

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月27日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780075

研究課題名（和文） 乳酸菌と酵母の複合バイオフィーム形成

研究課題名（英文） Mixed-species biofilm formation between
lactic acid bacteria and yeast

研究代表者

古川 壮一（FURUKAWA SOICHI）

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：40339289

研究成果の概要（和文）：

Lactobacillus plantarum ML11-11と出芽酵母による複合バイオフィームの形成には、乳酸菌の表層タンパクと酵母表層のマナンを介した細胞間接着が必要であった。検討の結果、乳酸菌の表層タンパクが認識するのは、マンナン主鎖にマンノースがひとつ以上付加した構造であることが明らかになった。また、複合BFを固定化菌体として用いる複合BFリアクターの開発につながる基礎的知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and budding yeast was necessary for mixed-species biofilm formation of them. It is clarified that the specific structure, consisted of mannan main chain to which are attached side chains containing one or more mannose residues, is critical for co-aggregation with *L. plantarum* ML11-11. It was indicated that the biofilm reactor using above mixed-species biofilm have a potential for developing the continuous fermentation processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：乳酸菌・酵母・複合系・バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

福山酢とは、鹿児島県霧島市福山町で200年余りにわたり、壺を用いた特殊な製法により発酵生産されている米酢である。

申請者らは、そのもろみから分離した酵母と乳酸菌のスクリーニングを行い、共培養すると顕著にバイオフィームを形成する酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* Y11-43) と乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ML11-11) の組み合わせを見出した。

その後の検討で、今回分離した乳酸菌 (*L. plantarum* ML11-11) が分離菌以外の清酒酵母などの実用酵母及び遺伝情報や実験ツールが整備されている実験室酵母とも複合バイオフィームを形成可能であることを明らかにすることができた。一方、現在までに百数十株程度の乳酸菌について検討を行っているが、今のところ本活性を有する株は分離乳酸菌 ML11-11 と併せて計6株のみである。このことから、本現象は限られた乳酸菌が有する特殊な性質に依存していると考えられる。

申請者らの分離した *L. plantarum* ML11-11 と出芽酵母を共培養すると、固体表面に酵母細胞を高密度に含む強固な酵母・乳酸菌複合バイオフィームを形成させることができる。

また、これまでの研究から、*L. plantarum* ML11-11 は、出芽酵母と高い凝集活性を示すことが明らかとなっており、実際、両菌液を混合すると数分で肉眼で確認できる凝集塊が多く形成される。このことから、乳酸菌 ML11-11 と出芽酵母による複合バイオフィーム形成は、*L. plantarum* ML11-11 と出芽酵母の高い凝集性、及び *L. plantarum* ML11-11 の担体との高い親和性、の2つに依存していると考えられる。出芽

酵母を加熱しても凝集能は喪失しないが、乳酸菌 *L. plantarum* ML11-11 を加熱すると凝集能が喪失し、またマンノースの添加でも凝集能が喪失したことから、出芽酵母側の因子はマンナンなどの多糖であり、乳酸菌の表層因子はタンパクであることが推定された。

2. 研究の目的

清酒や醤油をはじめとする多くの伝統発酵食品においては、乳酸菌と酵母が共存している場合が多く、それらを含む多種多様な微生物間の相互作用が発酵の安定性や製品の質に大きく影響を及ぼしていると考えられる。また、「もろみ」中では、固形物表面に微生物細胞が付着し集落を形成することもまた、発酵の安定化に一定の役割を果たしているのではないかと考えている。我々は、鹿児島福山町で200年余りに渡りつくられてきた福山酢より、共培養すると顕著に複合バイオフィームを形成する酵母と乳酸菌を見出した。本研究では、これらの複合バイオフィームの形成機構解明を目指すと共に、複合バイオフィームを固定化菌体として用いることによる新しい物質生産システムの構築を目指す。

ところで、多くの東アジアの伝統的発酵は、「もろみ」の状態で行われる。「もろみ」は多く固形物を含む。「もろみ」中では、固形物表面に微生物細胞が付着して一種のバイオフィームのような状態となっており、発酵が進行するのでないかと考えられ、こうした微生物の付着は、発酵の安定化に一定の役割を果たしているのではないかと考えられる。

