

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05372

研究課題名(和文) 乳酸菌に乳酸を生産させない革新的高密度培養法

研究課題名(英文) High-density cultivation method that does not allow lactic acid bacteria to produce lactic acid

研究代表者

片倉 啓雄 (Katakura, Yoshio)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：50263207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫賦活など様々な有用な機能をもつ乳酸菌の高効率な培養について検討した。嫌気状態で栄養素を最初にすべて与えて培養する従来の嫌気回分培養では、乳酸菌は著量の乳酸を生産するため、例えばpHを調整しても菌体濃度は1～3 g-dry-cell/Lにとどまる。これに対して、栄養素を徐々にあたえる流加培養を好気条件で行えば、乳酸などの有機酸の生産を抑制できることを明らかにした。カタラーゼ添加によって酸素障害を軽減し、呼吸を補助するヘムを添加して好気流加培養を行えば、*Lactococcus lactis*の菌体濃度を15時間で約20 g-dry-cell/Lに高めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌はヒトに対して免疫賦活や成人病予防など様々な有用な効果をもち、プロバイオティクスとして注目されている。プロバイオティクス市場は2030年には1000億ドルを超えるとされ、乳酸菌を効率よく安価に培養する技術が望まれている。本研究では、乳酸菌の好気流加培養について検討した結果、乳酸などの副生を抑制することによって、従来の嫌気回分培養に比べて2倍以上の収率で一桁高い菌体濃度を達成した。この成果は、乳酸の培養コストの大幅な低減を可能にし、プロバイオティクスのさらなる普及によって人々の健康に貢献する。また、カタボライト抑制が解除される流加培養でのみ発現する酸素利用関連遺伝子の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A highly efficient culture of lactic acid bacteria, which have various useful functions such as immunostimulation, was investigated. In conventional anaerobic batch culture, in which all nutrients are first provided under anaerobic conditions, lactobacilli produce significant amounts of lactic acid, so that even if the pH is adjusted, the bacteria concentration is limited to 1-3 g-dry-cell/L. In contrast, this study revealed that the production of organic acids such as lactic acid can be suppressed under aerobic condition by fed-batch culture, in which nutrients are gradually added. Furthermore, the concentration of *Lactococcus lactis* could be increased to about 20 g-dry-cell/L in 15 hours by aerobic fed-batch culture with addition of catalase and hem which reduces oxygen stress and assists respiration, respectively.

研究分野：生物化学工学

キーワード：乳酸菌 流加培養 呼吸 好気代謝 比増殖速度 酸素ストレス 高濃度培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌はプロバイオティクスとして注目され、その需要は年々高まっているが、安価に培養できないことが大きな問題となっている<sup>1)</sup>。これまで乳酸菌は、研究室においても工業生産においても、回分培養で嫌氣的に培養されてきたが、乳酸菌はその名の通り著量の乳酸を生産する。このため例えばアルカリで pH を調整しても乳酸の蓄積により増殖が阻害され、乳酸菌の終濃度は、乾燥菌体としてせいぜい  $1 \sim 3 \text{ g-cell}\cdot\text{L}^{-1}$  (OD で  $5 \sim 10$ ) にとどまる。

乳酸菌が乳酸を生産するのは、解糖系でエネルギーを得る際に還元された NAD を lactate dehydrogenase (LDH) によって再生するためである。従って、LDH 以外の代替経路で NADH を  $\text{NAD}^+$  に酸化すれば乳酸の生産を抑制できる<sup>1-4)</sup>。乳酸菌は各種の oxidase をもち、酸素を電子受容体として  $\text{NAD}^+$  を再生し LDH を代替できるが、多くの oxidase はグルコースなどの糖による抑制を受ける<sup>1)</sup>。また、oxidase は過酸化水素を副生するものがあり、過酸化水素はさらに二価の鉄イオンによってヒドロキシラジカルに変換され、酸素障害を起こす<sup>5)</sup>。

