

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658212

研究課題名(和文) 農産物に付着するバイオフィルム微細構造の解明

研究課題名(英文) Elucidation of microstructure of biofilm attached on the surface of agricultural produce

研究代表者

内野 敏剛 (Uchino, Toshitaka)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70134393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：乳製品副産物を試片表面に塗布し、乳関連微生物の試片への付着に及ぼす副産物の影響を検討した。副産物皮膜の厚さはスキムミルク、バターミルク、バターセラムを塗布した順に厚くなった。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い、試片表面に付着するバイオフィルム(BF)の3次元画像を得、副産物の塗布がBFの付着を抑制することを見出した。また、インデンテーション法を用いてBFの硬度を計測した。小型万能試験機で20 μ mの載荷と10 μ mの除荷を圧子が試片に達するまで繰り返した。変位荷重曲線の傾きから試片とBFの接触変位を得、BFの膜圧を求めた結果、膜圧が薄い方がBFの強度が大きくなる傾向が得られた。

研究成果の概要(英文)：An effect of dairy byproducts on adherence of dairy related bacteria to a stainless steel coupon surface conditioned by the byproducts was evaluated. The layer formed by skim milk buttermilk butter serum was thinnest, medium and thickest, respectively. Three dimensional images of biofilm were obtained by using a confocal laser scanning microscopy. In the result the conditioning by the byproducts controlled the bacterial adherence. A hardness of biofilm was determined by indentation method. Twenty micro m of loading and 10 micro m of unloading by a universal material testing machine were repeated until a plunger head touching a plastic coupon. Thickness of biofilm was calculated from a length between contact points of the plunger head with the coupon and biofilm. The biofilm strength increased with decrease of biofilm thickness.

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：バイオフィルム 共焦点レーザー顕微鏡 細胞外多糖類 乳製品副産物 インデンテーション法 微細構造

1. 研究開始当初の背景

青果物表在微生物は、例えば国内外における O-157, 米国における *Salmonella* による食中毒に代表されるように、社会的に大きな問題を引き起こすことから、流通過程における微生物制御は喫緊の課題である。微生物制御に関する研究は、微生物が遊離している状態で行われることが一般的であるが、実際に流通している青果物では微生物は表面に付着した状態で存在し、その性状も遊離した状態とは異なる(森崎, 2001)。報告者らはこれまで、赤外線や紫外線による青果物表在微生物の殺菌の研究を行うなかで(内野ら, 2004, Hamanaka et al., 2010), バイオフィルム(以下 BF) を制御することの重要性に思い至り、これまでに BF の付着特性と温度の関係等について研究し、温度上昇による付着菌数の増加と細胞外多糖類脱離の促進等を明らかにしてきた(森松ら, 2009)。これらの研究の中で、実際の青果物や食品あるいは食品工場の製造装置、パイプライン等への微生物、BF の付着特性を知り、これを抑制する方法等を確立する必要があると考えた。

Hamanaka, D., Atungulu, G.G., Tanaka, F., Uchino, T. (2010) Food. Sci. & Tech. Res., 16(4), 279-284.

森松和也, 濱中大介, 内野敏剛, 田中史彦(2009) 防菌防黴, 37(8), 565-571.

森崎久雄(2001)表面科学, 22, 638-644.

内野敏剛・井上歩美・川崎浩平・濱中大介・田中俊一郎(2004) 農業機械学会九州支部誌, 53, 7-10.

