

新規ビフィズス菌特異的増殖因子の生産と それを利用したプロバイオティクスの開発

(課題番号 10555286)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金（基盤研究B）
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 谷 口 正 之
(新潟大学工学部教授)

は じ め に

研究代表者は「新規ビフィズス菌特異的増殖因子の生産とそれを利用したプロバイオテフィクスの開発」に関して、平成 10 年度文部省科学研究費補助金を申請し、採択された。本報告は、上記研究の成果を総括したものである。

ビフィズス菌とその発酵物は、腸内菌叢の改善、腐敗産物の生成抑制、便性改善等の体調節機能（整腸作用）ばかりでなくコレステロール低下作用、免疫賦活作用（発癌抑制作用）などの各種生理効果を有する。したがって、ビフィズス菌は特定保健用食品いわゆる機能性食品中の有効成分として、また生菌製剤としても非常に有用な乳酸菌である。研究代表者らは、これまでに膜濾過型バイオリアクターを用いたスターター微生物としての乳酸菌やビフィズス菌の生産および乳酸菌による抗生物質、芳香成分、酵素などの有用物質の生産について既に報告してきた。また、有用物質の生産に混合培養を積極的に利用する研究として、2種類の酵母の混合培養、乳酸菌と酵母の混合培養およびビフィズス菌とプロピオン酸菌の混合培養について検討した。すなわち、第一にバイオマス加水分解物からのエタノール生産の効率化を図るために、キシロース発酵性酵母とグルコース発酵性酵母の混合培養について検討した。第二に乳酸菌による機能性多糖ケフィランの生産に対する酵母の存在の影響について検討した。また、各種食品の保存性を向上するために必要な天然の安全な抗菌剤として、ビフィズス菌とプロピオン酸菌の混合培養物の生産について検討した。この混合培養においては、これらの2種類の微生物を用いた逐次転換法によって高い抗菌活性を有する天然抗菌剤の効率的な生産を試みた。

本研究では、膜濾過型バイオリアクターとオンライン乳酸コントローラを組み合わせた連続生産システムによるビフィズス菌特異的増殖促進物質の効率的生産および膜型混合バイオリアクターを用いたビフィズス菌とプロピオン酸菌の同時菌体生産について検討した。

以上の研究成果は、微生物間の相互作用を解析し、それらの相互作用を利用して有用物質を生産する新規プロセスの開発にとって有益な知見を提供していると確信している。

研究組織

研究代表者：谷 口 正 之 （新潟大学工学部教授）

研究経費

平成 10 年度	7,000 千円
平成 11 年度	3,600 千円
平成 12 年度	2,100 千円
計	12,700 千円

研究発表

（１）学会誌等

- 1) M. Taniguchi, H. Nakazawa, O. Takeda, K. Hoshino, and T. Tanaka :
Production of a Mixture of Antimicrobial Organic Acids from Lactose by
Co-Culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*.
Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol.**62**, No.8, 1522-1527 (1998).
- 2) 谷口正之 :
微生物間相互作用の解析と混合培養システムの開発.
化学工学論文集, 第 **25** 巻 2 号, 149-157 (1999).
- 3) 谷口正之 :
食品微生物間相互作用の解析と“擬混合培養法”の開発.
酵素工学ニュース, No.41, 29-34 (1999).
- 4) 北條研一, 依田伸生, 竹友直生 :
プロピオン酸菌が生産するビフィズス菌の増殖促進物質の機能と特性
Milk Science, Vol.**49**, No.3, 161-167 (2000).
- 5) 谷口正之, 黒岩巖 :
"複合培養装置", 特願 2000-271311 (2000).

(2) 口頭発表

- 1) 白石典生, 飛田和宏, 佐藤信之, 金子 勉, 梅澤 彰, 田中孝明,
谷口正之 :
プロピオン酸菌によるビフィズス菌特異的増殖因子の効率的生産.
平成 10 年度日本生物工学会 (広島), 講演要旨集 p.216 (1998 年 9 月).
- 2) 山田英登, 飛田和宏, 橋本克夫, 金子 勉, 田中孝明, 谷口正之 :
膜型混合バイオリタクターを用いたビフィズス菌の効率的生産.
日本生物工学会 (広島), 講演要旨集 p.216 (1998 年 9 月).
- 3) 谷口正之, 山田英登, 橋本克夫, 金子 勉, 田中孝明 :
ビフィズス菌とプロピオン酸菌の相互作用を利用した菌体の同時生産.
日本農芸化学会大会 (福岡), 講演要旨集 p.297 (1999 年 4 月).
- 4) 谷口正之, 山田英登, 飛田和宏, 金子 勉, 田中孝明 :
ビフィズス菌とプロピオン酸菌間の協調作用の解析とその同時菌体生産への
応用.
平成 11 年度日本生物工学会大会 (大阪), 講演要旨集 p.369 (1999 年 9 月).
- 5) Masayuki Taniguchi, Hideto Yamada, Katsuo Hashimoto, and Takaaki Tanaka :
Simultaneous Production of Bifidobacterial and Propionibacterial Cells by Using a
New Co-Culture System with Two Microfiltration Modules and Two Fermentors.
Abstracts of The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999,
Phuket, Thailand, p.232 P-IB35 (1999 年 11 月).
- 6) 佐藤信之, 白石典生, 田中孝明, 谷口正之 :
Propionibacterium acidipropionici によるビフィズス菌特異的増殖促進物質の
生産.
化学工学会第 65 年会 (東京), 講演要旨集 p.370 (2000 年 3 月).
- 7) 谷口正之, 佐藤信之, 白石典生, 梅澤 彰, 田中孝明 :
グリセロール培地を用いたプロピオン酸菌の培養による BGS の生産.
2000 年度日本農芸化学会大会 (東京), 講演要旨集 p.383 (2000 年 4 月).
- 8) 佐藤信之, 白石典生, 田中孝明, 谷口正之 :
プロピオン酸菌によるビフィズス菌特異的増殖促進物質の連続生産.
日本食品工学会 (東京), 講演要旨集 p.118 (2000 年 8 月).

目 次

第1章 序 論 -----	1
1. 1 微生物間相互作用	
1. 2 混合培養を利用した有用物質の生産	
1. 3 本研究の目的	
第2章 プロピオン酸菌が生産するビフィズス菌の 増殖促進物質について -----	6
2. 1 はじめに	
2. 1 プロピオン酸菌によるB G Sの産生	
2. 2 B G Sの分離精製および構造	
2. 4 ヒト腸内細菌に対するB G Sの作用	
2. 5 おわりに	
第3章 微生物間相互作用の解析と混合培養システムの開発 -----	15
3. 1 緒言	
3. 2 逐次転換反応による抗菌物質の生産	
1) 安全な抗菌物質の必要性	
2) 有機酸の抗菌活性	
3) ビフィズス菌の単独培養	
4) 混合培養による逐次転換	
5) 単独培養と混合培養の比較	
3. 3 混合基質からのエタノール生産	
1) バイオマスエネルギーの生産	
2) 単独培養による混合基質からのエタノール生産	
3) <i>S. cerevisiae</i> と <i>P. stipitis</i> を用いた混合培養	
4) 膜型混合培養装置の開発	
5) 膜型混合培養装置のエタノール生産への利用	

6) 膜型混合培養装置の有用性	
3. 4 酵母と乳酸菌の混合培養による機能性多糖の生産	
3. 5 結言	
第4章 プロピオン酸菌の産生するビフィズス菌の 増殖促進物質の機能と特性 -----	24
4. 1 はじめに	
4. 2 プロピオン酸菌によるBGSの産生	
4. 3 BGSの精製と構造決定	
4. 4 ヒト腸内フローラに及ぼすBGSの影響	
1) 嫌気性連続培養系	
2) ヒト投与試験	
4. 5 BGSの作用メカニズム	
4. 6 おわりに	
第5章 プロピオン酸菌によるビフィズス菌 特異的増殖促進物質の効率的生産 -----	31
5. 1 緒 論	
5. 2 BGS活性の測定	
5. 3 グルコースを炭素源としたBGSの生産	
5. 4 乳酸を炭素源としたBGSの生産	
5. 5 逐次培養と混合培養によるBGSの効率的な生産	
5. 6 連続生産システムによるBGSの効率的な生産	
第6章 膜型混合バイオリアクターを用いたビフィズス菌と プロピオン酸菌の同時菌体生産 -----	43
6. 1 緒 論	
6. 2 実験方法および実験装置	
1) 微生物と培地	
2) 培養方法	

