

発酵豆乳に含まれる大豆たん白質由来抗菌ペプチドの特性解析

荒川健佑*・福留香菜子・豊川直樹・大森葉子・宮本 拓

岡山大学大学院環境生命科学研究科農生命科学専攻 動物機能開発学講座

Search for Antibacterial Peptides Released from Soy Proteins in Fermented Soymilk

Kensuke ARAKAWA*, Kanako FUKUDOME, Naoki TOYOKAWA,
Yoko OMORI and Taku MIYAMOTO

Department of Animal Science, Division of Agricultural and Life Science, Graduate School of
Environmental and Life Science, Okayama University, Okayama 700-8530

ABSTRACT

Some antibacterial peptides released from milk proteins by cell-envelope proteinases (CEPs) of lactic acid bacteria have been already reported, but not yet from soy proteins. In this study, we aimed to search antibacterial peptides in soymilk fermented by *Lactobacillus helveticus* with various CEPs. Among 8 tested strains (nonbacteriocin producers) of *Lb. helveticus*, AK1244 and AK1245 were selected with antibacterial activity against *Listeria monocytogenes* VTU206 in cell-free supernatant (CFS) of the fermented soymilk. The activity was shown only at pH 4.5 or under. An optimal temperature of cultivation of both strains to produce antibacterial substances was 37°C, not 25, 30 and 42°C. Strain AK1244 produced the antibacterial substances during the stationary phase, whereas strain AK1245 did during the exponential and stationary phases. The antibacterial activity of the AK1244- and the AK1245-CFS was stable for heating. The activity of 4x CFS was comparatively resistant to enzymatic treatments using catalase and some proteinases, but α -chymotrypsin decreased the activity; suggesting that the CFS would include antibacterial short peptides in addition to nonproteinaceous antibacterial components such as lactic acid. The AK1244- and the AK1245-CFS had antibacterial activity against *Escherichia coli* (1 strain), *Enterococcus* sp. bacteria (2 strains) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2 strains) as well as *Lis. monocytogenes* VTU206; whereas not against the other tested 14 strains of lactic acid bacteria. To separate antibacterial peptides from the CFS including the other

*〒700-8530 岡山市北区津島中1-1-1

antibacterial substances such as lactic acid, strain AK1245 was incubated with 5% (w/v) soy proteins, not soymilk, without fermentation (without production of lactic acid). 4x CFS of the suspension was analysed using C18-RP-HPLC, and then an antibacterial fraction which would include the antibacterial peptides was separated; but the antibacterial peptides have not been purified yet. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 204-212, 2015.

Key words : antibacterial peptide, fermented soymilk, soy protein, *Lactobacillus helveticus*, cell-envelope proteinase

近年、食生活の質的向上に伴い、食の安全・安心を希求する消費者が増加し、合成添加物の使用が敬遠される傾向にある。そのような背景の中で、天然由来の抗菌物質（バイオプリザパティブ）を利用した食品保存法である「バイオプリザベーション」が注目を集めている¹⁾。有用なバイオプリザパティブの1つには、乳酸菌の作り出す抗菌物質が挙げられ、特に、風味にほとんど影響を与えないほど微量で高い抗菌活性を有し、体内の消化酵素で容易に分解・代謝される「抗菌ペプチド」の有効活用が期待されている。乳酸菌の作り出す抗菌ペプチドは大きく分けて2種類存在し、1つはナイシンAに代表されるバクテリオシンである²⁾。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*によって産生されるナイシンAは、世界60ヶ国以上で食品保存料として広く利用され、日本においても2009年に食品添加物として新規指定されている。もう一方は、乳たん白質をペプシンやトリプシン等のプロテアーゼによって加水分解して生ずる抗菌ペプチドであり、これまでに10種以上の存在が知られている³⁾。乳たん白質由来の抗菌ペプチドの中には、菌体外プロテアーゼ（cell-envelope proteinase, CEP）を有する乳酸菌と作用させることによって遊離するカゼイン由来の抗菌ペプチドも報告されている^{4,5)}。しかし、大豆たん白質から乳酸菌CEPの作用で遊離する抗菌ペプチドの存在はこれまでに知られていない。

