

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成24年度～平成26年度

課題番号：24580129

研究課題名（和文） 乳酸菌、酵母及び酢酸菌の複合バイオフィームを用いた物質生産

研究課題名（英文） Fermentative production adopting mixed-species biofilms formed by lactic acid bacteria, yeast and acetic acid bacteria

研究代表者

古川 壮一（FURUKAWA Soichi）

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：40339289

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：4,200,000円

研究成果の概要（和文）：*Lactobacillus plantarum* ML11-11 の表層には細胞内タンパク質が存在し、酵母との細胞接着や複合バイオフィーム（BF）の形成に何らかの役割を果たしていることが示唆された。また、酵母との接着への関与が考えられる特異なマンナン結合タンパク質の遺伝子を ML11-11 ゲノム中にみいだした。無殺菌稲わらに形成した乳酸菌・酵母複合 BF は固定化菌体としてエタノール生産に利用可能だった。さらに、乳酸菌・酵母・酢酸菌 3 菌種共培養系を構築し、培養液の底部の乳酸菌・酵母複合 BF と上部の酢酸菌 BF が共役する「二層バイオフィーム発酵システム」により糖を酢酸に効率的に変換可能なことを示した。

研究成果の概要（英文）：On the surface of *Lactobacillus plantarum* ML11-11 cells, some intracellular proteins were existed and seemed to contribute to ML11-11 cells adhesion to yeast cells and mixed-species biofilm (BF) formation with yeast. At the same time, a gene coding specific mannan binding protein, also suggested to contribute to adhesion to yeast cells, was found in the genome of ML11-11. Mixed-species BF formed by lactic acid bacteria (LAB) and yeast on non-aseptic rice straw can be adopted as immobilized cells for ethanol production. Triple species co-cultivation system, with LAB, yeast and acetic acid bacteria (AAB), was devised and with this system it was demonstrated that an efficient conversion of glucose to acetic acid could be proceeded by “Dual BF Fermentation System” in conjugation of AAB single BF formed on medium surface and LAB/yeast BF formed at the bottom of medium.

研究分野：応用微生物学

キーワード：乳酸菌 酵母 酢酸菌 共培養 バイオフィーム 細胞接着 エタノール発酵 酢酸発酵

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究開始当初までに我々は、鹿児島県福山町の伝統発酵食品の福山酢から、共培養すると顕著に複合バイオフィルムを形成する酵母、乳酸菌及び酢酸菌を見出していた。また、乳酸菌と酵母のつくる二菌種複合バイオフィルムの形成に乳酸菌表層のレクチン様タンパク質と酵母表層のマンナンの相互作用が重要な役割をもっていることを推定していた。さらに乳酸菌の産生する乳酸によって酢酸菌バイオフィルム(ペリクル)の形成が促進されることを見いだしていた。

(2) また、乳酸菌と酵母の複合バイオフィルムを一種の固定化菌体としてエタノール発酵に利用できること、ならびに三菌種共培養系で酢酸発酵が可能であることを見いだしていた。

(3) しかしながら、これらの複合バイオフィルムの形成機構の詳細は不明であり、また、その固定化菌体としての利用法についても詳細な検討は行われていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、これらの複合バイオフィルムの形成機構の詳細を解明するとともに、複合バイオフィルムを固定化菌体として用いる新しい物質生産システムの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 乳酸菌と酵母の複合バイオフィルム形成機構解明：複合バイオフィルム形成性乳酸菌 *L. plantarum* ML11-11 の表層タンパク因子の同定をプロテオーム解析などにより進める。当該タンパク因子が同定できた場合には、当該遺伝子をクローニングする。

(2) 乳酸菌と酢酸菌の複合バイオフィルム形成機構解明：乳酸菌の生成する乳酸による酢酸菌バイオフィルムの形成促進機構について、その原因が酢酸菌の菌数増加によるのかバイオフィルム形成に必要な菌体外多糖の生産増加によるのかを検討する。また、乳酸添加による酢酸菌プロテオームの変化について検討し、乳酸の添加が酢酸菌の代謝にどのような影響を及ぼしているのかを解明し、バイオフィルム形成に関わる遺伝子を見出す。