3) 分析方法

6. 3 実験結果および考察

1) プロピオン酸菌培養上澄み液の添加効果

2) プロピオン酸菌の増殖に対する炭素源の種類の影響

3) 逐次培養による *B. adolescentis* と *P. freudenreichii* の菌体生産

4) 膜型混合培養による *B. adolescentis* と *P. freudenreichii* の同時菌体生産

5) 回分培養による *B. longum* と *B. breve* の菌体生産

6) 膜型混合培養による *B. longum* と *P. freudenreichii* の同時菌体生産

7) 膜型混合培養による *B. breve* と *P. freudenreichii* の同時菌体生産

第 1 章 序 論

第1章 序 論

1. 1 微生物間相互作用

自然界において微生物は他の微生物をはじめとして植物や動物と相互に影響しあいながら共存しており、単一の微生物だけで生存していることは希有であると思われる¹⁾。Aと α の2種の(微)生物間での相互作用の組み合わせは、無関係な場合を(0)、プラスの場合を(+), およびマイナスの場合を(-)とした時、00, ++, --, +-, +0および-0の6種類となる²⁾。これらのうち、不偏(中立)関係(neutralism)をはさんで正の相互関係は協調的關係を示す。一方、負を含む相互関係は敵対的關係と呼ばれる。協調的關係としては、一方は利益を受けるが他方は影響を受けない片(偏)利共生(commensalism), 両方の種の生存に利益があり、互いに相手がいなくてもよい原始協同(proto cooperation), および両方の種の生存に利益があり、互い相手がいないと生存できない相利共生(mutualism)の關係がある。敵対的關係としては、一方の種が他を抑制し、その種は他からの影響を受けない片(偏)害作用(amenalism), 両方が互いに他種を抑制する競争(competition), 一方の種が他を攻撃しながら他に依存する場合で、一般に攻撃者は宿主より小さい寄生(parasitism), および寄生と同じく、一方が他を攻撃しながら他に依存するが一般に攻撃者は被攻撃者より大きい捕食(predation)などがある。どんな2種間の個体の關係においても、影響が正確に0となることはめったにないであろうが、問題にならないくらい小さいときには0と考えられる。また、強い影響が存在しても、正の効果と負の効果が相殺して0となることも考えられる。したがって、お互いの影響が0である中立關係においても、必ずしも種間に相互關係がないことではない。また、片利共生にしても相利共生しても、2, 3の物質についての受益バランスからみることは比較的容易であろうが、個体の利益が総合された種の個体数の増加という面から、相互作用を解析することは非常に困難になるであろう。このように微生物の相互關係は、たとえ2種の間であつても複雑である。しかし、一般に長い進化の歴史の上で、寄生者が片利共生者を経て相利共生者に進化するのは自然のプロセスである。このことは「今日の敵は明日の友」と言い表される。

人類は、微生物の存在を認識していない時代からワイン、ビール、清酒、チーズ、ヨーグルト、味噌、醤油、漬物などの数多くの発酵食品の製造に、微生物を利用してきた。このように直接眼に見えない微生物を利用して、生活に役立てきた人類の英知は、誠に驚くべきものである。その後、微生物の存在が明らかにされ、その性質と能力が解明されるにつれて、特定の微生物がもつ優れた生産能力を利用しようとする方向へと研究は進められ、微生物利用学は飛躍的に発展を遂げてきた。すなわち、微生物を用いた有用物質の生産は、純粋分離した優秀な微生物による純粋培養を基本にして発展してきている。微生物間相互作用を積極的に活用したバイオプロセスとは何であろうか。

1. 2 混合培養を利用した有用物質の生産

従来、各種アルコール飲料や乳製品などの発酵食品の製造および活性汚泥法やメタン発酵法などの排水処理において、複数の微生物が関与する混合培養を積極的に利用してきた¹⁾。しかし、混合培養系における各微生物の挙動や相互作用はブラックボックスであり、あるインプットに対して経験的な予測に基づくアウトプットを期待して混合培養を利用している状況にあると思われる。混合培養系内の各微生物の挙動および上述したような相互作用を定量的に解明することは、混合培養系の安定化や積極的な制御のために不可欠である。したがって、これまでも混合培養に関するモデリングやダイナミックスについて多くの研究が実施されている。ところが、複数の微生物を同一の空間内で培養する従来の混合培養においては、個々の細胞数の計測だけでも煩雑であり、まして個々の微生物の性質に合わせて培養環境を制御することは非常に困難である。しかし、混合培養系を定量的に解析するための培養装置は、これまでほとんど開発されていない。実験書には、セロファン膜によって隔てた2重培養管が記述されているが、この装置は振とう培養や通気培養には適さない。最近、田中らは底部にメンブランフィルターを装着した培養槽を2台連結した混合培養解析装置を開発し、*Saccharomyces cerevisiae* と *Zymomonas mobilis* をモデル菌株として混合培養した結果を報告している³⁾。この装置を用いることによって、両菌の細胞数は容易に計測できる。また、上記の培養槽を3台連結した混合培養解析装置を用いて、サイレージの発酵過程（乳酸発酵、酪酸発酵および乳酸発酵を阻害する微生物群）に関与する微生

物群の混合培養を行い、比較的低温では乳酸発酵が支配的であり、高温になるにしたがって酪酸発酵が活発になる環境を再現できることを明らかにしている。さらに、腐敗菌の最適な培養温度においても、活発に乳酸発酵を行い、腐敗を抑制する乳酸菌の分離に成功し、高温においても高品質のサイレージを調製できることを示している⁴⁾。

混合培養系における微生物間の相互作用を解明できれば、それらの相互作用を積極的に利活用した有用物質の合成、有用細胞の生産、物質の機能変換、物質の迅速分解などを目的とした、バイオプロセスの開発に発展できると考えられる。特に、自然界の中で寄生者が片利共生者を経て相利共生者へとどのような方法で進化してきたのか、あるいは両共生関係においては物質レベルでどのように協調しているのか、などが解明されれば、バイオプロセスにおいて単一の微生物だけを用いても微生物間の相互作用を模倣した現象を再現することが可能になると考えられる。

これまで報告してきた結果は、微生物間の相互作用を積極的に活用した混合培養プロセスと言うよりは、単純に「2種の微生物を用いたバイオプロセス」について検討したという方が的確であろう。すなわち、まず2種の食品微生物を用いた逐次転換反応によって安全な抗菌性物質の生産について検討した^{5, 6)}。また、2種の酵母が別々の培養槽で異なる環境条件でも増殖できる膜型混合バイオリアクターを開発し、この装置を用いてグルコースとキシロースからなる複合基質からのエタノール生産について検討した^{7, 8)}。さらに、発酵乳ケフィア中の乳酸菌と酵母と相互作用に注目して、機能性多糖ケフィランの生産について検討した⁹⁾。

1. 3 本研究の目的

本研究では、以上の結果を踏まえて、プロピオン酸菌とビフィズス菌の相互作用に着目し、それらを解析するとともに、プロバイオティクスとしてのビフィズス菌の生産へ応用することを検討した。従来、ビフィズス菌自体を効率よく生産する培養手段として、1) 天然物由来の栄養源を添加する方法、2) 増殖に阻害となる代謝産物（乳酸と酢酸）を何らかの分離手段（例えば濾過、抽出、吸着、電気透析など）で除去する方法¹⁰⁻¹³⁾、3) 増殖促進物質（各種オリゴ糖など）を利用する方法などが検討されている。また、Kaneko らはプロピオン酸菌の培

養液および菌体抽出物が各種ビフィズス菌の増殖を促進すること、またその増殖促進作用はビフィズス菌に対して特異的であることを報告している¹⁴⁾。最近、このプロピオン酸菌が生産するビフィズス菌特異的増殖促進物質 (BGS: Bifidogenic Growth Stimulator) は、2-アミノ-3-カルボキシ-1,4-ナフトキノンであることを明らかにしている¹⁵⁾。

そこで、著者らが従来から用いてきた膜濾過型バイオリアクターと新規に開発されたオンライン乳酸コントローラを組み合わせた連続生産システムによるBGSの効率的生産について検討した。また、プロピオン酸菌の培養液を利用したビフィズス菌の効率的生産を最終目的として、膜型混合培養法を用いてビフィズス菌とプロピオン酸菌の間の相互作用を解析するとともに、ビフィズス菌とプロピオン酸菌の同時菌体生産について検討した。