なお、バイオフィームとは、一般に固体液相界面に形成されるフィルム状の微生物集落のことを指し (Microbial Biofilms, ASM Press, Washington (2004))、菌体がつくる

菌体外多糖に囲まれている場合が多い。一般に、バイオフィームは、各種の物理・化学的処理に対して高い耐性を示すため、医療をはじめとする種々の産業活動において問題視されてきた。ただ、その一方で、バイオフィームは水の浄化などにも貢献しており、必ずしも悪い面ばかりではない。実際には、バイオフィーム形成はほとんど全ての微生物が有する普遍的な性質であると考えられるので、意図せず色々な分野で利用されてきた可能性があり、発酵・醸造分野もそのひとつなのではないかと考えられる。

本申請研究では、*L. plantarum* ML11-11 と出芽酵母が複合バイオフィームを形成機構するために必要な互いの因子を明らかにするとともに、複合バイオフィームを固定化菌体として利用することによる物質生産への利用に関する基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

乳酸菌と出芽酵母の複合バイオフィーム形成機構解明とその固定化菌体としての利用基盤技術の創出を目指す。まず、複合バイオフィーム形成に必要な、乳酸菌 *L. plantarum* ML11-11 と出芽酵母それぞれの表層因子の同定を行い、そのことを通して、複合バイオフィーム形成機構解明を行う。乳酸菌と酵母の表層因子の同定は、変異株もしくは欠損株ライブラリーのスクリーニングとプロテオーム解析を並行して行った。

次に、複合バイオフィームを固定化菌体として用いることによる新しい物質生産システムの構築を目指す。まずは、エタノール発酵を対象に研究を行う。特に、繰返し使用耐性の向上、連続化、及び、コンタミネーション耐性化に関する検討を行った。

まず、乳酸菌の複合バイオフィーム形成に必要な表層因子の探索に関しては、*L.*

plantarum ML11-11 のトランスポゾン変異株ライブラリーの構築を行い、これを用いて、複合バイオフィーム非形成変異株のスクリーニングを行うことにより、複合バイオフィーム形成に必要な遺伝子の獲得を目指した。

次に、*L. plantarum* ML11-11 ショットガンクローンライブラリーのスクリーニングに関しては、共凝集活性を有しない *L. plantarum* ML11-11 変異株に野生株ゲノムのショットガンクローンを導入することによりライブラリーを構築し、これを用いて、複合バイオフィーム形成変異株のスクリーニングを行うことにより、マルチサブレッサークローンの獲得を目指した。

L. plantarum ML11-11 表層タンパクのプロテオーム解析に関しては、現在までの検討より、乳酸菌側の表層因子はタンパクであることが推定されることから、乳酸菌の表層タンパクを抽出し、二次元電気泳動から LC/MS/MS 解析を行い、表層タンパクのプロファイルを調査した。

予備的検討結果より、酵母側の因子はマンナンであることがある程度推定されたが、複合バイオフィーム形成に関わる遺伝子は多岐に渡るものと考えられるため、出芽酵母遺伝子欠損株ライブラリーを用いたマンナン生合成欠損株を対象とするスクリーニングと併せてランダムスクリーニングも行った。

スクリーニングには、出芽酵母遺伝子欠損ハプロイド株ライブラリー (BY4741 haploid background (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)) を用い、複合バイオフィーム非形成変異株を探索した。

また、複合バイオフィームリアクターの実用展開に向けた基礎的研究については、セルロースビーズを担体として用いた連続

式複合バイオフィルムリアクターを作製し、連続エタノール発酵能について検討する。また、併せて、バクテリオシン生産乳酸菌を、複合対象菌として用いることにより、コンタミネーション耐性化に関する検討を行った。

4. 研究成果



図1. 福山壺酢の発酵風景

鹿児島県の福山酢（図1）もろみから分離された乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ML11-11）は、出芽酵母と共培養すると顕著に複合バイオフィルムを形成し（図2、3）、同時にそれらは高い共凝集活性を有していた。そこで本申請研究においては、共凝集機構の解明、及び、複合バイオフィルムの固定化菌体としての利用に関する基礎的検討を行った。

