

有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発[†]

—分離乳酸菌の諸性状の検討—

恩田 匠・柳田 藤寿*・木村 英生・辻 政雄・荻野 敏・篠原 隆*・内村 泰**

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

—Characterization of Isolated Lactic Acid Bacteria—

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

要 約

バクテリオシン生産乳酸菌 *Enterococcus* sp. GM005株について、最も高い活性が得られる培養条件について検討した。その結果、pHを中性付近に保ち、培養18時間程度にとどめることで、最も活性の高い培養液が得られた。また、本バクテリオシンの濃縮・精製法を検討したところ、80%飽和硫酸での濃縮および疎水クロマトグラフィーでの部分精製が有効であった。

Summary

The production of bacteriocin from *Enterococcus* sp. GM005 was studied during batch fermentation at various pHs or various incubation times. Optimum pH for bacteriocin production was at pH7.0. Optimum incubation time was 18 hr. For high yield of the bacteriocin, these conditions need to be considered. And, moreover, the separation of the bacteriocin was studied. The bacteriocin was almost concentrated by 80% saturated ammonium sulfate, and that was purification partially by hydrophobic chromatography.

1. 緒 言

近年、有用微生物の抗菌力を利用して、有害な微生物の増殖を抑制しようとする、いわゆるバイオプリザベーション¹⁾が、新しい食品保蔵の考え方として注目を集めている。このバイオプリザベーションの主軸として捉えられているのが、一部の乳酸菌が生産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積極的に応用研究が進展している。

我々^{4,5)}は、各種食品への乳酸菌バクテリオシンの利用について研究を行っているが、その一環として味噌醸造に存在するバクテリオシン生産乳酸菌の解析とその利用について検討を行っている。既に、生味噌にはバクテリオシン生産能をもった *Enterococcus* 属乳酸菌が広く、かつ高頻度で存在することを明らかにしており、分離乳酸菌とバクテ

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。分離乳酸菌のバクテリオシンの本体はタンパク質性の物質であることが分かっているが、今後実用化のためには、分子レベルでの情報を集積するとともに、その安全性についての確認を行う必要があった。したがって、バクテリオシンタンパク質を培地中から完全に純粋分離・精製する方法の確立が必要不可欠であった。

本報告では、高い抗菌活性を示した *Enterococcus* 属乳酸菌 GM005株について、そのバクテリオシン生産の最適条件と、バクテリオシンタンパク質を濃縮・精製するための基本的条件について検討した結果を報告する。

2. 実験材料と方法

2-1 供試乳酸菌と培養方法

これまで生味噌から分離したバクテリオシン生産乳酸菌の中で最も強い活性を示す *Enterococcus* sp. GM005株^{4,5)}を主に用いた。本菌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ら、

[†] 本研究は、平成10年度客員研究員事業として実施された共同研究である。

* 山梨大学ワイン研究センター、**客員研究員、東京農業大学応用生物科学部

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℃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* JCM1157T^{4,5)}を用いた。

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)}のように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た。すなわち、バクテリオシン溶液を随時2倍希釈した試験液を作製し、*L. sakei* JCM1157^Tを指示菌としたアガーウエル拡散法において、活性が残存した試験液の中で最も希釈倍率の高い段階を抗菌活性の力価 (Activity Unit; A.U.) として示した。

2-3 培養中におけるバクテリオシン力価の変化

GM005株をMRS培地に1/20量接種し、30℃で24時間培養し、経時的に培養液の濁度とpH、さらに培養液中の抗菌活性の力価を計測した。培養液の濁度は、分光光度計により、660nmの吸光度として調べた。

2-4 バクテリオシン生産の最適pH試験

初発pHを調整したMRS培地に、GM005株の前培養液を1/20量接種し、30℃で一定時間培養後の抗菌活性の力価を計測した。また、1時間毎に初発pHに調整してpHを制御しながら培養後の力価も調べた。

2-5 バクテリオシンタンパク質の濃縮・精製

GM005株のバクテリオシンは、タンパク質 (またはペプチド) であることが分かっており、一般的なタンパク質の濃縮・精製法⁶⁾にしたがって、その濃縮・精製のための基本的条件を検討した。