文 献

- 1) Bailey, J. E. and D. F. Ollis ; Biochemical Engineering Fundamentals 2nd ed., p. 854- 902, p. 903- 964, McGraw- Hill Book Co., New York, USA (1987).
- 2) 柳田友道 ; 微生物の生態 18, p.1-15, 学会出版センター, 東京 (1992).
- 3) 田中秀夫 ; “混合細胞培養の新しい展開” 化学工学秋田大会, 講演要旨集 p. 170-173, (1993).
- 4) Kuwahara, I., S. Ohmomo and H. Tanaka ; “Screening for Lactic Acid Bacteria for Silage-Making by Simulated Ensilage,” Proc. Annual Meeting of Soc. Ferment. Bioeng. Japan, , p.205, Tsukuba, Japan (1993).
- 5) Nakazawa, H., O. Takeda, T. Itaya and M. Taniguchi ; “Enhancement of Antimicrobial Activity of Bifidobacterial Culture by a Mixed Culture,” Proc. Annual Meeting of Japan Soc. Biosci. Biotechnol. Agrochem., p.66, Tokyo, Japan (1994).
- 6) Taniguchi, M., H. Nakazawa, O. Takeda, K. Hoshino and T. Tanaka : “Production of a Mixture of Antimicrobial Organic Acids from Lactose by Co-Culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1522-1527 (1998).
- 7) Taniguchi, M., T. Tohma, T. Itaya and M. Fujii ; “Ethanol Production of a Mixture

- of Glucose and Xylose by Co-Culture of *Pichia stipitis* and a Respiratory Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 364-370 (1997).
- 8) Taniguchi, M., T. Itaya, T. Tohma and M. Fujii ; “Ethanol Production of a Mixture of Glucose and Xylose by a Novel Co-Culture System Using Two Fermentors and Two Microfiltration Modules,” *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 59-64 (1997).
 - 9) Nomura, M., T. Itaya, T. Tanaka and M. Taniguchi ; “Production of Useful Polysaccharide (Kefiran) by a Lactic Acid Bacterium of a Food Microorganism,” Proc. Annual Meeting of Soc. Chem. Eng. Japan, No. 1, p.118, Tokyo, Japan (1997).
 - 10) Taniguchi, M., N. Kotani and T. Kobayashi ; “High Concentration Cultivation of *Bifidobacterium longum* in Fermentor with Cross-Flow Filtration,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 438-441 (1987).
 - 11) Taniguchi, M., K. Hoshino, K. Shimizu, I. Nakagawa, Y. Takahashi and M. Fujii ; “Rapid Production of *Pediococcus halophilus* Salt-Tolerant Cells by a Cultivation Method Employing Gradual Increase of NaCl Concentration Using a Fermentor with Microfiltration Module,” *J. Ferment. Technol.*, **66**, 633-641 (1988).
 - 12) Taniguchi, M., I. Nakagawa, K. Hoshino., T. Itoh, K. Ohno and M. Fujii ; “Production of Superoxide Dismutase from *Streptococcus lactis* Using a Bioreactor with a Microfiltration Module,” *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2447-2453 (1989).
 - 13) Taniguchi, M., K. Hoshino, Y. Urasaki and M. Fujii ; “Continuous Production of an Antibiotic Polypeptide (nisin) by *Lactococcus lactis* Using a Bioreactor Coupled to a Microfiltration Module,” *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 704-708 (1994).
 - 14) Kaneko, T., H. Mori, M. Iwata, and S. Meguro ; “Growth Stimulator for Bifidobacteria Produced by *Propionibacterium freudenreichii* and Several Intestinal Bacteria,” *J. Dairy Sci.*, **77**, 393-404 (1994).
 - 15) Mori, H., T. Sato, N. Takemoto, T. Kamiyama, Y. Yoshiyama, H. Sato, S. Meguro, and Kaneko, T. ; “Isolation and Structural Identification of Bifidogenic Growth Stimulator Produced by *Propionibacterium freudenreichii*,” *J. Dairy Sci.*, **80**, 1959-1964 (1997).

第2章 プロピオン酸菌が産生するビフィズス 菌の増殖促進物質について

第2章は下記より転載した。

プロピオン酸菌が産生するビフィズス菌の増殖促進物質について.

Japanese Journal of Dairy and Food Science, Vol.45, No.4,

A-83 ~ A-91 (1996).

第 3 章 微生物間相互作用の解析と 混合培養システムの開発

第 3 章は下記より転載した。

微生物間相互作用の解析と混合培養システムの開発.
化学工学論文集, 第 25 巻 2 号, 149-157 (1999).

第4章 プロピオン酸菌の産生するビフィズス菌の増殖促進物質の機能と特性

第4章は下記より転載した。

プロピオン酸菌が産生するビフィズス菌の増殖促進物質の機能と特性.

Milk Science, Vol.49, No.3, 161-167 (2000).

第5章 プロピオン酸菌によるビフィズス菌 特異的増殖促進物質の効率的生産

第5章 プロピオン酸菌によるビフィズス菌特異的増殖促進物質の効率的生産

5. 1 緒 論

ビフィズス菌は、各種の生理効果（腸内菌叢の改善，腐敗産物の生成抑制，便性改善等の体調節機能，コレステロール低下作用，免疫賦活作用など）を有するため，特定保健用食品いわゆる機能性食品中の有効成分として，またプロバイオティクスすなわち生菌製剤としても非常に有用な乳酸菌である。著者らは，これまでに各種バイオリアクターを用いた食品微生物，特に乳酸菌の生産および食品微生物による抗生物質，芳香成分，酵素などの有用物質の生産について既に報告してきた。¹⁻⁴⁾

プロピオン酸菌は，ビフィズス菌の増殖を特異的に促進させる物質（BGS: Bifidogenic Growth Stimulator），すなわち 2-アミノ-3-カルボキシ-1,4-ナフトキノン(ACNQ)を生産することが，共同研究者の金子らによって最近報告された。⁵⁾

そこで，本研究では，BGSを利用したビフィズス菌の効率的な生産を最終目的として，まず各種プロピオン酸菌によるBGSの効率的生産について検討した。⁶⁻¹¹⁾ すなわち，著者らが以前に開発した膜濾過型バイオリアクターと新規に開発されたオンライン乳酸コントローラを組み合わせた連続生産システムによるBGSの効率的生産について検討した。

5. 2 BGS活性の測定

BGSは0.1 ng/mlのオーダーでビフィズス菌に対して増殖促進効果を示すために，機器分析による定量は非常に煩雑になることが報告されている。⁵⁾ そこで，BGSをバイオアッセイによって定量する方法について検討した。ビフィズス菌を懸濁したTPY寒天培地上にペーパーディスクを置いた後，そのディスクにBGSを含むプロピオン酸菌の培養液を含浸させて，ディスクのまわりに形成されるビフィズス菌の増殖円を測定した。ここで，サンプル液中にBGSが存在しなければ，ビフィズス菌は全く生育できないように寒天培地成分の濃度およびpHを設定した。図5-1に示すように，培地成分の濃度が標準の1/4倍の時に一番

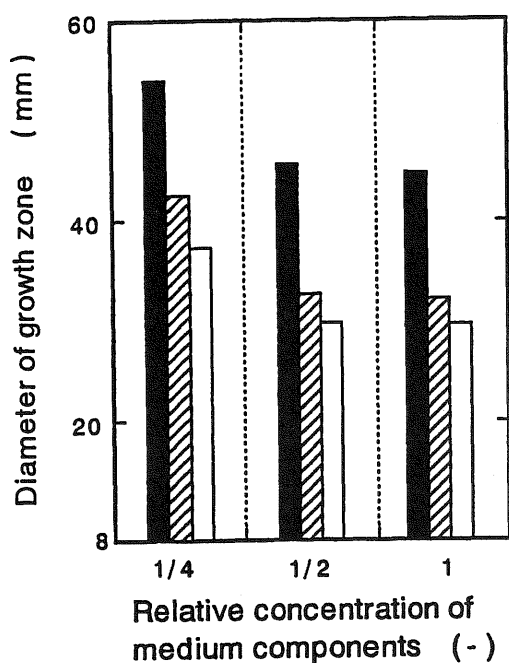


Fig. 5-1. Effect of the concentration of medium components on sensitivity of BGS assay. The culture broth without dilution (solid bar) and the culture broth diluted by a factor of 20 (hatched bar) and 50 (open bar) were used as test samples.

