

有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発†

—有用乳酸菌の産生する抗菌活性物質の精製とその応用試験—

恩田 匠・柳田 藤寿*・辻 政雄・荻野 敏・篠原 隆*・内村 泰**

The Development of Valuable Fermented Food by Using Beneficial Lactic Acid Bacteria

—Purification of Antibiotic Substance Produced by Useful Acid Bacteria and Its Application—

Takumi ONDA, Fujitoshi YANAGIDA*, Masao TSUJI, Satoshi OGINO, Takashi SHINOHARA* and Tai UCHIMURA**

要 約

味噌から分離されたバクテリオシン産生乳酸菌の中で最も抗菌活性の強かった *Enterococcus* sp. GM005株の産生するバクテリオシンの完全精製方法を確立した。GM005株の培養上清から、疎水クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより、バクテリオシンペプチドを完全に単離・精製できた。本バクテリオシンは、トリシンSDSポリアクリルアミド電気泳動の結果、2.4kDaの低分子なペプチド物質であることが分かった。この精製バクテリオシンの豆腐への添加実験を実施した結果、汚染菌の顕著な減少が認められ日持ち性の向上が図られた。

Summary

Bacteriocin-producing lactic acid coccal strain GM005, isolated from Miso-paste product, exhibited the strongest antibacterial activity among other isolates. The bacteriocin peptide was purified from the culture fluid of strain GM005 mainly by hydrophobic-interaction chromatography and gel-filtration chromatography. The bacteriocin peptide was migrated by tricine-SDS-PAGE as a single band with molecular weight of ca. 2.5kDa. Application of the bacteriocin of GM005 to 'Tofu' was performed.

1. 緒 言

近年、生物由来の自然な抗菌力（バイオプリザバティブ；biopreservative）を利用して、有害な微生物の増殖を抑止しようとする、いわゆるバイオプリザベーション（biopreservation）¹⁾が、新しい食品保蔵の考え方として注目を集めている。このバイオプリザバティブの中で最も可能性の高いものと考えられているのが、一部の乳酸菌が産生するバクテリオシン^{2,3)}と総称される抗菌性物質であり、欧米などを中心として我が国でも急速に応用研究が進展している。

我々^{4,6)}は、各種食品への乳酸菌バクテリオシンの利用についての研究の一環から、味噌醸造にはバクテリオシン産生能をもった乳酸球菌が広くかつ高頻度で存在することを明らかにし、バクテリオシンの諸性状の解析およびその

利用についての検討を進めている。分離したバクテリオシン産生乳酸球菌の中で最も抗菌活性が強かったGM005株の産生するバクテリオシンは、培養液中では非常に高度な耐熱性を示し、中性領域のpHでも安定であるなど、食品利用上有望な性質を示した。今後、実用化のためには、本バクテリオシンの構造解析など分子レベルでの情報を集積し、その安全性について確認を行う必要があった。そこで、昨年度の成果として得られたバクテリオシン活性の回収条件を元に、GM005株の培地中からの完全精製方法を確立し、バクテリオシンを単離・精製した結果について報告する。また、本バクテリオシン利用のモデル食品として市販豆腐への添加実験を行った結果についても報告する。

2. 実験材料と方法

2-1 供試乳酸菌と培養方法

分離したバクテリオシン産生乳酸菌の中で最も強い活性を示した乳酸球菌GM005株^{4,6)}の培養には基本培地として、MRS培地（*Lactobacilli* MRS medium, Difco Lab社製）を用いた、-80℃で凍結保存したグリセロールストックか

†本研究は、平成11年度客員研究員事業として実施された共同研究である。

*山梨大学ワイン化学研究センター、**客員研究員、東京農業大学応用生物科学部

ら、MRS液体培地に植菌し、3～4回継代培養を行った後実験に供した。通常の菌体の短期的な保存は、スタブカルチャーを用い、4℃以下で冷蔵保存した。

抗菌活性の検出および抗菌力価の測定のための指示菌には、*Lactobacillus sakei* JCM1157^{4, 5)}を用いた。本菌の培養もMRS培地を用いて同様に行った。

2-2 バクテリオシンの抗菌活性の力価計測

バクテリオシンの抗菌活性の力価計測は、既報^{4, 5)}と同様に*L. sakei* JCM1157⁷⁾を指示菌としたアガーウエル拡散法を用いたクリティカル希釈法により計測し、抗菌活性の力価 (Activity Unit; A. U.) として示した。

2-3 バクテリオシンの大量調整

pHを7.5に調整したGYP4培地⁷⁾ (グルコース (G)、酵母エキス (Y) およびペプトン (P) を主要基本組成としたGYP培地で、含まれるタンパク質含量が少なく、高いバクテリオシン活性が得られる組成としたもの) を用いて、18時間30℃で静置培養した。

