

59

助成番号 0059

抗菌性食品タンパク質—多糖類複合体の抗菌効果に及ぼす塩類の影響

助成研究者：中村 宗一郎(島根大学 教育学部)

現在、食品分野で使用されている添加物の多くは化学的に合成されたものが多く、しばしばその安全性が問題にされてきた。天然中に存在する食品タンパク質の中には優れた抗菌作用を有しているものがあり、それらは食品分野をはじめ様々な分野での工業的応用の可能性を持っている。しかし、そのような機能性タンパク質の多くは変性を受けやすく、塩類の添加などの加工工程を持つ食品へ利用する場合、その優れた生理機能が失われてしまうことが懸念されている。生物活性を維持したままで構造的に安定化することができれば、そのようなタンパク質は安全性に富んだ食品添加物として利用することが可能となる。

本申請者らは、これまでに卵白由来のリゾチームあるいは卵黄由来のホスビチンと水溶性多糖類であるガラクトマンナンとを化学的に共有結合させることに成功し、これらのタンパク質が多糖類との複合体形成によって、分子表面機能特性を著しく高め、病原性のグラム陰性菌に対する抗菌スペクトラムを拡大させるようになることを報告してきた。そこで、本研究では、リゾチームおよびホスビチンとガラクトマンナンあるいはキシログルカンとの複合体について、塩類の共存が抗菌効果に及ぼす影響について調べた。

その結果、多糖鎖が導入されたリゾチーム—多糖類複合体およびホスビチン—多糖類複合体のいずれについても、高塩濃度において、大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果は安定なだけでなく、塩の添加濃度に比例して強化される傾向にあることが明らかになった。これは、高塩濃度下においてもこれらの抗菌性タンパク質—多糖類複合体が安定な表面機能特性を示していたことと密接に関係しているものと考えられた。とくに塩化マグネシウムと塩化カルシウムの共存によって抗菌効果が強まったことについては、これらの塩類の添加によって供試菌の細胞膜が緩み、高塩濃度下でも安定な複合体の界面活性作用によって殺菌効率が向上したためと推察された。

今回用いた方法は、化学試薬を使用せずにタンパク質を多糖化することに特徴があり、安全性を重視する食品、医薬品、化粧品業界での高分子素材作成に向いており、消費者の安全性志向のニーズにも応える食品添加物開発の手段として期待される。そこで、その期待に応えるために、今後の課題として、今回調製した食品タンパク質—多糖類複合体について、食品衛生的な安全性を確認したい。また、ガラクトマンナンについてはこれまでに、動物実験によってラット肝臓中の総脂肪量を低減化する効果があることが報告されており、今後、安全性の確認とともに、長期投与によるリゾチーム—多糖類複合体およびホスビチン—多糖類複合体の特定保健食品的な効果についても検討を加えたい。

24

助成番号 0059

抗菌性食品タンパク質—多糖類複合体の抗菌効果に及ぼす塩類の影響

助成研究者：中村 宗一郎(島根大学 教育学部)

1. 研究目的

現在、食品分野で使用されている添加物の多くは化学的に合成されたものが多く、しばしばその安全性が問題にされてきた。天然中に存在する食品タンパク質の中には優れた抗菌作用を有しているものがあり、それらは食品分野をはじめ様々な分野での工業的応用の可能性を持っている。しかし、そのような機能性タンパク質の多くは変性を受けやすく、塩類の添加などの加工工程を持つ食品へ利用する場合、その優れた生理機能が失われてしまうことが懸念されている。生物活性を維持したままで構造的に安定化することができれば、そのようなタンパク質は安全性に富んだ食品添加物として利用することが可能となる。

本申請者らは、これまでに卵白リゾチームあるいは卵黄中のホスピチンと水溶性多糖類であるガラクトマンナンとを化学的に共有結合させることに成功し、これらのタンパク質が多糖類との複合体形成によって、分子表面機能特性を著しく高め、病原性のグラム陰性菌に対する抗菌スペクトラムを拡大させるようになることを報告してきた¹⁻³⁾。

また本申請者らはすでに、タンパク質分子への多糖鎖の導入は、タンパク質の表面機能特性を改善するだけでなく、タンパク質分子へ優れた耐熱性を付与することになるということ、遺伝子工学的手法を用いて証明している^{4,5)}。また、遺伝工学的に多糖化されたリゾチームは、きわめて高い乳化性を示すだけでなく、その乳化特性が加熱処理や低 pH 下においても安定であることを報告している⁶⁾。このような現象は、化学的手法によってタンパク質分子へ多糖鎖が導入された食品タンパク質—多糖類複合体においても期待される。

そこで、本研究ではこれまでに優れた抗菌性を有していることが認められている2種類の食品タンパク質、すなわちリゾチームとホスピチンについて、平均分子量 15,000 のガラクトマンナンと平均分子量 1,400 のキシログルカンと複合体を形成させ、塩類の共存が抗菌効果に及ぼす影響について調べたので報告する。