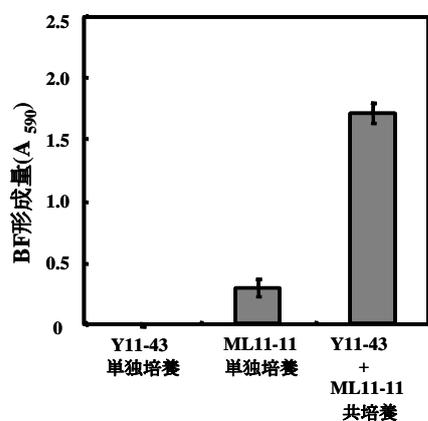


図2. 壺酢由来乳酸菌 (ML11-11) と酵母 (Y11-43) のBF形成量

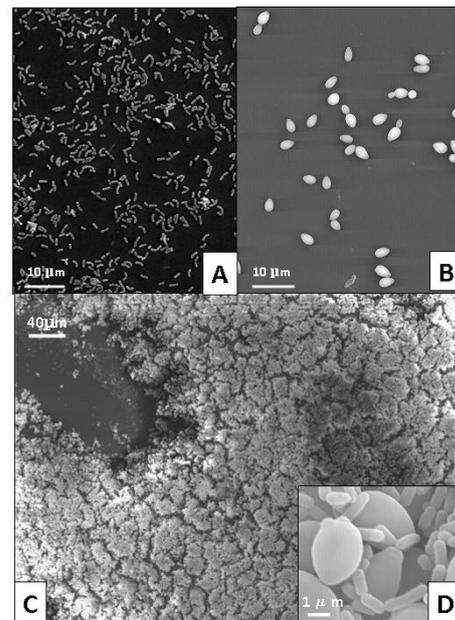


図3. 福山酢分離乳酸菌 (ML11-11) と同分離酵母 (*S. cerevisiae* Y11-43) の単独及び複合バイオフィルムの走査型電子顕微鏡写真。

- A. 福山酢分離乳酸菌の単独バイオフィルム。
- B. 福山酢分離酵母の単独バイオフィルム。
- C. 福山酢分離乳酸菌と同分離酵母の複合バイオフィルム。
- D. 福山酢分離乳酸菌と同分離酵母の複合バイオフィルム。

まず、共凝集特性について検討を行ったところ、本共凝集は pH 3 以下と 12 以上の環境及びマンノースを添加した環境では抑制され、乳酸菌表層をプロテアーゼで処理した場合も共凝集しなかった。また、乳酸菌細胞を加熱した場合には共凝集は起こらなかった。これらのことから、本乳酸菌と酵母の共凝集は、乳酸菌の表層タンパクと酵母の表層のマンナンを介して行われていることが強く示唆された（図4）。

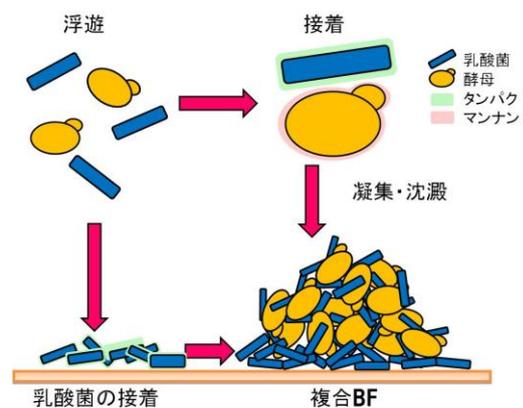


図4. 複合バイオフィルム形成と接着のモデル。

次に、両菌液を混合後、凝集沈殿後の上清部分から菌液を採取し、それらを乳酸菌もし

くは酵母の選択培地で培養することを繰り返し行った結果、15株の非凝集性乳酸菌自然変異株を得ることが出来た。一方、酵母の変異株は取得できなかった。本乳酸菌非凝集性変異株の複合バイオフィーム形成能は著しく低く、複合バイオフィーム形成には、共凝集が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

