ポリフェノールの乳酸菌生育阻害と タンパク質による回復機構[†]

西山隆造, 小崎道雄*

(東京都立農業高等学校食品化学科, *東京農業大学農芸化学科)

昭和 53 年 8 月 8 日 受理

Mechanism of Growth Inhibition of Lactic Acid Bacteria by Polyphenols and Its Recovery by Protein Addition in the Culture Medium (Studies on Phenol Related Compounds Inhibiting the Growth of Lactic Acid Bacteria Part III)

Ryūzō NISHIYAMA and Michio KOZAKI*

Tokyo Metropolitan Agricultural Senior High School, *Department
of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture

The growth inhibition of *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (*Leuc.* P-60) by tannic acid and polyphenols of green tea was recovered by addition of protein in the culture medium.

Damage and recovery of cell wall were observed under the electron microscope. To clarify the mechanism of interaction between protein and polyphenols, proteins denatured by urea or by chemical modification were added to a culture medium containing polyphenols in the threshold amount of growth inhibition. Addition of proteins denatured by urea, modified by carboxymethylation of methionine or histidine residues or modified by di-isopropylfluorophosphoric acid at serine residues recovered the growth inhibition just like the addition of original protein.

With the addition of protein modified by carboxymethylation at ϵ -amino group of lysine residue, or destruction of N-terminal amino acid and ϵ -amino group of lysine residue by nitrite, the growth inhibition was not recovered. The growth inhibition of *Leuc.* P-60 was recovered by the addition of ovalbumin having acetylated N-terminal amino acid residue in a medium contained the threshold amount of polyphenol.

Results showed that combination of polyphenols and proteins assumed to occur at ϵ -amino group of lysine residue of proteins.

(Received August 8, 1978)

緒 言

前報⁽¹⁾で, 合成および天然倍地における *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (以下, *Leuc.* P-60) の生育におよぼす緑茶抽出液の阻害パターンがタンニン酸型であることを知り, また抽出液中の阻害成分は, エピガロカテキンガレート (EGCG), エピカテキンガレート (ECG), エピガロカテキン (EGC) およびエピカテキン (EC) の

緑茶の主要なポリフェノールであることを認めた。その後, 緑茶抽出液, タンニン酸および各種阻害物質の *Leuc.* P-60 菌体に対する阻害力を調べるために, 石炭酸係数試験法を準用して比較検討した。さらに緑茶抽出液およびタンニン酸による阻害は, タンパク質の存在により回復を示すことから, これらのポリフェノールとタンパク質との結合機構についても検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料 静岡県茶業試験場より分与を受けた荒茶

[†] 乳酸菌の生育におよぼすフェノール関連物質の阻害作用に関する研究 (第3報)。

を前報に準じた調製法で抽出し, 供試した. 緑茶の 4 種のポリフェノールである EGCG, ECG, EGC および EC は, 前報⁽¹⁾に準じて緑茶抽出液から分離精製したものをを用いた. 阻害物質としては, タンニン酸, ピロカテコール, 没食子酸およびフェノールを用いた. またタンパク質は, ゼラチン, 血清アルブミン (albumin bovine, 4 × crystalline, ICN 製) および卵白アルブミン (albumin, egg, crystallized & lyophilized salt-free grade V, Sigma 製) をを用いた.

2. 供試菌株 東京農業大学保存の *Leuconostoc mesenteroides* P-60 をを用いた.

3. 培地および菌増殖阻害力の測定 前培養, 本培養および阻害停止試験培養ともに田村, 角田改良培地 (TT 培地) をを用い, 培養法および生酸度測定法は, いずれも前報⁽²⁾に準じた. また, 緑茶および各阻害物質の阻害力の比較は, 石炭酸係数試験法⁽³⁾を準用した (Fig. 1).

なお, 緑茶抽出液の阻害力は, 緑茶の風乾重量に換算し, 培地 1 ml あたりの mg で示した.

