

## バイオフィーム視点から食品危害菌の制御を目指して

### Microbial Control of Food Spoilage Bacteria in Biofilms

久保田 浩 美  
HIROMI KUBOTA

花王株式会社安全性評価研究所 〒 321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606

\* TEL: 0285-68-7402 FAX: 0285-68-7403

\* E-mail: kubota.hiromi@kao.co.jp

Global R&D-Safety Science, Kao Corporation, 2606 Akabane, Ichikai-machi, Haga-gun, Tochigi, 321-3497, Japan

キーワード: 汚染菌, 危害菌, バイオフィーム, 乳酸菌, *Lactobacillus plantarum*

Key words: food spoilage, biofilm, *Lactobacillus plantarum*

(原稿受付 2010 年 2 月 26 日 / 原稿受理 2010 年 4 月 3 日)

#### 1. はじめに

乳酸菌は、古くから世界各地で、ヨーグルト、チーズ、漬物、発酵ソーセージなどの発酵食品の製造に利用されてきた。その他にもバクテリオシンの生産による変敗の防止、あるいは代謝産物による香りや風味の付加などにおいて多くの発酵食品に寄与している。さらに、プロバイオティクスとして腸内環境の改善や健康の維持に有効であることから人間にとって非常に有益な菌種として広く知られている。

しかしながら、その一方で、これら乳酸菌は、食品における変敗、異臭、またはパッケージの膨張を引き起こす「変敗菌」、「汚染菌」あるいは「危害菌」としても非常によく知られている。食品業界では長い間この問題に悩まされ、食品製造時の多くの場面で乳酸菌を意識した制御対策が講じられてきた。

#### 2. 食品における乳酸菌汚染の現状

乳酸菌による食品の変敗や汚染の例としては、日本人が古くから経験してきた清酒における「火落ち」(製成酒に乳酸菌が繁殖して濁る事)がまず挙げられる。これは火落ち菌といわれる *Lactobacillus homohiochi*, *Lactobacillus heterohiochi* (*Lactobacillus fructivorans*) などの混入<sup>2,8)</sup>によるもので、アルコール含量が低いとよりおこり易い。アルコール飲料では、この他、ビールやワインに対する乳酸菌汚染の報告がある<sup>3)</sup>。ビールにおける汚染菌の事例としては、*Lactobacillus brevis* が最も多く、汚染事例の 30% を占めている。ワイン発酵では、糖含量の高いデザートワインを汚染する菌として、*Lactobacillus fructivorans* と *Lactobacillus hilgardii* が報告されている。乳酸菌を利用して製造するチーズ<sup>8,43)</sup> やヨーグルト<sup>8,10)</sup>、漬物<sup>8,10)</sup> においてもそれらの風味を損

なわせる混入菌として、*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, および *Enterococcus* 属の乳酸菌が多く報告されている。酢<sup>23,25)</sup>、マヨネーズ<sup>32)</sup>、ドレッシング<sup>32)</sup>、ピクルス<sup>42)</sup>、マリネ<sup>36)</sup> などの酸性の食品、ソーセージなどの食肉加工品<sup>1,4,8,15,17,39)</sup>、かまぼこ、イカの燻製などの魚肉加工品<sup>6,8,11)</sup>、佃煮<sup>5)</sup>、醤油やつゆ<sup>7,9,12)</sup> あるいは味噌<sup>8,38)</sup> など塩分含量の多い食品においてエタノール臭や異臭を起す変敗菌、酸敗あるいはパッケージの膨張の原因菌として *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, および *Pediococcus* 属の乳酸菌が多く報告されている。これらの属の中でも *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus acidilactici* などが報告事例の多い菌種として挙げられる<sup>8)</sup>。

これら食品の変敗や汚染を乳酸菌が引き起こす最も大きな理由としては、乳酸菌が環境ストレスに対し高い耐性を有することが挙げられる。すなわち食品中あるいは食品製造工程における重要な微生物制御因子である酸<sup>22,23,25,32)</sup>、エタノール<sup>2)</sup>、塩<sup>7,9,12)</sup>、熱<sup>21)</sup>、殺菌・防腐剤<sup>8)</sup>、低温<sup>8)</sup> などのストレスに対して、またビールにおいてはホップ<sup>16,40)</sup> に対しても乳酸菌は非常に高い耐性を有しており、このことが危害を引き起こす最も大きな原因と考えられている。このように様々なストレスに対し耐性を有し、かつ我々の身近な環境に多く存在している乳酸菌は、食品の製造工程において原料に付着して、あるいは工場内の環境から製品中に混入し、製品の中では危害菌として生存することも危惧される。このため原料や製造環境の微生物管理時には十分な注意を払う必要があった。

#### 3. バイオフィーム視点での微生物制御研究

一方、環境中で微生物は、固体表面に付着し存在していることが多く、付着した微生物は菌体外に産生するポ

リマーなどを介してバイオフィームを形成している場合も多いことが知られている。このようなバイオフィームの形成は、微生物の環境応答、すなわち生き残り戦略と考えられており、その特徴として熱や薬剤などの物理的または化学的なストレスに対して浮遊の状態よりも耐性化する事が様々な菌種で知られている<sup>24,26,37,44,49</sup>。そのため、微生物制御の観点では、目的の微生物を液中に懸濁させた状態（浮遊状態）で薬剤の評価を行う従来の抗菌試験による評価のみではなく、実際に環境に存在している状態を反映させた評価に基づく制御も重要であると考えられている。医療分野における緑膿菌のバイオフィーム制御に代表されるようなバイオフィーム状態の菌を制御対象とした研究が推進されている。

