農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

Characterisitic evaluation of lactic acid bacteria collections based on the bacteriocin productivit

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 留美, 島, 純, 鈴木, チセ, 百瀬, 洋夫, 川本, 伸一 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002649

報　文

微生物バンク等保存乳酸菌株のバクテリオシン生産性を指標とした特性評価

佐藤留美*・島　純・鈴木チセ・百瀬洋夫*・川本伸一

Characterisitic evaluation of lactic acid bacteria collections based on the bacteriocin productivity

Rumi SATO*, Jun SHIMA, Chise SUZUKI, Hiroh MOMOSE* and Shinichi KAWAMOTO
* Graduate school of Human Life Sciences, Jissen Women's University
National Food Research Institute

Abstract

Bacteriocins are a heterogenous group of antimicrobial peptides and proteins produced by lactic acid bacteria(LAB) that inhibit the growth of closely related species. The stock strains of LAB in National Food Reseach Institute and Jissen Women's University were tested for the prodution of antimicrobial activity using a agar well diffusion assay against four species of *Lactobacillus*, *Enterococcus faecium* ,and *Bacillus subtilis* as the indicator strains. Of 169 LAB strains tested, 8 strains were identified that inhibited the growth of at least one of the LAB indicator strains. They were *E. faecalis* NFRI7001, *E. faecium* NFRI7031, *L. plantarum* NFRI7313, *L. sake* NFRI7317, *L. curvatus* NFRI7352 and NFRI7372, *L. casei* K-1 and strain c5-1, most of which are food-borne bacteria. The antimicrobial compounds produced by these LAB strains except *L. casei* K-1 were all protease-sensitive, suggesting that the LAB strains were considered to produce bacteriocins. *L. casei* K-1 produced a protease-resistant antimicrobial compound.

(Received Oct.2,2001; Accepted Dec. 27, 2001)

近年，生物由来の抗菌活性物質（バイオプリザバティブ）を利用して，食中毒菌等の有害な微生物の増殖を抑止しようとするバイオプリザベーションが新しい食品保蔵の考え方として注目を集めている[1]。このバイオプリザバティブとしての利用の可能性が最も高いと考えられているのが，バクテリオシン[2-4]と総称される抗菌性物質である。その中でも特に注目されているのが，発酵食品微生物の代表である乳酸菌の一部が産生する一群の蛋白質もしくはペプチド性のバクテリオシンであり，主に生産菌近縁の細菌に対して殺菌的に作用する[5]。このバクテリオシンは選択毒性が高く，かつ人体に取り込まれても胃の蛋白質分解酵素により消化されるので，極めて安全性の高いものであると考えられる。

このような観点から特に発酵食品由来の乳酸菌が生

*実践女子大学大学院　生活科学研究科
2001年10月2日受付，2001年12月27日受理

産するバクテリオシンに関して1980年以後急速に基礎及び応用研究が進展し[6]，現在では200を超える報告がある[7-10]。中でも*Lactococcus lactis*の生産するナイシン[11]は，GRAS（generally recognized as safe）物質[12]として欧米を中心に56ヶ国で食品保存料として使用されている[13]。しかし，このように安全性が高く評価されているにも関わらず，日本ではいまだナイシンの食品保存料としての使用は許可されていないのが現状である。現段階では，味噌や醤油の製造工程で問題となっている微生物汚染を防ぐため，ナイシン生産菌のような乳酸菌を「抗菌性乳酸菌スターターカルチャー」として利用するに留まっている[14,15]。しかしながら最近の消費者の人工化学食品保存料使用に対する反発やこれらの安全性に対する関心の高まりから，我が国においても天然由来のバクテリオシンのような安全性の高い食品保存料の早急な開発と応用が必須であると考えられる。

そこで本研究では，安全性の高い食品由来の乳酸菌からバイオプリザベーションに利用可能な強い抗菌力を有したバクテリオシンの分離を目指し，食品総合研究所微生物バンク保存株等に関してバクテリオシン生産性を指標として特性評価を行った。

