

<平成 20 年度助成>

## 食品製造施設へのリステリアの定着に寄与する バイオフィルムの解析

中 村 寛 海

(大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当)

### 1. はじめに

*Listeria monocytogenes* (リステリア) は、食品を介してヒトにリステリア症を引き起こす、食品媒介感染症の原因細菌の一種である。リステリア症は健康なヒトでは発症しにくく、妊婦や胎児・新生児、免疫機能の低下したヒトなど特定の集団が罹りやすい、いわゆる日和見感染症の一種と考えられるが、その主症状は髄膜炎や敗血症および脳炎などで一般的な食中毒の症状に比べて重篤であり、重症化すると致死率が高い。また、本菌は 4℃ 以下の低温でも増殖可能であり、わが国の食品衛生対策の柱ともいえる低温保存・流通ではリステリアを制御することができない。すなわち、食品媒介リステリア症の発生を未然に防止するためには食品を本菌に汚染させないことが肝要である。

食品媒介リステリア症の原因食品としては、ナチュラルチーズや食肉加工品、サラダなど加熱調理せずそのまま食べる、いわゆる ready-to-eat 食品が最も多く、諸外国では ready-to-eat 食品に対するリステリアの規格基準が設定されている。わが国では水産品の生食が一般的であり、ready-to-eat 食品のうちでも特に冷蔵保存期間の長い水産加工品はリステリア症のリスクの高い食品であると考えられる。そこで、筆者らは ready-to-eat 水産加工品のリステリア汚染実態を調べた。その結果、リステリアがスモークサーモンから比較的高率に検出されることが明らかとなった<sup>1)</sup>。また、これらの製品から分離された菌株の

解析結果から、各製造元に特有の菌株が存在する可能性が示唆された<sup>1)</sup>。そこで、スモークサーモン製造施設におけるリステリア汚染源調査を行った結果、施設内から分離されるリステリアは特定のタイプに偏る傾向が認められるとともに、同じタイプの菌株が長期間繰り返し検出されることがわかった<sup>2)</sup>。このような傾向は、諸外国の調査においても認められており、スモークサーモンに限らず、乳製品や食肉製品の製造施設においても同様の報告が見られる<sup>3)</sup>。これらは、長期間施設に定着しているように見えることから、persistent strain と言われ、長いものでは 7 から 12 年間も同一施設から検出される<sup>3)</sup>。

一方、近年、微生物の存在形態の一つとして、バイオフィルムが注目されている。バイオフィルムとは、微生物が様々な物質表面に付着・増殖して菌体外多糖類 (Extracellular polymeric substances, EPS) を分泌し、それらに取り囲まれて存在する微生物の集合体のことを指す (Fig. 1)。バイオフィルムを形成した細菌は、遊離状態で存在する細菌 (Planktonic cells) (Fig. 1) に

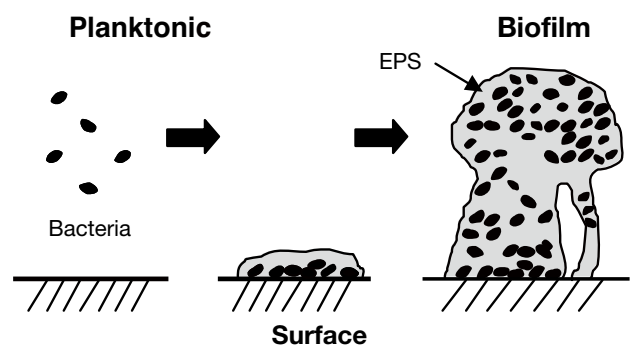


Fig. 1 Biofilm formation

比べて、乾燥に対する耐性や薬剤への抵抗性を示す<sup>4)</sup>。リステリアもこのようなバイオフィーム形成細菌の一種であり、ステンレスやプラスチック表面にバイオフィームを形成する。食品の製造施設においては、リステリアがバイオフィームを形成して乾燥耐性や薬剤抵抗性を示すことにより、製品のリステリア汚染が引き起こされる可能性がある<sup>5)</sup>。バイオフィームが示す乾燥耐性や薬剤抵抗性に主体的な役割を担っているのはEPSであるとされているが<sup>4)</sup>、リステリアバイオフィームのEPSについて詳しく調べられた報告はない。

