

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3472804号
(P3472804)

(45)発行日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(24)登録日 平成15年9月19日(2003.9.19)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C 0 7 K 14/315	Z N A	C 0 7 K 14/315 Z N A
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20 A
		E
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02 A
// A 2 3 L 3/3526	5 0 1	A 2 3 L 3/3526 5 0 1

請求項の数3(全8頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-152586(P2000-152586)
(22)出願日 平成12年5月24日(2000.5.24)
(65)公開番号 特開2001-335597(P2001-335597A)
(43)公開日 平成13年12月4日(2001.12.4)
審査請求日 平成12年5月24日(2000.5.24)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年3月5日社団法人日本農芸化学会発行、「日本農芸化学会誌 74巻臨時増刊号」に発表。

微生物の受託番号 F E R M B P - 7 1 6 2

(73)特許権者 501145295
独立行政法人食品総合研究所
茨城県つくば市観音台2丁目1番地12
(72)発明者 島 純
茨城県つくば市吾妻1丁目1番地1号
603号棟709号
(72)発明者 川本 伸一
茨城県つくば市松代4丁目25番地401号
棟405号
(72)発明者 森 勝美
岩手県盛岡市下厨川字赤平4番地 東北
農業試験場宿舎C48
(74)代理人 100074077
弁理士 久保田 藤郎 (外1名)
審査官 鈴木 恵理子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規バクテリオシン及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の性質を有する新規バクテリオシン、エンテロシンSE-K4。

(a)分子量：約5kDa(SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による)

(b)エンテロコッカス・ファセウムに対し抗菌活性を有する

(c)耐熱性を有する

(d)食中毒菌に対し抗菌作用がある

(e)N末端アミノ酸配列：配列表の配列番号1記載の配列を有する

【請求項2】 エンテロコッカス・フェカリスK-4株(FERM BP-7162)を培養し、培養物から請求項1記載の新規バクテリオシン、エンテロシンSE-K4を採取することを特徴とする新規バクテリオシン、

エンテロシンSE-K4の製造方法。

【請求項3】 請求項1記載の新規バクテリオシン、エンテロシンSE-K4の生産能を有するエンテロコッカス・フェカリスK-4株(FERM BP-7162)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規バクテリオシンであるエンテロシンSE-K4、該バクテリオシンの製造方法に関し、詳しくは抗菌性ペプチドである新規バクテリオシンとその製造方法に関する。この抗菌性ペプチドは、食品保存料等として有用である。

【0002】

【従来の技術】食品の腐敗や品質の低下等を防止する目的で、食品保存料が種々の食品に添加されている。かか

る食品保存料としては、これまでは主に化学的に合成された食品保存料が用いられている。しかしながら、化学的に合成された食品保存料の大量摂取は、人間にとって健康面から好ましくない。その原因の1つは、化学合成保存料が人体内で容易に分解されないことである。このような問題を解決するためには、人体内で容易に分解される抗菌性物質の開発が必要である。ところで、乳酸菌は、古来より醤油、味噌、漬け物、日本酒等の様々な発酵食品や発酵飲料の生産に利用されている有用な微生物の1つである。乳酸菌を発酵食品等の製造過程で用いることにより、乳酸発酵が行われて産生された乳酸によって系のpHが低下したり、該乳酸菌が抗菌性物質を産生したりすることで、製造過程及び製品中での雑菌等の生育を阻害することが可能となり、製品の腐敗や品質の低下を防ぐことができる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記したように、乳酸菌は、古くから食品及び食品加工に利用されており、安全性の面で心配がない。したがって、乳酸菌が生産する抗菌性物質は、化学的に合成された物質よりも安全性が高いと考えられる。本発明の目的は、乳酸菌に由来し、人体内で容易に分解される抗菌性ペプチドを開発することである。

