

博士論文

乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* が生産する
多糖類の増産を目的としたパルス電界処理に関する研究

大 羽 哲 郎

目次

第 1 章	乳酸菌が生産する菌体外多糖類についての総説	5
1.1.	乳酸菌が生産する菌体外多糖類とその分類	5
1.2.	乳酸菌による菌体外多糖類の組成や構造	6
1.3.	多糖類産生乳酸菌の由来	7
1.4.	菌体外多糖類の効用	8
1.5.	菌体外多糖類の生合成メカニズム	9
1.6.	糖ヌクレオチド前駆体への代謝経路	10
1.7.	乳酸菌の菌体外多糖類に関するゲノム研究	11
1.8.	多糖類発酵のエンジニアリング	12
1.9.	微生物へのパルス電界処理の応用	13
1.10.	本研究の目的	14
第 2 章	<i>L. cremoris</i> 菌による菌体外多糖類の生産特性	23
2.1.	序論	23
2.2.	実験材料および方法	24
2.2.1.	供試菌株と培養条件	25
2.2.2.	多糖類画分の調製と生産量の測定	25
2.2.3.	多糖類の化学組成分析	26
2.2.4.	多糖類の分子量測定	27
2.2.5.	化学分析	27
2.3.	結果	27
2.3.1.	SBT0495 株と C4 株の生育および多糖類生産特性	27
2.3.2.	SBT0495 株と C4 株が生産する多糖類画分の化学組成	28
2.3.3.	CDM 培地における糖質源の影響	29
2.3.4.	定 pH 培養における pH と生育や多糖類生産との関係	29
2.3.5.	至適 pH での定 pH 培養における菌の生育と多糖類組成の経時変化	30
2.4.	考察	31
2.5.	結論	32
第 3 章	<i>L. cremoris</i> 菌が生産するリン酸化多糖類の物理化学特性	42
3.1.	序論	42
3.2.	実験材料および方法	43

3.2.1.	リン酸化多糖類の精製.....	43
3.2.2.	レオロジー測定.....	44
3.3.	結果および考察.....	44
3.3.1.	動的粘弾性測定.....	45
3.3.2.	定常剪断測定.....	47
3.3.3.	温度の影響.....	48
3.4.	総合考察.....	49
3.5.	結論.....	50
第4章	<i>L. cremoris</i> 菌によるリン酸化多糖類の生合成.....	62
4.1.	序論.....	62
4.2.	実験材料および方法.....	63
4.2.1.	供試菌株と培養条件.....	63
4.2.2.	抽出物の調製.....	63
4.2.3.	抽出物の酸加水分解.....	64
4.2.4.	薄層クロマトグラフィー.....	64
4.2.5.	質量分析.....	64
4.2.6.	液体クロマトグラフィー.....	65
4.2.7.	糖質の化学修飾.....	65
4.2.8.	ガスクロマトグラフィー.....	66
4.2.9.	化学分析.....	66
4.3.	結果.....	66
4.3.1.	TCA 抽出物中の糖ヌクレオチド.....	66
4.3.2.	1203 抽出物の弱酸加水分解で遊離した脂質の同定.....	67
4.3.3.	1203 抽出物の弱酸加水分解で遊離した糖質の同定.....	67
4.4.	考察.....	69
4.5.	結論.....	70
第5章	パルス電界処理による <i>L. cremoris</i> 菌での多糖類増産効果.....	80
5.1.	序論.....	80
5.2.	実験材料および方法.....	81
5.2.1.	供試菌株と培養条件.....	81
5.2.2.	多糖類の粗精製.....	81

5.2.3.	多糖類の組成分析.....	82
5.2.4.	パルス電界処理.....	82
5.2.5.	細胞透過率測定.....	83
5.2.6.	サイズ排除クロマトグラフィー.....	84
5.2.7.	β -ガラクトシダーゼ活性測定.....	84
5.2.8.	多糖類生合成中間体.....	85
5.3.	結果.....	86
5.3.1.	生育特性と多糖類産生特性.....	86
5.3.2.	ワンパス処理.....	86
5.3.3.	循環連続処理.....	87
5.3.4.	細胞透過率.....	88
5.3.5.	多糖類の化学組成と分子量.....	88
5.3.6.	β -ガラクトシダーゼ活性と多糖類生合成中間体.....	89
5.3.7.	パルス電界処理後の継代培養における多糖類生産性.....	89
5.4.	考察.....	90
5.5.	結論.....	92
第6章	パルス電界処理による <i>L. cremoris</i> 菌での多糖類増産効果の機序	102
6.1.	序論.....	102
6.2.	実験材料および方法.....	103
6.2.1.	供試菌株と培養条件.....	103
6.2.2.	パルス電界処理.....	103
6.2.3.	メタボローム解析用サンプル調製.....	104
6.2.4.	メタボローム解析.....	104
6.2.5.	走査電子顕微鏡 (SEM) 観察.....	105
6.2.6.	ウンデカプレノイド (C ₅₅) 分析.....	105
6.3.	結果.....	106
6.3.1.	パルス電界処理による誘電緩和の影響.....	106
6.3.2.	パルス電界処理中の多糖類生産.....	107
6.3.3.	代謝物質の変化.....	108
6.3.4.	走査電子顕微鏡 (SEM) 観察.....	109
6.3.5.	ウンデカプレノイドの変化.....	110

6.4.	考察.....	111
6.5.	結論.....	114
第7章	多糖類増産効果に対するパルス電界処理条件の検討.....	127
7.1.	序論.....	127
7.2.	実験材料および方法.....	128
7.2.1.	供試菌株と培養条件.....	128
7.2.2.	パルス電界処理.....	128
7.2.3.	パルス電界における極性の影響.....	129
7.2.4.	パルス累積時間と多糖類増産効果.....	129
7.2.5.	パルス処理中の平均電流と多糖類増産効果.....	129
7.3.	結果.....	130
7.3.1.	パルス電界における極性の影響.....	130
7.3.2.	パルス処理中の平均電流と多糖類増産効果.....	131
7.3.3.	代謝物質の変化.....	131
7.3.4.	全実験区を通じた考察.....	132
7.4.	考察.....	132
7.5.	結論.....	134
第8章	研究成果と今後の課題を含めた全体総括.....	143
8.1.	本研究で得られた結果の総括.....	143
8.2.	今後の研究課題.....	146
8.3.	今後の展望.....	148
	参考文献.....	150
	論文の内容の要旨.....	164
	謝辞.....	168

第1章 乳酸菌が生産する菌体外多糖類についての総説

1.1. 乳酸菌が生産する菌体外多糖類とその分類

細胞壁の一部としての多糖類ではなく、微生物が菌体外に生産する多糖類に関する研究は、1878年にデキストランを生産する *Leuconostoc mesenteroides* の発見に始まる。その後デキストランを添加物として利用するための研究に発展し、1940年代には経済性が成立する規模でのデキストランの生産へと進展した。それからさらに約20年のち、菌体外多糖類の2例目として、*Xanthomonas campestris* が生産するキサントランが産業的に利用されるようになった (Kang & Pettitt, 1993)。その後も土壌菌・動植物病原菌・植物寄生菌・腐敗菌などが生産する菌体外多糖類が発見 (Gabriel, 1987; Whitfield & Valvano, 1993) されてきたが、特にこの20-30年間に、食品の発酵に用いられる乳酸菌が生産する菌体外多糖類に関する研究が数多く報告され、Cerning (1990) や De Vuyst & Degeest (1999) が総説にまとめている。微生物が生産する菌体外多糖類の多様性を求める一方で、化学的または酵素的な手法で多糖類を修飾する技術も発展してきたことから、乳酸菌を用いた発酵食品において、その物性や保健機能などの差別化をもたらす多糖類が、次第に注目されてきたためと考えられる。

また Sutherland (1986) は、これまで発見された乳酸菌による菌体外多糖類を、その特性に基づいて4グループに分類している。大きくホモ多糖類とヘテロ多糖類のグループに分けた上で、ホモ多糖類についてはその生合成のメカニズムの違いによって2つに分類した。菌体外の細胞表層上で特定の単糖を酵素反応により重合して合成されるグループと、菌体内で一定の重合単位となるオリゴ糖を合成してから、細胞膜を通して菌体表層にトランスポートし、そこで重合を重ねて多糖類が生産されるグループである。前者の例としては、 α -D-グルカンとして分類される *Leuconostoc mesenteroides* のデキストラン (Miyaji & Misaki, 1973)、 β -D-グルカンとして分類される *Streptococcus mutans* のムタン (Loesche, 1986)、フルクタンとして分類される *Streptococcus salivarius* のレバン (Hancock *et al.*, 1976) などが挙げられ、これらの多糖類合成にはショ糖が必要であることが明らかにされている (Cerning, 1990; Sutherland, 1993)。一方、後者の例としては、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H414 のポリガラクトナン (Gruter *et al.*, 1992) があり、この多糖類はガラクトース5分子 (主鎖3分子と側鎖2分子) からなる重合単位が重合した構造となっている。

なお、ヘテロ多糖類はその重合構造の規則性の有無で2つのグループに分類され、規則性があるグループの多糖類は、2~8分子の単糖からなるオリゴ糖を単位とする重合ユニットを有しており、それが数百・数千と重合して多糖類分子を形成する。乳酸菌が生産するヘテロ多糖類の大半はこのグループに属し、代表例としては*Xanthomonas campestris*によるキサントラン (Ielpi *et al.*, 1981) である。規則性がないグループの多糖類は2種類以上の単糖がランダムに重合しており、代表的な多糖類は*Pseudomonas aeruginosa*や*Azotobacter vinelandii*によるアルギン酸 (Linker & Jones, 1966; Gorin & Spencer, 1966) である。

1.2. 乳酸菌による菌体外多糖類の組成や構造

これまで乳酸菌が生産する菌体外多糖類に関する研究で、多糖類の化学組成を明らかにした報告や、その1次構造まで明らかにした報告などを表 1.1 にまとめた。乳酸桿菌の *Lactobacillus* 属からは 31 菌株、乳酸球菌の *Lactococcus* 属 7 菌株と *Streptococcus* 属 13 菌株を列挙した。さらに図 1 には、1次構造が解明されている *Lactobacillus* 属による 19 種類の多糖類と、*Lactococcus* 属および *Streptococcus* 属による 9 種類の多糖類の構造を一覧にまとめた。

いずれの多糖類もグルコースやガラクトースを構成単糖としており、さらに約半数の多糖類はラムノース、N-アセチルガラクトサミンや N-アセチルグルコサミンを含んでいる。その他、マンノースやフルクトース、さらにピルビン酸基、アセチル基、リン酸基が構成成分として報告されているものもある。菌種ごとに列挙した組成から明らかのように、構成成分に関して同一菌種での明確な共通性などは見られないが、乳酸桿菌で報告されているピルビン酸基は乳酸球菌での報告はなく、リン酸基については *Lactococcus* 属だけに報告されている。多糖類の化学組成は、使用する培地の糖質源によっても変化することも報告されており、Grobben らは、*Lb. bulgaricus* NCFB 2772 株がグルコース含有培地で生産した多糖類の化学組成が、グルコース、ガラクトース、ラムノースで 1 : 6.8 : 0.7 の分子比 (1995) であり、フルクトース含有培地ではグルコースとガラクトースだけの 1 : 2.4 の分子比となると報告 (1996) した。*Lb. casei* CG11 株を用いた Cerning ら (1992, 1994) と Kojic ら (1992) も、培地の種類やその糖質源の違いによって組成が大きく変化することを報告した。

一方、1次構造に着目すると、ほとんどの多糖類がその骨格となる主鎖に側鎖が結合した構造を有し、単純な直鎖構造の多糖類は 28 種類の中で 4 種類に過ぎない。また、

グリコシド結合の位置や向きは全くランダムで規則性はなく、重合単位となるオリゴ糖の大きさも3量体から7量体まで報告されている。分子量についても、数千 Da のものから数千万 Da のものまでそのレンジは幅広いが、数百万 Da の多糖類が標準的なサイズであると考えられる。

なお、多糖類の生産量については報告件数が少ないことや、培養方法が単純なバッチ培養に限らず、栄養成分の補給や定 pH 管理した連続培養などの多岐に及び、比較できるデータはないが、Cerning (1990) の総説ではヘテロ多糖類の生産量は、通常 30-400 mg/L であるとしている。Garcia-Garibay & Marshall (1991) は2種類の *Lb. bulgaricus* 菌株 CNRZ 737 株と NCFB 2772 株の生産量を報告しており、それぞれ 420 mg/L と 120 mg/L とした。最も生産性が高い菌株は、van den Berg ら (1995) が報告した *Lb. sake* 0-1 株であり、グルコースとリン酸バッファーおよびカゼイン加水分解物からなる粗製培地で約 2 g/L の多糖類を生産したとしている。

1.3. 多糖類産生乳酸菌の由来

表 1.1 に示した多糖類産生乳酸菌のほとんどが、乳製品に由来するものであり、ヨーグルトに使用される *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 菌と *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 菌の中で、独特な粘稠性や曳糸性を呈することにより製品を差別化する菌株として研究が進められた。特にコーカサス地方の発酵乳である kefir は、乳酸菌と酵母を含む Kefir 粒をスターターとして牛乳に接種して製造する (Pick, 1933) ものであり、多くの菌株とそれらによる多糖類が研究された (La Riviere *et al.*, 1967; Toba *et al.*, 1986; Pidoux *et al.*, 1990)。同様に、スカンジナビアの国々で伝統的に製造されている粘稠性の高い発酵乳についても研究が行なわれ、Nilsson (1950) は、スウェーデンの tåtmölk の細菌叢として *Streptococcus lactis* を報告し、Sundman (1953) はフィンランドの viili においてスライムを生産するのは *Str. cremoris* であることを報告した。なお、近年日本では、kefir と同じくコーカサス地方の発酵乳で酵母を使用しないカスピ海ヨーグルトが注目され、その主要乳酸菌として *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 菌が分離される (Uchida *et al.*, 2009) とともに、免疫賦活効果についても報告 (Kosaka *et al.*, 2012) されている。

乳酸菌がなぜ菌体外多糖類を生産するのかについては諸説あるが、生存環境における外的ストレス（低水分活性、phagocytosis、ファージ感染、乾燥、酸素露出など）からの菌体を保護するために培った形質であるとの説 (Cerning, 1990) や、特異的環境に

において菌体を固定するバイオフィルムを形成するために、多糖類を菌体外に生産するようになったとの説 (Costerton *et al.*, 1987) がある。また、Weiner ら (1995) は菌体外多糖類が必須金属イオンを封鎖すると報告し、Looijesteijn Petronella ら (2001) は抗菌作用を有する化合物から保護するためとしているが、Forde & Fitzgerald (1999) や Looijesteijn Petronella ら (2001) が示した、バクテリオファージの攻撃から保護するためとする説はとても興味深い。

1.4. 菌体外多糖類の効用

乳酸菌が生産する菌体外多糖類の効用は、第一にその特徴的な粘稠性である。特に発酵乳製品に用いられた場合、乳酸発酵による pH の低下で凝集しやすくなった乳タンパク質のネットワークと、その中に生産された多糖類によるネットワークとが形成する微細構造は、曳糸性と表現される特徴的な物性を示すスライム状の発酵物 (Hassan *et al.*, 2003; Folkenberg *et al.*, 2006) となり製品の差別化に寄与する。特に本研究の対象である *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 菌が生産するリン酸化多糖類では、第3章で述べるように、オリゴ糖重合単位に結合するリン酸基により多糖類が陰電荷を帯びた多価電解質として挙動する (Oba *et al.*, 1999b) ことから、タンパク質との静電的相互作用によりさらに顕著な物性を示すと考えられる。Pachekrepapol ら (2015) は、陰電荷を帯びたデキストラン硫酸が、等電点以下の pH で陽電荷を帯びた乳タンパク質カゼインと強固なゲルを形成することを報告し、Ayala-Hernandez ら (2008) は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 菌が生産するリン酸化多糖類が、乳タンパク質の凝集物と菌体を包含したフィラメントを形成することを、電子顕微鏡観察で報告した。こうして形成される微細構造と物性は、発酵乳製品での離水を顕著に抑制する (Toba *et al.*, 1990) ことから、添加物の使用が認められないヨーロッパ諸国では、製品の品質維持に貢献する特徴として着目されてきた。

第二の効用は、多糖類がもたらす保健効果である。具体的には、抗腫瘍効果や免疫賦活化作用があげられ、免疫賦活化作用については、いくつかの活性化機構が報告されている。Oda ら (1983) は、腹水に Sarcoma-180 (腫瘍細胞) を移植したマウスに対し、*Lactobacillus helveticus* var. *jugurtii* が生産した多糖類を投与することにより、延命効果を報告している。Kitazawa ら (1991a) は、フィンランドの viili から分離した多糖類産生菌株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KVS20 の凍結乾燥菌体を用いて同様の実験を行い、Sarcoma-180 の増殖抑制効果を認めたが、KVS20 菌は腫瘍細胞に対する直接細胞毒性は

なかったことから、宿主の免疫機能の増強によって誘導される結果であると考察した。その後、KVS20 菌株が生産したスライム状の多糖類が、マウスの腹腔中の Fc γ -レセプター陽性マクロファージを増加させ (Kitazawa *et al.*, 1991b)、腫瘍細胞を攻撃する活性が増強していることを示唆した (Kitazawa *et al.*, 1991c)。さらにその多糖類は、免疫反応で重要な B 細胞の分裂活性化因子として機能することも報告した (Kitazawa *et al.*, 1993)。

乳酸菌の菌体外多糖類による免疫調節機能に関する研究は近年でも報告されており、Makino ら (2006) は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 が生産するリン酸化多糖類が、マウス脾臓細胞によるインターフェロン- γ (IFN- γ) の産生を促進し、マウスに経口投与した場合にはナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) の活性が高まることを報告した。さらに Nagai ら (2011) は同菌株のリン酸化多糖類を用いたマウスへの経口投与による実験で、インフルエンザウィルスの経鼻感染抑制効果を調べ、インフルエンザウィルスの減少と抗インフルエンザウィルス抗体 IgA, IgG の増加を報告した。さらに、Kosaka ら (2012) は、コーカサス地方の発酵乳であるカスピ海ヨーグルトから分離した *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC による発酵乳で、Makino ら (2006) と同様にマウス脾臓細胞によるインターフェロン- γ (IFN- γ) の産生促進効果を報告し、Maruo ら (2012) も同菌株で Nagai ら (2011) と同様にマウスにおけるインフルエンザウィルスの経鼻感染抑制効果を報告した。いずれの菌株も日本のマーケットで発酵乳として製品化されており、消費者の高い関心を得ている。

1.5. 菌体外多糖類の生合成メカニズム

1.1.に述べたように菌体外多糖類は 4 種類に分類されるが、その生合成のメカニズムは大きく 2 通りに分類される。ホモ多糖類であるデキストラン、ムタン、レバンなどの多糖類は、菌体外の細胞表層上で特定の単糖を酵素反応により重合して合成される (Cerning, 1990; Sutherland, 1993) が、表 1.1, 1.2 や図 1.1, 1.2 に示した乳酸菌によるヘテロ多糖類の生合成は、菌体内で一定の重合単位となるオリゴ糖を合成してから、細胞膜を通して菌体表層にトランスポートし、そこで重合を重ねて多糖類が生産されると考えられている。

Ielpi ら (1993) が報告した、*Xanthomonas campestris* によるキサントンの生合成スキームを図 1.3 に示した。キサントンはグルコース 2 分子を主鎖とし、マンノース 2 分子に挟まれたグルクロン酸 1 分子を側鎖とする 5 量体のオリゴ糖が重合単位となってお

り、この重合単位は2分子のリン酸基を介して結合するウンデカプレノールという脂質分子上で形成される。それぞれの単糖は、前駆体である糖ヌクレオチド前駆体（UDP-グルコース、GDP-マンノース、UDP-グルクロン酸）から、ウンデカプレノールリン酸に1分子ずつ転移される。細胞質膜内表面で行われる重合単位の合成は、生合成の第1ステップであり、近年 Whitfield (2010) や Islam & Lam (2014) が示したように、第2ステップでは完成した重合単位が細胞質膜のベシクルにアンカーされているウンデカプレノールごと反転し、細胞質膜外表面に転位すると考えられている。このプロセスは、フリッパーズと称される Wzx タンパク質によって行われる。このように、細胞質膜外表面に転位した新たな重合単位には、すでに重合が進んでいる他のウンデカプレノール結合型中間体の糖鎖部分が転位することにより、第3ステップである重合が進行する。最後の第4ステップは重合体である多糖類の鎖長の制御であり、一定の分子量に達した時点で、ウンデカプレノールリン酸から切り離された多糖類が培地中に放出されるとしている。第3・4ステップに関与するタンパク質は、ポリメラーゼとしての Wzy タンパク質と鎖長を制御する Wzz タンパク質であり、両者は多糖類共重合タンパク質ファミリーと称されている (Cuthbertson *et al.*, 2009)。

1.6. 糖ヌクレオチド前駆体への代謝経路

多糖類の生合成に利用される糖ヌクレオチド前駆体は、糖代謝における様々な経路を経て合成される。表 1.1, 1.2 に示した乳酸菌はそのほとんどが乳製品に由来するものであり、乳糖を糖質源として資化して生育していた菌株であるため、培地中の乳糖を起点として、解糖系を介して ATP エネルギーを生産するクエン酸回路や乳酸発酵に至る経路、また、糖ヌクレオチド前駆体合成に至る経路などをまとめて図 1.4 に示した。

培地中の乳糖は主に3つのルートで細胞質内に取り込まれるが、乳糖に特異的に作用する PEP-PTS (ホスホエノールピルビン酸リン酸化輸送システム) により、乳糖 6リン酸となって取り込まれるルート (Chassy & Thompson, 1983) が中心となっており、その他 Lactose permease という供輸送体タンパク質が、水素イオンの能動輸送に伴って乳糖を取り込むルート (Abramson *et al.*, 2004)、また、供輸送体とは逆にガラクトースの排出に伴って乳糖を取り込む交換輸送体 (Hutkins & Ponne, 1991) によっても、細胞質内に取り込まれる。こうして細胞質内に入った乳糖 6リン酸または乳糖は、リン酸 β -ガラクトシダーゼまたは β -ガラクトシダーゼにより、グルコースおよびガラクトース 6リン酸またはガラクトースに分解されてから、解糖系やガラクトース代謝経路へと

進む。

グルコースは、そのまま解糖系に入りピルビン酸まで代謝されると、クエン酸回路へと進みエネルギー生産に利用されるか、あるいは乳酸の生産に利用される。また、ガラクトース 6 リン酸は、タガトース 6 リン酸経路を経て解糖系に入り同様にエネルギー生産や乳酸発酵に利用される。なお、解糖系中のグルコース 6 リン酸は、ホスホグルコムターゼの反応によりグルコース 1 リン酸となり、Leloir 経路と称されるガラクトース代謝経路にも進んで UDP-グルコースや UDP-ガラクトースへと変換される (Sjöberg & Hahn-Hägerdal, 1989)。一方、乳糖の分解で生成したガラクトースからも、Leloir 経路の中でガラクトース 1 リン酸を介して UDP-ガラクトースや UDP-グルコースに変換される。さらに Leloir 経路のグルコース 1 リン酸からは、ストレプトマイシン生合成経路と称される代謝経路において dTDP-グルコースや dTDP-ラムノースに変換される (Graninger *et al.*, 1999)。一方図中に示してはいないが、解糖系におけるフルクトース 6 リン酸からは、グルコサミン 6 リン酸、N-アセチルグルコサミン 6 リン酸などを介して、UDP-N-アセチルグルコサミンや UDP-N-アセチルガラクトサミンが生成する。こうして生成する各種の糖ヌクレオチドは、多糖類の生合成に限らず、ペプチドグリカン、リポ多糖、テイコ酸など各種のグリコシル化合物の生合成における前駆体として利用される。

1.7. 乳酸菌の菌体外多糖類に関するゲノム研究

菌体外多糖類の生合成に関係する遺伝子は、中温性乳酸菌においてはプラスミド上にあり、一方高温性乳酸菌においては染色体上にあると考えられてきた。高温性乳酸菌の報告例では、Cerning ら (1992) や Kojic ら (1992) は *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CG11 における多糖類合成系遺伝子は約 30kb のプラスミドにあると報告した。また、Vescovo ら (1989) は *Lactobacillus casei* subsp. *casei* NCIB4114 についてもプラスミド上に多糖類合成系遺伝子があるとしているが、*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ではプラスミドがなかったことから染色体上にコードされていることを示唆した。また、Mozzi ら (2003) は *Lactobacillus casei* CRL87 における多糖類合成関連の遺伝子は、染色体上にあるとしている。その後、Stingele ら (1996) は *Streptococcus thermophilus* Sfi6 を用い、染色体上の多糖類合成系遺伝子に関する初めての分子生物学的研究の成果として、13 種類の遺伝子からなるクラスターの構成を提示した。

一方、van Kranenburg ら (1997a) は、中温性乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

NIZO B40 を用い、約 40kb とされるプラスミド上に多糖類合成系の遺伝子がコードされており、糖ヌクレオチド前駆体からの糖転移酵素の遺伝子を含むオープンリーディングフレームを大腸菌で発現させることにより、図 2-1 に示した重合単位形成の順序を解明した。また van Kranenburg ら (1997b) は、同菌株のプラスミドから、多糖類合成に関与する 14 種類の遺伝子が構成するクラスターを提示しており、*Streptococcus thermophilus* Sfi6 の遺伝子クラスターを比較すると、遺伝子構成において 4 種類の機能領域（制御→重合輸送→糖転移→重合輸送）が存在する点や、特に糖転移酵素をコードする遺伝子などにおいて相同性がある。

その後、Lamothe ら (2002) は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* による 14 種類の遺伝子からなるクラスターを提示し、Jolly ら (2002) は *Lactobacillus helveticus* NCC2745 の遺伝子クラスターの中で、特に糖転移機能に関わる遺伝子について報告した。Nierop Groot & Kleerebezem (2007) は、広く乳酸菌の多糖類合成に関わる遺伝子クラスターに関し、5'側端には生合成の制御に関与する遺伝子が配置され、3'側端には糖転移・重合・輸送の機能に関与する遺伝子が配置する点において共通性が見られるとした。また、Dabour & Lapointe (2005) は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461 について、新たに重合単位の輸送に関わる遺伝子を加え、15 種類の遺伝子が構成するクラスターを提示するとともに、上記 NIZO B40 を含む *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 4 菌株の多糖類合成遺伝子との相同性を比較した。5'側端の生合成制御に関与する遺伝子や一部の糖転移機能に関わる遺伝子で、菌株間で高い相同性があることを示した。

1.8. 多糖類発酵のエンジニアリング

先に述べたように、乳酸菌による菌体外多糖類は、それがもたらす特徴的物性や保健効果により、それを使用する製品を大いに差別化することが可能となる。また、保健効果を示す多糖類を分離することにより、様々な形態の製品への応用が可能となることから、多糖類の生産性向上や特性改良を目的としたエンジニアリング技術は産業上有用である。これまで、乳酸菌に限らず広く微生物による多糖類生産性を向上するために、発酵温度や時間の調整や、糖質源・窒素源・ミネラル・重金属などの培地成分の濃度に着目する方法など、従前の発酵条件の至適化によるアプローチ (Cerning, 1995; Degeest *et al.*, 1997; De Vuyst *et al.*, 1998) がほとんどである。その他、ファーメンターによる定 pH 培養や定栄養成分培養、さらには、多糖類生産に関わる遺伝子をクローニングして過剰発現させる方法 (Levander & Svensson, 2002; Boels *et al.*, 2003) があるが、乳製品のように

な食品へは直ちに応用できる方法ではない。

なお、より工学的手法を菌体外多糖類の合成に応用した例としては、多糖類を生産する微生物にパルス電界処理を行なって電気穿孔を起こさせ、菌体を酵素反応系として多糖類生産させる方法であり、*Acetobator xylinum* (Semino & Dankert, 1993) や *Rhizobium leguminosarum* (Bossio *et al.*, 1996) が報告されている。パルス電界処理は、電位差のストレスにより細胞質膜や核膜に穿孔をおこさせ、遺伝子組み換えを目的とした DNA の導入技術として応用されてきたが、Mattar ら (2015) は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Actiflore F33 を用いて穏やかなパルス処理を実施した結果、酵母の代謝が促進されることを報告しており、電気化学的刺激が乳酸菌の生育や菌体外多糖類の生産にどのような影響をもたらすのかは、興味深い研究分野である。

1.9. 微生物へのパルス電界処理の応用

前述のように、パルス電界処理は DNA の導入技術として応用されてきたが、最近では食品の加工技術としても応用されており、その大半は食品の風味を損なわずに殺菌する非加熱殺菌技術としての応用である (Mohamed & Eissa, 2012)。その殺菌原理はやはり電気穿孔による細胞破壊であり、仮に直径 1 μm の球菌に 1 V 以上の電界が印加されると、リン脂質のベシクルである細胞質膜に 2×10^6 V/cm もの電界強度が発生するため、ベシクル構造が壊れ膜に細孔ができる (Hülshager *et al.*, 1983; Zimmermann, 1986)。この孔が大ききものでなければ、細胞自体の自己修復機能により細胞質膜は修復されるが、あまり大きな孔となった場合は細胞内の物質が外部へ流出してしまい細胞が壊死する (Kandušer *et al.*, 2006)。

Ewe ら (2012) は、パルス電界処理した *Lactobacillus fermentum* BT 8219 を用い、ビオチンを添加した豆乳で発酵させることにより、菌体の β -グルコシダーゼが活性化しイソフラボン配糖体からアグリコンへの変換を促進し、その効果はパルス電界処理後 3 回の継代培養中維持されることを報告した。また、Lye ら (2012) は、パルス電界処理した *Lactobacillus acidophilus* BT 1088 を用い、同菌株が有するコレステロールの吸収・同化作用が高まることを報告した。これらの報告は、パルス電界処理による電気穿孔が菌体の持つ自己修復能力の範囲内であったことを示しており、部分的な細胞穿孔により物質交換が高まったことや、電界処理による細胞質膜のリン脂質の酸化が、膜の流動性や疎水性に変化を与えたことによる効果であったと考察している。

パルス電界処理で発生する菌体の電気穿孔を応用し、殺菌技術としての研究報告は

近年増加しているが、穏やかなパルス電界処理で自己修復可能な電気穿孔に留め、菌体の生活性（バイアビリティ）を維持しながら、菌体が本来有する機能性などを高めるような研究報告は、上記の Ewe ら（2012）や Lye ら（2012）の報告だけであり、特に乳酸菌による多糖類生産の生産性に変化をもたらすような研究は、これまでに例がない。1.5.で述べたように、菌体外多糖類の生合成は細胞質膜に固定されたウンデカプレノール2リン酸上で進行する。細胞質膜内側で重合単位が形成され、細胞質膜外側に転移してから重合が進み、十分な鎖長になると培地中に放出される。部分的な細胞穿孔による物質交換の影響や細胞質膜の流動性の変化が、菌体外多糖類の生合成を促進する効果となることを期待したい。

1.10. 本研究の目的

本研究では、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*（以降 *L. cremoris*）を供試菌とし、それが生産するリン酸化多糖類を対象としている。この章で述べてきたように、*L. cremoris* 菌はスカンジナビア地方の粘性発酵乳 viili や tätmölk、コーカサス地方の kefir やカスピ海ヨーグルトなどの主要スターター菌であり、リン酸化多糖類がもたらす特徴的な物性や、免疫賦活などの保健機能が数多く報告されている。*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類については、異なる2菌株で同様の一次構造が明らかにされており、その生合成のスキームやそれに関与する遺伝子クラスターも解明されている。構造や機能、生合成における分子生物学など様々な知見が解明されている点や、発酵乳やフレッシュチーズなどの乳製品として産業上の実績がある点で有用な研究対象であり、これまでの伝統的な乳酸菌発酵技術ではなく、パルス電界処理という電気化学的手法を組み合わせた全く新規な発酵技術を検討する。

パルス電界処理技術は、食品加工における殺菌技術としてすでに応用され始めており、液体状のものを処理する場合には特に複雑な装置を必要とせず、電源装置と電極およびパルスを発生させるジェネレーターにより処理が可能となる。パルス電界がもたらす電気化学的刺激が、*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類の生産を促進するなど、有益な効果をもたらすのであれば、産業上容易に応用可能な新規な発酵エンジニアリング技術であり研究に資するものと考えられる。パルス電界処理においては、パルス電圧、パルス幅、パルス周期、などの各種パルス印加条件やパルス波形も含めて、装置的には様々な処理が可能であるが、殺菌に至るような条件での処理ではなく、むしろ菌体の生活性を一定レベルで維持する一方で、多糖類の生合成に有益な効果をもたらすことが可能かど

うかを検証する。さらに、有益な効果が認められる場合には、パルス電界処理がもたらす電気化学的刺激が、菌体による多糖類のような物質生産にどのような作用を与えるのかについて検討し、従来のような殺菌処理技術としてではなく、有用菌の発酵エンジニアリング技術としての基盤となる知見をまとめることが本研究の目的である。

本研究においては、まず、多糖類産生能を有する *L. cremoris* 菌を選定し、その菌株による多糖類の生産量や構造およびその性状を把握し、また、多糖類がどのように生合成され、そのためにどのような糖代謝経路が関与しているのかを理解する必要がある。その上で、パルス電界処理による菌の生育や多糖類生合成への影響を調べることにより、パルス電界処理がもたらす作用を検証することが可能となる。したがって、本論文の構成においては、以下の第2章で供試菌株による菌体外多糖類の生産特性をまとめ、第3章で菌体外多糖類の物性について述べた後に、第4章で菌体外多糖類の生合成のしくみについてまとめる。供試菌株による多糖類生産に関する全般的知見に基づき、第5章では発酵中のパルス電界処理がもたらす効果についてまとめ、第6章ではパルス電界処理がもたらす糖代謝系への作用や発酵生成物の変化に関するメタボローム解析の結果を、さらに、第7章では様々なパルス処理条件に対する効果の検証について述べる。最後の第8章にて、本研究の全般について総括し、本来目的としたパルス電界処理を応用した発酵エンジニアリング技術としての基盤について結論する。

表 1.1 *Lactobacillus* 菌種 (*Lb.*) が生産する菌体外多糖類の化学特性

菌種	菌株	化学組成比				分子量 (Da)	重合ユニット	ユニット構造	引用論文
		Glc	Gal	Rha	Others				
<i>Lb. acidophilus</i>	LMG9433	2	1	1	1 GlcA, 1 GlcNAc	-	pentamer	1-1	Robijn 1996b
<i>Lb. brevis</i>		1	1			2.0×10^4	hexamer	1-2	Kooiman 1968
<i>Lb. casei</i>	CG11	15	1	3		-	-	-	Kojic 1992
<i>Lb. casei</i>	NCIB4114	5	2.5	1		-	-	-	Cerning 1992
<i>Lb. casei</i>	CRL87	1	1	1.1		7.9×10^3	-	-	Mozzi 1996
<i>Lb. bulgaricus</i>	CRL420	1			2 Fru	2.0×10^3	-	-	Manca De Nadra 1985
<i>Lb. bulgaricus</i>	NCFB2772	1	6.8	0.7		1.5×10^6	-	-	Grobben 1996
<i>Lb. bulgaricus</i>	CNRZ416	1	4	1		4.9×10^3	-	-	Cerning 1986
<i>Lb. bulgaricus</i>	CNRZ737	1	4	1		-	-	-	Cerning 1986
<i>Lb. bulgaricus</i>	CNRZ1187	9	14		1 Man	-	-	-	Bouzer 1996
<i>Lb. bulgaricus</i>	291	3	2			1.4×10^3	pentamer	1-3	Faber 2001
<i>Lb. bulgaricus</i>	OLL1073R-1	2	3			5.0×10^6	pentamer	1-4	Van Calsteren 2015
<i>Lb. bulgaricus</i>	rr	1	5	1		-	heptamer	1-5	Gruter 1993
<i>Lb. fermentum</i>	TDS030603	3	1			-	tetramer	1-6	Gerwig 2013
<i>Lb. helveticus</i>	var. <i>jugurtii</i>	2	1			-	-	-	Oda 1983
<i>Lb. helveticus</i>	766	2	1			-	hexamer	1-7	Robijn 1995a
<i>Lb. helveticus</i>	Lh59	1	1			2.0×10^6	hexamer	1-8	Stingele 1997
<i>Lb. helveticus</i>	TN-4	1	1			1.8×10^6	hexamer	1-8	Stingele 1997
<i>Lb. helveticus</i>	TY1-2	3	2.8		1 GlcNAc	1.6×10^6	heptamer	1-9	Yamamoto 1994
<i>Lb. johnsonii</i>	142	1	4			-	pentamer	1-10	Górska 2010
<i>Lb. johnsonii</i>	151	2	3			-	pentamer	1-11	Górska-Fraćzek 2013
<i>Lb. kefiranoformans</i>	K1	0.9	1.1			1.0×10^6	heptamer	1-12	Mukai 1990
<i>Lb. paracasei</i>	34-1	3	2		1 GalNAc, 1 G3P	-	tetramer	1-13	Robijn 1996b
<i>Lb. plantarum</i>	C88	3	2		2 Ac	9.5×10^3	pentamer	1-14	Fontana 2015
<i>Lb. plantarum</i>	MTCC9510	2			1 Man	-	trimer	1-15	Ismail 2010
<i>Lb. rhamnosus</i>	KL37B	1	2			-	nonamer	1-16	Górska-Fraćzek 2011
<i>Lb. rhamnosus</i>	KL37C	2	3			-	pentamer	1-17	Lipiński 2003
<i>Lb. rhamnosus</i>	RW-9595M	2	1	4	1 Py	5.0×10^7	heptamer	1-18	van Calsteren 2002
<i>Lb. rhamnosus</i>	RW-9595R	2	1	4	1 Py	2.1×10^7	heptamer	1-18	van Calsteren 2002
<i>Lb. sake</i>	0-1	3		2	1 G3P, 0.85 Ac	6.0×10^6	pentamer	1-19	Robijn 1995b
<i>Lb. species</i>	KPB-167B	1	1			1.6×10^6	hexamer	1-2	Yokoi 1991

Ac - acetyl, Fru - fructose, Gal - galactose, GalNAc - *N*-acetylgalactosamine, Glc - glucose, GlcA - glucuronic acid, GlcNAc - *N*-acetylglucosamine, G3P - *sn*-glycerol 3-phosphate, Man - mannose, P - phosphate, Py - pyruvate, Rha - rhamnose.