本研究は、バイオフィームの形態や機能および物理化学的、生物学的な性質の鍵を担うEPSに着目し、スモークサーモン製造施設からの分離頻度が高かったリステリアと一度しか分離されなかったリステリア菌株を用いて、これらのリステリアの形成するバイオフィームについて検討を行うとともに、リステリアバイオフィームのEPSの糖組成について明らかにし、定量を行うことを目的とする。

## 2. 材料と方法

### 1. 使用菌株

スモークサーモン製造施設における3年間の調査の結果、分離頻度が最も高かったタイプのリステリア No.20-6 を persistent strain (PS)、施設から一度しか分離されなかったタイプのリステリア No.40-1 を transient strain (TS) とし<sup>1)</sup>、実験に使用した (Table 1)。

### 2. バイオフィーム形成条件<sup>6)</sup>

リステリア菌株を TSBYE 培地 (トリプトソイブロスに 0.6% になるように酵母エキスを添加したもの) で 24 時間培養し、培養後の培養液 100  $\mu$ l を 10 ml の MWB 培地と混合し、32°C で 40 時間培養後に形成されたリステリアバイオフィームを使用した。

### 3. クリスタルバイオレット (CV) 法によるバイオフィームの定量

TSBYE 培養液 100  $\mu$ l を 10 ml の MWB 培地と混合してその 100  $\mu$ l をポリ塩化ビニル製 (PVC) の 96 穴プレート (BD Falcon#353911) の 8 ウェルに接種して 32°C で 16, 24, 40, 48, 72 時間培養し、プレートに形成されるバイオフィームの経時変化を CV 法により調べた。すなわち、プレート上の培養液を捨てて 200  $\mu$ l の滅菌水で 5 回洗浄し、室温で 45 分乾燥させた。乾燥後 150  $\mu$ l の 0.1% CV で 45 分染色した後に 200  $\mu$ l の滅菌水で 5 回洗浄した。200  $\mu$ l の 95% エタノールで CV を脱色して 100  $\mu$ l を新しいプレートに移し、Labsystems マルチスキャン MS (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で OD<sub>600</sub> 値を測定し、脱色された CV をバイオフィーム量として定量した。

### 4. バイオフィーム形成菌数の計測

PVC プレート上に形成されたリステリアバイオフィームを経時的に滅菌綿棒 (日水製薬) で 100 回擦りとり、1 ml の滅菌生理食塩水に菌を洗い出して適宜希釈し、100  $\mu$ l を 2 枚のブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天平板培地 (BD

Table 1 Bacterial strains

Bacteria	Strain No.	Type*	Source	persist or transient
<i>Listeria monocytogenes</i>	20-6	1	Slicer	persist
<i>Listeria monocytogenes</i>	40-1	10	Product trimmings from slicing machines	transient

\*A total of 77 *L. monocytogenes* isolates were classified into 13 different types by combining the results of the serotyping, PFGE, and three PCR-based typing methods<sup>1)</sup>.

Difco#241830) に塗抹して 37℃ 24 時間後、BHI 培地上に形成されたコロニー数を計測し、1 ウェルあたりの菌数を算出した。

## 5. 蛍光標識レクチンを用いたリステリアバイオフィルムの観察

Lab-Tek チャンバースライド (Nunc#177429) にバイオフィルムを形成させて固定後、蛍光標識レクチンを反応させ、蛍光顕微鏡で観察を行った。蛍光標識レクチンとしては Alexa Fluor コンジュゲートのコンカナバリン A (ConA) (Molecular Probes#C11252) を用いた。

## 6. バイオフィルムからの EPS の抽出および定量

### 6.1 バイオフィルム溶液の作製

TSBYE 培養液 100  $\mu$ l を 10 ml の MWB 培地と混合してその 5 ml を滅菌プラスチックディッシュ ( $\phi$  60 x 15 mm, SUMILON#MS-11600) に接種し、32℃ で 40 時間培養した。培養後、上清を遊離状態のリステリアとして実験に使用し、ディッシュの底に形成されたバイオフィルムをセルスクレイパー (IWAKI#9000-220) でかきとり、マイクロチューブに移しかえたものをバイオフィルム溶液とした。

