

5. 乳酸球菌の生産するバクテリオシンに関する研究

園元 謙二 (九州大学農学部食糧化学工学科)

1. はじめに

乳酸菌は広く食品の分野において利用の拡大がみられているが、この理由に乳酸菌が多くのごくすぐれた代謝機能とその増殖や発酵に伴う保蔵的、栄養的および保健治療的効果を有しているからである。最近その純粋培養法が確立し、やっと近代の生化学的、遺伝子工学的手法も活用され始めた結果、本研究部会のような乳酸菌の総合的産業利用を目指した研究など新しい流れが生まれた。現在、乳酸菌のバイオテクノロジーは急速に進展しつつある。

ところで、乳酸菌による競合微生物の排除、すなわち食品の腐敗防止などに有効であることは蓄積した乳酸の効果だけでは説明がつかなかった。乳酸菌が生産するきわめて特異的な構造をもつ抗菌性ペプチド（バクテリオシン）が深く関与していることが判明し、その抗菌力、抗菌スペクトル、物理化学的性質が解明されるに伴って新しい食品保存料として実用化されるに

至った。そして、近年、乳酸菌由来の生理活性物質の多様性や腸内菌のフローラコントロールへの関与が非常に興味ある課題として登場してきた。

乳酸菌のバクテリオシンは一般に生産菌に近縁のグラム陽性菌に対してのみ抗菌作用を示すが、中には食品汚染菌などに対しても働く、比較的広い抗菌作用範囲をもつものもあり注目されている。さらに、バクテリオシンは人の腸管にある消化酵素により分解されることや、乳酸菌が古くから広く食品に利用されていて安全性が高いことなどから、今後、多くのバクテリオシンが食品の保存性向上に利用されるものと考えられる。そのため、生産菌のスクリーニングだけでなく物質の単離・精製・構造解析および感受性菌への増殖阻害作用機作、生合成遺伝子の解析と生合成・分泌プロセスの分子機構などの研究が精力的に行われている。¹⁻⁴⁾このような研究成果に基づいて、乳酸菌が生産するバクテリオシンは現在4つのクラスに分類されている (Table 1)。

Table 1. Classification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.

Class	Properties	Molecular mass	Example
I	Lantibiotics, membrane-active peptides, heat-stable, unusual amino acids (lanthionine, 3-methylanthionine, dehydrated residues) in the mature bacteriocins	< 5 kDa	Nisin A, nisin Z, lactacin 481, carnocin UI49, lactosin S
II	Non-lantibiotic, membrane-active peptides, heat-stable, Gly-Gly ^{-1**+1} Xaa processing site in the precursor	< 10 kDa	
IIa	<i>Listeria</i> -active peptides with a consensus sequence in the N-terminal of -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-		Pediocin PA-1, sakacin A, sakacin P, leucocin A, curvacin A
IIb	Poration complexes, two proteinaceous peptides for activity		Lactococcin G, lactococcin M, lactacin F
IIc	Thiol-activated peptides, reduced cysteine residues for activity		Lactococcin B
III	Non-lantibiotic, heat-labile proteins	> 30 kDa	Helveticin J, helveticin V-1829, acidophilucin A, lactacin A, lactacin B
IV	Complex bacteriocins, protein plus one or more chemical moieties (lipid, carbohydrate) for activity		Plantaricin S, leuconocin S, lactocin 27, pediocin SJ-1