乳酸菌を用いた発酵乳製造に当たっては、乳酸菌はまず、乳から窒素源を得るために、乳たん白質をCEPによってペプチドないし遊離アミノ酸まで分解する⁶⁾。その後、ペプチド／アミノ酸トランスポーターを用いてそれらを細胞内に吸収し、ペプチドは菌体内ペプチダーゼによって遊離アミノ酸まで分解され、資化される。発酵乳製造に用いられる乳酸菌のほとんどはCEPを1つしか持たないことが知られているが、古くよりチーズや加糖酸乳飲料の製造に用いられている *Lactobacillus helveticus* はPrtH系やPrtYといった複数

のCEPを有することが報告されている^{7,8)}。これまで、*Lb. helveticus*はその多様なCEPの保有から、抗菌ペプチドだけでなく、血圧降下ペプチドや抗変異原性ペプチド等の機能性ペプチドの生成に利用されている^{3,8)}。そこで本研究では、*Lb. helveticus*を用いて発酵豆乳を作製し、その培養上清に含まれる抗菌物質の特性解析および大豆たん白質由来の抗菌ペプチドの探索を行うことを目的とした。

材料と方法

使用菌株と培養条件

当研究室保有の*Lb. helveticus* 8菌株（JCM 1120^T, AK1239, AK1240, AK1241, AK1242, AK1243, AK1244およびAK1245；全てバクテリオシン非産生株）を供試菌として用いた（Table 1）。また、抗菌活性測定における指標菌として *Listeria monocytogenes* VTU206を用い、被検菌として *Escherichia coli* RB, 乳酸球菌6菌株および乳酸桿菌12菌株の計19菌株（Table 1）を用いた。*Lb. helveticus*を含む乳酸桿菌はMRS液体培地（Oxoid, Hampshire, UK）で、その他の細菌はTYLG液体培地⁹⁾にて前培養し、本試験に用いた。

*Lb. helveticus*が保有するCEP遺伝子の検出

Lb. helveticus 8菌株が保有するCEP遺伝子（*prtHa*, *prtHb*, *prth2*, *prth3*, *prth4*および*prtY*）を検出するために、各菌株をMRS寒天培地（Oxoid）上に塗抹培養し、形成したコロニーを鋳型にコロニーダイレクトPCRを行った。プライマーは既報のものと既知の配列から独自に作製したものを各CEP遺伝子に対して2-3ペアずつ用い、PCR条件はプライマーおよび増幅産物長に応じて設定した（詳細は示していない）。増幅産物のアガロース電気泳動および紫外光下での可視化は常法に則って行った。

発酵豆乳および発酵豆乳上清の調製

発酵豆乳は、滅菌処理（110℃, 20 min）した市販の無調整豆乳（紀文食品, 東京）に前培養した*Lb. helveticus*を2%（v/v）量接種し、37℃で0-120 h培養することで作製した。無菌発酵豆乳上清（cell-free supernatant, CFS）は、発酵豆乳を遠心分離（1,600 g, 20 min）し、上清を1-6 N HClおよび1-6 N NaOHでpH 3.0-9.5に調整後、無菌条件下でフィルターろ過（孔径 0.45 μm; Sartorius, Göttingen, Germany）することによって調製した。また、CFSを凍結乾燥後、蒸留水に溶解することで4倍濃縮CFS（4x CFS）を得た。

抗菌活性測定

CFSの抗菌活性測定は、*Lis. monocytogenes* VTU206を指標菌とした寒天平板拡散法にて行った¹⁰⁾。また、CFSの抗菌スペクトルは、VTU206株および被