### 2. 研究の目的

#### (1) 高密度培養条件の検討

そこで本研究では、流加培養によって糖濃度を低く保つ好気培養によって乳酸生産を抑制し、高密度培養の実現を目指した。この際、設定する比増殖速度は、培養時間短縮のためには高い方が望ましい。しかし、解糖系での  $\text{NAD}^+$  消費速度は比増殖速度とともに増加して、代替経路の能力を上回り、乳酸が生産される。そこで、流加培養における比増殖速度が乳酸などの代謝産物の比生産速度、菌体収率、酸素比消費速度などに及ぼす影響を検討し、高密度培養のための条件を検討する。

#### (2) 酸素障害の回避

好気培養においては、酸素を電子受容体として利用する一連の遺伝子や、それに伴って生産される過酸化水素に起因する障害に対応する様々な遺伝子が発現すると考えられる。また、これらの遺伝子の多くは回分培養ではカーボンカタボライト抑制を受けると考えられる。カタボライト抑制が解除される流加培養において、発現する遺伝子を網羅的に解析することによって、酸素に対する応答と障害の機構を理解し、酸素障害を回避するための知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 菌株と培養

*Lactococcus lactis* MG1363 または *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NCIMB8826 を、MRS 培地を用い、それぞれ  $37^\circ\text{C}$  または  $30^\circ\text{C}$  で培養した。流加培養は、初期液量  $V_0$  [L]、初期菌体濃度  $X_0$  [ $\text{g}\cdot\text{cell}\cdot\text{L}^{-1}$ ] の菌体に対して、比増殖速度  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] の設定値を  $\mu^*$  [ $\text{h}^{-1}$ ] とするとき、予備実験の結果を参考に菌体収率  $Y_{X/S}$  [ $\text{g}\cdot\text{cell}\cdot\text{g}^{-1}$ ] を仮定し、糖濃度  $S_f$  [ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ] の培地を  $t$  [h] 後の流速  $F$  [ $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ] が  $F = \mu^* V_0 V_0 \exp(\mu^* t) / (S_f Y_{X/S})$  となるように流加した<sup>3, 4)</sup>。

#### (2) 酸素比消費速度

内側に蛍光膜を貼り付けた小試験管に菌体懸濁液を  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  のグルコースを含む MRS 培地に懸濁し、ボルテックスして酸素飽和した後、蛍光式溶存酸素センサー (DBF-1131、バイオット) で溶存酸素濃度の減少速度を測定し、菌体濃度で除すことによって算出した。

#### (3) RNAseq 解析

菌体は細胞壁を  $30 \text{ mg/mL}$  のリゾチームと  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  のムタノリシンを用いて消化し、市販 RNA 抽出キットで RNA を抽出した。解析は筑波大学のオープンファシリティー推進機構に依頼し、遺伝子長を  $1 \text{ kb}$  に総リード数を  $100$  万に補正した TPM 値を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 比増殖速度が乳酸生産と収率に及ぼす影響<sup>6)</sup>

既に、合成培地を用いて好気条件で流加培養を行えば、乳酸生産を抑制できることを確認しているが、複合培地である MRS 培地でも同様の結果を得た。解糖系のフラックスは比増殖速度に伴って高まり<sup>4)</sup>、これが LDH の代替経路の能力を超えれば乳酸が生産されたと考えられた。そこで、MRS 培地を用い、比増殖速度  $\mu$  を  $0.1 \sim 0.45 \text{ h}^{-1}$  に設定して流加培養を行った (図 1)。