4. ポリフェノール成分の定量法 緑茶のポリフェノール定量は, Swain と Hillis⁽⁴⁾ のバニリン-硫酸法を一部改変しカテキンとして計算する中林⁽⁵⁾の方法で行なった.

5. タンニン酸による *Leuc. P-60* の阻害とタンパク質による回復状態の観察 *Leuc. P-60* の前培養液 8 ml を集菌洗浄し, 5% タンニン酸溶液各 25 ml 中に懸濁, 室温で 1 時間作用させた後, 1 N 酢酸アンモニウム溶液にて集菌洗浄した. 洗浄菌体を試料とし, 超薄切片としたものを常法^(6,7)により電子顕微鏡で観察した. 電子顕微鏡は日本電子株式会社製 JEM-7 A, JEM-SS および超薄切片の調製には, 同社の Porter-Blum MT-2 型を使用した. なお, 2% リンタングステン酸染色による観察も行なった.

6. タンパク質の化学修飾および変性 (1) 化学修飾: 血清アルブミン溶液の脱アミノ化は, Cassel ら⁽⁸⁾ の脱アミノ化コラーゲン調製法, SH 基の修飾は, Sykes⁽⁹⁾ のヨード酢酸処理法, OH 部位の修飾は Schaffer ら⁽¹⁰⁾ のジソプロピルフルオロリン酸 (DFP) 処理の方法で行なった.

(2) 変性: 血清アルブミン溶液の変性は尿素溶液 (5 モル濃度) 中で, 1 夜透析して変性させたのち, さらに冷蔵庫で蒸留を用い透析を行なった.

Fig. 1. Judgement Criteria on the Strength of Inhibition of Green Tea Extract and Various Phenolic Substances on the Growth of *Leuc. P-60*. *TT-medium: Tamura & Tsunoda medium.

7. ジニトロフェニレーション法による末端アミノ酸の確認法 化学修飾を行なったタンパク質の末端アミノ酸および N^ε-ジニトロフェニル (DNP) リジンの確認は Sanger⁽¹¹⁾ によるアルコール溶液中でのジニトロフェニレーション (DNP) 法に従って行なった. ついで, DNP タンパク質を加水分解し, 加水分解物をエーテル層と水層とにそれぞれ分別した.

これらの DNP アミノ酸について, ペーパークロマトグラフィー (PPC)⁽¹²⁾ により血清アルブミンの末端アミノ酸の確認を行なった. また水溶性 DNP アミノ酸については, 沔紙電気泳動法⁽¹³⁾とあわせて N^ε-DNP リジンの確認を行なった.

実験結果および考察

1. *Leuc. P-60* の菌体に対する緑茶抽出液および各阻害物質の阻害力の比較

先⁽¹⁾に緑茶抽出液またはフェノール関連物質の阻害性を調べたが, さらに石炭酸係数試験法⁽³⁾を準用して緑茶抽出液と他の阻害物質についての阻害力を比較検討した. その結果は, Table I の通りである. 緑茶抽出液のポリフェノールのうち, カテキンの定量値が 8.0% であることから, 緑茶ポリフェノールの希釈倍数としては, 石炭酸係数が 0.3 となり, ピロカテコールの 0.4 に近い数値となった. これに対し, タンニン酸は 0.1 を示し阻害力が弱かった. 以上のことから, ポリフェノールの阻害力は種類により差は認められるが, 石炭酸に比べるといずれも弱いといえる.

2. タンパク質添加培地における *Leuc. P-60* の生育におよぼす緑茶抽出液および各種阻害物質の影響

一般にカテキン, ガロカテキンのガレートやタンニン

Table I. Comparison of the Inhibitory Action of Green Tea Extract and Various Phenolic Substances on the Growth of *Leuc. P-60*

Phenolic substances	Green tea extract			Tannic acid				Pyrocatechol			Phenol			
	Multiple dilution	1/2.5 (1/20) ^a	1/5.0 (1/40)	1/7.0 (1/60)	1/7.5	1/10	1/15	1/20	1/50	1/60	1/70	1/140	1/150	1/160
Reaction time (min)														
60	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
120	—	+	+	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	+
180	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—

^a Concentration of green tea polyphenols.

