフィームが形成される場合、その初期過程では水中の有機物が微生物よりも先に固体表面を覆うことによって表面がまずコンディショニングされ、その後に微生物が付着するものとされている [15]。これは、有機物分子の方が微生物よりも小さく、分子運動または拡散による移動が速いためである。また、Barnes *et al.* [14] は *S. aureus* を牛乳に懸濁した状態からSS表面に付着させるととも

に、SS表面の元素組成をX線電子分光法によって測定したところ、乳タンパク質に起因する窒素量の減少と付着菌数の増加との間に相関が見られたことを報告している。彼らの結果も、微生物よりも先に乳タンパク質がSS表面に吸着することによって微生物の付着が抑制されたものと考えることができる。本実験においても、乾燥前は同様に食品成分と芽胞とが水中で共存した状態にあり、食品成分が先に表面を覆うことは起こり得る。ただし、本実験の場合には、たとえ芽胞の付着が抑制されたとしても、乾燥の結果として全ての芽胞がSS表面上に残ることになる。しかし、食品成分が先に固体表面に付着していれば、芽胞が固体表面には直接接触できず、食品成分の層を挟んだ状態のまま乾燥される。水に懸濁した芽胞の実験結果に示されるように、固体表面に直接接触する芽胞の脱離性は低い。しかし、食品成分の層を挟んだ場合には、食品の脱離とともに芽胞も脱離するので、脱離性が高くなるものと考えられる。

