

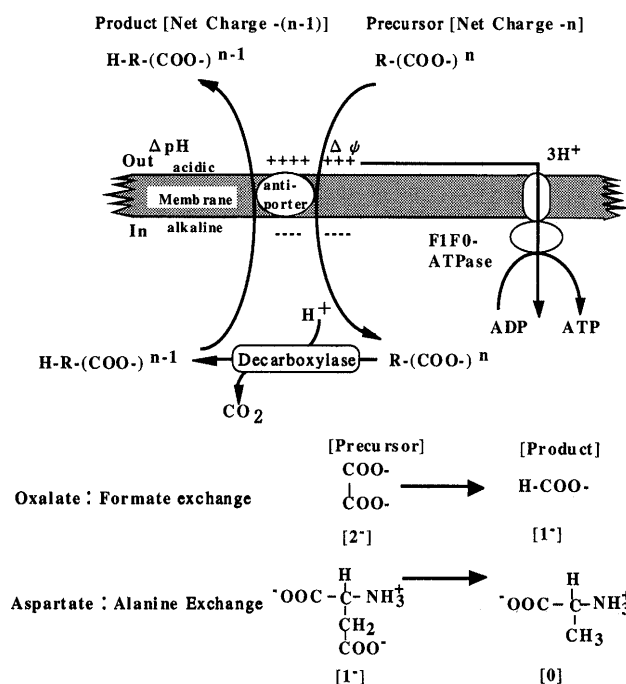


Fig. 1. Decarboxylative Phosphorylation. Inward transport of the precursor is followed by intracellular decarboxylation and an outward movement of the product. These events reflect a combination of vectorial and scalar reactions that together comprise a proton pump.

(未発表データを含む).^{2,4)} 大腸菌において発現した両

遺伝子産物を, proteoliposome に再構成し輸送過程を解析した結果, 電位差形成的交換輸送活性を示した (未発表データを含む).⁴⁾

5. 脱炭酸共役エネルギー生成系の生理的意義

現在までに知られている ATP 生成系は, 基質レベルのリン酸化, 光合成における光リン酸化, 呼吸鎖における酸化リン酸化の三種であり, 今回紹介した系は脱炭酸的リン酸化 (Decarboxylative Phosphorylation) とも呼べる, 新たに見いだされてきた第四の ATP 生成系と言える. この系は, proton pump として, 一般に二反応系 (基質: 産物の交換輸送と脱炭酸反応) で構成されており, 反応的にも酵素数的にも単純で, 他の代謝の影響をほとんど受けずに自己触媒的に高速に反応が進む. また, そのエネルギー生成能は脱炭酸されるカルボキシル基の解離に依存することから, 細菌は広範な pH 領域をカバーする proton pump として, 種々のカルボキシル基を脱炭酸する系を備えているものと考えられる. これらの性質は種々の細胞に人工的に組み込み可能なエネルギー生成系として大変魅力的である.

- 1) Maloney, P. C. *et al.*: *J. Exp. Biol.*, **196**, 471 (1994).
- 2) Higuchi, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1601 (1998).
- 3) Abe, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **271**, 3079 (1996).
- 4) Abe, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **271**, 6789 (1996).

乳酸菌を利用する食品にやさしい殺菌方法

—バイオプリザベーション—

園元 謙二*・石崎 文彬

1. 新しい微生物制御法としてのバイオプリザベーション

食品の安全性を確保するためには生産・加工時の細菌汚染防止と流通時の増殖防止対策が重要である. 薬剤の多用や過度の加熱処理による無菌に近い食品の製造は, 我々の免疫獲得の機会を少なくし, 食品への好まざる細菌の侵入を許すことになり, 食中毒多発の一因にもなっている. また, 現代はフレーバーロスのない本来のフレーバーをもち, バクテリアコントロールされた食品を要求する時代である. このような消費者の生鮮・高品質化志向などのニーズに応えるには, さらに穏和な殺菌条件の確立が必要となってきた. その技術のひとつに食品保存料の開発があるが, これら添加物の使用は人の健康にかかわる安全性の面からの十分な検討が必要である. 安全性が高く, かつより効果のある新しい抗菌性物質の

探索が世界的な趨勢であり, 食品の国際競争力のバロメーターともなっている.