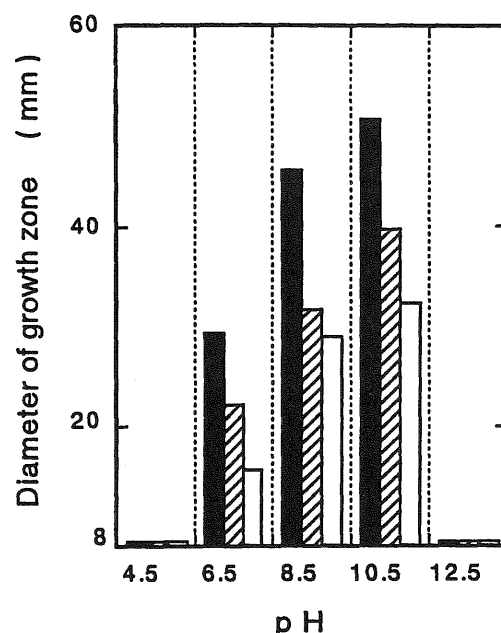


Fig. 5-2. Effect of the pH of agar medium on sensitivity of BGS assay. The culture broth without dilution (solid bar) and the culture broth diluted by a factor of 20 (hatched bar) and 50 (open bar) were used as test samples.

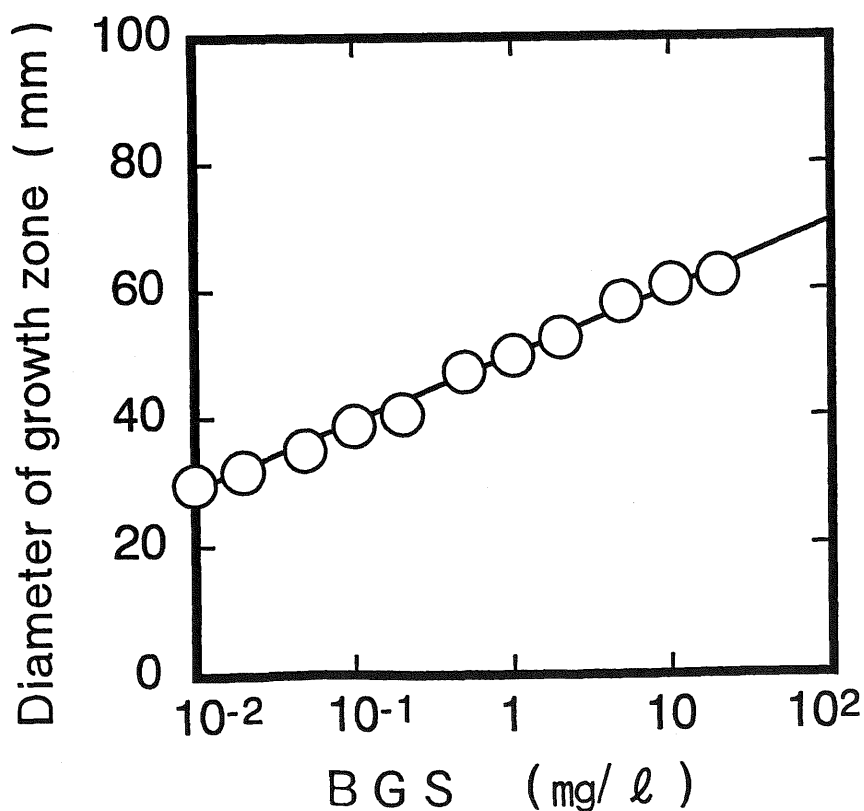


Fig. 5-3. Relationship between diameter of the growth zone and BGS concentration.

感度よく測定できたが、増殖した菌の円周が明確ではなかった。そこで、最終的に、増殖円を感度よくかつ正確に測定するための最適な条件は、培地成分の濃度が標準の 1/2 倍、また図 5-2 に示すように培地の pH が 8.5 と決定できた。⁶⁾ この条件において合成した ACNQ 標準品が示す増殖促進円の直径と比較することによって、プロピオン酸菌によって培養液中に生産された BGS の濃度を算出した。⁸⁾ 本研究で得られた検量線の例を図 5-3 に示す。

5. 3 グルコースを炭素源とした BGS の生産

50 g/L のグルコースを炭素源とした T P Y 培地を用いて *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* および *Propionibacterium arabinosum* を培養した。その結果を図 5-4 に示す。また、これらの培養において得られた BGS と代謝産物の濃度を表 5-1 に示す。*P. freudenreichii* は最も増殖が遅く、BGS 生産量も低かった。代謝産物濃度は、菌株にかかわらずほぼ同じ程度であったが、BGS 濃度は *P. arabinosum* を用いた時に最大となった。このように図 5-3 の検量線に基づいて、培地中の BGS 濃度を測定することが可能となった。

5. 4 乳酸を炭素源とした BGS の生産

一般にプロピオン酸菌は、ラクトースやグルコースなどの糖類を炭素源とした場合に比べて、乳酸を炭素源とした場合に増殖がよくなることが知られている。この点は、これまでの研究において確認した。そこで、10 g/L の乳酸を炭素源とした T P Y 培地を用いて *P. freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (以下では *P. shermanii*) および *P. arabinosum* を培養した。その結果を図 5-5 に示す。検討した菌株の中では *P. shermanii* の増殖速度が最も速く、BGS の生産量も最大となった。そこで、増殖速度と BGS 生産量に対する初期乳酸濃度の影響を 5 と 20 g/l について検討した。その結果を図 5-6 に示す。初期乳酸濃度を高くするにつれて BGS 濃度は徐々に高くなったが、BGS 濃度が最大になるまでの培養時間は長くなった。これは、基質である乳酸の濃度が高い場合には、培養初期において増殖を阻害し、その後に代謝産物であるプロピオン酸と酢酸がプロピオン酸菌の増殖を阻害したためと考えられる。実際、後述するようにプロピオン酸

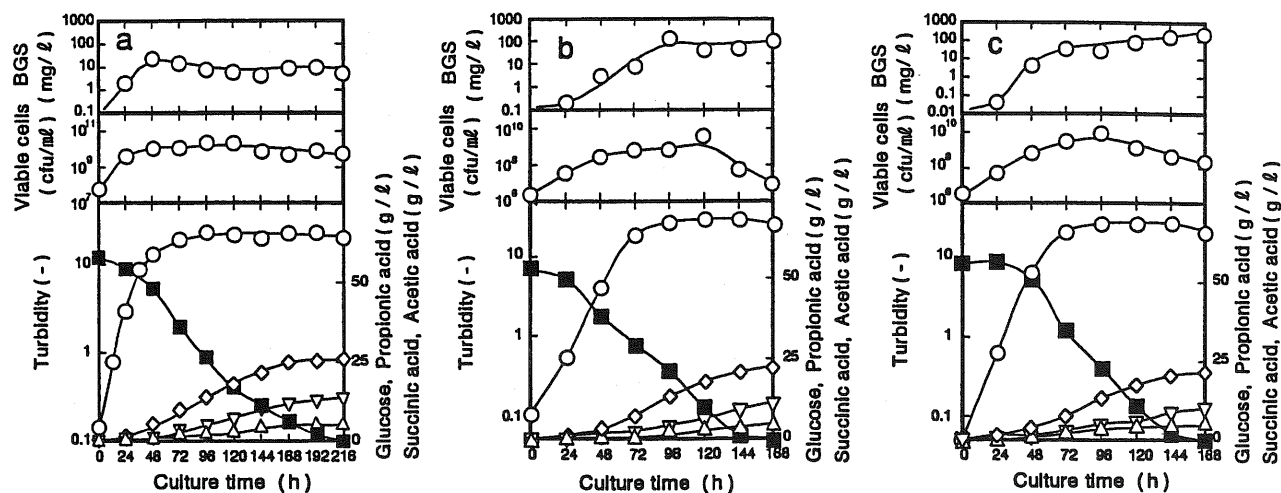


Fig. 5-4. BGS production by batch cultures of propionic acid bacteria using glucose as a carbon source.

