The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

2Ip01　マクロファージ様細胞株を用いた免疫調節作用の高い生もと乳酸菌の選抜

○増田 康之[1], 高橋 俊成[1], 吉田 和利[2], 水野 雅史[3], 溝口 晴彦[1]
([1]菊正宗・総研, [2]兵庫工技セ, [3]神戸大院・自科)

[目的]生もと酒母では初期に球菌である*Leuconostoc mesenteroides*が生育し、次いで桿菌である*Lactobacillus sakei*が生育する優占乳酸菌の遷移が起こっていることが知られている。本研究では当社生もと製造場より分離した乳酸菌保存株の中から、マクロファージ様細胞株J774.1から分泌されるサイトカインの産生誘導能を指標として、免疫調節作用に優れた生もと乳酸菌を選抜することを目的とした。
[方法と結果]MRS培地に生もと乳酸菌を植菌し一晩静置培養後、熱処理した生もと乳酸菌体をJ774.1株に添加し、一晩培養してサイトカイン産生を誘導した。培養終了後培養上清を回収し、培養上清中に分泌されたサイトカイン（IL-12p40, IL-6, IL-10）量をELISAキットにより測定した。その結果、J774.1からIL-12p40, IL-6, IL-10の分泌を強く誘導している生もと乳酸菌*L.mesenteroides*, *L.sakei*を選抜することができた。現在、それらの生もと乳酸菌株について、トランズウェル上で小腸上皮様に分化させた細胞株Caco-2細胞をマクロファージ様細胞株RAW264.7上に配置することで共培養とした実験系を用いて、Caco-2 を生もと乳酸菌により刺激した際の、RAW264.7から分泌されるTNF-α量を測定することにより、腸管を介した免疫調節作用を評価することを検討している。

In vitro screening of immuno modulating strains of lactic acid bacteria from *kimoto* using the macrophage cell line

○Yasuyuki MASUDA[1], Toshinari TAKAHASHI[1], Kazutoshi YOSHIDA[2], Masashi MIZUNO[3], Haruhiko MIZOGUCHI[1]
([1]Gen. Res. Lab., Kiku-Masamune Sake Brewing Co., [2]Hyogo Prefectural Institute of Technology, [3]Grad. Sch. Agric., Kobe Univ.)

Key words *kimoto*, macrophage, cytokine

2Ip02　コーヒーチェリー付着微生物の単離・同定とそのコーヒー生豆中のGABA含量への影響

○南塚 博司[1], 右山 由美香[1], 紙谷 雄志[2], 大西 いづみ[1], 福永 泰司[2], 老川 典夫[1]
([1]関大・化学生命工・生命生物工, [2]UCC上島珈琲株R&Dセ)

【目的】カカオ豆に付着している微生物がチョコレートの味や成分などに影響を及ぼすことが知られている。しかしコーヒーチェリーに付着している微生物の種類やそのコーヒー生豆中の成分に及ぼす影響に関する研究は，皆無である。そこで本研究では，コーヒーチェリーから付着微生物を単離・同定するとともに，そのコーヒー生豆中のγ-アミノ酪酸(GABA)含量への影響について検討することを目的とした。
【方法】沖縄産及びハワイ産のコーヒーチェリーを液体培地で集積培養した後，固体培地で画線培養し，付着微生物を単離した(30℃)。単離微生物の16SrDNA 解析を行い，同定した。また単離微生物の菌体をコーヒーチェリーと共存させ，コーヒー生豆中のGABA及びL-Gluを経時的に定量した。
【結果及び考察】16SrDNA解析の結果，いずれの産地のコーヒーチェリーにも乳酸菌や酢酸菌などの発酵微生物が存在することが明らかになった。また存在する微生物の種には産地間で類似と相違が見られた。コーヒーチェリーから単離した乳酸菌をコーヒーチェリーと 7 日間共存させると，生豆1 gあたりのGABA含量は0.06 mgから0.25 mgへ約4倍増加した。したがって，コーヒーチェリー付着微生物がコーヒー生豆中のGABA含量に影響を及ぼすことが明らかとなった。

Isolation and identification of microorganisms from coffee cherries and their effects on γ-aminobutyric acid content in coffee beans