2. 研究方法

2.1 試料および試薬

卵白リゾチームは、新鮮な鶏卵卵白を5%塩化ナトリウム存在下で pH を 10.0 にすることによって結晶化する方法によって分離した⁷⁾。精製にはこの工程を5回繰り返した。卵黄ホスピチンは、新鮮な鶏卵から Mecham & Olcott (1949)の方法⁸⁾によって分離・精製した。タンパク質との複合体形成に用いた多糖類には、ガラクトマンナンとキシログルカンを用いた。ガラクトマンナンについては、太陽化学株式会社より入手したグアーガムのマンナーゼ分解物を 12-14 k mol wt. cut-off の透析膜(Spectra/Por 社製)にて 4℃、2日間、純水に対して透析後、凍結乾

燥し、ガラクトマンナンとして用いた。ガラクトマンナンは、Sephacryl S-100 および S-200 によるゲルろ過クロマトグラフィーによって、その平均分子量は 15,000 kDa であることが示された。一方、比較的小さな分子サイズを有する多糖類としてタマリンドガムの β -グルカナーゼ分解物を大日本製薬(株)から入手し、RI-1530 detector 付 HPLC システム (JASCO 社製)を用いて7から9糖の混合物を分取し、平均分子量 1,400 kDa のキシログルカンを調製した。

ペプトン、酵母エキスおよび寒天は Dfico 社製のものを、マッコンキー寒天培地およびマンニット食塩寒天培地は、日水製薬(株)製のものをそれぞれ用いた。塩化ナトリウム、塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムは、それぞれ和光純薬工業(株)製の特級を用いた。その他の試薬も、原則的に特級以上のものを用いた。

2.2 供試菌

今回の実験には、2種類のバクテリアを用いた。すなわち、代表的なグラム陰性菌として大腸菌 (*Escherichia coli* IFO 3301) を、また代表的なグラム陽性菌として黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* IFO 12732) を供試菌として用いた。

2.3 タンパク質-多糖類複合体の調製

卵白リゾチーム (以下、リゾチームと記す) あるいは卵黄ホスピチン (以下、ホスピチンと記す) とガラクトマンナンあるいはキシログルカンとをいったん水に溶解後、凍結乾燥し、その乾燥粉末を、60°Cで、相対湿度 65%あるいは 79%で所定の時間インキュベーションして、タンパク質の遊離アミノ基と多糖の還元末端カルボニル基との間でメイラード反応を起こさせ、両者を共有結合させることによって、タンパク質-多糖類複合体を調製した (Fig.1)。

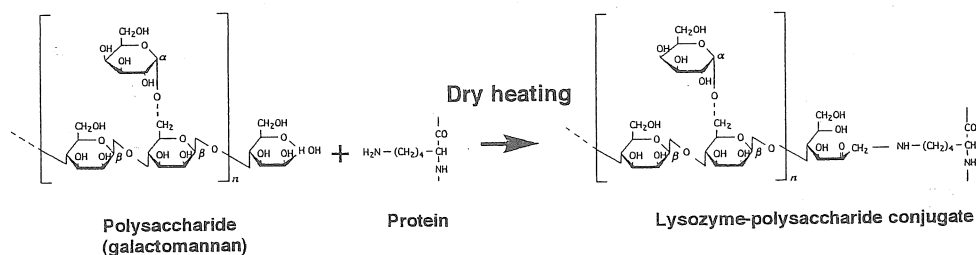


Fig. 1. Scheme of the formation of Maillard-type protein-polysaccharide conjugate. Polysaccharide was covalently attached to protein by heating of a dried powder of protein-polysaccharide mixture, under a controlled condition of 60°C and 65% or 79% relative humidity, through a naturally occurring Maillard reaction between the ϵ -amino groups in protein and the reducing-end carbonyl residue in polysaccharide.

2.4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質と多糖類との複合体形成を確認するために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動⁹⁾を行った。すなわち、濃縮用には1%SDS含有の5%ゲルを、分離用には1%SDS含有

の15%ゲルを調製し、2-メルカプトエタノールおよびSDS含有の試料処理液で100℃、5分間加熱処理した検液を20 μ L アプライし、1%SDS含有トリス-グリシン緩衝液(pH 8.8)を用いて15 mAで3時間電気泳動した。泳動後、ゲルシートはタンパク質染色にはCoomassie Brilliant Blue G-250を、糖染色には0.5% Periodic acid-Fuchsinをそれぞれ用いた¹⁾。

2.5 乳化性試験

タンパク質-多糖類の乳化性は、Pearce & Kinsellaの方法¹⁰⁾によって調べた。すなわち、試験管に検液3mLと1mLのコーン油とを入れ、高速ホモゲナイザー(Polytron PT 3100, Kinematica社製)で12,000回転、1分間高速ホモゲナイズし、形成されたエマルジョンを試験管の底から経時的に100 μ L採取し、5mLの0.1%SDSに懸濁後、500nmの吸光度を測定することによって行った。