Tamura & Tsunoda medium (recovery culture), 37°C, 72 hr. +, growth; —, no growth.

Table II. Growth Inhibition of *Leuc. P-60* by Green Tea Extract and Various Phenolic Substances in the Presence of Added Protein

Phenolic substances	Green tea extract						Tannic acid				Pyrocatechol						Phenol																				
	1			3			1~5				1			3			5			1~5																	
	1			1			1				1			1			1			1																	
	2.5			5.0			7.5				10			15			20			50			60			70			140			150			160		
Gelatine (mg/ml)	1			3			1~5				1			3			5			1~5																	
Multiple dilution	1			1			1				1			1			1			1																	
	2.5			5.0			7.5				10			15			20			50			60			70			140			150			160		
Reaction time (min)																																					
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
120	-	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	+	-	+	+	-	+	+	(+)	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-					
180	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+	-	(+)	+	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Recovery culture medium: Tamura & Tsunoda medium using 10 ml, 37°C, 72 hr.

(+) , growth recovered by the addition of gelatine in the culture medium.

酸のようなポリフェノールは、ゼラチンなどのタンパク質と結合⁽⁴⁾して沈でんする。そこで、緑茶抽出液および各阻害物質溶液中にあらかじめゼラチンを添加し *Leuc. P-60* の菌体を接触させたときの阻害の有無について調べた。その結果は Table II に示した。すなわち、緑茶抽出液はゼラチン 1 mg/ml の添加でその阻害作用をやや減じ、3 mg/ml の添加で完全に停止した。タンニン酸はゼラチン 1 mg/ml の添加で完全に阻害作用を失った。これに対し、ピロカテコールはゼラチンを 1~5 mg/ml と添加量を増しても、その影響は弱かった。一方フェノールの場合は、ゼラチンによる影響が全く見られなかった。これらの現象はゼラチン以外のアルブミンやカゼインなどのタンク質についても同様の傾向が見られた。緑茶ポリフェノールおよびタンニン酸とタンパク質が結合して不溶性物質を生じ、阻害性を失うのに対し、ピロカテコールはほとんどタンパク質との結合が起らないためと思われる。緑茶抽出液または、タンニン酸溶液にタンパク質を添加すると白濁を生ずるが、ピロカテコールやフェノールはあまり変化が起らないことでもわかる。なお、タンパク質を塩酸により加水分解したものについては、阻害の停止が見られなかった。

したがって低分子のペプチドおよびアミノ酸では阻害停止の効果はないといえる。

3. タンパク質添加培養による *Leuc. P-60* の阻害の回復

上述のごとく、緑茶抽出液およびタンニン酸溶液中にタンパク質を添加すると、*Leuc. P-60* の阻害が起らないことを認めたので、緑茶抽出液および各阻害物質溶液中で *Leuc. P-60* の菌体を接触させたのち、ゼラチン添加 TT 培地中に培養し回復性を調べた。その結果は Table III の通りである。

すなわち、緑茶抽出液の場合は、培地にゼラチン 1 mg/ml を添加すると無添加培地に比べて顕著な回復を示し、さらに 3 mg/ml と添加量を増すと、わずかにその回復が向上した。

タンニン酸の場合も、ゼラチン 1 mg/ml の添加によって緑茶と同様顕著な回復が見られたが、5 mg/ml まではゼラチンの添加量を増しても変わらなかった。一方、ピロカテコールの場合は、ゼラチンの添加による回復が弱かった。また、フェノールの場合はほとんど回復しなかった。

以上のことから、緑茶ポリフェノールおよびタンニン

Table III. Growth Inhibition of *Leuc. P-60* by Green Tea Extracts and Various Phenolic Substances in the Recovery Culture Medium Containing Added Protein