2. 研究の目的

青果物に付着する病原微生物による健康被害の軽減を最終目的とする。青果物の変敗や健康被害を抑制するためには微生物・BF の付着を抑制したり、洗浄を効果的に行うことが必要である。これには、微生物・BF の付着特性、物理的性質を把握することが重要となる。本研究では、これらを実験的に明らかにすることで、BF を洗浄あるいは付着抑制を行う際の基礎的データを蓄積し、微生物被害の起こりにくい流通環境、食品製造環境と流通形態を提言することを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 共焦点レーザー顕微鏡を用いた微生物付着特性の解明

3.1.1 供試微生物

本研究では乳製品中に存在する *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 100933 (*Lactococcus lactis*), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* NBRC107766 (*Leuconostoc cremoris*), *Lactobacillus casei* FIRI 108 (*Lactobacillus casei*) を供試菌として用いた。供試菌は培養後、菌数が $10^8 \sim 10^9$ になるよう調整して菌懸濁液を作成し、付着試験まで 4 で保存した。

3.1.2 試片と付着試験

バクテリアを付着させる試片は 1 cm×7

cm のステンレス鋼製で、表面を清浄にした後、121 で 30 min 高圧滅菌処理を行い、クリーンベンチ内で乾燥させた。その後、試片は乳製品製造時の加工副産物であるスキムミルク、バターミルク、バターゼーラムの 10% 液中に 30 min 浸漬し、被膜を形成させた後、蒸留水ですすぎ、乾燥後付着試験に用いた。

上記処理後、試片を 0.5×10^8 の菌数に調整した 10 mL の懸濁液中に 30, 180, 720 min 間浸漬した。懸濁液に浸漬しない試片は対照区とした。付着した菌は顕微鏡を用いた計数のため、染色した。

3.1.3 共焦点レーザー顕微鏡による評価

Acridine Orange で試片に付着したバクテリア菌体を染色し、洗浄・乾燥後 2, 3 滴の滅菌蒸留水を試片上に滴下してカバーガラスを掛けた。試片は共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス製 IX71)を用いて観察し、ランダムに 20 の視野の画像を得た。共焦点レーザー顕微鏡の対物レンズは 100 倍で、レンズとカバーガラスの間は油浸した。

3.2 マイクロインデンテーション法によるバイオフィルム硬度の測定

3.2.1 供試微生物

(独)製品評価技術基盤機構より入手した *Pseudomonas fluorescens* NBRC 13922 を供試菌として用いた。

前培養を行った培養液を適度に希釈し、初菌数を概ね揃えた菌液を作成した。次に、マイクロタイタープレート(以下 MTP)に 1 cm 四方のポリスチレン板と 2.5 mL の Tryptic Soy Broth (以下 TSB)を入れ、0.05 mL の菌液を添加した。これを 25 のインキュベーター内で 1 時間静置培養し、その後 5 で 22 時間静置培養した。さらにポリスチレン板を 40 の送風定温恒温器内で 1 時間乾燥させ、付着物を試片に固着させた。その間に MTP 内の培養液を除去し、新たに TSB 2.5 mL を添加後、25 のインキュベーター内で 1 時間静置培養した。乾燥後の試片を 2.5 mL の TSB とともに MTP に再び加え、5 で 22 時間静置培養した。この操作を 7 日間繰り返し、25 のインキュベーター内で 1.5 時間乾燥後、ポリスチレン板表面に形成された物体を BF としてインデンテーション試験に用いた。

3.2.2 インデンテーション試験

インデンテーション試験にはテンシロン万能試験機(エー・アンド・デイ製, RTG-1210)を用いた。インデンテーション法は圧子に載荷して試料に押し込み、その後除荷した後、再度載荷を行い、これを繰り返す。載荷時と除荷時の変位と荷重を連続的に測定することで得られる変位荷重曲線から試料の硬度と弾性率を算出する。圧子は直径 5 mm の球形で、移動速度は $1.2 \mu\text{m s}^{-1}$ とした。圧子の挙動は変位制御で行い、BF が形成されたポリスチレン板に対し 20 μm の載荷と

10 μm の除荷動作を、圧子先端部分がポリスチレン板に到達するまで繰り返し、試料の変位荷重曲線を取得した。また、バイオフィルムが形成されていないポリスチレン板についても同様にインデンテーション試験を行い、比較した。