その結果、乳酸の比生産速度  $\rho_L$  は  $\mu$  が  $0.2 \text{ h}^{-1}$  までは漸増したが低く抑えることができ、 $\mu$  が  $0.2 \text{ h}^{-1}$  を超えると急激に増加した。アセトインは  $\mu$  が  $0.2 \text{ h}^{-1}$  までは生産されなかったが、これを超えると急激に生産が増加した。酸素比消費速度  $Q_{O_2}$  は  $\mu$  とともに  $1.6$  から  $2.7 \text{ mmol}\cdot\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  に増加した。解糖系のフラックスは  $\mu$  とともに増加するので、 $\mu$  が  $0.2 \text{ h}^{-1}$  までは oxidase をはじめとする代替経路で  $\text{NAD}^+$  再生を賄っていたが、これ以上になると、LDH や diacetyl reductase で  $\text{NAD}^+$  を再生すると考えられた。

一方、酢酸の比生産速度は、 $\mu$  が  $0.2 \text{ h}^{-1}$  がピークであった。これは低い  $\mu$  では不足するエネルギーを補うために acetate kinase を誘導したが、糖濃度が高まる高い  $\mu$  ではカタボライト抑制がかかると考えた。菌体収率  $Y_{X/S}$  は  $\mu$  が  $0.1 \sim 0.15 \text{ h}^{-1}$  で  $0.23 \text{ g}\cdot\text{cell}\cdot\text{g}^{-1}$  に達したが、これ以上