検菌19菌株（Table 1）に対する抗菌活性測定によって調べた。指標菌および被検菌は、MRS寒天培地もしくは標準寒天培地（栄研化学, 東京）に混釈培養した。

生育性評価

発酵豆乳中での*Lb. helveticus*の生育性は、培養液pH、滴定酸度および生菌数を測定することにより評価した。生菌数は、滅菌生理食塩水で希釈した発酵豆乳をMRS寒天培地で混釈培養し、出現したコロニーを計数することで測定した。

抗菌活性に及ぼす加熱・酵素処理の影響

CFSを65, 75, 105および121℃で15 min加熱した後、抗菌活性測定を行うことにより、CFSに含まれる抗菌物質の耐熱性を調べた。また、CFSと4x CFSをカタラーゼおよび各種プロテアーゼ（ペプシン、トリプ

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strain	Source*
<i>Lactobacillus helveticus</i>	JCM 1120 ^T	JCM
	AK 1239	Our laboratory
	AK 1240	Our laboratory
	AK 1241	Our laboratory
	AK 1242	Our laboratory
	AK 1243	Our laboratory
	AK 1244	Our laboratory
	AK 1245	Our laboratory
<i>Listeria monocytogenes</i>	VTU 206	VTU
<i>Escherichia coli</i>	RB	Our laboratory
<i>Enterococcus faecalis</i>	TH15	Our laboratory
<i>Enterococcus faecium</i>	C210	Our laboratory
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	DH1	Our laboratory
	KM	Our laboratory
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM 5885	JCM
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2330M2	Our laboratory
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393 ^T	ATCC
	L-49	Our laboratory
	NIAI L-14	NIAI
	NIAI L-54	NIAI
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	7235	Our laboratory
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	1135	Our laboratory
<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM 1025	JCM
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25598	ATCC
	34143	Our laboratory
	34143S	Our laboratory
	301102	Our laboratory
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6214	Our laboratory

* ATCC = American Type Culture Collection; JCM = Japan Collection of Microorganisms; NIAI = National Institute of Animal Industry, Japan; VTU = Department of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture, University of Tokyo.

シン, α -キモトリプシンおよびプロテアーゼK) 処理することによって, CFSの抗菌活性が過酸化水素およびたん白質性の抗菌物質に起因するかどうかを調べた.

Lb. helveticusの作用で遊離する大豆たん白質由来ペプチド含有画分の調製

*Lb. helveticus*の作用で大豆たん白質から遊離するペプチドを含む画分を以下の通り調製した. まず, 5%(w/v) 大豆たん白質懸濁液に*Lb. helveticus*の菌液を10%(v/v) 量接種し, 37℃で24 h恒温保持後, 遠心分離(12,700 g, 3 min)によって上清を得た. 次に, 遠心上清を凍結乾燥後, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解することで4倍濃縮液を作製し, 無菌条件下でフィルターろ過 (孔径0.20 μ m; Sartorius) することによってペプチド含有画分とした.

HPLC

大豆たん白質由来ペプチド含有画分は逆相HPLCを用いて分離した. HPLCカラムにはCOSMOSIL 5C18-AR-300 (ナカライテスク, 京都) を35℃で用い, 移動相には蒸留水とアセトニトリルを用いて, 流速0.8 mL/secでリニアグラジエント溶出した. ペプチドの溶出は220 nmの波長で検出した.

結果と考察

Lb. helveticusが保有するCEP遺伝子の検出

供試菌*Lb. helveticus* 8菌株が保有するCEP遺伝子をPCR法にて調べたところ, Table 2に示す通り, 多様なCEP遺伝子の保有パターンが確認された. 本結果は, 既報¹⁰⁾ で示された*Lb. helveticus*のCEP遺伝子保有の多様性を支持するものであった.

Lb. helveticusを用いた発酵豆乳上清の抗菌活性測定

Lb. helveticus 8菌株を用いて発酵豆乳 (37℃, 120 h培養) を作製し, そのCFSの*Lis. monocytogenes* VTU206に対する抗菌活性を測定したところ, pH 7.0および9.5に調整したCFSではいずれにおいても活性は検出されなかったが, pH 4.5に調整したAK1241株, AK1244株およびAK1245株のCFSでは活性が見られた (Table 3). 抗菌阻止円の比較的大きかったAK1244株およびAK1245株を選抜して以降の試験に用いた.

