

氏 名（本籍）	久保田 浩 美（栃 木 県）		
学 位 の 種 類	博 士（農 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5207 号		
学位授与年月日	平成 21 年 11 月 30 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	乳酸菌のバイオフィルム形成機構の解析およびその制御に関する研究		
主 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副 査	筑波大学教授	農学博士	宮 崎 均
副 査	筑波大学准教授	博士（工学）	野 村 暢 彦
副 査	筑波大学准教授	博士（学術）	中 島 敏 明

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

食品製造分野における微生物制御に際しては、危害菌の実態やそれらの対ストレス耐性を把握することは重要であり、これら知見を基にした危害菌の適切な制御は食品の安全性の確保に留まらず、商品設計の幅をも広げることになる。食品分野で危害菌として問題となっている乳酸菌は、古くから様々な発酵食品の製造に有効利用されている。また、プロバイオティクスとして人々の健康維持に有用であることやバクテリオシン生産性を利用することにより様々な場面で有害菌の制御に役立つことが知られている。しかしその一方で、食品製造工程に混入し、食品の変敗やパッケージの膨張をひき起こす危害菌としても知られており、長い間その制御が課題となってきた。たとえば味噌、醤油、佃煮などの塩分の多い食品、酢、マヨネーズ、ドレッシング、マリネなどの pH の低い食品、日本酒、ビール、ワインなどのアルコールを含む食品、ソーセージ、かまぼこ等の畜水産加工食品、洋菓子、麺類など多種多様な食品において乳酸菌の汚染事例が報告されている。一方、微生物は、実環境中において固体表面に付着・存在していることが多く、バイオフィルム（BF）を形成している場合も多々あることが知られている。このような BF の形成は、微生物の生き残り戦略の一つと考えられ、熱や薬剤などのストレスに対して浮遊菌よりも高い耐性を示すことが多くの菌種で知られている。食品の危害菌となり得る乳酸菌なども原料あるいは製造環境に付着して BF 状態となって混入する場合も多く、BF を形成することによって各種環境ストレスに対する耐性が向上することが予想されるが、これまで実験等によりそれを明確に示した例はなかった。そこで著者は、食品の危害菌となりうる代表的な乳酸菌である *Lactobacillus* 属細菌を用いて、BF 形成能および形成時のストレス耐性に着目して研究を行った。

まず、実験室内で BF の形成度、顕微鏡による形態観察およびストレス耐性評価を行うモデル評価系を構築した。次いで、この評価系を用いて、代表的な食品原料であるタマネギから分離した乳酸菌 43 株及び *Lactobacillus* 属標準株 3 株について BF 形性能を評価した。その結果、供試した全ての乳酸菌が BF 形成能を有し、食品原料中の乳酸菌がバイオフィルムを形成して食品製造時に混入する可能性を指摘した。さらに、危害菌として報告されている *Lactobacillus plantarum* の標準株を用い、BF 形成時および浮遊状態におけるストレス耐性を比較し、BF 状態の菌は食品分野において微生物制御として用いられている有機酸（酢酸、乳酸、クエン酸、コハク酸）、エタノール、次亜塩素酸塩に対して浮遊菌と比べて高い耐性を有することが明らかとなった。また、BF 状態における高い酸耐性は、バイオフィルムを壊して懸濁した浮遊状態でも維持され

ていることが明らかとなった。

以上により、これまで知見の乏しかった乳酸菌バイオフィルムのストレス耐性が明らかとなり、これは乳酸菌の制御を考える上で重要な知見を与えるものである。本成果は、今後、食品分野における乳酸菌を制御していく上で新たな技術を創出する基盤になるものと期待される。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

食品の安全性確保において、危害菌の食品製造過程および食品製品中における挙動を把握することは重要であるが、特にその混入が問題視される乳酸菌の挙動に関しては殆ど知られていないのが現状である。著者は、乳酸菌の標準株と実際の食料原材料から単離した株を用い、バイオフィルム状態を形成することによって各種ストレス耐性を獲得し、それらの高い酸耐性はバイオフィルム構造を破壊して得た浮遊状態でも維持されていることを明確にした。この結果から、製造ラインや食品中でバイオフィルム構造が崩され希釈された場合でも、バイオフィルム由来の乳酸菌が汚染を引き起こす危険性がある事を指摘した。これらに関する知見は今まで例がなく、食品分野において危害菌となる乳酸菌の制御においてバイオフィルム状態で環境耐性を獲得し、それを考慮に入れた制御法の開発の重要性が明らかにされた。また、今後の研究方向として、バイオフィルム形成状態での耐性の詳細な把握と共に、バイオフィルム構造と耐性メカニズムの関連性について分子生物学的に解明し、有効な制御につなげることを提唱した。

以上のように、本論文の著者は地道な研究によって乳酸菌がバイオフィルムを形成することによって酸やアルコールに対して耐性を獲得し、獲得形質は浮遊状態になっても維持されることを明らかにした。このような新規な耐性獲得の発見は、今後、食品業界における新たな危害菌制御技術を切り開くものとして期待され高く評価できる。また、環境中の乳酸菌の挙動を知る上でも、今後の研究に重要な知見をもたらした。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものとして認める。