牛乳とともに乾燥された場合、水洗浄後には低レベルながらある割合で芽胞がSS表面およびPP表面に残

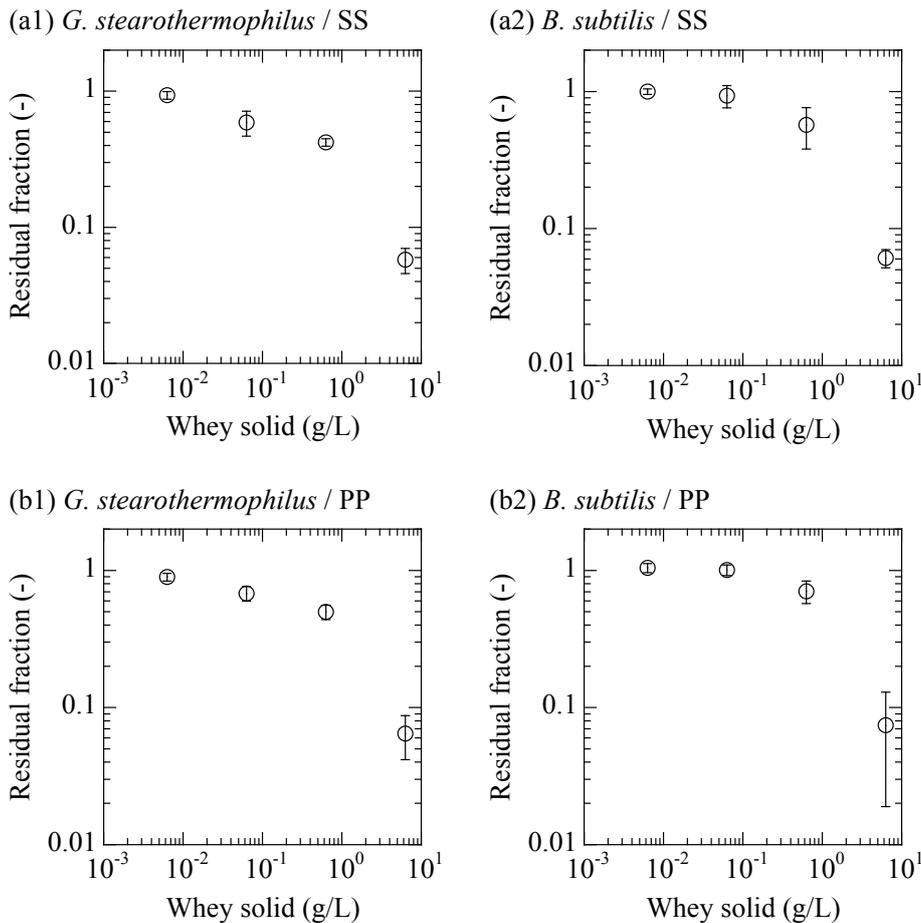


Fig. 3 Effect of whey solid concentration on residual fraction of *G. stearothermophilus* and *B. subtilis* spores after water rinsing. Spores were attached to surfaces of (a) SS and (b) PP by drying with whey solid solutions. Bars show standard deviation ($n=3$).

存した。このことは、牛乳と共存する場合でも、直接表面に接触して乾燥する芽胞がわずかに存在することを示唆する。共存する牛乳の濃度を薄くすると、直接表面に接触する芽胞の割合が大きくなって脱離性が低下するものと考えられる。また、Fig. 2 に示したように、牛乳の希釈試料と共存した場合の芽胞残存率は、*G. stearothermophilus* よりも *B. subtilis* の方が有意に高かった。この原因としては、残存した両芽胞が直接固体表面に付着する割合と付着力の両者が考えられる。*Bacillus* 属芽胞の付着特性については、芽胞側の因子として、芽胞表面の疎水性と電位が付着に影響を及ぼすことが知られている [16]。ただし、付着を起こす主因は疎水性相互作用であり、芽胞表面の電荷は反発力を誘起して付着抑制に寄与するものとされている [4]。*B. subtilis* の芽胞は *G. stearothermophilus* の芽胞よりも疎水性がわずかに強いが、芽胞表面の電荷の違いはほとんどない [17,18]。したがって、芽胞表面の疎水性の差異が固体表面との親和性に影響を及ぼし、付着力に差が生じているのではないかと推測される。また、懸

濁芽胞の付着割合も固体表面との親和性の高さに影響を受ける可能性がある。実際、*B. subtilis* 芽胞の懸濁状態からの付着菌数は、SS 表面よりも疎水性の高い PP 表面の方が多いたことが示されている [19]。本実験においても、疎水性のより高い PP 表面の方でとくに、直接付着する芽胞割合の増加効果が顕著に現れたものと考えられることもできる。さらに、懸濁状態からステンレス鋼に付着した大腸菌の脱離性については、表面粗さの影響を受けることが明らかになっている [20]。芽胞の場合も同様に、付着する固体表面の粗さが脱離性に影響を及ぼしている可能性もある。

乳糖のみと共存して乾燥された芽胞については、水洗浄後も高い割合で固体表面に残存することが示された。これまでの考察からすると、乳糖の場合には、芽胞に先んじて固体表面を覆ってしまう訳ではないものと考えられる。すなわち、芽胞が乳糖と共存して乾燥された場合、多くの芽胞は固体表面と直接接触しており、その上を乾燥した乳糖の層が覆っている構造になっているものと推測される。この推測に関し