### 6.2 各種前処理法の検討

バイオフィルムから EPS のみを抽出定量するために 6.1 項で調製したバイオフィルム溶液を用いて以下の前処理法、すなわち、i) 超音波 (1% Tween80 溶液中で 25℃ 30 分間超音波処理)、ii) エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) (0.5 M EDTA pH 8.0 溶液中で 25℃ 3 時間処理)、iii) 加熱 (70℃ の水溶液中で 1 時間加熱処理)、iv) アルカリ (1M 水酸化ナトリウム (NaOH) 溶液中で 25℃ 3 時間処理)、v) 酸 (0.5M 硫酸 ( $H_2SO_4$ ) 溶液中で 25℃ 3 時間処理)、vi) 糖分解酵素 (Endoglycosidase H (CARBIOCHEM) 溶液中で 37℃ 一晚処理) について検討を行った。コントロールとして、リステリアの MWB 試験管培養液と 25℃ の滅菌水を使

用した。各処理後、バイオフィルム溶液を 0.22  $\mu$  m のフィルター (DISMIC-25cs, ADVANTEC) でろ過して菌体を取り除き、エタノール (99.5%) を加えて多糖を析出させ、生じた沈殿の有無を目視により確認した。

### 6.3 フェノール硫酸法による EPS の定量

バイオフィルムからの EPS 定量法は、フェノール硫酸法により実施した。すなわち、菌体を 0.22  $\mu$  m のフィルターで除去したバイオフィルム溶液 1ml に 2.5ml のエタノール (99.5%) を加えて混和し、生じた沈殿を遠心分離により回収した。上清を除去し、沈渣を室温で乾燥させた後、滅菌水 2ml で溶解した。この EPS 溶液 0.5ml に 5% フェノール溶液 0.5ml を加えて混和し、2.5ml の濃硫酸を加えて室温で 20-30 分放置した。日立ダブルビーム分光光度計 U-2000 型 (日立ハイテク) を用いて、本試料液を 490nm で定量し、得られたグルコース量をバイオフィルム中の EPS 量とした。

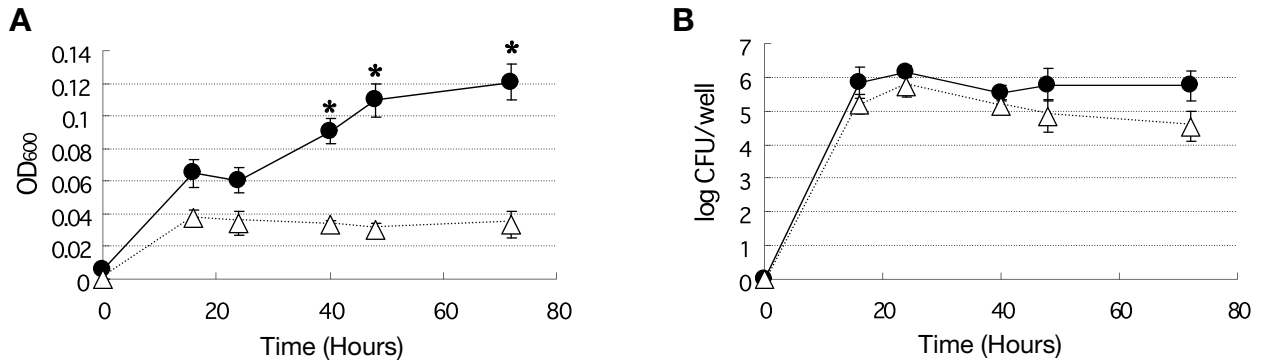
## 3. 結 果

### 1. マイクロプレートを用いたクリスタルバイオレット (CV) 法によるバイオフィルムの定量および菌数の計測

マイクロプレートを用いた CV 法でプレート上に形成されたバイオフィルム量を調べたところ、PS は TS に比べて、プレート上に形成されるバイオフィルム量が多い傾向が認められた (Fig. 2A)。しかしながら、プレート上の生菌数に差は認められなかった (Fig. 2B)。

### 2. 蛍光標識レクチンを用いたリステリアバイオフィルムの観察

蛍光標識レクチンを反応させたリステリアバイオフィルムの観察を行った結果、いずれの菌株にも ConA と結合する薄膜が観察された (データ示さず)。



**Fig. 2** (A) Destained biofilm (measured at OD<sub>600</sub>) by crystal violet assay. (B) *L. monocytogenes* viable cell count. Closed circles (●) are represented *L. monocytogenes* strain No. 20-6 (persistent strain). Opened triangles (△) are represented *L. monocytogenes* strain No. 40-1 (transient strain). Asterisks are represented significant value ( $P < 0.01$ ) (A).

