

野菜種子ならびにスプラウト由来の 新規抗菌ペプチドの分離同定に関する研究

九州大学大学院農学研究院・准教授 本城 賢一

■ 目的

本研究では、日常我々が食している野菜の種子ならびにその発芽直後のスプラウトから、食中毒細菌や食品腐敗細菌など食品劣化に関わる微生物を制御し、加熱加工工程でも安定性を有する新規な抗菌タンパク質またはペプチドを分離同定することを目的とした。

■ 方法

材料：野菜の種子(カボチャ、コリアンダー、セロリ、ニンジン、ネギ、パセリ、ピーマン、シュンギク、クウシンサイ、ガーデンクレス、ゴーヤ、シロゴマ、ソバ、タカナ、ヒマワリ、ブロッコリー、カラシナ、ルッコラ、ダイズ、カイワレ、サンゴカイワレ、レッドキャベツ)を用い、スプラウトの育成の際には、プラントボックス内に滅菌水で湿らせたキムワイプ上に滅菌した種子をおき、植物育成チャンバー内で発芽させた。

抽出法Ⅰによる粗抽出液の調製：種子またはその発芽直後のスプラウトを乳鉢で摩砕した。摩砕物に4倍容の50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7)を添加し、4°Cで一晩振とう抽出した。その後、遠心分離(10,000×g、4°C、40分間)を行い、上清に7倍容のアセトンを添加し、-20°C冷却後、遠心により沈殿を得た。この沈殿を50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7)で溶解し、可溶性アセトン画分とした。水溶性画分については、さらに、80°C、10分間の加熱処理後、遠心分離(10,000×g、4°C、20分間)を行い、上清に7倍容のアセトンを添加し、-20°Cで冷却後、遠心により沈殿を得た。この沈殿を50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7)で溶解し、加熱処理アセトン画分を得た。

抽出法Ⅱによる粗抽出液の調製：種子またはスプラウトを乳鉢で摩砕後、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.2)、0.1M NaCl、10mM EDTA、0.1mM PMSFを添加し、4°Cで一晩振とう抽出した。その後、遠心分離(10,000×g、4°C、40分間)を行い、上清を得た。その上清に硫酸アンモニウムを添加し、30-80%、80-90%、90-100%の3つの飽和沈殿画分を取得した。得られた各画分を10mM Tris-HCl(pH7.0)緩衝液で透析を行い、抗菌性評価に供した。

抗菌性評価：OD₆₀₀=0.1に濁度調整した大腸菌または枯草菌懸濁液を20μl、1.8倍濃度の tryptic soy broth を100μl、0.2μm フィルター滅菌済みの各抽出画分80μlを、96穴マイクロプレートの1ウェルに入れ、37°Cで18時間培養した。その後、培養液のOD₆₀₀を測定し、コントロールと比較した相対濁度を算出することで抗菌性を評価した。

■ 結果および考察

抽出法Ⅰを利用した種子抽出物の抗菌活性評価

抽出法Ⅰを用いて20種類の野菜種子ならびに14種類のスプラウトから可溶性アセトン画分、加熱処理アセトン画分を取得し、抗菌活性を評価した。その結果、加熱処理アセトン画分にセロリ、ゴーヤ、ルッコラ種子の枯草菌に対して抗菌性が認められた。

抽出法Ⅱを利用したスプラウト抽出物の抗菌活性評価

一部のスプラウトを用いて抽出法Ⅱを用いて抽出物を取得後、抗菌活性の評価を行った。その結果、クウシンサイの粗抽出画分から抗菌性を示す結果が認められ、その30-80%、80-90%硫酸画分に大腸菌、枯草菌に対して抗菌性が認められた。

■ 結語

セロリ、ゴーヤ、ルッコラ種子からの加熱処理後も安定な抽出物に枯草菌に対する抗菌活性を示すことを見出した。さらに、クウシンサイのスプラウトの抽出物については30-80%ならびに80-90%硫酸沈殿画分が大腸菌ならびに枯草菌に対して抗菌活性を示すことを見出した。