

平成30年6月20日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07460

研究課題名(和文) 抗菌ペプチド「ナisin」とエタノールを併用した食品保存技術とその作用機構解析

研究課題名(英文) A food preservation technology and the action mechanism analysis using ethanol with an antibacterial peptide "nisin"

研究代表者

川井 泰 (KAWAI, Yasushi)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00261496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食品添加物であるナisin(乳酸菌由来の抗菌ペプチド)が単独では抗菌効果の無い大腸菌に対して、エタノールとの併用により高い殺菌相乗効果を示すことを明らかにした。また、エタノール中でナisinが速やかに大腸菌に付着すること、4℃下で本溶液の抗菌活性が長期間で維持されることを見出した。さらに、エタノール単独、ナisin単独では抗菌効果を示さなかったグラム陽性の乳酸菌および食肉表面菌に対してもエタノール・ナisin溶液に有用な抗菌効果が認められた。

以上の結果から、エタノール・ナisin溶液は、その簡便性から食肉、調理器具、さらには医療機材等の低コストで有用な抗菌剤としての利用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that a food additive nisin, an antibacterial peptide produced by lactic acid bacteria (LAB), has high antibacterial synergy effects by combination with ethanol to *Escherichia coli* resisting to nisin alone. And it was found that nisin immediately attached to the cells of *Escherichia coli* in ethanol and the antibacterial activity was maintained at 4℃ in a long term. In addition, the ethanol-nisin solution exerts antibacterial effects to edible meat surface bacteria and gram-positive LAB that did not inhibited by each 25% ethanol and nisin alone.

These results indicate that the ethanol-nisin solution is available as a low-cost useful antibacterial agent by the handiness to such edible meats, kitchen utensils, and medical equipment.

研究分野：食品微生物学

キーワード：抗菌ペプチド エタノール ナisin 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

ナイシンはチーズ製造用乳酸菌 *Lactococcus lactis* により生産されるバクテリオシン (抗菌ペプチド) であり、我が国では 2009 年から食品添加物として使用されている。しかしながら、中性 pH 域では溶解性の低下から、活性が大幅に減少することが知られていた。そこで当研究室では、中性 pH の各種溶媒中におけるナイシンの活性低下抑制を網羅的に調べた結果、エタノールとの併用が効果的であることを見出した。

2. 研究の目的

これまでの検討により、本来はグラム陰性菌に抗菌活性を示さないナイシンが、エタノールを溶媒とした際に大腸菌 (*Escherichia coli*) に対して高い相乗抗菌効果を示すことを見出した。

(1) そこで本研究では、エタノール・ナイシン溶液の大腸菌に対する作用機構の一端について解明することを目的として、はじめに大腸菌に対するナイシン溶液の浸漬試験、付着性試験、および回収試験を行った。

(2) 次に、低コストで有用な抗菌スプレーおよび浸漬剤の開発を目指し、エタノール・ナイシン溶液の食肉表面菌に対する抗菌効果について検討を行った。

(3) 我々人類と太古から深い関わりをもつグラム陽性菌の乳酸菌は様々な発酵食品に利用されているが、一部の食品においては汚染原因菌でもある。そこで、ナイシンを生産する (ナイシン耐性の) *Lc. lactis* NBRC12007、およびバクテリオシン生産株を含む乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* に対するエタノール・ナイシン溶液の抗菌効果について検討を行った。

(4) 最後に、本エタノール・ナイシン溶液の上市に向けて、製剤化時の有効活性維持期間 (保存性) について検討を試みた。

3. 研究の方法

(1) 浸漬、付着性、および回収試験

大腸菌 (*E. coli* JM109) をナイシン溶液 (2mg/40ml)、20%エタノール、および 20%エタノール・ナイシン溶液 (2mg/40ml、1.25ppm) に 0、2、および 4 時間で同時または時間差で感作 (浸漬) 後、生菌数測定による相乗抗菌効果を検証した。また、走査型電子顕微鏡により同感作菌体の表層を観察した。

次いで、大腸菌 (*E. coli* JM109、BL21) に各濃度のエタノール・ナイシン溶液を感作させ、経時的に生菌数を測定した。また 20%~80%のエタノール・ナイシン溶液を各大腸菌に感作した後、得た上清中のナイシン残存活性値から、ナイシンの菌体推定付着率と回収率をそれぞれ算出した。なお、活性値は、指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^T を用いた寒天拡散

法により測定した。

(2) 市販食肉への噴射および浸漬試験

約 2cm×3cm にカットした市販食肉 (牛、豚、および鶏) に 70%~80%エタノール・ナイシン溶液 (1.25ppm) を噴射し、噴射前後の生菌数を測定した (噴射試験)。また、食肉片 (鶏ささみ肉) を 20%~80%エタノール・ナイシン溶液に浸漬し、経時的に食肉表層の残存生菌数を測定した (浸漬試験)。