【0004】各種細菌によって生産されるタンパク質性の抗菌性物質はバクテリオシンと称されている。本発明者らは、発酵食品やサイレージ等に存在する乳酸菌を分離して、バクテリオシン生産能を有する菌株の探索を行った。その結果、抗菌性ペプチド生産能を有する乳酸菌の分離に成功し、本菌によって生産される抗菌性物質は、新規物質であることを確認して本発明を完成した。なお、本発明者らは、当該新規バクテリオシンをエンテロシンSE-K4と命名した。

【0005】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、下記の性質を有する新規バクテリオシン、エンテロシンSE-K4である。

- (a) 分子量：約5kDa (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による)
- (b) エンテロコッカス・ファセウムに対し抗菌活性を有する
- (c) 耐熱性を有する
- (d) 食中毒菌に対し抗菌作用がある
- (e) N末端アミノ酸配列：配列表の配列番号1記載の配列を有する

【0006】請求項2記載の本発明は、エンテロコッカス・フェカリスK-4株(FERMBP-7162)を培養し、培養物から請求項1記載の新規バクテリオシン、エンテロシンSE-K4を採取することを特徴とする新規バクテリオシン、エンテロシンSE-K4の製造方法である。請求項3記載の本発明は、請求項1記載の

新規バクテリオシン、エンテロシンSE-K4の生産能を有するエンテロコッカス・フェカリスK-4株(FERMBP-7162)である。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明者らは、タイ国において発酵食品及びサイレージを分離源として多数の乳酸菌を分離した。分離した乳酸菌から、エンテロコッカス・ファセウム(Enterococcus faecium)に対する抗菌活性を指標として、抗菌性物質生産能を有する乳酸菌を選択した。乳酸菌の分離は以下の方法で実施した。各種の発酵食品及びサイレージから採取した試料を0.5%の炭酸カルシウムを含むLactobacilli MRS培地(組成：プロテオースペプトン1%、牛肉エキス1%、酵母エキス0.5%、ブドウ糖2%、Tween 80 0.1%、クエン酸アンモニウム0.5%、硫酸マグネシウム0.01%、硫酸マンガン0.005%、リン酸ニカリウム0.2%、ディフコ社製)を用いて培養し、必要に応じて数回の継代培養を行った後、Lactobacilli MRS寒天培地(組成：上記の培地組成に寒天2%を添加したものに塗抹培養し、生じたコロニーから乳酸菌を採取した。

【0008】次に、このようにして分離した乳酸菌から、エンテロコッカス・ファセウムに対する抗菌活性を指標として、ペーパーディスク検定法(Hoover, D.G. & Harlander, S.K., In Bacteriocins of lactic acid bacteria, Academic Press 社刊、23-39、1993)によって抗菌性物質生産能を有する乳酸菌を選択した。選択した乳酸菌の菌学的性質を調べたところ、16SリボソームDNA(rDNA)の塩基配列の相同性の解析(Mori, K. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 47巻、54-57、1997)によりエンテロコッカス・フェカリスNCDO581株と99.5%の相同性を示したことが、DNA-DNAハイブリダイゼーション法(Ezaki, T. et al.: J. Clin. Microbiol., 26巻、1708-1713、1988)によりエンテロコッカス・フェカリスNCDO581株と70%以上のハイブリッドを形成し、他の菌株とは70%以下のハイブリッドしか形成しないこと、糖質の発酵性がエンテロコッカス・フェカリスNCDO581株の発酵性と一致したこと等の性質から、本菌はエンテロコッカス・フェカリスに属する菌株であることが分かった。しかし、16S rDNAにおいて100%のホモロジーを示さず、DNA-DNAハイブリダイゼーション法においても100%のハイブリッドを形成しなかったことから、公知菌とは明らかに異なる新規な菌株と認め、本菌をエンテロコッカス・フェカリスK-4株と命名した。本菌は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託されており、その寄託番号はFERMBP-7162である。

【0009】次に、エンテロコッカス・フェカリスK-4株をLactobacilli MRS培地(組成：前記の通り、ディフコ社製)を用いて所定の条件で培養し、抗菌性ペプチ