実験方法

1．使用菌株

食品総合研究所微生物バンクに保存されている乳酸菌98株(*Lactobacillus*属の24種90株，*Enterococcus*属の2種3株，*Pediococcus*属の2種3株，*Leuconostoc*属の1種2株;ほとんどのものは生理，生化学的同定に加え16S rDNA塩基配列解析[16]により同定された菌株である。）と実践女子大学食品加工学研究室の保存乳酸菌株71株（主に生理、生化学的同定によって乳酸菌と判定された菌株）をスクリーニングに使用した。指示菌として使用した菌株は，第１表に示した。これらは微生物バンク保存菌株の中から選択した。

第1表　バクテリオシン生産性検定に使用した指示菌

菌株名*	備考**
Bacillus subtilis 168	枯草菌実験室株
Enterococcus faecium IFO13712	Type strain
Lactobacillus lactis IAM1173	NFRI7307
Lactobacillus bavaricus JCM1129	NFRI7323 Type strain
Lactobacillus casei ssp.casei JCM1134	NFRI7325 Type strain
Lactobacillus curvatus JCM1096	NFRI7333 Type strain

* IFO，発酵研究所；IAM，東京大学応用微生物学研究所；JCM，理化学研究所
** NFRI，食品総合研究所微生物バンク

2．使用培地

乳酸菌株の培養は全て*Lactobacilli* MRS broth培地（Difco社）を用いて30℃で一晩静置培養を行った。*Bacillus subtilis* 168はLB培地を用いて37℃で一晩振盪培養を行った。菌株の保存に使用する固形培地には1.5%(w/v)の寒天を添加した[17]。抗菌物質生産性検定用の指示菌添加寒天培地（以後，指示菌プレートと略す。）は，滅菌した0.8%寒天添加MRS培地を40℃まで冷却し，これに指示菌の一晩培養液を0.25%(v/v)接種し混合後、40 ml ずつ角形プラスチックシャーレ(10×14cm)に分注して作製した。固化後、指示菌プレートは4℃に保存し，2週間以内に使用した。

3．抗菌物質生産性の検定

抗菌物質生産性の検定は，「寒天ゲル法」（Agar Well Diffusion Assay）[18,19]を用いた。各供試菌株の一晩培養液を10,000× g ,4℃,5分遠心分離し，培養上清を回収した。この上清を指示菌プレートに10 μl ずつ滴下した。対照として既知のバクテリオシン生産菌 *Enterococcus mundtii* NFRI7393株[20]の培養上清も同量滴下した。抗菌物質生産性の判定は，30℃,12時間培養後，試料滴下部位における生育阻止円の形成の有無により行った。

4．蛋白質・ペプチド性バクテリオシンの判定

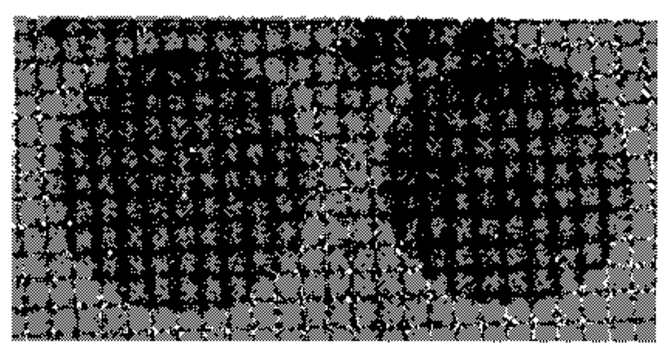
培養上清中に抗菌活性を有すると判定された菌株に

ついては，培養上清を蛋白質分解酵素Proteinase K（MERCK社）を用いて活性が消失されるか確認を行った[21]。Proteinase Kは10 mg/mlの濃度で10 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）に溶解し，培養上清50 μl,滅菌水48 μlに対してProteinase K溶液2 μlを加えて37℃,1時間反応を行った。なお，対照としてProteinase Kと蛋白質分解酵素阻害剤Complete mini（Roche社）を用いた反応を行った。Complete miniは，1錠を10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）2 mlに溶解し，これを培養上清50 μl,滅菌水28 μl, Proteinase K 溶液2 μlに対して20 μl 使用した。Proteinase K処理で活性が失われなかった菌株については，Microcon YM-3（MILLIPORE社,分子量排除限界:3000)を用いて培養上清を限外濾過し，抗菌活性がペプチド，蛋白質以外の有機酸等の低分子化合物によるものか否か検討を行った。