(3) グラム陽性菌 (乳酸菌) に対する浸漬および付着性試験

Lc. lactis NBRC12007 (ナイシン生産・耐性)、ヒト腸管由来乳酸菌 *Lb. gasseri* LA39、LA158、LA327 (バクテリオシン生産株) および *Lb. gasseri* JCM 1131^T (バクテリオシン非生産株) の各供試菌に 20~30%のエタノール・ナイシン溶液を感作後、それぞれの生菌数を経時的に測定した。また、20%エタノール・ナイシン溶液を感作した菌体上清の残存活性値からナイシンの各菌体への推定付着量を算出した。

(4) エタノール・ナイシン溶液の保存性試験

各濃度のエタノール・ナイシン溶液を 4℃または 37℃下で遮光の有り・無し conditions で保存し、経時的に残存活性値を測定した。

4. 研究成果

(1) 浸漬、付着性、および回収試験

大腸菌 (*E. coli* JM109) に対する 20%エタノール・ナイシン溶液の相乗効果試験により、菌体に対して先にエタノールが作用することによりナイシンは抗菌効果を発揮することが明らかになった。また、走査型電子顕微鏡観察により感作大腸菌 JM109 の表面に損傷が確認できたが、ナイシン添加の有無における差は認められず、ナイシンは損傷した菌体の内部に入り込み、細胞膜上に孔を形成して殺菌効果を高めていることが示唆された (図 1)。

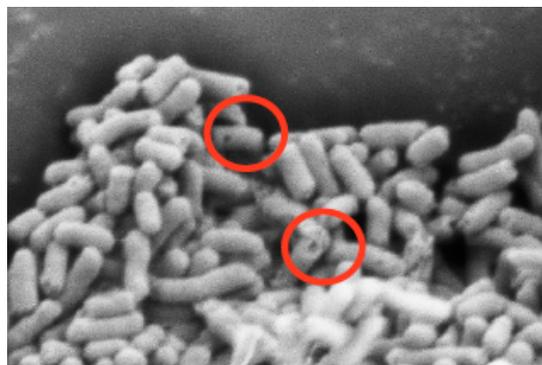


図 1 20%エタノール・ナイシン溶液を感作した *E. coli* JM109 の電子顕微鏡観察

大腸菌 (*E. coli* JM109、BL21) に対する浸漬試験では、35%以上のエタノール・

ナイシン溶液により両大腸菌は瞬時に死滅した。また、エタノール・ナイシン溶液は各単独よりも高い抗菌効果を示し、相乗効果が再確認された。付着性試験では、JM109 に対して 58%濃度までナイシンは付着するが、60%以上では付着せず、BL21 では緩やかに菌体付着率が低下することが示された (図 2)。また、ナイシン感作菌体からのナイシン回収試験では、JM109 の回収率は最大で 4.3%に留まり、BL21 では僅か 1.5%の低い値を示した。以上の結果より、ナイシンは瞬時に大腸菌へ付着し、一度付着すると菌体から遊離せずに、抗菌作用を発揮すると考えられた。

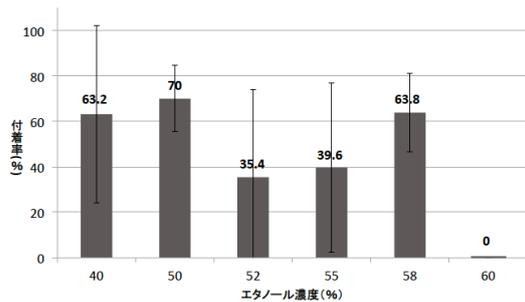


図 2 各濃度エタノール中におけるナイシンの *E. coli* JM109 への推定付着率

(2) 市販食肉への噴射および浸漬試験

市販食肉(牛、豚、および鶏)への噴射試験により、エタノール単独では抗菌効果が認められなかったが、ナイシンの添加により各食肉に対して高い抗菌効果が観察された (図 3)。食肉片 (鶏ささみ肉) を用いた浸漬試験では、70%、80%エタノール単独の 30 秒感作でも、食肉表面菌の減少率は 90%に達しなかったが、同濃度のエタノールにナイシンを添加することにより 100%の減少率が得られた。以上の結果から、エタノール・ナイシン溶液は食肉表面菌に対して高い抗菌作用を示すことが明らかとなり、その簡便性から食肉、調理器具、さらには医療機材等の抗菌剤としての利用性が期待された。