○Hiroshi MINAMIZUKA[1], Yumika MIGIYAMA[1], Yuji KAMITANI[2], Izumi ONISHI[1], Taiji FUKUNAGA[2], Tadao OIKAWA[1]
([1]Dept. Life Sci. &Tech., Fac. Chem., Materials & Bioeng., Kansai Univ., [2]UCC Ueshima Coffee Co.,Ltd., R&D Center)

Key words coffee cherry, gamma-aminobutyric acid, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria

2Ip03　耐熱性乳酸菌 *Lactobacillius salivarius* AC21が生産するバクテリオシン、salivacin K21の遺伝子クローニングと分子解析

○古賀 千恵[1], 園村 奈々[1], 伊藤 紗希[2], NITISINPRASERT Sunee[3], 善藤 威史[4], 中山 二郎[4], 園元 謙二[4], 松崎 弘美[3]
([1]熊本県大院・環境共生, [2]熊本県大・環境共生, [3]カセサート大, [4]九大院・農)

【目的】耐熱性乳酸菌*Lactobacillus salivarius* AC21が生産するバクテリオシン、salivacin K21はαおよびβペプチドの2分子ペプチドで構成されると予想されている。しかしそれらの相互作用や分子内ジスルフィド結合の役割、また、全ての生合成遺伝子は明らかではない。よって、生合成遺伝子のクローニングおよび大腸菌によるsalivacin K21の発現を検討した。
【方法と結果】Salivacin K21 の生合成遺伝子の一部を degenerate PCR、inverse PCR によりクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、salivacin K21は、*Lb. salivarius subsp. salivarius* UCC-118が生産する2分子ペプチドから成るバクテリオシン、ABP-118（Abp118αとAbp118β）と相同性が高く、SalAαはAbp118αと同一、SalAβはAbp118βと2個のアミノ酸残基が異なっていた。また、salivacin K21は誘導ペプチド遺伝子（*salIP*）、ヒスチジンプロテインキナーゼ遺伝子（*salK*）、応答調節遺伝子（*salR*）の三成分調節機構で生合成されると予想された。salivacin K21の成熟αペプチドおよび成熟βペプチドに相当するDNA領域とDHFR遺伝子を融合させたものを、それぞれHis-tag DHFR融合タンパク質として大腸菌で発現させることを試みた。

Gene cloning and molecular analysis of salivacin K21, a bacteriocin produced by thermotolerant *Lactobacillus salivarius* AC21

○Chie KOGA[1], Nana SONOMURA[1], Saki ITO[2], Sunee NITISINPRASERT[3], Takeshi ZENDO[4], Jirou NAKAYAMA[4], Kenji SONOMOTO[4], Hiromi MATUSAKI[3]
([1]Grad. Sch. Environ. Symbiotic Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Symbiotic Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Fac. Agro-Industry, Kasetsart Univ, [4]Fac. Agr., Kyushu Univ)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*

2Ip04　たくあん漬から分離した乳酸菌 *Lactococcus lactis* PJR24が生産するバクテリオシンの精製と諸性質

○平山 恵理[1], 松崎 弘美[2]
([1]熊本県大院・環境共生, [2]熊本県大・環境共生)

【目的】ある種の乳酸菌が生産する抗菌物質、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。本研究では、たくあん漬より分離した *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの精製および諸性質を調べることを目的とした。
【方法と結果】PJR24株の培養液上清より、70%飽和濃度で硫安沈殿を行った。この活性沈殿物を20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)、そして8 M尿素-HCl（pH 5.0）に対して透析後、イオン交換クロマトグラフィーでの精製を検討したところ、本バクテリオシンは陽イオン交換樹脂に pH 3.6~5.0で結合せず、陰イオン交換樹脂にpH 5.0~6.0で強固に結合することがわかった。本バクテリオシンは、pH 3.0~9.0の広いpH領域で安定であったが、110℃、10分オートクレーブにより失活した。また、透析後サンプルについて、proteinase K処理を行ったところ、抗菌活性が消失した。さらに、Tricine-SDS-PAGEおよびゲルのバイオアッセイ（重層法）によって、本バクテリオシンの分子量は約8.0 kDaであることがわかった。

Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* PJR24 isolated from picled Japanese radish

○Eri HIRAYAMA[1], Hiromi MATSUSAKI[2]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactococcus*

NII-Electronic Library Service