Phenolic Substances	Green tea extract						Tannic acid				Pyrocatechol						Phenol					
Gelatine (mg/ml)	1			3			1~5				1			3~5			1			3~5		
Multiple dilution	1/2.5	1/5.0	1/7.5	1/2.5	1/5.0	1/7.5	1/7.5	1/10	1/15	1/20	1/50	1/60	1/70	1/50	1/60	1/70	1/140	1/150	1/160	1/140	1/150	1/160
Reaction time (min)																						
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
120	(+)	+	+	(+)	+	+	-	(+)	(+)	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
180	(+)	+	+	(+)	+	+	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+	-	(+)	+	-	-	-	-	-	(+)
300	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Recovery culture medium: Tamura & Tsunoda medium using 10 ml, 37°C, 72 hr.

(+), growth recovered in the recovery culture medium containing added protein.

Fig. 2. Ultrathin Section of *Leuc. P-60* Inhibited by Tannic Acid. A, control; B, treated with 5% tannic acid solution for 60 min.

酸によって阻害をうけた *Leuc. P-60* の菌体は、タンパク質を含む培地中で何らかの原因により生育阻害の回復を示すことが考えられる

4. タンニン酸による *Leuc. P-60* の生育阻害とタンパク質による回復状態の観察

タンニン酸溶液で阻害をうけた *Leuc. P-60* 菌体、またはゼラチンを含む TT 培地に移植培養によって阻害の回復が見られた菌体の、超薄切片を電子顕微鏡にて観察を行なった。その結果は Fig. 2 に示したように阻害をうけた *Leuc. P-60* 菌体の細胞壁周囲には、タンニン酸があたかも吸着されているように観察された。なお、この観察に先立って 10% タンニン酸溶液を用いたほかは、上記と同じ条件で実験を行ない、2% リンタングステン酸染色法 *Leuc. P-60* での菌体を観察した。その場合、阻害を受けた菌体を TT 培地に移植培養しても菌の増殖が見られなかったが、ゼラチンを含む TT 培地に

移植培養すると菌体の周囲にタンニン酸がまだ吸着したまま増殖しているのが見られた。しかし、阻害時と比べてタンニン酸の吸着が粗になっていたことから、菌の増殖に影響が少なくなったものと考えられる。

5. *Leuc. P-60* の生育におよぼすポリフェノールの阻害に対する修飾および変性タンパク質添加の影響

上述のごとく、緑茶抽出液およびタンニン酸溶液中で阻害を受けた *Leuc. P-60* の菌体を、タンパク質を含む培地に移植培養すると回復を示すことを認めた。

そこで緑茶ポリフェノールおよびタンニン酸に対するタンパク質の影響がどのように行なわれるかを見るために、一般化学修飾試薬を用いて血清アルブミンの N 末端、SH 基および OH 基を特異的に修飾し、これらの修飾タンパク質を緑茶ポリフェノールおよびタンニン酸の阻止量を含む TT 培地中に添加したときの *Leuc. P-60*

Table IV. Effect of Original or Modified Proteins on the Growth Inhibition of *Leuc. P-60* by Polyphenols