実験結果と考察

1．抗菌物質生産株の検索

抗菌物質生産株の検索に当たっては，第1表に示した6菌株を指示菌として使用した。いずれかの指示菌において，供試菌株の培養上清が生育阻止円を形成するものを抗菌性ありと判断した。微生物バンク保存乳酸菌98株と実践女子大学食品加工学研究室保存乳酸菌71株についての計169株をスクリーニングした結果，
*Enterococcus faecalis*NFRI7001（醤油諸味より分離），
Enterococcus faecium NFRI7031（Type strain JCM5804），
Lactobacillus plantarum NFRI7313(サイレージより分離),
Lactobacillus sake NFRI7317（漬物より分離），
Lactobacillus curvatus NRFI7352（漬物より分離），
Lactobalillus curvatus NFRI7372（漬物より分離），
Lactobacillus casei K-1(鮒すしより分離)[22],c5-1（日本酒の酒母より分離）[23]の8株が抗菌物質生産性を示した。その代表例として，第1図に*L.sake* NFRI7317と*L.curvatus* NFRI7352の2株から得られた培養上清の抗菌活性を示した。第2表にこれら抗菌物質生産性8菌株の指示菌6株に対する抗菌スペクトルを示した。



1　　2

1. *L. sake* NFRI7317　培養上清
2. *L. curvatus* NFRI7352　培養上清

第1図．*L. curvatus* NFRI7317株と*L. curvatus* NFRI7352株の産生する抗菌活性
指示菌として*L. curvatus* NFRI7333株を接種したMRS寒天培地のウエルに菌株の培養上清10 μlを加え，30℃で12時間培養した。

第2表　バクテリオシン生産菌株の抗菌スペクトル

菌株＼指示菌	*Bacillus subtilis*	*E. faecium* IFO13712	*L. casei* NFRI7325	*L. bavaricas* NFRI7323	*L. curvatus* NFRI7333	*L. lactis* NFRI7307
Enterococcus faecalis NFRI7001	++	+	+	−	+	+
Enterococcus faecium NFRI7031	−	++	−	+	−	+
Lactobacillus plantarum NFRI7313	++	−	+	−	−	−
Lactobacillus sake NFRI7317	++	−	−	+++	+++	−
Lactobacillus curvatus NRFI7352	−	−	−	+++	+++	−
Lactobacillus curvatus NFRI7372	−	−	−	+++	+++	−
Lactobacillus casei K-1	++	−	−	−	−	−
c 5-1	++	+	+	−	+	+

−，活性なし；+～+++，相対活性を示している

第２表から，使用した指示菌の範囲内で，*Enterococcus*属の2株とｃ5-1株は広い抗菌スペクトルを，一方*L. sake* NFRI7317, *L. curvatus* NFRI7352, *L. curvatus* NFRI7372の3株は特定の乳酸菌に対して強い抗菌活性を示した。*L. casei* K-1株は*B. subtilis* のみに抗菌活性を示した。*L. plantarum* NFRI7313は*B. subtilis*に加え，*L. casei* NFRI7325に弱い抗菌活性を示した。