### 3. バイオフィームからのEPSの抽出

バイオフィームから菌体を除去してEPSのみを抽出するための前処理法として、超音波、EDTA、加熱、アルカリ、酸、糖分解酵素 (Endoglycosidase H) について検討を行った。その結果、0.5M EDTA (pH8.0)、アルカリ (1M NaOH) および Endoglycosidase 処理の場合のみエタノールにより沈殿物が確認された (Table 2)。

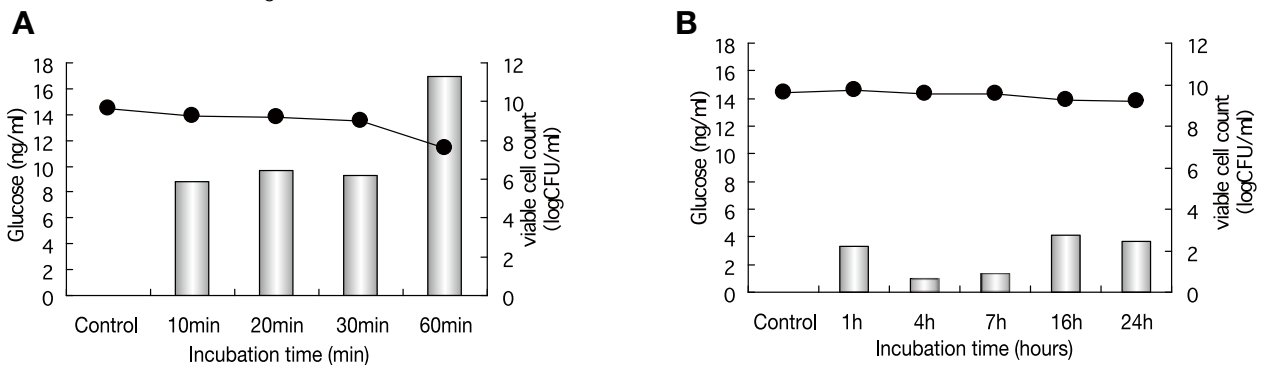
このうち、0.5M EDTA (pH8.0) 溶液は本溶液のみでも沈殿物を生じたことからこれを除去した。1M NaOH 溶液は菌体が溶菌している可能性が考えられたため、0.01M から 1M までの間で、リステリア培養液およびリステリアバイオフィーム溶液について影響を調べたところ、0.1M の NaOH 溶液で 10 分間処理が生菌への影響がなかったことから、0.1M の NaOH 溶液と Endoglycosidase

**Table 2** Precipitation by ethanol using different EPS isolation methods

EPS isolation methods	Incubation time	Precipitation by ethanol
Planktonic cell	—	+
Sonication in 1% Tween 80 at 25 °C	30 min	—
0.5 M EDTA, pH 8.0 at 25 °C	3 h	+*
Heat at 70 °C	1 h	—
1M NaOH at 25 °C	3 h	+
0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> at 25 °C	3 h	—
Endoglycosidase H at 37 °C	O/N**	+
Sterile DDW at 25 °C	3 h	—

\*Precipitation is obtained from only 0.5 M EDTA solution.

\*\*Overnight



**Fig. 3** Extracellular polymeric substances (EPS) isolation methods from *L. monocytogenes* biofilms and incubation time. (A) 0.1 M NaOH. (B) Endoglycosidase H. Closed circles (●) are represented *L. monocytogenes* viable cell count (cfu/ml). Bars are represented glucose yielded (ng/ml).