表 1.1 *Lactobacillus* 菌種 (*Lb.*) が生産する菌体外多糖類の化学特性

菌種	菌株	化学組成比				分子量 (Da)	重合ユニット	ユニット構造	引用論文
		Glc	Gal	Rha	Others				
<i>Lc. cremoris</i>	B40	2	2	1	1 P	-	pentamer	2-1	van Kranenburg 1997a
<i>Lc. cremoris</i>	H414		1			-	pentamer	2-2	Gruter 1992
<i>Lc. cremoris</i>	KLS96	1	1			-	-	-	Cerning 1992
<i>Lc. cremoris</i>	LC330	6	3		2 GlcNAc	2.0×10^6	-	-	Marshall 1995
<i>Lc. cremoris</i>	LC330	6	4	5	1 GlcNAc, 1 P	1.0×10^6	-	-	Marshall 1995
<i>Lc. cremoris</i>	SBT0495	2	2	1	1 P	1.7×10^6	pentamer	2-3	Nakajima 1990
<i>Lc. cremoris</i>	T5	1	1.2			-	-	-	Cerning 1992
<i>Str. macedonicus</i>	Sc136	3	2	2	1 GlcNAc	-	hexamer	2-4	Vincent 2001
<i>Str. thermophilus</i>	CNCMI733	1	2.19		0.92 GalNAc	1.0×10^6	tetramer	2-5	Doco 1991
<i>Str. thermophilus</i>	CNCMI734	1	1.91		0.77 GalNAc	1.0×10^6	tetramer	2-5	Doco 1991
<i>Str. thermophilus</i>	CNCMI735	1	2.2		0.77 GalNAc	1.0×10^6	tetramer	2-5	Doco 1991
<i>Str. thermophilus</i>	CNRZ389	5	11	1	3 Man	-	-	-	Cerning 1988
<i>Str. thermophilus</i>	CNRZ1068	1	1.3			-	-	-	Cerning 1988
<i>Str. thermophilus</i>	OR901		5	2		-	heptamer	2-6	Bubb 1997
<i>Str. thermophilus</i>	Sfi12	1	3	2		2.0×10^6	hexamer	2-7	Lemoine 1997
<i>Str. thermophilus</i>	Sfi39	2	2			2.0×10^6	tetramer	2-8	Lemoine 1997
<i>Str. thermophilus</i>	Sfi6	1	2		1 GalNAc	2.0×10^6	tetramer	2-5	Stingele 1996
<i>Str. thermophilus</i>	ST1	4	2			6.2×10^4	hexamer	2-9	Säwén 2010
<i>Str. thermophilus</i>			1.46	1		1.1×10^6	-	-	Ariga 1992
<i>Str. thermophilus</i>		1	2		1 GalNAc	1.0×10^6	tetramer	2-5	Doco 1990

Gal - galactose, GalNAc - N-acetylgalactosamine, Glc - glucose, GlcNAc - N-acetylglucosamine, Man - mannose, P - phosphate, Rha - rhamnose.

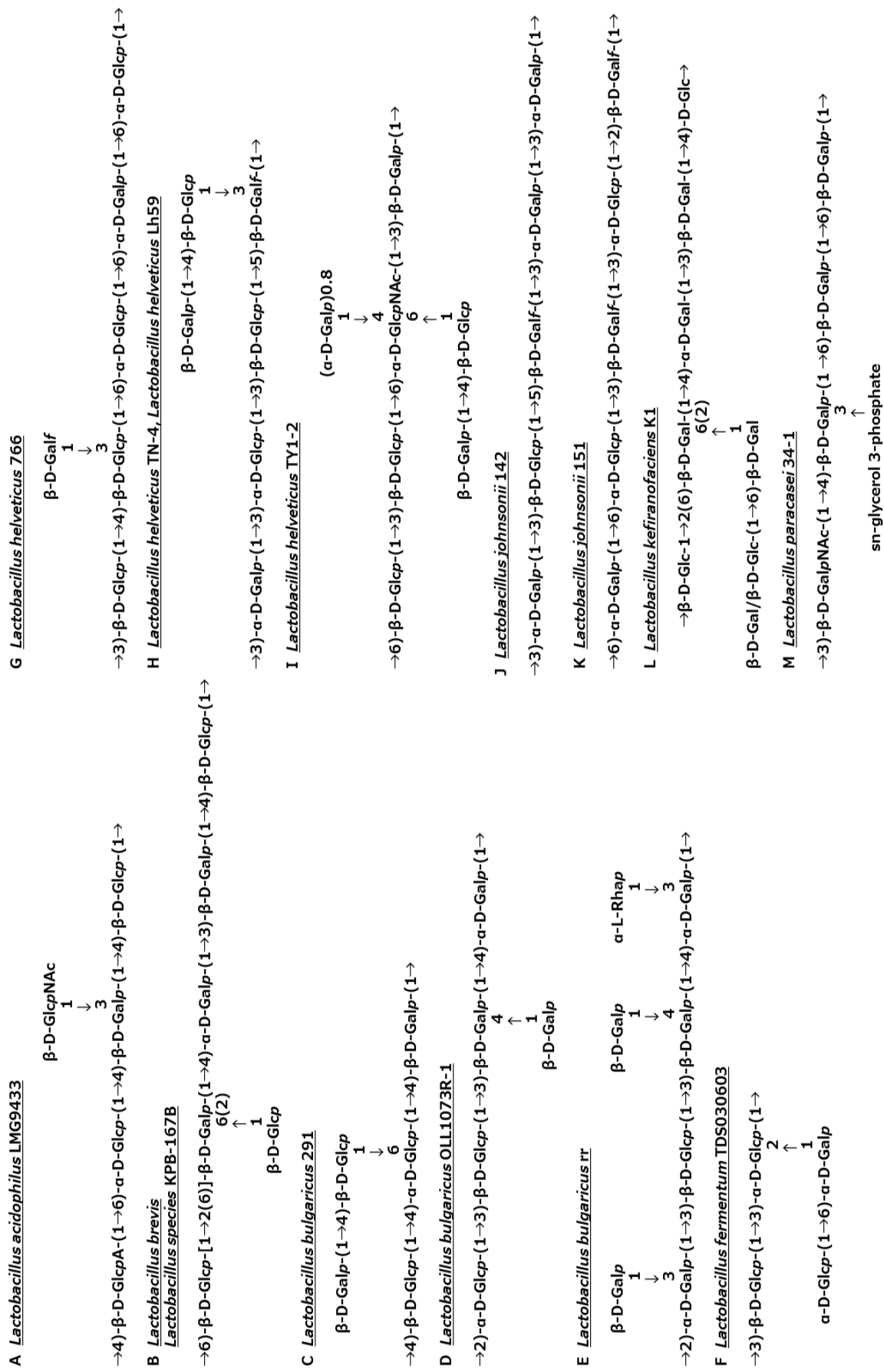


図 1.1 *Lactobacillus* 菌種 (*Lb.*) が生産する菌体外多糖類の 1 次構造

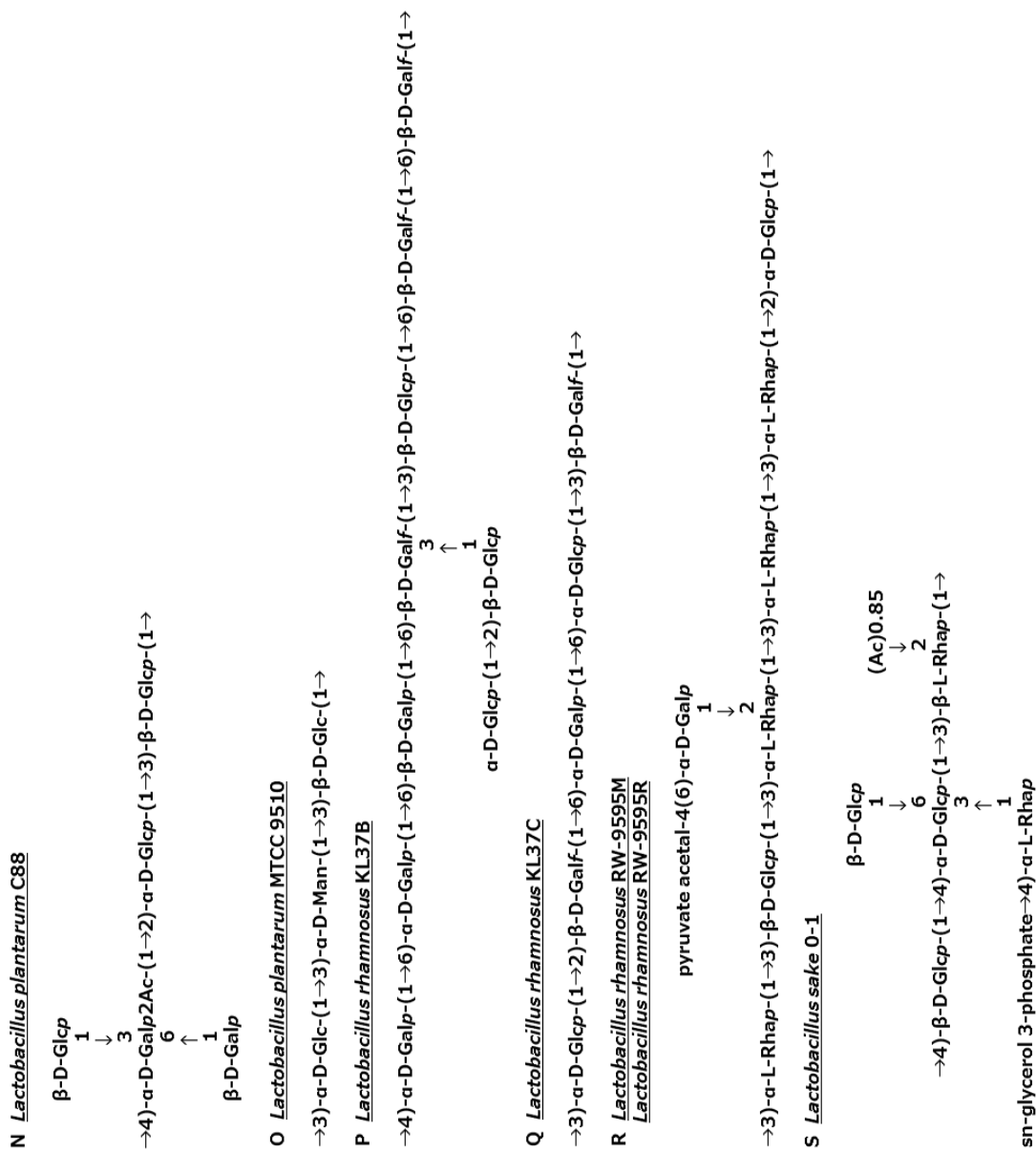


図1.1 *Lactobacillus* 菌種 (*Lb.*) が生産する菌体外多糖類の1次構造

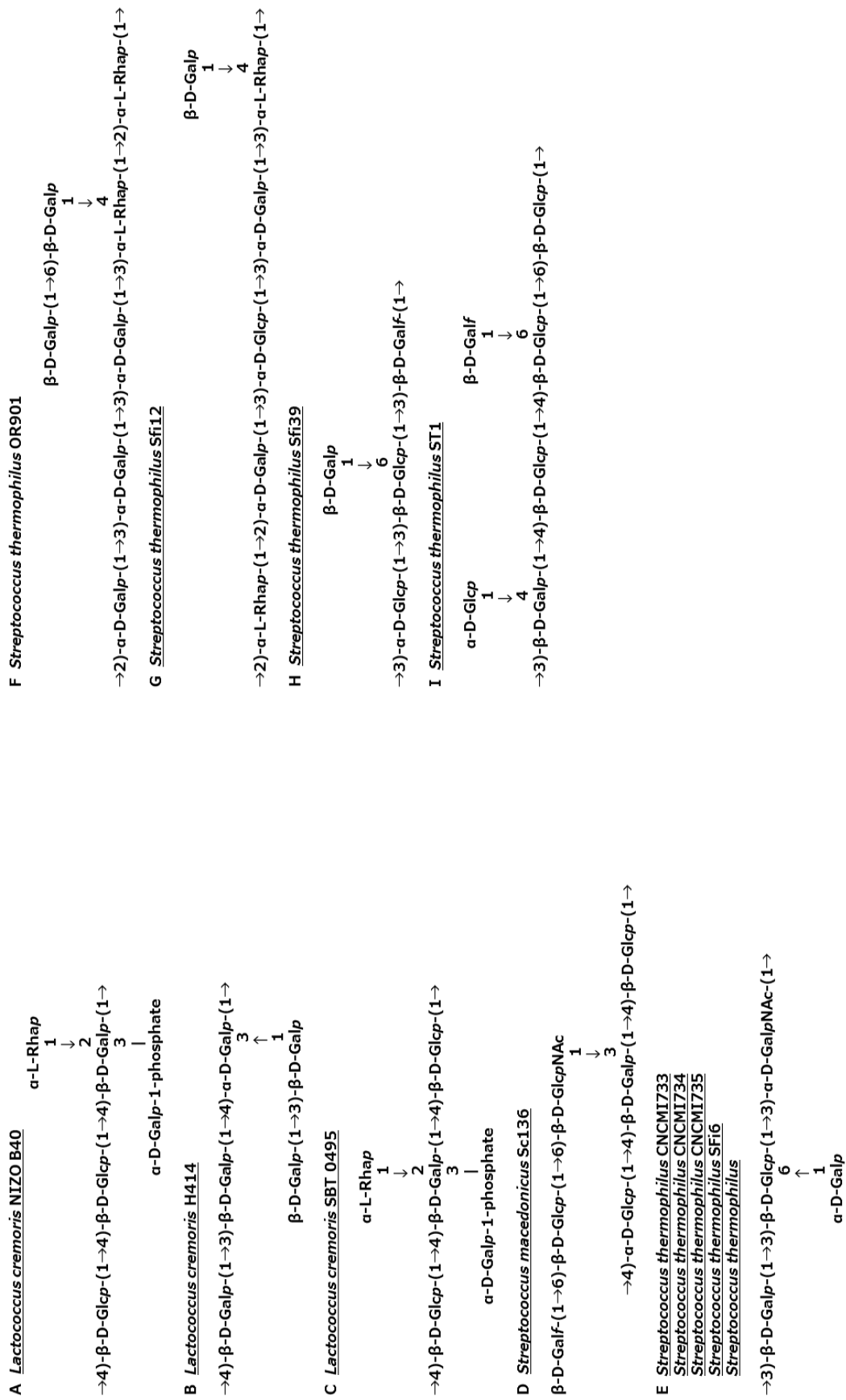


図1.2 *Lactococcus*菌種 (*Lc.*) および *Streptococcus*菌種 (*Str.*) が生産する菌体外多糖類の1次構造

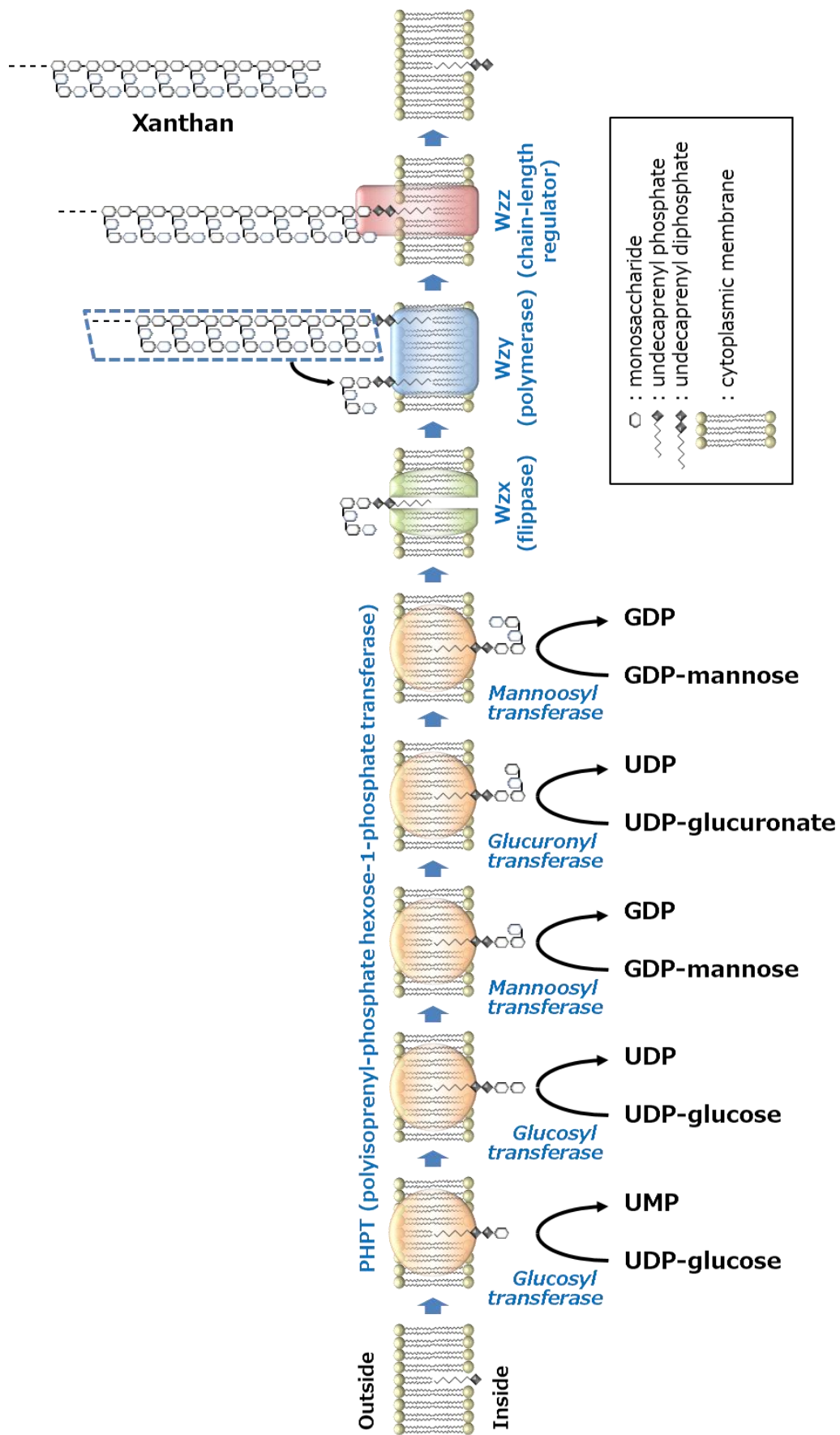


図1.3 *Xanthomonas campestris* によるキサントランの生成

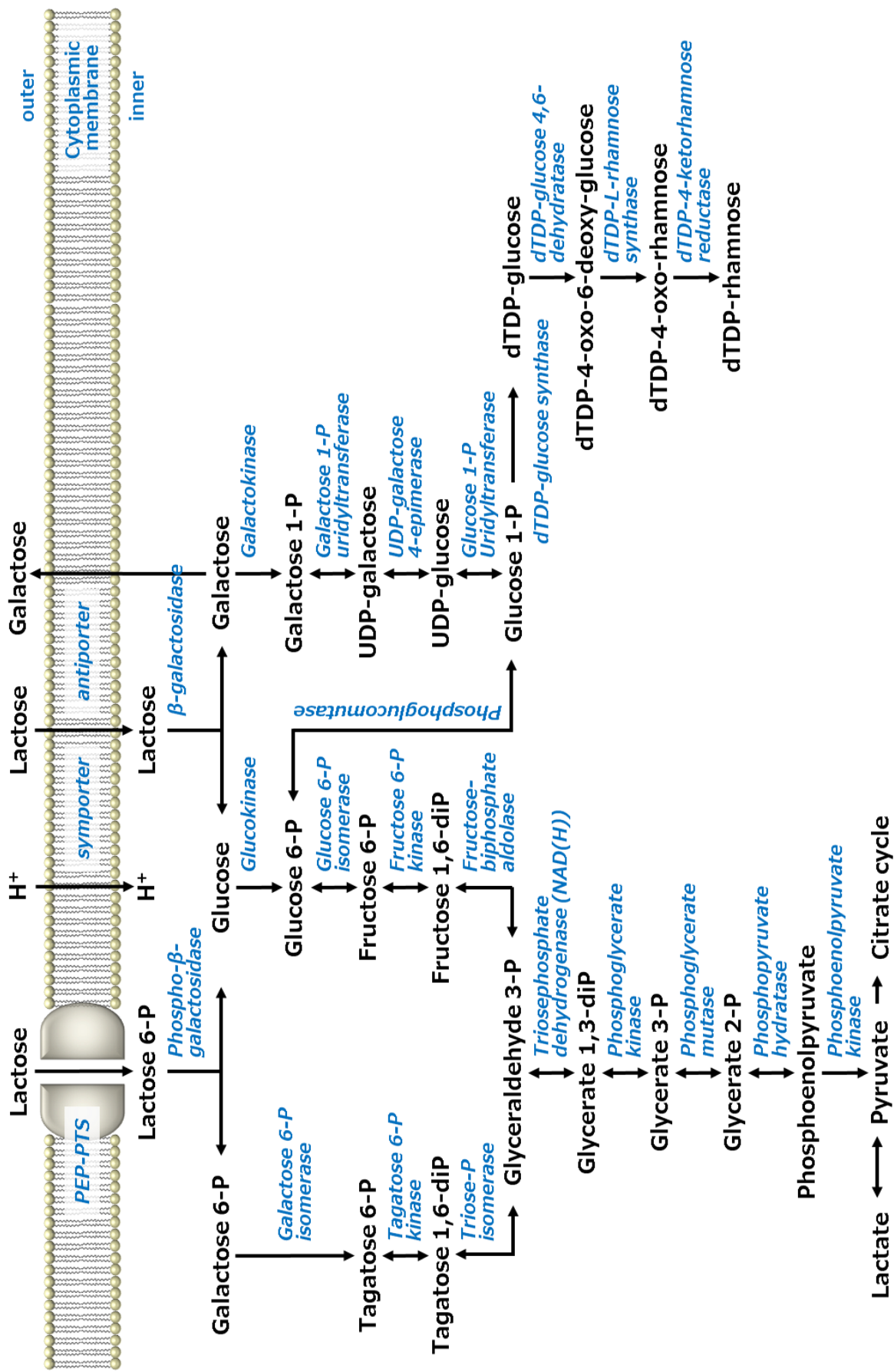


図1.4 乳酸菌の糖代謝における糖ヌクレオチド前駆体形成

第2章 *L. cremoris* 菌による菌体外多糖類の生産特性

2.1. 序論

第1章で述べたように、乳酸菌が生産する菌体外多糖類は、発酵乳製品に特有の物性をもたらし、発酵乳でのシネレシス（ホエー分離）を抑制する効果があるほか、免疫賦活や抗腫瘍効果などの保健機能が着目され、様々な研究がなされてきた。日本の市場では、乳酸菌が生産する多糖類を有効成分とし、インフルエンザ予防効果やアレルギー抑制効果などの疫学的調査や動物試験の結果を科学的根拠として、実質的に保健機能を訴求する製品が複数存在し、発酵乳製品市場をけん引している状況である。

本研究では、多糖類産生能を有する乳酸菌の発酵中にパルス電界処理を行ない、電気化学的刺激により多糖類発酵に有益な効果をもたらし、新たな発酵エンジニアリング技術の基礎を確立することを目的としている。そのためにはまず、供試菌株がどのような発酵条件でどれほどの菌体外多糖類を生産し、どのような化学特性を有する多糖類を生産するのか、また、どのようなメカニズムで生合成が行なわれ、どういった遺伝子が生合成に関与するのかなどをできる限り把握し、パルス電界処理がもたらす発酵への影響を考察しながら技術の確立へと進める必要がある。

筆者は、1991年から1996年まで *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 による菌体外多糖類“*viilian*”について研究を行い、この章で述べる多糖類生産の特性について知見を得ている。また、パルス電界処理によるエンジニアリング技術の研究を行うにあたり、市販のヨーグルトスターターカルチャーから分離した *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C4 を新たな供試菌株として選択し、この菌株での多糖類生産特性について調べたので、それらのデータを合わせて以下の内容を本章にとりまとめた。

まず、SBT0495株とC4株の発酵特性や多糖類の生産性、さらに生産された多糖類の化学組成を比較するとともに、培地の糖質源の種類や濃度の違いによる多糖類の生産量への影響や、静置回分培養と定pH培養での多糖類生産量の比較、さらに、定pH培養におけるpHと生産量との関係や、培養中に生産された多糖類の化学組成の経時変化などの結果をまとめ、*L. cremoris* 菌種での多糖類産生特性を考察する。なお、本研究の目的であるパルス電界処理による多糖類発酵のエンジニアリング技術確立は、上記のような発酵乳製品の製造技術として応用されることを前提としており、基本的に回分酸性化培養による発酵プロセスが前提となる。したがって、この章では、*L. cremoris* 菌種に

よる多糖類発酵の特性を把握した上で、パルス電界処理を実施するに適した発酵のステージや、パルス電界処理に期待する多糖類発酵への効果について述べる。

2.2. 実験材料および方法

2.2.1. 供試菌株と培養条件

フィンランドの粘性発酵乳 Viili のスターターカルチャー (Valio, Helsinki, Finland) から分離された *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 株は、雪印乳業菌株センター (SBT) より入手した。SBT0495 株は、グルコース・ガラクトース・ラムノースとリン酸基から構成されるヘテロ多糖類を産生し、その一次構造 (図 2.1) についても解明されている (Nakajima *et al.*, 1992)。また、多糖類を産生する追加菌株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C4 株は、コーカサス地方の発酵乳カスピ海ヨーグルト用の市販スターターカルチャーから分離した粘性菌であり、*Lactococcus lactis* 種に特有な *gadB* 遺伝子を PCR 増幅して配列を分析 (Nomura *et al.*, 2002) することにより、その亜種 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* であると同定された (表 2.1)。

SBT0495 株の保存用カルチャーとして、10%グリセロールを含む MRS 培地 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で培養してから凍結 (-50°C) し、実験に使用する場合には 3 回以上継代培養して十分に活性化してから使用した。培養に使用した培地は、Otto ら (1983) が *Streptococcus cremoris* の培養に使用した化学合成培地 (CDM 培地) を使用した。なお、CDM 培地における糖質源として乳糖 10 g/L を基本配合とし、他の糖質源で培養する場合も 10 g/L で配合した。培養は静置回分培養もしくは定 pH 培養のいずれかにより培養温度 18°C で行い、定 pH 培養の場合は 5 L のジャーフェーマンターを用いて 5 M 水酸化カリウムの自動滴定により行った。いずれの培養も、対数増殖期の前培養物を 2.5 % (vol/vol) 添加することとし、乳酸菌の多糖類産生形質は比較的不安定であり、継代を繰り返すうちに形質を失うことがある (van den Berg *et al.*, 1995) ため、凍結保存から賦活後 5 継代までの菌体に限って使用した。菌の生育は、600 nm での濁度 (OD600) をモニターすることにより評価した。

なお、菌の比増殖速度を求める際には、培養開始時と培養終了時の培養液中の菌体由来総タンパク質量を以下の 2.2.5 に述べる方法で測定し、以下の式 2.1 に示したように、菌体由来総タンパク質の増加率の自然対数を計算してから培養時間で除算することによって計算した。

$$\text{比増殖速度 (g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \ln (\text{培養終点菌体総タンパク質量} \div \text{培養始点菌体総タンパク質量}) \div \text{培養時間 (h)} \quad \dots \text{式 2.1}$$

また、C4株の培養においては、乳糖を10 g/L配合したCDM培地を用いて静置回分培養し、対数増殖期の前培養物を1.0 % (vol/vol) 添加して25°Cで培養した。M17寒天培地 (Oxoid Limited, Hampshire, UK) で経時的に生菌数を測定するか、pHを測定して生育を評価した。

2.2.2. 多糖類画分の調製と生産量の測定

100 mLの培養液を遠心チューブに移し、JA25.50ローターを使用したBeckman Avanti J-25遠心機 (Beckman, Fullerton, CA) により、4°C、50,000 × gで60分間遠心して菌体を完全に除去した。得られた上清に2倍容量の冷却したエタノールを加えて多糖類を沈殿させ、4°C、10,000 × gで30分間遠心して多糖類を回収した。この沈殿物を0.1 % (wt/vol) のアジ化ナトリウムを含む50 mM HEPESバッファーpH 7.5中でタンパク質分解酵素プロナーゼ (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) と混合 (1 g/L) し、37°Cで48時間処理して残存するタンパク質を分解した。次にこの反応液にトリクロロ酢酸 (TCA) を4 % (wt/vol) 添加し、4°C、18,000 × gで2時間遠心して残存する酵素タンパク質などを除去してから、得られた上清に対してその2倍容量の冷却したエタノールを加えて多糖類を沈殿させた。最終的に、回収した沈殿物をイオン交換水50 mLで溶解してから、分画分子量3,000の限外濾過膜Amicon YM3を装着した攪拌型限外濾過装置Amicon SERIES 8000 (Amicon, Danvers, MA) により濃縮し、さらに200 mLのイオン交換水で透析濾過することにより残存するTCAや夾雑物を除去して多糖類画分を調製した。途中、酵素反応法による乳糖測定キット (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) やPierce BCAプロテインアッセイキット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) を用い、残存する乳糖やタンパク質が検出されないことを確認した。また、得られた多糖類画分中の全糖量をフェノール硫酸法で分析し、グルコースを標品とする検量線で定量された糖質含量から培養液中の濃度に換算した。

C4株の培養における多糖類画分の生産量を測定する場合には、以下に述べる分子量測定のためのサイズ排除クロマトグラフィーを用いた。予め糖質含量を測定した多糖類画分を分離し、そのピーク面積から検量線を作成した上で、検体を分析した際の多糖類画分のピーク面積から糖質含量を算出し培養液中の濃度に換算した。

2.2.3. 多糖類の化学組成分析

多糖類画分の化学組成分析を行うため、調製した画分の加水分解を 2 M トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて 100°C で 6 時間処理した。封入した容器の中で加水分解した後、真空濃縮により TFA を除去した。加水分解物中の単糖の分析は、高性能陰イオン交換クロマトグラフィーにパルスドアンペロメトリ検出器を組み合わせた (HPAEC-PAD) システムで、CarboPac PA1 カラムを 30°C に維持しながら、1 mL/min の流速で以下の溶出液プログラムにより単糖類を分離した。プログラムは、100 mM 水酸化ナトリウムを溶媒とする 1.0 M 酢酸ナトリウムによるカラムの再生処理を 5 分間行い、次に 200 mM 水酸化ナトリウムを 5 分間流した後、16 mM 水酸化ナトリウムを 10 分間流してカラムを平衡化する。その後検体を注入し、16 mM 水酸化ナトリウムの定濃度のまま 25 分間流して単糖類を分離した。溶出液中の糖質の検出は、EG&G model 400 EC 電気化学検出器 (Princeton Applied Research, Princeton, NJ) に、作用電極と参照電極に金電極と銀・塩化銀電極をそれぞれ装着してパルスドアンペロメトリモードで行った。電極間のパルス電位とパルス幅については、E1 = 50 mV (t1 = 480 ms)、E2 = 600 mV (t2 = 200 ms)、E3 = -600 mV (t3 = 50 ms) とした。溶出する単糖類の定量にあたっては、各種の単糖類を既定濃度で配合した標準液を注入して得られる各ピーク面積から、それぞれの検量線を作成して計算した。

なお、C4 株が生産する多糖類の化学組成を分析する場合は、TFA による加水分解の後、構成単糖を 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン修飾 (PMP 修飾) し、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で分析を行った。PMP 修飾法は、Honda ら (2003) と Yang ら (2005) による方法を参照し、次のように一部変更して行った。まず TFA 分解物に内部標準物質を添加してから 0.6 mL の 0.5 M PMP メタノール溶液に溶解し、0.3 mL の 0.3 M 水酸化ナトリウムを添加した。この混合液を 70°C で 30 分間加熱してから室温まで冷却し、0.3 mL の 0.5 M 硫酸と 5 mL のクロロホルムを十分に混合した。その後、混合液を 3,000 × g で 5 分間遠心して水層と有機溶媒層に分離し、水層だけを回収して真空乾燥してから、RP-HPLC の溶媒 2 mL で溶解して分析に供した。RP-HPLC では、オクタデシル (C18) 逆相カラム Intersil ODS-3 (GL Science, Tokyo, Japan) を用いて 40°C で分析し、10 mM リン酸カリウムバッファー pH 4.5 とアセトニトリルを 81:19 で混合しものを溶媒とした。検体は 30 µL 注入し、溶媒を 1.0 mL/min の流速で流してそれぞれの PMP 修飾体を溶出させた。PMP 修飾体の溶出は 245 nm の吸光度でモニタ

一し、内部標準物質のピーク面積との相対比からそれぞれの PMP 修飾体量を計算した。

また、多糖類の構成成分としてリン酸基を含有していたため、リン酸基の分析も行った。多糖類の加水分解は、56%の過塩素酸により 200℃で 20 分間加熱して行い、分解物を用いて Bartlett 法 (Bartlett, 1959) による比色法で定量した。なお、多糖類画分の収量の計算は、上記の糖組成分析による多糖類画分の各構成糖の濃度とリン酸含量を合算することによって算出した。

2.2.4. 多糖類の分子量測定

多糖類の分子量は、Asahipak GS-710 カラム (500×7.8 mm: Asahi Kasei, Tokyo, Japan) または Shodex OHpak SB-806 HQ カラム (300×8 mm: Showa Denko, Tokyo, Japan) を使用したサイズ排除クロマトグラフィーにより測定した。カラム温度を 30℃に保ち、50 mM 塩化ナトリウムを 1 mL/min の流速で流して、溶出する多糖類を示差屈折計によって検出した。分子量の推定においては、Asahipak GS-710 カラムではプルラン分子量マーカー P-82 (Showa Denko, Tokyo, Japan) を用いて、Shodex OHpak SB-806 HQ カラムではデキストラン D5376 (Sigma-Aldrich, St. Louis, US) を用いて作成した検量線に基づき、その溶出時間から分子量を算出した。