食品危害菌においても同様で、「バイオフィームの制御」の重要性については認識されていた<sup>52</sup>が、実際的な制御研究や抗菌評価の多くは浮遊の状態の細菌を用いて行っており、バイオフィーム形態を加味した制御研究は少なかった。実際、1990年代後半以降、食品分野においてもバイオフィームを対象とした制御研究の報告も増えてきてはいたが、その多くは、例えば、食品製造ラインや生鮮原料などの表面のバイオフィームの解析やそれらの場面で使用する抗菌剤、除菌剤、および洗浄剤について、あるいは物理的殺菌手法などによる洗浄除去効果についてなど<sup>13,14,18,28</sup> 実学的研究であり、医療分野における「緑膿菌のバイオフィーム研究」等に比べると、食品微生物のバイオフィームに関する基礎的な研究の例は圧倒的に少なかった。

乳酸菌の「バイオフィーム制御」に関しては、口腔内の齲蝕原因菌といわれている *Streptococcus mutans* において詳細な研究が進められてきた<sup>34,35</sup>。しかしながら、食品への危害の対象になることが多い *Lactobacillus* 属などにおいては、クオラムセンシング、付着、バイオフィーム形成あるいはそれらに関わる遺伝子に関する報告<sup>27,29,33,45-47</sup>があるものの、バイオフィームの形成とその耐性の変化について詳細に調べられてはならず、耐性の変化をもたらすバイオフィーム状態を科学的に考慮して制御法を決定している例もなかった。

このような背景の下、我々は、古くから様々な場面で危害菌となっていた乳酸菌をより適切に制御するためのアプローチの一つとして、バイオフィーム状態を考慮すること、すなわち、バイオフィーム視点からの制御を行うことが必要であると考え研究に着手した。原料中でのバイオフィーム形成の可能性やその耐性の変化を詳細に把握することで、より科学的で適切な制御手法を提案することが可能となり、食品の安全性の確保はもちろんのこと、過剰な制御による味や風味の低下を回避できることから商品設計の幅を広げることも期待できた。

#### 4. 原料上の乳酸菌の存在状態<sup>30</sup>

我々は、まず実際の食品原料上ではどのような乳酸菌がどのような状態で存在する可能性があるかということ調査するために、一年を通して安定的に流通している野菜の一つであるタマネギを例として取り上げ、タマネギ上の微生物の存在状態の観察や存在する乳酸菌の分離を試みた。すなわちタマネギ上の SEM 観察を行う（図1）とともに、MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) 培地を用いて嫌気的あるいは好氣的に乳酸菌を分離し、16S rRNA 遺伝子の相同性およびそれを用いた系統樹解析により種の同定を行った（表1）。その結果、タマネギ上には微生物が付着し、バイオフィーム状態で存在する場合もあること、また、タマネギからは様々な乳酸菌が分離され、その中に食品の危害菌としてよく知られている乳酸菌種である *L. plantarum*, *L. brevis* などが存在していることが判明した。

#### 5. 乳酸菌のバイオフィーム<sup>30</sup>

続いて、代表的な危害菌とされる乳酸菌種が固体表面にバイオフィームを形成する可能性について実験により評価した。危害菌として多く報告されている *Lactobacillus* 属の中から、その中でも多くの報告のある *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fructivorans* の標準株および前述

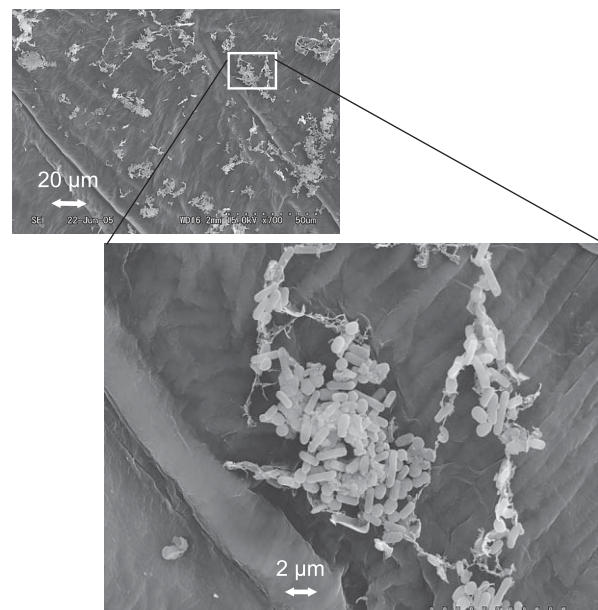


図1. タマネギ表層の SEM 観察

表1. タマネギからの乳酸菌の分離

分離タマネギ	分離菌数			
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	その他の <i>Lactobacillus</i> 属	<i>Lactobacillus</i> 属 以外の乳酸菌
カットタマネギ	4	0	0	0
ミンチ状原料	4	3	7	4
ペースト状原料	0	1	0	20

のタマネギからの分離株 43 株について、O'Toole ら<sup>41)</sup>の手法を改変した方法によりバイオフィーム形成能の評価を行った。まず、親水化処理を施した 96 穴マイクロプレート (Costar 3595 96-well polystyrene microtiter dishes, Corning, NY, USA) にて MRS 培地を用いて培養し、培養終了後、培地を取り除いて静かに洗浄した後にウェル上に残ったものをバイオフィームとした。次に、0.1% (w/v) クリスタルバイオレット (CV) 水溶液を添加してバイオフィームを染色した。CV 水溶液を取り除いて静かに洗浄した後、一定量のエタノールを添加して CV を脱色させ、そのエタノール溶液の吸光度 ( $A_{595}$ ) を測定することで形成量を評価した。尚、本実験では菌を接種せずに同様の操作をおこなった際の  $A_{595}$  値が 0.1 よりも小さかったことから、 $A_{595} > 0.1$  の場合をバイオフィーム形成があるものと判断した。