(3) 複合バイオフィルムによる物質生産システム構築に向けた基礎的検討：  
複合バイオフィルムリアクターに適した乳酸菌や酵母のスクリーニングを行い、複合バイオフィルムの高機能化・多機能化を目指す。多様な機能を有する乳酸菌(バクテリオシン生産菌、プロバイオティクス菌、各種産業用乳酸菌など)、様々な機能を有する酵母(各種産業用酵母など)及び多様な機能を有する酢酸菌(各種産業用酢酸菌など)との共培養により、複合バイオフィルムの高機能化・多機能化を目指す。同時に、複合バイオフィルムリアクターに適した乳酸菌、酵母及び酢酸菌のスクリーニングも行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 乳酸菌と酵母の複合バイオフィルム形成機構解明

酵母との複合バイオフィルム形成性を示す *L. plantarum* ML11-11 から誘導した非凝集性変異株が、酵母接着性を喪失し (Fig. 1)、細胞の負荷電が増大し (Fig. 2)、表層タンパク質量が顕著に減少 (Fig. 3) していることをあきらかにした。接着因子の同定を目的に、非凝集性変異株で減少している表層タンパク質に相当する野生株のタンパク質バンドを分画・抽出して質量分析により解析したところ、DnaK、GAPDH、Elongation factor G などのいくつかの細胞内タンパク質が同定され、これらが乳酸菌の細胞内から表層に移行して酵母接着因子として働いている可能性が示唆された。しかしながら、これらの細胞内タンパク質は一般的には低 pH 域で細胞接着に関与することが報告されているが、ML11-11 と酵母の細胞接着は中性域を含む広い pH 域で起こること、更には酵母のマノース糖鎖に特異的に結合するなどの特徴を有していることから、ML11-11 表層に見いだされたこれらの細胞内タンパク質が酵母との接着活性の本体ではない可能性も考えられた。

一方、ML11-11 など当研究室で分離した複合バイオフィルム形成性を示す酵母接着性乳酸菌 *L. plantarum* 3 菌株のゲノム構造を解析した結果、共通して存在する特異なマンナン結合型タンパク質をコードする遺伝子をみいだした。このタンパク質がこれら酵母接着性乳酸菌の接着活性の本体である可能性が考えられたため、当該遺伝子を ML11-11 よりクローニングして、非凝集性変異株に導入したが、凝集性の回復は確認できなかった。当該遺伝子の機能に関しては今後さらなる解析が必要だが、当該遺伝子の産物が酵母接着因子として機能している可能性も考えられる。

以上のように本研究では、酵母との複合バイオフィルム形成に関与する乳酸菌表層タンパク質に関して最終的な同定には至らなかったが、酵母と乳酸菌の異種間細胞接着に関する重要な新知見を得ることができた。

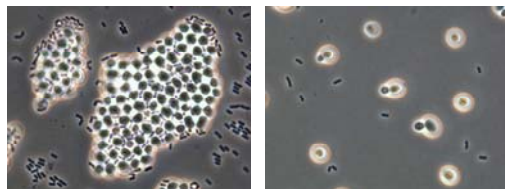


Fig. 1 ML11-11 野生株(左)と変異株(右)の酵母との凝集性

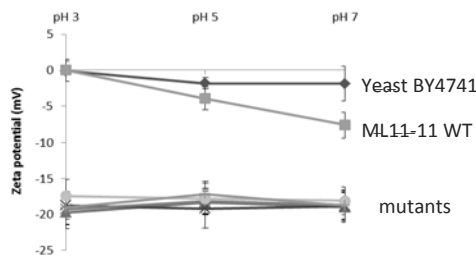


Fig. 2 ML11-11 野生株と変異株のゼータ電位

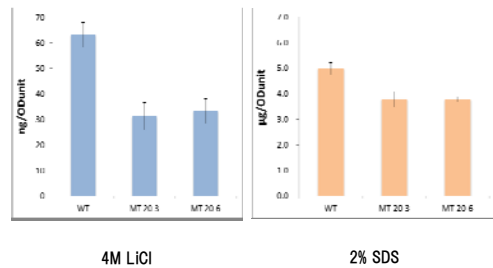


Fig. 3 ML11-11 野生株と変異株の細胞表面タンパク量 (左: 4M LiCl 抽出; 右: 2% SDS 抽出)