2.6 抗菌試験

抗菌効果試験は、供試菌をL-broth(ペプトン10g、酵母エキス10g、塩化ナトリウム5g、水1L)中で1昼夜培養後、生理的食塩水(pH7.0)で培地成分を完全に洗浄除去後、最終的に10⁵cells/mlの菌体浮遊液を調製し、これに供試検液をタンパク質終濃度で0.05%になるように加え、50℃にて所定時間インキュベーション後に生存率を求めることによって行った。生菌数は、大腸菌についてはマッコンキー寒天平板上に、黄色ブドウ球菌については卵黄加マンニット食塩寒天培地平板上にそれぞれ検液を塗布し、37℃で24時間培養後に出現する供試菌特有のコロニーの数をカウントすることによって求めた。

実験系には、塩化ナトリウム、塩化カルシウムあるいは塩化マグネシウムを加えて、これらの塩類が抗菌性タンパク質-多糖類複合体の抗菌効果に及ぼす影響を調べた。

3. 研究結果

3.1 タンパク質と多糖類との複合体形成

比較的大きなサイズ(平均分子量15,000 kDa)の多糖類であるガラクトマンナンとの複合体の場合、リゾチームについては60℃、相対湿度79%で2週間のインキュベーションによって、ホスピチンについては60℃、相対湿度65%で1週間のインキュベーションによって、タンパク質-多糖類複合体が効率的に形成された。一方、比較的小きなサイズ(平均分子量1,400 kDa)のキシログルカンの場合、リゾチームについては60℃、相対湿度65%で1週間のインキュベーションによって、ホスピチンについては60℃、相対湿度65%で3日間のインキュベーションによって、複合体が効率的に形成された。Fig.2にリゾチーム-ガラクトマンナン複合体、ホスピチン-ガラクトマンナン複合体のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を示した。両タンパク質ともコントロールされた条件下において、多糖類とドライヒーティングすることによって、タンパク質染色および糖染色のいずれの場合においても、濃縮ゲルと分

離ゲルの境界付近にブロードなバンドが出現した (Fig.2)。こうして、タンパク質と多糖類は化学的に共有結合し、高分子化していることが確認された。リゾチームおよびホスビチンとキシログルカンとの複合体形成においても同様の現象が見られた。

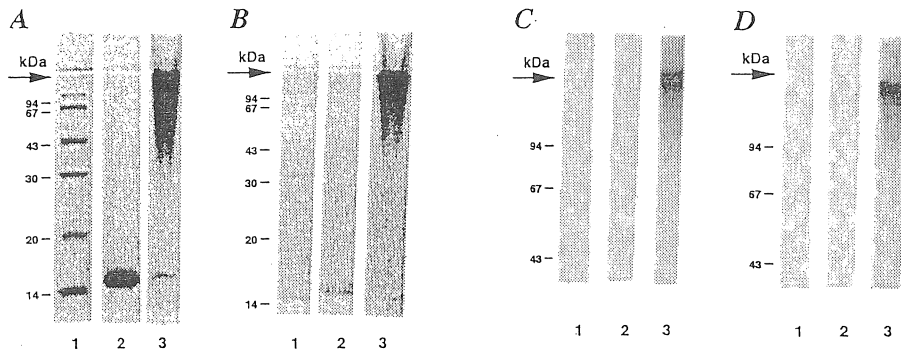


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the purified lysozyme-galactomannan conjugate (A, B) and phosvitin-galactomannan conjugate (C, D) stained for protein (A, C) and carbohydrate (B, D). Arrows indicate the position of the boundary between staining (upper) and separating (lower) gels. (Lane 1) Molecular weight marker; (lane 2) native protein; (lane 3) protein-polysaccharide conjugate.

3.2 多糖類との複合体形成によるリゾチームおよびホスビチンの抗菌効果の変化

典型的なグラム陰性桿菌である大腸菌 (*E. coli*) および典型的なグラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を用いて、多糖類との複合体形成によるリゾチームおよびホスビチンの抗菌効果の変化を調べた。その結果を Fig.3 にまとめて示した。いずれの供試菌においても、50℃でのインキュベーションによって、わずかではあるが、リゾチームは、室温では殺菌効果は示さないとされている大腸菌や黄色ブドウ球菌に対して殺菌効果を示すようになった (Fig.3 A & B)。これに対して、リゾチーム-多糖類複合体を添加した実験系では顕著な殺菌作用が観察された。特にリゾチーム-ガラクトマンナン複合体は、グラム陰性菌である大腸菌に対して致命的な殺菌作用を示すようになることが認められた。20分間のインキュベーション後には、リゾチーム-ガラクトマンナン複合体の実験系から大腸菌の生菌は、検出されなくなっていた。リゾチームのガラクトマンナン複合体およびキシログルカン複合体の酵素活性は、*Micrococcus lysodeikticus* 乾燥菌体を基質とした場合、それぞれ79%²⁾と100%¹¹⁾であるが、生菌に対しては、リゾチーム-ガラクトマンナン複合体の方がリゾチーム-キシログルカン複合体に比べ、はるかに殺菌効果が強いことが示された (Fig.3 A & B)。