(a) *P. freudenreichii*, (b) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, (c) *P. arabinosum*

Symbols : (○) Turbidity, (■) Glucose, (◇) Propionic acid, (▽) Succinic acid, (△) Acetic acid.

Table 5-1. BGS production by cultures of propionic acid bacteria using glucose as a carbon source.

strains used	Culture time (h)	Propionic acid (g/l)	Acetic acid (g/l)	Succinic acid (g/l)	BGS (mg/l)
<i>P. freudenreichii</i>	216	25.6	5.62	13.1	5.32
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	168	23.3	5.27	11.5	93.5
<i>P. arabinosum</i>	168	22.1	5.61	10.6	233

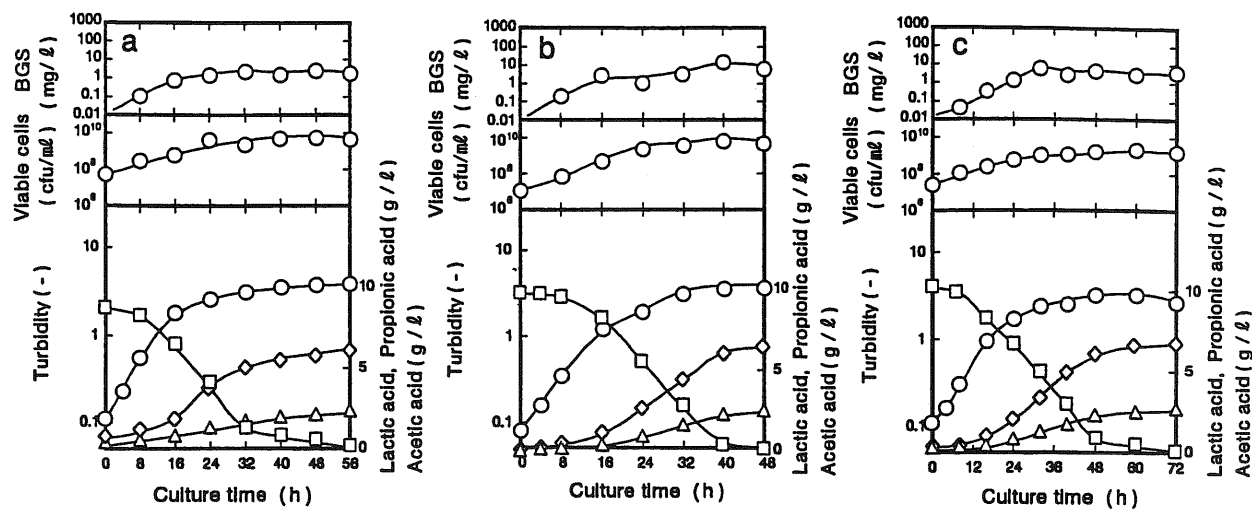


Fig. 5-5. BGS production by batch cultures of propionic acid bacteria using 10 g/L of lactic acid as a carbon source.

(a) *P. freudenreichii*, (b) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, (c) *P. arabinosum*

Symbols : (○) Turbidity, (□) Lactic acid, (◇) Propionic acid, (△) Acetic acid.

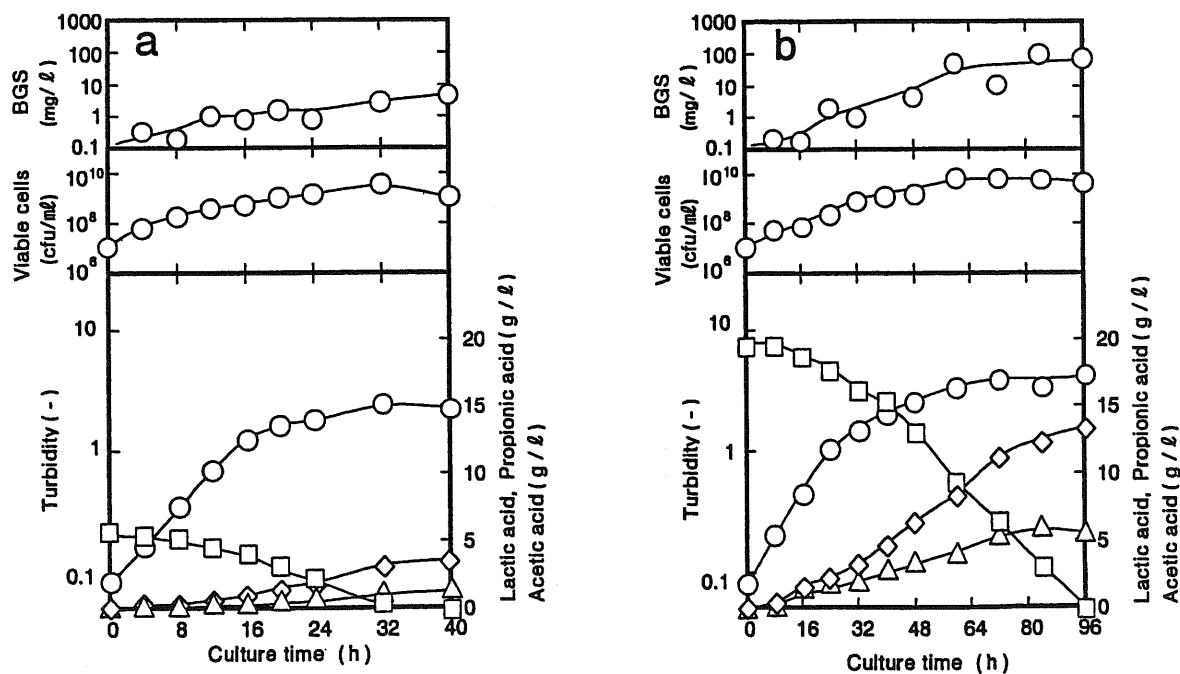


Fig. 5-6. Effect of lactic acid concentration on cell growth and BGS production by batch culture of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*.

Lactic acid concentration : (a) 5 g/L, (b) 20 g/L. Symbols : (○) Turbidity, (□) Lactic acid, (◇) Propionic acid, (△) Acetic acid.

および酢酸を添加した培養において、プロピオン酸菌の増殖は著しく阻害された。^{8, 10)} これらの結果より、乳酸による基質阻害を避けるために初期乳酸濃度を 10 g/l 程度として、増殖を阻害する代謝産物を除去できれば BGS を効率よく生産できると考えられる。

5. 5 逐次培養と混合培養による BGS の効率的な生産

培地の有効利用の観点から、ラクトースを炭素源として *Bifidobacterium longum* を培養した後、その使用した培地を用いて *P. shermanii* を培養する逐次培養を行った。その結果を図 5-7 に示す。培地中に含まれていた乳酸を消費して *P. shermanii* は増殖し、BGS を生産した。次にラクトースを炭素源として *Lactobacillus casei* と *P. shermanii* の混合培養を行った。30 g/L のラクトースを用いた培養の結果を図 5-8 に示す。ラクトースは *L. casei* によっていったん乳酸に変換され、その後 *P. shermanii* によってプロピオン酸と酢酸に変換された。ラクトース濃度を 50 g/L にした場合には、短時間のうちに高い濃度の乳酸が生産され、*P. shermanii* の増殖は阻害された。その結果、BGS の生産量は大幅に低下した。これまで述べてきた乳酸を炭素源とした単独培養、*B. longum* の培養液を用いた逐次培養、およびラクトースを炭素源とした *L. casei* と *P. shermanii* の混合培養の結果を表 5-2 に示す。乳酸を用いた単独培養の場合と同じように、逐次培養や混合培養においても BGS を生産できることがわかった。

5. 6 連続生産システムによる BGS の効率的な生産

P. shermanii の増殖に対する初期乳酸濃度の影響を図 5-9 に示す。縦軸に比増殖速度 μ 、培養 24 時間後の濁度をそれぞれ示す。乳酸濃度を増加させるにつれて、*P. shermanii* の比増殖速度および濁度は徐々に低下した。しかし、低い乳酸濃度の範囲における比増殖速度および濁度の値からわかるように、*P. shermanii* の増殖は初期乳酸濃度が 10g/l 前後までは影響を受けなかった。次に、*P. shermanii* の増殖に対する代謝産物濃度の影響を図 5-10 に示す。炭素源である乳酸の濃度を 10 g/l として、プロピオン酸または酢酸を培地に添加して *P. shermanii* を培養した。下の図は、代謝産物であるプロピオン酸および酢酸を添加した場合の比増殖速度 μ と添加しない場合の比増殖速度 μ_0 の比を表す。上の図は培養 24 時間後