3.2.3 硬度と膜厚の算出

除荷時に得られた変位と荷重の関係を最小二乗法によって近似することで変位荷重曲線を求め、その傾きから接触剛性 S を得た。硬度 H は押し込み深さ h_c が最大の値を示す時に得られる最大荷重 P_{max} と圧子の接触面積 A によって(1)式のように表される。本実験では球形圧子を用いて実験を行ったため、接触面積 A は押し込み深さ h_c と球形圧子の半径 r を用いて(2)式のように表される。また、押し込み深さ h_c は変位荷重曲線ごとに算出された接触剛性 S と圧子変位 h 、圧子の形状係数 ϵ から(3)式のように表される。

$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (1)$$

$$A = 2\pi r h_c \quad (2)$$

$$h_c = h - \epsilon \frac{F}{S} \quad (3)$$

ここに、 H : 硬度 ($N \mu m^{-2}$)、 P_{max} : 最大荷重 (N)、 A : 表面積 (μm^2)、 r : 圧子先端の球の半径 (μm)、 h_c : 押し込み深さ (μm)、 h : 総変位 (μm)、 S : 接触剛性 ($N \mu m^{-1}$)、 ϵ : 圧子の形状係数。

荷重 P が 0 を超えて、上昇した時点の変位量を測定圧子が BF に接触した時の変位量と考え、BF 接触変位 h_{BF} とした。また、BF が付着していないポリスチレンの試験から負荷時の変位荷重曲線の傾きを算出し S_{PS} とした。 S_{PS} を基準として、BF 試料の変位荷重曲線の傾きが S_{PS} を上回った時点をポリスチレンに接触した変位とし、ポリスチレン接触変位 h_{PS} とした。(4)式のように BF 接触変位 h_{BF} とポリスチレン接触変位 h_{PS} の差を BF の膜厚 T とした。

$$t = h_{PS} - h_{BF} \quad (4)$$

4. 研究成果

4.1 共焦点レーザー顕微鏡を用いたバイオフィルム構造の解明

共焦点レーザー顕微鏡により得られた試片表面の色彩から、乳加工副産物で表面をコーティングした試片のそれぞれの副産物の被膜の厚さはスキムミルクが最も薄く、バターミルク、バターゼーラムの順に厚くなることが明らかとなった。バターゼーラムで処理した試片の被膜は最も厚いが、一部被膜の付着が見られない部分があった。これら 3 種の副産物の主たる成分は乾物、タンパク質、炭水化物、脂肪であり、乾物から炭水化物の成分含量は副産物間でほとんど変わらず、脂肪のみがスキムミルクで最も低く (0.2%)、バターミルク (1.8%)、バターゼーラム (3.1%)

の順に大きくなった。これは膜厚と相関があるようである。

副産物でコーティングした試片 (処理試片) を 25 °C で 3 種の菌懸濁液に浸漬し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、菌単体、菌鎖、菌クラスタが明瞭に観察された。

図 1 に処理試片に付着した *Lactococcus lactis* の菌数を示す。3 種の副産物による処理試片はスキムミルクに 720min 浸漬したものを除き、いずれも無処理の対照区に比べ 5% 水準で有意に付着菌数が少なかった。浸漬時間の増加に伴い付着菌数は増加するが、バターミルクとバターゼーラム処理区では対照区を越えることはなかった。

Leuconostoc cremoris、*Lactobacillus casei* も *Lactococcus lactis* と同様に処理試片に付着した菌数は対照区に比べ、有意に少なかった (図省略)。*Leuconostoc cremoris* ではスキムミルクの付着抑制効果が他の副産物に比較して小さかったが、*Lactobacillus casei* では 3 種の副産物での処理試片に付着した菌数間に有意差はなかった。