Modified protein (mg/ml)	Polyphenols (mg/ml) ^a				
	Green tea polyphenols				Tannic acid (0.3)
	EGCG (0.5)	ECG (0.6)	EGC (0.8)	EC (1.0)	
1. Control ^b	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
2. Original albumin					
0.05	5.01	5.03	5.02	4.95	3.20
0.10	6.02	6.01	6.00	5.98	4.45
0.15	6.52	6.48	6.50	6.51	6.50
3. Modified albumin					
(1) Deamination					
0.05	}	no growth			3.85
0.10					
0.15					
(2) Iodoacetic acid	3.20	2.80	2.50	2.30	
① Treatment at pH 2.8					
0.05	5.00	4.95	4.87	4.93	2.10
0.10	6.02	6.01	6.00	6.12	4.14
0.15	6.52	6.50	6.50	6.51	6.52
② Treatment at pH 5.5					
0.05	4.50	4.48	4.52	4.43	1.85
0.10	5.20	5.10	5.02	5.35	5.02
0.15	6.52	6.51	6.49	6.48	6.51
③ Treatment at pH 9.0					
0.05	}	no growth			3.01
0.10					
0.15					
(3) Treatment at DFP ^c	3.85	3.53	3.25	3.18	
0.05	5.02	5.01	4.98	4.99	1.98
0.10	6.01	6.05	6.15	6.14	4.50
0.15	6.48	6.49	6.50	6.51	6.55
4. Denaturated albumin					
(1) Denaturation by urea					
0.05	4.80	4.55	4.67	4.37	3.75
0.10	5.20	5.25	5.30	5.26	4.67
0.15	6.51	6.49	6.48	6.52	6.51

Tamura & Tsunoda medium 4 ml, 37°C, 72 hr.

Cell growth were expressed in volume (ml) of 0.1 N NaOH solution equivalent to acid formed.

EGCG : epigallocatechin gallate, ECG : epicatechin gallate, EGC : epigallocatechin, EC : epicatechin.

^a Polyphenols at its minimum amount for growth inhibition (mg/ml) of *Leuc. P-60*.

^b Control : only TT medium, no addition of albumin and polyphenols.

^c DFP : di-isopropylfluorophosphoric acid.

の生育阻害の停止について無処理タンパク質と比較検討した。

なお、尿素により不可逆的に変性させ、未変性タンパク質との差スペクトル⁽¹⁵⁾により確認したタンパク質についてもあわせて検討を行なった。

それらの結果を Table IV に示した。すなわち、4 種の緑茶ポリフェノールおよびタンニン酸は、カルボキシ

メチル化によるメチオニン、ヒスチジン、DFP 化によるセリンを修飾したタンパク質および尿素により変性させたタンパク質をそれぞれ添加しても、無処理タンパク質と変わらぬ阻害の停止を示した。しかし亜硝酸処理による N 末端およびリジン残基の一部のカルボキシメチル化によるリジンの ε-アミノ基の修飾をしたタンパク質を添加するとほとんど阻害の停止を示さなかった。

Fig. 3. Detection of N^{ϵ} -DNP-Lysine from Bovine Albumin. 1, after deamination; 2, after treatment with iodoacetic acid (pH 9.0); 3, control.

6. ジニトロフェニル化による末端アミノ酸および N^{ϵ} -ジニトロフェニルリジンの確認

前述のごとく血清アルブミンのN末端およびリジンの ϵ -アミノ基の部分を修飾したタンパク質を阻止量のタンニン酸を含む培地に添加しても *Leuc. P-60* の阻害の回復が見られなかった。その際、化学修飾が行なわれたことを確認するため、脱アミノ化およびヨード酢酸 (pH 9.0) 処理した血清アルブミンの DNP 化を行ない、加水分解して得られた DNP アミノ酸の検出を行なった。

Fig. 3 は N^{ϵ} -DNP-リジンの PPC の結果を示したものである。すなわち、無処理と比べて脱アミノ化およびヨード酢酸 (pH 9.0) 処理した血清アルブミンからは N^{ϵ} -DNP-リジンはほとんど検出されなかった。なお、血清アルブミンのN末端は Brown⁽¹⁶⁾ によるとアスパラギン酸 (Asp) であることが報告されている。著者らも無処理の血清アルブミンにおいて Asp であることを確認した。この際、脱アミノ化したものはほとんど Asp が検出されなかった。またヨード酢酸 (pH 9.0) 処理したものも無処理と比べて明らかに Asp が減少していた。以上のことから、脱アミノ化したタンパク質もN末端以外にリジンの ϵ -アミノ基の部分が修飾されるために、ヨード酢酸 (pH 9.0) 処理の場合と同じ傾向を示したことがわかる。