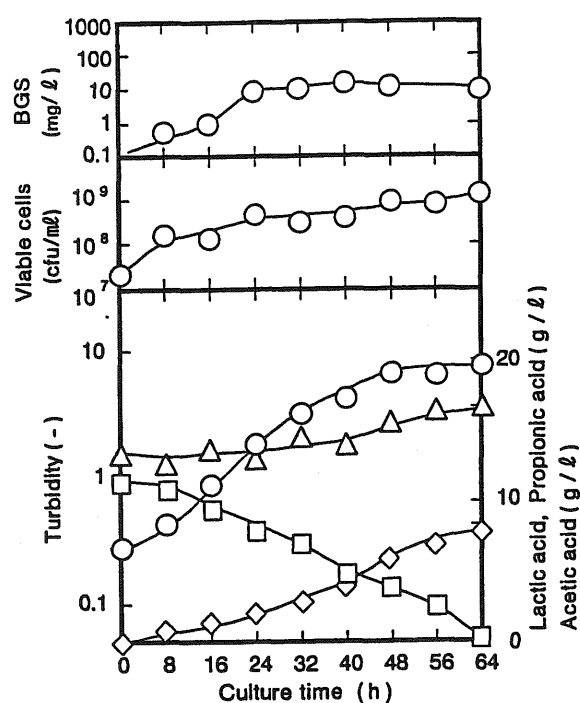


Fig. 5-7. BGS production by batch culture of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* using the medium spent once for cultivation of *B. longum*. Symbols : (○) Turbidity, (□) Lactic acid, (◇) Propionic acid, (△) Acetic acid.

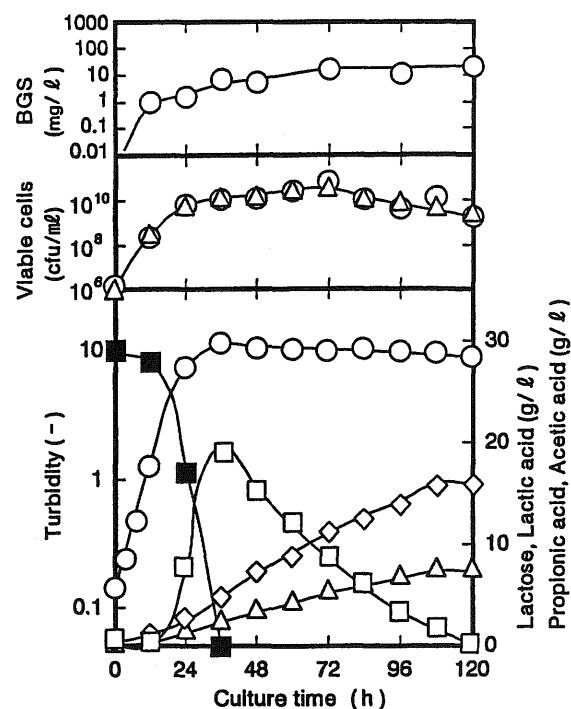


Fig. 5-8. BGS production by co-culture of *L. casei* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* using lactose as a carbon source. Symbols : (○) Turbidity, (■) Lactose, (□) Lactic acid, (◇) Propionic acid, (△) Acetic acid.

Table 5-2. Comparison of amounts of BGS produced among different cultures methods.

Culture methods	Strains used	Carbon source		Culture time (h)	BGS (mg/l)	BGS Productivity (mg/l/h)	Remarks
		Kind	Concentration (g/l)				
Monoculture	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Lactic acid	5	40	4.76	0.12	Fig. 2-6
	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Lactic acid	10	48	5.93	0.12	Fig. 2-5
	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Lactic acid	20	96	62.9	0.65	Fig. 2-6
Two-stage culture	<i>B. longum</i> → <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Lactose	40	64	9.37	0.15	Fig. 2-7
Co-culture	<i>L. casei</i> + <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Lactose	10	60	2.50	0.042	—
	<i>L. casei</i> + <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Lactose	30	120	19.7	0.16	Fig. 2-8
	<i>L. casei</i> + <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Lactose	50	168	0.50	0.030	—

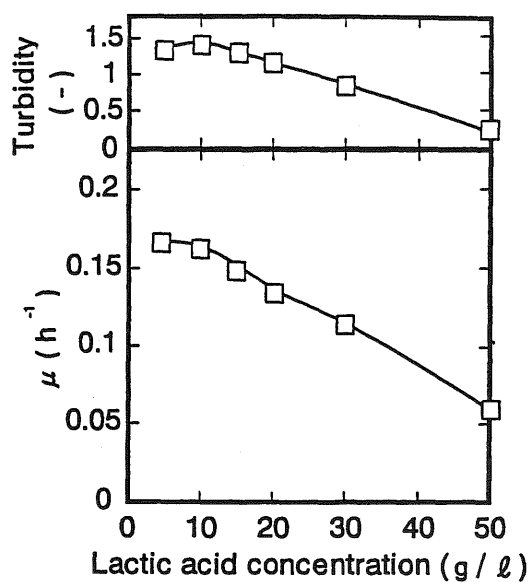


Fig. 5-9. Influence of the lactate concentration on cell growth of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*.

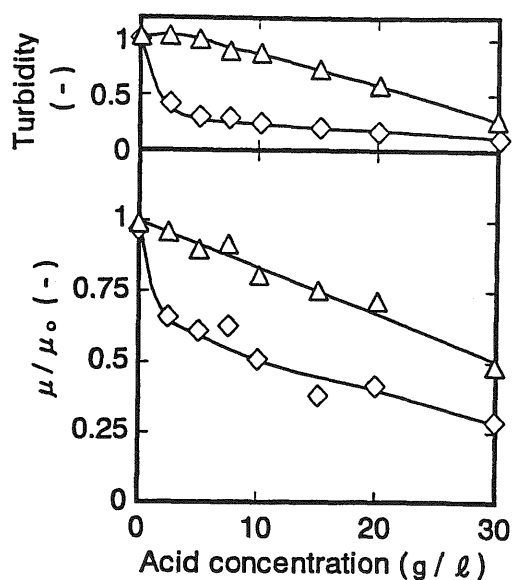


Fig. 5-10. Influence of the concentrations of metabolites on cell growth of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Symbols: (\diamond) Propionic acid, (\triangle) Acetic acid.

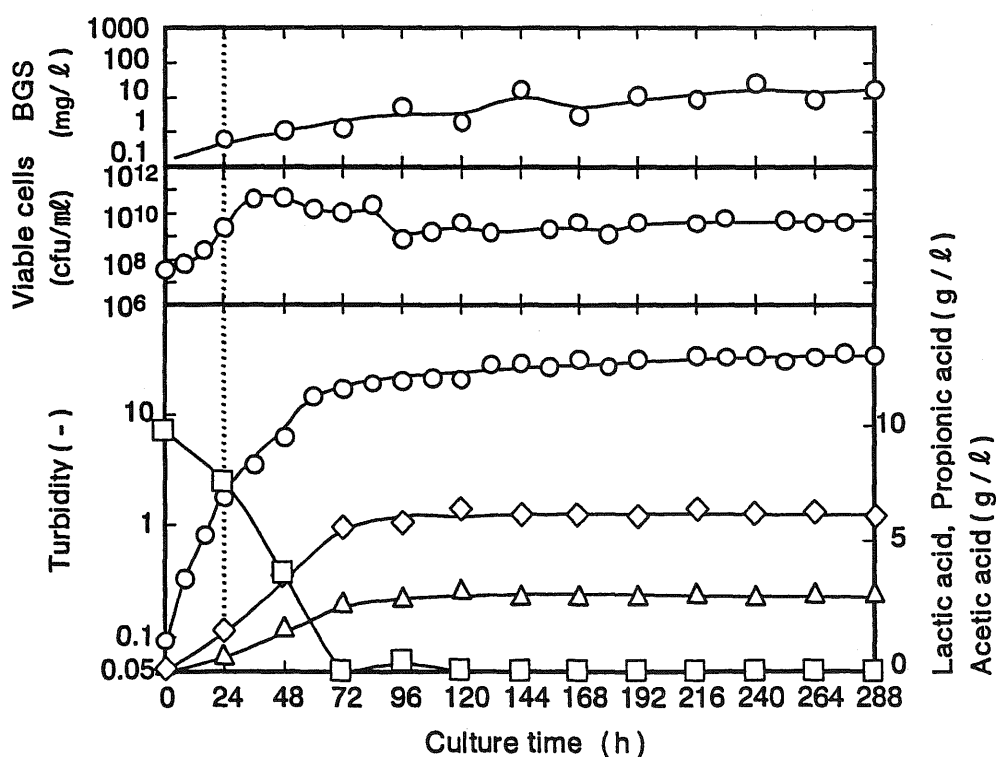


Fig. 5-11. Continuous production of BGS using a bioreactor with a microfiltration module. Filtration was started at 24 h as indicated by the dotted line. The dilution rate (D) was maintained at 0.075 h^{-1} . The same volume of fresh medium with 10 g/L lactic acid as the filtration was supplied. Symbols: (\circ) Turbidity, (\diamond) Propionic acid, (\triangle) Acetic acid, (\square) Lactic acid.