2.2.5. 化学分析

タンパク質の定量には、Pierce BCA プロテインアッセイキット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) を使用した。菌体由来の総タンパク質を測定する際は、菌体を 1M 水酸化ナトリウムにより 100℃で 30 分間処理後、一方、多糖類に含まれるタンパク質を測定する場合は、多糖類を 100℃で 5 分間処理後に上記アッセイキットで分析した。また、乳糖および乳酸の定量には、それぞれ、ガラクトース・乳糖測定キット (BioVision, Milpitas, US) および乳酸測定キット (Funakoshi, Tokyo, Japan) を使用した。

2.3. 結果

2.3.1. SBT0495 株と C4 株の生育および多糖類生産特性

本研究における 2 供試菌株である SBT0495 株と C4 株を、いずれも乳糖 10 g/L を含む CDM 培地で 28 時間静置回分培養を行い、生育曲線や多糖類生産曲線を図 2.2 に示した。SBT0495 株は生育の立ち上がりが C4 株よりも早く、培養 8 時間後ほどから対数増

殖が始まるが、C4 株では約 5 時間遅れて培養 13 時間後ほどから対数増殖期となる。いずれの菌株も、菌の増殖による OD₆₀₀ の上昇に続いて乳酸発酵による pH の低下が始まり、その後多糖類の生産が始まる傾向は同様に見られるが、C4 株は菌の生育が SBT0495 株よりも明らかに遅い。さらに、発酵終点での多糖類生産量を比較すると、SBT0495 株では約 37 mg/L であるのに対し、C4 株では約 13 mg/L にとどまった。

SBT0495 株の場合は限外濾過による濃縮法で多糖類を調製し、C4 株の場合はサイズ排除クロマトグラフィーで数百万の分子量に相当する多糖類のピーク面積から、生産量を算出しているが、限外濾過濃縮では菌体由来するペプチドグリカン、テイコ酸やリポテイコ酸などの比較的高分子の糖含有化合物を回収する可能性もあるため、両菌株の多糖類生産性を厳密には比較できないが、SBT0495 株の方が C4 株よりも多糖類生産性が高く、菌の生育も早い特徴を有すると考えられる。

2.3.2. SBT0495 株と C4 株が生産する多糖類画分の化学組成

上記と同様に、乳糖 10 g/L を含む CDM 培地で SBT0495 株と C4 株を 28 時間静置回分培養し、得られた多糖類画分の化学組成について表 2.2 にまとめた。2.3.1 に述べたように、C4 株の多糖類生産量は SBT0495 株による生産量の約 35 % 程度と低いが、その化学組成に基づく分子構成比については、SBT0495 株で 2.0 : 2.1 : 1.2 : 1.0 (グルコース : ガラクトース : ラムノース : リン酸) であるのに対し、C4 株では 2.2 : 1.9 : 0.7 : 0.8 となり、生産量の差に見られるような大きな違いはなく、グルコースとガラクトースが約 2 分子であるのに対し、ラムノースとリン酸が SBT0495 株では約 1 分子、C4 株では 1 分子弱の構成であることを示した。いずれも、Nakajima ら (1992) が示した図 2.1 の 1 次構造による理論上の分子比 2 : 2 : 1 : 1 (グルコース : ガラクトース : ラムノース : リン酸) と大きく逸脱していないことから、C4 株の多糖類が SBT0495 株の多糖類と同じ構造を有する可能性があり、菌の生育や多糖類の生産性などに違いはあるものの、両菌株の多糖類生合成に関与する相同性が示唆された。

Nakajima ら (1992) は、脱脂乳のタンパク質を加水分解してから限外濾過して調製した培地における、SBT0495 株による多糖類の分子量を 170 万 Da と報告しており、同じく SBT0495 株を CDM 培地で培養して生産される多糖類の分子量は、340 万 Da であったことから、培地の違いにより分子量が変化することが示唆された。また、上記のように同様の化学組成を有する C4 株を CDM 培地で発酵させた場合の多糖類の分子量は、さらに大きく 620 万 Da と推定され、使用したサイズ排除クロマトグラフィーのカラム

や分子量マーカーが異なるため、単純に比較することはできないが、培地環境や継代培養数などによって、生産する多糖類の大きさは変化しているものと考えられる。

2.3.3. CDM 培地における糖質源の影響

CDM 培地を用いて SBT0495 株を静置回分培養し、その糖質源としてグルコース、ガラクトース、果糖、マンノース、乳糖、N-アセチルグルコサミンをそれぞれ 10 g/L 配合して培養することにより、生育や多糖類生産に対する糖質源の影響を調べた。培養の終点は、生育が定常期に至り pH の低下が収まる時点までとし、その時点での濁度 OD₆₀₀ やそれまでの培養時間と多糖類画分の収量を表 2.3 に示した。

培養終点での OD₆₀₀ を比較すると、N-アセチルグルコサミンでの 1.22 から果糖での 1.38 の範囲での違いであり大きな差があるとは言えないが、その培養時間は大きく異なり、ガラクトースを使用した場合には定常期に至るまでに 48 時間を要している。さらに、粗製多糖類の生産量は糖質源の違いによる差が見られるが、生産量が最も高かった N-アセチルグルコサミンでも、本来牛乳に含まれる乳糖での生産量の約 1.5 倍に相当する 52.5 mg/L に留まった。

一方、乳糖を糖質源とする CDM 培地で C4 株を静置回分培養し、乳糖濃度を 1-4 % の範囲で変更した場合の生育や多糖類生産に対する影響を調べ、その結果を表 2.4 に示した。OD₆₀₀ や pH に見る菌の生育や、多糖類生産量のいずれにおいても乳糖濃度の影響はほとんど見られなかった。静置回分培養においてはいずれの場合も培養 20 時間程度で pH が 4.2 となっていることから、1 % 程度の乳糖濃度であれば十分に乳酸酸度が高まり代謝の低下に至ったものと考えられる。

2.3.4. 定 pH 培養における pH と生育や多糖類生産との関係

供試菌株 SBT0495 株や C4 株のような酪農乳酸菌は、牛乳をベースとする発酵乳製品に使用されてきた菌であり、牛乳中の乳糖濃度は 5 % である。上記の静置回分培養での結果では、乳糖濃度 1-4 % では生育や多糖類生産への影響が見られなかったが、定 pH 培養では発酵で生成する乳酸が随時中和されていくため、pH 低下による細胞ストレスや代謝抑制がかからない。したがって、培地中の必須栄養素の枯渇や乳酸以外の生産物質による阻害作用が働くまでは発酵が継続することを考慮し、CDM 培地中の乳糖濃度を牛乳中と同じ 5 % として定 pH 培養を行なった。pH 4.5-7.0 の範囲で一定の pH を維持しながら培養し、50 時間の培養における菌の比増殖速度や多糖類生産量との関係を調

べて図 2.3 に示した。

図から明らかなように、比増殖速度と多糖類生産量のいずれにおいても至適条件は pH 6.3 であり、50 時間での多糖類生産量は 464 mg/L となった。pH 6.3 前後での多糖類生産量の変化は大きく、pH 5.5 では 63 mg/L、pH 7.0 では 3.3 mg/L であることから、多糖類生産における至適 pH は非常にシャープな範囲にあることがわかる。上記の静置回分培養では、乳糖 10 g/L を糖質源とした場合の多糖類生産量は 28 時間の培養後に 36 mg/L であったことから、至適 pH 6.3 での定 pH 培養による多糖類生産量は、約 13 倍に相当した。

2.3.5. 至適 pH での定 pH 培養における菌の生育と多糖類組成の経時変化

上記の結果から定 pH 培養での至適条件を pH 6.3 とし、50 時間の培養中の経時的な物質収支（乳糖減少、乳酸生成、菌数増加、多糖類生産）の変化を図 2.4 に、多糖類生産量の増加に伴う構成単糖の組成とリン酸含量の変化を表 2.5 にまとめた。

図 2.4 に見られるように、培養 10 時間後から菌の増殖が始まり、20-30 時間後までが対数増殖を示すが、30 時間以降は、回分培養と同様に定常期に至り、菌の生育は OD₆₀₀ 4.9 に至った。多糖類の生産は実質的には培養 20 時間以降であり、それに伴って乳糖の減少が明確である。乳酸はやや遅れて 25 時間後から増加し始め、その後は多糖類の生産曲線と並行するように推移した。50 時間の培養終点における多糖類生産量および乳酸濃度は、それぞれ 429 mg/L と 366 mM となった。なお、乳糖の減少傾向は培養 50 時間でほぼ終息し、5.0 % (= 146 mM) から開始した培養は 50 時間後に 0.8 % (= 16 mM) に至った。

一方、表 2.5 に見られるように、50 時間の定 pH 培養における多糖類の化学組成の変化には特徴があり、培養 25 時間ごろからリン酸含量の増加と構成単糖におけるラムノースの増加が明らかとなった。図 2.1 に示された SBT0495 株のリン酸化多糖類が、培養 25 時間後から顕著に増加したことによると考えられ、35 時間以降には 3 種類の単糖（グルコース：ガラクトース：ラムノース）の構成比が、図 2.1 の構造に基づく 2:2:1 に相当するものとなった。また、多糖類画分に回収されたリン酸量を培養液 1 L 当たりで表中示しているが、ラムノースの構成比の挙動と同様に、35 時間以降に多糖類の 1 次構造におけるリン酸基の理論的構成比に近づく傾向を示した。

なお、培養 5-15 時間後までごく微量の画分が回収されており、その糖組成はグルコースとガラクトースがおおよそ半分ずつ含まれていた。乳糖の残存も考えられるが、

2.3.1 でも述べたように、限外濾過濃縮では菌体に由来するペプチドグリカン、テイコ酸やリポテイコ酸などの比較的高分子の糖含有化合物を回収する可能性があり、実際に Sijtsma ら (1990) は *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 によるリポテイコ酸の構成糖として、グルコースやガラクトースが含まれることを報告している。いずれにせよ、培養終点での多糖類生産量は 429 mg/L であり、培養 15 時間までに測定された画分 5.1 mg/L は約 1 % に相当するに過ぎない。

2.4. 考察

序論で述べたように、筆者は 1991 年から 1996 年にかけて、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 株による菌体外多糖類“viilian”について研究を行っており、パルス電界処理による多糖類発酵のエンジニアリング技術を検討する上で基礎となる、多くの知見を得た。ところが、その後パルス電界処理によるエンジニアリング技術に関する研究を行うに当たっては、新たに *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C4 株を使用することになり、SBT0495 株で得られた知見を参照するためには両菌株の相同性、特に多糖類発酵に関する遺伝的相同性が見られるか否かは本研究において重要なポイントであった。

C4 株が生産する多糖類の 1 次構造は明らかになっていないが、表 2.2 に示した分子構成比は SBT0495 株と大きく異なるものではなく、van Kranenburg ら (1998) が彼らの菌株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40 株でも、SBT0495 株と同じ構造のリン酸化多糖類を生産することを報告していることを考慮すると、*L. cremoris* 菌が生産する多糖類には共通性が多く、その生合成を制御する遺伝子の相同性は高いと見られる。C4 株の生育や多糖類の生産効率が SBT0495 株には劣るものの、SBT0495 株で明らかのように様々な糖質を資化して多糖類を生産することが可能であり、静置回分培養では 10-50 mg/L、至適 pH 6.0-6.5 での定 pH 培養では 250-450 mg/L まで多糖類を生産することが可能である。

なお、これら供試菌株における多糖類生産は菌の増殖と並行するものではなく、生育が対数増殖期に至ってから数時間遅れて多糖類の生産が活発化する。多糖類の生産には、エネルギーだけではなくその構成糖を生産するための糖代謝が活発に機能していることが必要であり、培地中の糖質源である乳糖は多糖類の生産とともに低減する。ただし、静置回分培養では培地中の乳糖が 1 % 程度あれば、糖代謝における乳酸発酵により pH が 4.1-4.2 程度まで低下するため、代謝にブレーキがかかり多糖類の生産量も定 pH

培養と比較して 10 分の 1 程度に留まると考えられる。

本研究では、パルス電界処理により電気化学的刺激を与え、糖代謝のベクトルに変化を与えるか、多糖類生合成のメカニズムに直接作用させることにより、より効率的に多糖類を生産させる発酵のエンジニアリング技術としての確立を目指している。上記の考察に基づけば、供試菌株の生育における対数増殖期中期以降で、多糖類の生合成が活発に行われている状態で、パルス電界処理を行なうことにより、糖代謝や多糖類生合成への電気化学的刺激を効率よく菌に与え、それがもたらす変化を把握できるものと考えられる。

2.5. 結論

本研究の 2 つの供試菌株である SBT0495 株と C4 株による多糖類は、その構成糖やリン酸基を含有する点で同一であり、その化学組成も近似していた。なお多糖類生産性については SBT0495 株の方が若干優れているが、いずれも静置回分培養では 10-50 mg/L の生産性となった。なお、培地に使用する糖質源の違いにより多糖類の生産量に変化があったが、本来乳酸菌の発酵に用いられた牛乳中の糖質源である乳糖での生産量と比べると大幅な増産効果ではなく、さらに乳糖の初期濃度を高めても多糖類生産性に大きな変化はなかった。したがって、食品製造に応用可能な発酵調整技術では、生産性の大幅な向上は困難であることが示唆された。

一方、多糖類生産は菌の増殖と並行するものではなく、生育が対数増殖期に至ってから数時間遅れて多糖類の生産が活発化し、乳酸発酵による pH 低下とともに多糖類の生産も低下した。パルス電界処理を行う生育上のタイミングとして、糖代謝や多糖類生合成への電気化学的刺激による変化を把握するためにも、対数増殖期中期以降で多糖類の生合成が活発に行われている状態で処理を行なうことが適切であると結論した。

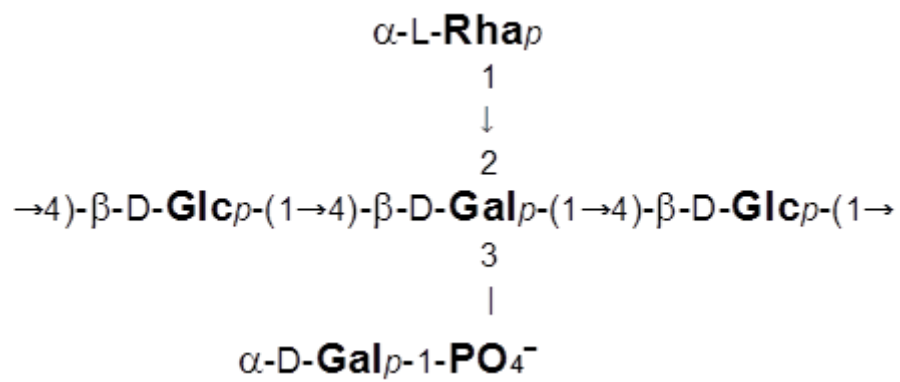


図 2.1 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 が生産するリン酸化多糖類の 1 次構造 (Nakajima *et al.*, 1992)

表 2.1 *Lactococcus lactis* 種の供試菌株 C4 に対する亜種同定 (subsp. *cremoris* または subsp. *lactis*)
Lactococci C4 株と *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC19257 および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC19435 の *gadB* 遺伝子を PCR で増幅し、541 の
 塩基配列を分析して相同性を調べることに、C4 株の *Lactococcus lactis* 種における亜種を同定する。

Bacterial strain	Base sequence	Alignment
Lactococci C4	1 CTCCTTTAAAATGGMAATTTGGATAAATACTATGMAAG- AA TAGGCGATAGCTAA TTAGTAA TAGCTTAAAA-----C 90	
<i>L. cremoris</i> ATCC19257	CTCCTTTAAAATGGMAATTTGGATAAATACTATGMAAG- AA TAGGCGATAGCTAA TTAGTAA TAGCTTAAAA-----C	77 / 77
<i>L. lactis</i> ATCC19435	CTCCTTTAAAATGGGATTTTAGATAAATATATGMAAMTAA CTGACAGACTTATACTAA TAGMAA MAACA MAAMTTATCATC 91	59 / 90
Lactococci C4	AAATAAAAGCGATATCTAGATATATCGCTTTTATTTT----- AGTGAGTAA GGCCATATGTTTTAT 180	
<i>L. cremoris</i> ATCC19257	AAATAAAAGCGATATCTAGATATATCGCTTTTATTTT----- AGTGAGTAA GGCCATATGTTTTAAT	64 / 66
<i>L. lactis</i> ATCC19435	AAATAAAAGCGATATAGATTAA CTATATCGCTTTTATTTT CTTAGATGMATATCAGCTTTT TTAGTGAGTAA AGCCATATGTTTTAT 181	60 / 90
Lactococci C4	TTTCAGGTTCCGTGATGMAATAGMATATGAGCTTATTTAGTGCATGAA TTGC TTCTGTATATCTTGAACATAGTTAAATGCCATATTC 270	
<i>L. cremoris</i> ATCC19257	TTTCAGGTTCCGTGATGMAATATAGAGCTTATTTAGTGCATGAA TTGC TTCTGTATATCTTGAACATAGTTAAATGCCATATTC	89 / 90
<i>L. lactis</i> ATCC19435	TTTCAGGTTCC CTCAT GGTATAGMATATGAGCTTATTTAAAGCC TC AA TTGC TTCTGCATATCTTGAACATAGTTAAATGCCATATTC 271	84 / 90
Lactococci C4	TCCCGMAATCTGCTCGMAATTA CTAA CGTTGAATGATTT CC MAATTTTAGGAAGTGGATAAGCAGGCAC TTGCC ATCCCTTCA 360	
<i>L. cremoris</i> ATCC19257	TCCCGMAATCTGCTCGMAATTA CTAA CGTTGAATGATTT CC MAATTTTAGGAAGTGGATAAGCAGGCAC TTGCC ATCCCTTCA	89 / 90
<i>L. lactis</i> ATCC19435	TCCGMAATCTGCTCGMAAT CA CTAAAGCTTGAATGATTT CC MAATTTTAGGAAGTGGATAAGCAGGCAC TTGCC ATCCCTTCA 361	88 / 90
Lactococci C4	TTAAATAACGATCTGCCMAATCATAAAGATTC CA AGCAGATTTGAATTTCTTTAAATTTGTAGCATACAA TTGGC AAATTTGGACCCA 450	
<i>L. cremoris</i> ATCC19257	TTAAATAACGATCTGCCMAATCATAAAGATTC CA AGCAGATTTGAATTTCTTTAAATTTGTAGCAGACAA TTGGC AAATTTGGACCCA	89 / 90
<i>L. lactis</i> ATCC19435	TTAA- TAA AGCGTCCGCCMAATCATAAAGATTC CA AGC CG ATTTGAATCTTCTTTAAATTTAGCAGACAA TTGGC AAATTTGGACCCA 451	83 / 90
Lactococci C4	TGTTTCATAA TTCA AA CA TTCCCGTGTTC CA ATTTCTCTG CA AA TACAT GGCTACTTTATGCGTTCTCTCA TGA ATAGCTTTATA- 541	
<i>L. cremoris</i> ATCC19257	TGTTTCATAA TTCA AA CA TTCCCGTGTTC CA ATTTCTCTG CA AA TACAT GGCTACTTTATGCGTTCTCTCA TGA ATAGCTTTATA	89 / 90
<i>L. lactis</i> ATCC19435	TGTTTCATAA TTCA AA CA TTCCAGTTTT TC AAATTTCTT GTAA AA ACAT GGCTACTTTATGTTCTCTCA TGA ATAGCTTTATA	84 / 90
Total alignment between Lactococci C4 and <i>L. cremoris</i> ATCC19257: 98.8 %		497 / 503
Total alignment between Lactococci C4 and <i>L. lactis</i> ATCC19435: 84.8 %		458 / 540

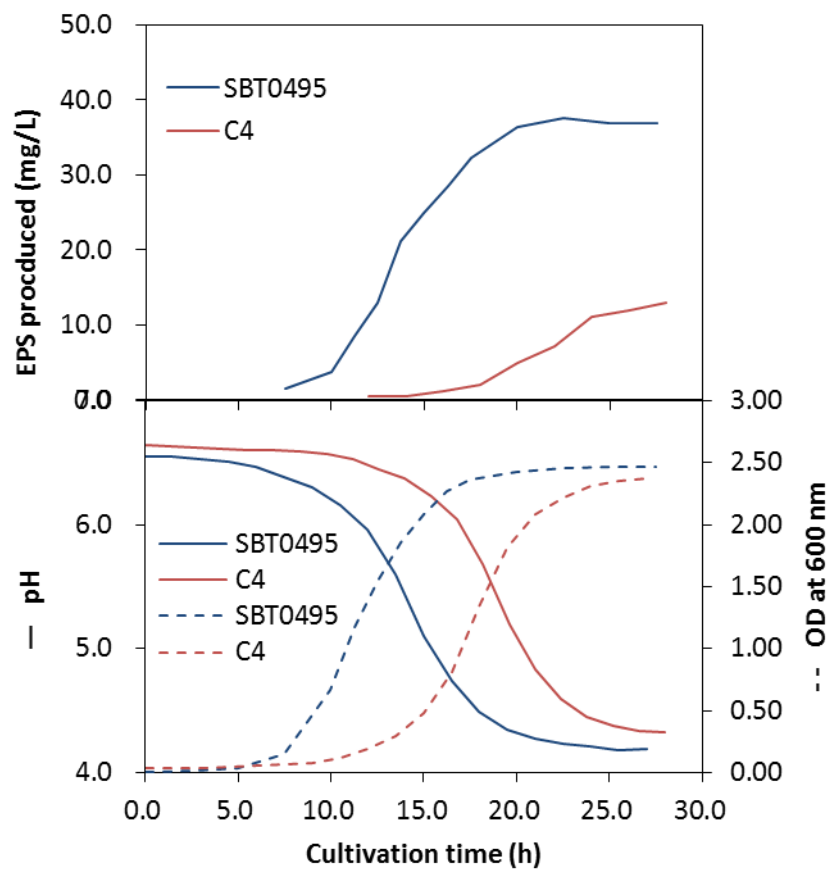


図 2.2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 および *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C4 を CDM 培地で静置回分培養した場合の生育および多糖類生産量の比較

表 2.2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 株と *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C4 株が生産する多糖類の比較

培地には乳糖 10 g/L を配合した化学合成培地 CDM (Otto *et al.*, 1983) を使用し、静置回分培養法で 28 時間培養し、生産された多糖類の化学組成として構成単糖とリン酸の組成を以下に示した。

供試菌株	化学組成 (mg/L)				分子構成比	分子量 (x 10 ⁶ Da)
	Glc*	Gal*	Rha*	PO ₄ *	Glc* : Gal* : Rha* : PO ₄ *	
SBT0495 株	13.7	14.3	8.3	3.6	2.0 : 2.1 : 1.2 : 1.0	3.4
C4 株	5.9	4.9	1.8	1.1	2.2 : 1.9 : 0.7 : 0.8	6.2

* Glc: グルコース; Gal: ガラクトース; Rha: ラムノース; PO₄: リン酸

** 多糖類画分収量は全ての構成糖とリン酸含量の合計

表 2.3 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 の生育および多糖類生産に対する培地中の糖質源の影響

培地には化学合成培地 CDM (Otto *et al.*, 1983) を使用し、以下に示した 6 種類の糖質源をいずれも 10 g/L の濃度で配合し、静置回分培養法で pH の低下が定常期に至るまで培養してから多糖類画分を調製し、その糖質含量をもって多糖類生産量とした。

培地糖質源	培養終点 pH	培養終点 OD	培養時間 (h)	多糖類生産量 (mg/L)
グルコース	4.12	1.30	23	40.4
ガラクトース	4.30	1.32	48	36.2
果糖	4.24	1.38	21	15.4
マンノース	4.22	1.26	27	22.8
乳糖	4.17	1.28	28	35.6
N-アセチルグルコサミン	4.15	1.22	21	52.5

表 2.4 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C4 の生育および多糖類生産に対する培地中の乳糖濃度の影響

培地には乳糖濃度が 1-4% で異なる化学合成培地 CDM (Otto *et al.*, 1983) を使用し、それぞれ静置回分培養法で 24 時間培養した。サイズ排除クロマトグラフィーにより分離された多糖類の糖質含量を算出し、培養液中での濃度に換算して以下に示した。

培地中乳糖濃度 (%)	培養終点 pH	培養終点 OD	多糖類生産量 (mg/L)
1	4.21	1.29	15.1
2	4.20	1.18	15.4
3	4.19	1.11	14.7
4	4.19	1.14	15.4

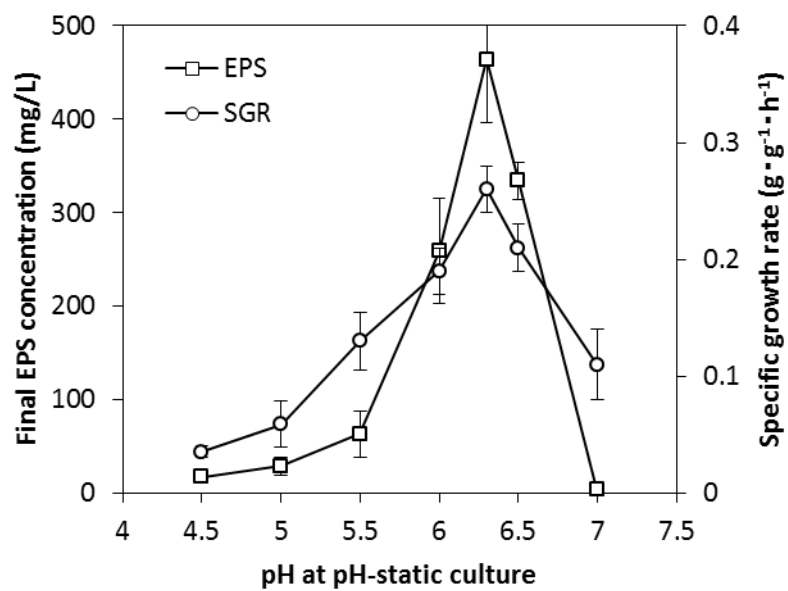


図 2.3 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 を CDM 培地で定 pH 培養した場合の pH と菌の比増殖速度および多糖類生産量との関係

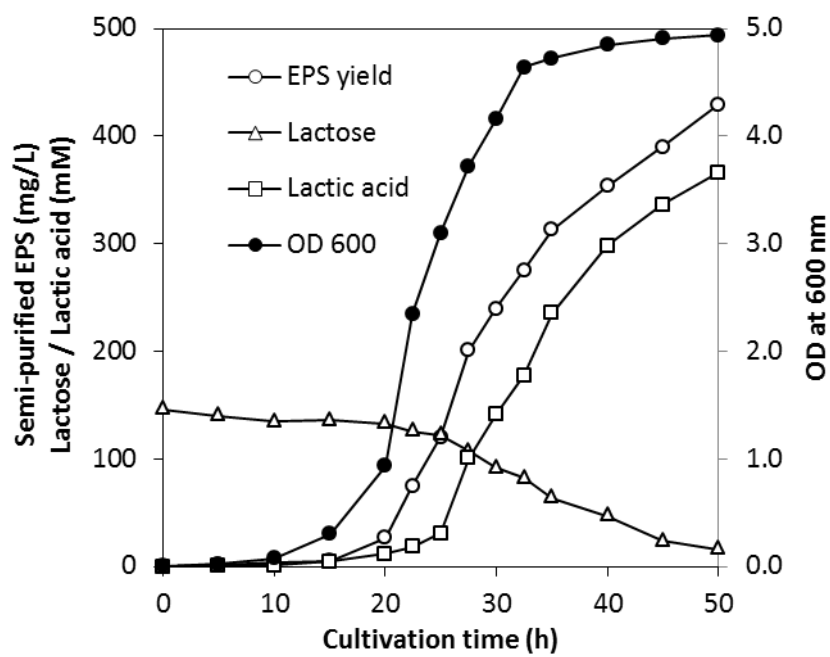


図 2.4 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 を CDM 培地で定 pH 培養 (pH = 6.3) した場合の pH と菌の比増殖速度および多糖類生産量の関係

表 2.5 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 の定 pH 培養における粗製多糖類の生産量およびその化学組成の経時変化

培地には乳糖 50 g/L を配合した化学合成培地 CDM (Otto *et al.*, 1983) を使用し、pH 6.3 で 50 時間培養する間に、多糖類生産量、多糖類画分に回収されたリン酸量、さらに、多糖類画分の糖組成の変化を経時的に測定した。

培養 時間 (h)	多糖類生産量 (mg/L)	多糖類画分 リン酸量 (mg/L)	多糖類画分の糖組成 (%)		
			グルコース	ガラクトース	ラムノース
5	1.4	ND*	53.0	47.0	ND*
10	4.2	ND*	51.8	48.2	ND*
15	5.1	ND*	50.4	45.6	4.0
20	26.6	0.9	47.6	45.8	6.6
25	120.3	7.0	43.1	45.3	11.7
30	239.5	18.4	41.8	42.0	16.2
35	312.8	31.1	40.1	38.0	21.9
40	353.3	35.1	39.8	38.2	22.0
45	389.7	40.6	40.0	37.6	22.4
50	429.3	45.5	39.7	37.2	22.9

*ND: not detected

第3章 *L. cremoris* 菌が生産するリン酸化多糖類の物理化学特性

3.1. 序論

第2章において、*L. cremoris* 菌は対数増殖期の生育曲線に対し、数時間の時差で多糖類生産が活発になることを報告し、パルス電界処理を対数増殖期中期以降に行うべきと結論した。発酵と並行して連続的にパルス電界処理を行う上では、多糖類がイオン濃度依存性や温度依存性のゲル形成能を有するか否かは、パルス電界処理の均一な効果や安定的な処理を行うために検証を要する。また、多糖類の物理化学的な性質を明らかにすることにより、パルス電界処理がもたらす影響を推定することも可能となる。そこで本章では、*L. cremoris* 菌の多糖類の水溶液を用いてレオロジー測定を行い、物理化学的特性を明らかにする。

本研究の供試菌株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 株や *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C4 株が生産する多糖類は、グルコース、ガラクトース、ラムノース、リン酸からなるリン酸化多糖類であり、その由来となっているフィンランドの viili およびコーカサス地方のカスピ海ヨーグルトなどの発酵乳に特有な曳糸性や粘性は、乳酸発酵で生成するタンパク質のネットワークの中に、*L. cremoris* 菌が生産した多糖類が緻密に取り込まれた微細構造によってもたらすものであると報告されている (Hassan *et al.*, 2003; Folkenberg *et al.*, 2006)。このような微細構造の形成が、Toba ら (1990) が報告した、SBT049 株による発酵乳でのシネレシス (ホエー分離) 抑制に寄与しているものと考えられる。また、Pachekreapol ら (2015) は、マイナスチャージを有するデキストラン硫酸は、乳中の主要タンパク質カゼインと堅いゲルを形成することを報告した。このゲルは、乳酸発酵によりカゼインの等電点 4.6 を下回る pH 環境となった場合、乳タンパク質がプラスチャージしているために、硫酸基のマイナスチャージとの静電的相互作用により、堅い物性を呈するゲルを形成したものと考察している。

Nakajima ら (1992) が解明した SBT0495 株によるリン酸化多糖類の一次構造 (図 2.1) において、リン酸基の 3 つの酸素分子の内 2 分子は多糖類の主鎖中のガラクトースおよび側鎖のガラクトースとエステル結合しているが、1 分子は水素イオンを解離してマイナスチャージを示すことが想定される。また、この多糖類の重合単位の分子量は約 890 であり、第2章の表 2.2 に示した SBT0495 株による多糖類の分子量が 3.4×10^6 Da から算出される重合数は約 3,800 であり、1 分子当たりその重合数と同数のマイナスチ

チャージを有すると考えられる。この電荷は上記のデキストラン硫酸による、カゼインとの静電的相互作用と同様の効果をもたらすはずであり、*L. cremoris* 菌を使用した発酵乳の特有の物性やそれによるシネレシス抑制効果をもたらす主因となっているものと考えられる。

L. cremoris 菌が生産するリン酸化多糖類は、当該菌を使用する発酵乳にその特徴をもたらしていると考えられるが、酸性多糖類としてのマイナスチャージは、本研究の目的であるパルス電界処理による多糖類発酵へのエンジニアリング技術においても、電気化学的な影響により中性多糖類とは異なる影響がある事も考えられる。この章では、SBT0495 株が生産するリン酸化多糖類を精製し、そのマイナスチャージによる物理化学的な性質が見られるかどうかを、レオロジー分析により検討した。特に、精製多糖類の水溶液において、食塩を含まない系と食塩を含む系でのレオロジー特性を比較することにより、マイナスチャージがもたらす静電的相互作用の有無を調べ以下に報告する。

3.2. 実験材料および方法

3.2.1. リン酸化多糖類の精製

供試菌株 SBT0495 株を、乳糖濃度を 50 g/L とした Otto ら (1983) の完全合成培地 (CDM 培地) を用い、18°C に設定した 5 L 容ジャーフェーマンターにより、pH 6.3 で定 pH 培養を行った。50 時間の培養後、4 L の培養液にトリクロロ酢酸 (TCA) を 4.0% (wt/vol) 添加し、2 時間 4°C で冷却した後、18,000 × g で 20 時間遠心 (Beckman Avanti J-25, JLA-10.500 rotor (Beckman, Fullerton, CA)) することにより菌体やタンパク質を除去した。得られた上清に、冷却したエタノールを 60% の濃度となるように加えて多糖類を沈殿させ、4°C、10,000 × g で 30 分間遠心して多糖類を回収した。この沈殿物を 500 mL の純粋に溶解し、4°C で 20 時間透析してリン酸化多糖類を精製した。途中、酵素反応法による乳糖測定キット (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) や Pierce BCA プロテインアッセイキット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) を用い、残存する乳糖やタンパク質が検出されないことを確認した。

得られた精製リン酸化多糖類溶液は凍結乾燥してから、純水または 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液を加えて 2.0% 溶液を調製し、それを希釈することにより各種の濃度 (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5%) の溶液を調製した。なお、すべての溶液は、測定に先立って、1,000 × g で 15 分間遠心して脱気処理を行なった。なお、調製したビーリアン

溶液の実濃度を表 3.1 に示した。

3.2.2. レオロジー測定

動的粘弾性測定や定常剪断測定などのレオロジー測定には、Rheometrics RFS II fluids spectrometer (Rheometrics Inc., Piscataway, US) を用い、特に記載のない限り温度は 25°C で測定した。なお、センサーシステムには、内径 34 mm のサンプルホルダーと外径 32 mm の円錐状先端形状を有する円筒型ローターを用い、約 10 g のサンプル溶液を気泡が残らないように充填したのち、測定中の水分蒸発を防ぐため、液面にパラフィンオイルを重層して測定を行った。

3.3. 結果および考察

本実験の目的は、リン酸化多糖類の水溶液が、液体状のゾルとしての性質と高分子同士が化学的架橋したゲルとしての性質の、どちらに近い性状を有するのかを明らかにすること。さらに、その特徴においてリン酸基がもたらすマイナスチャージがどのような影響をもたらすのかを分析し、パルス電界処理のような電気化学的刺激に対して特有の挙動を示すことが想定されるのか否かを明らかにすることである。そこで、濃度の異なる各種水溶液と、リン酸基によるマイナスチャージを相殺するに十分なイオン強度の 0.1 M 塩化ナトリウム溶液を用いて、動的粘弾性測定および定常剪断測定による解析を行った。

なお、液体状のゾルと規定するための要件は、1) 粘性率が弾性率よりも優勢となる低周波振動剪断において、振動周波数に対する弾性率 G' 曲線および粘性率 G'' 曲線の両対数グラフにおける傾きがそれぞれ 2 および 1 となること、2) ある一定以下の極めて低い剪断速度において、ニュートン流体としての性質を示すこと、3) 高濃度溶液による定常流粘度曲線において、剪断速度と粘度の両対数グラフにおける直線の傾きが約 -0.78 となる Graessley の理論 (Graessley, 1982) に従うこと、4) いかなる剪断条件においても動的粘度と定常流粘度が一致する Cox-Merz の定理 (Cox & Merz, 1958) に従うこと、5) 異なる温度での粘弾性曲線が重なりあい一致することの 5 点である。一方、固体状のゲルと規定するための要件は、1) 動的粘弾性測定において、幅広い振動剪断条件下で弾性率が粘性率よりも高く推移すること、2) 限りなくゼロに近い剪断速度において、粘度が無限大に高くなることの 2 点である。したがって、以下の実験結果の解