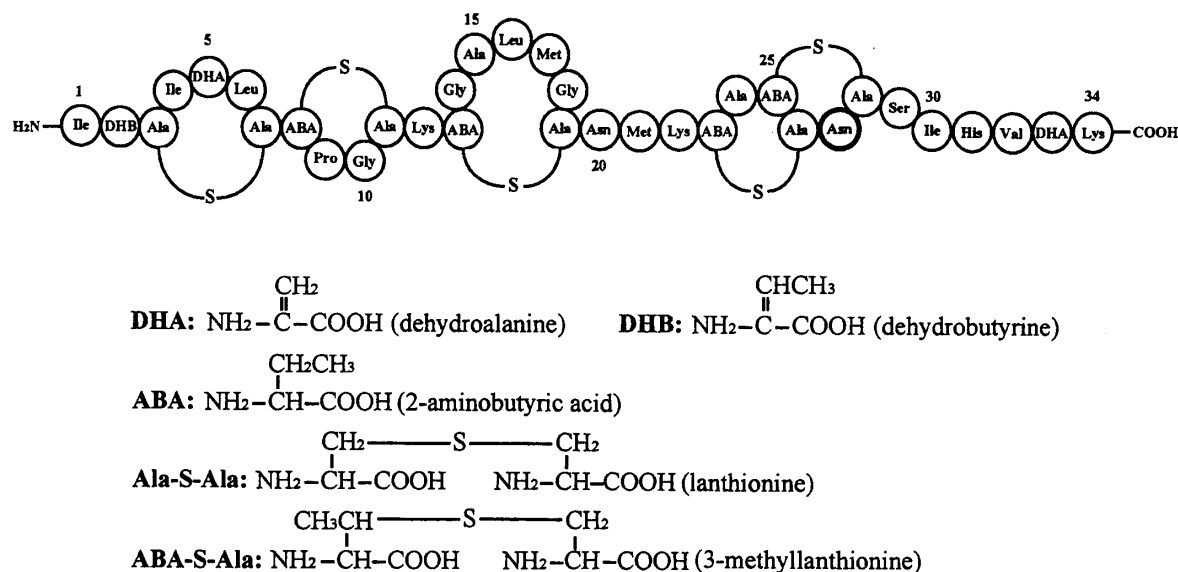


Fig. 1. Proposed structure of the peptide antibiotic purified from *Lactococcus lactis* IO-1. The amino acid residue at position 27 is a His residue in nisin A.

乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が生産するバクテリオシン、ナイシン A は、*Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus* などのグラム陽性菌に対して広い抗菌スペクトルをもち、酸や熱に安定である。実用化されている唯一のバクテリオシンであり、欧米など40ヵ国以上で、チーズ、缶詰、牛乳、マヨネーズなどの天然保存料として使用が許可されている。わが国では「食品、添加物等の規格基準」により食品への使用は認められていない。ナイシン A は、分子量3,354の低分子ペプチドで、その構造遺伝子の翻訳により生じたプレペプチドがさまざまな修飾を受け、不飽和アミノ酸やチオエーテル環を有するランチオニンなどの異常アミノ酸を含む活性型ペプチド（ランチビオティック）に変化する。ランチビオティックの研究は、EC 委員会の BRIDGE (Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe) program が1990年から始まり、Biotechnology of lactic acid bacteria がプロジェクトの一つに取り上げられた結果、めざましい進展が見られた。⁵⁾しかし、日本では欧米ほど研究は盛んではなく、ナイシン生産菌を単離したという報告例もこれまでなかった。

ここでは、当研究室で分離した新菌 *Lactococcus lactis* IO-1 (JCM 7638)⁶⁾ が生産する新しい抗菌ペプチドについて、精製、構造決定、生産性の改良など、筆者らの一連の研究を簡単に紹介する。

2. ペプチドの精製と構造解析⁷⁾

本菌の培養液上清から酸処理、硫酸アンモニウムによる塩析、尿素を外液とした透析、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行って、本ペプチドを比活性122倍、活性回収率24%で精製した。アミノ酸配列および組成分析により、本ペプチドは異常アミノ酸を含み、ナイシン A ときわめて類似していたが、HPLC 分析では異なる物質であることが分かった。そこで、さらに質量分析 (FAB-MS) や NMR 分析を行ったところ、本ペプチドの活性型の構造は、不飽和アミノ酸やランチオニンなどを含み、ナイシン A の His27 が Asn27 に置換した、分子量3,338のナイシン誘導体、ナイシン Z であることが明らかになった (Fig. 1)。

3. ペプチドの特性⁸⁾

感受性菌に対する生育阻害作用、抗菌スペクトル、pH や熱安定性およびタンパク質加水分解酵素の作用性など、ナイシン A とほぼ同様な性質を示した。ナイシン Z は、ナイシン A に比べて中性 pH での溶解度が高いことから、すぐれた食品保存料として期待される。