## (2) 乳酸菌と酢酸菌の複合バイオフィーム形成機構解明

乳酸菌・酵母・酢酸菌 3 菌種により形成されるバイオフィーム系に関しては、細胞培養用プレートを活用、3 菌種を同時計測可能な平板培地の開発などにより、簡易で高精度の実験系を構築した。さらに、共培養系では酢酸菌のバイオフィーム形成が増加するが、乳酸やアルコールを添加した場合に、代謝などに関与する幾つかのタンパクの発現が変化していることが質量分析解析で明らかになった。このことから、乳酸菌や酵母との共培と、及び、これらのタンパクのバイオフィーム形成への関与が示唆された。

構築した実験系を用いて 3 菌種複合培養による酢酸発酵を試みた結果、乳酸菌が共存する 3 菌種系で酢酸の生成が顕著に高まることを確認でき、乳酸菌が生成する乳酸により酢酸菌のエネルギー代謝や糖新生が活性化するため酢酸生成が高まると考えられた (Fig. 4)。

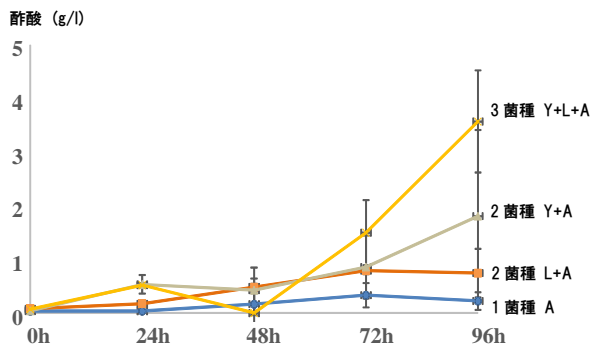


Fig. 4 酵母(Y)・乳酸菌(L)・酢酸菌(A)の3菌種複合培養による酢酸発酵

## (3) 複合バイオフィームによる物質生産システム構築に向けた基礎的検討

乳酸菌-酵母複合バイオフィームによる物質生産に関しては、セルロース、ガラス、ポリスチレン、ゼオライトビーズ担体を用いた反復回分式アルコール発酵を行ったが、セルロースビーズ担体が発酵能及び菌体の保持に最も優れていることが確認された。

セルロースビーズに形成させた乳酸菌-酵母複合バイオフィームを用いることにより、回分培養のみならず、連続的にもアルコールを生産可能であること (Figs. 5, 6)、及び、当該培養系は、高い雑菌排除能を有することを明らかにすることができた。

また、セルロースビーズの代わりに稲わらを担体とした実験も行った結果、担体として遜色なく用いることができ、しかも無殺菌のままの稲わらもちいても安定した発酵成績が得られることが明らかとなった (Fig. 7)。今後、この系にセルラーゼを添加することによって、バイオフィームを形成させた稲わらをセルラーゼで糖化しつつ、エタノール発酵を行える可能性が拓けてきた。

これらの結果は、農産廃棄物利用において複合バイオフィームを利用した新規発酵システム構築に向けての有用知見と考えられる。

さらに、乳酸菌・酵母・酢酸菌により形成される 3 菌種バイオフィーム系に関しては、前述のように簡易実験系を用いて酢酸発酵を試みた結果、乳酸菌が共存する 3 菌種系で酢酸の生成が顕著に高まることを確認できた。