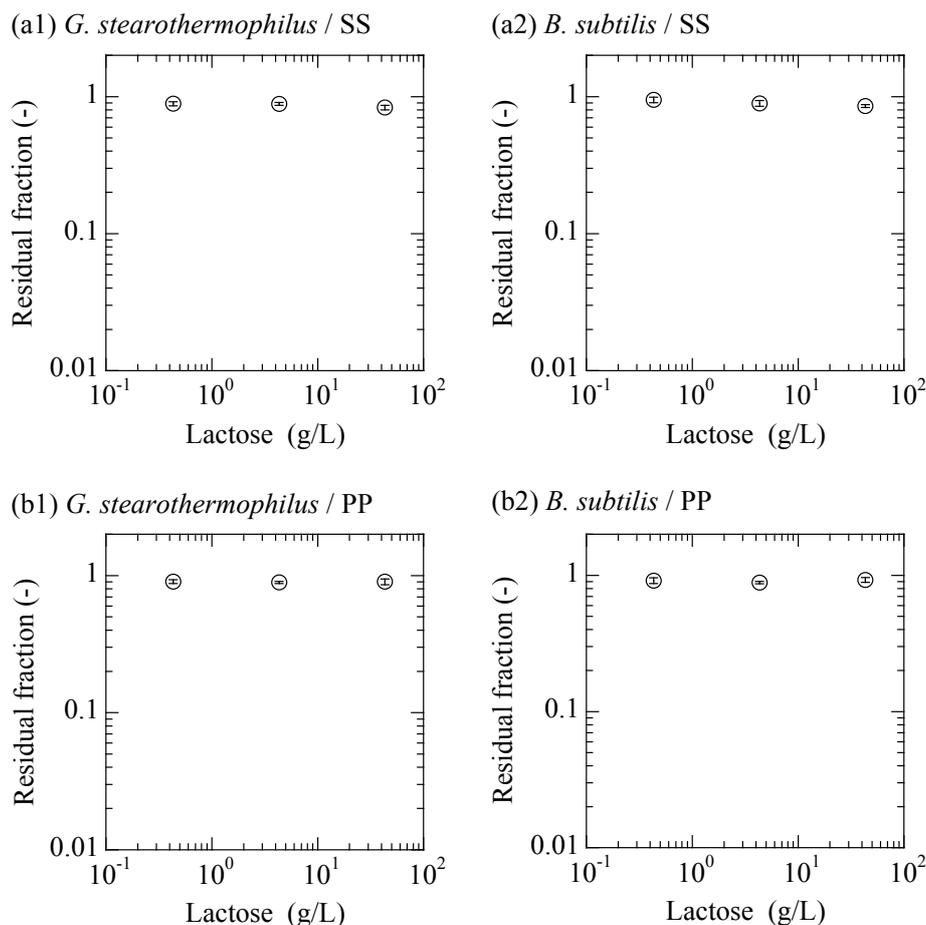


Fig. 4 Effect of lactose concentration on residual fraction of *G. stearothermophilus* and *B. subtilis* spores after water rinsing. Spores were attached to surfaces of (a) SS and (b) PP by drying with lactose solutions. Bars show standard deviation ($n=3$).

ては今後の検証が必要ではあるが、結果から考えると、低分子の糖が主成分の食品を製造する機器の場合に、洗浄によって食品成分は脱離しても芽胞は脱離しにくく、芽胞残存のリスクが大きいことが示唆される。筆者らはすでに、乾燥して固体表面に残存した芽胞がアルカリ処理でも脱離しにくく、とくにPP表面では生残性が高いことを報告した [6]。固体表面に直接接触した芽胞には、殺菌剤など他の薬剤の効果も及びにくい可能性もある。製造する食品の組成にも依存することではあるが、食品製造機器の衛生管理上、注意が必要である。芽胞の付着を抑制するための方法および機器表面に付着した場合の芽胞の効率的洗浄方法などについても今後の検討が望まれる。