H (EndoH) 溶液について処理時間と菌数変化およびグルコース量についてさらに検討を行った結果を Fig. 3 に示した。NaOH 溶液処理では 60 分後にリステリアの溶菌により菌数が減少し、グルコース量が増加した。EndoH では一晩処理後も菌数への影響は見られなかったが、NaOH 処理のグルコース量が多かったことから、リステリアバイオフィルム溶液から EPS を抽出する方法としては 0.1M の NaOH 溶液で 10 分間処理を行うこととした。

#### 4. リステリアバイオフィルム中の EPS の定量

No.20-6 および No.40-1 リステリア菌株について、3. 項で検討を行った処理法によってバイオフィルムから EPS を抽出し、遊離状態とバイオフィルム形成時における EPS 量をフェノール硫酸法でグルコース量として定量した。その経時変化を Fig. 4 に示した。バイオフィルム形成時はいずれの菌株も遊離時に比べて EPS 量が高く、さらに PS である No.20-6 の EPS 量が TS である No.40-1 に比べて高い傾向が見られた。

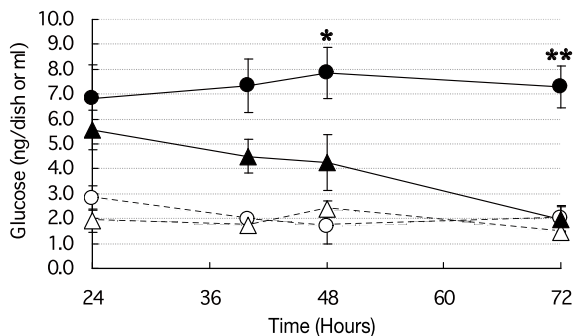


Fig. 4 Extracellular polymeric substances yield values in *L. monocytogenes* planktonic cells or biofilms. Closed circles (●) are represented biofilms, opened circles (○) are represented planktonic cells of the *L. monocytogenes* strain No. 20-6 (persistent strain). Closed triangles (▲) are represented biofilms, opened triangles (△) are represented planktonic cells of the *L. monocytogenes* strain No. 40-1 (transient strain). Asterisks are represented significant value, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

#### 4. 考 察

スモークサーモン製造施設における 3 年間の調

査の結果得られたリステリア菌株を血清型および DNA 型に基づいて分類し、長期にわたって分離されたタイプの菌株 (No. 20-6) を persistent strain (PS)、一度しか分離されなかったタイプの菌株 (No. 40-1) を transient strain (TS) として<sup>1)</sup>、これらの菌株のバイオフィルム形成に着目して解析を行った。その結果、マイクロプレートを用いた CV 法により、PS は経時的に CV 量が増加する傾向が見られたが、TS では見られなかった (Fig. 2A)。しかしながら、これらの菌株間でプレート上の生菌数に差はなかった (Fig. 2B)。蛍光標識レクチンを用いた顕微鏡観察の結果から、いずれの菌株も菌体外に ConA に結合するグルコースあるいはマンノースを構成成分とする多糖の存在が確認されたことから (データ示さず)、PS は TS に比べて菌体外に産生する多糖類が多い可能性があると考えられた。そこで、リステリアバイオフィルムの EPS について検討を行った。

一般的にバイオフィルムは菌体と菌体外分泌物が複雑に入り混じるマトリックスを形成し、それらが相互作用により互いに影響し合って存在しており<sup>7)</sup>、EPS のみを抽出して定量することは容易ではない。そこで、これらのマトリックスから菌体外に存在する EPS のみを抽出するための処理方法について検討を行った。その結果、0.1M の NaOH で 10 分間処理する方法で、リステリア菌体を破壊せずフェノール硫酸法によるグルコース量として EPS を定量することが可能となった。

Sheng ら<sup>8)</sup> は、光合成細菌である *Rhodospseudomonas acidophila* からの EPS 抽出法の検討において、EDTA 処理よりも NaOH 処理での EPS 回収が良好であったが、NaOH 処理では溶菌による菌体内成分の混入を指摘している。Sheng ら<sup>8)</sup> の使用している NaOH 濃度は 1 M であり、この濃度では、筆者の検討においても、リステリアの溶菌によると考えられる生菌数の低下とグルコース量の増加が見られた (Fig. 3) ことか

ら、菌体と EPS を区別するための NaOH 処理濃度について、バイオフィームから菌体を破壊せずに EPS を抽出することが可能な処理濃度を 0.1 M とした (Fig. 3)。