その結果、供試した全ての菌株において好気条件あるいは嫌気条件でバイオフィームの形成が認められた (図 2)。供試した全ての乳酸菌がバイオフィーム形成能を有していることや前項の結果から食品の危害菌となりうる乳酸菌が食品原料上や食品製造現場でバイオフィームを形成して存在する可能性が示唆された。

### 6. 乳酸菌バイオフィームのストレス耐性<sup>31)</sup>

先述のようにバイオフィーム状態の微生物は、熱や薬剤などの物理的または化学的なストレスに対して浮遊の状態よりも耐性化する事が様々な菌種で知られているた

め、乳酸菌についてもバイオフィーム状態でのストレス耐性を評価することとした。Sturme ら<sup>45)</sup>の手法を参考に、タイタープレート内に入れた丸型カバーガラス (12 mmφ, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 上にバイオフィームを形成させ (図 3)、耐性試験に供した。供試菌としては、先の実験の結果バイオフィーム形成量が最も多く、かつ食品 (ピクルス) 由来である *L. plantarum* の標準株 (JCM 1149 株) を選択した。

耐性試験は薬剤を添加した溶液に浮遊状態およびバイオフィーム状態の菌を室温で一定時間接触させた後、バイオフィームの場合は 10 回以上のピペッティングによりバイオフィームを崩壊したもの、浮遊菌の場合はよく攪拌したものを生理食塩水に懸濁し、懸濁液あるいはそれを希釈した液を MRS 寒天上に塗抹した。30°C で 3 日間嫌気ボックスを用いて培養した後、コロニー数を計測して生菌数を算出した。薬剤溶液の代わりに生理食塩水を用いて同様の操作を行ったものをコントロールとした。尚、耐性試験結果を示した図中の菌数の表示は、比較を容易にするために菌の状態に関わらず、処理溶液 1 mL あたりの生菌数 (CFU) とした。生菌数計測の際の検出限界は次亜塩素酸ナトリウムを接触した場合は 200 CFU/mL、それ以外の場合は 100 CFU/mL である。

#### 6.1. *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 株バイオフィームの酢酸耐性

乳酸菌は多様な食品において汚染菌としての報告があるが、特に酸性の食品においてはより酸に強い *Lacto-*

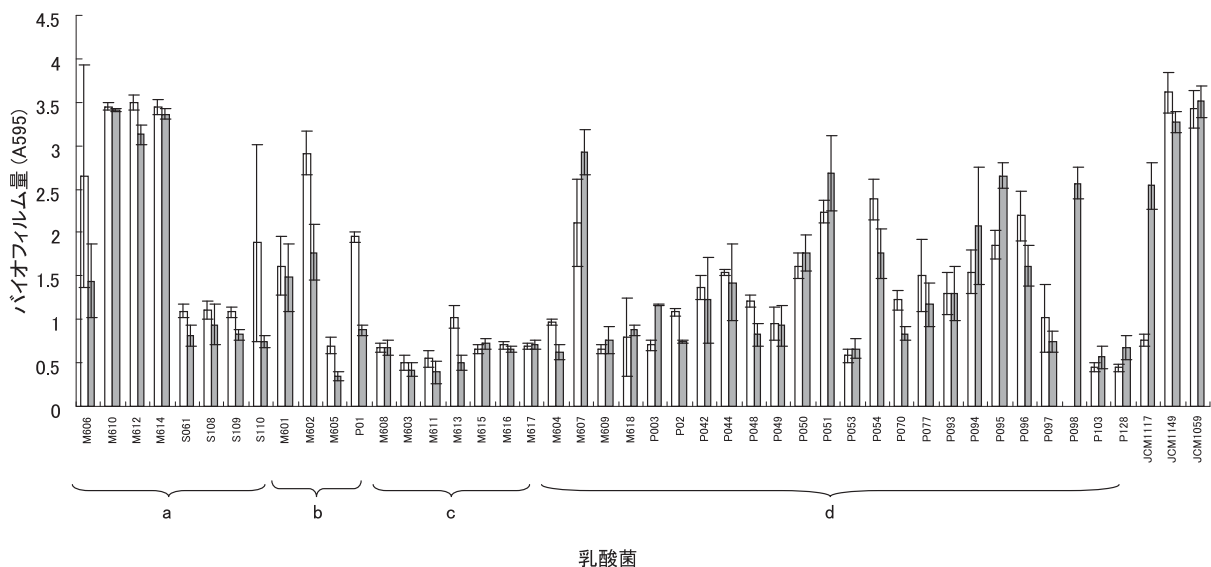


図 2. 乳酸菌のバイオフィーム形成量の評価  
a, *Lactobacillus plantarum* ; b, *Lactobacillus brevis* ; c, その他の *Lactobacillus* 属 ; d, *Lactobacillus* 属以外の乳酸菌

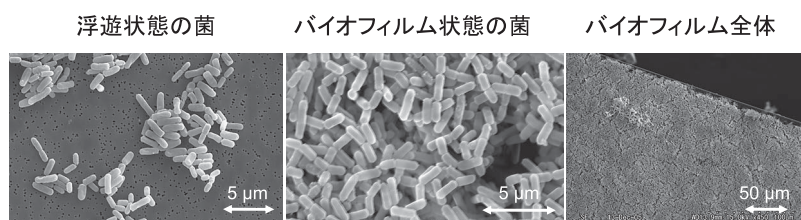


図 3. カバーガラス状に形成させた *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 株のバイオフィームの SEM 観察