発酵豆乳上清の抗菌活性に及ぼすpHおよび培養温度の影響

AK1244株およびAK1245株のCFS (37℃, 120 h培養) の抗菌活性に及ぼすpHの影響を調べたところ, いず

Table 2. Presence or absence of cell-envelope proteinase genes (*prtHs* and *prtY*) in 8 strains of *Lactobacillus helveticus* used in this study

CEP gene	<i>Lb. helveticus</i> strain							
	JCM 1120 ^T	AK1239	AK1240	AK1241	AK1242	AK1243	AK1244	AK1245
<i>prtHa</i>	—	—	—	—	+	±	—	—
<i>prtHb</i>	—	+	+	+	—	—	+	—
<i>prtH2</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
<i>prtH3</i>	+	—	—	—	—	+	—	—
<i>prtH4</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>prtY</i>	—	—	—	—	—	+	—	—

Table 3. Size of inhibitory zones (pore size: 6 mm) formed by cell-free supernatant (CFS) of soymilk fermented by *Lactobacillus helveticus* strains on the agar-well diffusion assay with *Listeria monocytogenes* VTU206

Solution pH*	Inhibitory zone (mm)							
	JCM 1120 ^T	AK1239	CFS of fermented soymilk with <i>Lb. helveticus</i>					
			AK1240	AK1241	AK1242	AK1243	AK1244	AK1245
4.5	—	—	—	7.5	—	—	8.2	8.4
7.0	—	—	—	—	—	—	—	—
9.5	—	—	—	—	—	—	—	—

*pH adjustment with 1-6N HCl and 1-6 N NaOH

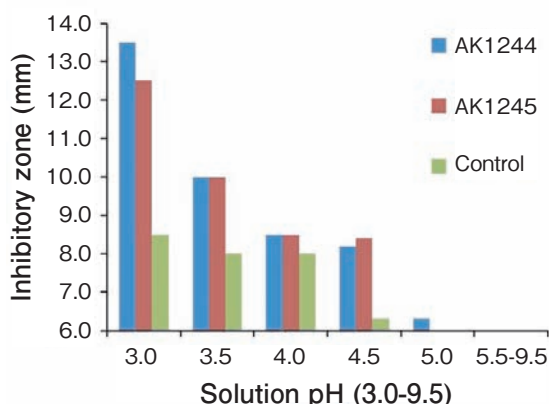


Fig. 1. Active pH range of cell-free supernatant (CFS) of soymilk fermented by *Lactobacillus helveticus* AK1244 and AK1245. The CFS was pH-adjusted to 3.0-9.5 with 1-6N HCl and 1-6 N NaOH. Data shown are average size of inhibitory zones (pore size: 6 mm) formed by the CFS on the agar-well diffusion assay with *Listeria monocytogenes* VTU206. 1.1 % (v/v) lactic acid was used as a control.

れもpH 4.5以下で明瞭な抗菌阻止円が確認された (Fig. 1)。一方、同様にpH調整した豆乳の遠心上清 (対照区) でもpH 4.0以下で抗菌阻止円が見られた。そこで、以降の試験では、対照区との差が明確なpH 4.5にCFSを調整して試験を行うこととした。

次に、CFSの抗菌活性に及ぼすAK1244株とAK1245株の培養温度 (120 h培養) の影響を調べたところ、いずれの菌株においても37℃培養時に25, 30および42℃培養時よりも高い抗菌活性が検出された (Fig. 2)。このことより、以降の試験では37℃で培養することとした。