4. ペプチド発酵生産の最適化⁹⁾

ペプチドは、乳酸と同様に菌体の増殖と共に生産されるが、その最適生産条件は、菌体増殖や乳酸生産の条件と異なっていた。特に、カルシウムイオンの添加

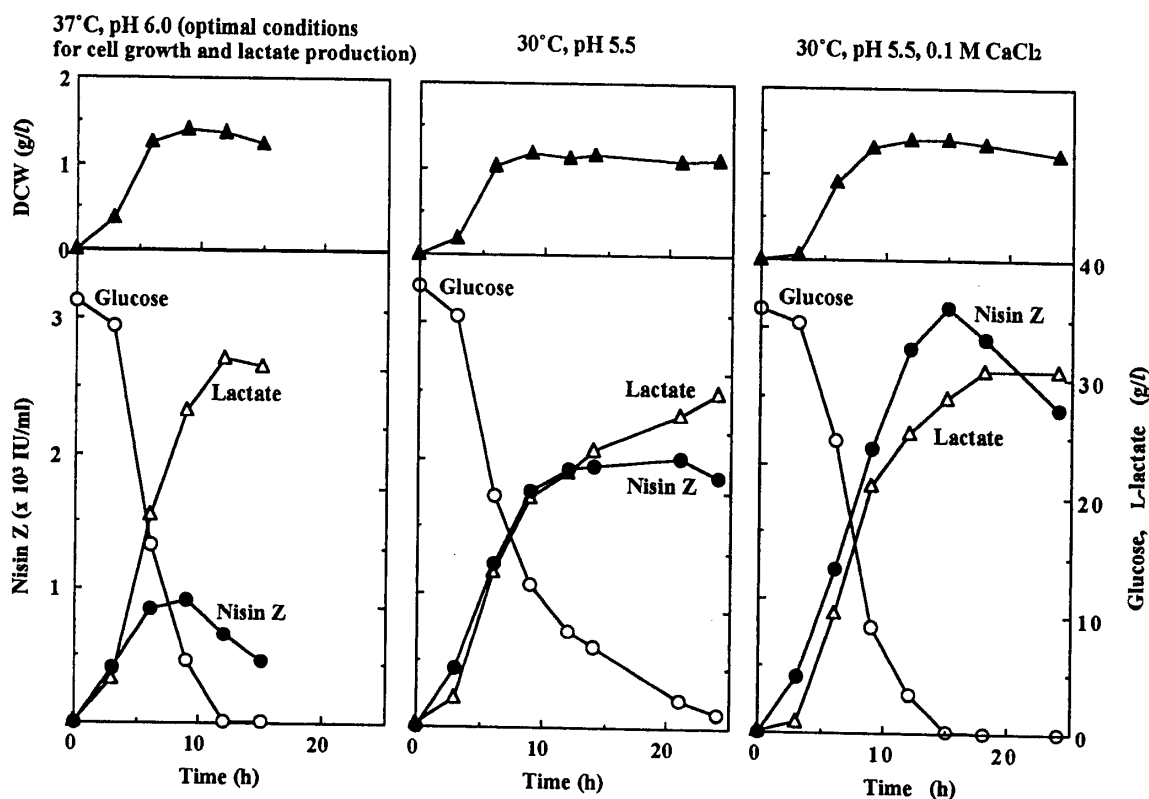


Fig. 2. pH-controlled fermentation of nisin Z by *Lactococcus lactis* IO-1.⁹⁾ Fermentations were conducted in an 1-l jar fermentor with a working volume of 500 ml of the basal medium supplemented with 36 g/l glucose.

は、ペプチドの生産性のみを高めることを見いだした。これらの結果より、ペプチドの最大活性値が約3倍増加した (Fig. 2)。

5. 連続生産バイオリアクターの開発¹⁰⁾

12種類の固定化用担体を用いて、菌体を吸着あるいは包括固定化し、ペプチドの生産性について検討した。菌体の新しい吸着担体として、光架橋性樹脂ビーズは、回分操作での繰り返し生産において、高い生産速度とすぐれた操作安定性を与えた。さらに、この固定化菌体を用いたバイオリアクターによる連続生産では、回分培養での最大生産速度を上回ると共に、少なくとも180時間連続運転が可能であった。

6. おわりに

以上、乳酸菌のバクテリオシンに関する概略や筆者らの研究を述べてきたが、このような研究は、今日、食品業界において食品保存料の開発をする際に重要でありながら難しいとされてきた「抗菌性」「味」「耐熱性」などといった問題を解決していくうえで基礎となる重要な示唆を与えてくれる。また、他の殺菌方法や

保存料を軽減し、食品素材の栄養価やテクスチャーを変えない。このように、よりすぐれた抗菌物質の検索は、よりすぐれた食品のデザインや食品に新たな機能性を賦与することを可能にする。さらに、乳酸菌の斬新な培養工学的技術は他の食品製造プロセスにも適用できる。したがって、熱や酸に安定なペプチド性抗菌物質の検索や生産技術は、乳酸菌のもつ顕在的および潜在的可能性を最大限に引出し、生鮮・高品質かつ安全な「新しい食品」の製造技術の大きなエポックとなるであろう。

また、食品保存料以外の視点から、以下のような研究課題がある。

- ① 人の腸内フローラやさまざまな伝統的発酵食品のマイクロフローラのコントロール機構への乳酸菌やバクテリオシンの寄与
- ② バクテリオシンの抗菌性における構造と活性の相関、その成果を利用したハイブリッド体やキメラ体あるいはまったく新しいタイプのバクテリオシンの *de novo* デザインや創製