さらに、非凝集性乳酸菌自然変異株の表層タンパクを抽出し SDS-PAGE によりそのプロファイルと比較したところ、非凝集性変異株において発現が著しく減少しているタンパクが見出された。そこで、質量分析法を用いて当該タンパクの同定を行い、現在得られた部分ペプチド配列から候補タンパク質の絞り込みを行っている。今後、当該部分ペプチド配列を有するタンパク質の遺伝子のクローニングを行いたい。

なお、共凝集に必要な乳酸菌の表層因子に関しては、約 8,500 株より成る ML11-11 のトランスポゾン変異株ライブラリーを構築することができた。現在までに千数百株程度スクリーニングを行ったが、有意に共凝集活性を失ったものは得られていない。また、ML11-11 の非凝集変異株を用いることによるマルチコピーサプレッサースクリーニングを行うべく、ショットガンクローンライブラリースクリーニングの構築を進めているが、これまでにゲノム DNA の安定抽出を行うことができるようになり、現在ライブラリー作製を進めている。共に、今後さらに検討を継続したい。

一方、共凝集に必要な出芽酵母表層マンナンに関しては、出芽酵母遺伝子欠損ハプロイド株ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。結果、マンナンの主鎖にマンノースがひとつ付加した構造を乳酸菌表層のタンパクが認識して接着していることが明らか

かになった。さらに、当該遺伝子 (*mnn2*) 相補実験を行った結果、共凝集現象が再現された (図 5)。

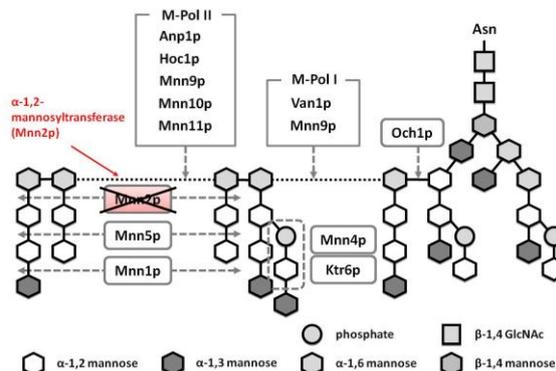


図5. 酵母マンナンの構造と生合成タンパク。

さらに、これまでに複合 BF を固定化菌体として用いる複合 BF リアクターの試作と発酵試験を行った。まず、シャーレ底部に形成させた複合バイオフィームを用いてアルコール発酵が可能かどうかを検討したところ、複合バイオフィームは洗浄操作を行ってもシャーレ底面に保持され、アルコール生産に利用可能なことが確認された。また、複合バイオフィームを形成させたガラスビーズやセルロースビーズを担体としてカラムリアクターを用いて反復回分培養を行った結果、同系は、収率や安定性が高いことが確認された。

次に、スケールアップと発酵の連続化について検討を行った。全容 670 ml 容のガラス容器に複合バイオフィームを形成させたセルロースビーズを充填したリアクターを用いて連続発酵システムを構築し、チューブポンプを用いて連続発酵試験を行った結果、10 日間にわたってアルコールが連続生産可能であった (図 6)。そこで、このリアクターを用いて、菌を追加接種することなく、約 1 カ月にわたる連続運転を試みたところ、途中トラブルにより非正常状態が発生したものの発酵を継続することができた。これらの結果より、乳酸菌と酵母の複合バイオフィーム