析においてはこれらの要件への適合性などをポイントとして、リン酸化多糖類の物理化学的特徴を考察する。

3.3.1. 動的粘弾性測定

この測定法では、ローターの動的振動が与える剪断力とサンプルが示す剪断応力を計測することにより、負荷したエネルギーに対して、サンプルが蓄積するエネルギー（動的弾性率 G' ）の割合と緩衝するエネルギー（動的粘性率 G'' ）の割合が算出される。1.0%水溶液を用いた歪み依存性測定の結果から、弾性率 G' と粘性率 G'' が歪み率 γ との関連において良好な直線関係を示し、信頼できるデータが得られる振動幅は、歪み率 γ で 0.5-10%であることが判明した。そこで、本実験では歪み率 1%の条件で行った。

図 3.1 に、1.0%リン酸化多糖類水溶液と 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液における、振動周波数依存性測定の結果を示した。弾性率 G' 曲線と粘性率 G'' 曲線は、振動周波数 ω の増加につれて連続的に上昇し、振動周波数 ω が低いほど両曲線の傾きが大きくなることから、高分子同士が架橋を形成しているようなゲルの性質は現れていないが、高振動周波数側で一定の粘性率 G'' に収束する傾向は、液体状ゾルとしての性質に近い。また表 3.2 に、各多糖類濃度での弾性率 G' 曲線と粘性率 G'' 曲線の交点座標を示した。これらの交点座標は、低振動周波数側での粘性率 G'' 優勢から高振動周波数側での弾性率 G' 優勢への転換ポイントであり、その時の振動周波数の逆数は、歪みに対する高分子同士の“もつれ”の持続時間を示していると考えられる。リン酸化多糖類の濃度が高いほど、交点座標の振動周波数は低くなり、もつれの持続時間が長くなることが分かる。すなわち、固体状のゲルと規定するための要件 1) 動的粘弾性測定において幅広い振動剪断条件下で弾性率が粘性率よりも高く推移するという点にも従わないことから、両溶液中に高分子同士の架橋が存在するゲルの性状ではないことを示している。

低周波振動域 (0.01-0.1 rad/s) における弾性率 G' 曲線と粘性率 G'' 曲線の傾きをまとめた表 3.3 に見られるように、いずれもゾルと規定するための要件 1) に示した傾きが弾性率 G' 曲線で 2、粘性率 G'' 曲線で 1 を満たすものではないが、0.1 M 塩化ナトリウム溶液の場合はリン酸化多糖類の濃度が低いほどそれに近似する傾向が見られる。純水溶液中での両曲線の傾きはリン酸化多糖類の濃度に対する依存性がなく、弾性率 G' 曲線の傾きは最大でも 1.17、粘性率 G'' 曲線でも 0.78 であり要件 1) には該当しない。これらの結果も、リン酸基による多価マイナスチャージに起因していると考えられる。上記のようにこのリン酸化多糖類は分子同士の架橋がなく、ゲルよりはゾルとしての性質

を示すはずであるが、純水溶液中ではリン酸基のマイナスチャージによる分子内反発や分子間反発が発生し、通常のゾルにはない挙動を示したものと考えられる。0.1 M 塩化ナトリウム溶液中では、その十分なイオン強度により静電的反発が抑制され、ゾルとしての要件 1) に近似する傾向が見られたものと考察した。

なお、表 3.2 における両曲線の交点座標を示す振動周波数 ω が、0.1 M 塩化ナトリウム溶液では濃度が高いほど低下する傾向が強く、もつれの持続時間が顕著に長くなるが、これについてはこのリン酸化多糖類中のラムノース分子による疎水性相互作用が関与している可能性も示唆される。ラムノースは 6 位の炭素の水酸基が水素分子に置き換わりメチル基として 5 位炭素に結合しており、グルコースやガラクトースよりも疎水性の性質を有するため、高濃度の溶液中でラムノース同士の距離が接近する場合には疎水性相互作用が働く可能性があるためである。

図 3.1 に示した 1.0% リン酸化多糖類水溶液の動的粘度曲線 (η^*) は、振動数 1rad/s 以上においては、両対数グラフにおいて負の傾きをもつ直線関係を示しており、振動数 1rad/s 以下においてはその傾きがゆるやかになる。その傾向は、0.1 M 塩化ナトリウム溶液よりも水溶液でより顕著ではあるが、振動周波数と無関係に一定の粘度を示すものではないことから、ニュートン流体の性質は明確ではなく、その傾向は 1.0% 以外の溶液でも同様であった。

以上の動的粘弾性の測定結果のように、リン酸化多糖類水溶液は高分子溶液としての液体状ゾルとしての要件 1) に従わない上、マイナスチャージを相殺する塩化ナトリウム溶液での挙動が異なることから単純な高分子溶液の性質ではないことが明らかである。一方、固形状ゲルの要件 1) に従わない点と、Richardson & Ross-Murphy (1987) がキサンタンを弱性ゲルとして規定する際に用いた要件にも適合せず、ゲルとして規定することはできない。Navarini ら (1992) は、*Cyanospira capsulata* が生産する多糖類は、グアーガムに代表される高分子溶液とキサントンのようなゲルとの中間的な特性を有すると結論しており、その測定結果と本実験の結果が似ていることから、このリン酸化多糖類がやはり中間的な性質を有するものと考察することが妥当であろう。Nakajima ら (1992) が明らかにしたリン酸化多糖類の一次構造 (図 2.1) において、主鎖 -Glc- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc- は比較的安定な結合からなるが、それに側鎖として結合するガラクトースリン酸とラムノースは、それぞれイオン性相互作用および疎水性相互作用をもたらすものと考えられ、それらの相互作用が主鎖の構造をよりフレキシブルにするために中間的な性質を示したものと思われる。

3.3.2. 定常剪断測定

各種濃度のリン酸化多糖類水溶液を用いた定常流粘度測定の結果を、図 3.2 に示した。0.05-0.5%水溶液での 0.1γ 以下の剪断速度においては、剪断速度に関わらず粘度が一定となるニュートニアンプラトーを呈する傾向を示したが、0.1 M 塩化ナトリウム溶液の測定においては、測定範囲内の剪断速度では明確な傾向が見られていない。また、0.1%以下の 0.1 M 塩化ナトリウム溶液以外は、いずれの溶液でも剪断速度が高いほど見掛けの粘度 (η) が低下する擬塑性流動の性質が見られ、非ニュートン流体であることを示した。これらの結果から、先に示した液体状ゾルとしての要件 2) に適合すると同時に、固体状ゲルの要件 2) には適合しないことが分かった。なお、同図 3.2 での 1.0% 水溶液の流動曲線の傾きは-0.76 であり、Morris (1990) がランダムコイル状多糖類で報告した傾きと同じ値となった。同様に、同じ濃度でのグァーガムの傾き-0.79 (Robinson et al., 1982)、キサントンの傾き-0.80 (Milas et al., 1990)、さらに *Cyanospira capsulata* が生産する多糖類の傾き-0.70 (Navarini et al., 1992) とも近似する結果であり、単分散高分子溶液に関する Graessley 理論から導かれる傾き-0.78 と符合することから、液体状ゾルの要件 3) に従うことが分かる。

また、1.0%水溶液および 0.1 M 塩化ナトリウム溶液での、振動周波数依存性測定における動的粘度 (η^*) と、定常流粘度測定における見掛け粘度 (η) を同時にプロットした図 3.3 の Cox-Merz プロットから、低い剪断速度の領域では若干のずれがみられるものの、両曲線の同一性は非常に高く、液体状ゾルの要件 4) である Cox-Merz の定理に従うことも明らかになった。このことは、定常流粘度測定で負荷される剪断により塑性変形を受けたリン酸化多糖類分子が示す応力と、振動周波数依存性測定による応力に大きな差がなく、分子間や分子内の相互作用がないことを意味している。これには、リン酸基による多価マイナスチャージにより分子間や分子内に静電的反発力があるためと考察することができる。

Morris (1990) は、さまざまな種類の多糖類を対象として、その水溶液濃度とゼロ剪断粘度との関係を検討した。ゼロ剪断粘度とは、機器では測定不可能な限りなくゼロに近い剪断速度における粘度を、粘度曲線を外挿することにより求められる値である。多くの多糖類で得られた溶液の濃度とそのゼロ剪断粘度との関係から、すべての多糖類に適合できるとする 1 つの理論を提示している。それは、両者の関係から得られる曲線が不連続点を示し、その点を与える多糖類の濃度を限界濃度(C^*)と規定し、溶解した多

糖類分子のランダムコイル同士が重なりあうか、もしくは、分子間相互作用を生じるに十分な距離にまで分子同士が接近しはじめる濃度であるとしている。限界濃度前後の状態を“希薄状態”および“もつれ状態”と称するこの理論は、Ross-Murphy (1994)によっても支持されている。なお、この実験に用いられた多糖類（デキストラン、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、ヒアルロン酸）の限界濃度は、いずれも 2.5-4 g/L の範囲にあることを示した。

一方で、Graessley (1982) は多糖類の理論的な限界濃度は 0.7-1.5 g/L であると報告し、さらに、Milas ら (1990) が報告したキサンタンの限界濃度および、Navarini ら (1992) が報告した cyanobacteria が生産する多糖類の限界濃度はいずれも約 1.0 g/L であり、Morris による上記の限界濃度 2.5-4 g/L よりも大きく下回るものである。この濃度の違いは、多糖類のランダムコイル同士の物理的干渉以外に、化学的相互作用が関与しているものと思われ、キサンタンの構造に含まれるアセチル基やピルビン酸基による相互作用が強い場合は、より低い濃度で限界濃度となったと考えられる。化学的相互作用が分子同士の干渉をもたらすような状態については、干渉が起きない“希薄状態”と干渉が起きている“もつれ状態”の中間的な状態であり、“半もつれ状態”と称され、それぞれの状態の濃度領域における直線の傾きにより判別可能である。希薄状態の傾きは通常 1.1-1.4、半もつれ状態では 1.9-2.1、もつれ状態では 3.0-4.5 となる。

図 3.2 の粘度曲線を外挿して求めた、リン酸化多糖類の各溶液濃度におけるゼロ剪断粘度を表 3.4 にまとめ、濃度との関係について図 3.4 にグラフ化した。図 3.4 から読み取れるリン酸化多糖類溶液の限界濃度は、水溶液で 0.3 g/L、0.1 M 塩化ナトリウム溶液中では 0.1 g/L となり、Graessley による理論的限界濃度 0.7-1.5 g/L よりもいずれも低くなった。0.1 M 塩化ナトリウム溶液では水溶液よりも限界濃度が低く、リン酸基によるマイナスチャージがもたらす分子内・分子間の静電的反発力が作用することに起因すると考えられる。ただし、このリン酸化多糖類における相互作用は、キサンタンにおいてアセチル基やピルビン酸基がもたらす相互作用よりも小さいものであると考察された。

3.3.3. 温度の影響

高分子溶液として規定するためのもう一つの規準は、異なる温度での粘弾性曲線が重なりあい一致することである。1.0%リン酸化多糖類溶液を用い、5°C、25°C、70°Cにおける動的粘弾性測定を行い、得られた図 3.5A の粘弾性曲線を図 3.5B で重ね合わせた。

図から明らかなように、弾性率曲線 G' は良好に重複し 1 本のマスターカーブを形成しており、粘性率曲線 G'' は高周波数側で若干のずれが見られ完全な重複を示していない。このことから、液体状ゾルとしての要件 5) については一定のレベルで充足するものの完全には満たしていない。なお、図 3.5A において 5°C、25°C、70°C の粘弾性曲線の交点を与える振動数は、温度が高いほど高周波側にシフトしたことから、多糖類組織の時間的な安定性は低下したことが分かる。

一方、定常剪断測定による見かけの粘度と温度 (5-70°C) との関係を示した曲線 (図 3.6) は、温度依存性の不連続な変化がなく連続的な曲線を示しており、5-70°C の温度範囲におけるリン酸化多糖類溶液は、温度依存性のゲル形成をしないことが分かった。

3.4. 総合考察

供試菌株 SBT0495 株が生産するリン酸化多糖類を精製し、その水溶液および 0.1 M 塩化ナトリウム溶液を用いて、動的粘弾性測定や定常剪断測定を行うことにより、多糖類が示す物理化学的性質を解析した。特に、当該多糖類がゲルを形成する性質を有するかどうか、温度依存性の変化を起こすのかどうか、さらに、その構造に含まれるリン酸基がもたらすマイナスチャージがどのような相互作用を示すのかなどの点は、供試菌株の発酵中にパルス電界処理を行なった場合に、どのような作用を及ぼすのかを考えるうえで重要な知見となる。

結果の冒頭で述べたように、動的粘弾性測定や定常剪断測定においては、液体状ゾルまたは固体状ゲルと規定するための要件を列挙し、それぞれの結果から要件への充足度を判断した。液体状ゾルの 5 つの要件に対し、2) 低い剪断速度でのニュートン流体としての性質、3) 定常流粘度曲線の傾きが約-0.78 となる Graessley の理論、4) 動的粘度と定常流粘度が一致する Cox-Merz の定理の 3 点は満たしており、1) 低周波振動剪断において弾性率曲線および粘性率曲線の傾きが 2 および 1 となる点と、5) 異なる温度での粘弾性曲線が重複して 1 つのマスターカーブを示す点について不完全ながら適合した。一方、固体状ゲルの 2 つの要件である 1) 動的粘弾性測定では弾性率が粘性率より優勢となる点と、2) 限りなくゼロに近い剪断速度で粘度が無限大となる点については、いずれも従わないことから、リン酸化多糖類はゲルではなくゾルであると判断された。また、5-70°C の範囲での定常流粘度測定においても、温度依存性の構造変化によると考えられるような状態変化がなくゾルの状態を維持していた。

リン酸化多糖類がゲルを形成しないことから、培養液に対してパルス電界処理を行なう際に、局所的な多糖類ゲルによる不連続な電界を想定する必要はなく、電極間に存在する菌体は培養液を通じた連続的な電界となることが想定できる。また、パルス電界がもたらす局所的な発熱によっても、多糖類の状態変化を想定せずに一定の電界処理が可能となる。

また、この多糖類の構造に起因する 2 つの相互作用が、測定結果から示唆された。1 つはリン酸基によるマイナスチャージがもたらす静電的な反発力であり、分子内だけではなく濃度が高い場合には分子間にも反発力が働き、ランダムコイルとしての分子鎖同士の干渉に影響を及ぼしている。もう 1 つはラムノースの 6 位炭素のメチル基に起因する疎水性の相互作用である。この現象は、0.1 M 塩化ナトリウム溶液中でリン酸基のマイナスチャージが相殺された環境において見られた、分子同士のもつれ時間が長くなることから推定された微弱な相互作用であるが、一般的に疎水性相互作用は温度に比例して高くなることから、パルス電界処理による局所的な発熱がラムノースの疎水性相互作用を高めることも考えられる。リン酸基の電荷は重合単位当たり 1 つずつ存在しており、序論で述べたように多糖類 1 分子当たり約 3,800 のマイナスチャージを有する多価電解質である。供試菌株の培養には、様々なミネラルを配合した培地を用いるためイオン強度が高く、0.1 M 塩化ナトリウム溶液と同様にマイナスチャージは相殺されると考えられるが、パルス電界処理を印加した場合には陽極に牽引される力が働くものと考えられる。供試菌株が、多くのマイナスチャージを帯びたランダムコイル状多糖類を活発に生産している最中に、パルス電界処理を行なうことは菌体の代謝に対する影響のみならず、発酵環境に新たな電気化学的モーメントをもたらすことになるため、中性多糖類を生産する乳酸菌にはない作用も想定される。パルス処理による新たな発酵のエンジニアリング技術を検討する上で、*L. cremoris* 菌が生産するリン酸化多糖類は研究材料としても興味深い。

3.5. 結論

供試菌株 SBT0495 株が生産するリン酸化多糖類の溶液を用いたレオロジー測定から、その溶液はゲルではなく通常のコロイド溶液として挙動するゾルであると判断された。また、5-70°C の範囲における温度依存性の状態変化は見られず、ゾルの状態を維持していた。このことから、培養液に対してパルス電界処理を行なう際に、培養液を通じ

た連続的な電界として安定で均一な電界を印加できることが確認された。また、パルス電界によるジュール熱により局所的な発熱があったとしても、多糖類の状態変化がなく一定の電界処理が可能であることが示唆された。

さらに、この多糖類の構造に起因する2つの相互作用として、リン酸基によるマイナスチャージがもたらす静電的な分子内および分子間の反発力と、ラムノースの6位炭素のメチル基に起因する疎水性の相互作用が示唆された。特にリン酸基によるマイナスチャージは、多糖類1分子当たりの重合数約3,800と同じ数となるため、パルス電界処理を印加した場合には陽極に牽引される力が働くものと考察された。一方、ラムノースによる疎水性相互作用については、パルス電界処理による局所的な発熱が、その相互作用を高める可能性も示唆された。

表 3.1 レオロジー測定のためのリン酸化多糖類水溶液の濃度

乳糖 50 g/L を配合した化学合成培地 CDM (Otto *et al.*, 1983) を使用し、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 を pH 6.3 で定 pH 培養した。50 時間の培養の後、培養液 4 L からリン酸化多糖類を精製し、凍結乾燥してから以下の濃度の水溶液を調製した。調整した水溶液の全糖質含量とリン酸含量を測定し、両者を合算することにより多糖類の実濃度を測定した。

Sample (%)	Polysaccharide concentration (% (wt/vol))	
	Water solution	0.1 M NaCl solution
2	-	1.998
1.5	1.501	1.499
1	0.992	0.999
0.75	0.750	0.749
0.5	0.499	0.500
0.4	0.402	0.403
0.3	0.297	-
0.25	0.249	0.249
0.2	0.201	0.198
0.1	0.101	0.099
0.05	0.050	0.049

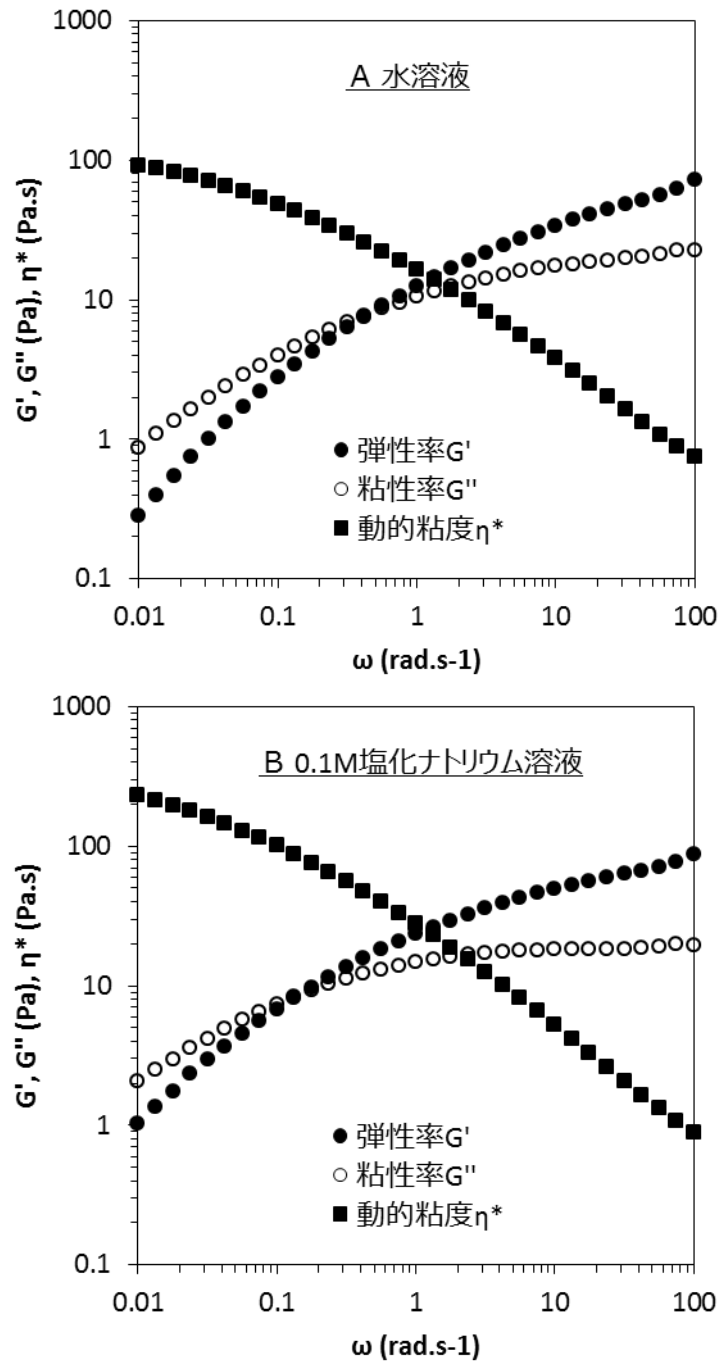


図 3.1 リン酸化多糖類 1.0%濃度での水溶液 (A) と 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液 (B) における振動周波数依存性測定

表 3.2 リン酸化多糖類溶液の動的粘弾性測定における溶液濃度と弾性率 G' 曲線と粘性率 G'' 曲線の交点座標との関係

各リン酸化多糖類溶液において振動周波数依存性測定を行い、弾性率 G' 曲線と粘性率 G'' 曲線の交点における振動周波数 ω と応力 (Pa) を示した。

Sample (%)	Water solution		0.1M NaCl solution	
	$G' = G''$ (Pa)	ω (rad/s)	$G' = G''$ (Pa)	ω (rad/s)
2	-	-	32.0	0.016
1.5	19.9	0.3	17.6	0.042
1	7.02	0.4	8.7	0.14
0.75	4.1	0.91	4.3	0.18
0.5	2.16	3.09	2.01	0.98
0.25	1.06	12.8	0.81	7.1
0.1	0.46	17.8	0.13	22.5
0.05	0.21	21.7	-	-

表 3.3 各濃度のリン酸化多糖類溶液での振動周波数依存性測定における低周波振動域での弾性率 G' 曲線と粘性率 G'' 曲線の傾き

Sample (%)	Water solution		0.1M NaCl solution	
	Limiting slope G'	Limiting slope G''	Limiting slope G'	Limiting slope G''
2	0.91	0.60	0.73	0.48
1.5	0.97	0.62	0.66	0.45
1	1.17	0.73	0.96	0.75
0.75	1.15	0.75	1.04	0.67
0.5	1.13	0.71	1.08	0.81
0.25	0.97	0.78	0.97	0.80
0.1	0.91	0.67	1.64	0.93
0.05	0.86	0.63	1.73	-

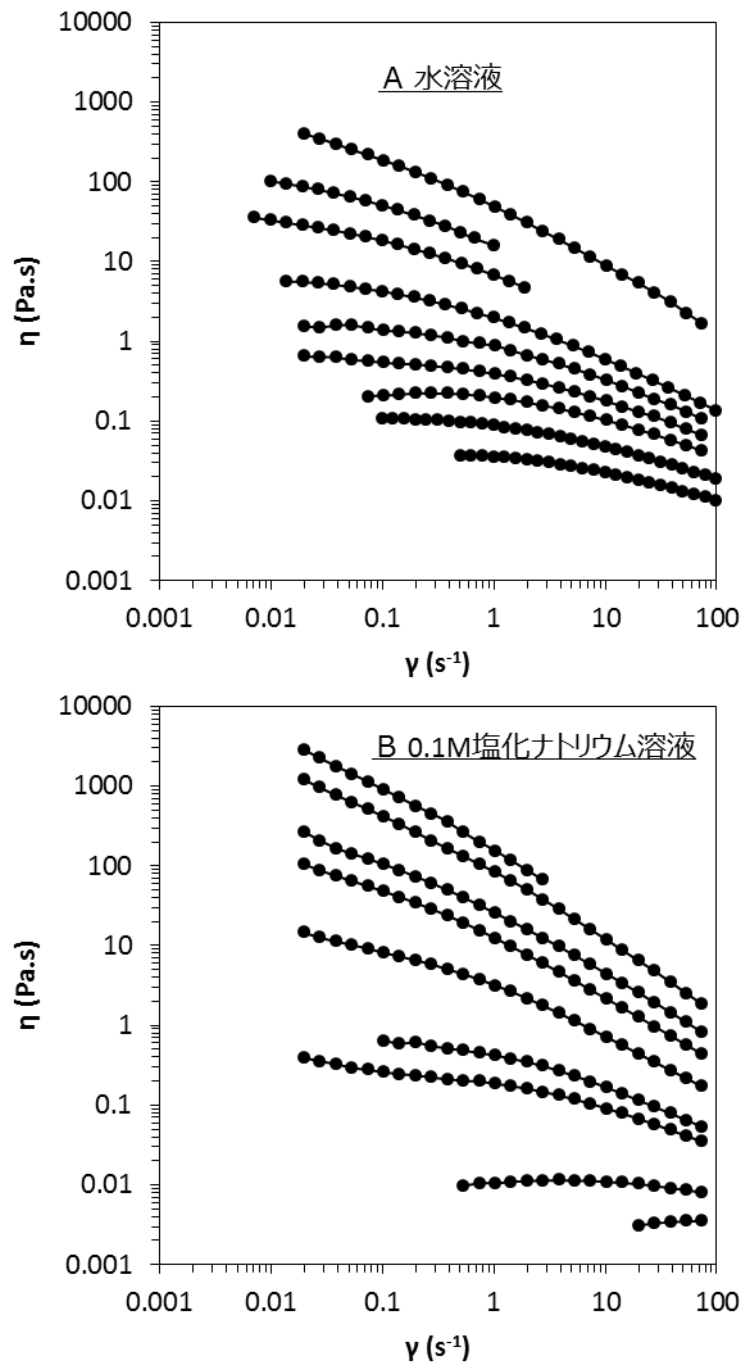


図 3.2 リン酸化多糖類 1.0%濃度での水溶液 (A) と 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液 (B) における振動周波数依存性測定

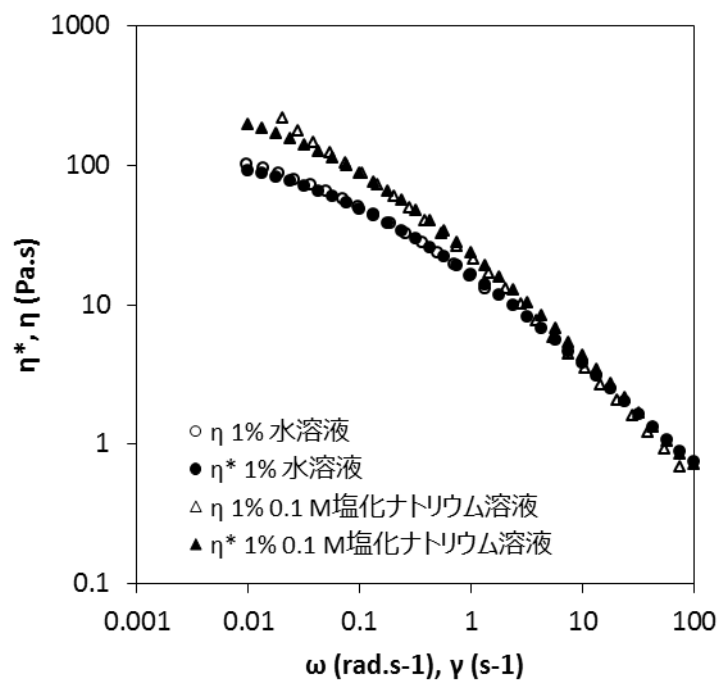


図 3.3 リン酸化多糖類 1%溶液での振動周波数に対する動的粘度と剪断速度に対する見掛け粘度 (Cox-Merz 図)

表 3.4 各濃度のリン酸化多糖類溶液の見掛けの粘度測定におけるゼロ剪断粘度とゼロ剪断粘度の 2 分の 1 を与える剪断速度および Morris 方程式の相関係数

Sample (%)	Water solution			0.1M NaCl solution		
	η_0 (Pa.s)	$\dot{\gamma}_{1/2}$ (s ⁻¹)	r ²	η_0 (Pa.s)	$\dot{\gamma}_{1/2}$ (s ⁻¹)	r ²
2	-	-	-	12,800	0.00354	0.999
1.5	673	0.0300	0.998	4,890	0.00439	0.999
1	122	0.0658	0.997	439	0.0240	0.990
0.75	37.7	0.101	0.990	172	0.0300	0.997
0.5	5.97	0.371	0.997	16.5	0.121	0.991
0.4	1.61	1.31	0.994	6.27	0.270	0.915
0.3	0.607	1.59	0.953	-	-	-
0.25	-	-	-	0.677	2.14	0.996
0.2	0.230	8.17	0.986	0.303	0.85	0.816
0.1	0.109	6.82	0.992	0.0111	246	0.674
0.05	0.039	16.4	0.991	0.0035	1,000	0.415

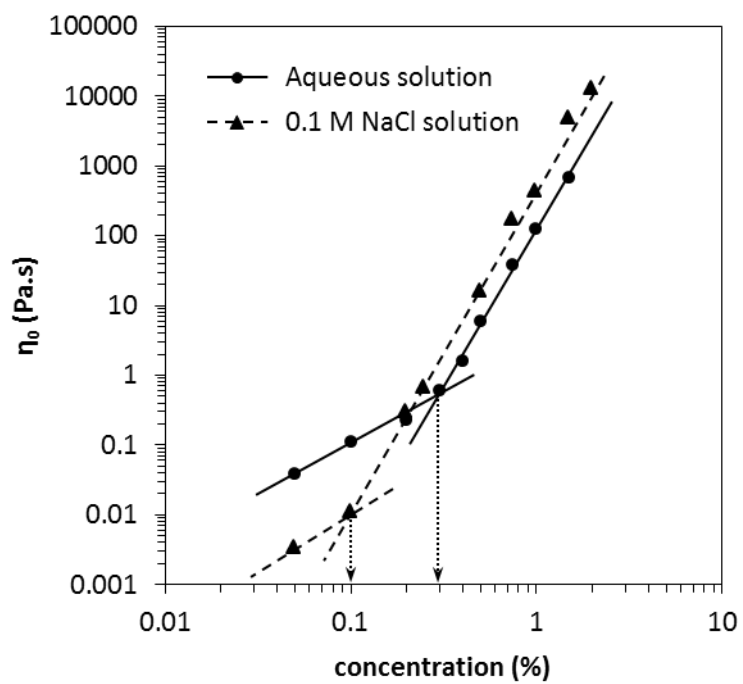


図 3.4 リン酸化多糖類水溶液および 0.1 M 塩化ナトリウム溶液の各濃度におけるゼロ剪断粘度

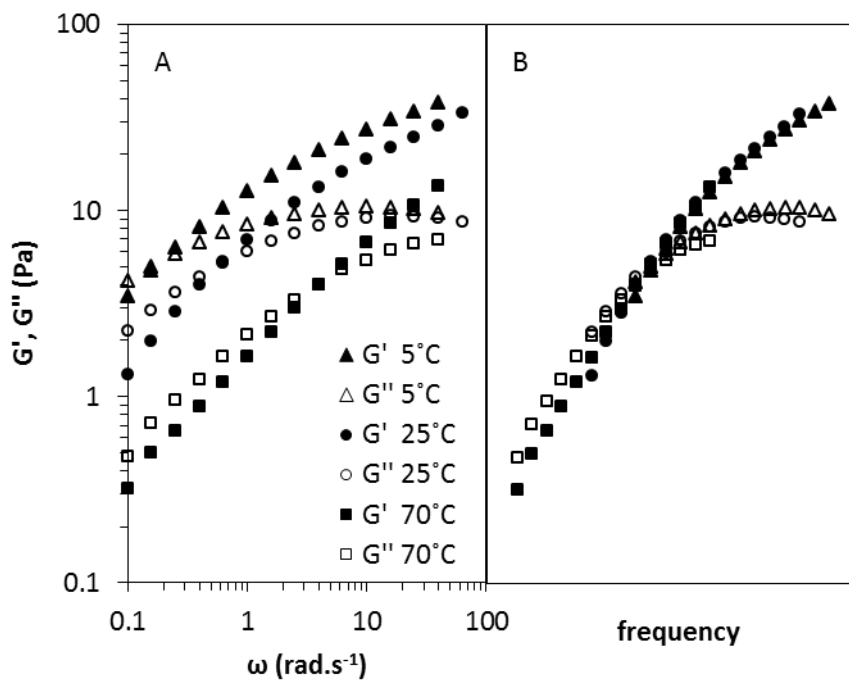


図 3.5 1.0%リン酸化多糖類水溶液における異なる測定温度 (5, 25, 70°C) での振動周波数依存性測定

A 図において、 G' は弾性率と G'' は粘性率を示し、B 図は 3 温度での G' の弾性率と G'' 粘性率を、それぞれが重なるように水平にシフトさせてマスターカーブを示した。

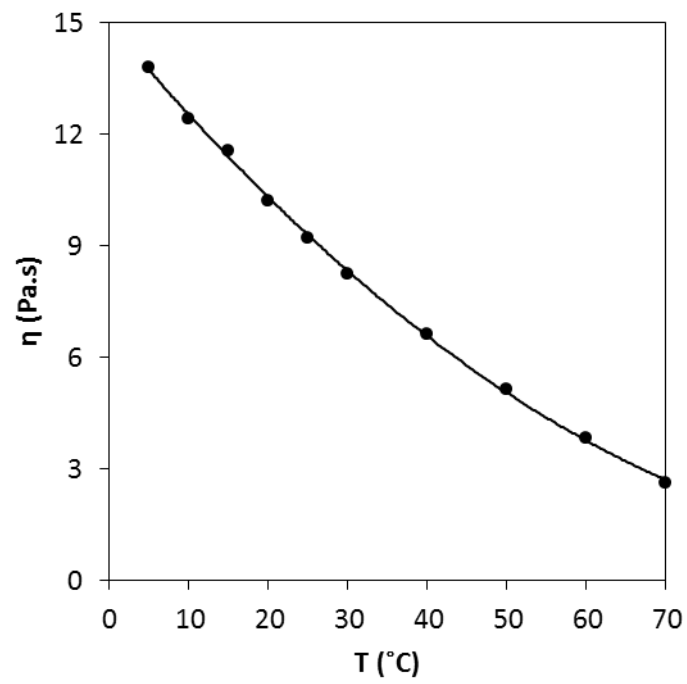


図 3.6 1.0%リン酸化多糖類水溶液での剪断速度 1 s^{-1} での定常剪断粘度と測定定温度との関係

第4章 *L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類の生合成

4.1. 序論

第2章および第3章に述べたように、*Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT0495 株（以下 SBT0495 株）はグルコースおよびガラクトース 2 分子ずつと、ラムノースおよびリン酸 1 分子ずつから構成される酸性多糖類（図 2.1）を生産し、そのリン酸基が有するマイナスチャージにより高分子電解質としての性質を有することが分かった。本研究の目的である、乳酸菌の多糖類生産におけるパルス電界処理によるエンジニアリング技術を検討する上で、供試菌株である SBT0495 株がリン酸化多糖類をどのように生合成するのかを解明することにより、発酵中の菌体が多糖類を生産している最中にパルス電界処理を行なうことにより、どのような影響をもたらすのか、またどのようなパルス条件が多糖類生産に有効な効果をもたらすのかを考察することが可能になると考える。

菌体外に産出される多糖類をはじめ、細胞表層におけるリポ多糖、テイコ酸やペプチドグリカンなどの複合糖質の生合成は、同じメカニズムで合成されると考えられている。糖ヌクレオチドが複合糖質の構成糖の供与体として働き、乳酸菌のような原核生物ではウンデカプレノール、真核生物ではドリコールという脂質がリン酸とエステル結合した形態で、細胞質膜内表面に固定されて糖受容体として働き、必要な構成糖が糖ヌクレオチドから 1 つ 1 つ伝達されて 1 つの重合単位を形成するとされている。第 1 章の 1.5. に示した *Xanthomonas campestris* によるキサントンの生合成 (Ielpi *et al.*, 1993) の例のように、SBT0495 株によるリン酸化多糖類も同様のメカニズムで生合成が行なわれると考えられる。この章では、SBT0495 株の菌体から抽出した糖ヌクレオチドや糖受容体となる脂質、さらにその受容体上で合成される中間体を分析することにより、SBT0495 株での多糖類生合成プロセスを検証した。

