

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660073

研究課題名(和文) 乳酸を生産させない乳酸菌の培養法

研究課題名(英文) Cultivation of lactic acid bacteria without production of 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌は与えた糖の半分以上を乳酸に変換する微生物と定義されるが、乳酸菌による乳酸生産は高密度培養を困難にし、有用物質生産の効率化を妨げる。固体培養を中心に、乳酸菌の乳酸生産を抑制する培養条件を探索した結果、ある天然物を培地に用いると、菌体あたりの乳酸生産量が乳酸菌の標準的な培地であるMRS培地でのそれに比べて約1/10に低下することを見出した。この現象はLactococcus属、Lactobacillus属の乳酸菌で認められ、天然物の熱水抽出液で培養した場合にも認められている。現在、メタボローム解析などでその機構を調べている。

研究成果の概要(英文)：Lactic acid bacteria (LAB) are defined as microorganisms to convert more than half of the given sugar to lactic acid. Accumulation of lactic acid complicates high density culture of LAB and disturbs efficient production of useful compounds. The cultivation conditions restraining lactic acid production by LAB were searched focusing on solid cultivation using powder of natural products. When a natural product was used as substrate, we found that the lactic acid production per number of bacterial cell falls to about 1/10 compared with that by the MRS medium which is a conventional medium for LAB. This phenomenon is also observed in both Lactobacillus and Lactococcus when a heat aqueous extract of the natural product is used as the medium. The mechanism of this phenomenon is being studied by metabolome analysis at present.

研究分野：生物化学工学

キーワード：乳酸菌 乳酸 固体培養

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌は通性嫌気性菌であり、糖を乳酸に代謝することによってエネルギーを獲得して生育する。この特性は古くからヨーグルト、パン、漬物などの様々な発酵食品に応用されてきた。しかし、著量の乳酸を生産するがゆえに、その阻害が問題になる場合も多く、乳酸菌の高濃度培養は困難であり、乳酸菌による物質生産も、乳酸の除去がコスト的に困難であるため、普及してはいない。我々は、乳酸菌の固体発酵の研究の過程で、小麦粉と脱脂粉乳からなる培地では、表 1 に示すように、水分を減少させるに従って、培地固形分あたりの生菌数が 1 桁以上増加するにもかかわらず、菌体あたりの乳酸生産量は逆に 1/40 ~ 1/50 に減少することを見出した¹⁾。この現象は、他の乳酸菌株においても認められ、乳酸菌の一般的な応答であると考えられる。

表 1 の水分 91%の培地にプロテアーゼを添加しても、培地固形分あたりの生菌数が 8 倍に増加するが乳酸生産量は 1/8 に減少するので、このドラスティックな代謝の変化は水分の違いだけによって起きる単純なものではない。そこで、(1) 代謝が変化して乳酸発酵をしなくなる条件を明らかにし、(2) DNA マイクロアレイ解析などによって代謝が切り替わる機構と引き金となるイベントを明らかにするとともに、(3) 代謝フラックス解析によって、乳酸発酵しない条件では、乳酸菌はどのようにして生育に必要なエネルギーを得ているかを明らかにする。

表 1 水分が乳酸菌の生育と乳酸生産に及ぼす影響

水分 (%)	生菌数 (CFU/g-material)	乳酸生産 (pg/CFU)
91	8×10^8	214
63	2×10^9	39
54	1×10^{10}	4
45	7×10^9	4
91*	6×10^9	25

ガンマ線滅菌した小麦粉（強力粉）と脱脂粉乳の等量混合物に所定量の滅菌水と 105 cfu/g の *Lactobacillus bulgaricus* ME-278 を加え、30 で 48 時間静置培養した。*はプロテアーゼアマノ SD を 2.5 mg/g-material 添加した場合。

しかし、その後の研究で、使用した乳酸菌株 *Lb. bulgaricus* には、平板培養による生菌数計測においてコロニーを形成しない乳酸菌が含まれており、生菌数を過少評価していたことが判明したことから、平成 27 年度以降は、乳酸菌が乳酸を生産しない培養条件の探索を行い、乳酸を生産しないメカニズムの解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

乳酸菌は、消費した糖に対し 50%以上の乳酸を生産する細菌と定義されている。この特性は古くから様々な発酵食品に利用され、最近ではプロバイオティクスとしての需要も高い。

ところで、乳酸菌の培養は実験室や工業生産においても糖をエネルギー基質とするため、増殖に伴い著量の乳酸が蓄積する。その結果、自身の生産した著量の乳酸により増殖阻害が起こり、乳酸菌の高濃度培養は困難とされている。

一般的な乳酸菌培養では、サンプリングが容易で、再現性に優れた液体培養が採用されているが、乳酸菌が実際に生育する自然界では、動物の腸内や発酵食品などの半固体状の低水分環境で生育している場合が多い。さらに、他の微生物や固形分が存在する複雑な環境であり、人工的な培養環境とは大きく異なる²⁾。産業的には、農産廃棄物を原料とした乳酸菌の固体培養は行われては一部行われているものの、学術的な研究はほとんどなされておらず、固体培養環境下で乳酸菌がどのような挙動をしているかは明らかになっていない点が多い。