*bacillus* 属乳酸菌の制御が重要な課題となっている。そこで、まず酸性の食品を想定して pH 3 付近での酢酸の影響についてバイオフィーム状態と浮遊の状態の菌を用いて評価することにした。pH 3.0 付近に調整した酢酸溶液を用いて室温で 30 分間接触させることにより耐性試験を行った結果、浮遊状態では、対数増殖期に比べ定常期の菌の酢酸耐性が高く、また、酢酸濃度が 10% 以上になると定常期の菌に比べてバイオフィーム状態の菌が顕著に高い耐性を示すことが明らかになった (図 4)。この結果は、酸性の食品において、危害菌としてバイオフィーム状態の乳酸菌を考慮した制御をすることの重要性を示唆していた。

次に、バイオフィーム状態の菌を懸濁あるいは希釈した状態で酢酸 (8.2%, pH 3.0) 耐性の評価 (室温, 30 分間接触) を行った。その結果、バイオフィーム状態の菌は浮遊状態の場合と同じ菌体濃度になるように懸濁した状態でも、更にそれを 10 ~ 100 倍希釈した状態でも、その耐性の低下が認められないことが判明した (図 5)。バイオフィーム状態の菌ばかりではなく、バイオフィーム状態から浮遊状態に移行したり、それがさらに希釈されてラインなどに存在したりしても、ある一定の時間はバイオフィーム状態と同様の高い耐性を持って危害菌となりうる可能性を示唆している。このため生産ラインや原料中に危害菌として乳酸菌が存在している場合は、このような実験結果を踏まえた適切な制御法が必要と考えられた。

6.2. *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 株バイオフィームの種々のストレス耐性

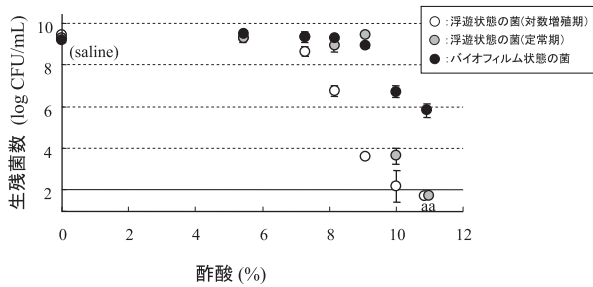


図 4. *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149 株の浮遊状態およびバイオフィーム状態における酢酸 (pH 3.0-2.9 に調整) 耐性  
a, 検出限界以下

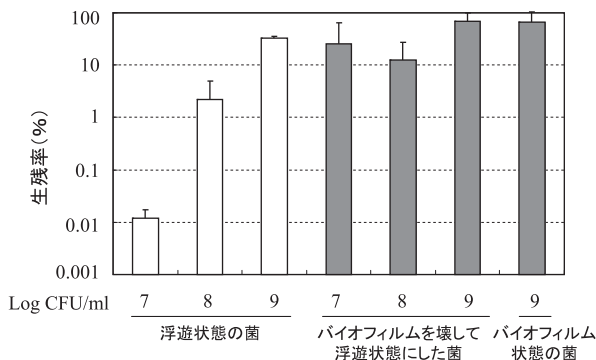


図 5. 各種状態における酢酸 (8.2%, pH 3.0 に調整) 耐性

続いて、バイオフィーム状態の菌の様々なストレスに対する耐性を調べるために、食品の防腐や食品製造時の衛生管理に重要な制御因子となる有機酸、エタノール、次亜塩素酸ナトリウムに対する耐性の評価を行った。

種々の有機酸溶液中で、*L. plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149 の浮遊状態 (対数増殖期, 定常期) およびバ