いずれの菌においてもスキムミルクは長時間の浸漬で付着菌数が大きく増加してお

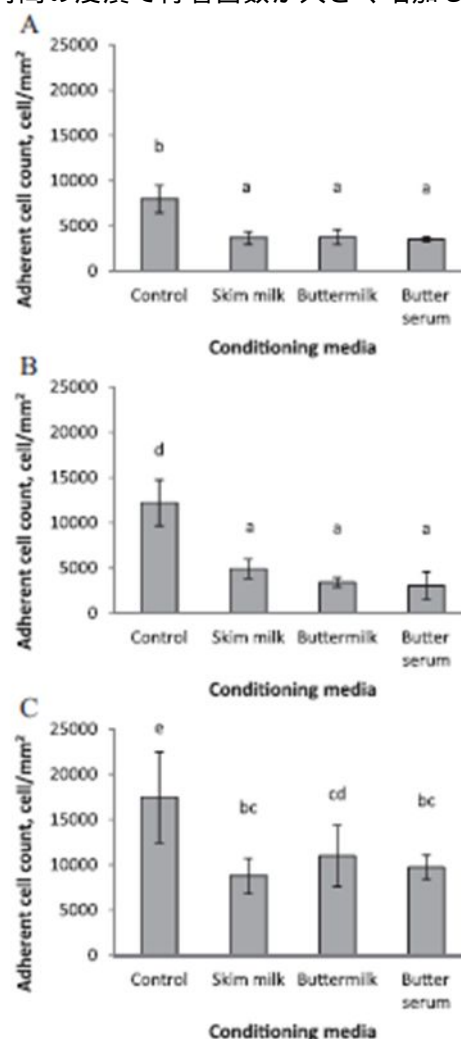


図 1 処理試片に付着した *Lactococcus lactis* の菌数, A: 浸漬時間 30min, B: 180min, C: 720min.