発酵豆乳における*Lb. helveticus* AK1244およびAK1245の生育性と抗菌活性の経時変化

発酵豆乳作製時におけるAK1244株およびAK1245株の生育性は、発酵豆乳pH、滴定酸度および生菌数を経時的に測定することで評価した。また、CFSの抗菌活性を経時的に測定した。その結果、AK1244株のCFSでは、十分なpH低下 (pH<4.2) と酸生成 (滴定酸度>1.0%) が見られた培養開始48 h以降の定常期で抗菌活性が検出された (Fig. 3ac)。それに対して、AK1245株のCFSでは、十分なpH低下および酸度上昇が起きる前の対数増殖期である培養開始8 hで既に抗菌活性が検出された (Fig. 3bd)。両菌株ともに、培養開始96 hで抗菌阻止円は最大となった。本結果から、

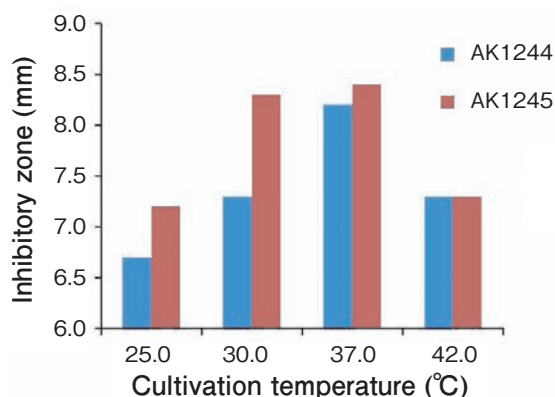


Fig. 2. Effect of cultivation temperature of *Lactobacillus helveticus* AK1244 and AK1245 in soymilk on antibacterial activity of the cell-free culture supernatant (CFS, pH 4.5). Data shown are average size of inhibitory zones (pore size: 6 mm) formed by the CFS on the agar-well diffusion assay with *Listeria monocytogenes* VTU206.

いずれのCFSにおいても乳酸による抗菌効果があると推察されたが、AK1245株のCFSでは十分に乳酸生成される前から抗菌活性が検出されたことから、少なくともAK1245株の発酵豆乳には乳酸以外の抗菌物質が生成されていることが示唆された。

発酵豆乳上清の抗菌活性に及ぼす加熱および酵素処理の影響

AK1244株およびAK1245株のCFS (120 h培養) の抗菌活性に及ぼす加熱の影響を調べたところ、65, 75, 105ないし121℃で15 minの加熱に対して両CFSの抗菌活性は安定していた (Table 4)。本結果から、CFSに含まれる抗菌物質は耐熱性を有していることが示された。

また、AK1244株とAK1245株のCFS (120 h培養) の抗菌活性に与える酵素処理の影響を調べたところ、両CFSの抗菌活性は各種プロテアーゼ (ペプシン、トリプシン、 α -キモトリプシンおよびプロテアーゼK) によって失活が確認された (Table 5)。AK1244株のCFSはカタラーゼに対して抵抗性を有していたが、AK1245株のCFSではカタラーゼの作用によって抗菌阻止円が喪失した。しかし、AK1245株のCFSは対照区 (酵素処理無し) の阻止円が元々小さかったため、両CFSともに4倍濃縮液 (4x CFS) で同様の試験を行った。その結果、両CFSともにカタラーゼに対して抵抗

性を有し、いくつかのプロテアーゼに対しても抵抗性を示した。しかし、両CFSともに α -キモトリプシン等の処理によって抗菌阻止円の縮小が確認された。このことから、両CFSともに乳酸によるものと思われる抗