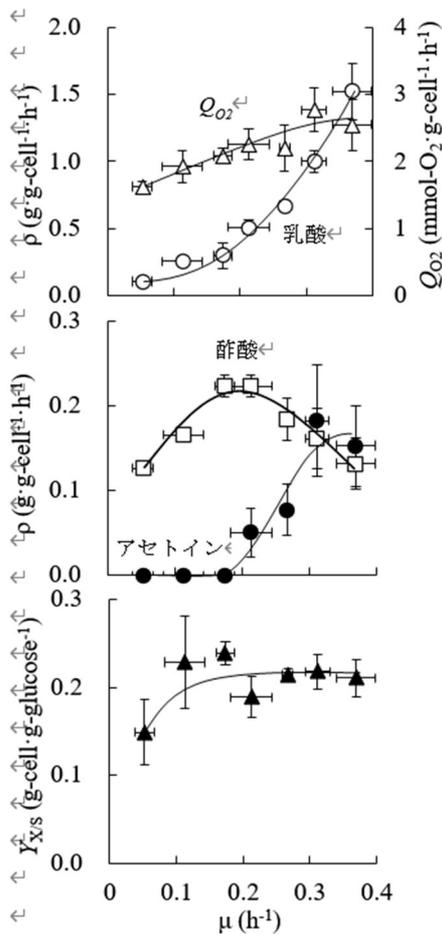


図 1. 比増殖速度が乳酸菌の代謝と呼吸活性に及ぼす影響

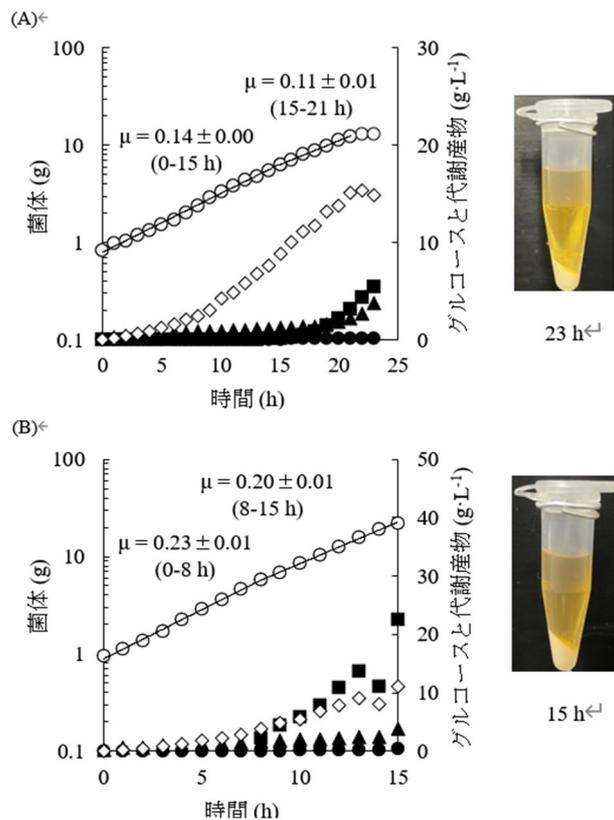


図 2. *Lactococcus lactis* MG1363 の高密度培養 (A)  $\mu^*=0.15 \text{ h}^{-1}$ . (B)  $\mu^*=0.25 \text{ h}^{-1}$ , hemin を  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  添加. ○, 菌体; □, グルコース; ▲, 酢酸; ●, アセトイン; △, 乳酸. 写真は最終の培養液を遠心分離したもの.

の $\mu$ では副生物が増え、 $0.2 \text{ g}\cdot\text{cell}\cdot\text{g}^{-1}$ を下回った。

### (2) 高濃度培養<sup>6)</sup>

乳酸や酢酸などの副産物生成を抑制した高密度培養を試みた。まず、 $\mu^*$ を  $0.15 \text{ h}^{-1}$  に設定し改変 MRS 培地を流加したところ、15 時間までは  $\mu$  は  $0.14 \text{ h}^{-1}$  で保てたが、その後は次第に減少し 21 時間後には菌体濃度  $11.2 \text{ g}\cdot\text{cell}\cdot\text{L}^{-1}$  で増殖は停止した(図 2(A))。この時、乳酸濃度は  $2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  にとどまったが、酢酸が  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  に達しており、これによる阻害のため、増殖が停止したと考えられた。酢酸の蓄積を防ぐには、 $\mu$  を高く設定して解糖系でより多くの ATP を生産する必要があるが、酸素による  $\text{NAD}^+$  の再生能力が不足すると、乳酸が蓄積すると予想された。

そこで、ヘムを添加することで乳酸菌の呼吸鎖を活性化し<sup>7)</sup>、プロトン濃度勾配による ATP 生産の促進を試みた。 $\mu^*$ を  $0.25 \text{ h}^{-1}$  に設定しヘムを  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  添加したところ、8 時間まで  $0.23 \text{ h}^{-1}$  で増殖し、その後も培養液量が上限に達した 15 時間後まで  $0.20 \text{ h}^{-1}$  で増殖を続けた。この時の菌体濃度は  $18.8 \text{ g}\cdot\text{cell}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $5.6 \times 10^{10} \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) であり、ヘムを添加しない培養に比べて 3 割短い時間で 1.8 倍の菌体が得られた。最終の乳酸と酢酸の濃度はそれぞれ  $3.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  と  $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  に抑えることができた。これに伴って 8 時間までの菌体収率は  $0.42 \text{ g}\cdot\text{cell}\cdot\text{g}\cdot\text{glucose}$  に達し、それ以降も  $0.26 \text{ g}\cdot\text{cell}\cdot\text{g}\cdot\text{glucose}$  を維持できた。回分培養での菌体収率が  $0.1 \text{ g}\cdot\text{cell}\cdot\text{g}\cdot\text{glucose}$  程度にとどまるのに比べて大きく改善することができた。

これまでに様々な方法で乳酸菌の高密度培養が報告されているが<sup>8-12)</sup>、イオン交換樹脂や滲流培養などの大掛かりな装置で乳酸を除去するものが多い<sup>10-12)</sup>。これに対して、本研究の乳酸生産自体を抑える流加培養は、外付けポンプだけで実施でき、これまで報告された流加培養の中でも 15 時間という最も短い時間で、 $5.6 \times 10^{10} \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  という最も高い菌体濃度を達成した(表 1)。