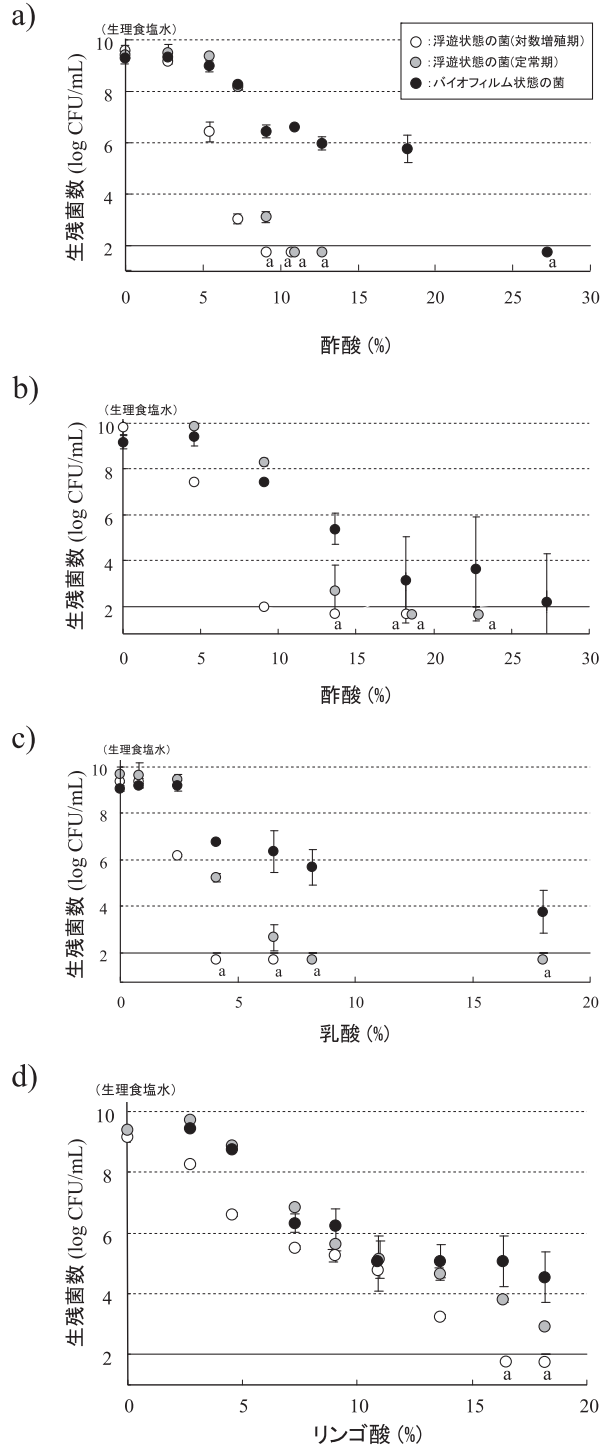


図 6. 浮遊状態およびバイオフィーム状態における有機酸耐性  
a) 2.7-27% (v/v) 酢酸水溶液 (pH 2.5-1.7), b) 4.6-27% (w/v) クエン酸水溶液 (pH 2.0-1.4), c) 0.9-20.0% (w/v) 乳酸水溶液 (pH 2.3-1.5), d) 2.7-1.8% (w/v) リンゴ酸水溶液 (pH 2.1-1.5). a, 検出限界以下

イオフィーム状態における耐性（室温，30分間接触）を比較した結果を図6に示す。2.7-27%（v/v）酢酸水溶液（pH 2.5-1.7）（図6-a），4.6-27%（w/v）クエン酸水溶液（pH 2.0-1.4）（図6-b），0.9-20.0%（w/v）乳酸水溶液（pH 2.3-1.5）（図6-c），2.7-1.8%（w/v）リンゴ酸水溶液（pH 2.1-1.5）（図6-d）のいずれの場合も，浮遊状態では，対数増殖期に比べ定常期の菌の耐性が高く，バイオフィーム状態の菌は対数増殖期および定常期のいずれのフェーズの浮遊状態の菌に比べても高い耐性を示していた。その耐性の違いは酢酸あるいは乳酸溶液中で特に顕著に認められた。エタノール，次亜塩素酸ナトリウムに対する耐性を評価（室温でそれぞれ60分間，10分間接触）した結果を図7に示す。いずれの薬剤に対しても浮遊状態では定常期の菌のほうが対数増殖期の菌よりも高い耐性を有していた。エタノールに対しては20%付近よりバイオフィーム状態の菌が浮遊状態に比べて明らかに高い耐性を有していた（図7-a）。また，次亜塩素酸ナトリウムに対しては低濃度（有効塩素濃度10 ppm付近）からバイオフィーム状態の菌が顕著に高い耐性を有していた（図7-b）。このように評価したすべての薬剤に対してバイオフィーム状態の菌が浮遊状態の菌（対数増殖期および定常期）よりも高い耐性を有していることが初めて明らかとなった。これらの結果からも食品分野における危害菌としての乳酸菌の制御においては，制御する薬剤に関わらずバイオフィーム状態での耐性を把握することと，それを考慮した評価系の構築が必須であると考えられた。

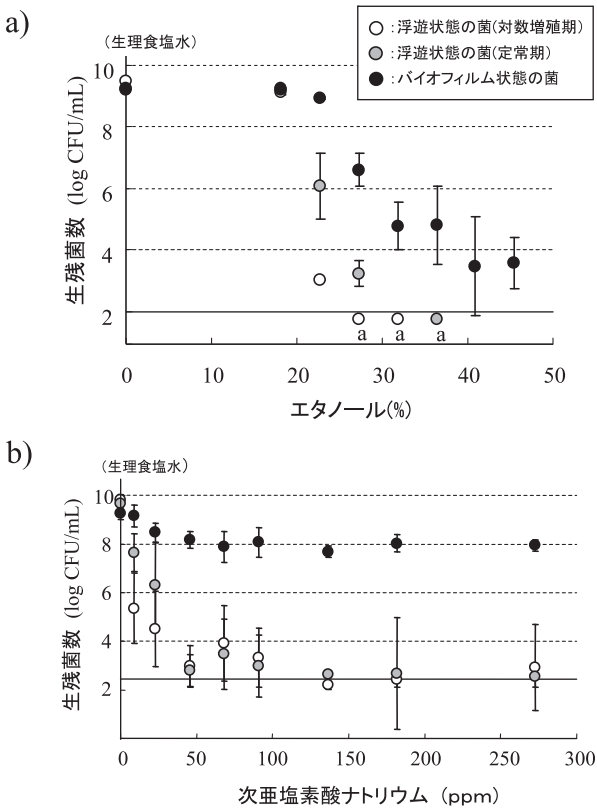


図7. 浮遊状態およびバイオフィーム状態における薬剤耐性 a) エタノール, b) 次亜塩素酸ナトリウム. a, 検出限界以下

### 7. *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149 株バイオフィームのストレス耐性機構<sup>30,31)</sup>

乳酸菌 *L. plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149 株はバイオフィームを形成すると種々のストレスに対して高い耐性を示すことがわかってきたため，耐性機構の推定を試みた。初めに，酢酸あるいはエタノール耐性試験後の菌体の状態を SEM により観察した（図8）。10%酢酸や30%エタノールで処理した場合には，浮遊状態の菌の細胞表層の損傷が大きく，特にエタノールで処理した場合には，視野に存在する菌数も顕著に減少していた。それに対し，バイオフィームの場合は10%酢酸に接触させた場合での細胞表層の大きな損傷はほとんどなく，30%エタノールの場合においても大きく損傷している菌の数は少なかった。これらの観察結果は塗抹法による生菌数の測定結果を反映していた。バイオフィーム全体を観察したところ，10%酢酸に接触させた場合は表面の凹凸が目立ち，30%エタノールに接触させた場合はより平坦であり，いずれの場合もバイオフィームの表層部分は薬剤との接触により構造が変化していた。バイオフィーム中では外側の菌体のみが損傷し，その際に損傷した菌体は耐性試験中に脱離した，あるいは脱離した菌体の多くが試験中に損傷したが集合体を作っている菌体の多くは薬剤の影響を受けなかったという可能性が考えられた。そこで酢酸耐性試験後に浮遊状態となっていた菌体（試験中に脱離した菌体）を回収して同様に観察を行ったところ，バイオフィームから脱離した菌体では損傷した菌の割合が高いことも判明した（data not shown）。ま