菌効果があると推察されたが、ペプチド性（特に短鎖と思われる）の抗菌物質も含まれていることが示唆された。

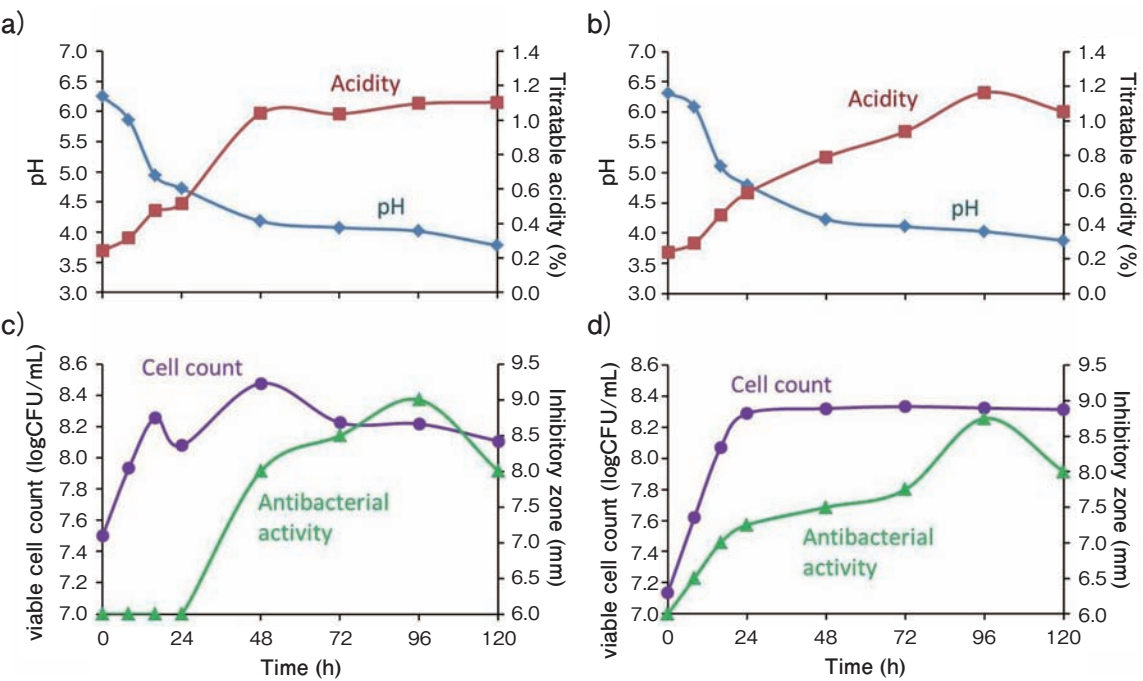


Fig. 3. Change in cell growth (pH, titratable acidity and viable cell count) and production of antibacterial substances during soy milk fermentation (0-120 h) by *Lactobacillus helveticus* AK1244 (a, c) and AK1245 (b, d). The production of antibacterial substances is shown by antibacterial activity of cell-free supernatant (CFS, pH 4.5) of the fermented soy milk. The antibacterial activity was measured as size of inhibitory zones (pore size: 6 mm) formed by the CFS on the agar-well diffusion assay with *Listeria monocytogenes* VTU206.

Table 4. Effect of heat treatment on antibacterial activity of cell-free supernatant (CFS, pH 4.5) of soy milk fermented by *Lactobacillus helveticus* AK1244 and AK1245. Data shown are average size of inhibitory zones (pore size: 6 mm) formed by the CFS on the agar-well diffusion assay with *Listeria monocytogenes* VTU206

Heating condition	Inhibitory zone (mm)	
	CFS of fermented soy milk with <i>Lb. helveticus</i>	
	AK1244	AK1245
Control	8.2	8.4
65°C, 15 min	7.8	8.0
75°C, 15 min	8.0	8.0
105°C, 15 min	8.0	7.8
121°C, 15 min	8.0	7.5

Table 5. Effect of enzymatic treatment on antibacterial activity of cell-free supernatant (CFS, pH 4.5) and 4x CFS (concentrated with freeze-drying, pH 4.5) of soymilk fermented by *Lactobacillus helveticus* AK1244 and AK1245. Data shown are average size of inhibitory zones (pore size: 6 mm) formed by the CFS and the 4x CFS on the agar-well diffusion assay with *Listeria monocytogenes* VTU206. The CFS and the 4x CFS without any enzymatic treatment but with incubation and inactivation processes were used as each control