一方、ホスビチンは、未修飾の状態でも大腸菌および黄色ブドウ球菌のいずれに対しても強い殺菌効果を示した。これは、ホスビチンが強い金属イオンキレート能を持ち、細胞膜中の金属をトラップし、細胞骨格を脆弱化する³⁾ことによるものと考えられる。この殺菌作用は、キシログルカンとの複合体形成によっては、ほとんど改善されなかったが、ガラクトマンナンとの複合体形成によって著しく向上した。ホスビチン-ガラクトマンナン複合体は、大腸菌および黄色ブドウ球菌のいずれに対しても50℃、20分間のインキュベーションによって10⁵cells/mlの供試菌体の全てを死滅させていることが示された (Fig.3 C & D)。以上のような、複合体形成による殺菌

作用向上のメカニズムとしては、多糖修飾によって、タンパク質分子の構造安定性が増し、併せて表面機能特性が改善された²⁻³⁾ことが推測される。

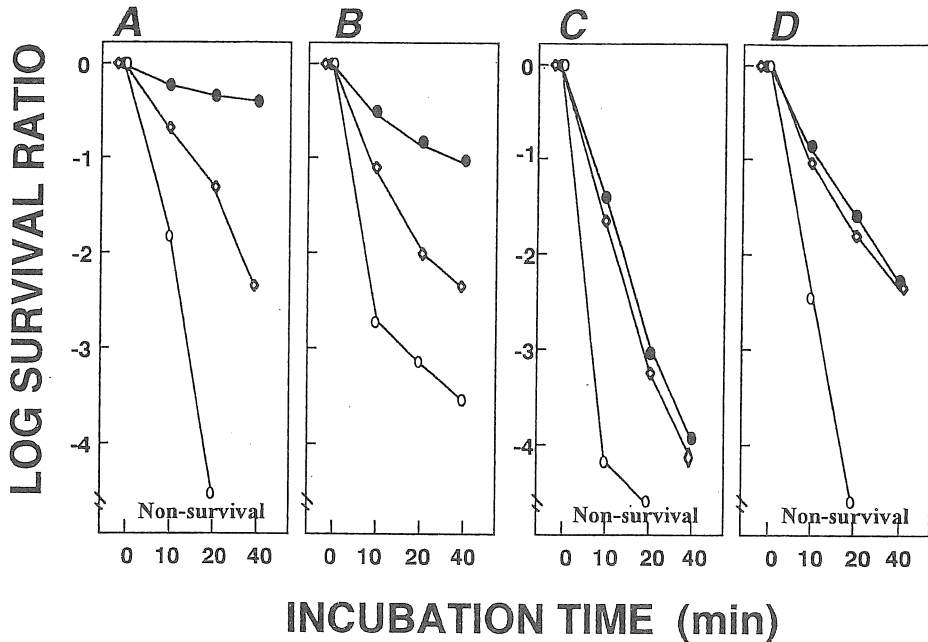


Fig. 3. Antimicrobial effect of lysozyme-galactomannan conjugates (A, B) and phosvitin-galactomannan conjugate (C, D) against *Escherichia coli* IFO 3301 (A, C) and *Staphylococcus aureus* IFO 12732 (B, D). Microorganisms were harvested from the culture medium and washed three times by centrifugation and resuspended in 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0). Washed preparation of microorganisms were diluted with 50 mM potassium buffer (pH 7.0) to give the concentration of 10^5 cells/ml by using a hematometer. Protein or protein-polysaccharide conjugate were added to the cell suspensions to give a final protein concentration of 0.05%. Five milliliters of sample-cell mixture suspensions were incubated at 50 °C in a waterbath equipped with a Lab-thermo Shaker (Advantec Co.) at 90 rpm to provide constant temperature and cell suspension. After a given heating time, the heated suspension was immediately added to a sterile test tube immersed in an ice-bath. After cooling to room temperature, decimal dilutions were subsequently carried out in physiological saline solution adjusted to pH 7.2. A 100 micro liter portion was spread over MacConkey agar plate for *E. coli* and over Mannit-salt agar plate for *S. aureus*. Colonies were counted after incubation for 24 h at 37 °C. Data shown were from a representative experiment repeated triple with similar results. (●) Native protein; (◇) Protein-xylloglucan conjugate; (○) Protein-galactomannan conjugate.

3.3 タンパク質-多糖類複合体の抗菌効果に及ぼす塩化ナトリムの影響

タンパク質およびその多糖類複合体の抗菌効果に及ぼす塩化ナトリムの共存効果について調べた。塩化ナトリウムを最終濃度で、0、10、100 および 1,000 mg/L に加え、50°C で 10 分間インキュベーションした時の生存率の対数値を縦軸に示した。Fig. 4 の A と B は、リゾチームおよびリゾチーム多糖類複合体についての、C と D は、ホスビチンおよびホスビチン多糖類複合体についての、また、A と C は、大腸菌についての、B と D は、黄色ブドウ球菌についてのデータである。