一方、乳酸発酵では、解糖系の glycolaldehyde-3-phosphate dehydrogenase の反応で消費された NAD^+ を、lactate dehydrogenase の反応で再生するため、結果として、乳酸が生産される。これまでに、乳酸菌の培養にヘミンを添加して呼吸鎖の NADH dehydrogenase を活性化し、 NAD^+ を再生することによって乳酸生産を抑制する方法などが報告されているが、通気の必要や、ヘミン自身による増殖阻害が問題となっている³⁾。このような背景から、我々は、解糖系により消費された NAD^+ を、乳酸を生じない代謝経路にて再生できる培養条件を設定することで、乳酸による増殖阻害を回避し、高密度培養が可能になると考えた。

そこで、本研究ではまず、自然界と工業生産での乳酸菌の生育環境の違いに着目し、低水分環境が乳酸菌の代謝に及ぼす影響を検討することとした。我々は、これまでに、小麦粉や脱脂粉乳など品質が一定かつ粒径が小さく均一である固形分を用いることで、従来の固体培養の課題を解決し、再現性を有する乳酸菌の固体培養法を確立している。様々な固形分を用いて乳酸菌の固体培養を行い、乳酸菌が乳酸を生産しない培養条件の検討および乳酸生成が抑制されるメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) 培養条件

乳酸菌の前培養には MRS 培地を用い、フローズンストックから植菌して、各菌株の至適培養温度にて一晩静置培養した。合成培地として、グルコース濃度 6 g/l、18 種のアミ

ノ酸、4種の核酸、23種のビタミン及び無機塩、アスコルビン酸からなる培地を用いた^{4,5)}。

固体培養の基質に用いる各種固形分は日本照射サービス㈱に依頼して線滅菌した。

2) 分析条件

生菌数はコロニーカウント法により測定した。培地中のグルコース、D-乳酸およびL-乳酸の濃度測定には、各培地成分の測定に対応する酵素電極を付設したバイオセンサーBF-5（王子計測機器株式会社）を用いた。アミノ酸は高速アミノ酸分析計（日立ハイテクサイエンス）、全糖はフェノール硫酸法で測定した。

4. 研究成果

1) 乳酸菌が乳酸を生産しない培養条件の探索

固体培養に用いる基質には、小麦粉や脱脂粉乳のように一定の品質のものが入手でき、かつ粒径が小さく均一である固形分を前提とした。中でも、穀類などの植物や魚粉などの動物由来の天然物に由来する固形分について、乳酸生産が抑制される可能性のある低水分環境を中心に広く探索を行った（表2）。

モデル菌株として *Lactobacillus casei* ATCC 334 を用い、 γ 線滅菌した固形分に滅菌水を加えて水分を50~60%とし、前培養液を0.1% (v/v) 加えて37°Cで48時間、固体培養を行った。

表2 固体培養の基質として検討した固形分

米粉	アロエ
白糖	オートミール
きび粉	そば粉
小麦ふすま	きな粉
ココナッツ	ヒドロキシプロピルセルロース
天然物 X	グルコマンナン

その結果、米粉や白糖などのいくつかの固形分を基質として用いることで、*Lb. casei* ATCC 334 が増殖することを確認した。また、2種類の固形分を組み合わせることで、炭素源と窒素源の供給バランスが改善され、増殖が促進することも確認した。一方、天然物 X を基質とし、水分を60%で培養した場合、48時間後の菌体濃度が 7.0×10^9 CFU/g-material に到達するが、菌体当たりの乳酸生産量は0.6 pg/CFUであった。他の固体培地やMRS液体培地の1/4~1/10に留まり、pHも6付近で維持され、乳酸生産量が減少する培養条件の存在が示唆された（表3-1）（天然物 X の名称は、特許出願準備中のため伏せて記載）。

また、この天然物 X は、水分を90%に増やして液体培養を行った場合においても、乳酸生産量は0.1 pg/CFUとなった。このことは、低水分という環境が乳酸生産を抑制するのではなく、天然物 X に含まれる成分にその作

用があると考えられた（表3-2）。

表3-1 各種固形分を基質とした *Lb. casei* ATCC 334 の固体培養における48時間後の生菌数と乳酸量

基質	生菌数 (CFU/ g-material)	乳酸量 (mg/ g-material)	菌体当たりの 乳酸量 (pg/CFU)
米粉	1×10^9	15	15.0
きび粉	1×10^9	21	14.7
白糖	2×10^9	28	14.4
小麦粉 + 脱脂粉乳	1×10^{10}	106	3.7
オートミール	3×10^9	12	2.9
天然物 X 水分 60%	7×10^9	4	0.6