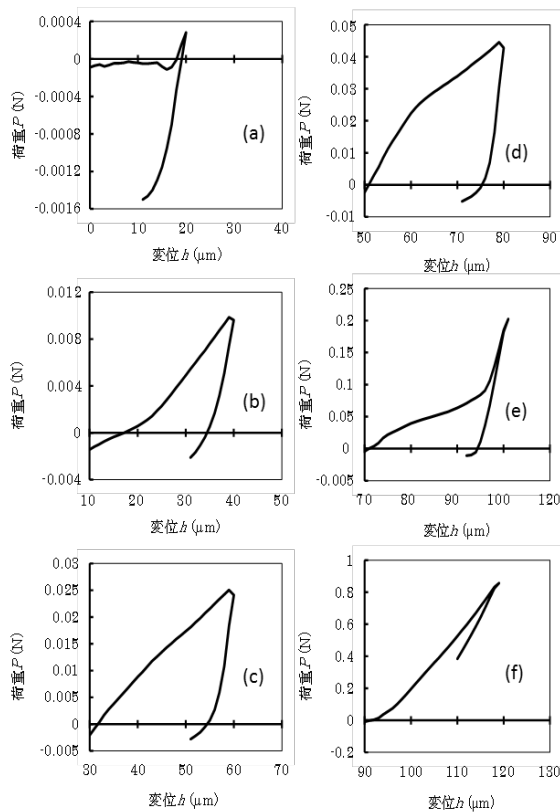


図2 BFの変位荷重曲

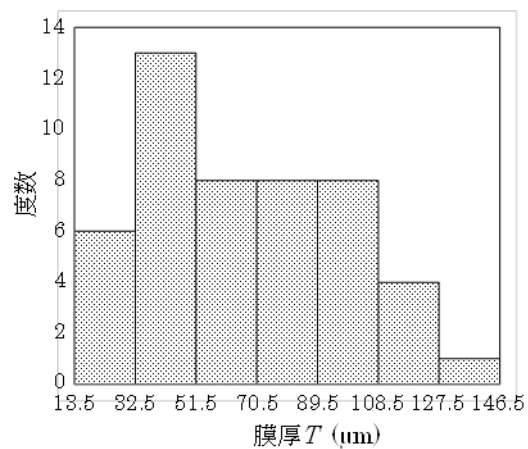
り, 30min 程度の短時間の付着抑制に対しては効果的であると考えられる。

4.2 マイクロインデンテーション法によるバイオフィルム硬度の測定

インデンテーション試験を行って得られた代表的な変位荷重曲線を図2(a)~(f)に示す。図4-1(a)では、変位 h が $18 \mu\text{m}$ のとき荷重 P は 0 を超え増加していることから、 $h=18 \mu\text{m}$ で測定圧子先端がバイオフィルムに接触したと考えられる。また、図4-1(e)では $95 \mu\text{m}$ 付近で P が急激に増加しており、このとき圧子先端がポリスチレン製試片に到達したとが考えられる。実際、変位 h が $96 \mu\text{m}$ のとき、変位荷重曲線の傾きがポリスチレン製試片の傾き S_{PS} を上回っている。これらより、この試片ではバイオフィルム接触変位 $h_{BF} = 18 \mu\text{m}$ 、ポリスチレン製試片接触変位 $h_{PS} = 96 \mu\text{m}$ となり、膜厚 t は式(4)より $78 \mu\text{m}$ となる。

図2にBFの膜厚 T のヒストグラムを示す。データ数は 48、膜厚のモードは $42 \mu\text{m}$ 、算術平均は $64.3 \mu\text{m}$ 、標準偏差は 30.7 となった。

図3に膜厚ごとの平均硬度を示す。硬度は膜厚の増加に従い、ほぼ直線的に減少しており、膜厚が薄いほど硬度が大きくなった。これにつき膜厚を因子とする一元配置法により分散分析を行った結果、膜厚により硬度は有意に減少することが明らかとなった。このことから、膜厚が薄い方がBFの強度が上がり、除去に必要な力が大きくなると考えられた。



データ数：48 平均：64.3 標準偏差：30.7

図3 BFの膜厚のヒストグラム

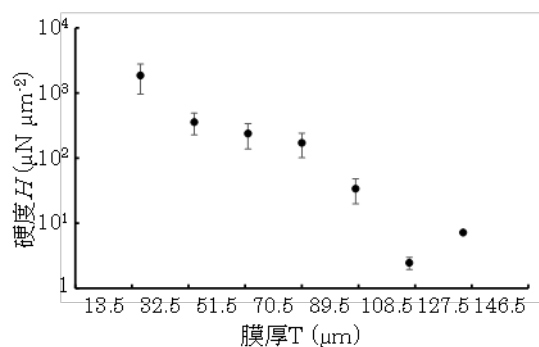


図4 BF硬度の平均値

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

江口広大, 堀海, 森本愛子, 濱中大介, 金山素平, 田中史彦, 内野敏剛: インデンテーション法によるバイオフィルムの力学特性評価の可能性, 農業食料工学会九州支部誌, 査読有, 62, 2013, 1-5.

M. D. Nguyen, L.D. Manh, D. Hamanaka, H. V. Duong, F. Tanaka, T. Uchino: Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk, buttermilk, and butter serum solutions and its effect on bacterial adherence, Food Control, 査読有, 42, 2014, 94-100, DOI:10.1016/j.foodcont.2014.01.040.

〔学会発表〕(計 3 件)

江口広大, 内野敏剛, 田中史彦, 濱中大介, 森松和也: バイオフィルムを形成した *Pseudomonas putida* への洗浄効果, 第66回農業機械学会九州支部例会 2012年8月, 宮崎市.

江口広大, 堀海, 森本愛子, 濱中大介, 金山素平, 田中史彦, 内野敏剛: インデンテーション法によるバイオフィルムの力学特性評価の可能性, 農業食料工学会第72回年次大会, 2013年9月, 帯広市.

M. D. Nguyen, L.D. Manh, D. Hamanaka, H. V. Duong, F. Tanaka, T. Uchino: Influence of some dairy by-products on the

adherence of *Lactococcus lactis*, Int. WS on
Agric. Eng. & Post-harvest Tech. for Asia
Sustainability, 2013 Dec., Hanoi, Vietnam.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

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