の濁度を示す。 μ/μ_0 は、有機酸濃度が増加するにつれて徐々に減少した。特に、プロピオン酸を添加した場合には低濃度の領域においても急激に増殖が阻害された。24 時間後の濁度は、低い濃度の酢酸を添加した時にわずかに高くなったが、5 g/L 以上の濃度では減少した。これらの結果より、代謝産物であるプロピオン酸と酢酸は *P. shermanii* の増殖を阻害することがわかった。

そこで、乳酸による基質阻害を避けるために初期乳酸濃度を 10g/l として、増殖を阻害する代謝産物を除去しながら、プロピオン酸菌を高濃度に培養できる膜濾過型バイオリアクターを用いた BGS の連続生産について検討した。その結果を図 5-11 に示す。培養 24 時間目から希釈率を 0.075h^{-1} 、供給乳酸濃度を 10g/l として濾過培養を開始した。その結果、72 時間目に菌体濃度は濁度として約 17 となり、その後徐々にほぼ一定速度で増加し、288 時間目に約 35 に達した。この濃度は回分培養の約 9 倍である。また、培養液中の乳酸濃度は乳酸を連続的に供給しているにもかかわらず、72 時間目以降見かけ上ゼロとなり、乳酸はほぼ 90 %の割合でプロピオン酸と酢酸に変換された。一方、BGS 濃度は菌体の増殖につれて徐々に増加し、培養 96 時間目に約 6 mg/l になり、その後 288 時間目までほぼ一定の濃度の BGS が連続的に生産された。生菌数は乳酸が存在する 84 時間目までは高い値に維持されていたが、その後減少し、培養 288 時間目までほぼ一定となった。したがって、高い生菌数を維持するためには、阻害がからない程度に乳酸をさらに供給する必要があると考えられる。

オンライン乳酸コントローラ (BF-400: エイブル㈱) を用いて炭素源である乳酸の濃度を低レベルに制御した流加培養を行い、BGS の生産に対する乳酸濃度の影響を検討した。その結果を図 5-12 に示す。約 3 g/l になるように乳酸を供給した流加培養において、BGS 濃度は回分培養に比べて 26 倍高くなった。したがって、オンライン乳酸コントローラを用いて乳酸濃度を低レベルに制御する流加培養は、BGS の生産にとって有効であることがわかった。そこで、膜濾過型バイオリアクターにオンライン乳酸コントローラを組み込んだ BGS の連続生産システムを開発した。このシステムを用いた BGS の連続生産の結果を図 5-12 に示す。この培養において、150 時間以上にわたって乳酸濃度を低く制御でき、かつ培養期間を通して生菌数を、平均 10^{10} のオーダーに維持できた。この培養において得られた BGS 濃度と時間当たりの BGS 生産性は、それぞれ回

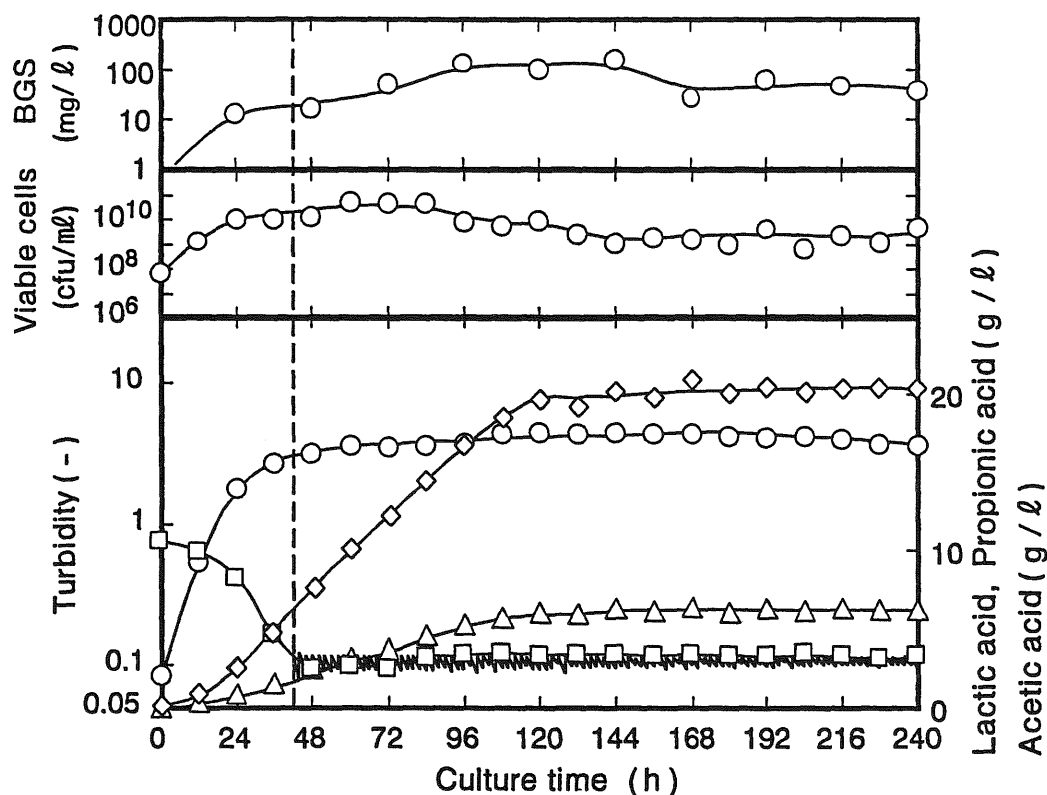


Fig. 5-12. BGS production using a bioreactor with a feed back control system of lactic acid concentration in the culture broth.

Controlling of lactic acid concentration in the culture broth was started at 42 h as indicated by the broken line. The concentration of lactic acid was maintained at 3 g/L by feeding the fresh medium with 50 g/L lactate. The concentration of lactic acid in the culture broth calculated by the controller system was shown by the solid wave line. Symbols: (○) Turbidity, (◇) Propionic acid, (△) Acetic acid, (□) Lactic acid.

