

# 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 生産に関する研究

高 屋 朋 彰\*

## Studies on production of bifidogenic growth stimulator by propionibacterial strains

by Tomoaki KOUYA

*Propionibacterium* 属の微生物は、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の微生物とともに長い歴史の中で乳製品の製造に使われてきている。これらの食品微生物は、宿主に対して有益な効果（免疫賦活作用、腸機能の改善、感染症からの保護など）を有することが報告されている。腸内の有益な微生物の生存数を増やす方法として、生菌である「プロバイオティクス」または有益な微生物の増殖因子である「プレバイオティクス」を経口摂取することが考えられる。現在、多様な「プロバイオティクス」や「プレバイオティクス」が商品化されており、一般の消費者に利用されている。乳製品由来のプロピオン酸菌は、伝統的なチーズ製造のスターターとして、また有用な物質（プロピオン酸、抗菌物質、ビタミンの生産など）の生産能を有しているため、様々な分野において用いられてきている。さらに、プロピオン酸菌がビフィズス菌の増殖を選択的に促進させる物質（Bifidogenic Growth Stimulator: BGS）を生産することは既に報告されているが、オリゴ糖などに代わる新しいプレバイオティクスとして利用するためには、その効率的な生産方法を開発する必要がある。

本論文では、新しいプロバイオティクスである BGS を効率的に生産するために、プロピオン酸菌による BGS 生産条件を最適化する方策をまとめた。具体的には、培養工学および代謝工学の観点から BGS

の生産に関する研究を行った。

第1章は緒言であり、本研究の背景ならびに既往の研究を概観し、プロピオン酸菌のプロバイオティクスとしての可能性、プロピオン酸菌の生産する BGS の機能性、および有用性について解説した。また、本研究の目的および本論文の構成を述べた。

第2章の「食品由来プロピオン酸菌を用いた嫌気条件および好気条件におけるビフィズス菌特異的増殖促進物質の生産」では、より高感度に BGS を測定するためのバイオアッセイ法の最適化について検討した。さらにその最適化したバイオアッセイ法を用いて、BGS を生産する食品由来プロピオン酸菌を検索した。

従来の BGS バイオアッセイ法に酸化防止剤を加えた改変 BGS バイオアッセイ法は、BGS の主な構成成分である 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) を 0.1  $\mu\text{g/l}$  ~ 1  $\text{mg/l}$  の濃度範囲で高感度に測定できることを明らかにした。6種類の乳製品由来プロピオン酸菌を用いて、嫌気培養および好気培養により BGS 生産を行った結果、4種類のプロピオン酸菌 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3, *Propionibacterium shermanii* PZ-3, *Propionibacterium acidipropionici* JCM 6432, および *Propionibacterium jensenii* JCM 6433) が BGS を生産できることを示した。特に、*P. acidipropionici* JCM 6432 は好気条件におい

\*新潟大学自然科学研究科

現在 新潟大学自然科学附置地域連携フードサイエンス・センター  
〔新潟大学博士（工学）平成20年3月24日授与〕

て増殖が促進され、BGS 生産量は、嫌気条件の場合の1.3倍に増加することを明らかにした。

第3章の「食品工業における廃棄物を基質としたBGSの生産」では、食品工業において副産物として発生するグリセロールやラクトースを炭素源として、より安価にBGSを生産する方法について検討した。さらに、プロピオン酸菌が糖類よりも乳酸を炭素源として速く消費する特性を利用して、プロピオン酸菌が直接利用しにくいラクトースを炭素源としてBGSを生産するための混合培養法について検討した。

第2章において選択した4種類のプロピオン酸菌は、グリセロールや乳酸を基質とした嫌気培養および好気培養において、BGSを生産できることを示した。さらに、ラクトースを乳酸に変換しながら同時にBGSを生産するために、ホモ乳酸菌とプロピオン酸菌の混合培養によるBGS生産を試みた。その結果、*P. shermanii* と *Lactobacillus bulgaricus* OLL 1067 の混合培養において、培養72時間に 6.4 mg/l のBGSを生産することができた。このBGS濃度は、ラクトースあるいはガラクトースを炭素源とした *P. shermanii* の単独培養の場合と比較して3.0~3.4倍高く、かつ生産に要する培養時間を 1/2~1/3 程度まで短縮できることを明らかにした。

第4章の「精密ろ過膜とオンライン乳酸コントローラーを備えたバイオリアクターを用いたBGSの連続生産」では、増殖に阻害となる基質の濃度を制御するためのオンライン乳酸コントローラーおよび生産物阻害を除去するための精密ろ過膜を備えたバイオリアクターを構築した。この新しいバイオリアクターを用いた効率的なBGS生産法の開発について検討した。

*P. shermanii* の増殖に影響を及ぼす、基質である乳酸および生産物であるプロピオン酸や酢酸の阻害効果について検証した。その結果、BGSを効率的に生産するためには、乳酸濃度を 10 g/l 以下にする必要があることが明らかになった。また、プロピオン酸濃度が 5 g/l であっても、比増殖速度およびBGS生産速度はそれぞれ 1/3 および 1/4 まで低下するこ

とから、効率的なBGSの生産のためには、プロピオン酸の除去が必要であることを示した。以上の結果から、基質濃度を制御するためのオンライン乳酸コントローラーおよびプロピオン酸と酢酸を除去するための精密ろ過膜を備えたバイオリアクターシステムを構築した。このシステムを用いた結果、BGSは高い濃度 (47 mg/l) で連続的に生産することができた。この時のBGS生産性は、培養時間当たり  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  および総培養液量当たり  $1.7 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  であり、これらの値は回分培養の場合と比較してそれぞれ37倍および2.1倍高くなることを示した。

第5章の「酸素供給によるプロピオン酸菌の代謝変動の解析」では、プロピオン酸菌の無細胞抽出液を用いた①酵素活性の測定および②二次元電気泳動とN末端アミノ酸配列の決定を組み合わせたプロテオーム解析により、プロピオン酸菌の代謝に対する酸素供給の影響を比較解析した。

酸素供給の影響を検討した結果、増殖速度と菌体濃度は、好気培養において嫌気培養よりも高くなった。一方、BGS濃度は、好気条件 (6.4 mg/l) では嫌気条件 (6.1 mg/l) よりも高い値を示したが、溶存酸素濃度を制御した好気培養 (DO制御培養) では、低い値 (3.5 mg/l) となった。これは、DHNAが酸素に対して感受性が高く、高い溶存酸素濃度のために酸化分解したためと考えられる。無細胞抽出液の酵素活性を測定した結果、DHNAの生合成経路に関与する isochorismate synthase のタンパク質量当たりの比活性が、嫌気条件と比較して好気条件において増加することを示した。また、二次元電気泳動とN末端アミノ酸配列の決定を組み合わせることを明らかにした。特に、glyceraldehyde-3-phosphate に関連する酵素の発現が減少することを明らかにした。

第6章は総括であり、本研究で得られた結果をまとめた。

終わりに、指導を賜った谷口 正之教授に謝意を表します。