

食品有害菌産生バイオフィルムに対するフマル酸、乳酸、フェルラ酸の併用効果

塚谷 忠之^{*1} 坂田 文彦^{*1}

Combined effects of fumaric, lactic, and ferulic acid against food-borne pathogenic biofilms

Tadayuki Tsukatani, Fumihiko Sakata

微生物が産生するバイオフィルムは食品の変敗や食中毒の大きな要因となることが知られている。そこで、本研究ではバイオフィルム殺菌活性スクリーニング法を用いて、バイオフィルム殺菌活性を有する食品添加物の選抜を試みた。その結果、酸味料やpH調整剤として汎用されているフマル酸が大腸菌及び黄色ブドウ球菌産生バイオフィルムに対して高い殺菌活性を示すことが分かった。また、フマル酸、乳酸、フェルラ酸を併用することにより、低濃度でサルモネラ菌や緑膿菌を含めた食品有害菌が産生するバイオフィルムを殺菌できることを明らかとした。さらに、フマル酸、乳酸、フェルラ酸の混合液を適用することで浅漬け野菜の保存性を向上させることが可能となった。

1 はじめに

バイオフィルムは、水と接触する固体表面に付着し形成される微生物の共同体のことであり、菌体外多糖などに覆われた内部では多くの微生物が共存し、薬剤などの外的要因から保護されている。バイオフィルムは、食品の腐敗や食中毒の大きな要因となることが知られており、近年、抗バイオフィルム素材を探索する研究が活発化している。

本研究では96ピンマイクロプレート（フタ）へのバイオフィルム形成法と水溶性テトラゾリウム塩WST微生物検出法を組み合わせたバイオフィルム殺菌活性スクリーニング法を用いて、バイオフィルム殺菌活性を有する食品添加物の探索を行った。

2 研究、実験方法

2-1 バイオフィルムの形成

バイオフィルム形成用培地で調製した微生物懸濁液を96ウェルマイクロプレートへ分注し、これに96ピンマイクロプレート（フタ）を被せて37℃で一定時間インキュベーションし、96ピンへバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム産生菌として下記6菌株を使用した。

- ・大腸菌 *Escherichia coli* NBRC15034
- ・緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275
- ・サルモネラ菌 *Salmonella enterica* NBRC3313

- ・セラチア菌 *Serratia marcescens* NBRC102204
- ・乳酸菌 *Lactobacillus brevis* NBRC107147
- ・黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NBRC13276

2-2 バイオフィルム殺菌活性の測定

96ウェルマイクロプレートへミュラーヒントンブロス(MHB)で調製した種々の濃度の食品添加物（24種類）を200μl分注し、バイオフィルムを形成させた96ピンマイクロプレート（フタ）を被せ、37℃で30分間または24時間インキュベーションした。さらに、96ピンに形成させたバイオフィルムを生理食塩水で3回洗浄後、WST-8検出試薬含有MHBを分注した受けプレートへ移し、一定時間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーを用いて受けプレートの吸光度測定(460nm)を行った。阻害率はコントロールの吸光度に対するサンプルの吸光度の比から求めた。阻害率99%以上を示す食品添加物の最小濃度を最小バイオフィルム殺菌（撲滅）濃度（MBEC）とした。

2-3 併用効果

併用効果は Fractional Inhibition Concentration (FIC) index を用いて算出した。FIC は、相乗：≤0.5、相加：>0.5、1.0<、不関：≥1.0、4.0<と定義した。

3 結果と考察

3-1 バイオフィルム殺菌活性を有する食品添加物の探索

食品添加物24種類を本スクリーニング法へ適用し、大腸菌及び黄色ブドウ球菌産生バイオフィルムに対す

*1 生物食品研究所

る殺菌活性を測定したところ、インキュベーション時間が30分間、24時間とも両バイオフィルムに対して高い殺菌活性を示したのはフマル酸（酸味料）であった。フマル酸のMBECは大腸菌，黄色ブドウ球菌とも30分間で0.8%，24時間で0.4%であった。

3-2 フマル酸，乳酸，フェルラ酸の併用効果

次にフマル酸と他の食品添加物の併用効果を検討した。インキュベーション時間が30分間の場合，フマル酸と他の食品添加物の相乗効果は認められなかった。このため，殺菌洗浄など短時間処理の場合は0.8%フマル酸単独の使用が有効であると考えられた。