ドを生産するための最適条件について検討した。その結果を図1及び図2に示した。図1は、本菌の増殖の程度をOD₆₀₀で調べたものであり、37～45の範囲では培養温度による差はなく、いずれも培養5時間程で十分な生育が認められた。また、図2は、抗菌性ペプチドの生産量をエンテロコッカス・ファセウムに対する抗菌活性を指標としたアガーウェル法によって調べた結果を示しており、43～45という高温で培養することにより、多量の抗菌性ペプチドが生産されることが分かった。また、培養時間については、8～12時間で抗菌性ペプチドの生産量は最大値に達することが分かった。

【0010】抗菌性ペプチド、エンテロシンSE-K4の取得を目的として、本菌を大量に培養する場合は、培地としてTGE培地（組成：1リットルあたり牛肉抽出物（ディフコ社製）6g、トリプトン（ディフコ社製）10g、グルコース（和光純薬社製）2g）を用いることが好ましく、この培地を用いて43～45で嫌氣的に10～12時間培養する。

【0011】次に、培養物から目的とするバクテリオシンを採取し、精製する方法について説明する。エンテロコッカス・フェカリスK-4株の生産するバクテリオシンの分離、精製は常法によって行うことができるが、酸抽出法が好ましい方法である。図3はその1例を示したものである。すなわち、培養物にタンパク質分解酵素阻害剤であるフェニルメタンスルホニルフルオリド（PMSF）を最終濃度が1mMとなるように添加した後、pHを6に調整し、バクテリオシンを一旦、菌体に吸着させる。次いで、必要に応じて培養物の温度を4℃まで冷却して30分間攪拌したのち、遠心分離を行って上清を除去し、菌体を沈殿物として回収する。次に、沈殿物である菌体を緩衝液、例えば2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸（MES）（pH6）で1～5回、好ましくは2～3回洗浄する。

【0012】その後、洗浄した菌体を1M食塩と0.1%界面活性剤（例えばBrij-35、半井社製）を含む50mM MES緩衝液（pH2）50mLに懸濁し、必要に応じて懸濁液を4℃で1時間攪拌し、菌体に吸着しているバクテリオシンを遊離させる。次に、遠心分離を行ってバクテリオシンを含む上清を回収する。回収された上清を逆相シリカゲルカートリッジ（例えばSep-Pac C18、ミリポア社製）を用いてバクテリオシンを濃縮した後、例えば Sephasil Peptide C185 µST（ファルマシア社製）を用いた逆相カラムクロマトグラフィーで活性画分を分画する。該活性画分を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）で泳動すると、分子量約5kDaの単一バンドが検出された（図4A、B参照）。このことから抗菌性ペプチドは完全に精製されていることが確認された。さらに、この単一バンドを示すペプチドについて、アミノ酸シーケンサーを用いてN末端のアミノ酸を決定した（配列表の配列番号

1参照）。配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を既知のバクテリオシンのアミノ酸配列と比較した結果、新規な構造を有することが判明したので、この抗菌性ペプチドをエンテロシンSE-K4と命名した。

【0013】このエンテロシンSE-K4の抗菌スペクトルを調べた結果、エンテロコッカス・ファセウムの他に、食中毒の原因となるリステリア、モノサイトゲネス、クロストリジウム・ベージェリンキ及び醤油や味噌の製造過程で有害なバチルス・ズブチリスを含むグラム陽性菌に対しても生育阻害効果があることが判明した。また、エンテロシンSE-K4は、pH2～11という広い範囲で抗菌活性は安定で、特にpH6付近において強い抗菌活性を有しており、100℃で10分間加熱した後も約50%の活性を維持することから、熱安定性に優れている。

【0014】以上のように、エンテロシンSE-K4は、乳酸菌に由来し安全性が高く、食中毒菌に対しても抗菌作用があり、比較的耐熱性も高いことから、食品保存料として食品産業への応用が期待できる。