Enzyme	Inhibitory zone (mm)			
	CFS		4x CFS	
	AK1244	AK1245	AK1244	AK1245
Control	8.0	6.5	12.5	9.8
Catalase	7.8	—	12.0	9.8
Pepsin	—	—	12.5	8.0
Trypsin	—	—	11.3	9.0
α -Chymotrypsin	—	—	10.0	8.0
Proteinase K	—	—	11.5	8.8

発酵豆乳上清の抗菌スペクトル測定

AK1244株 およびAK1245株 のCFS (120 h培養) の抗菌スペクトルを測定したところ, *Lis. monocytogenes* VTU206だけでなく, *E. coli* RB, *Enterococcus*属細菌2菌株および*Lc. lactis* subsp. *lactis* 2菌株に対して抗菌活性を有することが明らかとなった (Table 6). 一方, その他の乳酸菌 (乳酸球菌2菌株および全乳酸桿菌12菌株) に対しては抗菌活性を示さなかった. 食中毒細菌およびいくつかの乳酸球菌に対してのみ抗菌効果を示した本結果は, 両菌株を用いた発酵豆乳およびCFSがバイオプリザバティブとして有用であることを示唆していた.

*Lb. helveticus*の作用で遊離する大豆たん白質由来ペプチド含有画分の分離

これまでの結果より, AK1244株とAK1245株のCFSに抗菌活性を有する乳酸が含まれることが推察された. そこで, 乳酸の影響を排除するために, 大豆たん白質懸濁液にAK1244株およびAK1245株をそれぞれ接種して恒温保持 (24 h, 37°C) することで, 発酵 (乳酸生成) させずに抗菌活性を有する遠心上清を得た. そして, 4倍濃縮した遠心上清を逆相HPLCに供して分画し, 各画分の抗菌活性測定を行った (Fig. 4: AK1245株の結果のみ表示). その結果, 抗菌活性を示す画分を得たが, その精製および構造解析には至らなかった.

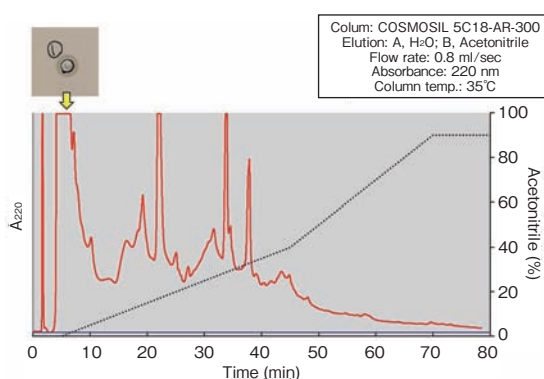


Fig. 4. Separation of an antibacterial fraction from cell-free supernatant (4x) of suspension of *Lactobacillus helveticus* AK1245 in 5% (w/v) soy proteins. The suspension was incubated for 24 h at 37°C.

Table 6. Antibacterial spectrum of cell-free supernatant (CFS, pH 4.5) of soymilk fermented by *Lactobacillus helveticus* AK1244 and AK1245. Data shown are average size of Inhibitory zones (pore size: 6 mm) formed by the CFS on the agar-well diffusion assay with 20 tested bacterial strains.

Tested strain	Inhibitory zone (mm)	
	CFS of AK1244	CFS of AK1245
<i>Lis. monocytogenes</i> VTU206	8.2	8.4
<i>E. coli</i> RB	6.7	6.4
<i>Ent. faecalis</i> TH15	8.3	8.0
<i>Ent. faecium</i> C210	8.5	7.3
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DH1	8.3	8.5
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KM	9.0	8.0
<i>Ped. pentosaceus</i> JCM 5885	—	—
<i>Str. thermophilus</i> 2330M2	—	—
<i>Lb. casei</i> ATCC 393 ^T	—	—
<i>Lb. casei</i> L-49	—	—
<i>Lb. casei</i> NIAI L-14	—	—
<i>Lb. casei</i> NIAI L-54	—	—
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 7235	—	—
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1135	—	—
<i>Lb. gasseri</i> JCM 1025	—	—
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25598	—	—
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 34143	—	—
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 34143S	—	—
<i>Lb. plantarum</i> 301102	—	—
<i>Lb. plantarum</i> 6214	—	—

