

2D14-1 大腸菌 MetC 欠損変異株による L-シスタチオニンの蓄積 – metB 遺伝子導入の影響

○元松 剛史¹, 宮島 義郎¹, 荒木 和美¹, 小野寺 正幸², 戸田 清²
(¹ 東亜大・院・食品, ² 新潟工大・工・物生システム)

【目的】我々の研究グループでは先に、大腸菌のシスタチオニンβ-リアーゼ欠損変異株(MetC⁻)がL-シスタチオニンを蓄積することを報告した。^{a)}そこでL-シスタチオニン合成にかかわるシスタチオニンγ-シントラーゼ遺伝子(metB)をクローン化し、これをMetC⁻株へ導入してその発酵生産への影響を調べた。

【方法・結果】E.coli K-12の野生株のDNAを鋳型にして、PCR法によりmetB遺伝子を増幅し、“pDriveCloningVector”(キアゲン社製)に組み込み、それをMetC⁻株に導入した。MetBの酵素活性をMarshallら^{b)}の方法で測定した結果、非導入株に対して30倍の活性を認めた。発酵試験を先報^{a)}と同様に、果糖6%、硫酸アンモニウム1%、L-メチオニン0~2,000μg/ml等を含む発酵培地7mlを300ml容三角フラスコに入れ、30℃で140rpmの振とう条件で44時間培養して行った。その結果、対照株では予想どおりL-シスタチオニンを蓄積したが、metB導入株はほとんどL-シスタチオニンを蓄積しなかった。

a) T. Nishi et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 178 (2002).

b) M. K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4463 (1966).

Microbial production of L-cystathionine with an *Escherichia coli* MetC deficient mutant – Influence of enhanced expression of metB gene

○ Takeshi Motomatsu¹, Yoshiro Miyajima¹, Kazumi Araki¹, Masayuki Onodera², Kiyoshi Toda²
(¹ Grad. Sch. Univ. East Asia., ² Fac. Eng. Niigata Inst. Technol.)

Key words L-cystathionine, cystathionine β-lyase, metB gene

2D14-3 *Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産する多成分バクテリオシンの解析

○富田 浩二¹, Wilaipun Pongtep², 善藤 威史¹, Leelawatchara Vichien², 中山 二郎¹, 関元 謙二¹
(¹ 九大院・農, ² カセサート大)

【目的】タイの発酵魚、Pla-ra から単離した *Enterococcus faecium* NKR-5-3 の培養液上清は *Enterococcus*, *Listeria* をはじめとする様々なグラム陽性菌に対して抗菌活性を示した。本研究では NKR-5-3 株が生産するバクテリオシンの精製・構造解析を試みた。

【方法・結果】本菌株の培養液上清から種々の液体クロマトグラフィーおよび逆相 HPLC を用いてバクテリオシンの精製を行った。その結果、*Brochothrix campestris* NBRC 15547 (= ATCC 43754) が生産する2つのペプチドからなるバクテリオシン Brochocin-C と考えられるものと2つのバクテリオシン (ペプチド B, Mw ca. 6300; ペプチド C, Mw ca. 5680) が得られた。ペプチド B に関して Edman 分解によるアミノ酸配列解析を試みたが、配列が得られなかった。そこで、各種プロテアーゼおよび化学試薬を用いたペプチドの限定分解による配列解析を行うとともに、Brochocin-C 生産菌 *Brochothrix campestris* NBRC 15547 との交差耐性について検討中である。

Analysis of the multi-bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3

○ Koji Fujita¹, Pongtep Wilaipun², Takeshi Zendo¹, Vichien Leelawatcharamas², Jiro Nakayama¹, Kenji Sonomoto¹
(¹ Fac., Agr., Grad., Sch., Kyushu Univ., ² Kasetsart Univ.)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, *Enterococcus*, brochocin-C

2D14-2 植物性分離源からの新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索

○岩永 宜子¹, 善藤 威史¹, 古賀 祥子¹, 松尾 義明², 関元 謙二¹
(¹ 九大院・農, ² オーケー食品工業・技術研)

【目的】乳酸菌によって生産される抗菌性ペプチド、バクテリオシンは、安全な天然の食品保存料としての利用が期待されている。乳酸菌は、動物の腸管や発酵乳だけでなく植物にも存在しており、植物由来の乳酸菌から新奇バクテリオシンの発見が期待されている。本研究では、植物性の分離源から新奇バクテリオシン生産乳酸菌を探索した。

【方法・結果】分離源として野菜 (小松菜、大根葉)、豆腐の製造工程で排出される廃棄物 (おから、澄水) を用いた。得られた菌株の培養液上清を用いて抗菌活性を調べた結果、13 株のバクテリオシン生産乳酸菌が得られた。それらの抗菌スペクトルはナisinと類似した幅広いものから、非常に狭いものまでさまざまであった。これらから特徴的な抗菌スペクトルを持つ菌株を、野菜由来の4株から2株、豆腐廃棄物由来の9株から3株選抜し、同定試験を行った。カタラーゼ活性試験と形態観察の結果、全てカタラーゼ陰性の球菌、あるいは桿菌であった。API 50 CHL キットによる糖類発酵性試験の結果、いずれも乳酸菌 *Lactococcus* 属、もしくは *Lactobacillus* 属と同定された。現在、16S rDNA 配列の解析による同定とバクテリオシンの精製・構造解析を行っている。

Screening of novel bacteriocin-producing lactic acid bacteria from plant-associated sources

○ Noriko Iwanaga¹, Takeshi Zendo¹, Shoko Koga¹, Yoshiaki Matsuo², Kenji Sonomoto¹
(¹ Fac. Agr., Grad. Sch., Kyushu Univ., ² OK Food Ind. Co. Ltd.)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, nisin, bean-curd refuse

2D14-4 Characterization of bacteriocin produced *Lactobacillus bulgaricus* against bovine mastitic pathogens

○ HYUN-JIN KIM, JI-HYUN KIM, JEONG HWA SON, SUNG-KOO KIM
(Pukyong Natl. Univ. Korea)

The bovine mastitis is a critical problem in dairy farming. Currently, the cows with bovine mastitis have been treated using antibiotics. However, antibiotics were detected in the raw milk of cows with bovine mastitis by the antibiotics residue-test. Therefore, bacteriocins have been emerged as an alternative to the antibiotics to treat the cows with bovine mastitis. Bacteriocins are biologically active peptides, proteins and protein complex produced by bacterial species acting against related species. In this study, the bacteriocin to kill mastitic pathogens was screened from LAB and characterized. The characteristics and the optimal production condition of the bacteriocin were evaluated. The antimicrobial substance was inactivated by protease was confirmed to be a bacteriocin. The optimal conditions for the production of bacteriocin were the temperature of 30℃ and the culture time of 10 hours. *S. aureus* and *S. agalactiae*, the common bovine mastitic pathogens, were treated with the bacteriocin by the agar-well method. The bacteriocin was more effective to *S. agalactiae* rather than *S. aureus*. The bacteriocin activity was existed at 100℃ for 90 min. Finally, the antimicrobial activity was showed activity in wide range of pH from pH 2 to 11. Also the various metal ions did not affect bacteriocin activity, whereas, it was lost at high pH combined with exposure to 100℃.

Characterization of bacteriocin produced *Lactobacillus bulgaricus* against bovine mastitic pathogens

○ HYUN-JIN KIM, JI-HYUN KIM, JEONG HWA SON, SUNG-KOO KIM
(Pukyong Natl. Univ. Korea)

Key words bacteriocin, mastitis pathogens, *Lactobacillus bulgaricus*