【0015】

【実施例】以下に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

実施例1

タイ国の発酵食品及びサイレージから採取した試料をLactobacilli MRS培地（組成：前記の通り、ディフコ社製）を用いて培養し、必要に応じて数回の継代培養を行った後、Lactobacilli MRS寒天培地（組成：上記の培地組成に寒天2%を添加したものに塗抹培養し、生じたコロニーから乳酸菌を採取した。

【0016】次に、このようにして分離した乳酸菌から、エンテロコッカス・ファセウムに対する抗菌活性を指標としてペーパーディスク検定法（Hoover, D.G. & Harlander, S.K., In Bacteriocins of lactic acid bacteria, Academic Press 社刊、23-39、1993）によって抗菌性物質生産能を有する乳酸菌を選択した。選択した乳酸菌の菌学的性質を調べたところ、16SrDNAの塩基配列の相同性の解析（Mori, K. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 47巻、54-57、1997）によりエンテロコッカス・フェカリスNCDO581株と99.5%の相同性を示したことが、DNA-DNAハイブリダイゼーション法（Ezaki, T. et al.: J. Clin. Microbiol., 26巻、1708-1713、1988）によりエンテロコッカス・フェカリスNCDO581株と70%以上のハイブリッドを形成し、他の菌株とは70%以下のハイブリッドしか形成しないこと、糖質の発酵性がエンテロコッカス・フェカリスNCDO581株の発酵性（バイオメリエクス社のAPI好クリップを使用）と一致したこと等の性質から、本菌はエンテロコッカス・フェカリスに属する菌株であることが分かった。

【0017】しかし、16SrDNAにおいて100

%のホモロジーを示さず、DNA-DNAハイブリダイゼーション法においても100%のハイブリッドを形成しなかったことから、公知菌とは明らかに異なる新規な菌株と認め、本菌をエンテロコッカス・フェカリスK-

4株と命名した。本菌の同定に関する知見を第1表に示す。

【0018】

【表1】第1表

16S rDNA の相同性	エンテロコッカス・フェカリス NCDO581=99.5%
DNA-DNA ハイブリダイゼーション	エンテロコッカス・フェカリス NCDO581=73.8% エンテロコッカス・ファセウム JCM5804=2.91% エンテロコッカス・アビウム NCDO2369=9.94%
糖類の発酵性 発酵性 (+)	グリセロール、リボース、ガラクトース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、ラムノース、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、N-アセチルグルコサミン、アミグダリン、7-フルクトシ、エスタリン、サリシン、セロビオース、マルトース、ラクトース、サッカロース、トレハロース、メチトース、アミドン、β-サンチビオース、D-ツラノース、D-ガラクトース、グルコネート、5-セト-グルコネート
発酵性 (-)	エリスリトール、D-アラビノース、L-アラビノース、D-キシロース、L-キシロース、アドニトール、β-メチル-キシロシド、スルチトール、L-ソルボース、メリビオース、イヌリン、キシリトール、D-リキノース、α-メチル-D-マンノシド、α-メチル-D-グルコシド、D-アラビノース、グリコ-ゲン、D-フコース、L-アラビノース、D-アラビトール、L-アラビトール、2-セト-グルコネート

【0019】実施例2

実施例1において単離したエンテロコッカス・フェカリスK-4株(FERMBP-7162)をLactobacilli MRS培地(組成:前記の通り、ディフコ社製)に接種し、37~45で所定時間培養し、本菌の生育状態並びに抗菌性ペプチドの生産性について調べた。結果を図1、2に示す。図1は培養温度を変化させた場合の本菌の増殖量をOD600で測定した結果を示しており、生育量は温度による影響を受けないことが分かる。また、図2は抗菌性ペプチドの活性をエンテロコッカス・ファセウムに対する抗菌活性を指標としたアガーウェル法によって調べた結果である。図から明らかのように、培養温度が高いときに抗菌活性が強く、43~45で培養したときに最大の生産量が得られることを示している。培養時間は、8~12時間程度が適当であることも分かった。図中、は37、は40、は43、は45での結果を表している。