### (3) RNAseq による網羅的遺伝子解析

本研究では、乳酸菌の従来の嫌気回分培養に対して、好気条件で糖を徐々に添加する流加培養を行えば、酸素を電子受容体とする代謝を誘導し、乳酸をはじめとする有機酸の生産を抑制できることを示した。これまでも、乳酸菌を好気培養する研究は多数あるが、そのほとんどは回分培養であり、カーボンカタボライト抑制がかかった状態で検討されてきた。本研究では、流加培養により、カーボンカタボライト抑制が解除された状態で好気培養を行っているが、この状態でのどのような遺伝子が発現しているのかはわかっていない。そこで、RNAseq によって網羅的な遺伝子発現解析を行った。

表 1. 乳酸菌の高密度培養

乳酸蓄積に対する戦略 <sup>↙</sup> 菌種 <sup>↙</sup>	通気 <sup>↙</sup>	最大菌体濃度 <sup>↙</sup>		培養時間 <sup>↙</sup> (h) <sup>↙</sup>	参考 <sup>↙</sup> 文献 <sup>↙</sup>	
		$\times 10^{10}$ cfu $\cdot$ mL <sup>-1</sup> <sup>↙</sup>	g $\cdot$ L <sup>-1</sup> <sup>↙</sup>			
指数流加培養 <sup>↙</sup>	<i>Lactococcus lactis</i> <sup>↙</sup>	+ <sup>↙</sup>	5.6 <sup>↙</sup>	18.8 <sup>↙</sup>	15 <sup>↙</sup>	本研究 <sup>↙</sup>
フィードバック制御 <sup>↙</sup>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <sup>↙</sup>	- <sup>↙</sup>	1.3 <sup>↙</sup>	n.d. <sup>↙</sup>	24 <sup>↙</sup>	9 <sup>↙</sup>
指数流加培養 <sup>↙</sup>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <sup>↙</sup>	- <sup>↙</sup>	0.9 <sup>↙</sup>	n.d. <sup>↙</sup>	32 <sup>↙</sup>	10 <sup>↙</sup>
イオン交換樹脂 <sup>↙</sup>	<i>Pediococcus acidilactici</i> <sup>↙</sup>	- <sup>↙</sup>	$1.7 \times 10^4$ <sup>↙</sup>	n.d. <sup>↙</sup>	18 <sup>↙</sup>	11 <sup>↙</sup>
イオン交換樹脂 <sup>↙</sup>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <sup>↙</sup>	- <sup>↙</sup>	n.d. <sup>↙</sup>	34.5 <sup>↙</sup>	12 <sup>↙</sup>	12 <sup>↙</sup>
灌流培養 <sup>↙</sup>	<i>Lactobacillus delbruekii</i> <sup>↙</sup>	+ <sup>↙</sup>	n.d. <sup>↙</sup>	18.6 <sup>↙</sup>	50-65 <sup>↙</sup>	13 <sup>↙</sup>

n.d., not determined

培養モードと通気の有無が遺伝子発現に及ぼす影響

まず、*Lactiplantibacillus plantarum* NCIMB 8826 株を用いて、MRS 培地での回分培養と $\mu^*$ を 0.1 h<sup>-1</sup> に設定した流加培養を、嫌気および好気条件で行い RNAseq 解析に供した。発現が 2 倍以上増加した遺伝子は、嫌気回分から好気回分では 132、嫌気回分から嫌気流加で 405、嫌気流加から好気流加で 214、好気回分から好気流加では 550 あった。回分培養よりも流加培養で発現が増加する遺伝子の数は、嫌気条件よりも好気条件の方が多かった。好気条件で回分培養よりも流加培養で発現が増加した遺伝子の中には、単に流加培養でグルコース抑制が解除されるだけでは発現せず、好気条件ないし過酸化水素が存在することで誘導される遺伝子も含まれていると考えられる。