リゾチームについては、大腸菌の場合、塩濃度が高くなると殺菌効果は、急速に弱まり、

1,000mg/L ではまったく殺菌効果は示さなくなった。これに対して、多糖類との複合体では、ガラクトマンナンの場合もキシログルカンの場合もいずれについても濃度が高くなると殺菌効果は増加する傾向が見られた。黄色ブドウ球菌に対する殺菌効果についても同様の傾向が見られた。一方、ホスピチンについては、未修飾のものの場合、100mg/L までの塩濃度までは殺菌効果は強まったが、1,000mg/L ではその効果は若干減少した。しかし、リゾチームの場合と同様に多糖修飾すると、塩濃度が高くなるにつれて、殺菌効果は増加する傾向が見られた。この現象は、黄色ブドウ球菌に対するホスピチン-ガラクトマンナン複合体の実験系において顕著に示された。

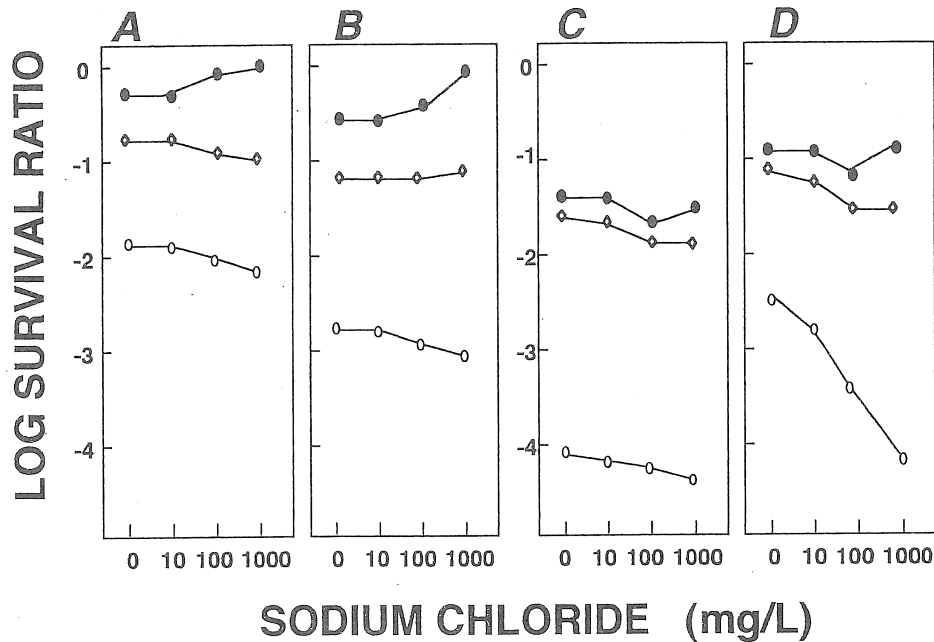


Fig. 4. Synergistic effect of NaCl on the bactericidal actions of lysozyme-polysaccharide conjugates (A, B) and phosvitin-polysaccharide conjugate (C, D) against *Escherichia coli* IFO 3301 (A, C) and *Staphylococcus aureus* IFO 12732 (B, D), when the tested bacteria were incubated at 50 °C for 10 min. Other procedure was exactly the same as that of the figure legend in Fig. 3. Data shown in figure were the representative data obtained from two separate experiments run in triplic. (●) Native protein; (○) protein-galactomannan conjugate; (◇) protein-xyloglucan conjugate.

3.4 塩類の共存効果

タンパク質およびその多糖類複合体の抗菌効果に及ぼす塩類の種類と濃度の効果について調べた結果をまとめて Table 1 に示した。データは、50°C で 10 分間インキュベーションした時の生存率の対数値を示している。塩化ナトリウムのデータは、Fig. 4 から抽出したものである。

塩化マグネシウムについては、塩濃度が高くなっても未修飾のリゾチームの大腸菌に対する殺菌効果を減少することはなかった。一方、リゾチーム-ガラクトマンナン複合体およびリゾチーム-キシログルカン複合体の大腸菌に対する殺菌効果は、塩化マグネシウムの共存によって著しく強まった。この傾向は、黄色ブドウ球菌の場合についても観察された。ホスピチンについても、

未修飾のものでは、1,000mg/Lの濃度で、殺菌効果の若干の減少が見られたが、塩化ナトリウムの場合のように100mg/Lの場合に比べて効果が弱まるほどではなかった。塩化カルシウムの場合についても、塩化マグネシウムと同様な実験結果が得られた。

以上のことから、塩類の共存効果の全体的な傾向としては、塩化カルシウム>塩化マグネシウム>塩化ナトリウムであることが示された。

Table 1. Synergistic effect of NaCl, MgCl₂ and CaCl₂ on antimicrobial action of lysozyme, phosvitin and their conjugates with galactomannan or xyloglucan