2-5-1 硫酸沈殿法による濃縮

GM005株の培養上清に対し、硫酸アンモニウム (和光純薬社製) を各種の飽和度になるように添加し、一晚4℃

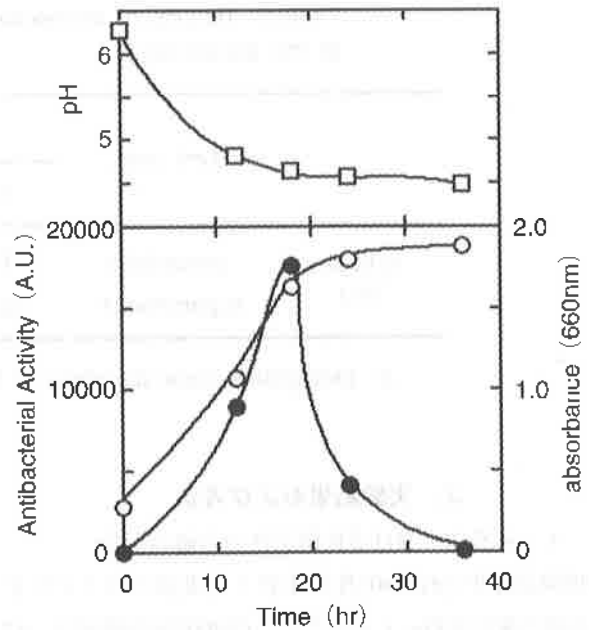


Fig.1 Changes of antibacterial activity (●), optical density (○) and pH (□) during incubation of strain GM005 in MRS broth.

で放置後、遠心分離 (5,000rpm, 20min) により、沈殿を回収した。その後、沈殿物には50mMリン酸緩衝液 (pH5.0) を添加して、試験液を調製した。以上の沈殿画分と上清画分について抗菌活性の力価を計測した。

2-5-2 疎水クロマトグラフィー法による部分精製
 クロマトグラフィー条件の検索キット (トヨパールスターキット, 東ソー社製) を用いてプチルトヨパール650M, フェニルトヨパール650Mおよびエーテルトヨパール650M担体それぞれへの吸着性と溶出挙動について調べた。遠心分離により除菌した培養液に対し、1.8Mとなるように硫酸アンモニウムを添加し、各担体にチャージさせ、1.8M硫酸アンモニウムとした50mMのリン酸緩衝液 (pH5.0) でよく洗浄した。洗浄後、硫酸アンモニウム濃度を段階的に1.8M~0Mに調整した同緩衝液で溶出させ、溶出画分の抗菌活性を調べた。

Table 1 Antibacterial activities after incubation at various initial pH in MRS broth

pH control		initial pH				
		5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Activity (A.U.)	No control	NT ^{b)}	4095	16384	16384	8192
	control ^{a)}	36	4096	32768	8192	NT

a) Broth pHs were adjusted to initial pHs every one hour during incubation. b) NT ; not tested.

Table 2 Results of ammonium sulfate precipitation of the bacteriocin

Test soln.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)				
	0	20	40	60	80
Activities precipitate (A.U.)	0	1024	1024	2048	3072
supernatant ^{a)}	4096	2048	128	128	4

a) precipitates were dissolved in 50mM phosphate buffer (pH5.0).

3. 実験結果および考察

3-1 培養中における抗菌活性の力価の変化

24時間培養中のGM005株の生育と培養液のバクテリオシン力価の変化をFig. 1 に示した。GM005株の増殖は、12~15時間後に定常期に達した。バクテリオシン活性の力価は、18時間後に最も高くなるが、その後随時減少した。このバクテリオシン活性の低下は、GM005株自体が菌体外に生産するプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）による分解の影響を受けた結果であると推察した。この結果から、バクテリオシン生産のための培養は18時間前後に止めておく必要があることが分かった。