ところで, 化学的殺菌技術の中でバイオプリザベーションが注目されているのは, “食品にやさしい殺菌・除菌・静菌方法” であるからである. たとえば, 乳酸菌は人間の生活に深くかかわっている有用な微生物の一つであり, 特に食品製造や健康とのかかわりでは, もっともなじみ深い細菌であり産業的にも有用である. 近年, 乳酸菌が競合微生物の排除, すなわち食品の腐敗防止や発酵食品中の安定したマイクロフローラの形成などに関与していることが明らかとなってきた. 乳酸菌がつくる代表的な増殖阻害物質であるバクテリオシンはきわめて特異的な構造をもち, その特性は, 熱安定性にすぐれ, ヒトの消化酵素により分解され, 食品の風味に影響を与えないなど, 従来の抗菌物質に代わる夢の抗菌剤として現代

* 著者紹介 (代表) 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 (教授)

〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1 TEL/FAX. 092-642-3019 E-mail: sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/biosci-biotech/biseibutu/>

社会にマッチする。なお、バイオプリザベーションの考え方や実際例などは紙面の都合上、既刊の成書や総説を参照してほしい。¹⁻³⁾

2. バクテリオシンの応用

質・量ともに世界の乳酸菌バイオテクノロジー研究全体を牽引する欧州各国ではすぐれた機能をもつ乳酸菌を分離してきたが、わが国の伝統的発酵食品などが未知の乳酸菌の魅力的で未開拓な分離源であることは疑う余地はない。すなわち、わが国の伝統的発酵食品中には、糖源の資化性が異なるなど独特の乳酸菌が生息しており、これらの分離源は乳・肉中心の欧米の乳酸菌生育環境と大きく異なるといえる。我々はこれまで、新規バクテリオシン産生乳酸菌の検索・同定、バクテリオシンの精製と構造および遺伝子解析、特性、発酵生産の最適化、連続生産バイオリクターの開発、などについて取り組んできた。⁴⁻⁶⁾さらに、産学官より成る「機能性食品製造プロセス開発チーム」を作り、バクテリオシンの食品製造プロセスへの応用について、以下のように、構成メンバーの特徴を生かした研究項目に取り組み、顕著な研究成果を得ることができた。⁷⁾

機能性食品製造プロセス開発チーム

産 オーム乳業㈱

㈱安河内綜合食品

㈱やまやコミュニケーションズ

学 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座微生物工学分野

官 福岡県保健環境研究所

研究項目

- 1) 新規バクテリオシン産生乳酸菌の検索
- 2) 新規バクテリオシンの特性に関する研究
- 3) 新規バクテリオシンの発酵生産技術の開発
- 4) 新規バクテリオシンの精製と簡易迅速測定法の開発
- 5) 食品製造技術と機能性食品の開発

研究成果

- 1) ナイシンZ生産菌の分離・同定
- 2) バクテリオシン活性の検出系の確立
- 3) 食品汚染菌に対するナイシンZの有効性
- 4) 実用規模を指向したナイシンZの発酵生産および分離技術の確立（設計指針、生産性評価、コスト評価）
- 5) ナイシンZによる非加熱食品などの品質保持効果（賞味期限の延長）
- 6) ナイシンZと一般静菌剤との相乗静菌効果（静菌剤の低減化）
- 7) ナイシンZによる発酵食品製造プロセスの微生物制

御（選択的静菌効果）

ナイシンZ製造方法について、これまでにその安価な培地の検討や濃縮・精製プロセスの開発に成功した。また、ナイシンZを含む培養液上清あるいは粗精製物を種々の加工食品、特に非加熱食品や日持ちしにくい食品（明太子、豆腐など）、に適用したところ、一般生菌数の減少が観察され、賞味期限を大幅に伸ばすことに成功した。さらに、従来の抗菌剤の使用量を減らしその併用により、低濃度でも格段の相乗静菌効果が得られた。これらの食品の風味やテクスチャーはまったく変化しなかった。以下に、ナイシンZの実用的な濃縮・精製プロセスの開発および福岡特産の辛子明太子に対する静菌効果について詳細に述べる。