		NaCl (mg/L)				MgCl ₂ (mg/L)				CaCl ₂ (mg/L)			
		0	10	100	1000	0	10	100	1000	0	10	100	1000
<i>E. coli</i>	LZ	-0.32	-0.33	-0.05	0.00	-0.32	-0.41	-0.58	-0.73	-0.32	-0.40	-0.63	-0.88
	LZ-GM	-1.92	-1.95	-2.05	-2.26	-1.92	-2.36	-2.50	-3.14	-1.92	-2.44	-2.70	-3.41
	LZ-XG	-0.75	-0.76	-0.90	-0.95	-0.75	-1.05	-1.33	-1.24	-0.75	-1.14	-1.50	-1.49
	Phos	-1.45	-1.45	-1.70	-1.53	-1.45	-1.51	-1.65	-1.63	-1.45	-1.43	-1.57	-1.60
	Phos-GM	-4.17	-4.21	-4.30	-4.41	-4.17	-4.30	-4.40	-4.50	-4.17	-4.20	-4.50	-4.66
	Phos-XG	-1.65	-1.73	-1.82	-1.80	-1.65	-1.80	-1.92	-2.33	-1.65	-1.45	-2.07	-2.51
<i>S. aureus</i>	LZ	-0.55	-0.53	-1.41	-0.05	-0.55	-0.63	-0.77	-0.81	-0.55	-0.55	-0.80	-0.81
	LZ-GM	-2.75	-2.78	-2.94	-3.05	-2.75	-3.31	-3.53	-3.98	-2.75	-3.32	-3.63	-4.03
	LZ-XG	-1.21	-1.20	-1.18	-1.16	-1.21	-1.35	-1.49	-1.51	-1.21	-1.25	-1.53	-1.55
	Phos	-0.92	-1.91	-1.22	-0.87	-0.92	-0.95	-1.15	-1.20	-0.92	-1.02	-1.13	-1.27
	Phos-GM	-2.47	-2.79	-3.40	-4.17	-2.47	-3.04	-3.53	-4.33	-2.47	-3.11	-3.54	-4.32
	Phos-XG	-1.15	-1.26	-1.53	-1.55	-1.15	-1.47	-1.75	-1.78	-1.15	-1.56	-1.71	-1.85

Data show the log survival ratio when the tested strains were incubated at 50°C for 10min. LZ, lysozyme; LZ-GM, lysozyme-galactomannan conjugate; LZ-XG, lysozyme-xyloglucan conjugate; Phos, phosvitin, Phos-GM, phosvitin-galactomannan conjugate; Phos-XG, phosvitin-xyloglucan conjugate.

3.5 タンパク質およびタンパク質-多糖類複合体の乳化性に及ぼす塩の影響

リゾチームおよびリゾチーム-多糖類複合体 (A, B)、ならびにホスビチンおよびホスビチン-多糖類複合体 (C, D) の乳化性に及ぼす0.2Mの塩化ナトリウム添加 (B, D) の影響について調べた結果を Fig. 5 に示した。リゾチームおよびホスビチンのいずれについても未修飾の場合では、1.16%の高塩濃度 (0.2M 塩化ナトリウム) 下で、乳化性は著しく低下した。しかし、多糖修飾を施したものでは、コントロール区 (20mM バッファー、pH 7.4) の場合とほぼ同じ、高乳化性を維持し続けることが明らかにされた。

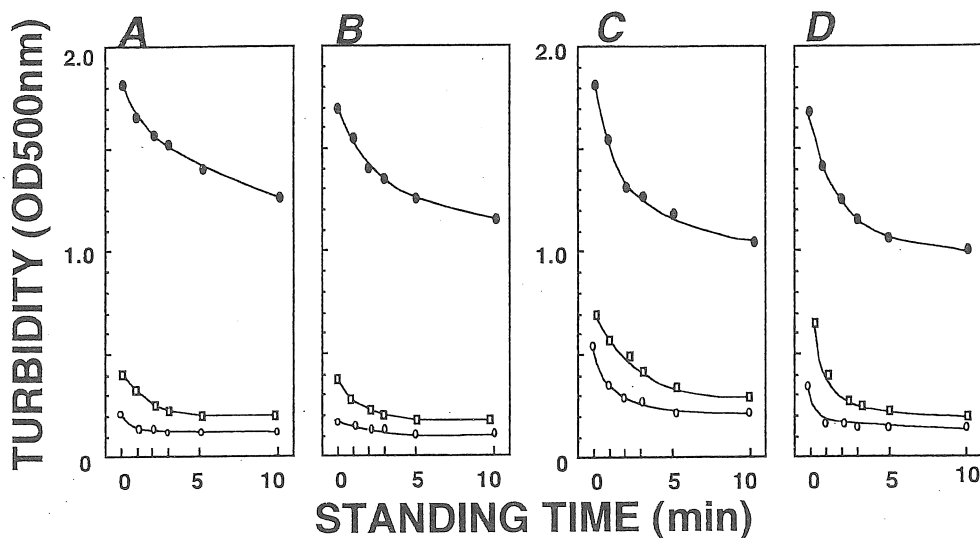


Fig. 5. Emulsifying properties of lysozyme-galactomannan conjugates (A, B) and phosvitin-galactomannan conjugate (C, D) in 20 mM sodium phosphate buffer (A, C) and in the same buffer containing 0.2M NaCl (B, D). (○) Native protein; (●) protein-galactomannan conjugate; (□) protein-xyloglucan conjugate.