菌体は誘電層としての細胞質膜が導電性の細胞質を覆った構造であり、パルス電界が印加されると菌体表層の細胞質膜表面に電解質が電気濃縮し、一方、細胞質膜を隔てた内面でもカウンターイオンの電気濃縮が発生 (Hülshager *et al.*, 1983) する。菌体の内外に発生する電気濃縮は、物理化学的な影響だけではなく菌の代謝反応への影響が想定され、多糖類発酵のような物質生産の代謝に作用することも考えられる。多糖類発酵への有益な効果が確認できれば、パルス電界処理のエンジニアリングとしての潜在性が期

待できるため、この章では生合成プロセスを明らかにすることにより、多糖類生合成のメカニズムに対するパルス電界がもたらす影響を考察し、エンジニアリング技術としての潜在性について検討する。

4.2. 実験材料および方法

4.2.1. 供試菌株と培養条件

供試菌株 SBT0495 株の培養には乳糖 5 % を含む Chemically Defined Medium (CDM) 培地 (Otto *et al.*, 1983) を用い、培養温度を 18°C とした 5 L 容積のジャーファーメンターにて、水酸化カリウム溶液の自動滴定により pH 6.3 に維持しながら定 pH 培養を行なった。菌の生育は 650 nm における濁度で測定し、対数増殖期後期に至った培養液を 50,000 × g で 60 分間、4°C で遠心分離して菌体を回収した。回収した菌体は、適量の 50 mM リン酸カリウムバッファー pH 7.0 にて懸濁して再度同条件で遠心分離する操作を 2 度繰り返し、最後に同じリン酸カリウムバッファーで懸濁したものを凍結乾燥した。

4.2.2. 抽出物の調製

凍結乾燥した菌体からは、2 種類の抽出物を調製した。一方はトリクロロ酢酸 (TCA) 抽出物であり、Hartmann & König の方法 (1991) に従い次のように調製した。凍結乾燥菌体 5.0 g を 10 % TCA 溶液 50 mL に懸濁し、0-4 °C で 1 時間放置してから 10,000 × g で 10 分間遠心分離した。沈殿した残渣を再び 50 mL の 10 % TCA 溶液で懸濁し、同様に放置後に遠心分離する操作を行い、2 回分の上澄みを混合してから同時容量のジエチルエーテルと十分に混合し、静置により分離するジエチルエーテル層に TCA を回収した。この操作をさらに 2 回繰り返して十分に TCA を除去した後、水層を回収して水酸化ナトリウムで中和し、最後にロータリーエバポレーターで乾固するまで濃縮した。

もう一方の抽出物は、クロロホルム、メタノールと水を体積比 1:2:0.3 で混合した溶媒 (1203 溶媒) による脂質抽出物 (1203 抽出物) であり、Ielpi らの方法 (1981) に従い次のように調製した。凍結乾燥菌体 5.0 g を 50 mL の 1203 溶媒に懸濁し、超音波処理装置 Vibra cell (Sonics & Materials Inc., Danbury, CT) を用いて、20 ワットの出力により 30 分間処理した。この処理は氷水に浸しながら行い、超音波で上昇する温度を 4°C 以下に抑え、その後 4°C 以下で、3,000 × g で 10 分間遠心分離して上澄みの 1203 溶媒層

を回収した。得られた菌体残渣に対して、上記一連の抽出操作を再び同様に行ない、2 回分の 1203 溶媒層を混合してロータリーエバポレーターで乾固するまで濃縮した。

4.2.3. 抽出物の酸加水分解

2 種類の抽出物中には、糖ヌクレオチド前駆体 (TCA 抽出物) やウンデカプレノール結合型中間体 (1203 抽出物) が含まれており、いずれも以下に述べる弱加水分解処理により、それらの化合物におけるリン酸ジエステル結合を分解し、糖鎖部分を解離させた。弱加水分解は、10 mM 塩酸を用いて 100°C で 10 分間加熱することにより行い、その後水酸化ナトリウムで中和した。

1203 抽出物の場合は、中和後の反応液にクロロホルムを十分に混合し、静置後に 2 層分配させることにより、糖鎖のような親水性の分解物を水層に回収した。一方、ウンデカプレノールのような脂質はクロロホルム層に回収されることになる。水層およびクロロホルム層は、いずれもロータリーエバポレーターを用いて乾固するまで濃縮した。なお、中間体由来の糖鎖を含有する水層画分については、その糖鎖中の糖組成分析を行うため、さらに酸加水分解を行った。これには 2 M トリフルオロ酢酸 (TFA) を用い、100°C で 6 時間処理して糖鎖を単糖まで分解させ、その後分解物をロータリーエバポレーターや凍結乾燥機により真空化で蒸発乾固させ、同時に TFA も蒸散させて除去した。

4.2.4. 薄層クロマトグラフィー

TCA 抽出物に回収された糖ヌクレオチドや、1203 抽出物の弱加水分解でクロロホルム層に回収された脂質の定性分析は、薄層クロマトグラフィーで行った。HPTLC silica gel 60 F254 アルミニウムプレート 20×20 cm (Merck, Darmstadt, Germany) を使用し、糖ヌクレオチドの分離には、イソ酪酸、25 % アンモニア溶液、水を容積比 66 : 2 : 33 で混合した溶媒 A を用いた。脂質の分離には、15 % 酢酸エチル n-ヘプタン溶液である溶媒 B を使用した。分離後の糖ヌクレオチドのスポットは、254 nm の UV ライトを照らして検出し、脂質のスポットは、2-naphthol を噴霧してから 50 % 硫酸を噴霧し、さらに 120°C で 5 分間加熱して発色させた。

4.2.5. 質量分析

1203 抽出物の弱酸加水分解で分離した脂質化合物を、HPTLC silica gel 60 F254 アルミニウムプレート上で 15 % 酢酸エチル n-ヘプタン溶液で展開し、ポリイソプレノー

ル系化合物を含む画分をシリカ樹脂から回収して質量分析に供した。質量分析は四極子質量分析計 Finnigan 3300 (Finnigan-MAT, San Jose, CA) で行い、イオン源温度を 250°C としながらアンモニアを 10 eV で反応ガスとして使用し、化学イオン化による質量スペクトルを分析した。

4.2.6. 液体クロマトグラフィー

両抽出物の水溶性画分は、Sephadex G-25 (26 × 1,000 mm) (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供し、20 mM トリエチルアミン炭酸バッファー pH 8.0 を 2 mL/min の流速、または 50 mM 酢酸アンモニウムバッファー pH 6.7 を 1 mL/min の流速で分離した。糖ヌクレオチドは、逆相カラム Prodigy 5 ODS-2 (4.6 × 250 mm) (Phenomenex, Torrance, CA) を用いたイオンペアクロマトグラフィーに供し、40 mM トリエチルアミンリン酸バッファー pH 6.5 を 1 mL/min の流速でイソクラティック溶出させた。

両抽出物の弱酸加水分解で得られた糖鎖部分の分析は、パルスドアンペロメトリー検出を組み合わせた高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD) で行った。陰イオン交換カラム CarboPac PA-1 (4.6 × 250 mm) (Dionex Corp., Sunnyvale, CA) を使用し、電気化学検出器 Model 400 (EG&G Princeton Applied Research, Princeton, NJ) におけるパルスドアンペロメトリーモードで (E1: 50 mV, t1: 480 ms; E2: 600 mV, t2: 200 ms; E3: -600 mV; t3 50 ms) 糖質を検出した。またカラムでの分離プログラムとして、再生、平衡、分離の 3 ステップからなる一連のグラジエントプログラムを適用した。いずれも 30°C に維持したカラムに溶離液を流速 1 mL/min で流し、再生ステップでは 1.0 M 酢酸ナトリウム 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を 5 分間流してから 200 mM 水酸化ナトリウムを 5 分間流し、次の平衡ステップでは 16 mM 水酸化ナトリウムを 10 分間流してからサンプルを注入した。分離ステップでは、始めに 16 mM 水酸化ナトリウムを 15 分間流し、その後 20 分間で水酸化ナトリウム濃度を 16 mM から 100 mM まで高め、さらに水酸化ナトリウムを 100 mM に維持しながら続く 15 分間で酢酸ナトリウムを 0 M から 0.2 M に、続いて 0.5 M および 1.0 M までそれぞれ 10 分間で高めることにより全て溶出させた。

4.2.7. 糖質の化学修飾

4.2.4. の液体クロマトグラフィーで分離された糖質をさらに分析するため、部分メ

チル化アルジトール酢酸 (PMAA) 誘導法 (Waeghe *et al.*, 1983) に従って一部を変更しながら化学修飾した。始めに、糖質の遊離水酸基をメチルスルフィニルメチルナトリウムの存在下でヨウ化メチルによりメチル化する。メチル化された糖質は、Sep-Pak C18 ライトカートリッジ (Waters, Milford, MA) を用いた固相抽出法により回収した。まず、カートリッジをエタノールおよびアセトニトリルで予備洗浄した後、純水で置換してから上記のメチル化反応物を注入した。カートリッジ内で吸着しないメチル化糖質以外の物質は、50%ジメチルスルホキシドと15%アセトニトリルで洗い流し、100%アセトニトリルで吸着したメチル化糖質を回収した。回収したメチル化糖質は、そのグリコシド結合を分解するために、トリフルオロ酢酸により加水分解し、分解されたメチル化単糖をアルジトール体に還元するために水素化ホウ素ナトリウムと反応させた。最後に部分メチル化アルジトールの水酸基を、無水酢酸によりアセチル化することにより PMAA 誘導体とし、ジクロロメタンで抽出してガスクロマトグラフィーに供した。

4.2.8. ガスクロマトグラフィー

PMAA 誘導体の分析のためのガスクロマトグラフィーは、キャピラリーカラム BPX70 25 m (SGE, Austin, TX) と水素炎イオン化検出器を接続したガスクロマトグラフ AutoSystem GC (Perkin Elmer, Norwalk, CT) で行い、サンプル注入から1分間はカラム温度を190°Cで保ち、その後260°Cまで3°C/minの昇温プログラムで分析した。なお、サンプル注入器と検出器の温度は、それぞれ250°Cと270°Cに設定した。分離されたピークは、内部標準として検体に添加したミオイノシトールから誘導された、ヘキサアセチルイノシトール (Lau & Bacic, 1993) の溶出時間との相対溶出時間で同定した。

4.2.9. 化学分析

糖質とリン酸の定量は、それぞれフェノール硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956) と Bartlett 法 (Bartlett, 1959) で行った。

4.3. 結果

4.3.1. TCA 抽出物中の糖ヌクレオチド

TCA 抽出物を Sephadex G-25 (26 × 1,000 mm) によるゲル濾過で分離したところ、254 nm での吸光度のモニターにより6つのピークが検出され、それぞれを薄層クロマ

トグラフィーで展開して UDP-グルコースおよび UDP-ガラクトース標品の R_f 値と比較した。表 4.1 に示したように、ピーク B は UDP-グルコースおよび UDP-ガラクトースと同様の R_f 値を示したことから、含まれる糖ヌクレオチドを分離するため、さらに逆相カラム Prodigy 5 ODS-2 でのイオンペアクロマトグラフィーで分析した。ピーク B のクロマトグラム (図 4.1) からいくつかのピークが検出され、各ピークを回収して弱酸加水分解により糖ヌクレオチドから遊離する単糖を分析した結果、溶出時間 11 分および 12 分に連続する 2 ピークと 43 分に溶出するピークは、それぞれ UDP-ガラクトース、UDP-グルコース、dTDP-ラムノースであることが推定された。なお、それぞれの糖ヌクレオチドの濃度は、1 g の乾燥菌体あたり 0.85、0.76、2.31 $\mu\text{mol/g}$ -乾燥菌体であった。

4.3.2. 1203 抽出物の弱酸加水分解で遊離した脂質の同定

多糖類や複合糖質の生合成における脂質結合型中間体は、アルカリには強いものの酸には弱く (Lennarz & Scher, 1972)、比較的濃度の低い 10 mM 塩酸中であっても、100°C で 10 分間加熱することにより、脂質と糖鎖を繋ぐリン酸ジエステル結合が加水分解されて脂質と糖鎖部分に分解される。1203 抽出物を弱酸加水分解した後にクロロホルムで抽出される脂質を、4.2.4.に記載した溶媒 B を用いて薄層クロマトグラフィーで分離し、その結果を表 4.2 にまとめた。

複合糖質の生合成中間体のキャリアーであるウンデカプレノールやドリコール C₅₅ 以外に、ドデカプレニルリン酸とドリコール C₈₀₋₁₀₅ を標品として展開した結果、ドデカプレニルリン酸は移動せずに R_f 値が 0、ドリコール C₅₅ は 0.25、ウンデカプレノールは 0.27、ドリコール C₈₀₋₁₀₅ は 0.29 となり、いずれも紫色に呈色した。検体からも R_f 値が 0.26 で紫色に呈色するスポットが分離されたことから、同じ薄層クロマトグラフィーにより当該画分を一定量分離し、剥離したシリカ樹脂からメタノールで抽出する方法で当該脂質を精製して質量分析に供した。精製した脂質の質量分析の結果 (図 4.2) から当該脂質の分子量が 766 と推定され、分子量 768 のドリコール C₅₅ ではなく、細菌における複合脂質の生合成に一般的なウンデカプレノールであることが判明した。

4.3.3. 1203 抽出物の弱酸加水分解で遊離した糖質の分析

1203 抽出物を弱酸加水分解してから水酸化ナトリウムで中和し、クロロホルムとの二層分配で水層に回収される遊離糖鎖を、まず Sephadex G-25 を用いたゲル濾過により、単糖類や二糖類を含むピーク P-1 とオリゴ糖を含むピーク P-2 に分取した。両ピーク

ク画分を、パルスドアンペロメトリー検出器と組み合わせた高速陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、P-1 と P-2 のクロマトグラムをそれぞれ図 4.3 の a と b に示した。

ピーク P-1 のクロマトグラム (図 4.3a) ではいくつかのピークが分離され、標品の溶出時間からグリセロール、デオキシリボース、グルコース、フルクトースやリボースが同定された。多糖類の構成糖に該当するのはグルコースだけであり、その濃度は 0.11 $\mu\text{mol/g}$ -乾燥菌体と算出された。なお、図中に W で示したピークは乳糖 (ガラクトシルグルコース) の標品と同じ溶出時間であり、二糖類であるものと考えられた。さらにオリゴ糖を含むピーク P-2 からは 3 つのピーク (X、Y、Z) が検出された (図 4.3b) ことから、W、X、Y、Z の 4 ピークを一定量分取して糖組成の分析と、PMAA 誘導体法によるガスクロマトグラフィーによりグリコシド結合の分析を行い、それぞれ表 4.3 と表 4.4 に結果をまとめた。

ピーク W として分離された糖類は、グルコースとガラクトースを約 1:1 の分子比で含んでおり、その濃度はそれぞれ約 1.59、1.43 $\mu\text{mol/g}$ -乾燥菌体 (表 4.3) であった。この糖質の PMAA 誘導体分析 (表 4.4) では、グルコース誘導体の 4 位炭素がメチル化されなかったことから、乳糖と同じ galactosyl-(1 \rightarrow 4)-glucose であることが分かった。また、ピーク Y の糖鎖はグルコース、ガラクトース、ラムノースを、ほぼ 1:1:1 の分子比で含んでおり、菌体当りの濃度はそれぞれ 0.63、0.69、0.67 $\mu\text{mol/g}$ -乾燥菌体 (表 4.3) であった。PMAA 誘導体分析 (表 4.4) では、グルコース誘導体の 4 位炭素とガラクトース誘導体の 2 位炭素がメチル化されなかったことから、想定されるグリコシド結合は rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-galactosyl-(1 \rightarrow 4)-glucose であるものと考えられる。ピーク W と Y の糖鎖化合物の構造は、供試菌株 SBT0495 株が生産する多糖類の重合単位の構造 (図 2.1) の一部と一致しており、多糖類の生合成中間体に由来する糖鎖であることが示唆された。

一方、ピーク X と Z についてはいずれもグリセロールを含む化合物であり、多糖類の中間体との関連は考えられない。テイコ酸やリポテイコ酸の構造にはグリセロールやリン酸が多く含まれることが報告 (Lifely *et al.*, 1980; Navarre & Schneewind, 1990) されており、特にグリセロールとリン酸が主に検出されたピーク Z については、*L. cremoris* 菌でも報告 (Sijtsma *et al.*, 1990) されているリポテイコ酸、あるいは、その生合成中間体に由来する化合物であると考えられる。PMAA 誘導体分析では、ピーク X から glucosyl-(1 \rightarrow 2)-glucose とピーク Z から galactosyl-(1 \rightarrow 6)-glucose が想定され、テイコ酸やリポテイコ酸の糖鎖部分あるいはその生合成中間体の一部が、弱酸加水分解で遊離したものと考えられる。

4.4. 考察

この章では、供試菌株 SBT0495 株による多糖類の生合成に着目し、糖ヌクレオチド前駆体と脂質結合型中間体を分析することにより、生合成経路を確認した。糖ヌクレオチド前駆体としては、多糖類の構成糖であるグルコース、ガラクトース、ラムノースの供与体として、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、dTDP-ラムノースが菌体から検出され、Gabriel (1987) が報告した糖供与体としてのヌクレオチドと符合する結果となった。また、脂質結合型中間体としては、単糖類として glucose が、二糖類として galactosyl-(1→4)-glucose が、三糖類として rhamnosyl-(1→2)-galactosyl-(1→4)-glucose が検出され、これらが多糖類の重合単位 (図 2.1) 形成における初めの 3 ステップであると考察される。四糖類や重合単位そのものである五糖類の糖鎖は検出されなかったが、主鎖を構成するもう 1 分子のグルコースか、もう一つの側鎖であるガラクトースリン酸のいずれかが先に 4 ステップ目の糖転移となり、その後 5 ステップ目の糖転移が行われて重合単位が完成することになる。

第 1 章の図 1.3 に示したキサントンの生合成では、グルコース 2 分子からなる主鎖が初めの 2 ステップですでに形成され、そのあと側鎖の三糖類が順に転移されて重合単位が形成されるスキームが報告されている。この SBT0495 株によるリン酸化多糖類の生合成も同様に考えると、4 ステップ目の糖転移はグルコースであり主鎖の三糖類が形成されたあとに、5 ステップ目に側鎖のガラクトースリン酸が糖転移されて重合単位が完成するものと考えられる。4・5 ステップの糖転移に対する仮説を含めて、供試菌株のリン酸化多糖類の生合成スキームを図 4.4 に図示した。

基本的にキサントンと同様に複合糖質の生合成スキームと同じであるが、細胞質膜の内面における重合単位形成と、外面における重合および放出で構成され、すべてのスキームが細胞質膜上で進行する。一方、本研究の目的であるパルス電界処理による多糖類発酵のエンジニアリング技術の確立においては、パルス電界が細胞質膜に大きなストレスを与える処理となる。菌体の培養液に電界をかけた場合、電解質の多い培地には電流が流れるものの、誘電体である細胞質膜で覆われた菌体は絶縁体となり、菌体の細胞質膜表面に電気濃縮が発生することになる。つまり、菌体の陽極側表面には陽イオンが濃縮し、陰極側表面には陰イオンが濃縮する。さらに、菌体内でもそれぞれのカウンターイオン (陽極側内面では陰イオン、陰極側内面では陽イオン) が電気濃縮を起こす

ことになり、細胞質膜内外面での電位差によるクーロン力がある閾値を超えると、細胞質膜の脂質二重層によるベシクル構造が崩壊し細胞穿孔が発生する。遺伝子導入などの技術に用いられてきた電気穿孔も、パルス電界処理によるものであるが、重度の電気穿孔は細胞死に至らしめるため、本研究では電気穿孔まで至らない程度の電界で処理することが技術確立のポイントとなる。

図 4.4 に示したように、細胞質膜表面での重合においては、細胞質膜にアンカーされているウンデカプレノールと糖鎖が 2 リン酸を介したエステル結合で結合している。パルス電界により電気濃縮が発生すると、陽極側では水素イオンの濃縮により局所的に pH が低下しエステル結合が開裂する可能性がある。同様に、多糖類の側鎖としてリン酸エステル結合を介するガラクトースについても、細胞質膜表面に近い部分ではエステル結合が開裂してガラクトースが遊離することも考えられる。また、第 3 章に述べたように、このリン酸化多糖類は数千の重合により数百万 Da の分子量を形成し、重合数分のリン酸基がマイナスチャージを帯びていることになり、分子内または分子間での反発力が作用していることが分かっている。細胞質膜表面で重合が進行した多糖類は、そのマイナスチャージにより、パルス電界における陽極側に牽引される可能性も考えられ、多糖類の生合成には様々な影響が想定される。

一方、細胞質膜内面での重合単位形成においても、細胞質内で発生する電気濃縮により、糖ヌクレオチドからウンデカプレノールへの糖転移反応が攪乱される可能性や、糖代謝経路で進行する各種の代謝反応に対する影響が考えられる。特に糖代謝経路への影響があるとすれば、多糖類生合成に間接的に影響するはずである。代謝経路の流れに変化があるとすれば、近年発達してきたメタボロミクスにより実際に変化を調べることも可能であろう。まずは次の第 5 章において、パルス電界処理がもたらす *L. cremoris* 菌での多糖類生産への影響についてまとめ、第 6 章において、メタボローム解析による代謝反応への影響や、電気濃縮がもたらす多糖類生合成への影響について報告する。

4.5. 結論

供試菌株 SBT0495 株による多糖類の生合成を解明するため、菌体から抽出した糖ヌクレオチド前駆体と脂質結合型中間体を分析した。糖ヌクレオチド前駆体としては、多糖類の構成糖であるグルコース、ガラクトース、ラムノースの供与体として、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、dTDP-ラムノースが菌体から検出された。また、脂質

結合型中間体としては、単糖類としてグルコースが、二糖類としてガラクトシル-(1→4)-グルコースが、三糖類としてラムノシル-(1→2)-ガラクトシル-(1→4)-グルコースが検出され、これらが多糖類の重合単位形成における初めの3ステップであると考察した。

一方、細胞質膜内面で行われる重合単位形成や、その後細胞質膜外面で行われる重合反応及び一定鎖長となった糖鎖の放出を含めて、全ての生合成プロセスにはウンデカプレノールが、リン酸エステル結合を介して糖鎖の担体となっていることが明らかとなった。特に細胞質膜外面における重合反応や糖鎖放出において、パルス電界処理がどのような影響をもたらすかが、本研究におけるエンジニアリング技術のポイントとなることが明らかになった。

表 4.1 TCA 抽出物からのゲル濾過ピークの薄層クロマトグラフィー

TCA 抽出物からゲル濾過で分離された 6 ピークと糖ヌクレオチド標品を、イソ酪酸、25 % アンモニア溶液、水を容積比 66 : 2 : 33 で混合した溶媒 A を用いて、HPTLC シリカゲル 60 F254 アルミニウムプレート 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Germany) で分離し、UV ライト下でスポットを検出した。

Samples and standards	<i>R_f</i> value
Peak A	0
Peak B	0.18
Peak C	0.35
Peak D	0.39, 0.46, 0.58
Peak E	0.38, 0.45, 0.58
Peak F	0.38, 0.45, 0.58
UDP-glucose, UDP-galactose	0.17

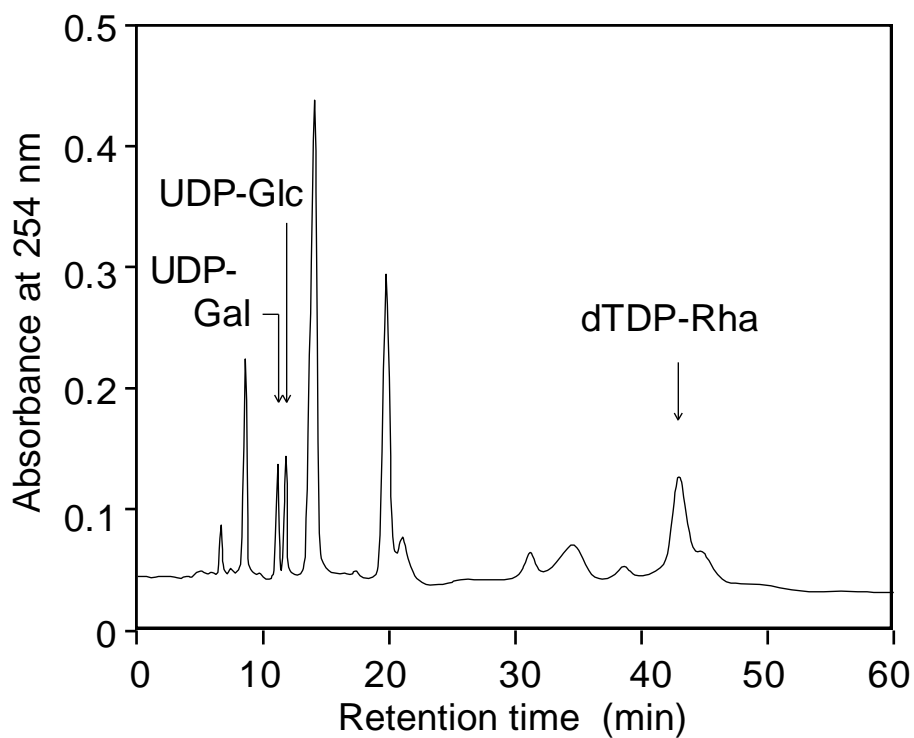


図 4.1 TCA 抽出物から分離された糖ヌクレオチド画分のイオンペアクロマトグラフィー

逆相カラム Prodigy 5 ODS-2 (Phenomenex, Torrance, CA) を用い、40 mM トリエチルアミンリン酸バッファー pH 6.5 を溶媒として 1 mL/min の流速で分離した。図中の、UDP-Gal、UDP-Glc、dTDP-Rha は、それぞれ標品により同定された UDP-ガラクトース、UDP-グルコース、dTDP-ラムノースであることを示す。

表 4.2 1203 抽出物の弱酸加水分解で遊離した脂質の薄層クロマトグラフィー

1203 抽出物を 10mM 塩酸により 100°C で 10 分間弱酸加水分解してから、クロロホルムで抽出された脂質を、HPTLC silica gel 60 F254 アルミニウムプレート (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて 15% 酢酸エチルの n-ヘプタン溶液を溶媒として分離し、2-ナフトール硫酸により加熱発色させた。表には、検体から分離された 7 スポットと、プレノール系脂質またはドリコール系脂質の標品によるスポットを、その発色とともに示した

Sample	<i>R_F</i> value (color)	Color
Lipid after mild acid hydrolysis of 1203 extract	0	Dark brown
	0.12, 0.15, 0.20	Brown
	0.26	Purple
	0.50	Orange
	0.56	Red
	Dodecaprenol phosphate	0
Dolichol-C ₅₅	0.25	Purple
Undecaprenol	0.27	Purple
Dolichol-C ₈₀₋₁₀₅	0.29	Purple

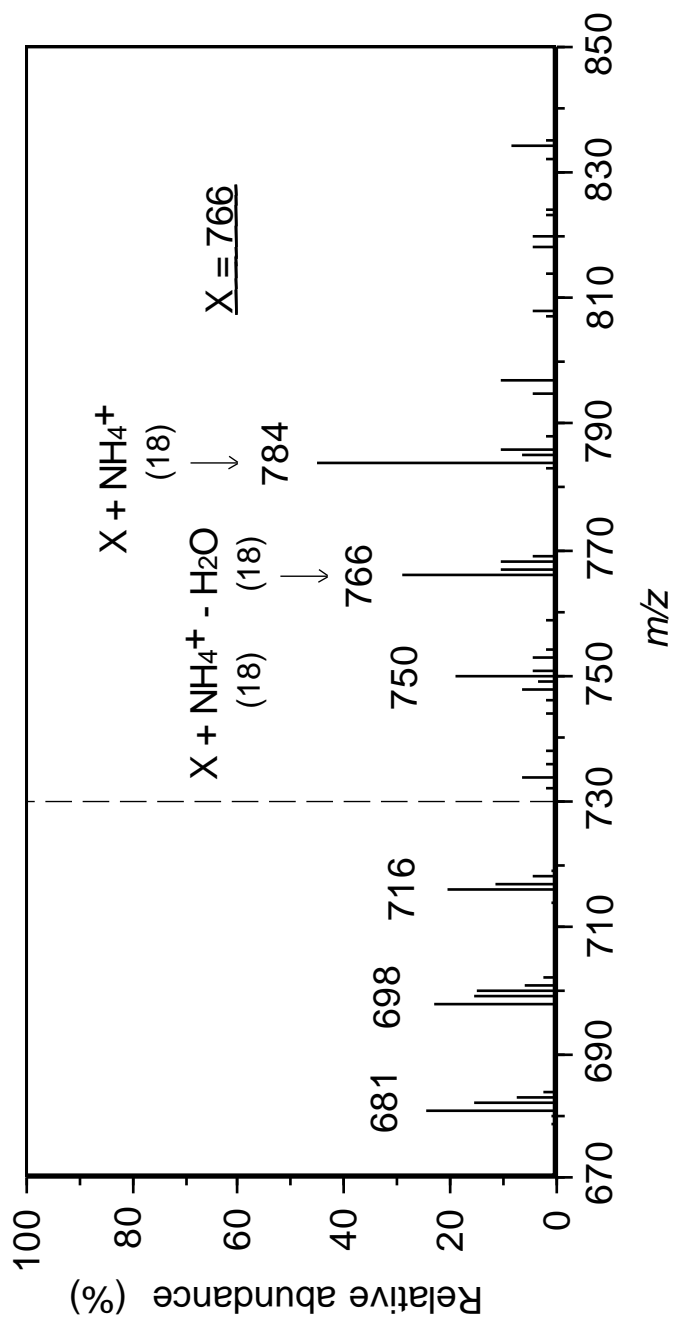


図 4.2 1203 抽出物の弱酸加水分解で遊離した脂質のマススペクトル

表 4.2 に示した方法で薄層クロマトグラフィー上に分離された、1203 抽出物の加水分解物由来の脂質のうち、ポリイソプレノール系脂質とみられる Rf 値 0.26 のスポットを、プレート上のシリカ樹脂とともに剥離して回収した。シリカ樹脂からクロホルムで抽出した化合物を質量分析に供し、アンモニアを反応ガスとする化学イオン化によって質量スペクトルを検出し、化合物の分子量を推定した。

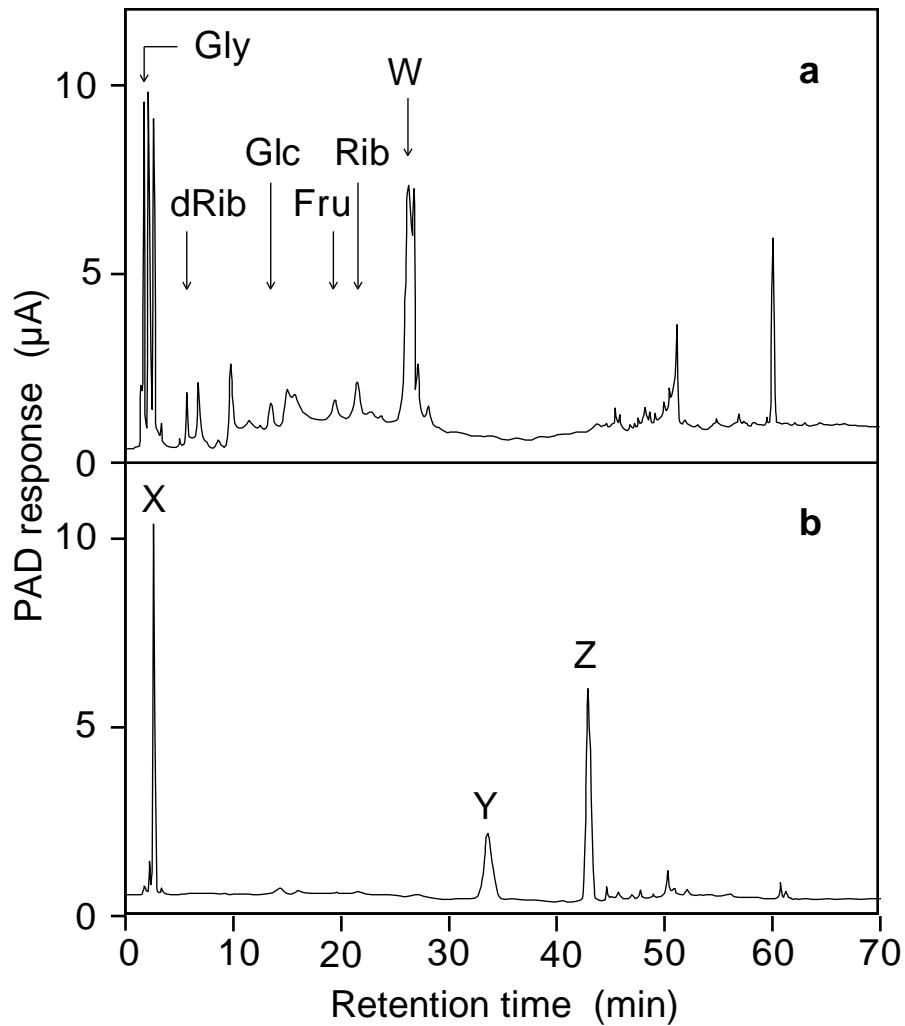


図 4.3 1203 抽出物の弱酸加水分解で遊離した糖鎖分析

10 mM 塩酸を用いて 100°C で 10 分間加熱して加水分解の後、水酸化ナトリウムで中和してから、遊離した糖鎖をクロロホルムとの二層分配により水層に回収し、さらにゲル濾過により、オリゴ糖を含むピーク P-1 と単糖類や 2 糖類を含むピーク P-2 に分取した。両ピーク画分を、パルスドアンペロメトリー検出器と組み合わせた高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD) に供し、P-1 と P-2 のクロマトグラムをそれぞれ a と b に示した。図中の Gly はグリセロール、dRib はデオキシリボース、Glc はグルコース、Fru はフルクトース、Rib はリボースを示す。W、X、Y、Z の 4 ピークについては分取を行い、糖の分析に供した。

表 4.3 1203 抽出物から弱酸加水分解によって遊離した糖鎖化合物の糖組成分析

高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD) で分取した 4 ピークの糖鎖化合物について、2 M トリフルオロ酢酸 (TFA) により 100°C で 6 時間処理して糖鎖を単糖に分解させ、再度 HPAEC-PAD により単糖を定量分析した。

Compound	Concentration [$\mu\text{mol}(\text{g cells})^{-1}$]				
	Glucose	Galactose	Rhamnose	Glycerol	Phosphate
W	1.592	1.429	n.d.	n.d.	n.d.
X	1.475	n.d.	n.d.	0.697	n.d.
Y	0.629	0.693	0.665	n.d.	n.d.
Z	0.132	0.122	n.d.	1.218	1.164

表 4.4 1203抽出物から弱酸加水分解によって遊離した糖鎖化合物のグリコシド結合分析

高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD) で分取した 4 ピークの糖鎖化合物について、部分メチル化アルジトール酢酸 (PMAA) 誘導体としてからガスクロマトグラフィーで定量分析した。

Compound	Derivatized alditol acetate	Approx. molar ratio
W	2,3,4,6- <i>O</i> -methyl galactitol	1
	2,3,6- <i>O</i> -methyl glucitol	1
X	2,3,4,6- <i>O</i> -methyl glucitol	1
	3,4,6- <i>O</i> -methyl glucitol	1
Y	2,3,4- <i>O</i> -methyl rhamnitol	1
	3,4,6- <i>O</i> -methyl galactitol	1
	2,3,6- <i>O</i> -methyl glucitol	1
Z	2,3,4,6- <i>O</i> -methyl galactitol	1
	2,3,4- <i>O</i> -methyl glucitol	1