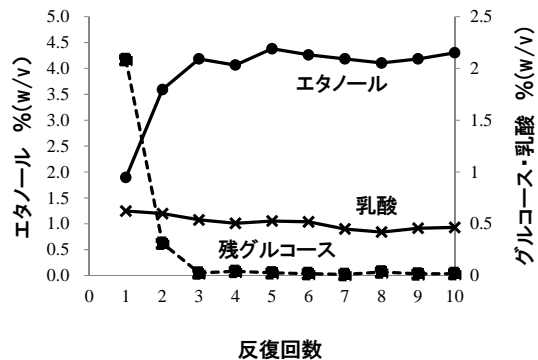


Fig. 5 酵母・乳酸菌複合バイオフィームをもちいた半連続エタノール発酵

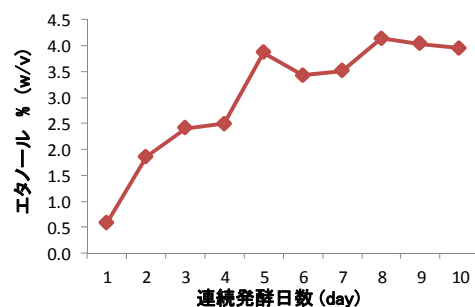


Fig. 6 酵母・乳酸菌複合バイオフィームをもちいた連続エタノール発酵

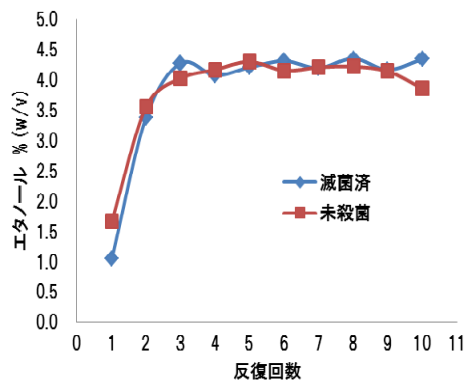


Fig. 7 殺菌及び無殺菌のイナワラに形成させた酵母・乳酸菌複合バイオフィームを用いた半連続エタノール発酵

以上のように、本研究では福山酢をモデルとして、新しい発酵システムを開発することを目指して取り組んできたが、培養液底部に形成した乳酸菌・酵母複合バイオフィームと培養液上部に形成した酢酸菌バイオフィームを共役させる「二層バイオフィーム発酵システム」(Fig. 8)によって、糖を酢酸に効率的に変換可能なことを示すことができ、応用にもつながる重要な知見が得られた。

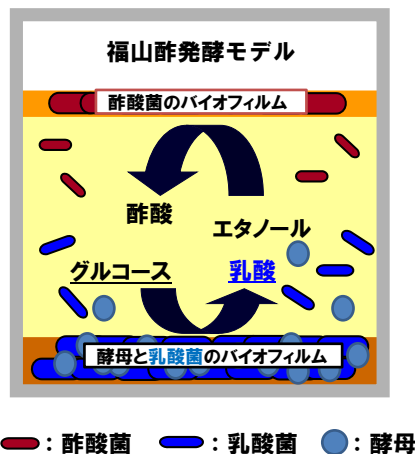


Fig. 8 福山酢発酵モデルによる二層バイオフィーム発酵システム

## 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 8 件)

① Satoru HIRAYAMA, Masashi SHIMIZU, Noriko TSUCHIYA, Soichi FURUKAWA, Daisuke WATANABE, Hitoshi SHIMOI, Hiroshi

TAKAGI, Hirokazu OGIHARA, and Yasushi MORINAGA, Awa1p on the Cell Surface of Sake Yeast Inhibits Biofilm Formation and the Co-Aggregation between Sake Yeasts and *Lactobacillus plantarum* ML11-11, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, 119/ 5, 532-537, 2015  
DOI :10.1016/j.jbiosc.2014.10.007

② Soichi FURUKAWA, Ryosuke ISOMAE, Noriko TSUCHIYA, Satoru HIRAYAMA, Asuka YAMAGISHI, Miho KOBAYASHI, Chise SUZUKI, Hirokazu OGIHARA, and Yasushi MORINAGA, Screening of Lactic Acid Bacteria that can Form Mixed-Species Biofilm with *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 査読有, 79/ 4, 681-686, 2015.  
DOI :10.1080/09168451.2014.991691

③ Soma NOZAKA, Soichi FURUKAWA, Miwa SASAKI, Satoru HIRAYAMA, Hirokazu OGIHARA and Yasushi MORINAGA, Manganese Ion Increases LAB-yeast Mixed-species Biofilm Formation, *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 査読有, 33/ 2, 79-84, 2014

④ 古川壯一, 平山 悟, 森永 康, 微生物の共存・共生と伝統的発酵, *醸造協会誌*, 査読無 108/ 4, 228-238, 2014

⑤ 森永康, 古川壯一, 酵母-乳酸菌複合バイオフィームの特性と利用, *月刊 BIO INDUSTRY*, 査読無, 30/ 7, 49-57, 2013/07

⑥ Atsumu Abe, Soichi Furukawa, Shinya Watanabe and Yasushi Morinaga, Yeasts and Lactic Acid Bacteria Mixed-Species Biofilm Formation is a Promising Cell Immobilization Technology for Ethanol Fermentation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 査読有, Sep.17 1(1) 72-9, 2013  
DOI :10.1007/s12010-013-0360-6

⑦ 古川壯一, 森永 康, 複合微生物系バイオフィームによる物質生産, *化学工学会誌*, 査読無, 76/ 11, 695-698, 2012

⑧ 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*, 査読無, 107/ 5, 292-299, 2012

[学会発表] (計 13 件)