表3-2 天然物 X を基質とした *Lb. casei* ATCC 334 の液体培養における48時間後の生菌数と乳酸量

基質	生菌数 (CFU/ml)	乳酸量 (mg/ml)	菌体当たりの 乳酸量 (pg/CFU)
天然物 X 水分 90%	4×10^8	0.02	0.1
MRS 液体 培地	1×10^9	7.3	6.4

2) 乳酸生産が抑制される乳酸菌株の検討

天然物 X による乳酸生産量の減少が、*Lb. casei* ATCC 334 に限定されるものかどうかを、天然物 X を基質とし、水分を90%で培養して検証した。その結果、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007、*Lactobacillus sakei* NBRC15893 および *Lactobacillus buchneri* JCM 1068 においても、菌体当たりの乳酸生産量がMRS培地の1/10程度まで低下した。天然物 X に含まれる成分の代謝経路は *Lb. casei* ATCC 334 に限定されるものではなく、天然物 X は乳酸生産を抑制する培地として、乳酸菌に広く応用できる可能性が示唆された。

3) 乳酸生産を抑制する成分の特定

天然物 X を培地とした培養において、天然物 X に含まれ、乳酸生成の抑制に関わる増殖基質を特定するため、まずは、天然物 X に9倍量の水を加えて煮沸した後、不溶性画分と可溶性画分に分け、どちらの画分に *Lb. casei* ATCC 334 の乳酸の生産抑制に関わる成分が含まれるかを検討した。その結果、分画しない培地及び分画して再構成した培地に比べて、どちらの画分も生菌数が約1/10に低下したが、菌体当たりの乳酸生産量は0.8 pg/CFUにとどまった（データ非掲載）。また、この生菌数の著しい低下は、各画分単独では栄養

源に不足が生じたためと考え、各画分と等量の合成培地を加えて同様の培養を行った。その結果、不溶性画分および可溶性画分のいずれにおいても、生菌数が同程度であるにもかかわらず、合成培地と比較して菌体当たりの乳酸生産量が 1.1 pg/CFU から、それぞれ 0.8 および 0.6 pg/CFU に低下した (表 4)。また、*Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007、*Lb. sakei* NBRC15893 および *Lb. buchneri* JCM 1068 についても同様の傾向が見られた。

一方、不溶性および可溶性画分のいずれにおいても乳酸生産の抑制が確認されたことから、成分の特定には、培養および分析が容易である可溶性画分を採用した。各乳酸菌について、熱水抽出液で培養する前後のアミノ酸と全糖の濃度を測定したが、枯渇した基質や顕著な基質消費は確認できず、乳酸生産を抑制する成分の特定には至らなかった。

表 4 不溶性および可溶性画分を基質とした *Lb. casei* ATCC 334 の培養 48 時間後の生菌数および乳酸量

培地	合成培地	生菌数 (CFU/ml)	乳酸量 (mg/ml)	菌体当たりの乳酸量 (pg/CFU)
未分離	-	4×10 ⁸	0.07	0.2
可溶性	+	1×10 ⁸	0.07	0.8
不溶性	+	1×10 ⁸	0.07	0.6
可溶+不溶	-	4×10 ⁸	0.04	0.1
合成培地	+	1×10 ⁸	0.14	1.1

4) 結言および今後の予定

乳酸菌の乳酸生産を抑制する培養条件の探索を行い、いくつかの動物あるいは植物由来の固形分、特に、天然物 X を培地として培養すると、菌体当たりの乳酸生産量が顕著に低下することを見出した。

乳酸生産を抑制する成分の特定には至っていないが、乳酸菌が乳酸を生産しない条件の発見は、乳酸菌の高密度培養法の開発に大きく貢献できると期待される。

今後、天然物 X を培地とした培養についてメタボローム解析を行い、天然物 X に含まれ乳酸生産を抑制する成分を特定するとともに、メカニズムについても解析を行う予定である。

引用文献

- 菅野勇樹ら, 2013 年度 日本生物工学会大会要旨集, 1P-123
- 片倉啓雄, 日本乳酸菌学会誌, 22, 1 (2011)
- Nagayasu M. *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 103, 529-534 (2007)
- Looijesteijn P.J. *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 88, 178-182 (1999)

- Poolman B. *et al.*, J. Bacteriol., 170, 700-707 (1988)

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

- S. Yamasaki-Yashiki, A. Saika, J. Kunisawa, Y. Katakura, Intestinal IgA enhancement by three Lactobacilli through Toll-like receptor 2 activation on dendritic cells in the Peyer's patches, The 8th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria, P-01-008, 2015.7.8, Bangkok, Thailand

6. 研究組織

(1) 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: 5 0 2 6 3 2 0 7

(2) 研究分担者

山崎 思乃 (YAMASAKI, Shino)
 関西大学・化学生命工学部・助教
 研究者番号: 5 0 6 0 2 1 8 2