【0020】実施例3

エンテロコッカス・フェカリスK-4株(FERMBP-7162)を、TGE培地(1Lあたり牛肉抽出物(ディフコ社製)6g、トリプトン(ディフコ社製)10g、ブドウ糖(和光純薬社製)2g含有)3Lに接種し、43で10時間培養し、大量の本菌を得た。得られた培養物にPMSFを最終濃度が1mMとなるように添加した後、培養液のpHを6に調整し、さらに培養液を4まで冷却し、30分間攪拌して生成した抗菌性物質を菌体に吸着させた。次に、遠心分離(10000x

g、20分間)を行って上清を除去し、抗菌性物質を吸着した菌体を沈殿物として回収した。この沈殿物を50mMのMES(pH6)で洗浄した。

【0021】次に、洗浄した菌体を1Mの食塩と0.1%の界面活性剤(商品名:Brij 35、半井社製)を含む50mM MES緩衝液(pH2)50mLに懸濁し、4に冷却して1時間攪拌した。このようにして、菌体から抗菌性物質を抽出した後、遠心分離(20000xg、25分間)を行い、該物質を含む上清を回収した。回収した上清を、Sep-Pak C18 カラム(アマシャム社製)で濃縮した後、Sephasil Peptide C185 μST(ファルマシア社製)を用いた逆相カラムクロマトグラフィーで活性画分を分画した。さらに、該活性画分をSDS-PAGE(ポリアクリルアミド濃度15%)で電気泳動し、分子量約5kDaの単一のバンドを得た。図4A、Bは、SDS-PAGEの泳動写真である。

【0022】図4から明らかのように、銀染色(A)及び活性染色(B)のいずれの場合においても、分子量約5kDaの単一バンドが検出された。この単一のバンドのアミノ酸配列を決定し、既知のバクテリオシンとのホモロジーを比較した結果、抗菌性ペプチドは新規な構造を有することが判明し、これをエンテロシンSE-K4と命名した。また、この抗菌性ペプチドの有する保存アミノ酸配列から、この抗菌性ペプチドはKlaenhammerの示したバクテリオシンの分類(Klaenhammer, T.R.: FEMS Microbiol. Rev., 12巻、39-86、1993)における低分子量・耐熱性クラス(クラスIIa)に属することも判明

した。さらに、アミノ酸シーケンサー（ヒューレットパッカード社製）を用いて、精製した抗菌性ペプチドのアミノ酸配列を決定した（配列表の配列番号1参照）。また、抗菌性ペプチドの各精製段階でのタンパク質濃度、

抗菌活性等の測定結果を第2表に示す。

【0023】

【表2】第2表

精製段階	体積 (mL)	抗菌活性 (AU/mL)	全活性 (AU)	タンパク質濃度 (mg/mL)	全タンパク質量 (mg)	比活性 (AU/mg)	回収率 (%)
培養上清	3000	133	399000	0.0523	156.9	2543	100
酸抽出後	50	8533	426650	0.1535	7.675	55590	107
HPLC (*)	2.08	68266	142198	0.0936	0.195	729221	36

(*) 逆相クロマトグラフィー後

【0024】実施例4

エンテロシンSE-K4を各種pHの緩衝液に溶解し、37で30分間保温した後、pHを6.0に戻し、pH安定性を調べた。結果を図5に示す。図から明らかのように、この抗菌性物質は、pH6のとき最大の活性を示し、pH3~11のときは60%以上の活性を保っている。このように、エンテロシンSE-K4は、広いpH範囲で安定性を有することが明らかとなった。

【0025】実施例5

精製したエンテロシンSE-K4の温度安定性を調べるため、この抗菌性物質をMES緩衝液(pH6.0)に溶解し、これを100に加熱した後の残存抗菌活性を測定した。図6は、その結果を示しており、100で10分間加熱した後も、約50%の抗菌活性を維持していることが分かった。