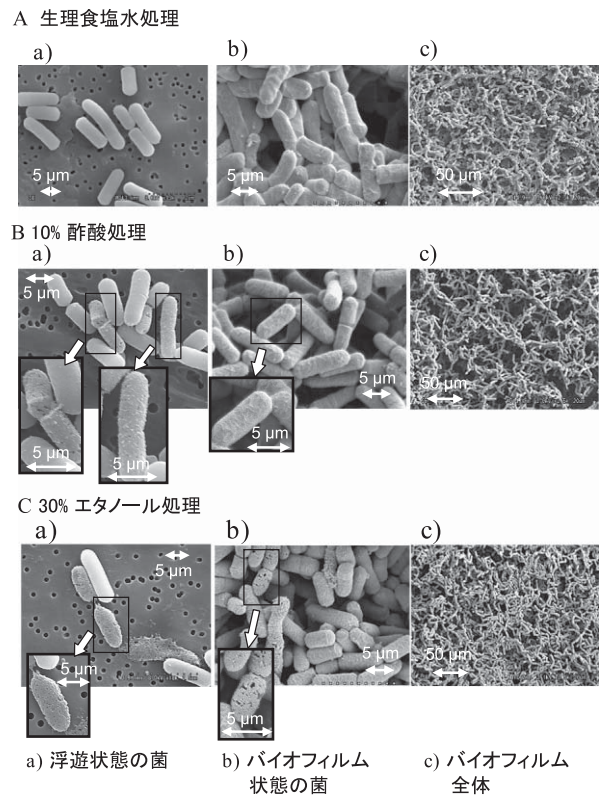


図8. 耐性試験後の *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 株の SEM 観察

た同時にバイオフィーム培養時（調製時）にバイオフィームとして附着しなかった菌体についての酢酸耐性を評価した結果、その耐性は低かった（data not shown）。これらのことは耐性発現にガラス面への附着や菌体同士の附着が重要であることを示唆している。

一方、有機酸の抗菌メカニズムは、疎水的な構造を有している非解離分子の細胞表層への作用であるといわれている<sup>19,20</sup>。使用した有機酸の中で非解離分子の疎水度がより高い酢酸や乳酸に対して、バイオフィーム状態の菌が浮遊状態に比べて特に顕著な耐性を示していることは、疎水性の物質が菌体の表層構造に作用する機序に対して、バイオフィームを形成することにより耐性を向上させていることを示唆している。図9に50 mM 酢酸-HCl 緩衝液を用いて pH を変化させた場合の pH ストレス耐性試験の結果を示した。この結果から、有機酸ではなく HCl にて pH を変化させた場合であってもより pH の低い酸性下（pH 2 以下）でバイオフィーム状態のほうが浮遊状態の菌に比べて高い耐性を示すことがわかった。バイオフィーム状態においては、疎水性の物質の細胞表層に対する作用に対して耐性を向上させているのみではなく、プロトン（H<sup>+</sup>）に対する耐性も向上させていると考えられた。乳酸菌の酸耐性機構の一つとしてプロトン（H<sup>+</sup>）に対する耐性機構も総説<sup>22,50</sup>にまとめられており、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase、K<sup>+</sup>-ATPase あるいは脱炭酸化など様々な代謝によるプロトン（H<sup>+</sup>）の移動により細胞内プロトン（H<sup>+</sup>）濃度を維持することが *Streptococcus* 属や *Lactobacillus* 属などでの酸耐性機構の一つであることが報告されている。また、urease や arginine deiminase などによりアルカリ性の物質を生産することで細胞内 pH を維持するというような酸耐性機構も *Streptococcus* 属や *Lactobacillus* 属などで報告されている。本研究においても、このような耐性機構がバイオフィーム状態より活発に働いている可能性も考えられる。また、乳酸菌は薄い酸溶液あるいは弱酸性の pH 値を示す溶液に曝されることで pH 値がより低い酸溶液への耐性を示すように適応するという報告もある<sup>50</sup>。*S. mutans* においては、バイオフィーム状態で、浮遊状態より酸耐性が高く、その酸耐性はやや高い pH 値（弱酸性）で前培養することによりさらに向上することが報告されている<sup>51</sup>。また、*Lactobacillus reuteri* CRL 1098 では胆汁酸に曝されることにより膜の脂質組成が変化した<sup>48</sup>。これらのことから、培養の段階で浮遊状態の菌とバイオフィームの状態の菌体では、酸に曝された履歴が異なることで耐性の違いが生じるということも考えられ

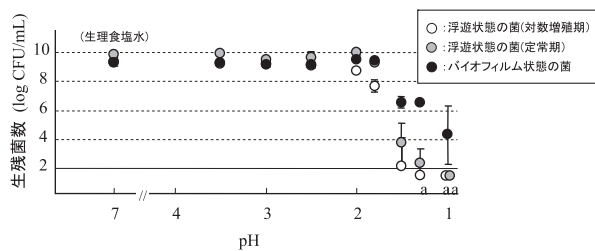


図9. バイオフィーム状態および浮遊の状態における pH ストレス耐性  
a, 検出限界以下

たが、本試験条件では、バイオフィーム状態での培養時も浮遊状態での培養時も 12 時間、24 時間後の培養液の pH はいずれも 3.5 であり、またバイオフィーム状態と浮遊状態の有機酸（酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸）の生産量も状態に関わらず各時間でそれぞれほぼ等しかった（data not shown）。このため、現段階においては、菌体の培養の段階での酸適応の違いからバイオフィームと浮遊状態の菌の酸耐性の違いが生じている可能性は低いと考えている。

