

ふりがな こうや ともあき
氏名 高屋 朋彰
学位 博士（工学）
学位記番号 新大院博（工）第263号
学位授与の日付 平成 20年 3月 24日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 **Studies on production of bifidogenic growth stimulator by
propionibacterial strains.**
 (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)

論文審査委員 主査 教授 谷口 正之
 副査 教授 大川 輝
 副査 教授 山際 和明
 副査 教授 坪川 紀夫
 副査 准教授 田中 孝明
 副査 准教授 山内 健

博士論文の要旨

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研究を行った。本論文の各章の内容の要約は以下の通りである。

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「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 アッセイ法に酸化防止剤を加えた改変 BGS 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 µg/l~1 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* JCM6433）が BGS を生産できることを示した。特に、*P. acidipropionici* は好気条件において増殖が促進され、BGS 生産量は、嫌気条件の 1.3 倍に増加することを明らかにした。

第 3 章「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の生産するために、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倍多く、また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「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。

第一に、*P. shermanii*の増殖に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5g/lであっても、比増殖速度およびBGS生産速度は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「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、好気条件において嫌気条件に比べ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たプロテオーム解析によって、解糖系の酵素の発現が減少することが明らかになった。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。

審査結果の要旨

本論文では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生物工学的な研究の成果が示されており、以下のような学術的価値があると判定された。①BGSを測定するための高感度バイオアッセイ法を確立した。また、食品由来の3種類のプロピオン酸菌がBGSを生産することを発見した。②グリセロールや乳酸を炭素源としたBGSの生産が可能であることを明らかにした。また、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を開発した。③精密ろ過膜とオンライン乳酸コントローラーを備えた新しいバイオリアクターシステムを構築した。④プロピオン酸菌の無細胞抽出液を用いた酵素活性の測定および二次元電気泳動とN末端アミノ酸配列の決定によって、酸素供給によるプロピオン酸菌の代謝変動をプロテオーム解析できることを示した。

以上、本論文は、新しい「プレバイオティクス」であるBGSの生産に関する新しい知見を示しており、博士(工学)の学位論文として十分な価値と内容を有すると認定した。