【0026】実施例6

エンテロシンSE-K4の各種微生物に対する抗菌効果を寒天スポット法(Van Reenen, C.A. et al.: J. Appl. Microbiol., 65巻、1131-1137、1998)により調べた。すなわち、被検菌に適した培地と培養条件を選定し、被検菌を含む寒天培地に、 $10 \sim 10^3$ AUの活性を有する精製エンテロシンSE-K4を直接スポットした。7mm以上の阻害斑を形成した場合に、感受性と評価した。測定結果と被検菌の培養条件を第3表に示す。

なお、試験に用いた培地の組成は以下の通りである。

【0027】LB培地：酵母エキス0.5%、トリプトン1%、食塩1%（ディフコ社製）

TYA培地：ブドウ糖4%、リン酸一カリウム0.05%、硫酸マグネシウム7水和物0.03%、硫酸鉄7水和物0.001%、酢酸アンモニウム0.3%、酵母エキス0.2%、トリプトン0.6%

MRS培地：プロテオースペプトン1%、牛肉エキス1%、酵母エキス0.5%、ブドウ糖2%、Tween 80 0.1%、クエン酸アンモニウム0.5%、硫酸マグネシウム0.01%、硫酸マンガン0.005%、リン酸二カリウム0.2%、寒天2%（ディフコ社製）

M17培地：トリプトン0.5%、ソイトン0.5%、肉消化物0.5%、酵母消化物0.25%、アスコルビン酸0.05%、硫酸マグネシウム0.025%、グリセロリン酸二ナトリウム1.9%、乳糖0.5%（ディフコ社製）

LSA培地：コロンビア血液基礎培地3.9%、エスクリン0.1%、クエン酸アンモニウム鉄0.05%、塩化リチウム0.15%（オキソイド社製）

NB培地：牛肉エキス0.3%、ペプトン0.5%（ディフコ社製）

【0028】

【表3】第3表

菌株名	培地	培養条件	感受性
バチルス・ズブチリス ATCC 6633	LB	好氣的、37℃	—
バチルス・ズブチリス ATCC 6633	LB	好氣的、40℃	+
クロストリジウム・ベイジェリンキ JCM 1390	TYA	嫌氣的、37℃	+
エンテロコッカス・ファセウム IFO 13712	MRS	嫌氣的、37℃	+++
エンテロコッカス・フェカリス IFO 12964	MRS	嫌氣的、37℃	++
ラクトバチルス・プランタラム IFO 14711	MRS	嫌氣的、37℃	—
ラクトバチルス・プランタラム TISTR 541	MRS	嫌氣的、37℃	—
ラクトコッカス・ラクティス IL 1403	M17	嫌氣的、37℃	—
リステリア・モノサイトゲネス ATCC 15313	LSA	好氣的、37℃	++
リュコノストク・メセンテロイデス TISTR 473	MRS	嫌氣的、37℃	—
ペディオコッカス・フィンディラクテン ISTR 952	MRS	嫌氣的、37℃	—
スタフィロコッカス・アウレウス IFO 15055	NB	好氣的、37℃	—
スタフィロコッカス・アウレウス TISTR 029	NB	好氣的、37℃	—
エシェリヒア・コリ MAFF 911145	NB	好氣的、37℃	—
エシェリヒア・コリ TISTR 527	NB	好氣的、37℃	—
クレプトセラ・ニューモニア NGRI G-1	NB	好氣的、37℃	—
チルモネラ・テイフィムリウム TISTR 292	NB	好氣的、37℃	—

【0029】表から明らかなように、食中毒等の原因となるリステリア・モノサイトゲネス、クロストリジウム・ベイジェリンキ及び醤油、味噌の製造過程で有害であるバチルス・ズブチリスを含むグラム陽性細菌に対してエンテロシンSE-K4は生育阻害効果があることが明らかとなった。バチルス・ズブチリスについてのみ温度による感受性の違いが見られた。さらに、表から明らかなように、乳酸発酵に有用なラクトバチルス属を除く、他のグラム陽性細菌に対して効果があった。