① 東垂水彩乃, 増田裕明, 古川壯一, 森永 康, *Acetobacter pasteurianus*, *Lactobacillus plantarum* 及び *Saccharomyces cerevisiae* の3菌種複合培養による酢酸発酵, 2015年度日本農芸化学会大会 (岡山大), 2015/03/29

②平山 悟, 古川壮一, 荻原 淳, 安井雅人, 森永 康, 酵母への接着に關与する *Lactobacillus plantarum* ML11-11 細胞表面蛋白質の解析, 2015 年度日本農芸化学会大会 (岡山大), 2015/03/29

③森永 康, 平山 悟, 古川壮一, 伝統発酵にみる微生物の共生と進化, 日本乳酸菌学会秋期セミナー・酢酸菌研究会研究集会合同シンポジウム (藤沢市日本大学生物資源科学部), 2014/12/05

④東垂水彩乃, 増田裕明, 古川 壮一, 森永 康, 酢酸菌・乳酸菌・酵母 3 菌種培養での酢酸発酵, 日本乳酸菌学会秋期セミナー・酢酸菌研究会研究集会合同シンポジウム (藤沢市日本大学生物資源科学部), 2014/12/05

⑤平山 悟, 古川壮一, 荻原 淳, 安井雅人, 森永 康, 酵母への接着に關与する *Lactobacillus plantarum* ML11-11 細胞表面糖質の解析, 日本乳酸菌学会秋期セミナー・酢酸菌研究会研究集会合同シンポジウム (藤沢市日本大学生物資源科学部), 2014/12/05

⑥平山 悟, 古川 壮一, 荻原 淳, 安井 雅人, 森永 康, 酵母への接着に關与する *Lactobacillus plantarum* ML11-11 細胞表面糖質の解析, 第 66 回日本生物工学会大会 (札幌コンベンションセンター), 2014/09/09

⑦平山 悟, 古川 壮一, 森永 康, 酵母との複合バイオフィルム形成能を有する乳酸菌のゲノムシーケンス及びポストゲノム解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会 (明治大学生田キャンパス), 2014/03/29

⑧古川 壮一, 森永 康, 伝統発酵 (福山酢) にみいだした発酵微生物のつくる複合バイオフィルムの特性と利用, 第 65 回日本生物工学会大会 (広島国際会議場) シンポジウム (九州における新産業創出に向けた発酵研究), 2013/09/20

⑨古川壮一, 菊池 貞, 森永 康, 乳酸菌、酵母及び酢酸菌の複合バイオフィルム形成と物質生産、日本乳酸菌学会 2013 年度大会 (北海道大学学術交流会館), 2013/07/10

⑩土屋典子, 古川壮一, 荻原博和, 森永 康, 清酒酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成と共凝集, 日本農芸化学会 2013 年度大会 (東北大学仙台北キャンパス), 2013/03/26

⑪平山 悟, 白井有美, 土屋典子, 阿部 侑, 靱内研吾, 藤谷拓嗣, 常田 聡, 古川壮一, 荻原博和, 森永 康, 出芽酵母と共凝集する乳酸菌の細胞表面特性に関する研究, 日本生

物工学会 2012 年度大会 (神戸国際会議場), 2012/10/25

⑫森永 康, 古川壮一, 酵母と乳酸菌の複合バイオフィルムを利用した発酵生産, イノベーションジャパン 2012 大学見本市 (東京国際フォーラム), 2012/09/28

⑬平山 悟, 古川壮一, 荻原博和, 森永 康, 乳酸菌と酵母の複合バイオフィルム形成及び共凝集に関する研究, 日本乳酸菌学会 (つくば国際会議場), 2012/07/13

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 連続発酵法  
発明者: 森永 康, 古川壮一, 荻原博和  
権利者: 学校法人日本大学  
種類: 国内優先権主張  
番号: 特願 2012-284395  
出願年月日: 平成 24 年 12 月 27 日  
国内外の別: 国内

名称: 抗菌物質生産菌と発酵菌を共培養する発酵法

発明者: 森永 康, 古川壮一, 荻原博和  
権利者: 学校法人日本大学  
種類: 国内優先権主張  
番号: 特願 2012-284396  
出願年月日: 平成 24 年 12 月 27 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日: 平成 年 月 日  
取得年月日: 平成 年 月 日  
国内外の別:

[その他]

## 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・准教授  
研究者番号: 40339289

### (2) 研究分担者

森永 康 (MORINAGA Yasushi)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 10459919