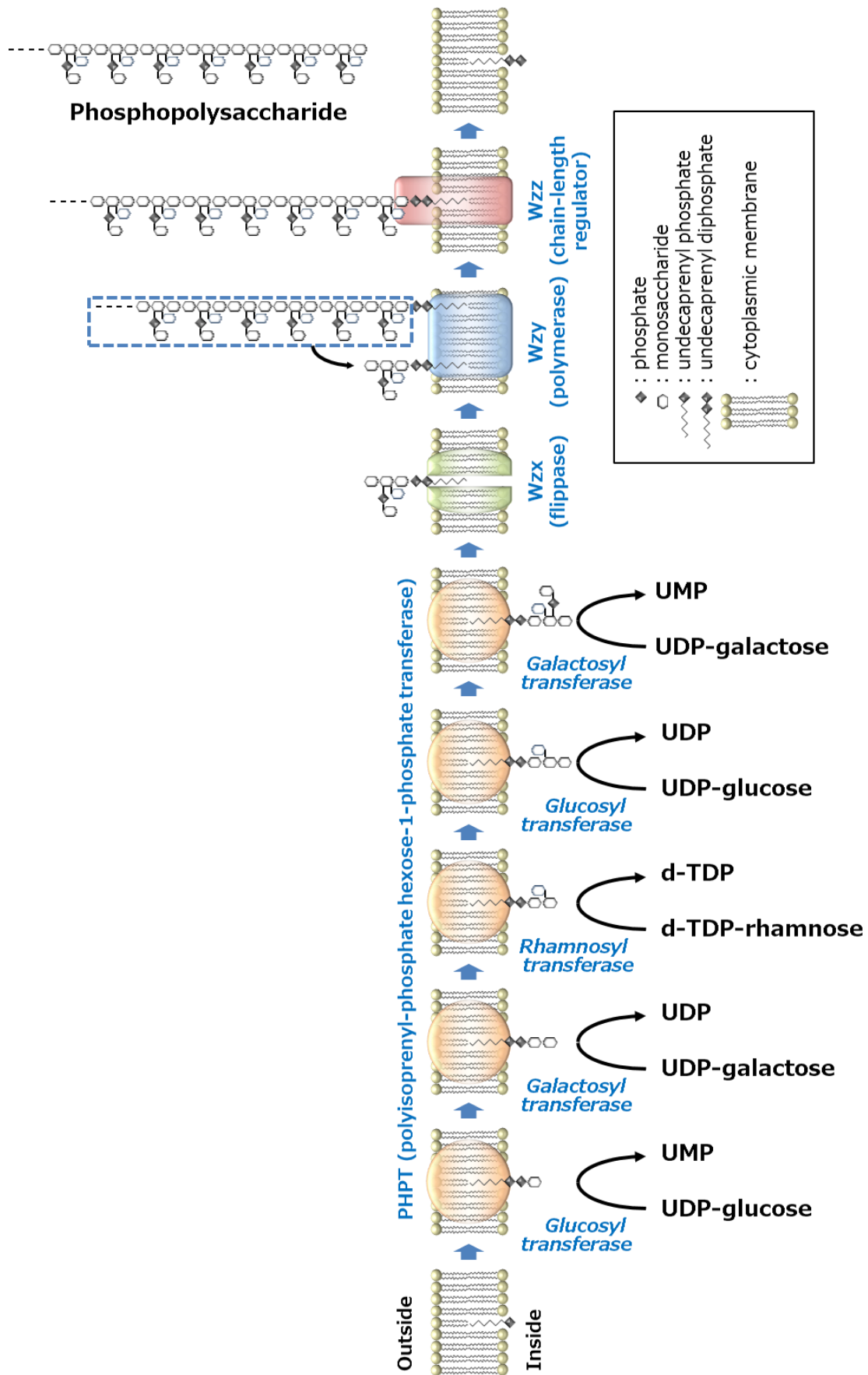


図4.4 *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT0495 によるリン酸化多糖類の生合成

第5章 パルス電界処理による *L. cremoris* 菌での多糖類増産効果

5.1. 序論

本研究の目的である、乳酸菌の多糖類生産におけるパルス電界処理によるエンジニアリング技術の基盤確立へ向け、第2章では *L. cremoris* 菌の供試菌株を用いて多糖類の生産特性を調べ、第3章では供試菌株が生産するリン酸化多糖類の粘弾性特性や静電気的特性を報告し、第4章ではリン酸化多糖類の生合成スキームについて検討した。本章では、実際に供試菌株の培養液にパルス電界処理を行い、多糖類の生産に対してどのような影響があるかを検討し報告する。

第2章の考察で述べたように、供試菌株の生育と多糖類生産とは必ずしも並行ではなく、増殖曲線における対数増殖期中期以降から多糖類の生合成が活発に行われることがわかっており、対数増殖期中期から後期にかけてパルス電界処理を行なうことにより、多糖類生合成やそれに関与する糖代謝に対してどのような作用をもたらすのかを把握できるものと考えられる。なお、パルス電界の処理方法についても、多糖類生産が活発な状態の培養液をパルス電界セルに通液してワンパス処理で行う方法と、対数増殖期中期から後期にかけて培養液を循環通液しながら、多糖類発酵と並行して連続処理する方法などの手段が考えられる。

第1章でまとめたように、パルス電界処理は細胞に電気穿孔を行うことにより、細胞内や核膜内に遺伝子を導入する技術や、加熱殺菌という熱処理によらない殺菌方法として、食品分野でも応用され始めた技術であるが、この研究が求めるのは多糖類発酵に対する電気化学的な刺激を応用する技術であり、電気穿孔のように物理的な破壊処理を目指すものではない。したがって、電気穿孔には至らない条件でパルス処理を行いながら、多糖類生産に変化をもたらすような処理条件を策定していくことが必要となる。以下の実験方法で述べるように、電界負荷を定量的にコントロール可能なワンパス処理実験により多糖類生産への影響を調べ、そこで見出された電界負荷量をもとに通液循環による連続処理における処理条件を検討した。

なおパルス電界処理を乳酸菌に応用した研究例としては、ビオチンを添加した豆乳で *Lactobacillus fermentum* BT 8219 を発酵させ、菌体の β -グルコシダーゼが活性化し、イソブラボン配糖体からアグリコンへの変換を促進する効果についての報告 (Ewe *et al.*, 2012) と、*Lactobacillus acidophilus* BT 1088 を用いてコレステロールの吸収・同化を促

進する効果についての報告 (Lye *et al.*, 2012) がある。これらの報告では、パルス電界処理による電気穿孔を菌体の持つ自己修復能力の範囲内で行っており、部分的な細胞穿孔により物質交換が高まったことや、電界処理による細胞質膜のリン脂質の酸化が、膜の流動性や疎水性に変化を与えたことによる効果であったと考察した。いずれも、パルス電界処理により乳酸菌がもたらすある種の特長や効用を高めることが報告されており、新たに乳酸菌による多糖類発酵という物質生産への作用を明らかにすることが、本章の目的である。

5.2. 実験材料および方法

5.2.1. 供試菌株と培養条件

第2章にも記載した C4 株を、供試菌株に用いた。乳糖 1% を配合した Chemically Defined Medium (CDM) 培地 (Otto *et al.*, 1983) を 0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌し、別途凍結保存しておいたスターターカルチャーを 0.1% (vol/vol) 添加して 25°C で培養した。なお、凍結スターターカルチャーは CDM 培地での対数増殖期の培養液を直ちに凍結し、-80°C で保存しながら培養実験に適宜使用した。また、菌数を測定する場合は、Oxoid 社の M17 培地 1 L 当たり 10 g の乳糖と 12.75 g の寒天を添加したプレート培地に、培養液の希釈液を塗抹してから 25°C で 3 日間培養し、コロニー数を計測してから希釈倍率を換算した。

5.2.2. 多糖類の粗精製

CDM 培地で培養の後、培養液を 4°C、12,300 \times g で 1 時間遠心 (Beckman Avanti J-25, JLA-10.500 rotor (Beckman, Fullerton, CA)) して菌体を分離し、上澄みに対して予め氷温まで冷却しておいた 2 容積量のエタノールを添加して多糖類を沈殿させた。このエタノール混合液を 7,900 \times g で 30 分間遠心して多糖類を沈殿させて回収し、タンパク質分解酵素プロナーゼ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) と防腐剤アジ化ナトリウムを 0.1% (wt/vol) 含有する 50 mM リン酸バッファー pH7.4 で完全に溶解した。その後この溶液を 37°C で 48 時間保持して残存するタンパク質を分解させたのち、トリクロロ酢酸を 4% (wt/vol) の濃度となるように添加してタンパク質分解反応を停止させた。この反応液を透析チューブに入れて十分に透析してから、残存する多糖類を再度 70% (vol/vol) エタノールで沈殿させる操作を 2 度行って粗精製多糖類を調製した。

5.2.3. 多糖類の組成分析

粗精製多糖類を対象として、それを構成する単糖類とリン酸の含量を測定した。単糖類の分析においては、2.0 M トリフルオロ酢酸 (TFA) により 100°C で 6 時間加水分解し、反応後ロータリーエバポレーターや凍結乾燥機などにより真空化で TFA を蒸発させてから、薄層クロマトグラフィー (TLC) による定性分析や、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) による定量分析を行った。なお、RP-HPLC での定量分析にあたっては、56%の過塩素酸により 200°C で 20 分間加水分解して単糖類に分解した後、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMP) 修飾法を適用した。また、リン酸含量については Bartlett (1959) の方法で分析した。

PMP 修飾法は Yang ら (2005) の方法や Wang ら (2015) の方法を一部変更して、以下のように行った。まず TFA 加水分解物に内部標準を添加し、0.5 M の PMP メタノール溶液を 0.6 mL を混合した。その後さらに 0.3 M の水酸化ナトリウム溶液を 0.3 mL 添加してから、70°C で 30 分間反応させた。反応液を室温まで冷却してから 0.3 mL の 0.5 M 硫酸と 5 mL のクロロホルムを十分に混合した後、800×g で 5 分間遠心して水溶液層と有機溶媒層に分離させた。水溶液層を回収して真空乾燥してから、以下に示す RP-HPLC の溶出液 2 mL で溶解し分析用検体とした。検体中の各種単糖類の PMP 誘導体は、オクタデシル (C18) 逆相カラム Intersil ODS-3 (GL Science, Tokyo, Japan) を用いて、10 mM リン酸カリウムバッファー pH 4.5 とアセトニトリルを 81 : 19 の容量比で混合したものを溶出液として 40 °C に維持しながら 1.0 mL/min の流速で分離した。検体は 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過してから 30 μL をカラムに注入し、溶出液を UV 検出器により 245 nm での吸光度をモニターして PMP 誘導体を検出した。

5.2.4. パルス電界処理

パルス電界処理は図 5.1 に示した構造のフローセルで行い、陽極と陰極の間隙 1 mm で幅 2 mm と長さ 11.2 mm の流路 (22.4 μL) を通液する間にパルスを印加させた。パルス電界は、パルス幅を 1 μs に固定した高電圧パルス発生器 TE-HP5K-HV5W (Tamaoki Electronics, Kawaguchi, Saitama) を使用し、実際のパルス電圧やピーク電流をデジタルオシロスコープ DSO-1052B (Keysight Technologies, California, US) と高電圧プローブ Agilent N2771A (Agilent Technologies, Colorado, US) でモニターしながらパルス強度を制御した。なお、フローセル通過直後に冷却コイルを通過させることにより、パルス電

界処理で上昇した液温を培養温度まで冷却した。また、冷却コイルの出口にニードルバルブを設置して 0.1 MPa まで加圧することにより、電極間での局所的なジュール加熱による沸騰を抑制させた。

実際に培養液に PEF 処理を行う方法としては、フローセルを 1 度だけ通液させるワンパス処理と、培養液を循環させながら連続的に処理する方法のいずれかで行った。ワンパス処理ではパルス電界負荷量を定量的に制御できるので、パルス処理条件とそれがもたらす効果との関係を明らかにし、そこで判明した至適条件を循環処理条件に反映させることにより、多糖類発酵と並行した連続処理に応用した。ワンパス処理は、対数増殖中期に相当する培養 18 時間の培養液を通液して行い、さらにその後 24 時間まで培養を継続してから多糖類の生産量などの測定を行った。一方の循環連続処理では、培養 18 時間から 4 時間培養液を循環しながら処理を行い、その間に約 4 倍の菌数に増殖することを考慮し、ワンパス処理で決定したパルス回数も 4 倍とすることにより、平均して全ての菌体が至適パルス条件に相当する処理を受けるように条件を設定した。

5.2.5. 細胞透過率測定

PEP 処理がもたらす細胞質膜の損傷を評価するため、フロピジウムヨウ素 (PI) を用いた以下の方法により細胞透過率を測定した。PI は DNA と結合して蛍光発光する物質であり、菌体懸濁液に PI を混合してインキュベートしてから蛍光分光分析を行うことにより、細胞質内に侵入して DNA と結合した PI を定量的に測定することにより細胞透過性として評価することができる。PI はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) pH 7.4 を用いた 10 µg/mL 溶液とし、PEF 処理後の培養液 1 mL に対して PI 溶液 1 mL を混合して 37°C で 10 分間反応させた。その後蛍光光度計により、励起波長 538 nm および、蛍光波長 617 nm で蛍光強度を測定した。

ブランクとしては CDM 培地に PI 溶液を混合したものを測定し、さらに、PEF 処理後の培養液を超音波処理して菌体を完全に破壊した検体を、陽性対照区として測定した。その際の超音波処理には、超音波処理装置 Vibracell VC-505 (Sonic Materials Inc., Connecticut, US) を用い、氷水に浸漬した 5 mL の培養液に対してマイクロチップ発生器を装着して、最大出力の 5% に相当する出力で 2 分間の処理を 5 回実施した。この検体の蛍光強度からブランク蛍光強度を差し引いたものを細胞透過率 100% とし、それぞれの検体での蛍光強度から同様にブランク蛍光強度を差し引いた蛍光強度から、細胞透過率 100% に対する相対値を算出し検体の細胞透過率とした。また、PEF 処理を行わず

に通常通り培養した菌体についても同様に測定することにより、PEF 処理だけに起因する細胞透過率を算出可能とした。

5.2.6. サイズ排除クロマトグラフィー

培養液中の多糖類生産量の測定は、Shodex OHpak SB-806 HQ およびガードカラム SB-G (Showa Denko, Tokyo) を接続した日本分光 HPLC システム LC-2000 プラスシリーズ (Jasco Corporation, Tokyo) で、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により行った。培養液を、 $12,300\times g$ で 10 分間遠心して菌体を除去し、さらに $0.45\ \mu\text{m}$ セルロースアセテートメンブレンフィルターで濾過してから、 $20\ \mu\text{L}$ を注入して $50\ \text{mM}$ 塩化ナトリウムを溶出液として $1\ \text{mL}/\text{min}$ の流速で分析した。屈折計を検出器として多糖類の溶出をモニターし、上記の組成分析で単糖類とリン酸の含量を測定済みのサンプルで作成した検量線から、多糖類の生産量を算出した。

多糖類の分子量についても SEC で推定した。分子量分布が決められているデキストラン標品 D-5376 (Sigma-Aldrich, Missouri, US) を使用し、多糖類の分子量と SEC での溶出時間との関係で相関式を決定し、検体中の多糖類の溶出ピークから分子量を推定した。なお、通常の培養で生産された多糖類は 6.7-8.8 分の 2 分間ブロードピークとなって溶出し、分子量で $2.6\text{-}8.6\times 10^6\ \text{Da}$ の幅を示したが、代表値として示す分子量はそのピークの最大値の溶出時間から決定した。

5.2.7. β -ガラクトシダーゼ活性測定

多糖類の生合成に関係する糖代謝系に対する PEF 処理の影響を評価する目的で、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。測定には *o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を基質として使用し、Zang & Bremer (1995) のプロトコールに準拠しながらも若干変更して以下のように測定した。培養 18 時間後から 4 時間、培養液を循環しながら連続的に PEF 処理を行った後、引き続き 2 時間培養してから菌体を回収した。 $0.2\text{-}2.0\ \text{mL}$ の培養液を $12,300\times g$ で 10 分間遠心し、その上澄みを $1\ \text{mL}$ の Z-バッファー ($0.1\ \text{M}$ リン酸ナトリウムバッファー, $10\ \text{mM}$ 塩化カリウム, $1\ \text{mM}$ 硫酸マグネシウム, $50\ \text{mM}$ 3-メルカプト-1,2-プロパンジオール) に置換して沈殿となった菌体を再懸濁した。なお、菌体あたりの β -ガラクトシダーゼ活性を換算できるように、菌体懸濁液の $600\ \text{nm}$ での濁度 (OD600) をあらかじめ測定しておいた。

この菌体懸濁液を 30°C としてから、 $4\ \text{mg}/\text{mL}$ の ONPG リン酸バッファー溶液 $200\ \mu\text{L}$

を添加して酵素反応を開始した。60 分間経過後に酵素反応を停止させるため、1 M の炭酸ナトリウム 500 μ L を添加し、続いて 10,000 $\times g$ で 5 分間遠心して細胞残渣を除去した。 β -ガラクトシダーゼ活性による ONPG の加水分解産物である *o*-ニトロフェノールは 420 nm での吸光 (Abs420) を示すが、残存する可能性のある細胞残渣による光散乱の影響を排除するため、550 nm での吸光度 (Abs550) も測定し、補正係数 1.75 を掛け合わせて 420 nm での光散乱の影響を差し引くように、以下の計算式でミラー単位による β -ガラクトシダーゼ活性を計算した。

$$\text{Miller Unit} = 1000 \times (\text{Abs420} - \text{Abs550} \times 1.75) / (60 \text{ min} \times \text{mL of cells} \times \text{OD600})$$

5.2.8. 多糖類生合成中間体

培養 18-22 時間の PEF 処理区と非処理区の両者から 24 時間後の培養液を回収し、600 nm での濁度 (OD600) を測定してから直ちに 4 $^{\circ}$ C に冷却して 18,600 $\times g$ で 1 時間遠心分離して菌体を分離した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で菌体を懸濁してから再度同じ条件で遠心分離し、適量の Milli-Q 水で再懸濁してから凍結乾燥して菌体粉末を調製した。この菌体粉末を Ielpi ら (1981) が用いた 1203 溶媒 (クロロホルム : メタノール : 水 = 1 : 2 : 0.3 (容量比)) に懸濁 (1 L の培養液に由来する乾燥菌体当たり 20 mL の 1203 溶媒) し、さらに上記 5.2.5. の細胞透過率測定で行った超音波処理と同じ条件で処理してから、3,000 $\times g$ で 10 分間遠心して上澄みを回収した。一方の菌体沈殿物に対しては同じ抽出操作を再度行って上澄みをとりとまとめ、ロータリーエバポレーターにより乾固するまで溶媒を蒸発させた。この抽出物中には、以前の研究報告 (Oba *et al.*, 1999a) で述べたように多糖類の生合成中間体が含まれている。

乾固した抽出物を 10 mM 塩酸 20 mL (1 L の培養液由来の抽出物当たり) で懸濁し、100 $^{\circ}$ C で 10 分間の加熱により脂質結合型中間体におけるリン酸ジエステル結合を加水分解し、糖鎖部分を遊離させた。この弱酸加水分解のあと、0.1 M 水酸化ナトリウムにより中和してから 20 mL のクロロホルムを混合し、1,500 $\times g$ で 5 分間遠心して水層と有機溶媒層の 2 層に分離させた。水層には遊離した糖鎖が残るためその量を定量するために、さらにトリフルオロ酢酸 (TFA) を 2 M の濃度となるように添加して 100 $^{\circ}$ C で 6 時間加熱し、糖鎖を単糖類まで加水分解させた。すべての構成糖の還元末端が遊離している状態で、ジニトロサリチル酸 (DNS) による比色法で糖質含量を測定し、多糖類の生合成中間体としての糖鎖量として培養液 1 L 当たり、また OD600 の測定値から菌数当

たりの糖鎖量を換算した。

5.3. 結果

5.3.1. 生育特性 と多糖類産生特性

供試菌株による、CDM 培地での多糖類生産と菌数や pH の変化を図 5.2 に示した。Jeanson ら (2009) が報告したように、*Lactococcus lactis* 菌では溶存酸素量に応じて乳酸発酵が遅れる傾向が見られ、本供試菌株でも PEF 処理フローセルに培養液を循環させると、発酵のスピードが低下する傾向が見られた。図 5.2 に示した生育曲線は、パルス電界の印加はしていないが、バイパスラインへの循環適液を培養 18-22 時間までの 4 時間行って、循環通液による物理的影響が同等となる条件で得られた対象区の結果を示している。生育曲線や pH 曲線からは、対数増殖が始まるまでには 10 時間以上の誘導期を要していることがわかり、26-28 時間で定常期に至ることを示している。多糖類の生産は、実質的に培養 16-28 時間で行われ、10.6 mg/L の生産量に至った。生育曲線と多糖類生産曲線は同期しておらず、多糖類生産の立ち上がりが数時間遅れることから、多糖類の生産には菌数が一定以上の濃度となる必要があることを示している。これらの結果から、培養開始後 16 時間以上経過してから PEF 処理を行うことが望ましいと判断した。

5.3.2. ワンパス処理

ワンパス処理による実験は、パルス電圧で 7-11 kV/cm およびパルス回数で 150-400 回 (パルスサイクルで 322-121 μ s に相当) の 2 因子で実験を行い、それぞれのパルス条件での多糖類の生産量を図 5.3 に示した。攪拌や循環などを行わない静置培養における多糖類の生産量は 12.2 mg/L であり、比較のために図 5.3 の中にその生産量を実線で、またその標準誤差幅 0.9 mg/L をストライプで示した。図から明らかなように、パルスを 250-300 回以上印加した場合には、パルス電圧の違いに関わらず多糖類の生産量が、対象区である静置培養での生産量を下回る結果となった。また、パルス電圧を 10 または 11 kV/cm とした場合にも、対象区を下回る結果となった。

一方、パルス電圧を 7-9 kV/cm とし、150-250 回のパルスを印加した場合、多糖類の生産が対象区よりも上回った。特にパルス電圧を 8 kV/cm で 200 回印加した場合に最も生産量が高くなり、静置培養での生産量 12.2 mg/L よりも 32% 高い 16.1 mg/L となっ

た。それに続き、9 kV/cm で 150 回、7 kV/cm で 200 回のパルス印加により、16.0 mg/L と 15.0 mg/L の生産量となった。これらの結果から、パルス電圧は 10 kV/cm を下回る条件で処理を行うべきであるが、多糖類の生産量を高めるためにはある一定のパルス電界を印加することが必要であることが示唆された。

5.3.3. 循環連続処理

ワンパス処理実験で明らかとなった至適パルス条件として、1 μ s のパルス幅で 8 kV/cm のパルス電圧を 200 回印加する条件を、循環連続処理に適用するため、4 時間の処理中に増加する菌数を考慮した。供試菌株は対数増殖後半の 4 時間で菌数がほぼ 4 倍になるため、菌数当たりの処理回数が同等になるように、4 時間の処理中に 200 回の 4 倍である 800 回印加することとした。なお、循環処理においては培養液量に応じて全体菌数が増えるため、フローセルを通液する培養液の流速を変化させ、それに伴ってパルス頻度を調整することにより、細胞あたりの処理回数が上記至適条件となるように実施した。

パルス処理条件を上記のように設定した上で、対数増殖期前半から定常期全般の間の異なる生育ステージで 4 時間の処理を行い、パルス処理がもたらす影響を図 5.4 にまとめた。図中左端のグラフは対象区として、パルス処理を行わない場合の多糖類生産量・菌数・pH の変化を示しており、循環処理による物理的な影響を同等とするため、18-22 時間の 4 時間パルスを印加せずにフローセルへの通液だけを行った結果である。一方、18-22 時間の 4 時間パルス処理を行った場合、その処理中に多糖類生産が促進され処理後も数時間その効果が続き、28 時間後の培養終了時の生産量は 20.6 mg/L となった。対象区での生産量は 10.6 mg/L であったことから、約 2 倍の生産量に匹敵することが判明した。なお、パルス処理を数時間継続した場合、電極表面に培地中の塩類が堆積する現象が発生したが、培養液の電気伝導度は培養開始時に 680 mS/m であったのに対し、4 時間のパルス処理直後で 646 +/- 6 mS/m、非処理区の 22 時間後で 664 +/- 4 mS/m、さらにそれぞれの培養終了で 626 +/- 4 mS/m と 630 +/- 5 mS/m となり、パルス処理により電気伝導度を著しく低下させるものではなかった。

一方、多糖類生産以外でのパルス処理の影響として、処理後の菌体は活発に多糖類を生産しながら 1.0×10^8 CFU/mL の菌数に到達した後は、対象区と比べて菌数が減少する傾向が見られる。18-22 時間の 4 時間パルス処理を行った場合では、パルス処理による多糖類増産効果が処理終了後も数時間効果が継続したが、20-24 時間や 22-26 時間で

処理を行った場合では、その後菌数が低下する傾向の中で、多糖類増産効果が十分に継続されず（それぞれ 16.0 mg/L および 14.6 mg/L）、およそ 2 倍の生産量となった 18-22 時間の処理区の結果には及ばなかったと考えられる。なお、16-20 時間の処理では 17.1 mg/L の生産量となったが、パルス処理を開始した時点での菌数が低かったため、18-22 時間の処理区のような増産効果を十分に得られなかったものと考察した。

5.3.4. 細胞透過率

パルス処理による細胞透過性の変化については、表 5.1 に示した。培養 18 時間での菌体の細胞透過性は 15.8% であり、対数増殖期にある菌体では細胞の分裂が活発な状態であり、透過性が高まる生育ステージであると考えられる。これに対しワンパス処理でパルス電圧を 8-12 kV/cm で変化させた場合、電圧が高いほど明らかに透過性が高まり、多糖類増産の効果が顕著な 8-9 kV/cm では、処理直後の透過性は 10-40% 上昇した。なお、8 kV/cm で 18-22 時間循環処理を行った場合では、処理直後の細胞透過性は 7.5% の上昇に留まり、菌体の損傷が大きなものではないことが示唆された。しかしながら、電気穿孔の閾値であるとされる $1 \text{ V}/\mu\text{m}$ に相当する 10 kV/cm 以上のパルス電圧では透過性が劇的に高まり、12 kV/cm の処理では 75.6% 増加して 91.4% の透過性を示した。

5.3.5. 多糖類の化学組成と分子量

表 5.2 に示したように、パルス処理を行わずに通常培養によって得られた粗精製多糖類の化学組成は、グルコース、ガラクトース、ラムノース、リン酸の分子比で 2.7 : 2.2 : 0.9 : 1.0（リン酸含量を 1 とした相対比）であり、供試菌株 C4 株が生産する多糖類も、Nakajima ら（1992）が SBT0495 株や、van Kranenburg ら（1997）が NIZO B40 株について報告した多糖類と同様に、リン酸化多糖類であることが示唆された。なお、これら 2 菌株による多糖類の 1 次構造は同一（グルコース 2 分子、ガラクトース 2 分子、ラムノース 1 分子、リン酸 1 分子）であり、本研究での多糖類の上記化学組成が両菌株の単糖構成と似ていることから、供試菌株 C4 も同様な 1 次構造を有するリン酸化多糖類を生産するものと考察した。なお、Nakajima ら（1992）は SBT0495 株による多糖類の分子量を $1.7 \times 10^6 \text{ Da}$ と報告しているが、供試菌株 C4 株ではそれよりも大きく $6.2 \times 10^6 \text{ Da}$ であった。

一方、4 時間の循環パルス処理を行って生産された多糖類の化学組成は、グルコース、ガラクトース、ラムノース、リン酸の分子比で 2.8 : 2.4 : 0.7 : 1.0 となり、パルス処

理を行わない場合の化学組成と大きな違いは見られない。ところが分子量では大きな変化があり、パルス処理を行った場合は 4.8×10^6 Da となった。表 5.2 中に示した SEC クロマトグラフィーでの多糖類の溶出ピークに見られるように、パルス処理に関わらずピーク幅は 6.7-8.8 min であるが、最大ピークの位置が 7.3 min から 7.7 min にシフトしており、それぞれ 6.2×10^6 Da から 4.8×10^6 Da へ分子量が低下したことを示した。

5.3.6. β -ガラクトシダーゼ活性と多糖類生合成中間体

上記の結果から、培養 18-22 時間の間に培養液を循環しながら、8 kV/cm のパルス処理を行うことにより、多糖類生産が促進され処理後も数時間、促進効果が続くことが判明した。この時、菌体における糖代謝の上流となる異化作用と下流となる同化作用にどのような変化があるかを調べるため、パルス処理後にさらに 2 時間の培養を行った上で菌体を回収し、 β -ガラクトシダーゼ活性と多糖類生合成中間体に由来する糖鎖量を調べ、パルス処理を行わない菌体の結果と合わせて表 5.3 にその結果を示した。

パルス処理した菌体での β -ガラクトシダーゼ活性は、対象区より若干活性が高いものの t-検定では有意差が認められなかった。 β -ガラクトシダーゼ活性は菌体に取り込まれた乳糖を分解し、解糖系やガラクトース代謝系の異化作用に入るための最初のステップであるが、それには大きな影響がないことが明らかとなった。一方、多糖類生合成中間体に由来する糖鎖量には変化があり、パルス処理を行った菌体では対象区と比べて、糖鎖量が 45%少ないことが判明した。

5.3.7. パルス電界処理後の継代培養における多糖類生産性

パルス電界処理がもたらす多糖類生産の促進が、遺伝的に獲得された形質であるか否かを確認するため、パルス処理された菌体を M17 寒天培地上に塗抹培養してからコロニーをいくつか単離し、再度 CDM 培地での生育や多糖類生産特性を評価した。図 5.5 にその結果を示したが、パルス処理された後の菌体は通常の菌体と比較して生育が悪く、それと並行して多糖類の生産量も通常の生産量を下回った。菌数 1.0×10^8 当たりの多糖類比生産性を算出すると、パルス処理されていない菌体では $11.3 \text{ mg/L}/10^8\text{-cells}$ であったのに対し、パルス処理された菌体では $11.9 \text{ mg/L}/10^8\text{-cells}$ であり、比生産性での差は認められない。したがって、パルス処理がもたらす多糖類生産の促進効果は、菌体が遺伝的に獲得した形質ではないことが確認された。

5.4. 考察

多糖類を生産する乳酸菌に対して発酵中にパルス電界処理した場合、電気穿孔などのダメージが限定的な穏やかなパルス電界処理を行うことにより、多糖類の生産が促進されることが明らかとなった。対数増殖期の菌体に対して、ワンパス方式でパルス処理をした場合でも、また、培養液を循環させながら連続的に処理した場合のいずれにおいても多糖類増産効果が示唆された。なお、パルス電界処理を行った場合と行わない場合において、生産された多糖類の分子量や化学組成の変化、また、菌体については、パルス処理による細胞透過性の変化や、糖代謝および多糖類生合成における変化を調べることにより、増産効果のメカニズムに対する若干の手掛かりが得られたので以下に考察した。

パルス幅を 1 μs に固定したワンパス処理実験では、8-9 kV/cm のパルス電圧で 150-200 回印加した場合に多糖類の増産効果が最も高くなり、10 kV/cm 以上のパルス電圧または 200 回以上のパルス印加回数では、供試菌株は多糖類の生産を維持できずに生産量が低下する結果となった。これは、細胞穿孔の閾値に相当する 10 kV/cm 以上のパルス電圧により細胞質膜が損傷したか、あるいは、印加回数が多く細胞質膜のダメージが累積し、多糖類の生産に異常をきたしたものと考えられる。Kandušer ら (2006) や Lye ら (2012) は、パルス電界処理により菌体の細胞質膜が一定の損傷を受けたとしても、細胞の自己修復機能で損傷部分が再生されることを報告しているが、10-12 kV/cm のパルス電圧で処理した場合には細胞透過性が 75% に上昇しており、重度のダメージにより損傷部分が再生されずに細胞死に至ったものと考えられる。

多糖類の生合成は、グラム陽性菌でのペプチドグリカン、リポテイコ酸、爽膜多糖類などの複合糖質の生合成と同様に、細胞質膜表層で行われると考えられている。上記のように、細胞透過性が 75% にもなるような損傷や、パルス印加が繰り返されて累積した損傷では、細胞質膜表層で行われる多糖類の生合成も継続できるとは考えにくい。しかしながら、比較的穏やかな処理を行った場合には、結果的に約 2 倍の多糖類生産量となっており、増産のメカニズムを解明するためには、多糖類の生合成スキームとの関連において検討することが必要である。

Whitfield (2010) は多糖類生合成のスキームを明確に図式化しており、連続する 4 つの生合成ステップに関与するとされる細胞質膜上の 4 種類のタンパク質と、それぞれの機能を報告した。また、Islam & Lam (2014) は、4 ステップの中でも第 2・3 ステッ

プに関与する Wzx と Wzy タンパク質について総説をまとめた。多糖類生合成の 4 ステップにおける最初のステップは、細胞質膜内面にて糖ヌクレオチド前駆体からポリイソプレニルリン酸に糖が伝達されるステップであり、これが繰り返されて多糖類の重合単位であるオリゴ糖ユニットが形成される。パルス処理によって発生する電界は、細胞質膜内でも電解質の電気分極を発生させることから、糖ヌクレオチドからの糖転移によるユニット形成において、電気化学的な影響を及ぼすことが想定される。

第 2 ステップは、完成したオリゴ糖ユニットを細胞質膜内面から外面に反転させる Wzx タンパク質の作用であり、リン脂質 2 重層のベシクル構造内でオリゴ糖を異動させる際の膜の柔軟性に、パルス処理が影響することも想定される。残りの第 3・4 ステップは、いずれも細胞質膜外面で行われるのでパルス処理の影響を直接受けやすいステップである。第 3 ステップは Wzy タンパク質による重合反応であり、すでに重合が進行した多糖類中間体を、新たに表面に転送されたオリゴ糖ユニットの上に重合させるステップである。最後の第 4 ステップは、多糖類の鎖長を制御するタンパク質により一定の鎖長になると培地中に放出して生合成を完了するステップである。

今回のパルス処理実験では、処理を行った場合に生産される多糖類の分子量が、通常の培養で生産される多糖類よりも 1.4×10^6 Da ほど小さくなっており、パルス処理により鎖長を制御する第 4 ステップのタンパク質に異常をきたしたか、不十分な鎖長のまま糖鎖が強制的に解放されたなどの仮説が想定される。また、多糖類の生合成中間体由来する糖鎖量が、パルス電界処理された菌体では 45% 少なかった結果を考慮すると、後者の仮説に整合性があるものと考えられる。さらに、不十分な鎖長の糖鎖が通常よりも早い段階でポリイソプレノイド担体から解放されたとすると、ポリイソプレノイド担体が多糖類合成にリサイクルされる回数が高まり、より効率的に多糖類生合成が進行したと想定することもできる。また、供試菌株による多糖類がリン酸化多糖類として多価マイナスマイナスチャージを有しているため、パルス電界により陽極側に牽引する静電的作用が働いたことも考えられ、不十分な鎖長の糖鎖が切り離された原因についても説明の余地がある。

多糖類の増産効果を説明するもう一つの仮説として、パルス処理により 10% 弱高まる細胞透過性に着目することができる。細胞の透過性が高めれば、物理的に乳糖が菌体内に進入することも考えられ、エネルギーを要する通常の膜輸送システムによる乳糖の取り込みよりも菌体内の乳糖濃度が増加し、解糖系や TCA 回路で生産される ATP エネルギーや多糖類の原料となる糖ヌクレオチド前駆体の合成量が増加したと想定するこ

とができる。但し、 β -ガラクトシダーゼ活性にはパルス処理による変化がなかったもので、取り込まれた乳糖が十分に加水分解され糖代謝を促進したかどうかについては検証しなければならない。

パルス電界処理による多糖類増産の機序を解明するには、糖代謝や多糖類の生合成に関わる様々な生化学的検証が必要であるが、パルス処理により多糖類の分子量が若干小さくなり、生合成中間体の量が低下した事実は、機序解明において重要な手掛かりとなるはずである。また、多糖類生産量の増加はその後の継代培養では見られなかったことから、パルス電界処理が多糖類生合成に関わるゲノムに変化を与え、多糖類を増産する形質を遺伝的に獲得したものでないことは明らかであるが、関与する遺伝子の発現の機構に影響を与えた可能性を否定することはできない。

機序の解明に加えて興味深いのは、パルス処理による多糖類増産効果が他の多糖類産生菌にも通用する現象であるかどうかである。そこで、多糖類産生能を有する乳酸桿菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* とビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* の2菌株を市販乳製品から分離し、それらの多糖類がいずれもグルコース、ガラクトース、マンノースから構成されることを確認した上で、供試菌株でのパルス処理条件と全く同じ条件で4時間処理を行い、多糖類生産量の変化を確認する予備実験を行った。結果として、*L. bulgaricus* 菌では多糖類の増産が確認され、通常発酵では 60.4 mg/L の生産量であったが、パルス処理区では 97.1 mg/L となり約 60% の増加となった。しかしながら、*B. longum* 菌においてはパルス処理の初期で若干の増産傾向が見られたものの、最終生産量では対象区と大きな差は見られなかった。