分培養の 34 倍と 123 倍であった。¹⁰⁾ これまで述べてきた膜濾過培養，オンライン乳酸コントローラを用いて流加培養，膜濾過型バイオリアクターとオンライン乳酸コントローラを組み合わせた培養による BGS の生産結果を表 5-3 に示す。この比較より，新しく開発した膜濾過型バイオリアクターとオンライン乳酸コントローラを組み合わせた連続生産システムを用いることによって，BGS の濃度およびその生産性を大幅に向上できることがわかった。

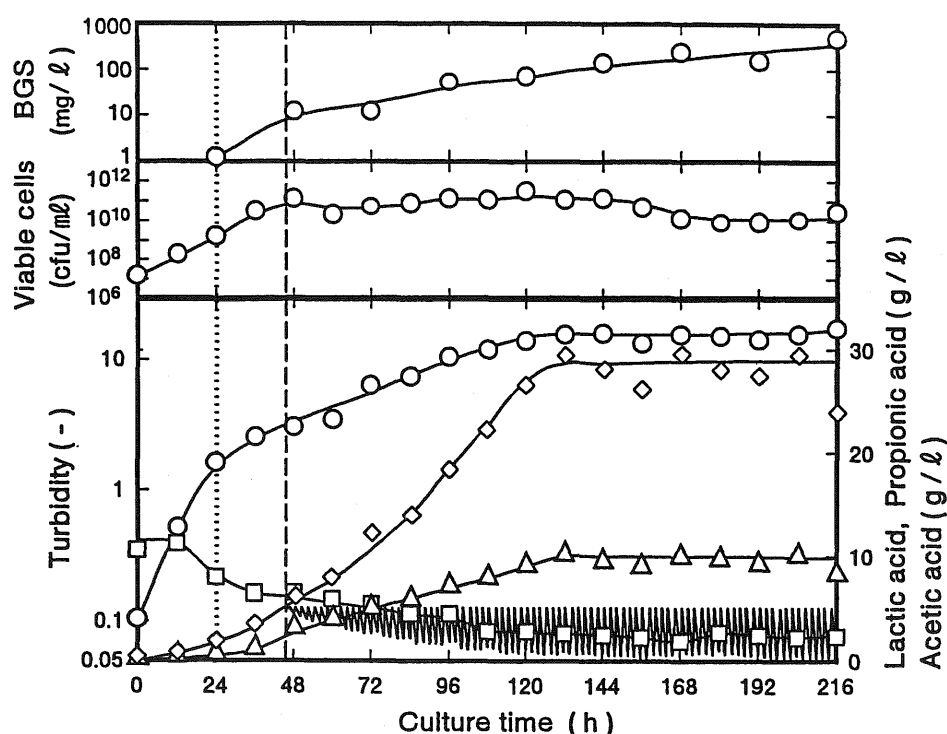


Fig. 5-13. Continuous production of BGS using a bioreactor with a microfiltration module and a feed back control system of lactic acid concentration in the culture broth.

Filtration was started at 24 h as indicated by the dotted line. The dilution rate (D) was maintained at 0.075 h^{-1} . The same volume of fresh medium with 10 g/L lactate as the filtration was supplied. Controlling of lactic acid concentration in the culture broth was started at 46 h as indicated by the broken line. The concentration of lactic acid was maintained at 3 g/L by feeding the fresh medium with 50 g/L lactate. The concentration of lactic acid in the culture broth calculated by the controller system was shown by the solid wave line. Symbols: (○) Turbidity, (◇) Propionic acid, (△) Acetic acid, (□) Lactic acid.

Table 5-3. Comparison of BGS productivity among different culture systems.

Culture methods	Culture time (h)	Turbidity (-)	Viable cell (cfu/ml)	Propionic acid (g/l)	Acetic acid (g/l)	BGS (mg/l)	BGS Productivity (mg/l/h)	Remarks
Batch culture	48	3.76	5.5×10^{10}	6.4	2.5	5.93	0.124	Fig. 2-5
Culture with filtration	144~288	31.9	5.4×10^{10}	6.4	3.1	13.4	1.00	Fig. 2-11
Fed-batch culture	144	4.44	1.1×10^9	20.4	6.3	154	1.07	Fig. 2-12
Fed-batch culture with filtration	120~216	16.2	5.4×10^{10}	27.8	9.8	204	15.3	Fig. 2-13

文 献

- 1) Taniguchi, M., Kotani, N., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 179 (1987).
- 2) Taniguchi, M., Hoshino, K., Shimizu, K., Nakagawa, I., Takahashi, Y. and Fujii, M.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 633 (1988).
- 3) Taniguchi, M., Hoshino, K., Ito, T., Kumakura, H. and Fujii, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 886 (1992).
- 4) Taniguchi, M., Hoshino, K., Urasaki, H. and Fujii, M.: *J. Ferment. Technol.*, **77**, 704 (1994).
- 5) 金子 勉, 野田勝彦: 酪農科学・食品の研究, **45**, A83-A91 (1996).
- 6) 飛田和宏, 三澤克博, 堀内将史, 田中孝明, 金子 勉, 谷口正之: 化学工学会第 62 年会講演要旨集第 1 分冊 p.119 (1997).
- 7) 堀内将史, 飛田和宏, 金子 勉, 梅沢 彰, 谷口正之: 日本農芸化学会大会講演要旨集 p.246 (1997).
- 8) 白石典生, 飛田和宏, 佐藤信之, 金子 勉, 梅澤 彰, 田中孝明, 谷口正之: 平成 10 年度日本生物工学会, 講演要旨集 p.216 (1998).
- 9) 佐藤信之, 白石典生, 田中孝明, 谷口正之: 化学工学会第 65 年会, 講演要旨集 p.370 (2000).
- 10) 谷口正之, 佐藤信之, 白石典生, 梅沢 彰, 田中孝明: 2000 年度日本農芸化学会大会, 講演要旨集 p.383 (2000).
- 11) 佐藤信之, 白石典生, 田中孝明, 谷口正之: 日本食品工学会 (東京), 講演要旨集 p.118 (2000).

第 6 章 膜型混合バイオリアクターを用いた ビフィズス菌とプロピオン酸菌の 同時菌体生産

第 6 章の一部は下記より転載した。

Simultaneous Production of Bifidobacterial and Propionibacterial Cells by Using a New Co-Culture System with Two Microfiltration Modules and Two Fermentors. Abstracts of The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, Phuket, Thailand, P-IB35 (1999).

第 7 章 全体の総括

第7章 全体の総括

これまで述べてきた「新規ビフィズス菌特異的増殖因子の生産とそれを利用したプロバイオティクスの開発」に関する本研究の成果は、以下のようにまとめられる。

A. 嫌気培養によるビフィズス菌特異的増殖促進物質の生産

(1) バイオアッセイによるBG S測定感度の向上

pH を 8.5, 培地の成分濃度を通常の 1/2 とした TPY 寒天培地を用いたペーパードイスク法によって, 10 μ g/L のオーダーの濃度までBG S (ACNQ を標準物質とした) を測定できる方法を確立した。

(2) プロピオン酸菌の菌株間におけるBG S生産量の比較

グルコースを炭素源としたTPY培地を用いて *Propionibacterium freudenreichii*, *P. arabinosum*, *P. shermanii* の間でBG S生産量を比較した結果, 最も多くのBG Sを生産したのは, *P. arabinosum* であった。

(3) プロピオン酸菌の嫌気培養における増殖特性とBG Sの生産

上記3種類のプロピオン酸菌の増殖は, プロピオン酸および酢酸によって強く阻害された。増殖阻害の程度は, プロピオン酸の方が高かった。乳酸を炭素源とした嫌気培養において最も多くのBG Sを生産したのは, *P. shermanii* であった。

(4) オンライン乳酸コントローラを用いた膜濾過培養によるBG Sの連続生産

P. shermanii によるBG Sの生産性は, 増殖阻害物質を除去しながら, 新鮮培地を供給できる膜濾過培養によって約8倍, オンライン乳酸コントローラを用いた流加培養によって約9倍, 回分培養に比べて高くなった。また, オンライン乳酸コントローラを装備した膜濾過培養によって, BG S濃度は34倍, 生産性は123倍まで向上した。

B. ビフィズス菌特異的増殖促進物質を利用したプロバイオティクス(ビフィズス菌)の生産

(5) プロピオン酸菌培養液によるビフィズス菌の増殖促進作用

プロピオン酸菌の培養上澄液を添加して、ビフィズス菌を培養した結果、比増殖速度は増加しなかったが、菌体濃度は増加した。また、pH耐性の向上、酸素耐性の向上、誘導期の短縮などが観察された。特に、上澄液を流加した培養において、生菌数の増加が認められた。

(6) 膜型混合培養システムを用いたビフィズス菌とプロピオン酸菌の同時菌体生産

プロピオン酸菌とビフィズス菌の間の協調作用を積極的に利用するために、膜型混合培養システムを構築した。本システムを用いることによって、微生物はそれぞれの培養槽において増殖でき、培養液は培養槽間を相互に循環できた。すなわち、プロピオン酸菌はビフィズス菌が生産した乳酸を利用し、プロピオン酸菌はビフィズス菌に増殖促進物質を提供できた。

本システムを用いることによって *P. freudenreichii* と *Bifidobacterium longum*, *B. adolescentis* または *B. breve* を組み合わせた培養を行った結果、合計の菌体生産量は回分培養の合計値に比べて、それぞれ 1.2 倍、1.6 倍または 1.6 倍に達した。