を用いたリアクターは、長期間の連続使用に適したロバスト性（堅固な安定性）を備えていることが期待された。

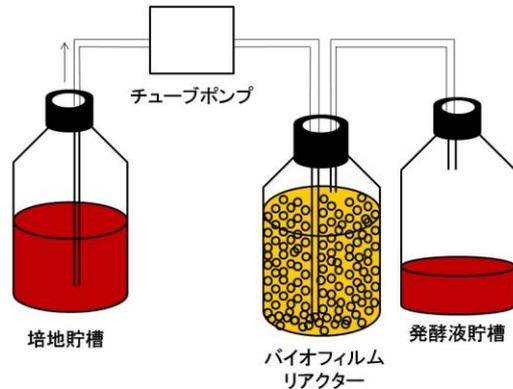


図6. 共培養バイオフィームを利用した連続発酵システムの概略図。

なお、酵母と乳酸菌の共培養系に、大腸菌や枯草菌などをモデル雑菌として接種したところ、共培養系は優れた雑菌排除能を有することが示唆された。乳酸菌と酵母の複合バイオフィームを用いた連続発酵リアクターで安定した連続運転が可能な理由は、バイオフィームとして酵母細胞が固定化されて系外へ流出しにくくなったことに加えて、優れた雑菌排除能によるのではないかと考えられた。

これらのことから、本申請研究を通して、「低殺菌自律複製型固定化BFリアクター」の作製につながる基礎的知見を得ることができたものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

① Junji Shimazaki, Soichi Furukawa, Hirokazu Ogihara, Yasushi Morinaga, L-Tryptophan prevents *Escherichia coli* biofilm formation and triggers biofilm degradation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419, 715–718 (2012). (査読あり)

- ② Satoru Hirayama, Soichi Furukawa, Hirokazu Ogihara, and Yasushi Morinaga, Yeast Mannan Structure Necessary for Co-aggregation with *Lactobacillus plantarum* ML11-11, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419, 652–655 (2012). (査読あり)
- ③ Soichi Furukawa, Natsumi Nojima, Soma Nozaka, Satoru Hirayama, Ayumi Satoh, Hirokazu Ogihara, and Yasushi Morinaga, Mutants of *Lactobacillus plantarum* ML11-11 Deficient in Co-aggregation with Yeast Exhibited Reduce Activities of Mixed-species Biofilm Formation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76: 326-330 (2012). (査読あり)
- ④ 古川壯一・片倉啓雄：乳酸菌と酵母の共存と共生, *日本生物工学会誌*, 90, 188-191 (2012). (査読なし)
- ⑤ 古川壯一・森永康：微生物における細胞接着とその利用, *日本生物工学会誌*, 90, 197 (2012). (査読なし)
- ⑥ 古川壯一・阿部侑・深瀬栄・平山悟・荻原博和・森永康：多菌種複合バイオフィームを利用した物質生産, *日本醸造協会誌*, 107, 292-299 (2012). (査読なし)
- ⑦ Soichi Furukawa, Natsumi Nojima, Kanako Yoshida, Satoru Hirayama, Hirokazu Ogihara, and Yasushi Morinaga, Importance of Inter-species Cell-Cell Co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in Mixed-Species Biofilm Formation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 1430-1434 (2011). (査読あり)
- ⑧ Ayako Ogawa, Soichi Furukawa, Shuhei Fujita, Jiro Mitobe, Taketo Kawarai, Naoki Narisawa, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Kuniyasu Ochiai, Hirokazu Ogihara, Saori Kosono, Saori Yoneda, Haruo Watanabe, Yasushi Morinaga, Hiroshi Uematsu, and Hidenobu Senpuku, Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation by *Streptococcus*

salivarius FruA, Applied and Environmental Microbiology, 193, 421-428 (2011). (査読あり)