好気流加培養で発現が増加した遺伝子の上位には、glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*) や pyruvate oxidase (*pox5*) といった過酸化水素の生産に関わる遺伝子、過酸化水素を分解し NAD<sup>+</sup> を再生する NADH peroxidase (*npr2*) の他に、鉄硫黄クラスター様の配列をもつ機能未知タンパク質 (*lp\_2113*) が含まれていた(表 2)。グリセロール代謝に関わり、過酸化水素を副産する *glpD* の TPM 値は、嫌気回分での 223 から、好気流加培養では 4,996 に増加し、グリセリンの取り込みを担う *glpF3* とリン酸化を担う *glpK* についても好気流加培養でそれぞれ 7,526、2,485 と他の試験区の 10 倍以上発現が増加していた。pyruvate oxidase をコードする遺伝子は *pox1* ~ 5 の 5 つあるが、好気流加培養で発現が増加していたのは *pox3*、*pox5* のみで、それぞれの TPM 値は 921、11,148 と他の試験区の 10 倍以上発現が増加していた。過酸化水素の生産にかかわる遺伝子の多くは、回分培養では好気条件であってもその発現は増加せず、カーボンカタボライト抑制を受けていると考えられた。

NADH peroxidase (NPR) をコードする *npr2* の TPM 値は、嫌気条件に比べ好気回分培養では 956 と 4 倍ほど増加し、好気流加培養では 2,815 と 10 倍以上発現が増加していた(表 2)。NPR をコードするもう一つの遺伝子である *npr1* は最大でも 11 とどの条件でもほとんど発現していなかった。このことから、*L. plantarum* の好気流加培養では、過酸化水素を電子受容体とした NAD<sup>+</sup> 再生経路が利用されていることがわかった。*L. plantarum* strain Lp80 の好気回分培養では、定常期の初期に *pox3* と *pox5* が発現することが報告されており<sup>13)</sup>、今回得られた知見と矛盾しない。また、NOX をコードする遺伝子では *nox5* の発現が最も大きかったが、好気流加培養での TPM 値は 450 程度で *glpD* や *pox5*、*npr2* に比べて小さく、主要な NAD<sup>+</sup> 再生経路ではないと考えられる。

一方、*lp\_2113* は好気流加培養でのみ 13,430 まで発現が増加し、発現している遺伝子の 1% 以上を占めていた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> からは鉄イオンが存在すると、フェントン反応によって、より有害なヒドロキシルラジカルが生じるが、*lp\_2113* は鉄キレートタンパク質と相同性があり、鉄イオンをキレートして酸素障害を回避している可能性がある。現在、組換え *lp\_2113* を調製して鉄キレート能を確認するとともに、遺伝子破壊実験で酸素感受性が高まるかを確認している。

表 2. 好気流加培養で発現する *Lactiplantibacillus plantarum* の遺伝子の TPM 値 (抜粋)

Entry	回分		流加		予想される機能
	嫌気	好気	嫌気	好気	
<i>lp_2113</i>	541	1645	1310	13430	鉄キレートタンパク質
<i>lp_2629</i>	37	36	32	921	Pyruvate oxidase ( <i>pox3</i> )
<i>lp_3589</i>	696	663	1077	11148	Pyruvate oxidase ( <i>pox5</i> )
<i>lp_2544</i>	252	956	208	2815	NADH peroxidase ( <i>npr2</i> )
<i>lp_0372</i>	229	49	574	7526	グリセリン取り込み ( <i>glpF3</i> )
<i>lp_0370</i>	173	34	226	2485	Glycerol kinase ( <i>glpK</i> )
<i>lp_0371</i>	223	54	431	4996	Glycerophosphate oxidase ( <i>glpD</i> )
<i>lp_0756</i>	903	815	886	956	Glycerophosphate dehydrogenase ( <i>glpDh</i> )