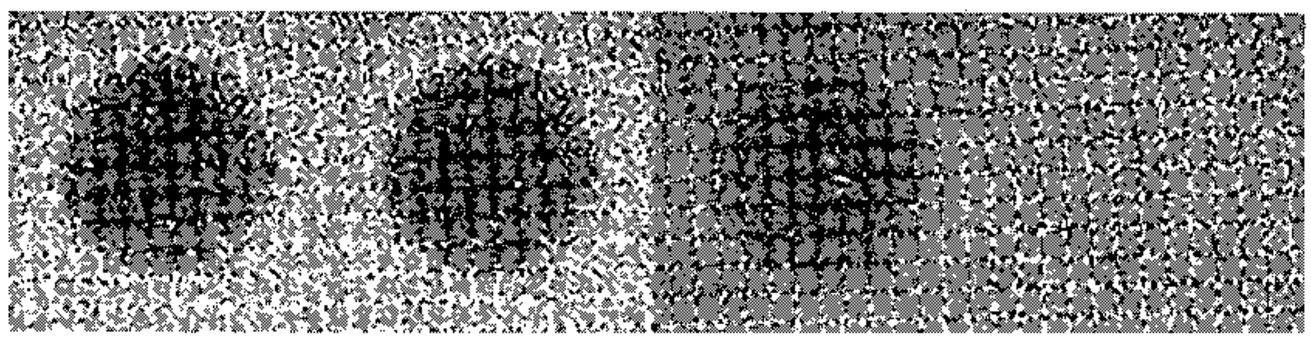
２．蛋白質分解酵素処理によるバクテリオシン生産性検定

上記8菌株の生産する抗菌物質が蛋白質・ペプチド性のバクテリオシンか否かを，蛋白質分解酵素Proteinase Kを用いて検討した。その結果，*L. casei* K-1を除く他の全ての菌株において，蛋白質分解酵素処理（37℃,1時間）により培養上清の抗菌活性は完全に消失することを確認した。一方，Proteinase Kに蛋白質分解酵素阻害剤を添加した対照実験では全ての菌株において活性の低下は認められなかった。以上の結果から，*L. casei* K-1を除く菌株の抗菌活性は蛋白質性のバクテリオシンによる可能性が極めて高いと判断された。

３．*L. casei* K-1株が生産する抗菌物質の検討

L.casei K-1株の培養上清に検出された抗菌活性は，蛋白質分解酵素処理により消失しないことから（第2図），低分子化合物によるものである可能性が示唆された。そこで，限外濾過による抗菌物質の分画を行った（第2図）。分子量排除限界3000の限外濾過では，K-1株培養上清の抗菌活性は濾過透過画分に検出された。従って，K-1株が生産する抗菌物質は分子量3000以下の低分子化合物である。

*B. subtilis*の指示菌プレートは酸による影響を受け易く，今回の*L. casei* K-1株のように生育阻止円がバクテリオシンの活性によるものか否か判断する際に，蛋白質分解酵素処理の他にこのような限外濾過実験を行うことは有効である。



1　　2　　3　　4

1. K-1株の培養上清
2. 蛋白質分解酵素処理をしたK-1株の培養上清
3.限外濾過透過画分
4.限外濾過濃縮画分

第２図．*L. casei* K-1株の産生する抗菌活性に対する蛋白質分解酵素処理と限外濾過処理の影響
指示菌として*B. subtilis*をを接種したMRS寒天培地のウエルに各処理画分10μlを加え，30℃で12時間培養した。

４．バクテリオシン類似性検定のための交叉試験

第２表に示した結果において，*E.faecalis* NFRI7001株とc5-1株が生産するバクテリオシンは，バクテリオシンの活性の強さと抗菌スペクトルが一致していた。同様のことが*L. curvatus* 7352株と*L. curvatus* 7372株の生産するバクテリオシン間でも見られた。

一般にバクテリオシン生産菌は，バクテリオシン生合成遺伝子に加え自らが生産するバクテリオシンによる自殺を防ぐための耐性を付与する免疫遺伝子を保持している[7]。この免疫遺伝子は特異性が高く，生産菌由来のバクテリオシンと同一または極めて相同性の高いものに対してのみ耐性を付与する[3]。そこで，今回得られたバクテリオシン生産菌を指示菌として用いて，各々の生産するバクテリオシンに対する耐性すなわち免疫性を検討する交叉試験を行った（第3表）。