一方，インキュベーション24時間の場合，フマル酸，乳酸（酸味料），フェルラ酸（酸化防止剤）の併用により，代表的な食品有害菌産生バイオフィルムに対して，相乗・相加的殺菌効果が認められた。結果を表1に示す。特に大腸菌，黄色ブドウ球菌の産生バイオフィルムに対して相乗的殺菌効果を示した（FIC $\leq$ 0.5）。

以上の結果から，フマル酸，乳酸，フェルラ酸の併用は，食品有害菌産生バイオフィルムの殺菌に対して有効であることが示唆された。

3-3 野菜浅漬けへの適用性

バイオフィルムに汚染された食材のモデル系として，緑膿菌バイオフィルム形成させたキャベツの試験片（約8×8mm）を調製した。電子顕微鏡画像を図1に示す。まず，0.8%フマル酸による試験片の殺菌洗浄試験（10分間）を試みた。フマル酸の処理により初期のバイオフィルム内菌数 1.07×10^9 cfu/pieceを 1.40×10^4 cfu/pieceまで低下させることができた。一方，野菜の殺菌洗浄剤として汎用されている次亜塩素酸ナトリウムでは 5.40×10^7 cfu/pieceへの低下にとどまった。この結果より，0.8%フマル酸が野菜の殺菌洗浄には有効であることが確認できた。

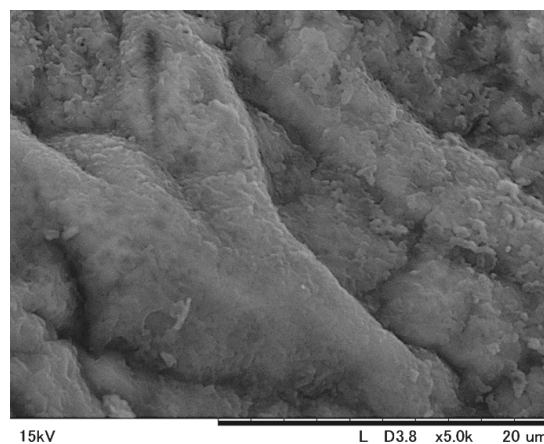


図1 キャベツに形成したバイオフィルム（SEM）

さらに，0.8%フマル酸処理した試験片を通常の浅漬け液（0.4%酢酸含有）と0.2%の酢酸を0.1%フマル酸，0.05%乳酸，0.05%フェルラ酸の混合液に置き換えた浅漬け液へ20時間浸漬した際のバイオフィルム内菌数を比較した。その結果，通常の浅漬け液では 6.67×10^1 cfu/pieceの菌数が残存していたのに対して，0.1%フマル酸，0.05%乳酸，0.05%フェルラ酸に置き換えた浅漬け液では検出下限値以下となった。

以上の結果から，浅漬け液に含まれている酢酸の一部をフマル酸，乳酸，フェルラ酸の混合液に置き換えることで殺菌効率を向上させることができた。

4 まとめ

フマル酸，乳酸，フェルラ酸の併用により食品有害菌産生バイオフィルムの殺菌が可能であることが示された。また，バイオフィルムに汚染された食品の保存性向上にも有効であることが示唆された。

5 掲載論文

Food Control, Vol.138, 109024 (2022).

表1 フマル酸，乳酸，フェルラ酸の併用効果

バイオフィルム産生菌	単独 MBEC (%)			併用 (乳酸 / フェルラ酸 / フマル酸)		
	乳酸	フェルラ酸	フマル酸	MBEC (%)	Lowest FIC index	効果
<i>Escherichia coli</i> NBRC15034	0.8	>0.2	0.4	0.05 / 0.025 / 0.1	0.38	相乗
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC13275	0.4	>0.2	0.2	0.05 / 0.05 / 0.1	0.75	相加
<i>Salmonella enterica</i> NBRC3313	0.2	>0.2	0.2	0.05 / 0.025 / 0.1	0.81	相加
<i>Serratia marcescens</i> NBRC102204	0.4	>0.2	0.4	0.05 / 0.05 / 0.1	0.50	相乗
<i>Lactobacillus brevis</i> NBRC107147	1.6	>0.2	0.4	0.1 / 0.1 / 0.2	0.81	相加
<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC13276	0.8	>0.2	0.4	0.05 / 0.05 / 0.1	0.44	相乗