比増殖速度が遺伝子発現に及ぼす影響

回分培養では、好気条件であっても oxidase をはじめとする酸素を利用する遺伝子の多くがカーボンカタボライト抑制を受けていると考えられた。指数流加培養では  $\mu$  の設定によって培地中の糖の濃度を様々なレベルで一定に保つことができる。そこで、*L. lactis* MG1363 について、流加培養で  $\mu$  が 0.12、0.16、0.26 h<sup>-1</sup> で増殖する菌体と、回分培養で  $\mu$  が 0.80 h<sup>-1</sup> で増殖する菌体から mRNA を抽出して、RNAseq 解析に供した。

その結果、NADH dehydrogenase をコードする *noxB* の発現量は流加培養で倍以上に高まっていた。過酸化水素副生型の NADH oxidase をコードする *noxC* および *noxE*、pyruvate oxidase をコードする *poxL* も流加培養での発現が高まっていた。しかし、*noxB* および *noxE* の発現は、 $\mu$  が 0.26 h<sup>-1</sup> で脱抑制されていたが、*noxC* および *poxL* の発現はそれほど高まっておらず、遺伝子によってカタボライト抑制のレベルに差が認められた。

現在、リアルタイム PCR による確認を行っているが、酸素利用関連遺伝子の発現は、 $\mu$  によって抑制のレベルが異なることが予想される。過酸化水素を生産する能力と消去する能力(あるいはフェントン反応を回避する能力)のバランスによって酸素障害の受け方が異なると考えられ、今後は生産を抑制するとともに消去能力を誘導することによって、障害の軽減を目指す。

#### (4) 総括

本研究では好気条件で流加培養を行うことによって、乳酸生産を抑制し、乳酸菌を高濃度まで培養することに成功した。本研究で得られた知見は、乳酸菌の培養コストの低減に貢献できる。また、回分培養ではそのほとんどの区間で糖濃度が高く、多くの遺伝子がカーボンカタボライト抑制を受けているのに対して、糖濃度を低く維持する流加培養では多くの遺伝子の抑制が解除され、好気条件においては、酸素を電子受容体として NADH から NAD<sup>+</sup>を再生する一連の oxidase が誘導されることが分かった。いくつかの oxidase は過酸化水素を副生するが、これらは好気流加培養において発現が高まっていた。過酸化水素は 2 価の鉄と反応して、フェントン反応によってヒドロキシラジカルを生じ、酸素障害を引き起こす。これに対応するため、過酸化水素を消去する peroxidase などの酵素や、鉄をキレートしてフェントン反応を防ぐと考えられるタンパク質の発現も誘導されていた。

解糖系によってエネルギーを得るには、NAD<sup>+</sup>の再生が不可欠であるが、酸素を電子受容体とする NAD<sup>+</sup>の再生は、有機物を電子受容体とする再生に比べて炭素収率が高く、培養コスト的に有利である。しかし、過酸化水素の発生とこれに付随する酸素障害を回避する研究が合わせて必要であり、過酸化水素の生産系よりも先に消去系を誘導する工夫などが今後の研究課題になる。乳酸菌をカーボンカタボライト抑制が解除された好気条件で培養した研究はこれまでにほとんどなく、本研究は乳酸菌の隠された能力を理解する糸口になるだろう。