以上の条件検討から、リステリアバイオフィームの EPS を 0.1 M の NaOH で処理した後に PS と TS について、遊離状態での存在時とバイオフィーム形成時における EPS 量を測定し、経時変化を調べて比較を行った。その結果、遊離状態で存在するリステリアよりもバイオフィームを形成しているリステリアの方が菌体外に存在する EPS 量が多いことが明らかとなった (Fig. 4)。また、PS が TS よりも EPS 量が多かった。以上より、リステリアがバイオフィームを形成すること、また、バイオフィームを形成したリステリアのうちでも菌体外に存在する EPS 量が多い方が施設への定着性に寄与している可能性が示唆された。

EPS にはカプセル多糖とスライム多糖があり、カプセル多糖は細胞表面のリン脂質や lipid-A に共有結合しているとされる。一方、スライム多糖はカプセル多糖に比べその結合は非常に弱く、細胞の外側を取り巻くように存在していると言われている。またこの両者を厳密に区別できない場合も存在する<sup>4,7,9)</sup>。多糖類はしばしば、カルシウムイオンやマグネシウムイオンのような 2 価の陽イオンで架橋されて容易にゲル化することがある<sup>7)</sup>。今回、リステリアバイオフィームから EPS を回収するための前処理法として NaOH が EDTA より優れていたが、リステリアの EPS はカプセル多糖である可能性が高いかもしれない。

ConA は  $\alpha$ -D-グルコースや  $\alpha$ -D-マンノースを認識するレクチンであり、これらを含む多糖であるデキストラン、グリコーゲン、マンナン、アミロペクチン、スフィンガンに結合することが知られているが、Strathmann らは、蛍光標識 ConA が  $\alpha$ -D-グルコースや  $\alpha$ -D-マンノースを含まない *Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィ

ーム中に存在するアルギン酸にも特異的に結合することを示した<sup>10)</sup>。また、下水のバイオフィームから抽出される EPS は多糖よりもタンパク質や有機物が主要な構成成分であることから<sup>7)</sup>、今回、バイオフィーム中に含まれる EPS 量が培養液 1ml あるいはシャーレ 1 枚 (直径 60 mm) あたり数 ng であり少なかった原因として、EPS の構成糖としてグルコース以外の糖が含まれている可能性があることや、リステリアバイオフィームの EPS の主要な構成成分が多糖でなく、タンパク質や有機物である可能性も考えられる。

リステリアのバイオフィーム形成培地としては筆者らが用いた MWB の他に 1/2 濃度のトリプトソイブイオン (TSB) 培地や BHI 培地など市販のものが使用されることもあるが、筆者が CV 法を用いて行った検討では TSB 培地や BHI 培地に比べて MWB 培地のバイオフィーム形成が良好であった (データ示さず)。また、リステリアと遺伝的に近縁とされる乳酸菌でも EPS を抽出および定量する際の培地としてタンパク質など培地成分の影響がない chemically defined media が適しているとされる<sup>11)</sup>。MWB 培地はバイオフィーム形成のみでなく、リステリアバイオフィーム中の EPS の抽出および定量にも適していると考えられる。

Romanova ら<sup>12)</sup> はマイクロプレート上に形成させたリステリアバイオフィームに対する塩化ベンザルコニウムの影響を CV 染色法で調べた結果、CV 法では生菌のみが染まっているのではなく死菌も染まっていることを示している。筆者もマイクロプレートを用いた CV 法で PS において経時的に CV 量が増加する傾向が見られたが、EPS 以外の死菌も CV で染まっているかも知れない。バイオフィーム形成リステリアの定量的な評価指標として、今後、CV 染色や生菌数測定以外にアデノシン三リン酸 (adenosin 5'-triphosphate ATP)<sup>12,13,14)</sup> を測定することも検討したい。