4. 考察

リゾチームおよびホスビチンの殺菌効果が多糖類修飾によって向上したメカニズムとしては、糖鎖導入に起因する生物活性の耐熱性および塩類の存在下でも安定な界面活性効果が考えられる。本実験結果から、細菌細胞の膜構造は、塩類の共存によってより不安定化したため、リゾチーム-多糖類複合体あるいはホスビチン-多糖類複合体によって、細胞が破壊され易くなり、殺菌効果が強まったのではないかと推測された。これらのタンパク質-多糖類複合体によってグラム陰性桿菌の細胞が破壊される様子を Fig. 6 に示した。

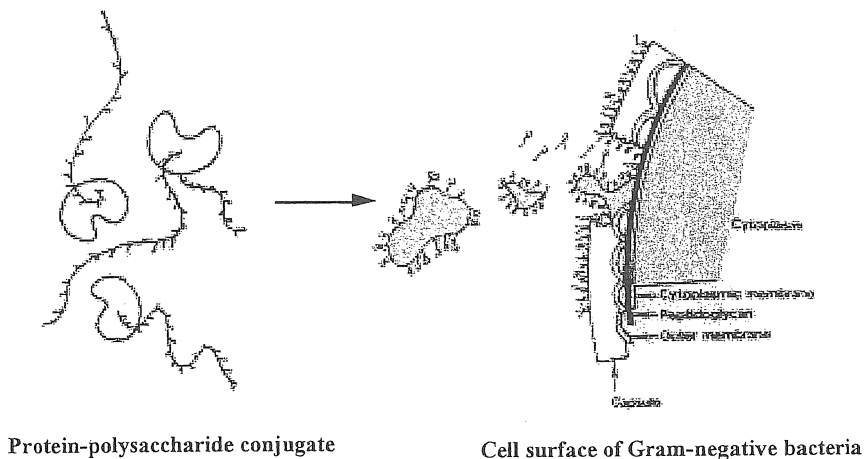


Fig. 6. A scheme for lethal effect of lysozyme-polysaccharide conjugate against Gram-negative bacteria.

リゾチームは細菌の細胞壁の骨格をなすペプチドグリカン層の N-acetylmuramic acid と N-acetylglucosamine との間の β (1-4) 結合を加水分解し、細胞壁を破壊することによって抗菌性を示すとされている。グラム陰性菌のペプチドグリカン層は、グラム陽性菌に比べて遥かに薄いにもかかわらず、その表層はリポポリサッカライド(LPS)などを含む疎水性外膜で覆われているため、これらがバリアーとなってグラム陰性菌はリゾチーム耐性を示すとされている。しかし一方では、マイルドな加熱処理やデオキシコール酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、あるいは Triton X-100 のような界面活性剤の使用によってグラム陰性菌の外膜を可溶化することができる とされている。リゾチームの酵素活性を失わせることなく、優れた界面活性作用を与えることができれば、リゾチームの抗菌スペクトラムは一挙に拡大することになるだろう。こうして著者らはグラム陰性菌およびグラム陽性菌両方に作用する新規な多機能性多糖化リゾチームの開発に成功した^{1,2)}。多糖鎖の共有結合によって得られた多糖化リゾチームは、その強力な乳化活性と供試菌に科せられた加熱ストレスとの相乗作用によってグラム陰性菌を破壊するものと推測された。一方、ホスビチンの抗菌効果については、著者らはすでにホスビチンは多糖修飾後も金属イオンキレート能には、ほとんど変化が見られないこと³⁾、また、ホスビチンは多糖化によって、その界面活性作用を一段と向上させ、抗菌効果を増強させることを報告している³⁾。

本研究結果で、多糖鎖が導入されたリゾチーム-多糖類複合体およびホスビチン-多糖類複体のいずれについても、高塩濃度において、それらの抗菌効果は安定だけでなく、塩の添加濃度に比例して強化される傾向にあることが明らかになった。これは、高塩濃度下においてもこれらの抗菌性タンパク質-多糖類複合体が安定な表面機能特性を示していることと密接に関係しているものと考えられる。とくに塩化マグネシウムと塩化カルシウムの共存によって抗菌効果が強まったことについては、これらの塩類の添加によって供試菌の細胞膜が緩み、高塩濃度下でも安定な複合体の界面活性作用によって殺菌効率が向上したためと推察された。

5. 今後の課題

本研究では、抗菌性タンパク質-多糖類複体の抗菌効果に及ぼす塩類の影響を調べた。その結果、リゾチーム-多糖類複合体およびホスビチン-多糖類複体のいずれについても塩の共存によって大腸菌および黄色ブドウ球菌のいずれに対しても殺菌効果が増強されることが示された。今回の抗菌性の実験では、塩の種類は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウムの3種類、塩濃度は、最高で1,000 mg/L までであった。今後の課題としては、塩の種類と濃度の幅を広げて検討してみたい。