【0030】

【発明の効果】本発明のエンテロシンSE-K4は、耐熱性に優れた抗菌性ペプチドであり、食中毒菌をはじめ

様々な細菌に対して抗菌スペクトルを示す。そのため、この抗菌性物質を食品等に添加することによって、雑菌等の生育を阻害し、食品の腐敗や品質の低下を有効に防止することができる。また、この抗菌性物質は、乳酸菌に由来しており、しかも人体内で容易に分解されるため、従来の化学合成された食品保存料と比べ、大量に摂取しても安全性の上で心配がなく、健康面から好ましいものである。本発明の抗菌性物質は、今回単離された乳酸菌を用いて発酵法により効率よく製造することができる。

【0031】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<;110>; 農林水産省食品総合研究所長 鈴木 建夫
<;120>; 新規バクテリオシン及びその製造方法
<;130>; P121123K
<;160>; 1
<;210>; 1
<;211>; 45
<;212>; PRT
<;213>; Enterococcus faecalis
<;400>; 1
Ala Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Tyr Cys Asn Lys Gln Lys Cys Trp
                    5                10                15
Val Asp Trp Ser Arg Ala Arg Ser Glu Ile Ile Asp Arg Gly Val Lys
                    20                25                30
Ala Tyr Val Asn Gly Phe Thr Lys Val Leu Gly Gly Gly
                    35                40                45

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 エンテロコッカス・フェカリスK-4株の増殖に及ぼす培養温度の影響を示すグラフである。