ナイシンZは筆者らが開発した最適発酵条件下で約3000 U/mlが得られる（なお、精製ナイシンAの1 μ gが示す抗菌活性を40 Uと定義している）。本物質を実用化するには、できるだけ低コストで濃縮し、かつ他の培地成分などを取り除く簡便な精製が必要である。食品添加物としての用途を考える場合、商品の活性は少なくとも10,000 U/mlは必要であろう。そこでナイシンZの実用的な濃縮・精製方法を検討した。ナイシンZ発酵液の上清を濃塩酸でpH 3.0に調整し、4°Cで一晩放置し（酸性処理）、得られた上清をナイシンZ溶液（約3000 U/ml）とした。まず逆浸透膜や限外ろ過膜を用いてナイシンZの膜濃縮を検討した。その結果、負荷電逆浸透膜を用いた場合に透過液側にリークすることなく、効率よく活性画分を濃縮できた。このときの濃縮倍率は約3.8倍、回収率は約88%であった。濃縮だけでは、培地成分や他の発酵産物の残留が避けられず、これら狭雑物質を除くために、イオン交換クロマトグラフィーによる粗精製を行った。各種の陽イオン交換体を用いてナイシンZの吸着と溶出について検討したところ、弱陽イオン交換体が最適であった（回収率、約89%）。これらの濃縮・精製プロセスで、培養液を約3～4倍に濃縮し、収率約80%で10,000 U/ml以上の無味、無臭の無色透明ナイシンZ液を調製できた。ただし、目的の食品や製造プロセスによって精製度の異なるナイシンを使い分けてコストダウンを図る必要がある。

辛子明太子は、タラコを唐辛子などを含む調味料に5°C前後で1週間漬け込み熟成させた発酵食品であるが、まれにガス、酸味臭を発生するものがあり、それらの原因菌を抑え、より安全性を高める方法が必要となってきた。まず辛子明太子から分離した菌90株に対するナイシンZの効果を検討した。試験方法はMRS培地

上に分離菌を含む標準寒天培地を重層し、その上に粗精製ナイシンZを滴下して30°C, 48時間培養し、生育阻止円の有無で最少有効阻止濃度を決定した。その結果、粗精製ナイシンZは7.8~500 U/mlの濃度で約8割の菌に生育阻止が見られた。次に、辛子明太子に対する静菌効果について検討した。辛子明太子の菌数を一定にするため外の皮を取り除いたバラコに、直接10,000 U/mlの粗精製ナイシンZを添加し、10°Cでの毎日の菌数を検査することにより静菌効果の有無を判断した。粗精製ナイシンZ添加区はナイシンZ濃度が0.25% (25 U/g)でも無添加区と比較して菌数が10分の1に低下し、3~4日の日持ち期間の延長が見られた。その効果は、アジピン酸、プロタミン（白子タンパク質）、リゾチーム、ポリリジン、竹抽出物などの市販の静菌剤と比較して最も優れたグループに属していた。また、ナイシンZと市販の静菌剤との併用効果について検討した結果、組み合わせ次第で低濃度でも大幅な静菌効果が得られた。辛子明太子漬け込み工程においても同様に、工程に使用する調味液にナイシンZを100 U/ml以上添加することで静菌効果が認められ、ポリリジンとの併用により強い静菌効果が得られた。そこで、ナイシンZとポリリジンを添加した調味液にタラコを1週間漬け込み、辛子明太子を作成した結果、大幅な日持ちの向上が見られ、かつ官能試験においても特に従来のものと比較して遜色なかった。以上の結果から、粗精製ナイシンZは市販の静菌剤と併用して辛子明太子の品質を向上させ、かつ製造プロセスの細菌汚染防止に有効であることが明らかとなった。