要 約

近年、消費者の安全・安心志向の高まりから、天然由来の抗菌物質であるバイオプリザバティブの利用が期待されている。そこで本研究では、新たなバイオプリザバティブとして発酵豆乳中に含まれる抗菌物質、特に乳酸菌の菌体外プロテアーゼの作用によって遊離する大豆ペプチド由来の抗菌ペプチドを探索することとした。まず、当研究室保有の*Lactobacillus helveticus* 8菌株（バクテリオシン非産生株）が多様なCEP遺伝子パターンを保有することを確認した。次いで、その*Lb. helveticus* 8菌株を用いて発酵豆乳を作製し、その培養上清（CFS）の抗菌活性を*Listeria monocytogenes* VTU206を指標菌として測定した。その結果、pH 4.5に調整した3菌株のCFSで抗菌活性を検出し、うち比較的活性の高かった2菌株（AK1244株とAK1245株）を選抜した。選抜2菌株のCFSはともにpH 4.5以下で抗菌活性を呈し、37℃で96 h培養時に最も高い抗菌活性を示した。また、両CFSの抗菌活性本体は耐熱性を有し、カタラーゼおよびいくつかのプロテアーゼに対して抵抗性を示した。しかし一方で、 α -キモトリプシン等のプロテアーゼによって活性の減退が認められた。本結果は、両菌株のCFSの抗菌活性の一部が短鎖のペプチドに由来することを示唆していた。また、AK1244株およびAK1245株のCFSは、*Lis. monocytogenes*だけでなく、*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*および*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*に対しても抗菌活性を有することが明らかとなった。さらに、乳酸の影響を排除するために、大豆たん白質懸濁液に両菌株をそれぞれ接種し、発酵させずに恒温保持した懸濁液上清を逆相HPLCに供したところ、抗菌ペプチドと思われる活性画分を得た。本活性画分の精製および構造解析は現在進行中である。以上のことから、一部の*Lb. helveticus*を用いた発酵豆乳およびそのCFSは、将来的なバイオプリザバティブとしての利用の可能性を有していると考えられた。

文 献

- 1) Ray B (1992): The need for biopreservation. In: Food Biopreservatives of Microbial Origin. Ray B and Daeschel M, eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 1-23.
- 2) Cotter PD, Hill C and Ross RP (2005): Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* **3**, 777-788.
- 3) Abd El-Salam MH and El-Shibiny S (2013): Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare and yak milks and milk products. *Food Rev Int.* **29**, 1-23.
- 4) Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, Fox PF, Monnet V and Gobetti M (2003): Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 5297-5305.
- 5) Hayes M, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C and Stanton C (2006): Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 2260-2264.
- 6) Savijoki K, Ingmer H and Varmanen P (2006): Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **71**, 394-406.
- 7) Smeianov VV, Wechter P, Broadbent JR, Hughes JE, Rodríguez BT, Christensen TK, Ardö Y and Steele JL (2007): Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 2661-2672.
- 8) Sadat-Mekmene L, Genay M, Atlan D, Lortal S and Gagnaire V (2011): Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int J Food Microbiol.* **146**, 1-13.
- 9) Mok JS, Miyamoto T, Kataoka K (1998): Properties of antibacterial substance produced by wild *Lactobacillus* strain IMC-1 from Inner Mongolian cheese. *Anim Sci Technol.* **69**, 768-778.
- 10) Broadbent JR, Cai H, Larsen RL, Hughes JE, Welker DL, De Carvalho VG, Tompkins TA, Ardö Y, Vogensen F, De Lorentiis A, Gatti M, Neviani E and Steele JL (2011): Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J Dairy Sci.* **94**, 4313-4328.