第3表　バクテリオシン類似性検定のための交叉試験

指示菌＼生産菌	*E. faecalis* NFRI7001	*E. faecium* NFRI7031	*E. platarum* NFRI7313	*L. sake* NFRI7317	*L. curvatus* NFRI7352	*L. curvatus* NFRI7372	c 5-1	*E. mundtii* NFRI7393
Enterococcus faecalis NFRI7001	−	++	−	−	−	−	−	++
Enterococcus faecium NFRI7031	++	−	−	−	−	−	++	−
Lactobacillus platarum NFRI7313	−	+	−	−	−	−	−	+
Lactobacillus sake NFRI7317	−	−	−	−	−	−	−	+
Lactobacillus curvatus NRFI7352	−	+	−	−	−	−	−	+
Lactobacillus curvatus NFRI7372	−	+	−	−	−	−	−	+
c 5-1	−	++	−	−	−	−	−	++
Enterococcus mundtii NFRI7393	++	+++	−	−	−	−	++	−
Enterococcus faecium IFO13712	+	++	−	−	−	−	+	+++

−，活性なし；+～+++，相対活性を示している

E. faecalis NFRI7001株の生産するバクテリオシンに対してc5-1株は耐性を示した。また，c5-1株の生産するバクテリオシンに対して*E.faecalis* NFRI7001株は耐性を示した。同様に，*L. curvatus* 7352株は*L. curvatus* 7372株の生産するバクテリオシンに対して耐性を，7372株は7352株の生産するバクテリオシンに対して耐性を示した。

これらの結果から*E. faecalis* NFRI7001株とc5-1の生産するバクテリオシンは同一，あるいは極めて相同性の高いものであることが強く示唆された。同様に*L. curvatus* NFRI7352株と*L. curvatus* NFRI7372株の生産するバクテリオシンも同一，あるいは極めて相同性の高いものであると考えられる。

以上の結果から，本スクリーニング実験より，*E. faecalis* NFRI7001, *E. faecium* NFRI7031, *L. plantarum* NFRI7313, *L. sake* NFRI7317, *L. curvatus* NFRI7352, *L. curvatus* NFRI7372, c5-1の7株が蛋白質あるいはペプチド性のバクテリオシン生産乳酸菌であることが示された。バクテリオシンの実用的発展を考えると，まずこれら乳酸菌の生産するバクテリオシンが既知のものか或いは新規のものであるかの検討が重要である。そのためには今後，1) pHや熱に対する安定性等バクテリオシンの諸性質の検討, 2) ウェルシュ菌やリステリア菌等の食中毒菌も含めた抗菌スペクトル試験, 3) バクテリオシンの精製とアミノ酸配列分析による構造決定, 4) バクテリオシンの生合成遺伝子や免疫遺伝子のクローニング等の研究を行う必要がある。

謝　辞

本研究は，農林水産省パイオニア特別研究およびジーンバンク事業の助成を受けて行われたものである。

要　約

乳酸菌が産生するバクテリオシンは，近縁の種の生育阻害を引き起こす蛋白質・ペプチド性の抗菌性物質である。食品総合研究所微生物バンク保存乳酸菌株98株と実践女子大学食品加工学研究室保存乳酸菌71株の計169株に関して*Lactobacillus*属の4株，*Enterococcus faecium* と*Bacillus subtilis*を指示菌として用いた抗菌物質生産菌のスクリーニングを行った。その結果，*E.faecalis* NFRI7001,*E. faecium* NFRI7031, *L.plantarum* NFRI7313, *L. sake* NFRI7317, *L. curvatus* NFRI7352, *L. curvatus* NFRI7372, *L. casei* K-1, c5-1の計8株が用いた乳酸菌指示菌に対して抗菌性を示した。*L.casei* K-1の生産する抗菌物質は蛋白質分解酵素に耐性を示した。一方，他の7菌株の抗菌活性は全て，蛋白質分解酵素処理により消失した。以上のことから，これら7菌株は蛋白質・ペプチド性のバクテリオシンの生産菌であることが示唆された。

文　献

1) 森地敏樹・松田敏雄編,バイオプリザベーション,乳酸菌による食品微生物制御,（幸書房,東京）(1999).