また、今回用いた方法は、化学試薬を使用せずにタンパク質を多糖化することに特徴があり、安全性を重視する食品、医薬品、化粧品業界での高分子素材作成に向いており、消費者の安全性志向のニーズにも応える食品添加物開発の手段として期待される。そこで、その期待に応えるためにも、今回調製した食品タンパク質-多糖類複合体について、食品衛生的な安全性を確認したい。ガラクトマンナンについてはこれまでに、動物実験(経口投与)によってラット肝臓中の総脂肪量を低減化する効果があることが報告されており¹²⁾、今後、安全性の確認とともに、長期投与によるリゾチーム-多糖類複合体およびホスビチン-多糖類複体の

特定保健食品的な効果についても検討を加えたい。

6. 文献

- 1) Nakamura, S., Kato, A., and Kobayashi, K. (1991) New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 647-650.
- 2) Nakamura, S., Kato, A., and Kobayashi, K. (1992) Bifunctional lysozyme-galactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 735-739.
- 3) Khan, M.A.S., Nakamura, S., Ogawa, M., Akita, E., Azakami, H., and Kato, A. (2000) Bactericidal activity of egg yolk phosvitin against *Escherichia coli* under the influence of thermal stress. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1503-1506.
- 4) Nakamura, S., Takasaki, H., Kobayashi, K., and Kato, A. (1993) Hyperglycosylation of hen egg white lysozyme in yeast. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12706-12712
- 5) Kato A., Nakamura, S., Ban M., Azakami H., and Yutani K. (2000) Enthalpic destabilization of glycosylated lysozymes constructed by genetic modification, *Biochim. Biophys. Acta*, **1481**, 88-96.
- 6) Nakamura, S., Kobayashi, K., and Kato, A. (1993) Novel surface functional properties of polymannosyl lysozyme constructed by genetic modification. *FEBS Letters*, **328**, 259-262.
- 7) Alderton, S. G. and Fevold, H. L. (1946) Direct crystallization of lysozyme from egg white and crystalline salts of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **164**, 1-5.
- 8) Mecham, D. K. and Olcott, H. S. (1949) Phosvitin, the principal phosphoprotein of egg yolk. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 3670-3679.
- 9) Leamli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 10) Pearce, K. M. and Kinsella, J. E. (1978) Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716-723.
- 11) Nakamura, S., Ogawa, M., Saeki, H., Saito, M., Gotoh, M., and Hwang, J-K. (2000) Rapid formation of biologically active neoglycoprotein from lysozyme and xyloglucan hydrolysates through naturally occurring Maillard reaction. *J. Food Science and Nutrition*. **5**, 65-69.
- 12) Yamamoto, T., Yamamoto, S., Miyahara, I., Matsumura, I., Hirata, A. and Kin, M. (1990) Isolation of a β -mannan hydrazing enzyme and hydrolysis of gure gum by the enzyme isolated. *Denpun Kogaku*, **37**, 99-105.

Effect of Salts on the Antimicrobial Activity of Food Protein-Polysaccharide Conjugates

Soichiro Nakamura

Department of Living Science (Foods), Shimane Univeristy

Summary

Maillard-type protein-polysaccharide conjugate has been proposed to be useful as a safe functional biopolymer, since it was demonstrated that a neoglycoprotein can be prepared by binding of the free amino groups in the protein to the reducing-end carbonyl group in the polysaccharide through a controlled heating system without any chemical reagents. In this paper, enhanced antimicrobial activities of food protein-polysaccharide conjugates by the addition of salts, are discussed.

Lysozyme and phosvitin were covalently linked with galactomannan (average molecular weight of 15,000) or xyloglucan (average molecular weight of 1,400) through a controlled dry-heating at 60°C in 65% or 79% relative humidity. The surface functionality of lysozyme was remarkably improved by the covalently binding of polysaccharide chains, as well as phosvitin. A significant improvement in the emulsifying properties of lysozyme and phosvitin was observed in the galactomannan conjugates. The emulsifying activity and emulsion stability were stable in a high salt condition. An interesting finding was that the improved amphiphilicity provided the egg proteins with a novel antimicrobial activity against a typical Gram-negative *Escherichia coli* and a typical Gram-positive *Staphylococcus aureus*. Especially, galactomannan conjugates showed much more strong bactericidal effects on the both Gram-negative and Gram-positive bacteria, compared to xyloglucan conjugates. At the NaCl coexisting system, the antimicrobial activity of lysozyme-galactomannan conjugate increased with increasing the salt concentration, while that of the native protein was drastically reduced in the 100 mg/L NaCl system. The similar trend was observed in the phosvitin-galactomannan system. On the other hand, the promising phenomenon was demonstrated in the coexisting system with MgCl₂ and CaCl₂ for both lysozyme-galactomannan and phosvitin-galactomannan conjugates. The synergistic effect of salts on the antimicrobial actions of the conjugates was CaCl₂ > MgCl₂ > NaCl.

The conjugates of hen egg proteins with galactomannan can be used as a natural antibiotics with excellent surface functionality, because those were prepared by naturally occurring Maillard reaction.