2-4 バクテリオシンタンパク質の精製

バクテリオシンの精製は、以下のように疎水クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。GM005のバクテリオシンは、高度の耐熱性を有し、温度による影響を受けなかったことから、全ての精製は室温下で実施した。なお、硫酸沈澱法による抗菌活性の回収は、GYP4培地では回収率が低かったため、本精製では用いなかった。

2-4-1 培養上清の調製

GYP4培地で培養した培養上清に対して遠心分離 (7,000rpm, 25分) により菌体を除去し、メンブランフィルターで除去して、培養上清を得た。

2-4-2 疎水クロマトグラフィー

疎水クロマトグラフィー担体 (ブチルトヨパール650M, 東ソー社製) を内径2.5mmのガラスカラム (バイオカラムMP-2545型, アトー社製) にベット高さ約30cmになるように加圧充填し、20%硫酸アンモニウム (以下、硫酸と略記) とした50mMのリン酸緩衝液 (pH5.0) を流して平衡化させた。このカラムにバクテリオシンを含む培養上清を流速2.0ml/minでチャージさせ、同じ20%硫酸50mMリン酸緩衝液 (pH5.0) を流すことにより、リポフラビンの色が肉眼で観察されなくなるまでよく洗浄した。その後、硫酸濃度20%から0%までの直線的濃度勾配をグラディミキサー (AC-5905, アトー社製) で作製した溶出を行い、フラクションコレクター (バイオ・コレクターAC-5750型, アトー社製) により溶出液を一画分5mlとして分取した。各画分については、280nmの吸光度測定によりタンパク質の検出を行い、かつ抗菌活性の力価を調べた。

2-4-3 ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィー担体 (Sephdex G-75, シグマ社製) 内径2.5mmのガラスカラム (バイオカラムMP-2590型, アトー社製) にベット高さ約90cmになるように加圧充填し、リン酸緩衝液で平衡化させた。疎水クロマトグラフィーで得られた活性画分を20%シュウクロースとしたリン酸緩衝液中で透析処理し、ゲルろ過クロマトグラフィーにチャージした。その後、流速1.0ml/minで溶出を行い、フラクションコレクターにより溶出液を一画分5mlとして分取した。各画分については、280nmの吸光度測定と抗菌活性の力価を調べた。

2-5 トリシンSDSポリアクリルアミド電気泳動

精製過程および精製されたバクテリオシン溶液の純度検定とその分子量計測は、低分子タンパク質 (ペプチド) の電気泳動法であるトリシンSDSポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により行った。すなわち、電気泳動槽 (ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽, アトー社製) に設置されたポリアクリルアミドゲル (パジェルSPU-15S型, アトー社製) の試料ウェルに泳動用試料を添加して電気泳動 (20mA, 250V, 120min) した。泳動用試料は、バクテリオシン溶液600 μ lに10%SDS100 μ l, C緩衝液 (0.5M トリスヒドロキシアミノメタン, 0.4SDS [pH6.8]) 100 μ lおよびグリセロール200 μ lを添加、よく混合し、沸騰浴中で2分間、処理・急冷して調整した。電気泳動後、クマシーブリリアントブルー (和光純薬社製) を用いて染色し、タンパク質バンドの検出を行った。この電気泳動時には、分子量マーカーとして、ペプチドマーカー (ファルマシア社製) を用いた。

2-6 豆腐製品のバクテリオシンの応用実験

食品へのバクテリオシンの応用実験として、モデル食品を豆腐に選択した。

2-6-1 豆腐の汚染菌調査

豆腐への応用試験に先立ち、市販されている豆腐の汚染菌について調べた。山梨県内の量販店で市販されていた豆腐を無作為に収集し、その中に存在する一般生菌と大腸菌群の検出を行った。一般生菌数計測は標準寒天培地を用い、大腸菌群計測はデソキシコレート寒天培地を用い、それぞれ混釈培養したものを37℃2日間培養し、その後に生育したコロニー数を調べた。

2-6-2 豆腐へのバクテリオシン添加実験

市販豆腐を実験試料として、パックに充填された豆腐にシリンジを用いて無菌的にバクテリオシン溶液 (1000AU) を注入し、その後の一般生菌数の変化について調べた。このとき、バクテリオシンを無添加の試料を対照として用いた。