【図2】 エンテロシンSE-K4の生産量に及ぼす培

養温度の影響を示すグラフである。

【図3】 エンテロシンSE-K4の精製手順の流れ図である。

【図4】 エンテロシンSE-K4のSDS-PAGE

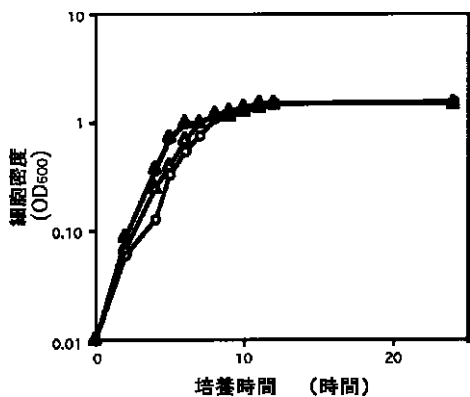
電気泳動写真で、Aは銀染色法の、Bは活性染色法の結果を示す。

【図5】 エンテロシンSE-K4のpH安定性を示す

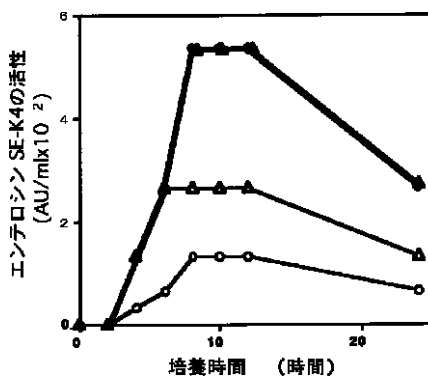
グラフである。

【図6】 エンテロシンSE-K4の熱安定性を示すグラフである。

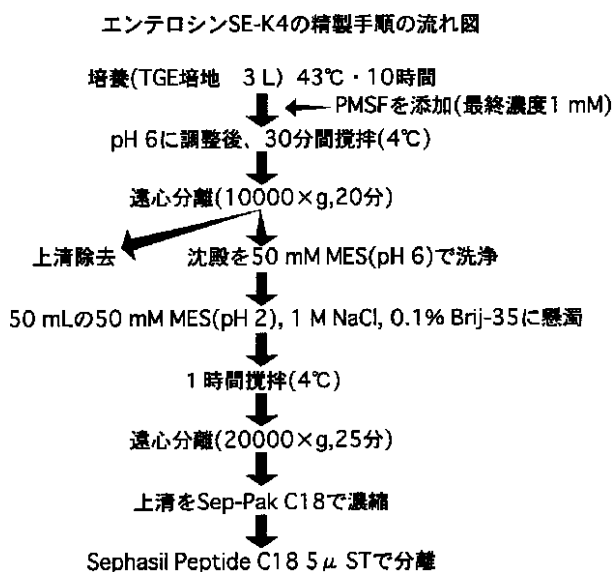
【図1】



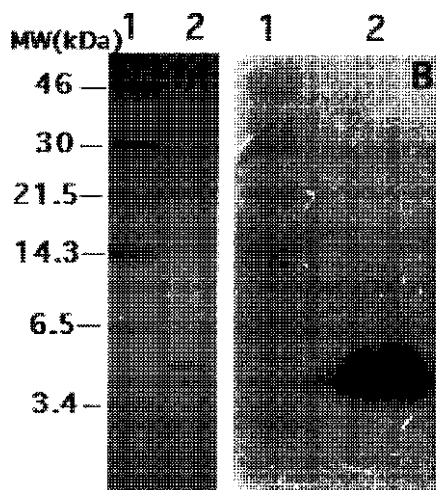
【図2】



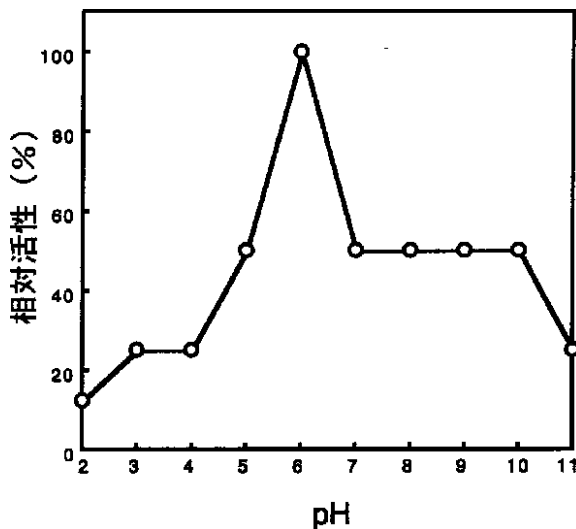
【図3】



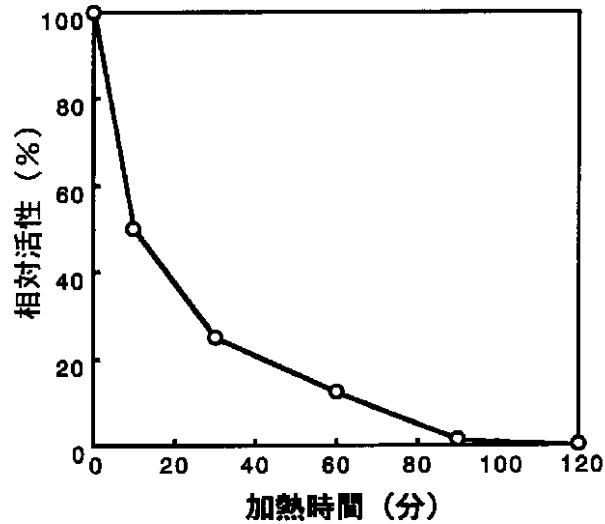
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ 識別記号 F I
 (C 1 2 P 21/02 C 1 2 R 1:01
 C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者 大桃 定洋
 茨城県稲敷郡阿見町荒川沖953番地502号

(72) 発明者 緒方 靖哉
 福岡県福岡市美和台2丁目18番4号

(58) 調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
 C07K 14/315
 A23L 3/3526
 BIOSIS(DIALOG)
 SwissProt/PIR/Genes
 eq