2) 藤田泰仁,バクテリオシン,「乳酸菌の科学と技術」,乳酸菌研究集談会編,（学会出版センター,東京）,pp. 205-215(1996).

3) Hoovrer,D.G., and Steenson,L.R., Bacteriocins of lactic acid bacteria,Academic Press,Inc, San Diego, Calif. (1993).

4) De Vuyst, L., and Vadamme, E.J., Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic & Professional, New York(1994).

5) Stiles,M.E., Biopreservation by lactic acid bacteria., *Antonie van Leeuwenhoek,* **70**, 331-345(1996).

6) 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).

7) 園元謙二,指原紀宏, 乳酸菌のバクテリオシンの構造と作用機構,蛋白質核酸酵素, **46**, 4,323-332(2001).

8) Aymerich, T., Holo, H. Havarstein, L.S. Hugas, M. M. Garriga,and I.F. Nes., Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faceium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins., *Appl.Environ.Microbiol.*, **62**, 1676-1682 (1996).

9) Casaus,P., Nilsen,T., Cintas,L.M., Nes,I.F., Hernandez,P.E. and Holo,H., Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A., *Microbiology,* **143**, 2287-2294(1997).

10) Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi,S., Doi,K., Ohmomo,S. and Ogata, S., Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (2),247-253(2001).

11) de Vos, W.M.,Kuipers, O.P., van der Meer, J.R. and Siezen, R.J., Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria., *Mol.Microbiol.*, **17**, 427-37 (1995).

12) Sahl, H.G. and Bierbaum, G., Lantibiotics ; biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria., *Annu .Rev .Microbiol.*, **52**, 41-79 (1998).

13) Delves-Broughton, J., Blackburn, P ., Evans, R.J., Hugenholtz, J., Applications of the bacteriocin, nisin., *Antonie van Leeuwenhoek,* **69**, 193-202(1996).

14) 加藤丈雄, 乳酸菌バクテリオシンを使った"無菌・無塩味噌"への挑戦,蛋白質核酸酵素, **45**, 4,631-634 (2000).

15) 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).

16) Mori, K., Yamazaki, K., Ishiyama,T. Katsumata, M., Kobayashi, K., Kawai, Y. Inoue, N. and Shinao,H., Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. ,*Int .J. Syst . Bacteriol.*, **47**, 54-57(1997).

17) 森地敏樹他, 生物の保存法, 根井外喜男編,（東京大学出版,東京）,78 (1972).

18) 斉藤忠夫,伊藤敞敏, 抗菌性ペプチド：乳酸菌の生産するバクテリオシンの特徴とその利用, 乳業技術, **47**, 90-100(1997).

19) Ohmomo, S., Kobayashi, M., Yajima, M., Suyanandana, P., Budaka , P. and Somchai, P., Screening of Thermophilic Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins in the Tropics, *JARQ*, **33**, 125-131(1999).

20) Kawamoto, S., Shima,J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibatou, J., Horikoshi, N., Takeshita, K. and Sameshima, T., Biochemical and genetic characterization of Mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393,*Appl. Environ. Microbiol.*, in submition.(2001).

21) 恩田匠, 味噌醸造に存在するバクテリオシン産生乳酸球菌,醸協, **96**, 174-181(2001).

22) 百瀬洋夫,青木恵,武藤円,篠田律子, 鮒すしより分離した乳酸菌,実践女子大学生活科学部紀要, **36**, 46-49 (1999).

23) 百瀬洋夫,鎌尾敦子, 生酛系酒母より分離した球状乳酸菌,醸協, 88, 76-80(1993).