- ⑨ 北垣浩志・古川壯一・渡邊泰祐：微生物の寄生・共生に着目した新しい物質生産技術の開発に向けて，日本生物工学会誌，89, 460 (2011). (査読なし)
- ⑩ 古川壯一・平山悟・深瀬栄・荻原博和・森永康：酵母、乳酸菌及び酢酸菌の複合バイオフィーム形成とその利用，日本生物工学会誌，89, 478-481 (2011). (査読なし)
- ⑪ 古川壯一：新しいバイオフィーム対策法，実験医学，Vol29, No.13, Page2128-2129 (2011). (査読なし)
- ⑫ 北垣浩志・古川壯一・井沢真吾：微生物の寄生・共生・オルガネラ研究から見える新たな発酵学の地平線，日本生物工学会誌，89, 674 (2011). (査読なし)
- ⑬ Soichi Furukawa , Kanako Yoshida, Hirokazu Ogihara , Makari Yamasaki , and Yasushi Morinaga, Mixed-Species Biofilm Formation by Direct Cell-Cell Contact between Brewing Yeasts and Lactic Acid Bacteria, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74, 2316-2319 (2010). (査読あり)
- ⑭ Sachiko Okazaki, Soichi Furukawa, Hirokazu Ogihara, Taketo Kawarai, Chika Kitada, Akiko Komeno, and Makari Yamasaki, Microbiological and biochemical survey on the transition of fermentative processes in Fukuyama pot vinegar brewing, The Journal of General and Applied Microbiology, 56, 205-211 (2010). (査読あり)
- ⑮ 古川壯一・山崎眞狩・森永康：複合バイオフィームを通して見えてくる乳酸菌と酵母の相互作用、化学と生物、48, 8-10 (2010). (査読なし)
- ⑯ 古川壯一・成澤直規・河原井武人：バイオフィーム研究の新展開、化学工業、61, 177-185 (2010). (査読なし)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 平山 悟 ほか
酵母と乳酸菌の複合バイオフィーム形成プロセスの解析

日本農芸化学会 2012 年度大会
2012 年 3 月 23 日
京都市

- ② 土屋典子 ほか
清酒酵母と乳酸菌の複合バイオフィーム形成と共凝集に関する研究
日本農芸化学会 2012 年度大会
2012 年 3 月 23 日
京都市
- ③ 阿部 侑 ほか
酵母と乳酸菌の複合バイオフィームを利用したアルコール発酵
日本農芸化学会 2012 年度大会
2012 年 3 月 23 日
京都市
- ④ 深瀬 栄 ほか
酢酸菌と乳酸菌の相互作用とバイオフィーム形成
第 63 回日本生物工学会大会
2011 年 9 月 26 日
府中市
- ⑤ 平山 悟 ほか
複合バイオフィーム形成乳酸菌との共凝集に必要な酵母表層マンナン構造
第 63 回日本生物工学会大会
2011 年 9 月 26 日
府中市
- ⑥ 渡辺真哉 ほか
酵母・乳酸菌複合バイオフィームを利用したロバストなエタノール連続発酵システム
日本乳酸菌学会 2011 年度大会
2011 年 7 月 12 日
大阪市
- ⑦ 野坂草馬 ほか
乳酸菌と酵母の共凝集に関する表層因子質について
日本乳酸菌学会 2011 年度大会
2011 年 7 月 12 日
大阪市
- ⑧ 古川壯一 ほか
酵母と乳酸菌の相互作用と複合バイオフィーム形成 (招待講演)
第 180 回酵母細胞研究会例会
2011 年 7 月 8 日
東京都
- ⑨ 磯前亮介 他
酵母と複合バイオフィームを形成する 2 種類の乳酸菌種の特性比較

第 62 回日本生物工学会大会講演要旨集
2010 年 10 月 28 日
宮崎

⑩ 渡辺真哉 他
酵母・乳酸菌の複合バイオフィルムの固
定化菌体としての特性
第 62 回日本生物工学会大会講演要旨集
2010 年 10 月 28 日
宮崎

⑪ 平山 悟 他
乳酸菌間の凝集と複合バイオフィルム
形成
酵母遺伝学フォーラム第 43 回研究報告
会
2010 年 9 月 9 日
奈良市

⑫ 磯前亮介 他
複合バイオフィルムを形成する酵母と
乳酸菌のスクリーニング
日本農芸化学会
2010 年 3 月 30 日
東京

⑬ 能島菜積 他
乳酸菌と酵母の細胞間付着が共培養バ
イオフィルム形成に果たす役割
日本農芸化学会
2010 年 3 月 30 日
東京

〔図書〕(計 1 件)

古川壮一 他
日本食糧新聞社
食品加工における微生物・酵素の利用<新食
品編>
8 ページ
2010 年

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：新規発酵食品
発明者：森永康 他
権利者：学校法人日本大学
種類：特許公開
番号：2011-239709
出願年月日：2010 年 5 月 17 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 壮一 (FURUKAWA SOICHI)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：40339289