乳酸桿菌やビフィズス菌は乳酸球菌とは菌体の形状が異なり、パルス電界の電気力線方向と桿菌の長さの向きが一致した場合には、絶縁体となる菌体の長さが 5-6 μm に相当するため、8 kV/cm 印加された場合 40-50 V の電圧が菌体の両端にかかることになり、電気穿孔により細胞死に至ることが想定される。したがって予備実験の結果としては、パルス処理による多糖類生産促進効果が、他の多糖類産生菌にも適用できる可能性が示唆されたものの、適用する菌体の形状に応じて適切な処理条件を設定することが必要であると考察した。

5.5. 結論

多糖類を生産する乳酸菌に対して発酵中にパルス電界処理を行った場合、電気穿孔

によるダメージが限定的な穏やかなパルス電界処理を行うことにより、多糖類の生産が促進されることが明らかとなった。対数増殖期の菌体に対して、ワンパス方式でパルス電界処理を行った場合でも、また、培養液を循環させながら連続的に処理を行った場合のいずれにおいても多糖類増産効果が示唆され、循環連続処理を4時間行った場合に多糖類の生産量がほぼ2倍となることが明らかとなった。また、パルス処理した菌体を継代培養しても多糖類増産効果は維持されなかったため、この効果は遺伝的に獲得した形質ではなく、処理に対する一時的なレスポンスがもたらす現象であると考えられた。

なお、パルス電界処理による多糖類の化学組成の変化は見られなかったが、分子量の低下が認められた。重合が進んだ多糖類を培地中に解放する鎖長制御のステップに異常をきたしたか、パルス電界により不十分な鎖長の糖鎖が強制的に解放されたなどの仮説が考えられた。パルス電界処理により細胞透過性が10%程度上昇したため、培地中の糖質源である乳糖が細胞内に多く取り込まれ、多糖類生産の原料やエネルギーとなった可能性も考えられた。菌体における代謝の変化を調べることで、パルス電界処理による多糖類増産の作用機序を解明する上で重要であることが示唆された。

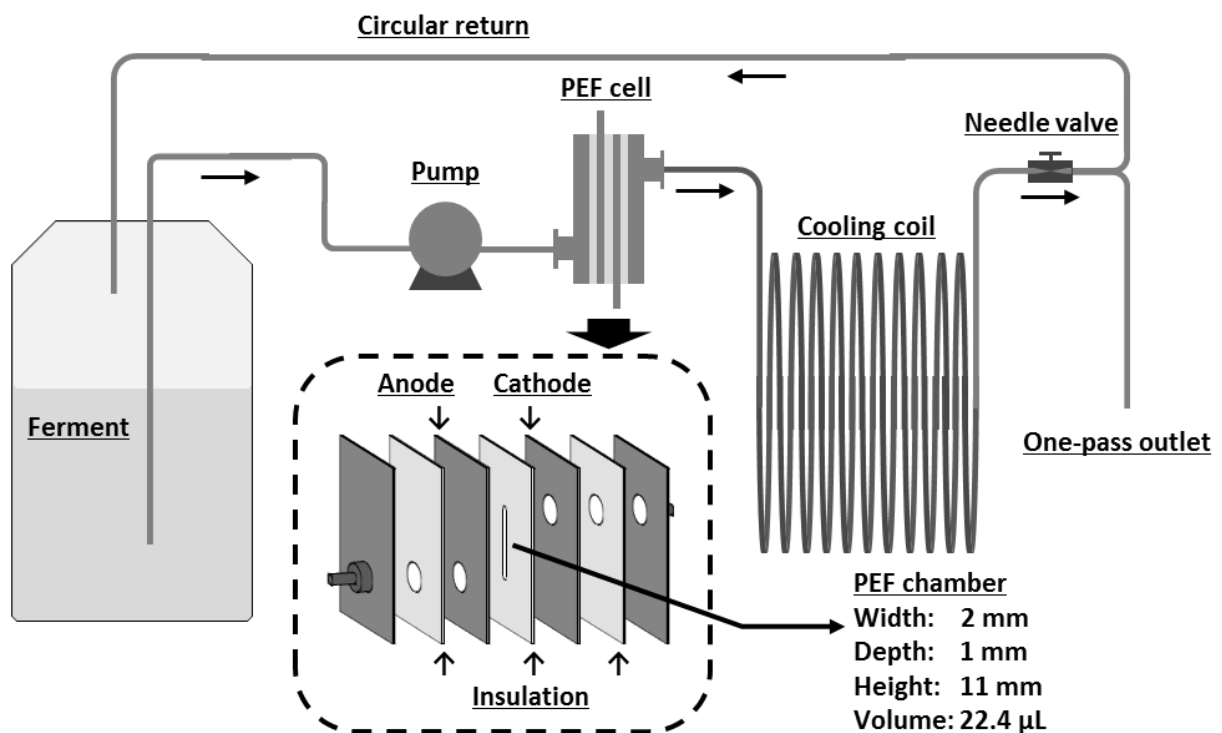


図 5.1 *L. cremoris* C4 菌培養液のパルス電界処理に使用した装置図

図中のファーマンターと冷却コイルは、いずれも定温水槽に浸漬して発酵温度である 25°C に維持した。

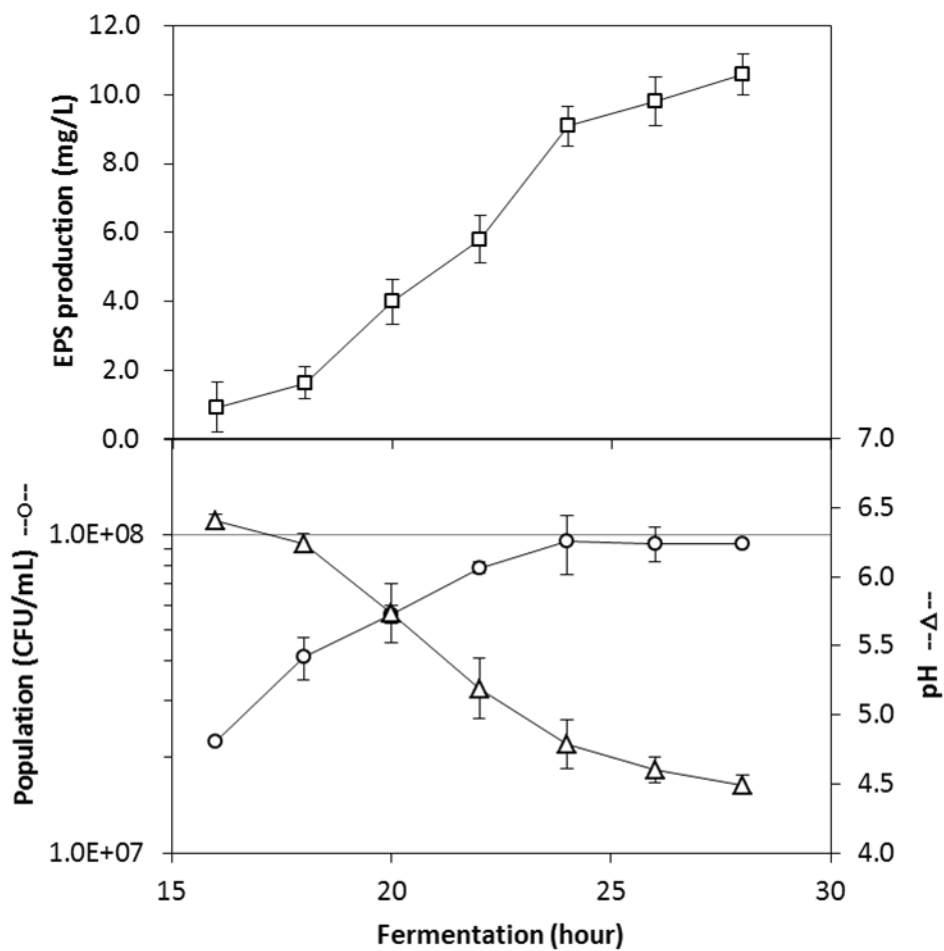


図 5.2 CDM 培地における *L. cremoris* C4 菌の生育と多糖類産生曲線

培養 18-22 時間の 4 時間、培養液を図 5.1 のパルス電界処理バイパスラインに循環させ、電界を印加しないまま通液させることにより、循環通液による物理的影響が同等となるように培養した。

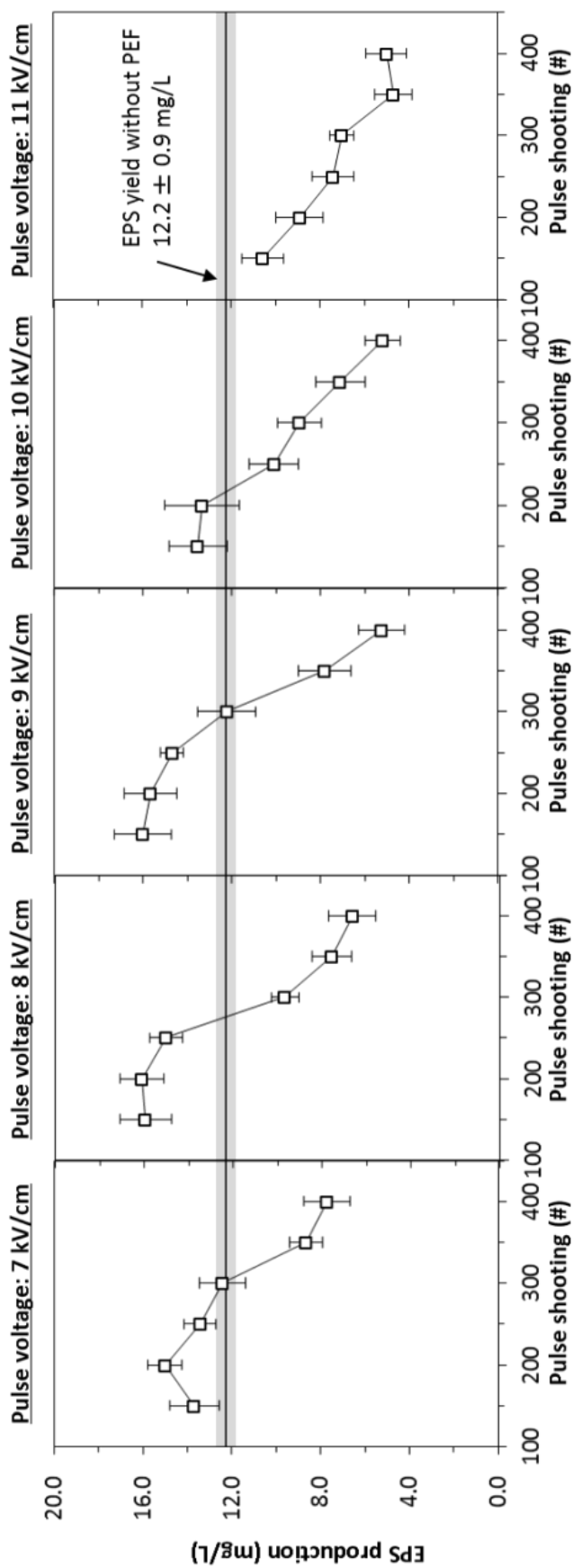


図 5.3 *L. cremoris* C4 菌による多糖類生産に対するワンパス通液によるパルス電界処理の影響

L. cremoris C4 菌を CDM 培地で培養し、培養 18 時間後に図 5.1 のパルス電界処理装置に通液してワンパス処理を行った。その後引き続き 24 時間まで培養を継続後に、多糖類の生産量を測定した。なお、図中の横線は、通常の静置培養 24 時間後の多糖類生産量を示しており、その標準誤差をストライプの幅で示した。

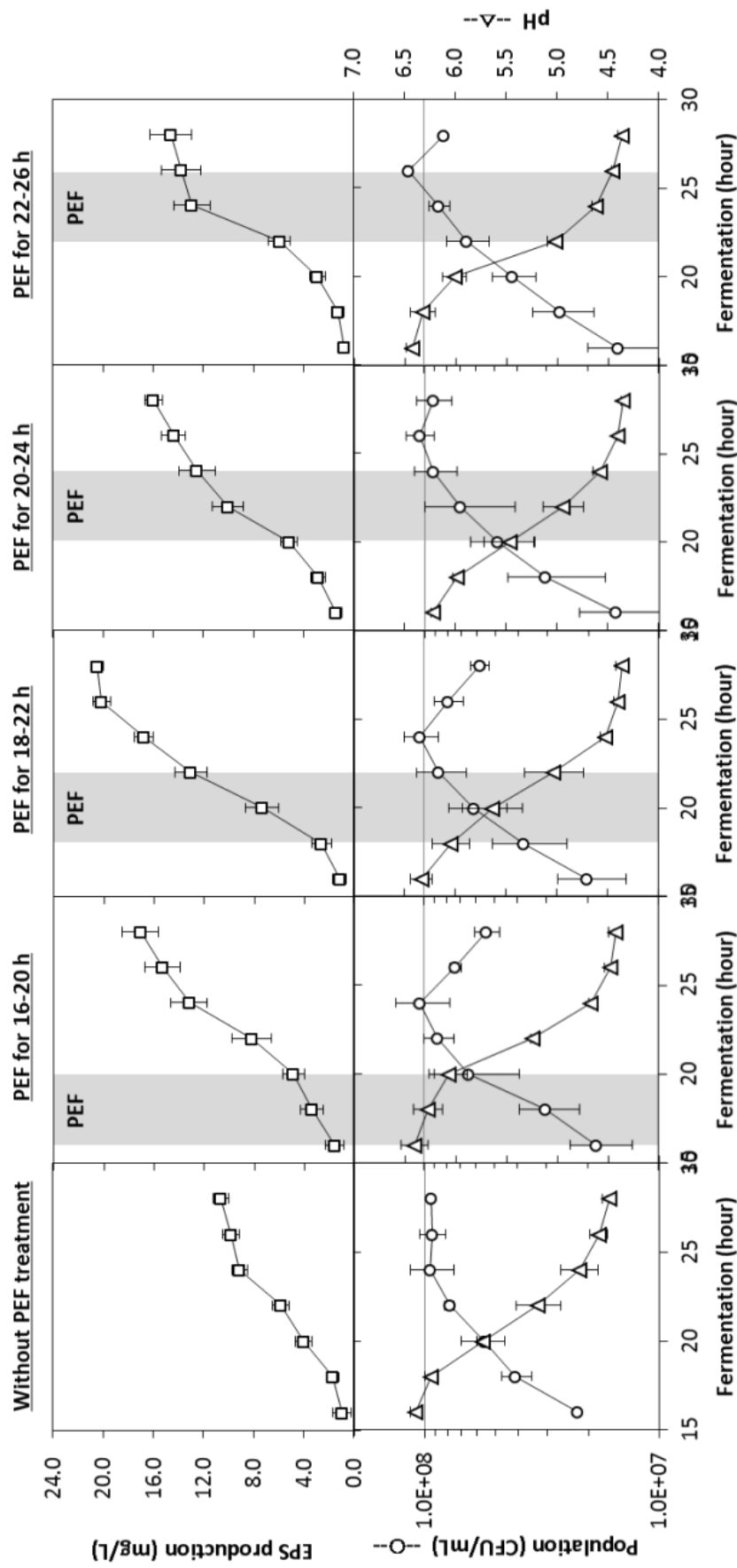


図 5.4 *L. cremoris* C4 菌による多糖類生産に対する循環通液によるパルス電界処理の影響

L. cremoris C4 菌を CDM 培地で培養し、図中のストライプが示すように、異なる生育ステージで循環通液を 4 時間継続しながらパルス電界処理を行い、2 時間おきに培養液を分析して、菌数、pH、多糖類生産量を測定した。

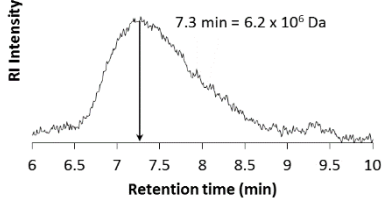
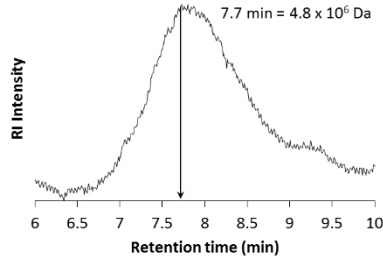
表 5.1 異なるパルス電圧で処理された菌体の細胞透過性

ワンパス処理は培養 18 時間後に行い、パルス電界フローセルを通過直後に菌体を回収して測定した。循環処理においては、培養 18-22 時間の 4 時間フローセルを循環させてから菌体を回収して測定した。

PEF treatment	One-pass treatment					Circular treatment		
	Control	8 kV/cm	9 kV/cm	10 kV/cm	11 kV/cm	12 kV/cm	Control	8 kV/cm
Permeability (per cent)	15.8	25.8	55.5	76.7	87.3	91.4	16.1	23.6
Increase vs control	-	10.0	39.7	60.8	71.5	75.6	-	7.5

表 5.2 通常培養とパルス電界処理培養による多糖類の化学組成や分子量の比較

化学組成比は分子比で示しており、リン酸基の分子数を 1 としたときの各構成単糖類の分子比を示している。

	EPS by normal fermentation	EPS by PEF treated fermentation
Chemical composition*	Glc:Gal:Rha:P = 2.7:2.2:0.9:1.0	Glc:Gal:Rha:P = 2.8:2.4:0.7:1.0
Molecular weight	6.2×10^6 Da	4.8×10^6 Da
Typical peak shape	 <p>RI Intensity vs Retention time (min). Peak at 7.3 min = 6.2×10^6 Da.</p>	 <p>RI Intensity vs Retention time (min). Peak at 7.7 min = 4.8×10^6 Da.</p>

* Molecular ratio based on phosphate as one molecule

表 5.3 通常培養とパルス電界処理培養による菌体中の β -ガラクトシダーゼ活性と多糖類生合成中間体由来の糖鎖量の比較

いずれの脚気も菌体量当たりの活性もしくは物質量で示しており、パルス電界処理による有意差を両側 *t*-検定で評価した。

	Normal cells	PEF treated cells	P value by t-test
β -Galactosidase (miller unit)	4.2 \pm 0.8	5.0 \pm 0.2	0.42
Sugar moiety (mg/L-ferment/OD ₆₀₀)	0.96 \pm 0.01	0.53 \pm 0.02	0.01 ⁺⁺

⁺⁺: significant difference in the 1 per cent of risk rate

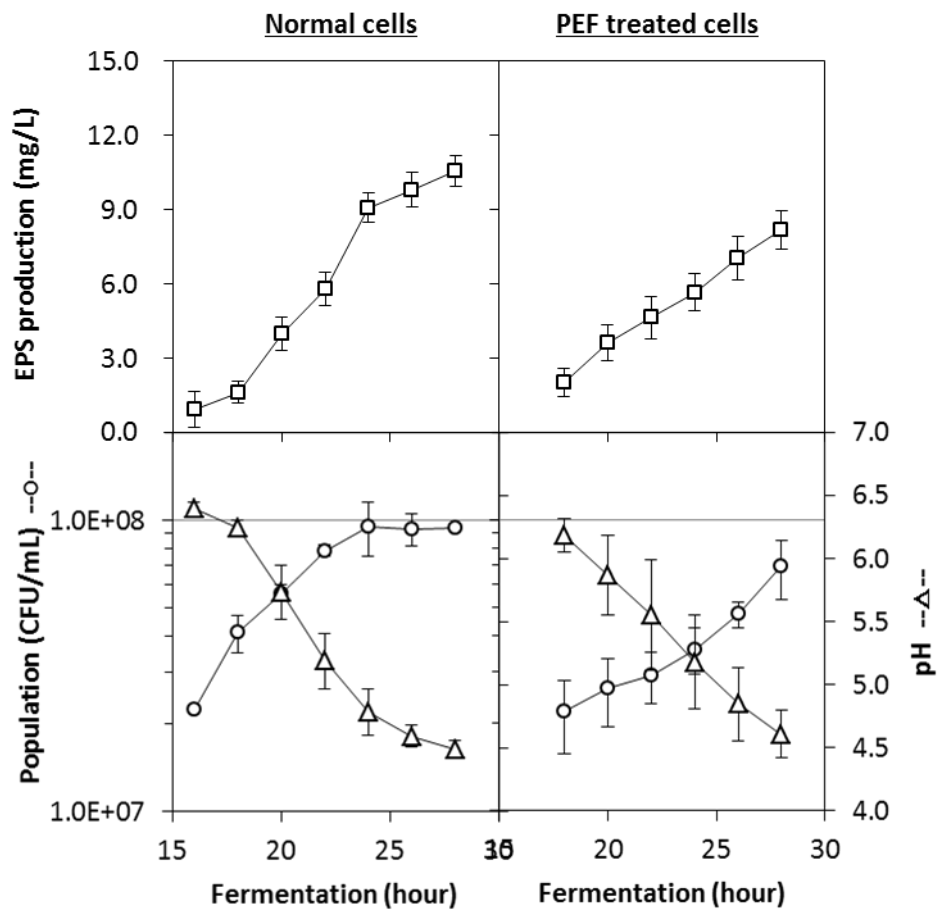


図 5.5 パルス電界処理された *L. cremoris* C4 菌のその後の継代培養における生育と多糖類産生曲線の変化

左図は通常菌体での生育（下段）や多糖類産生曲線（上段）を示し、右図がパルス処理を受けた菌体の結果を示している。

第6章 パルス電界処理による *L. cremoris* 菌での多糖類増産効果の機序

6.1. 序論

前章において、多糖類を生産する供試菌株 C4 株の培養中にパルス電界処理を行った結果、多糖類の分子量がやや小さくなるものの、生産量が約 2 倍に高まることが明らかになった (Ohba *et al.*, 2016)。また、パルス処理を行った菌体では多糖類の生合成中間体として菌体にプールされている糖鎖量が、パルス処理を行わない菌体の半量以下であったことや、パルス処理後の継代培養では多糖類増産効果が見られず、生合成に関連する代謝系の遺伝子にもたらされた形質変化ではないことも判明した。さらに、同様に多糖類産生能を有する *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *Bifidobacterium longum* に対するパルス処理の影響を調べた予備検討においても、供試菌株で見られたほど顕著ではないものの、*L. bulgaricus* 菌での多糖類生産量を高める効果が示唆された。

この章では、第 5 章の研究で初めて明らかになった、パルス電界処理による乳酸菌の多糖類増産効果に関し、その作用機序を明らかにすることを目的とした研究結果を述べる。第 5 章で得られた上記知見から考察されることは、パルス電界処理が供試菌株の代謝系、特に糖質の同化や異化に関わる酵素反応に影響を与えたと考えるか、または、細胞質膜表面で行われる多糖類の生合成スキームに対して、パルス処理が物理化学的な影響をもたらしたと考えるかのいずれかであるため、まず菌体の細胞質を用いたメタボローム解析の手法を応用した。

近年、細胞の機能発現を網羅的に解析する手法は発展してきており、Azizan ら (2012) は乳酸菌 *Lactococcus lactis* 菌の培養条件の変化による代謝への影響を、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー質量分析法 (HS/GC-MS) によるメタボローム解析を行い、有機酸、アミノ酸、脂肪酸などの代謝物質の変化について報告した。本研究では、陰イオン性代謝物質と陽イオン性代謝物質の両者を広く分析可能 (Soga *et al.*, 2003) な、飛行時間型質量分析を組み合わせたキャピラリー電気泳動システム (CE-TOFMS) を用いて、パルス電界処理による代謝物質の変化を調べた。

一方、生合成スキームに対する物理化学的な影響を調べる手段としては、走査電子顕微鏡観察による菌体表面の状態や形態の変化を調べるとともに、多糖類の生合成において糖鎖担体として機能するウンデカプレノール (Oba *et al.*, 1999a) の動態などを解析することとした。ウンデカプレノール (C₅₅-OH) は、炭素 5 分子のプレノールユニット

が 11 分子連結した長鎖アルコールであるが、転移酵素によりリン酸化されたウンデカプレニルリン酸 (C₅₅-P) となり、菌体外多糖類、莢膜多糖類、さらに、リポテイコ酸やペプチドグリカンなどの細胞膜や細胞壁の構成成分となる複合糖質を生合成する際に、細胞質膜にアンカーしながら糖鎖の担体として機能する (Bouhss *et al.*, 2008)。複合糖質の合成が終了すると遊離のウンデカプレニル 2 リン酸 (C₅₅-PP) となり、さらにホスファターゼにより脱リン酸されてウンデカプレニルリン酸 (C₅₅-P) に戻ると、再び複合糖質の生合成に参加するサイクルを繰り返す (Bickford & Nick, 2013)。

なお Barreteau ら (2009) は、上記 3 種類のウンデカプレノール派生物 (C₅₅-OH、C₅₅-P、C₅₅-PP) を逆相クロマトグラフィーで分離定量する方法を報告しており、その方法に従えば、上記のウンデカプレノール派生物の動態を調べる事が可能であり、それによって、供試菌株における多糖類生合成に対するパルス電界処理の物理化学的な影響を調べる手掛かりとなると考える。以下に、これらの検討結果をまとめ、多糖類生産促進効果の作用機序について考察する。

6.2. 実験材料および方法

6.2.1. 供試菌株と培養条件

第 5 章の検討に用いた C4 株を供試菌株に用い、乳糖 1% を配合した Chemically Defined Medium (CDM) 培地 (Otto *et al.*, 1983) を 0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌して培養に用いた。なお、対数増殖期の培養液を小分けにして -80°C で別途凍結保存しておいた、スターターカルチャー 1 mL を CDM 培地 9 mL に混合して 25°C で 16 時間以上培養し、これを賦活カルチャーとして実験に供する培地に 0.1% (vol/vol) 接種した。また、菌数を測定する場合は、Oxoid 社の M17 培地 1 L 当たり 10 g の乳糖と 12.75 g の寒天を添加したプレート培地に、培養液の希釈液を塗抹してから 25°C で 3 日間培養し、コロニー数を計測し希釈倍率を換算して求めた。

6.2.2. パルス電界処理

パルス電界処理には前章 5.2.4. に記載した装置 (図 5.1) を用い、上記の賦活カルチャーを行うことにより改善された培養条件において、培養後 13-15 時間の 2 時間培養液を循環しながらパルス処理を行った。パルス条件の設定においては、改善された培養条件では対数増殖期の倍加時間が早まったことを考慮して、882 μs のインターバル (1,131

Hz) で印加していた周波数を高め、443 μ s のインターバル (2,257 Hz) で印加することにより、菌体が分裂するまでの間に受けるパルスの回数を、前章 5.3.3.の至適条件である 200 回に合わせた。なお、パルス幅とパルス電圧についても前章 5.3.2.で確立した至適条件に合わせて、それぞれ 1 μ s で 8 kV/cm とした。これにより、循環連続処理中の平均電流量は 10-12 mA であり、パルス処理チャンバー出口付近においては 25°C の培養温度から 2-3°C 程度の温度上昇となるため、直後の冷却コイルが再び培養温度まで低下させる仕組みとした。

6.2.3. メタボローム解析用サンプル調製

CE-TOFMS 用のサンプルは培養 16 時間後と 24 時間後の培養液から調製し、いずれの場合も 13-15 時間の 2 時間パルス処理を行ったサンプルと、パルス処理フローセルに循環通液だけを行ったサンプルを調製した。なお、培養液を採取する際は、4°C に設定した冷却コイルを通すことにより、できる限り瞬時に菌の代謝を抑制させた。なお、分析後の代謝物質濃度を菌体当量で算出するため、600 nm での吸光度を予め測定しておいた。15 mL の培養液に対して 30 mL の氷温 Milli-Q 水を添加して粘度を低下させてから、6,000 \times g で 5 分間遠心分離して菌体を回収し、再度 50 mL の氷温 Milli-Q 水で懸濁して 8,000 \times g で 10 分間の遠心分離による培地成分洗浄作業を 2 度行った。

3 度目の遠心分離で得られた菌体沈殿物を 1.6 mL の氷温メタノールで懸濁し、30 秒間超音波処理してから 1.1 mL の内部標準溶液を混合した。その後 3,000 \times g で 10 分間遠心分離により菌体残渣を沈殿させ、上澄 1.4 mL を遠心式限外濾過モジュール Ultrafree MC PLHCC 分画分子量 5 kDa (Human Metabolome, Technologies Inc., Yamagata, Japan) に移し、9,100 \times g で 120 分間遠心して透過液を調製した。最後に透過液を真空下で乾燥させ、50 μ L の Milli-Q 水で溶解して CE-TOFMS に供するサンプルとした。培養時間とパルス処理の有無で 4 通りの実験区に対し、独立した 3 回の実験を行って合計 12 検体について解析を行った。

6.2.4. メタボローム解析

CE-TOFMS 分析は、飛行時間型質量分析器 6210 を接続したキャピラリー電気泳動システム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に、ヒューズドシリカキャピラリーカラム (50 μ m \times 80 cm) を装着して分析した。陽イオン性代謝物質は電気泳動バッファ H3301-1001 (Human Metabolome, Technologies Inc., Yamagata, Japan) でカラムをコン

ディショニングしてから、検体を 50 mbar の圧力下で 10 秒間に注入し、シース溶液 H3301-1020 (Human Metabolome, Technologies Inc., Yamagata, Japan) を 10 μ L/min の流速で流しながら、27 kV の電圧で電気泳動を行った。エレクトロスプレーイオン化質量分析器 (ESI-MS) を陽イオンモードに設定し、キャピラリー電圧を 4,000 V、ネブライザー圧力を 5 psig、窒素ガスを 300°C の温度で流速 7 L/min で供給した。質量スペクトルは 50-1,000 m/z の幅で、1.5 cycle/s の周期で記録した。

陰イオン性代謝物質は電気泳動バッファ H3302-1021 (Human Metabolome, Technologies Inc., Yamagata, Japan) でカラムをコンディショニングしてから、検体を 50 mbar の圧力下で 25 秒間に注入し、陽イオン分析と同じシース溶液を 10 μ L/min の流速で流しながら、30 kV の電圧で電気泳動を行った。ESI-MS を陰イオンモードとし、キャピラリー電圧 3,500 V、ネブライザー圧力と窒素ガスの供給および質量スペクトルの記録周期はすべて陽イオン分析と同じ条件とした。

6.2.5. 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

走査電子顕微鏡 (SEM) による観察には、パルス電界処理直後 (培養 15 時間後) の菌体と、処理後 3 時間の培養を継続した菌体 (培養 18 時間後)、さらに対象区としてパルス電界処理を行わずに 18 時間培養した菌体を用いた。それぞれの培養液は冷却コイル出口から採取し、Nanopercolator Sem Pore (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で濾過して膜表面に菌体を回収した。その後、カコジル酸ナトリウムバッファによる 2.5% グルタルアルデヒドと、2% ホルムアルデヒドにより 15 分間処理して菌体を固定化した。同じバッファで菌体を十分に洗浄し、やはり同じバッファで調製した 1% 四酸化オスミウムで 4°C で 30 分間さらに固定化を行った。固定化した菌体は、50% から 100% まで順次濃度を高めたエタノールで脱水処理を行い、最後に tert-ブチルアルコールで洗浄した。固定化菌体は凍結乾燥で完全に乾燥させてから、Smart Coater DII-29010SCTR (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いて表面に金蒸着を行い、JCM-6000 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) により SEM 観察を行った。

6.2.6. ウンデカプレノイド (C₅₅) 分析

培養 13 時間後から 15 時間後までパルス電界処理を行い、処理終了後直ちに冷却して回収した菌体と、パルス処理を行わずに 15 時間培養した菌体を回収し、多糖類生合成における糖鎖担体であるウンデカプレノールリン酸の動態を調べた。4°C に冷却した

まま 18,000×g で 2 時間遠心分離して得られた菌体を凍結乾燥し、4.2.2.や 5.2.8.に記載した方法で、1203 溶媒（クロロホルム：メタノール：水 = 1:2:0.3（容量比））による抽出物を調製した。1203 抽出物は 3 ポーションに等分してから凍結乾燥し、1 部はそのままクロロホルムに溶解して、以下に述べる HPLC 分析により遊離の C₅₅-P を測定した。残り 2 ポーションについては、0.1 M 塩酸による酸加水分解（100°C、10 分間）または 60%水酸化カリウムによるアルカリ加水分解（100°C、60 分間）を行った。酸加水分解では、多糖類生合成中間体やウンデカプレノール派生物における全てのリン酸 2 エステル結合を分解するため、遊離の C₅₅-OH とリン酸および糖鎖部分が生成する (Ielpi *et al.*, 1981)。一方のアルカリ加水分解では多糖類生合成中間体には影響を与えず (Lennarz & Scher, 1972) に、遊離の C₅₅-PP を脱リン酸して C₅₅-P に変換することが報告されている (Kato *et al.*, 1999)。それぞれの加水分解後、反応液にクロロホルムを混合して C₅₅-OH や C₅₅-P を 2 層分離後に回収して以下の HPLC 分析に供した。

C₅₅-OH や C₅₅-P の分析は、Barreteau ら (2009) によるオクタデシル (C18) 逆相カラムによる方法に従い、Intersil ODS-3 (GL Science, Tokyo, Japan) を用いて 2-プロパノール：メタノール = 1:4 に 10 mM リン酸を含む溶出液を 1 mL/min の流速で流して分離した。なお、市販のウンデカプレノールとウンデカプレニルリン酸 2 アンモニウム塩 (Larodan Fine Chemicals AB, Solna, Sweden) を標品として、サンプル中の C₅₅-OH や C₅₅-P を定量した。菌体中には多糖類の生合成中間体に加えてウンデカプレノイド派生物が含まれる (Bouhss *et al.*, 2008) が、上記のように酸・アルカリの加水分解を組み合わせることにより、それぞれのウンデカプレノイド派生物の含量を算出できるため、パルス電界処理による変化を調べることができる。酸加水分解後の C₅₅-OH 含量はウンデカプレノイドの総量を示し、アルカリ加水分解後の C₅₅-P 含量から、加水分解を行わないサンプル中の遊離 C₅₅-P 含量を差し引くことにより、菌体中に含まれていた遊離 C₅₅-PP の含量を算出することができる。さらに、酸加水分解後の C₅₅-OH 含量から、加水分解を行わないサンプルに含まれていた C₅₅-OH や C₅₅-P や上記の遊離 C₅₅-PP の含量を差し引くことにより、糖鎖を結合した中間体量を算出することが可能となる。

6.3. 結果

6.3.1. パルス電界処理による誘電緩和の影響

実際のパルス電界処理ではパルス電圧とパルス電流をモニターし、図 6.1-A にはパ

ルス波形を示した。また、本発酵物を用いてインピーダンス測定を行い、誘電緩和特性を図 6.1-B に示した。図 6.1-A に見られるように、最大電圧は 8 kV/cm のパルスが 1 μ s のパルス幅で発生しており、そのピーク電圧時にパルス電流は 9.7 A に達している。その後パルスの減衰によるリングングと見られる現象により、電流値は一旦マイナス値を示し、パルス発生時から 4 μ s の時点ではほぼゼロ電流に減衰した。一方、図 6.1-B に示した誘電緩和の解析に当たっては、Kumagai (2008) や Chassagne ら (2016) の論文を参考に行い、比誘電率 (ϵ') と誘電損失 (ϵ'') をプロットした結果、緩和時間と緩和周波数はそれぞれ 0.14 μ s および 1.10 MHz となった。この結果から、電極分極の二重層形成をもたらす静電遮蔽効果や誘電緩和現象による影響は、パルス電界が本来菌体にもたらす電気化学的影響を、大きく妨げるようには作用していないことが明らかになった。

6.3.2. パルス電界処理中の多糖類生産

前章においては、至適なパルス電界処理を行った場合に、培養終点での多糖類生産量がパルス処理を行わない場合と比較して、約 2 倍の生産量になることを報告した。ここでは、パルス電界処理中の特異的な多糖類生産量を測定するため、培養 13 時間後の菌体を遠心分離により回収し、直ちに新しい培地に懸濁して培養を継続するとともに 2 時間のパルス電界処理を行った。パルス処理 1 時間後と 2 時間後の培養液を回収し、それぞれパルス処理を行わなかった培養液を対象区として、多糖類の生産量を測定した。