また、前項で述べたように浮遊状態の菌は希釈すると酢酸耐性が低下するにもかかわらず、バイオフィーム構造を形成している菌体を浮遊状態のように壊してもその耐性は維持されている。このことはバイオフィーム形成にともなう遺伝子発現の変化により個々の菌体の耐性が向上していることを示唆している。

## 8. おわりに

食品の微生物制御においては、危害菌の実態や耐性の変化を把握することが重要な意義を持ち、これらを把握することにより、より科学的で適切な制御による食品の安全性の確保はもちろんのこと、過剰な制御による味や風味の低下の回避が可能となり、商品設計の幅を広げることも期待される。本研究では、食品分野で古くから危害菌として問題視されている乳酸菌に焦点を当て、バイオフィーム状態での耐性の変化に着目した。

代表的な危害菌である *L. plantarum* の標準株を用いて食品の製造や処方設計、衛生管理における重要な微生物制御因子とされている種々の有機酸、エタノール、および次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合について浮遊状態（定常期、対数増殖期）とバイオフィーム状態の菌の耐性を評価した。その結果、評価した全ての剤に対してバイオフィーム状態の菌が高い耐性を有しているという新しい知見が得られた。更にこのバイオフィーム状態での高い酢酸耐性は、バイオフィームを壊して懸濁した菌体でも、それを希釈した場合にも維持されていた。食品危害菌としての乳酸菌においてはこのような結果についての報告はこれまでになく、乳酸菌が危害となるような食品分野における乳酸菌バイオフィーム制御研究の必要性および重要性を示すものである。また乳酸菌はバイオフィーム状態では、構造全体と個々の菌の変化の両面から耐性が向上している可能性があり、この両面から詳細に検討していくことが重要であると考えられた。今後、構造に着目して細胞外ポリマーなどの存在や構造体の中での菌体の役割分布等を探ること、個々菌の変化に着目してバイオフィーム形成時における遺伝子発現の変化や膜組成の変化を調べることを進めていく予定である。これらの観点からの耐性機構解明が、食品危害菌としての乳酸菌の生態を明らかにしていくとともに、乳酸菌バイオフィーム制御技術の開発につながるものと考えている。