3. 今後の課題と展望

バクテリオシン生産菌は、自己の生産するバクテリオシンに対して耐性である。しかし、その機構はバクテリオシンの抗菌メカニズムに比べ、解明が大きく遅れており、その多くは自己耐性に関与すると思われる遺伝子から得られる情報や、遺伝子欠損や異種菌における自己耐性タンパク質の発現で確認されるのみである。近年、このような耐性機能や特別なバクテリオシン分解酵素を持たない菌が、高濃度のバクテリオシン添加培地で培養を行うことで、バクテリオシン耐性になることが報告された大きな話題となっている。バクテリオシン耐性菌の出現はバクテリオシンのバイオブリザベーションへの利用には脅威であり、解決しなければならない問題である。その解決策の一つに異なるバクテリオシンの併用があげられる。併用効果はおそらく使用したバクテリオシンの異なる作用機作によると思われるが、今後さらにバクテリ

オシン耐性、およびバクテリオシンの作用機作の完全な解明が必要である。

バクテリオシンは、広域に作用を及ぼすバンコマイシンなどのセフェム系抗生物質と異なり、狭い範囲でしか抗菌作用を示さない。このことが多様な微生物が共存している環境（腸内フローラや天然の発酵食品フローラなど）を巧妙に保つ要因の一つと考えられる。したがって、酵母やカビなど多様な生物が共生している発酵食品の原料などにおいて、耐性菌のみが選択的に増殖することは難しいと考えられる。また、微生物間の協調と攻撃の現象におけるきわめて特異的な物質としての乳酸菌のバクテリオシンをさまざまな分野で改めて見つめ直す必要がある。

乳酸菌のバクテリオシン研究は、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上で、基礎となる重要な示唆を与えてくれる。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、より有用なバクテリオシン生産菌のスクリーニングにおいては、保全を目的とする食品やすぐれた発酵食品を積極的に分離源として活用すべきであろう。その意味で、筆者らの日本あるいはアジア型発酵食品を分離源とした研究は参考となる。バクテリオシンの単離・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、耐性機構、新規のバクテリオシンの発現系の開発・分子改変などの基礎研究も重要である。⁸⁻¹⁷⁾このような基礎研究成果は遠からずバクテリオシンを利用したバイオブリザベーションの実現に結びつく。さらに、このような乳酸菌は食品のみならずヒトの腸内フローラコントロールにきわめて重要な役割を担っており、乳酸菌のマイクロフローラ調節機構を解明し、その機能を積極的にヒトの健康増進に役立てる食品の製造技術の開発は、今後、食品産業が取り組むべき創造的な研究テーマである。

- 1) 日本食品保全研究会編：食品微生物制御技術の進歩，中央法規出版（1998）。
- 2) 森地敏樹，松田敏生編著：バイオブリザベーションー乳酸菌による食品微生物制御ー，幸書房（1999）。
- 3) 松田敏生：食衛誌，**41**，163（2000）。
- 4) 園元謙二ら：食品微生物制御技術の進歩（日本食品保全研究会編），中央法規出版，p. 129（1998）。
- 5) 園元謙二，石崎文彬：乳酸菌学会誌，**9**，113（1999）。
- 6) 園元謙二：生物機能の新展開ー人類の生存をかけてー，日本食品出版，p. 65（2000）。
- 7) 勸福岡県産業・科学技術振興財団産学官共同研究開発事業研究成果報告書（2001）。

- 8) 園元謙二, 松崎弘美: 化学, **50**, 382 (1995).
- 9) 園元謙二ら: バイオサイエンスとインダストリー, **54**, 492 (1996).
- 10) 松崎弘美ら: 生物工学, **75**, 125 (1997).
- 11) 園元謙二, 指原紀宏: 酵素工学, **40**, 21 (1998).
- 12) Ennahar, S. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 705 (1999).
- 13) 指原紀宏ら: 乳酸菌学会誌, **10**, 2 (1999).
- 14) 松崎弘美ら: 食品工業, **42**, 18 (1999).
- 15) Ennahar, S. et al.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 85 (2000).
- 16) 指原紀宏ら: 化学と生物, **38**, 439 (2000).
- 17) 園元謙二, 指原紀宏: 蛋白質核酸酵素, **46**, 323 (2001).