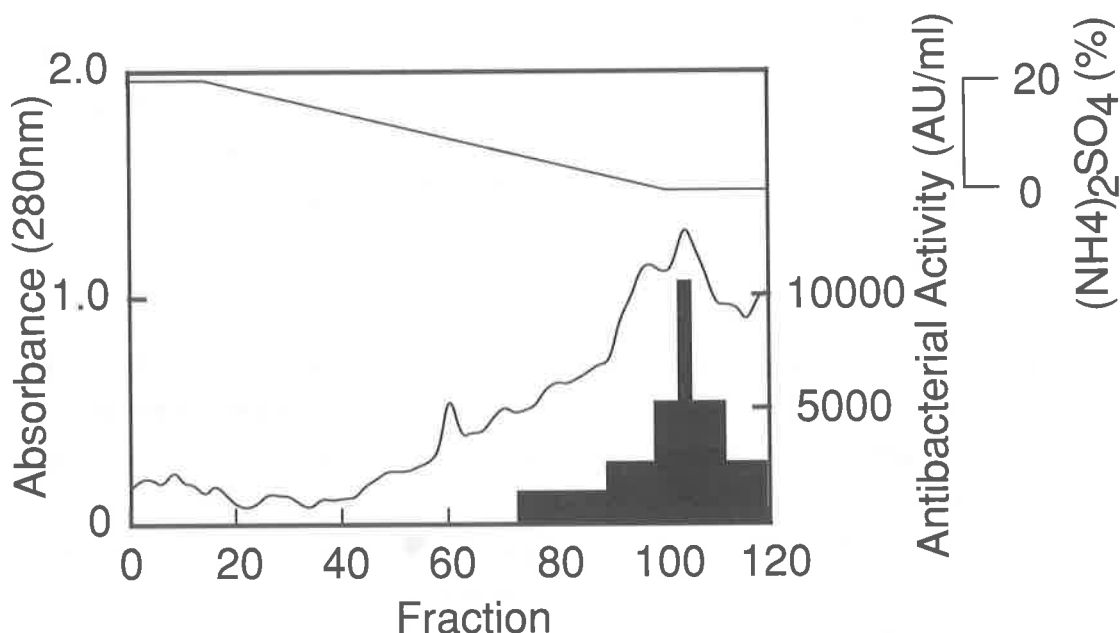


Fig. 1 Hydrophobic-interaction chromatogram of the bacteriocin from cultured broth of lactic acid cocci strain GM005
 Symbols : Bold line ; absorbance (280nm) , thin line ; concentration of ammonium sulfate, histogram ; antibacterial activity.

3. 実験結果および考察

3-1 タンパク質の精製

GM005の培養上清の疎水クロマトグラフィーでのタンパク質 (280nm吸収をもつ物質) とバクテリオシンの抗菌活性の溶出プロファイルを図. 1 に示した。硫酸濃度 0% 近傍のフラクションで抗菌活性が最大となるピークが検出でき、タンパク質のピークも明瞭ではないものの検出できた。このことから、本クロマトグラフィーでバクテリオシンペプチドが高度に濃縮・精製されたことが分かった。また、硫酸濃度 0% 近傍のフラクションに溶出されることから、疎水性のきわめて高い物質であることが推定された。なお、280nmでの溶出プロファイルが明瞭なピークを示さないことは、バクテリオシンペプチドが芳香族アミノ酸をその構成アミノ酸として含有しない可能性も考えられた。

また、疎水クロマトグラフィーにより得られた活性画分の透析物について、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画した結果、良好に濃縮・精製されることが分かった。

3-2 精製バクテリオシンタンパク質の純度検定と分子量計測

疎水クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより精製されたバクテリオシン溶液の電気泳動の結果、単一のタンパクバンドが認められた。このことから、本実験の精製操作で完全精製が達成されたことが確認できた。また、本タンパクと分子量マーカーとの比較の結果、約 2.5kDaの低分子のタンパク質であることが判明した。

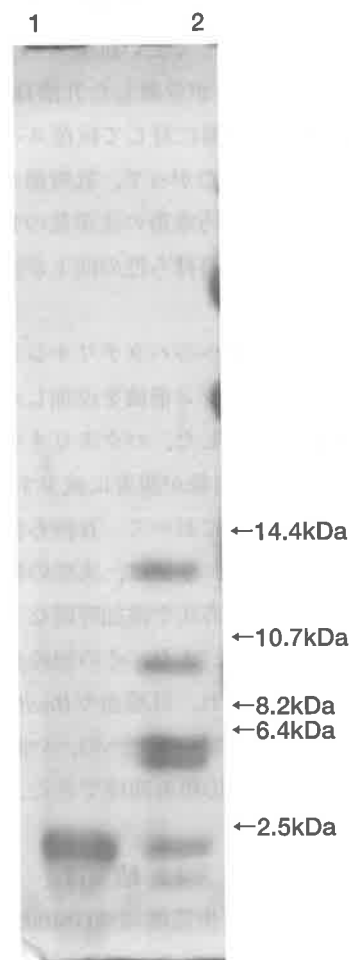


Fig. 2 Tricine-SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of Bacteriocin produced by strain GM005
 lane 1 ; purified bacteriocin, 2 molecular weight marker (Pharmacia) .