## 謝 辞

本研究に対し、多額の助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

1. Nakamura, H., M. Hatanaka, K. Ochi, M. Nagao, J. Ogasawara, A. Hase, T. Kitase, K. Haruki, and Y. Nishikawa. 2004. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. *Int J Food Microbiol* 94:323-8.
2. Nakamura, H., Y. Tokuda, A. Sono, T. Koyama, J. Ogasawara, A. Hase, K. Haruki, and Y. Nishikawa. 2006. Molecular typing to trace *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish to a contamination source in a processing plant. *J Food Prot* 69:835-41.
3. Suders, B.D., and M. Wiedmann. Ecology of *Listeria* species and *L.monocytogenes* in the natural environment. *Listeria*, listeriosis, and food safety. 3rd ed. Ryser, E.T., and E.H. Marth ed. 21-53, CRC Press, Boca Raton. (2007)
4. 岩淵範之, 砂入道夫, 中嶋陸安. 菌体外多糖類: EPS の重要性バイオフィルム—その生成メカニズムと防止のサイエンス—. 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編集, 84-94, サイエンスフォーラム, 千葉 (1998)
5. Kornacki, J. L., and J. B. Gurtler. 2007. Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities, 3 rd. ed. CRC Press, Boca Raton.
6. Djordjevic, D., M. Wiedmann, and L. A. McLandsborough. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 68:2950-8.
7. Starkey, M., K. A. Gray, S. I. Chang, and M. R. Parsek. 2004. A sticky business: The extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. ASM Press, Washington, DC.
8. Sheng, G. P., H. Q. Yu, and Z. Yu. 2005. Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:125-30.
9. Roberts, I. S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:285-315.
10. Strathmann, M., J. Wingender, and H. C. Flemming. 2002. Application of fluorescently labeled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* 50:237-48.
11. Ruas-Madiedo, P., and C. G. de los Reyes-Gavilan. 2005. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 88:843-56.
12. Romanova, N. A., P. V. Gawande, L. Y. Brovko, and M. W. Griffiths. 2007. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *J Microbiol Methods* 71:231-7.
13. Takenaka, T. 1994. An ATP bioluminescence assay for the analysis of bacterial biofilms. *Kansenshogaku Zasshi* 68:759-66.(In Japanese)
14. Ono, N. 1995. A semi-quantitative measurement of glycocalyx and an ATP bioluminescent assay for the analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 86:1440-9. (In Japanese)

## Quantification and characterization of polysaccharides in the biofilms of *Listeria monocytogenes* which resides in food processing plants

Hiromi Nakamura

Department of Microbiology

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

*Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen that can lead to potentially life-threatening listeriosis in high-risk populations. The foods reported to be associated with listeriosis are ready-to-eat foods consumed without further cooking. In Japan, there are high health risks specifically in ready-to-eat seafood products, usually highly processed, have an extended shelf life at refrigeration temperatures. In a previous report, we investigated *L. monocytogenes* contamination in commercially available ready-to-eat seafood products, and showed that there is a high incidence of *L. monocytogenes* contamination in cold-smoked salmon. We detected and examined by molecular typing methods *L. monocytogenes* isolates from a cold-smoked fish processing plant to trace the source of contamination. Our study has indicated that *L. monocytogenes* resides in this plant in the form of persistent strains during our investigation. Extracellular polymeric substances (EPS) play an important role in the bacterial biofilms such as physicochemical and biological characterization and structural configuration and function. Persistent strain (PS) is the specific *L. monocytogenes* strain types (combined with serotype, PFGE and PCR-based typing) frequently isolated for a long time, on the contrary, transient strain (TS) is the *L. monocytogenes* strain types isolated only one time during our investigation in the cold-smoked salmon processing plant. In the present study, we analyze to know quantification and characterization of polysaccharides in the EPS of *L. monocytogenes* PS and TS biofilms. We elucidated that polysaccharide containing the fluorescently labeled lectins, concanavalin A (ConA) target sugars,  $\alpha$ -D-glucose and  $\alpha$ -D-mannose seemed to be involved in biofilm of *L. monocytogenes*. The 0.1 M NaOH extraction method without cell lysis from *L. monocytogenes* biofilm was found to be the most effective among the EPS isolation methods we used. After the NaOH isolation steps, quantification of EPS yield values in *L. monocytogenes* biofilm was obtained by phenol-sulfuric method. Consequently, the total amount of EPS in *L. monocytogenes* biofilm was higher than in planktonic cells. The total amount of EPS in PS of *L. monocytogenes* biofilm has higher than TS. Our study was indicated that the higher amount of polysaccharides in EPS of *L. monocytogenes* biofilms tend to reside in food processing plant.