謝 辞

ホエイパウダーを試料としてご提供いただきました株式会社明治に深く感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) V. C. Salustiano, N. J. Andrade, N. F. F. Soares, J. C. Lima, P. C. Bernardes, L. M. P. Luiz, P. E. Fernandes; Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control*, **20**, 439-442 (2009).
- 2) U. Rönner, U. Husmark, A. Henriksson; Adhesion of *bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 550-556 (1990).
- 3) C. Faille, C. Jullien, F. Fontaine, M. N. Bellon-Fontaine, C. Slomianny, T. Benezech; Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces. *Can. J. Microbiol.*, **48**, 728-738 (2002).
- 4) U. Husmark, U. Rönner; Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 557-562 (1990)
- 5) R. J. Doyle, F. Nedjat-Haiem, J. S. Singh; Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. *Curr. Microbiol.*, **10**, 329-332 (1984).
- 6) Y. Nanasaki, T. Hagiwara, H. Watanabe, T. Sakiyama; Removability of bacterial spores made adherent to solid surfaces from suspension with and without drying. *Food Control*, **21**, 1472-1477 (2010).
- 7) EHEDG Update; A method for assessing the in-place cleanability of food processing equipment. *Trends Food Sci. Technol.*, **18**, S52-S63 (2007).
- 8) S. A. Scott, J. D. Brooks, J. Rakonjac, K. M. R. Walker, S. H. Flint; The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *Int. J. Dairy Sci.*, **60**, 109-117 (2007).
- 9) P. M. Murphy, D. Lynch, P. M. Kelly; Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *Int. J. Dairy Sci.*, **52**, 45-50 (1999).
- 10) S. H. Flint, J. Palmer, K. Bloemen, J. D. Brooks, R. Crawford; The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 151-157 (2001).
- 11) S. H. Flint, P. J. Bremer, J. D. Brooks; Biofilm in dairy manufacturing plant—description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, **11**, 81-97 (1997).
- 12) D. A. Shapton, W. R. Hindes; The standardization of a spore count technique. *Chem. Ind.*, **1963**, 230-234 (1963).
- 13) T. Ito; “Dairy Products (Nyuseihin seizougaku)”, Kourin, Tokyo, Japan, 2006, p. 6.
- 14) L. M. Barnes, M. F. Lo, M. R. Adams, A. H. L. Chamberlain; Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4543-4548 (1999).
- 15) R. Bos, H. C. van der Mei, H. J. Busscher; Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—mechanisms and methods for study. *FEMS. Microbiol. Rev.*, **23**, 179-230 (1999).
- 16) U. Husmark, U. Rönner; The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling*, **5**, 335-344 (1992).
- 17) R. B. Seale, S. H. Flint, A. J. McQuillan, P. J. Bremer; Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 731-737 (2008).
- 18) F. Ahimou, M. Paquot, P. Jacques, P. Thonart, P. G. Rouxhet; Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Methods*, **45**, 119-126 (2001).
- 19) K. M. Wiencek, N. A. Klapes, P. M. Foegeding; Adhesion of *Bacillus* spores to inanimate materials: effects of substratum and spore hydrophobicity. *Biofouling*, **3**, 139-149 (1991).
- 20) M. P. Ortega, T. Hagiwara, H. Watanabe, T. Sakiyama; Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. *Food Control*, **21**, 573-578 (2010).

和 文 要 旨

食品製造機器表面に芽胞が残存した場合、栄養細胞よりも熱や薬剤の殺菌処理に耐性が強いいため、対処が困難になる危険性が高い。本研究では、食品の例として牛乳に懸濁した状態でステンレス鋼平板およびポリ

プロピレン平板上で乾燥された芽胞に対して水による攪拌洗浄実験を行い、その付着性の強さについて検討した。乳脂肪分含量のみが異なる乳製品と共存した場合、洗浄後の芽胞残存率は乳脂肪含量に関わらず低レベルであった。希釈した牛乳に芽胞を懸濁して同様に付着・洗浄実験を行ったところ、共存する牛乳の濃度が減少すると洗浄後の芽胞残存率が増加した。したがって、両素材平板に対する芽胞の付着力は本来強いが、脂肪以外の乳成分が共存すると芽胞の付着力を弱めて

脱離性が高まることが示された。そこで、脱離性に及ぼす乳成分の影響を検討するために、ホエイパウダーおよび乳糖の水溶液に芽胞を懸濁して同様の実験を行った。その結果、共存するホエイの固形分濃度が増加すると洗浄後の残存率は減少したが、乳糖の場合には濃度に関わらず芽胞残存率は高いレベルのまま一定であった。以上の結果、ホエイ中のタンパク質は芽胞の付着力を弱めるのに対して、乳糖は付着力に影響を与えないことが示された。