生物に学ぶ：乳酸菌との共培養による有用物質生産

塩谷 捨明*・江川 直・清水 浩

乳酸菌は古くからさまざまな用途に利用されてきているが、我々は抗菌性のペプチド、バクテリオシンの生産に注目し、天然保存料として食品添加剤に用いることを想定し、培養プロセスという点からの効率的な生産を目指して検討を進めている。ナイシンは *Lactococcus lactis* が生産する代表的なバクテリオシンで、ヨーロッパでの研究の歴史が古い。乳酸菌培養においての問題点の一つは、乳酸生成および pH 低下による増殖阻害、生産阻害であり、我々は、生成乳酸を資化するような微生物との混合培養、共培養により、どの程度この問題点が解決可能かの検討を進めてきた。混合培養によるナイシン生産性向上の基本的概念を Fig. 1 に示す。乳酸菌はナイシン生産と同時に乳酸を副生するので、培地の pH 低下、乳酸の蓄積などにより増殖が著しく抑えられ、ナイシン生産も停止する。そこで、副生する乳酸を酵母によって資化させることを考える。一方、乳酸菌にとって主炭素源となるマルトースは酵母によって資化されないので、酵母は乳酸菌によって増殖阻害となる乳酸のみを除去してくれることになる。結果、ナイシン生産性の向上がはかれる。この場合、2 種の微生物は正の双利共生関係にあるといえよう。このような微生物相互関係は自然界によく見られる現象であり、我々はこのような自然現象を生産プロセスに利用しようと考えたわけである。

本報告では、このプロセスについて最近の研究成果に

ついて述べる。

1. 実験方法

ナイシン生産乳酸菌は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ATCC11454) を用い、乳酸資化性菌としては、ケフィール粒中から分離した酵母 *Kluyveromyces marxianus* MS1 を用いた。この酵母はマルトース資化能を持たない。培地は、混合培養用には炭素源 40 g/l、ポリペプトン 10 g/l、酵母エキス 10 g/l を用い、炭素源としてはマルトースを用いた。純粋培養ではグルコースや乳酸を適宜使用した。ナイシンの定量は市販ナイシン A (SIGMA: 2.5% contents) を標準品とし、*Staphylococcus aureus* を検定菌とする液体法によるバイオアッセイによった。菌濃度は、混合培養ではコロニーカウントによる生菌数を、純粋培養では生菌数、乾燥菌体重量などを用いた。乳酸、酢酸濃度は F-キット酵素法、培養は、5 l ジャーファメンター好気培養によった。

2. 実験結果

本乳酸菌は、乳酸濃度に関わらず pH 4.5 以下で急激な増殖阻害を起こし、また、乳酸濃度 15 g/l 以上で増殖阻害が無視できなかった。

スクリーニングしてきた酵母は好気条件下で培養するため、混合培養系全体を好気条件で培養することを考えた。したがって、好気条件下での乳酸菌の培養特性、ナイシン生産特性をチェックした。またこのとき酢酸、アセトインを副生した。好気系における代謝は概略 Fig. 2 のように考えられ、酸素は NADH と NAD の均衡を図るため、NADH の酸化に必要と考えられた。事実、生成乳酸・酢酸量もしくはアセトイン・二酸化炭素量、消費マルトース・酸素量から計算した、NADH, NAD 量は釣り合っていることが証明された。

酵母 *K. marxianus* は DO レベルを操作することによって乳酸資化速度をある範囲のなかで制御できる。乳酸の生産に伴って pH が低下する。この pH 低下は共培養している酵母の増殖に伴う乳酸資化によって抑えられ、制

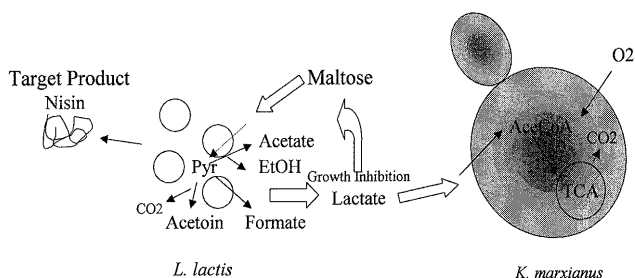


Fig. 1. Microbial interaction and removal of lactate by coculture.

* 著者紹介 (代表) 大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻 (教授)

〒565-0871 吹田市山田丘2-1 TEL/FAX. 06-6879-7444 E-mail: shioya@bio.eng.osaka-u.ac.jp