3-2 バクテリオシン生産の至適pH試験

初発pHを各種調整したMRS培地で18時間培養した後の、培養液の抗菌活性の力価の差異をTable 1 に示した。また、初発pHを制御し、1時間毎に初発pHに調整して18時間培養した後の、培養液の抗菌活性の差異もTable 1 に示した。図表には示さないが、GM005株の増殖は、pH7.0~8.0付近の微アルカリ領域に至適があることが分かった。初発pHの差異により、バクテリオシン生産が影響を受けたことから、本バクテリオシン生産はpH感受性を有することが分かった。特に、pHを制御して培養した場合、pH7.0において最も高い力価が得られた。以上のことから、GM005のバクテリオシン生産には、pHを制御することが重要であることが分かった。今後は、pHを制御したバッチ培養システムの導入が望まれた。

3-3 バクテリオシンタンパク質の濃縮・精製

タンパク質あるいはペプチドの一般的な濃縮・精製方法にしたがって、GM005の生産するバクテリオシンの培養液からの濃縮精製方法の確立のための基礎的条件を検討した。その結果、硫酸沈殿法および疎水クロマトグラフィー法が有効であることが分かった。なお、イオン交換クロマト用担体であるDEAEトヨパール650Mなどには吸着性を

示さなかった。

3-3-1 硫酸沈殿法

各種硫酸飽和度でのGM005株のバクテリオシンの回収について検討した結果をTable 2に示した。MRS培地からは、硫酸飽和80%で活性の75%以上を回収できることが分かった。

3-3-2 疎水クロマトグラフィー法

バクテリオシンは疎水性の高いタンパク質であることが多いことから、疎水性を利用したクロマトグラフィー法による濃縮・精製を検討した。クロマト用の担体としてブチルトヨパール650M、フェニルトヨパール650Mおよびエーテルルトヨパール650Mの3種の担体を用い精製実験を行った結果をTable 3 に示した。いずれの担体でも、バクテリオシンタンパク質が100%吸着することが分かった。ブチ

Table 3 Results of hydrophobic chromatography of the bacteriocin

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M)	antibacterial activities a)		
	butyl ^{b)}	phenyl ^{c)}	ether ^{d)}
1.8	—	—	—
1.5	—	—	—
1.2	—	—	—
0.9	—	—	+
0.6	—	++	++
0.3	—	++	++
0	++	+	+

a) Antibacterial activities were determined by sizes of inhibition zone. +;inhibition, —;no inhibition. b) butyl ; butyl toyopearl 650M, c) phenyl ; phenyl toyopearl 650M, d) ether ; ether toyopearl 650M.

ルトヨパール650Mを用いたとき、溶出液の硫安濃度が0%に近い画分に活性が集中したことから、本バクテリオシンが極めて疎水性が強い性質をもつことが分かった。これらの結果から、硫安飽和度が低く設定できるブチルトヨパール650M、フェニルトヨパール650Mのうち、よりシャープなピークが得られることが考えられるフェニルトヨパール650M担体を用いるのが最も有効であると判断した。

以上のことから、硫安沈殿および疎水クロマトグラフィー法が、バクテリオシンタンパク質の精製の第一段階の手段として有効であると考えられた。

4. 結 言

バクテリオシン生産乳酸菌 *Enterococcus* sp. GM005株について、最も高い活性が得られる培養条件について検討した。また、本バクテリオシンの濃縮・精製法を検討したところ、80%飽和硫安での濃縮および疎水クロマトグラフィーでの部分精製が有効であった。今後は、バクテリオシンタンパク質の詳細な諸性状解明のため、ゲル濾過クロマトグラフィー法およびポリアクリルアミド電気泳動法などの導入で、完全精製を行うための条件について検討を行い、DNAなどの分子遺伝学レベルでの解析を行っていく。さ

らに、GM005株の味噌醸造などへの応用についても検討していく。

なお、本実験系の一環として、清酒醸造に参与する乳酸菌20株の中から、バクテリオシン生産菌1株を得ている。本菌とその利用については、別稿にて報告する。

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) DeVuyst, 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) 岡田雅人・宮崎香編：タンパク質実験ノート，羊土社，東京 (1996)