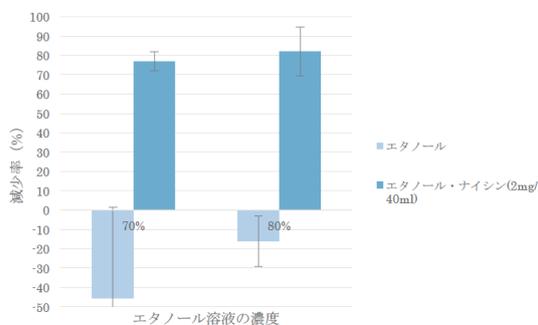


図 3 70%、80%エタノール、および 70%、80%エタノール・ナイシンを鶏ささみ肉に噴射した際の表面菌減少率

(3) グラム陽性菌 (乳酸菌) に対する浸漬および付着性試験

各供試乳酸菌は、エタノール単独およびナイシン単独では抗菌効果が得られなかったが、25%以下のエタノール・ナイシン溶液の感作により高い抗菌効果が認められた (図 4)。また、感作直後からナイシンの高い菌体付着性が確認されたことから、瞬時に付着したナイシンとエタノールが相乗効果を発揮するものと考えられた。

以上の結果より、エタノール・ナイシン溶液は大腸菌だけでなく乳酸菌を含む多くのグラム陽性菌に対しても有用であると考えられ、食品汚染の防止に向けた幅広い利用性が期待される。

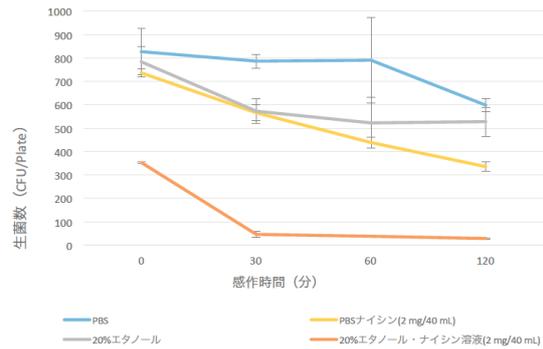


図 4 PBS、PBS・ナイシン溶液、20%エタノール、および 20%エタノール・ナイシン溶液を用いた浸漬試験における *Lb. gasseri* LA158 の生菌数変化

(4) エタノール・ナイシン溶液の保存性試験

各濃度のエタノール・ナイシン溶液の保存性について検討したところ、4°C、遮光有り条件下の高濃度 (70、80%) エタノール・ナイシン溶液で最も抗菌活性が維持された (図 5)。本結果から、市販時には低温流通にて、また直前に別添ナイシンを高濃度 (70、80%) エタノールに溶解して使用する形態が望ましいと考えられた。

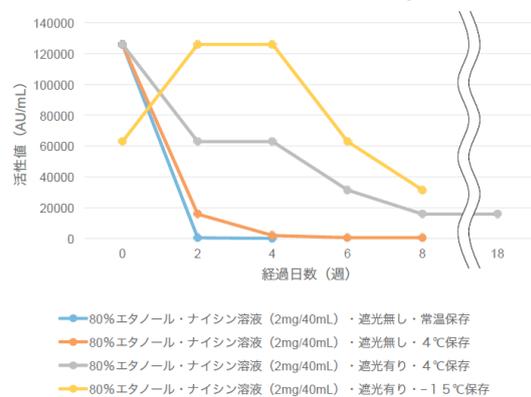


図 5 常温、4°C、-15°C 保存、および遮光有り・無しの条件下における 80%エタノール・ナイシン溶液 (2 mg/40 mL) の保存性試験 (活性値の経時的推移)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Genki Kasuga, Fumika Togashi, Maiko Abe, Masaru Tanaka, Kensuke Arakawa, Yasushi Kawai, Taku Miyamoto, and Tetsuya Masuda. Development of an MRS broth-based complete food-grade medium for *Lactobacillus gasseri* cultivation using food-grade yeast extract and bacteriocin produced by the bacteria. *Milk Science*, **66(3)**, 195-204, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 山戸泰成、川井 泰 他、エタノールとナイシンを併用した乳酸菌に対する相乗抗菌効果、日本畜産学会第 124 回大会、2018
- ② 山戸泰成、川井 泰 他、エタノールとナイシンの併用による食肉表面菌への抗菌効果、日本畜産学会第 123 回大会、2017
- ③ 山戸泰成、川井 泰 他、エタノールとナイシンの併用による大腸菌に対する抗菌効果とその作用機構、2017 年度酪農科学シンポジウム、2017
- ④ 山戸泰成、川井 泰 他、エタノールとナイシンの併用による大腸菌に対する抗菌効果とその作用機構、日本畜産学会第 122 回大会、2017
- ⑤ 川井 泰 他、エタノール/ナイシン溶液の大腸菌に対する作用機構解析、日本畜産学会第 121 回大会、2016

〔図書〕(計 1 件)

- ① 川井 泰 他、朝倉書店、ヨーグルトの事典、2016、243-249

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：除菌剤、除菌方法及び除菌キット
発明者：川井 泰、増田哲也
権利者：日本大学
種類：特許
番号：特許願 2017-109215
出願年月日：平成 29 年 6 月 1 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井 泰 (KAWAI, Yasushi)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00261496