<引用文献>

- 1) **片倉啓雄**, 一瀬涼, 神原大樹: 乳酸菌の好氣的流加培養, 日本乳酸菌学会誌, **33**, 12-19 (2022).
- 2) R. Ichinose, Y. Fukuda, **S. Yamasaki-Yashiki** and **Y. Katakura**: Suppression of lactate production of *Lactobacillus reuteri* JCM1112 by co-feeding glycerol with glucose. J. Biosci. Bioeng., **129**, 110-115 (2019).
- 3) M. Kawai, A. Tsuchiya, J. Ishida, N. Yoda, **S. Yamasaki-Yashiki** and **Y. Katakura**: Suppression of lactate production in fed-batch culture of some lactic acid bacteria with sucrose as the carbon source. J. Biosci. Bioeng., **129**, 535-540 (2019).
- 4) Sano, M. Takatera, M. Kawai, R. Ichinose, **S. Yamasaki-Yashiki** and **Y. Katakura**: Suppression of lactate production by aerobic fed-batch culture in *Lactococcus lactis*, J. Biosci. Bioeng., **130**, 402-408 (2019).
- 5) 山本裕司ら: 乳酸菌の酸素耐性メカニズム. 農芸化学会誌, **76**, 843-845 (2002).
- 6) R. Ichinose, **S. Yamasaki-Yashiki** and **Y. Katakura**: Analysis of the effects of specific growth rate of *Lactococcus lactis* MG1363 on aerobic metabolism and its application to high-density culture, J. Biosci. Bioeng., **136**, 129-135 (2023).
- 7) Blank, L. *et al.*: Hemin reconstitutes proton extrusion in an H<sup>+</sup>-ATPase-negative mutant of *Lactococcus lactis*, J. Bacteriol., **183**, 6707-6709 (2001).
- 8) S. Cui *et al.*: High-density cultivation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* using an automatic feedback feeding method. Lebensm. Wiss. Technol., **112**, 108232 (2019).
- 9) T. Xiong *et al.*: High-density cultivation of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in an ammonium and glucose fed-batch system. Afr. J. Biotechnol., **10**, 7518-7525 (2011).
- 10) M. Othman *et al.*: Growth enhancement of probiotic *Pediococcus acidilactici* by extractive fermentation of lactic acid exploiting anion-exchange resin. Front. Microbiol., **9**, 2554 (2018).
- 11) S. Cui *et al.*: High-density culture of *Lactobacillus plantarum* coupled with a lactic acid removal system with anion-exchange resins. Biochem. Eng. J., **115**, 80-84 (2016).
- 12) C. Schiraldi *et al.*: High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production. Biotechnol. Bioeng., **82**, 213-222 (2003).
- 13) P. Goffin *et al.*: Involvement of pyruvate oxidase activity and acetate production in the survival of *Lactobacillus plantarum* during the stationary phase of aerobic growth. Appl. Environ. Microbiol., **72**, 7933-7940 (2006).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katakura Yoshio, Ichinose Ryo, Kambara Daiki	4. 巻 33
2. 論文標題 Aerobic fed-batch culture of lactic acid bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria	6. 最初と最後の頁 12 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4109/jslab.33.12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichinose Ryo, Yamasaki-Yashiki Shino, Katakura Yoshio	4. 巻 136
2. 論文標題 Analysis of the effects of specific growth rate of Lactococcus lactis MG1363 on aerobic metabolism and its application to high-density culture	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 129 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2023.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yoshio Katakura
2. 発表標題 Interaction between lactic acid bacteria and carbohydrates
3. 学会等名 The 12th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daiki Kambara, Honoka Nagai, Shino Yamasaki-Yashiki, Yoshio Katakura
2. 発表標題 Avoiding oxygen damage in high efficiency culture of lactic acid bacteria
3. 学会等名 The 15th International Symposium in Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Ichinose, Shino Yamasaki-Yashiki, Yoshio Katakura
2. 発表標題 Highly efficient cultivation of lactic acid bacteria that does not produce lactic acid
3. 学会等名 The 15th International Symposium in Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神原 大樹、山崎 思乃、片倉 啓雄
2. 発表標題 L. plantarumの好気流加培養における網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本乳酸菌2022年度学会秋期セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshio Katakura
2. 発表標題 Efficient production of lactic acid bacteria by aerobic fed-batch culture
3. 学会等名 The 11th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片倉啓雄
2. 発表標題 好氣的流加培養による乳酸菌の高効率培養
3. 学会等名 日本乳酸菌学会設立30周年記念シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山崎 思乃  (Yamasaki-Yashiki Shino)  (50602182)	関西大学・化学生命工学部・准教授   (34416)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------