## 謝 辞

本研究は筑波大学との共同研究の一部を含みます。多岐にわたるご指導を賜りました同大大学院生命環境科学

研究科教授内山裕夫教授, 野村暢彦准教授に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 伊藤 武, 森地敏樹編. 2004. 食品のストレス環境と微生物, pp. 55–58. サイエンスフォーラム.
- 2) 伊藤 武, 森地敏樹編. 2004. 食品のストレス環境と微生物, pp. 194–196. サイエンスフォーラム.
- 3) 伊藤 武, 森地敏樹編. 2004. 食品のストレス環境と微生物, pp. 196–200. サイエンスフォーラム.
- 4) 宇田川俊一, 駒木 勝, 佐藤 順, 南澤正敏編. 2003. 微生物汚染事例・現場検査法 Q&A 集, pp. 98–102. サイエンスフォーラム.
- 5) 宇田川俊一, 駒木 勝, 佐藤 順, 南澤正敏編. 2003. 微生物汚染事例・現場検査法 Q&A 集, pp. 184–187. サイエンスフォーラム.
- 6) 宇田川俊一, 駒木 勝, 佐藤 順, 南澤正敏編. 2003. 微生物汚染事例・現場検査法 Q&A 集, pp. 193–194. サイエンスフォーラム.
- 7) 浦 哲二, 稲盛和夫, 古谷 武, 内田一生. 1988. 低塩醤油に生育する微生物に関する研究 (第1報). 醤油研報. 14: 187–192.
- 8) 食品変敗防止研究会編. 2006. 食品変敗防止ハンドブック, pp. 83–97. サイエンスフォーラム.
- 9) 末澤保彦, 尾路一幸, 大谷小百合. 1993. 耐塩性乳酸菌による減塩醤油の変敗 (第1報). 香川食品誌年報. 86: 29–31.
- 10) 内藤茂三. 1999. 食品の製造環境における乳酸菌の汚染と食品の変敗. 環境管理技術. 17: 289–303.
- 11) 内藤茂三, 岡田和久, 井上洋次. 2001. 燻製イカ製品の乳酸菌による膨張変敗とオゾン水殺菌. 日本防菌防黴学会誌. 29: 497–505.
- 12) 田中正男. 1990. 減塩醤油のガス発生原因について. 醤油研報. 16: 4–6.
- 13) 土戸哲明. 2000. 付着細菌とバイオフィームの薬剤・熱抵抗性と食品における制御. 日本防菌防黴学会誌. 10: 623–633.
- 14) 森崎久雄, 大島博之, 磯部賢治. 1998. バイオフィームバイオフィーム予防のための洗浄技術. pp. 265–275. サイエンスフォーラム.
- 15) Aymerich, T., B. Martín, M. Garriga, and M. Hugas. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *App. Environ. Microbiol.* 69: 4583–4594.
- 16) Behr, J., M.G. Gänzle, and R.F. Vogel. 2006. Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6483–6492.
- 17) Björkroth, K.J., and H.J. Korkeala. 1997. Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 448–453.
- 18) Blackman, I.S., and J.F. Frank. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. 59: 827–831.
- 19) Brown, M.H., and I.R. Booth. 1991. Acidulants and low pH. In: Russell, N.J., and G.W. Gould, (ed.), *Food preservatives* vol. 3, pp. 22–43. AVI Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- 20) Brul, S., and P. Coote. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 1–17.
- 21) Gardiner, G.E., E. O’Sullivan, J. Kelly, M.A.E. Auty, G.F. Fitzgerald, J.K. Collins, R.P. Ross, and C. Stanton. 2000. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Appl. Environ. Microb.* 66: 2605–2612.
- 22) Cotter, P.D., and C. Hill. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 429–453.
- 23) Dakin, J.C., and J.Y. Radwell. 1971. Lactobacilli causing spoilage of acetic acid preserves. *J. Appl. Bact.* 34: 541–545.
- 24) Desai, M., T. Bühler, P.H. Weller, and M.R.W. Brown. 1998. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 153–160.
- 25) Entani, E., H. Masai, and K. Suzuki. 1986. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 544–549.
- 26) Frank, J.F., and R.A. Koffi. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food. Prot.* 53: 550–554.
- 27) Fujii, T., C. Ingham, J. Nakayama, M. Beerthuyzen, R. Kunuki, D. Molenaar, M. Sturme, E. Vaughan, M. Kleerebezem, and W. de Vos. 2008. Two homologous *agr*-like quorum-sensing systems cooperatively control adherence, cell morphology, and cell viability properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *J. Bacteriol.* 190: 7655–7665.
- 28) Gibson, H., J.H. Taylor, K.E. Hall, and J.T. Holah. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 87: 41–48.
- 29) Kawarai, T., S. Furukawa, H. Ogihara, and M. Yamazaki. 2007. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4673–4676.
- 30) Kubota, H., S. Senda, N. Nomura, H. Tokuda, and H. Uchiyama. 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 381–386.
- 31) Kubota, H., S. Senda, H. Tokuda, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2009. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*. *Food Microbiology.* 26: 592–597.
- 32) Kurtzman, C.P., R. Rogers, and C.W. Hesseltine. 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. *Appl. Microbiol.* 21: 870–874.
- 33) Lebbber, S., S.C.J. De Keersmaecker, T.L.A. Verhoeven, A.A. Fadda, K. Marchal, and J. Vanderleyden. 2007. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 189: 860–871.
- 34) Li, Y.H., N. Hanna, G. Svensäter, R.P. Ellen, and D.G. Cvitkovitch. 2001. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: Implications for survival. *J. Bacteriol.* 18: 6875–6884.
- 35) Li, Y.H., P.C.Y. Lau, N. Tang, G. Svensäter, R.P. Ellen, and D.G. Cvitkovitch. 2002. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 184: 6333–6342.
- 36) Lyhs, U., H. Korkeala, P. Vandamme, and J. Björkroth. 2001. *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 335–360.
- 37) Muli, F., and J.K. Struthers. 1998. Use of a continuous-culture biofilm system to study the antimicrobial susceptibilities of *Gardnerella vaginalis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1428–1432.
- 38) Nikkuni, S., T. Ishiyama, C. Suzuki, T. Suzuki, N. Kosaka, and K. Mori. 1996. Swelling of packaged *Miso* by the heterofermentative lactic acid bacteria, *Lactobacillus fructivorans* L-1. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 43: 910–916.
- 39) Niven, C.F. Jr., A.G. Castellani, and V. Allanson. 1949. A study of the lactic acid bacteria that cause surface discolorations of sausages. *J. Bacteriol.* 58: 633–641.
- 40) Sakamoto, K., and W.N. Konings. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 105–124.
- 41) O’Toole, G.A., L.A. Pratt, P.I. Watnick, D.K. Newman, V.B.

- Weaver, and R. Kolter. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310: 91–109.
- 42) Sheneman, J.M., and R.N. Costilow. 1955. Sorbic acid as a preservative for sweet cucumber pickles. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 186–189.
- 43) Somers, E.B., M.E. Johnson, and A.C.L. Wong. 2001. Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *J. Dairy Sci.* 84: 1926–1936.
- 44) Stewart, P.S. 1994. Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1052–1058.
- 45) Sturme, M.H.J., J. Nakayama, D. Molenaar, Y. Murakami, R. Kunugi, T. Fujii, E.E. Vaughan, M. Kleerebezem, and W.M. de Vos. 2005. An *agr*-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of novel cyclic peptide and regulation of adherence. *J. Bacteriol.* 187: 5224–5235.
- 46) Sturme, M.H.J., C. Francke, R.J. Siezen, W.M. de Vos and M. Kleerebezem. 2007. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology* 153: 3939–3947.
- 47) Tannock, G.W., S. Ghazally, J. Walter, D. Loach, H. Brooks, G. Cook, M. Surette, C. Simmers, P. Bremer, F.D. Bello, and C. Hertel. 2005. Ecological behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 is affected by mutation of the *luxS* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8419–8425.
- 48) Taranto, M.P., M.L. Fernandez Murga, G. Lorca, and G.F. de Valdez. 2003. Bile salts and cholesterol induce change in the lipid cell. *J. Appl. Microbiol.* 95: 86–91.
- 49) Teitzel, G.M., and M.R. Parsek. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2313–2320.
- 50) Van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S.D. Ehrich, and E. Maguin. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 187–216.
- 51) Weilin-Neilands, J., and G. Svensäter. 2007. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5633–5638.
- 52) Zottola, E.A., and K.C. Sasahara. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry. Should they be a concern? *Int. J. Microbiol.* 23: 125–148.