文 献

- 1) Klaenhammer, T. R.: *Biochimie*, **70**, 337 (1988).
- 2) Klaenhammer, T. R.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 39 (1993).
- 3) De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic & Professional, Glasgow (1994).
- 4) Ralph, W. J., Tagg, J. R., and Ray, B.: *Microbiol. Rev.*, **59**, 171 (1995).
- 5) 園元謙二, 松崎弘美: 化学, **50**, 382 (1995).
- 6) Ishizaki, A., Osajima, K., Nakamura, K., Kimura, K., Hara, T., and Ezaki, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **36**, 1 (1990).
- 7) Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: *Food Sci. Technol., Int.*, **2**, in press (1996).
- 8) 松崎弘美, 遠藤直之, 園元謙二, 石崎文彬: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 115 (1995).
- 9) Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 36 (1996).
- 10) Chinachoti, N., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: 日本生物工学会大会要旨集, p. 52 (1995).

6. ビフィズス菌とプロピオン酸菌の混合培養

谷口 正之 (新潟大学工学部)

ビフィズス菌とその発酵物は、腸内菌叢の改善、腐敗産物の生成抑制、便性改善などの体調節機能（整腸作用）ばかりでなくコレステロール低下作用、免疫賦活作用（発癌抑制作用）などの各種生理効果を有する。したがって、ビフィズス菌は特定保健用食品いわゆる機能性食品中の有効成分として、また生菌製剤としても非常に有用な乳酸菌である。著者らは、これまでに膜ろ過型バイオリアクターを用いたスターター微生物としての乳酸菌やビフィズス菌の生産および乳酸菌による抗生物質、芳香成分、酵素などの有用物質の生産についてすでに報告してきた。¹⁻⁴⁾

本稿では、有用物質の生産に混合培養を積極的に利用することを目的として、ビフィズス菌とプロピオン酸菌の混合培養について検討した結果を紹介する。すなわち、各種食品の保存性を向上するために必要な天然の安全な抗菌剤として、ビフィズス菌とプロピオン酸菌の混合培養物の生産について検討した。この混合培養においては、これらの2種類の微生物を用いた逐次転換法によって高い抗菌活性を有する天然抗菌剤の効率的な生産を試みた。^{5,6)} また、ビフィズス菌に対するプロピオン酸菌培養物の増殖促進作用を解析・利用するために、膜型混合バイオリアクターを新規に開発した。^{7,8)} この装置を用いて別々の培養槽でビフィズス菌とプロピオン酸菌を培養し、ビフィズス菌とプロピオン酸菌の菌体生産について検討した。⁸⁻¹¹⁾

1. 混合培養による抗菌物質の生産

1.1 有機酸の抗菌活性 標準液として用いた乳

酸、酢酸およびプロピオン酸の抗菌活性について検討した。標準液の抗菌活性は、*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas* sp. および *Staphylococcus aureus* を検定菌としたペーバーディスク寒天平板拡散法によって、24時間後の生育阻止円径から求めた。抗菌活性は酢酸相当活性として表した。^{5,6)} 被験液の抗菌活性はpHによって大きく影響を受けたが、非解離型の有機酸濃度の対数と生育阻止円径の間には直線関係が成立した。また、市販の各有機酸の抗菌活性の間には、検定菌によらず酢酸＝プロピオン酸＞乳酸の関係があった。^{5,6)}

1.2 混合培養による逐次転換 ビフィズス菌とプロピオン酸菌の混合培養によって、有効利用されていないラクトースを炭素源として抗菌活性の高い有機酸混合物を生産する方法を考案した。まず第一段階はビフィズス菌によってラクトースを乳酸と酢酸に変換する。次に、第二段階はいったん生成した乳酸を共存するプロピオン酸菌によって抗菌活性の高いプロピオン酸と酢酸に変換する。結果として、ビフィズス菌の単独培養によって得られる培養液よりも、抗菌活性の高いプロピオン酸と酢酸を含む培養液が生産できると考えられる。混合培養においては、第一段階と第二段階の変換反応が同時に進行することになり、プロピオン酸菌が十分に生育できれば乳酸はあまり蓄積しないと考えられる。

1.3 混合培養による有機酸混合物の生産 上記の概念に基づいて、2種類の食品微生物を用いた逐次転換法によって抗菌性培養物を生産した。Fig. 1は、ラクトースを炭素源としたTPY培地を用いて