これらの結果から、タンパク質によるポリフェノールの *Leuc. P-60* 生育阻害作用の消滅はポリフェノールとタンパク質の結合によるもので、それにはタンパク質の

塩基性基とくにリジンの ϵ -アミノ基が主として関係していると推定される。なお、このことは岡村ら⁽¹⁷⁾ のコラーゲンと各種植物タンニンの結合がコラーゲンの塩基性基、とくにリジンの ϵ -アミノ基の関与が大きいことと一致する。

7. *Leuc. P-60* のタンニン酸阻害とオボアルブミン添加による影響

オボアルブミンはN末端がアセチル化⁽¹⁸⁾している。そこでタンニン酸の阻止量を含む培地にオボアルブミンを添加したさいの *Leuc. P-60* の生育阻害停止の有無を調べた。その結果、オボアルブミン 0.30 mg/ml の添加で阻害の停止を示した。このことからポリフェノールはタンパク質のN末端ではなく、他の部分で結合していることが考えられる。

要 約

(1) *Leuconostoc mesenteroides. P-60* の生育におよぼす緑茶ポリフェノールおよびタンニン酸の阻害は、タンパク質の添加により阻害が停止した。

(2) 化学修飾したタンパク質を阻止量のポリフェノールを含む培地に添加したさいの阻害停止におよぼす影響について検討した。その結果、ポリフェノールとタンパク質との結合は、リジンの ϵ -アミノ基が主に関与していることが推定できた。

終りにのぞみ、終始懇切なるご指導をいただいた千葉大学教養部彼谷俊夫教授、電子顕微鏡の技術のご指導をくださった東京農業大学農学部中村重正博士、菌体標本の作成ならびに写真撮影をしていただいたヤクルト本社研究所電子顕微鏡室の岩田真氏、石炭酸係数試験法のご教示をいただいた三共生産研究所佐橋佳郎博士に感謝します。また、DNP-アミノ酸の一部をご恵与くださった味の素中央研究所鈴木直雄氏に謝意を表します。

- (1) 西山隆造, 小崎道雄: 農化, **49**, 629 (1975).
- (2) 西山隆造, 小崎道雄: 農化, **48**, 83 (1974).
- (3) 厚生省編: 衛生検査指針 I, 細菌, 血清学的検査指針 (II), 消毒薬検査指針, 1952.
- (4) T. Swain and W. E. Hillis: *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 63 (1959).
- (5) 中林敏郎: 食品工誌, **15**, 2 (1968).
- (6) 電子顕微鏡学会編: 電子顕微鏡の理論と応用, I, II, 丸善, 東京, 1966.
- (7) 串田 弘: 超薄切片法, 文光堂, 東京, 1971.
- (8) I. M. Cassel and E. McKenna: *J. Am. Leather*

- Chem. Asso.*, **49**, 533 (1954).
- (9) R. L. Sykes : *ibid.*, **51**, 235 (1956).
- (10) N. K. Schaffer, S. C. May, Jr. and W. H. Summerson : *J. Biol. Chem.*, **202**, 67 (1953).
- (11) F. Sanger : *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- (12) A. L. Levy : *Nature*, **174**, 126 (1954).
- (13) M. Lederer : *Chromatogr. Rev.*, **2**, 84 (1960).
- (14) 中林敏郎, 木村 進, 加藤博通 : 食品の変色とその化学, 光琳書院, 東京, 1972.
- (15) 佐竹一夫 : タンパク質, 医学, 生物学のための有機化学, **3**, 朝倉書店, 東京, 1965, p.214.
- (16) J. R. Brown : *Federation Proc.*, **33**, 1389 (1974).
- (17) 岡村 浩, 小野寺幸之進 : 農化, **35**, 748 (1961).
- (18) K. Narita : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **5**, 160 (1961).
-