Table 1 Bacterial contamination in 'Tofu'

Tested bacteria	'Tofu' sample			
	A	B	C	D
'General bacteria'	8.2×10^7	8.0×10^4	1.4×10^6	3.5×10^2
coliform bacteria	—	—	—	+

Symbol : + ; positive, - ; negative.

3-3 豆腐製品のバクテリオシンの応用実験

3-3-1 豆腐の汚染菌調査

市販豆腐の一般生菌と大腸菌群の生菌数計測を行った結果をTable 1に示した。5試料とも差異はあるものの、標準寒天培地に生育可能な一般細菌が $10^2 \sim 10^8$ のレベルで存在することが分かった。これらの汚染菌は全てグラム陽性の細菌であり、これからは豆腐を汚染することの多い乳酸菌類⁸⁾や*Bacillus*属細菌であると考えられた。このことから、当該試料の保存温度が高くなる条件に曝された場合、汚染菌の顕著な増殖により変敗や微生物事故が発生する可能性が十分に考えられた。乳酸菌バクテリオシンは一般的にグラム陽性菌に対して広い抗菌スペクトルを示すことが知られており、我々が分離した乳酸球菌GM005株⁹⁾も乳酸菌や*Bacillus*属細菌に対して抗菌スペクトルをもつことが分かっている。したがって、乳酸菌バクテリオシンの添加により、これらの汚染菌の生菌数のレベルを低下させることが可能となり、日持ち性の向上が達成できる可能性が推察された。

3-3-2 豆腐へのバクテリオシン添加実験

豆腐にバクテリオシン溶液を添加したときの一般生菌数の変化をFig. 3に示した。バクテリオシンを豆腐に添加した結果、汚染菌の生菌数が顕著に減少することが分かった。このことから、豆腐において、日持ち性の向上が達成できる可能性が示された。今後は、実際の製造工程におけるバクテリオシンの添加方法や添加時期などの検討が必要であることが考えられた。また、その他の食品への応用も有効であることが予想され、乳酸菌や*Bacillus*属細菌で汚染されることの多い生麺類⁸⁾などへの、いわゆる非加熱殺菌が要求される食品への応用も期待できた。

4. 結言

バクテリオシン産生乳酸球菌GM005株について、その培養上清からのバクテリオシンタンパク質の精製方法を確立した。また、豆腐をモデル食品とした応用試験から、汚染菌の減少に効果があることが明らかになった。今後は、精製されたバクテリオシンタンパク質の詳細な諸性状解明のため、その構造解析や殺菌作用機作の解明、さらにDN

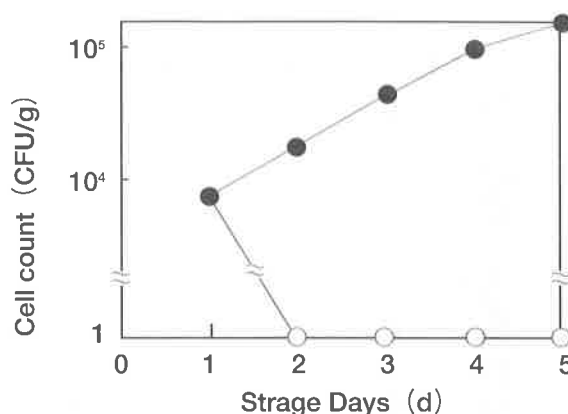


Fig. 3 Effects of application to 'Tofu' of the bacteriocin produced by strain GM005

Symbols : ● ; no application of bacteriocin soln, ○ ; application.

Aなどの分子遺伝学レベルでの解析を行っていく。将来的には、GM005株の味噌醸造などへの応用についても検討していく。

参考文献

- 1) 森地敏樹：乳酸菌利用技術の発達と今後の展望，日本乳酸菌学会誌，**9**，69-81 (1999)
- 2) De Vuyst, L. and Vandamme E. J. : Bacteriocins of lactic acid bacteria, Blackie Academic and Professional, London (1994)
- 3) Hoover, D. G. and Steenson L. R. : Bacteriocins of lactic acid bacteria, Academic Press, California (1993)
- 4) 恩田 匠・柳田藤寿：有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発，山梨大学地域共同研究センター研究報告書，**4**，74 (1992)
- 5) 恩田 匠・他：有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発—各種発酵食品からの抗菌性乳酸菌の分離・検索—，山梨県工技セ研究報告，**12**，8-11 (1998)
- 6) Onda, T. et al. : Isolation and characterization of the lactic acid bacterial strain GM005 producing an antibacterial substance from Miso-pasta product, Food Sci. Technol. Res., **5**，247-250 (1999)
- 7) 恩田 匠・他：未発表データ
- 8) 内藤茂三：脱酸素剤とオゾンガスによる食品保存技術，食品加工技術，**19**，155-164 (1999)