表 6.1 に示した結果のように、パルス電界処理を行った場合には、すでに 1 時間後の段階で処理を行わない場合よりも多糖類生産量が高まり、2 時間後ではさらにその差が顕著になった。この章での実験においては、凍結スターターを一度賦活培養して菌の増殖を同調してから培養したため、図 6.2 に示した生育特性のように前章の図 5.2 よりも誘導期からの立ち上がりが早く、対数増殖期に入ってから倍加時間も約 1.6 倍 (4.9 時間から 3.1 時間) 早くなった。このため、本章でのパルス電界処理においては、前章の実験で採用したパルス頻度を 2 倍に高めて処理しており、結果的に表 6.1 に示した 2 時間処理後の多糖類生産量 8.7 mg/L は、パルス処理をしない場合の生産量 5.6 mg/L の約 1.6 倍に相当し、前章において半分のパルス頻度で 4 時間処理した場合に、多糖類生産量が約 2 倍となった結果には及ばないものの、明らかに多糖類生産が促進されることが再検証された。

一方、同じく表 6.1 に示したように、パルス電界処理 2 時間後で生産された多糖類の分子量が 3.3×10^6 Da であるのに対し、パルス処理せずに 2 時間培養して生産された

多糖類の分子量は 4.7×10^6 Da であった。最終培養物での分子量を比較した前章の結果では、パルス処理した場合の多糖類が 4.8×10^6 Da、非処理の場合が 6.2×10^6 Da であり、パルス処理中に生産された多糖類だけの分子量サイズを測定した本章での結果は、回分培養通期で生産された多糖類の分子量サイズよりも小さい傾向を示したものの、パルス処理を行った場合に分子量が低下する傾向も再検証された。

6.3.3. 代謝物質の変化

CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った結果、本供試菌株 C4 株の細胞質から、87 種の陽イオン性物質と 137 種の陰イオン性物質、合計 224 種の代謝物質が同定された。パルス電界処理された検体と処理されていない検体の物質同定データをもとに主成分分析 (PCA) を行い、主成分 1-3 について解析した結果を図 6.3 に示した。パルス電界処理の有無を P と C、培養時間 2 水準の 16 時間と 24 時間、さらに 3 回の実験を 1-3 とするサンプル ID で示した、主成分 1 vs. 2 および主成分 1 vs. 3 の PCA プロットから、主成分 1 は培養時間であることが明らかであり、パルス処理は主成分 2 ではなく主成分 3 であると思われる。なお、それぞれの寄与率は、培養時間である主成分 1 で 32.6%、パルス処理と見られる主成分 3 は 11.2% と高くはなく、パルス電界処理が代謝物質に大きな変化をもたらすものではないことが明らかである。

一方、同定された 224 代謝物質の増減を示すヒートマップを、図 6.4 に示した。培養 16 時間および 24 時間のいずれにおいても、パルス処理を行わない対象区 2 番サンプルの挙動が他の 1 番および 3 番と異なっており、代謝物質の含量の変化における統計的有意差の解析に影響を与えていることは明らかである。また、224 物質の変化の傾向としては、菌体の増殖に関与する核酸や糖質関連物質の濃度が培養 16 時間で高く、培養 24 時間の菌体では核酸に加えてアミノ酸の濃度が高い傾向が見られ、パルス処理の有無以上に、菌体の増殖ステージの違いによる代謝の変化が読み取れる結果となった。

なお、224 代謝物質の中でパルス処理の有無で統計的有意差が認められた、18 の化合物を表 6.2 にまとめた。中でも 3 つの脂肪酸 (ヘキサン酸、デカン酸、ラウリン酸) の濃度は、培養時間に関わらずパルス電界処理を行った場合に有意に低下していた。その原因は恐らく、パルス処理でダメージを受けた細胞質膜の修復のために、必要とする複合脂質の生産が高まりプールされていた脂肪酸の含量が低下したものと考えられる。唯一、パルス処理によって有意に増加した化合物として、芳香族アミノ酸の生合成における中間生成物である 3-デヒドロシキミ酸があげられるが、その生合成の上流や下流

にある中間代謝物が同定されなかったため、増加した原因を推定することはできない。

また、多糖類の生産に最も影響する糖代謝系における代謝物質に関し、メタボローム解析で同定・定量された物質については、パルス電界処理の有無による菌体内濃度の違いを図 6.5 に示した。図中の各代謝物質に示した数字は、通常発酵した菌体（培養 16 時間後）における当該代謝物質の菌体内濃度に対して、パルス電界処理を行った菌体での濃度比を示している。1.0 を下回る代謝物質はパルス電界処理により低下したことを示し、1.0 を上回る場合は増加したことを示す。

培地中乳糖の菌体内への取り込みは様々なルートがあるが、タガトース 6 リン酸経路、フルクトース 6 リン酸経路、ガラクトース代謝経路のいずれかを介して異化や同化反応が進行する。タガトース 6 リン酸経路およびフルクトース 6 リン酸経路を通じて解糖系を進む代謝については、パルス電界処理を行った場合に若干濃度が下回る程度で進行するが、そこからクエン酸回路を進みエネルギー生産までの代謝においては、コハク酸やリンゴ酸の濃度低下とその結果である ATP 濃度の低下が顕著である。パルス電界処理を行った菌体ではピルビン酸やクエン酸の濃度が増加しており、損傷した細胞質膜の修復や多糖類を増産するためのエネルギー供給のためクエン酸回路の働きを高める傾向にシフトしているが、生産されたエネルギーの消費の方が上回り ATP 濃度が低下したものと考えられる。

6.3.4. 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

図 6.6 に、3 検体の代表的な SEM 観察結果を写真で示した。A は通常どおり 18 時間培養した菌体であり、B は培養 13-15 時間においてパルス電界処理を行った直後の菌体を、C は 13-15 時間のパルス電界処理後に 3 時間培養を継続した菌体を示す。A の通常発酵では、菌体の周囲に多糖類が繊維状に絡まって菌体と菌体を繋ぐネットワーク構造となっており、他の多糖類産生乳酸菌で報告 (Ayala-Hernandez *et al.*, 2008, Hassan, 2008) されている写真と同様な状態が観察された。これに対し、B のパルス電界処理直後の菌体では、多糖類の繊維状のネットワークが完全に失われており、加えて菌体表面に横皺が入り滑らかさが失われた状態を呈した。しかしながら、菌体に穴は見られず電気穿孔は起きていないものと考えられ、前章で細胞透過率の増加が 7.5%程度であった結果を裏付けている。なお、B の状態から 3 時間培養した後の菌体 C では、菌体表面の滑らかさと繊維状のネットワークが修復されてきており、細い繊維ではあるが一部では菌体間を繋ぐ状態が戻りつつある。Ayala-Hernandez ら (2008) は、*L. cremoris* JFR1 をバターミルクで発酵させた場合に、生産された多糖類が乳タンパク質と凝集して繊維状のネッ

ネットワークを形成すると報告したが、この実験ではタンパク質を含まない化学合成培地を使用しており、繊維状のネットワークは細胞質膜にアンカーされ、鎖長の伸長が進んだ多糖類の中間体であるか、あるいは、培地中に放出された多糖類が絡んで形成されたものであると考えられる。したがって、パルス処理直後の B の菌体で、繊維状ネットワークが完全に消失していたことは、多糖類の中間体が菌体から切り離されている状態であると推察された。

6.3.5. ウンデカプレノイドの変化

第4章において、*L. cremoris* 菌の多糖類生合成において中間体糖鎖のキャリアーとして機能する脂質はウンデカプレノール (C₅₅-OH) であり、真核生物において同様の機能を果たすドリコール (C₅₅-OH) ではないことを報告した (Oba *et al.*, 1999a)。従って、本供試菌株 C4 株において多糖類の生合成スキームに関与するのは、ウンデカプレニルリン酸 (C₅₅-P) やウンデカプレニル2リン酸 (C₅₅-PP) と考えられる。表 6.3 に、パルス処理を行わずに 15 時間まで培養した菌体と、13-15 時間の 2 時間パルス処理を行った直後の菌体における、総ウンデカプレノイド量と遊離の C₅₅-OH や C₅₅-P および C₅₅-PP の組成を示した。その算出方法は 6.2.6. の末尾に記載したが、総ウンデカプレノイド量から遊離の C₅₅-OH や C₅₅-P および C₅₅-PP を差し引いたものが、実際に糖鎖に結合した中間体であると想定され、主に多糖類の生合成中間体であると考えられる。

パルス電界処理により遊離 C₅₅-P の含量が増加し、総ウンデカプレノイド量の 71% にも相当したが、遊離 C₅₅-PP の含量は非処理の場合よりも若干減少した。この結果は、パルス処理により、ウンデカプレニル2リン酸に糖鎖が結合した中間体のリン酸2エステル結合が開裂されることを示唆しており、一部の遊離 C₅₅-PP も脱リン酸されて C₅₅-P となったことも推定される。総ウンデカプレノイド量もパルス電界処理により 32% ほど増加しており、多糖類の生合成で糖鎖担体を増産するために、ウンデカプレノイドの代謝自体も活性化されたものと考えられた。非処理の菌体において遊離の C₅₅-P および C₅₅-PP の含量は、総ウンデカプレノイド量の 36% に相当しており、遊離 C₅₅-OH が検出されなかったことを考慮すると、残る 64% のウンデカプレノイドは糖鎖を結合した中間体として存在していたと考えられる。

パルス処理を行った菌体においても遊離 C₅₅-OH が検出されなかったことから、全てのウンデカプレノイドが C₅₅-P または C₅₅-PP として、多糖類や複合糖質の生合成に関与していたと考えることができる。表 6.1 と 6.3 から、培養液 1 L 当たりの多糖類生産

量と菌体 1 g 当たりのウンデカプレノイド量がわかっているため、C₅₅-P の分子当たりの多糖類生産性を算出して表 6.4 にまとめた。表 6.3 において、パルス処理しない乾燥菌体と処理した乾燥菌体 1 g 当たりの C₅₅-P 含量が、それぞれ 324.9 および 428.5 nmol であり、1 g の乾燥菌体は対数増殖期後期の培養液では約 1.6 L であるため、表 6.1 のように 5.6 および 8.7 mg/L の多糖類生産量は 203.0 および 267.8 nmol/L の C₅₅-P によって生合成されたと考えられる。パルス処理しない場合と処理した場合の多糖類の分子量は 4.7×10^6 Da および 3.3×10^6 Da (表 6.1) であり、上記の生産量をモル濃度に変換すると、それぞれ 1.2 および 2.6 nmol/L となる。従って、C₅₅-P の分子当たりの多糖類生産性は、 5.9×10^{-3} (1.2 nmol-EPS / 203.0 nmol-C₅₅-P) および 9.7×10^{-3} (2.6 nmol-EPS / 268 nmol-C₅₅-P) と算出される。このことから、パルス電界処理を行った菌体においては、より効率的に多糖類の生産が行われていたことが示唆された。

6.4. 考察

本研究では、多糖類産生乳酸菌にパルス電界処理を行い、電気化学的な処理による多糖類生産への有益な効果があれば、発酵のエンジニアリングとしての技術確立を目指している。第 5 章にまとめたように、供試菌株 C4 株において対数増殖期後半に穏やかなパルス電界処理を行うことにより、多糖類の生産量が約 2 倍となる効果が示唆されたことは、本研究の目的の核となる知見が得られたと考えられる。パルス処理での至適条件では、細胞透過性があまり高くならず、菌体へのダメージが限定的であることが判明した。また、パルス処理により多糖類の生産量が増加する一方で、菌体内にプールされている中間体の量は減少することも明らかとなった。なお、パルス処理した菌体を継代培養した結果、多糖類の増産効果は遺伝的に獲得した形質ではなく、処理に対する一時的なレスポンスがもたらす現象であると考えられた。

パルス電界処理は遺伝子組み換えのために細胞に電気穿孔する技術 (Wang *et al.*, 2010) として広く利用され、また、電気穿孔による液体上食品の殺菌技術 (Morales-de la Peña *et al.*, 2011) としても応用されてきている。これらはいずれも細胞や菌体の一部を破壊することに基づいた応用例であるが、細胞や菌体に電気化学的な刺激を与えることにより代謝を改変しようとするような応用例は報告されていない。第 5 章で確立したパルス処理条件は、電気穿孔の閾値といわれる 10 kV/cm (Zimmermann, 1986) を下回る電界であり、それにより菌体の損傷を限定的なレベルに抑えながらも、多糖類の生合成を

高める効果を示した。従って、その作用機序を明らかにすることが、この章の研究の主な目的としていた。

メタボローム解析の結果から、いくつかの脂肪酸含量においてパルス処理による有意差があったが、これはパルス処理で部分的に損傷した細胞膜を修復することに起因するものと考えられる。また、解糖系、糖リン酸や糖ヌクレオチド経路など、多糖類の生合成経路に関わる代謝物質には有意差が見られず、作用機序解明への手掛かりを与える結果にはならなかった。一方で、この乳酸菌発酵物が乳製品となることを想定した場合において、有機酸、アミノ酸、核酸など味や風味に影響する代謝物質についても、パルス処理による有意差が見られなかった。これらの結果は、パルス電界処理を乳酸菌発酵食品に応用することを前提とした場合、味や風味への影響をもたらさない点において、食品加工技術として応用できる可能性を示唆している。

パルス電界処理直後の菌体の SEM 写真では、明らかに繊維状のネットワーク構造を消失していた。本菌株の多糖類のような菌体外多糖類 EPS (extracellular polysaccharide) は、菌体を取り巻く細胞表層の一部として機能する莢膜多糖類 CPS (capsular polysaccharide) (Malang *et al.*, 2015) とは異なり、生合成が完了すると菌体から培地中に放出される。従って、菌体同士を繋ぐ繊維状のネットワークとなっている多糖類は、未だ生合成が完了せず細胞質膜に固定された中間体同士が絡み合って形成されたものと考えられる。パルス処理によって繊維状のネットワークが菌体から消失した原因として、電界がもたらす電気濃縮が関与しているものと考えられる。電極間に存在する菌体は絶縁体となるため、水素イオンは菌体の陽極側表面に、水酸化物イオンは菌体の陰極側表面に濃縮する現象が起こる (図 6.7-B)。Ielpi ら (1981) がキサントンの生合成中間体の解析に応用したように、10 mM 塩酸により 100°C で 10 min 加熱すると、脂質結合型多糖類中間体におけるリン酸 2 エステル結合が加水分解され、その糖鎖が脂質から解放されることが知られている。供試菌株の培養において、対数増殖期中期では約 pH 5.0 程度まで乳酸発酵 (図 6.7-A) が進んでおり、その環境で発生する電気濃縮では、水素イオン濃度は局所的にミリモル濃度に達するはずである。一方、電界で発生する電流によるジュール熱で、パルス電界セル出口付近での液温は 2-4 °C 程度上昇しており、電極間においてはより高い温度上昇が推定される。局所的な水素イオン濃度の上昇による pH の低下と温度上昇が揃えば、中間体の糖鎖と細胞質膜に固定されている担体脂質との間のリン酸 2 エステル結合が加水分解されて糖鎖が解放され、図 6.7-C のように菌体を繋いでいた繊維状のネットワークが消失したものと考察した。

パルス電界処理により中間体の糖鎖が切り離される原因に関与するもう一つの要因として、この多糖類がリン酸化多糖類であることからリン酸基のマイナスチャージの影響が考えられる。第3章に述べたように、同じく *L. cremoris* 菌の SBT0495 株が生産するリン酸化多糖類は多価電解質として、リン酸基のマイナスチャージによる分子内及び分子間の静電的反発力が働いていることを報告 (Oba *et al.*, 1999b) した。この章の実験に用いた C4 株の多糖類の化学組成から、SBT0495 株の多糖類 (図 2.1) や NIZO B40 株の多糖類 (図 1.2-A) と同様の構造であると推定され、その重合構造の分子量は約 890 Da に相当する。C4 株の多糖類の分子量はパルス電界処理の有無により、 4.7×10^6 Da から 3.3×10^6 Da に変化しており、最低でも約 3,700 重合単位分のリン酸基を含んでいる計算となる。中間体の糖鎖に含まれるリン酸基がマイナスチャージを帯びていれば静電的に陽極に牽引されるはずであり、リン酸 2 エステル結合の加水分解とともに、繊維状のネットワークを形成していた糖鎖を引き離す力として作用したはずである。

Islam & Lam (2014) が総説にまとめたように、多糖類生合成における重合と鎖長制御の仕組みにおいて、多糖類の繰り返し構造であるオリゴ糖ユニットは、細胞質膜の外側に輸送されると、そこですでに重合が進行している別の中間体の糖鎖の根元に挿入されるように重合される。その後、糖鎖の鎖長が十分な長さになると、Wzz 鎖長制御タンパク質の作用により糖鎖が切り離されて培地中に放出される。上記のようにパルス電界処理による電気化学的な作用により、通常多糖類生合成により一定の鎖長にまで重合が進む前に、糖鎖が切り離され培地中に解放されたと考えると、前章に述べたように多糖類の分子量が低下する結果を説明することができる。なお、糖鎖が切り離されて遊離する担体脂質ウンデカプレニルリン酸は、次の糖鎖を形成するための担体として利用されるので、通常生合成でのサイクルよりも回転率が高まることも推定され、多糖類の生産重量が増加した結果を考察することもできる。実際に、ウンデカプレノールリン酸 1 分子当たりの多糖類生産性は、パルス処理を行った方が約 64% 高まっており、生合成サイクルの回転率が高まることを示唆している。本章および前章での結果から、パルス電界処理はゲノムレベルでの変化やメタボローム解析での大きな変化をもたらすものではないことが判明したが、電気化学的なメカニズムにより細胞質膜表面での生合成スキームに影響を与える (図 6.7) ことが明らかとなった。乳酸発酵が進んだ状態 (図 6.7-A) でのパルス電界処理は、電気濃縮により局所的に酸性度の高い環境を細胞質膜表面に形成 (図 6.7-B) し、中間体の膜表面に位置するリン酸が加水分解されて、未成熟な多糖類が培地に放出される。糖鎖担体となるウンデカプレノイド自体が増産され、

多糖類の生合成に必要となる ATP 生産のために、ピルビン酸やクエン酸などのクエン酸回路を回す代謝物質の濃度も増えているため、多糖類の生合成サイクルを回すためのキャリアーとエネルギーの両方が増加することにより生産性が高まり、多糖類の分子量は低下するものの生産された質量自体は2倍程度まで増加することが判明した。

パルス電界処理は多糖類の生産性を劇的に向上させる効果や、代謝を大きく変化させるような効果を有するエンジニアリングツールではないが、多糖類発酵の生合成メカニズムに作用して生産量を高める効果を示した。多糖類の分子量は若干低下するため、この乳酸菌を使用した発酵乳の粘度を高めるための手段としてパルス電界処理を行うことは適切ではないかもしれないが、多糖類がもたらす保健効果を高める目的には有効な技術であると考えられる。保健効果は、通常多糖類の構造と因果関係のあるものであって、分子量に関係するものでないことから、生産量を増加することができれば保健効果を増幅することが期待される。上記の考察において、多糖類の多価電界質としての性質によるマイナスチャージが、中間体の糖鎖を陽極側に引き寄せる静電的牽引力となり、パルス電界処理による糖鎖の切り離し効果を高めたとする仮説については、今後の研究による検証を要する。しかしながらその効果が検証された場合には、中性多糖類を生産する乳酸菌にこの技術を応用する場合には、パルス電界処理条件を強化し、電気濃縮率を高めて細胞質膜表面での pH をより低下させる条件とするか、さらに乳酸発酵が進んで培養液の pH をさらに下げた条件でパルス処理を行うなどの調整を要すると考えられる。いずれにせよ、多糖類の生産性向上効果を十分に引き出すためには、多糖類の性質や乳酸菌の種類に応じて至適なパルス電界処理を設定する必要がある。次章において、各種のパルス処理条件を検討し、多糖類生産性向上効果との関係について考察する。

6.5. 結論

メタボローム解析の結果から、部分的に損傷した細胞質膜の修復に必要な脂肪酸や、修復に要するエネルギーを生産する代謝物質の一部で有意に変化が見られたが、パルス電界処理が菌の代謝全般に与える影響は限定的であり、発酵食品への応用を前提とした場合に品質に大きな変化を与えるような影響が無いことが明らかとなった。代謝全般の解析では多糖類増産の機序を説明する結果が得られなかったため、多糖類の生合成サイクルに対するパルス電界処理の影響を調べた。その結果、多糖類の生合成における糖鎖を結合した状態の中間体の濃度がパルス電界処理後に約半減していたことや、一方で、

糖鎖の担体であるウンデカプレノールリン酸 1 分子当たりの多糖類生産性が、パルス電界処理により 64%向上したことも明らかとなった。また、パルス電界処理前後の菌体の SEM 写真から、繊維状の多糖類ネットワーク構造が完全に消失していることが明らかになった。

パルス電界処理がもたらす影響に関する上記の知見を総合的に考察し、多糖類増産への作用機序について以下のメカニズムを提起した。パルス電界処理を開始する対数増殖期中期では約 pH 5.0 程度まで乳酸発酵が進んでおり、水素イオン濃度が高まった状態で電界を印加すると、水素イオンは菌体の陽極側表面に濃縮し細胞質膜表層で局所的に pH が低下する。細胞質膜表層では、脂質結合型多糖類中間体におけるリン酸 2 エステル結合部分が糖鎖をウンデカプレノイドと繋いでいるが、局所的な低 pH 環境でエステル結合が開裂し糖鎖が中間体から解放される。この現象により、糖鎖を結合した中間体の濃度が半減していた結果や、SEM 写真において多糖類ネットワークが消失した事象を説明することができる。

一方、パルス電界処理により分子量 4.7×10^6 Da が 3.3×10^6 Da に 30%低下したことは、重合に要する時間も同様に低下することを意味しており、ウンデカプレノイドが次の生合成サイクルへと利用される時間当たりの回転率は高まることになる。そもそも、パルス電界処理によりウンデカプレノイド自体も 32%増加しており、さらに、多糖類生合成に必要な ATP を生産するためにピルビン酸やクエン酸の濃度も、パルス電界処理で高まることから、結果的に多糖類の生産性が 64%高まり増産されることがパルス電界処理の作用機序であると結論した。

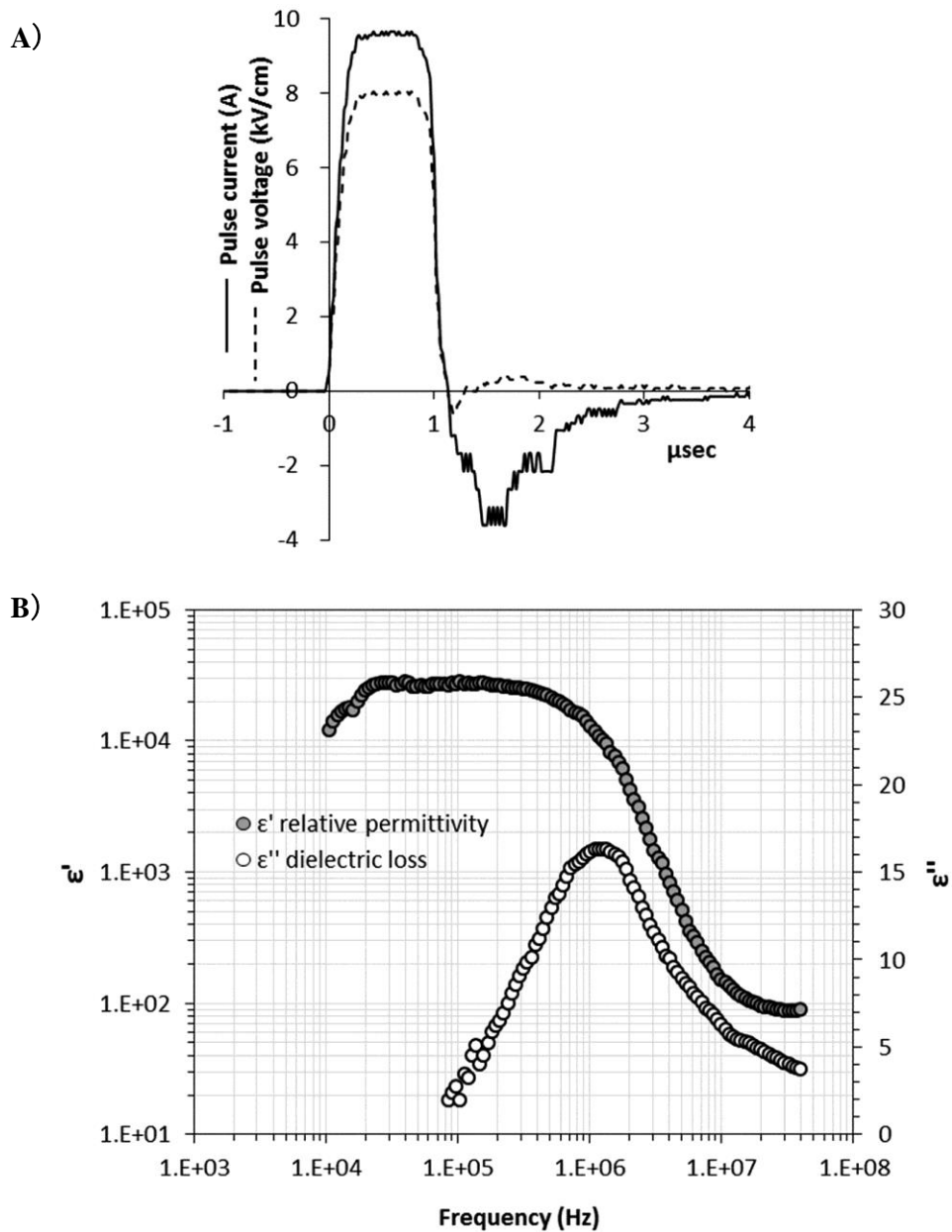


図 6.1 パルス電界処理におけるパルス波形と誘電緩和の影響

A) パルス電圧およびパルス電流によるパルス波形, B) 化学合成培地におけるインピーダンス測定による誘電緩和特性。図中 ϵ' は比誘電率を示し、 ϵ'' は誘電損失を示す。

表 6.1 対数増殖期の菌体によるパルス電界処理時間と多糖類生産量の関係

発酵 13 時間後の菌体を遠心回収してから新培地に懸濁し、25℃で発酵を継続しながらパルス電界処理を行い、1 時間後と 2 時間後の多糖類生産量を、パルス処理しない菌体による多糖類生産量とともに示した。

	EPS yield after 1 h (mg/L)	EPS yield after 2 h (mg/L)	Molecular weight of EPS (Da)
Control fermentation	1.7	5.6	4.7×10^6
PEF treatment	2.9	8.7	3.3×10^6

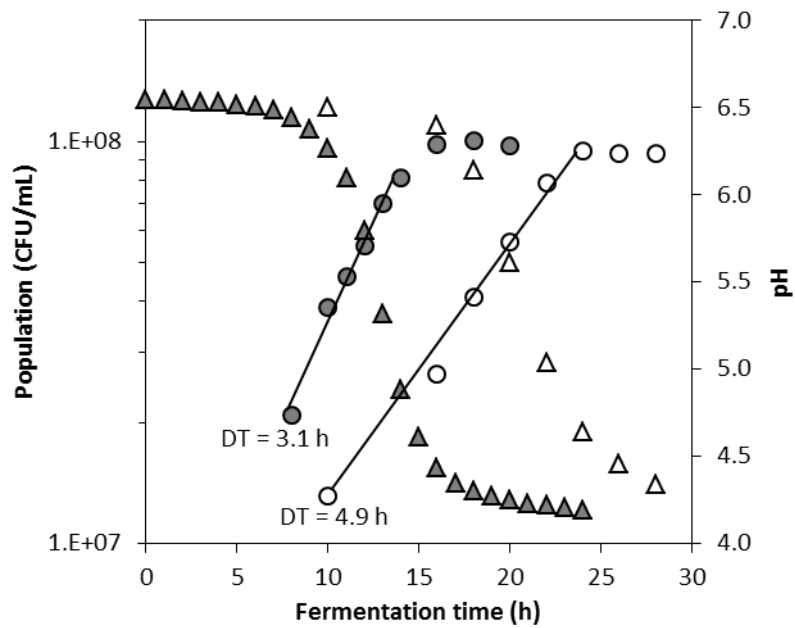


図 6.2 乳糖 1%含有する CDM 培地における *L. cremoris* C4 菌の生育と pH 曲線

25°Cでの培養による菌数の変化 (●, ○) と pH 変化 (▲, △) を示しており、凍結スターターを賦活培養した場合 (●, ▲) と賦活培養しない場合 (○, △) の曲線を示した。図中の DT は、対数増殖期における倍化時間を示している。

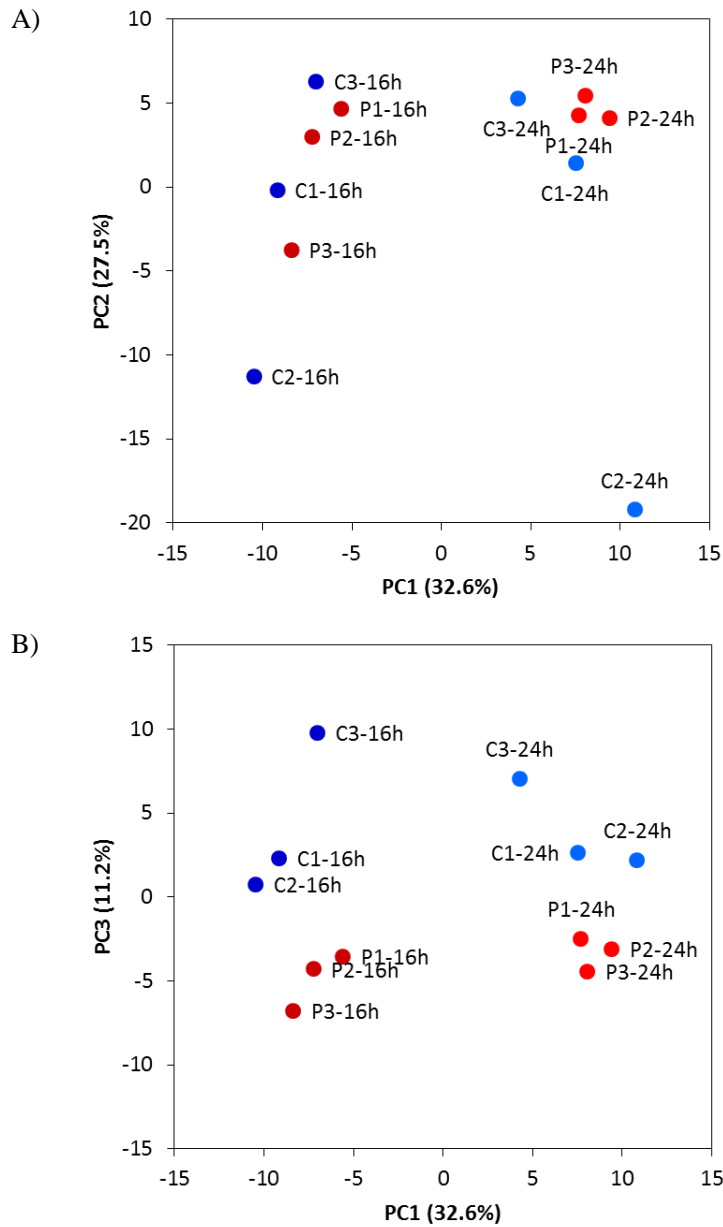


図 6.3 *L. cremoris* C4 菌のメタボローム解析結果の主成分分析 (PCA) プロット
 パルス電界処理の有無を P と C、培養時間 2 水準の 16 時間と 24 時間、さらに 3 回の実験を 1-3 とするサンプル ID で、主成分 1 vs. 2 (上段) と主成分 1 vs. 3 (下段) の PCA プロットを示した。

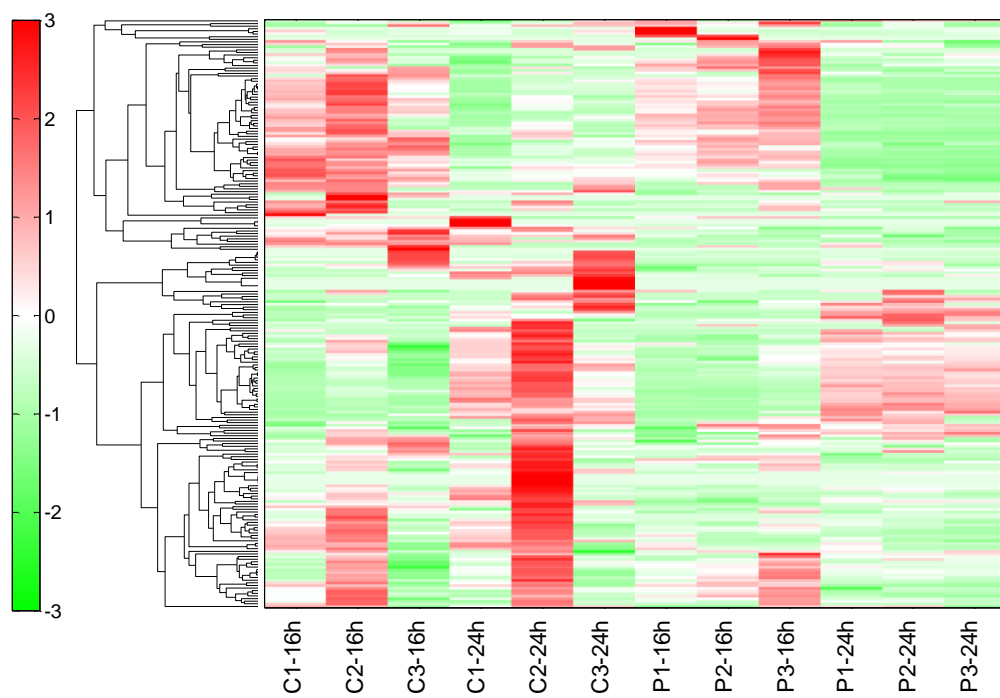


図 6.4 *L. cremoris* C4 菌のメタボローム解析で同定された 224 代謝物質のヒートマップ
パルス電界処理の有無を P と C、培養時間 2 水準の 16 時間と 24 時間、さらに 3 回の実
験を 1-3 とするサンプル ID で示した。

表 6.2 パルス処理の有無により有意差が認められた代謝物質

Compound	Relative peak area							
	PEF vs. Control at 16 h				PEF vs. Control at 24 h			
	Control	PEF-treated	Ratio	p^a	Control	PEF-treated	Ratio	p^a
3-Dehydroshikimic acid	2.3E-04	5.1E-04	2.2	*	1.5E-03	1.8E-03	1.2	
3-Phenylpropionic acid	9.4E-04	5.7E-04	0.6	***	8.1E-04	4.8E-04	0.6	**
2-Hydroxyoctanoic acid	5.8E-04	2.3E-04	0.4	*	6.2E-04	2.7E-04	0.4	
Decanoic acid	1.7E-03	9.5E-04	0.5	**	1.0E-03	5.7E-04	0.6	
Diethanolamine	7.2E-03	2.8E-03	0.4	***	1.1E-02	4.8E-03	0.4	
Dihydroxyacetone phosphate	2.3E-03	7.6E-04	0.3	*	3.5E-03	6.0E-04	0.2	
Guanosine diphosphate	4.8E-03	4.3E-03	0.9		1.3E-02	2.6E-02	2.0	*
Glutamine	6.0E-03	N.A.	<1		1.3E-02	3.9E-02	2.9	*
Glucose 1-phosphate	4.0E-03	2.9E-03	0.7		2.9E-03	1.6E-03	0.5	*
Glycerol	2.5E+00	1.7E+00	0.7		2.6E+00	1.7E+00	0.6	*
Hexanoic acid	2.1E-03	8.2E-04	0.4	**	1.0E-03	4.3E-04	0.4	*
Lauric acid	2.3E-02	1.7E-02	0.7		1.0E-02	3.3E-03	0.3	**
Mevalolactone	3.2E-02	2.7E-02	0.8	*	1.3E-02	9.1E-03	0.7	
Pantothenic acid	1.2E-03	6.7E-04	0.6	*	3.3E-04	1.8E-04	0.6	
Pelargonic acid	4.2E-03	2.3E-03	0.5		2.1E-03	7.5E-04	0.4	**
Phosphoribosyl diphosphate	1.9E-03	5.2E-04	0.3		1.0E-03	2.8E-04	0.3	**
Triethanolamine	3.6E-04	3.6E-04	1.0		5.8E-04	3.7E-04	0.6	*
Unidentified	2.1E-04	1.6E-04	0.8		2.6E-04	1.7E-04	0.7	*

^a p -value by t -test: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001

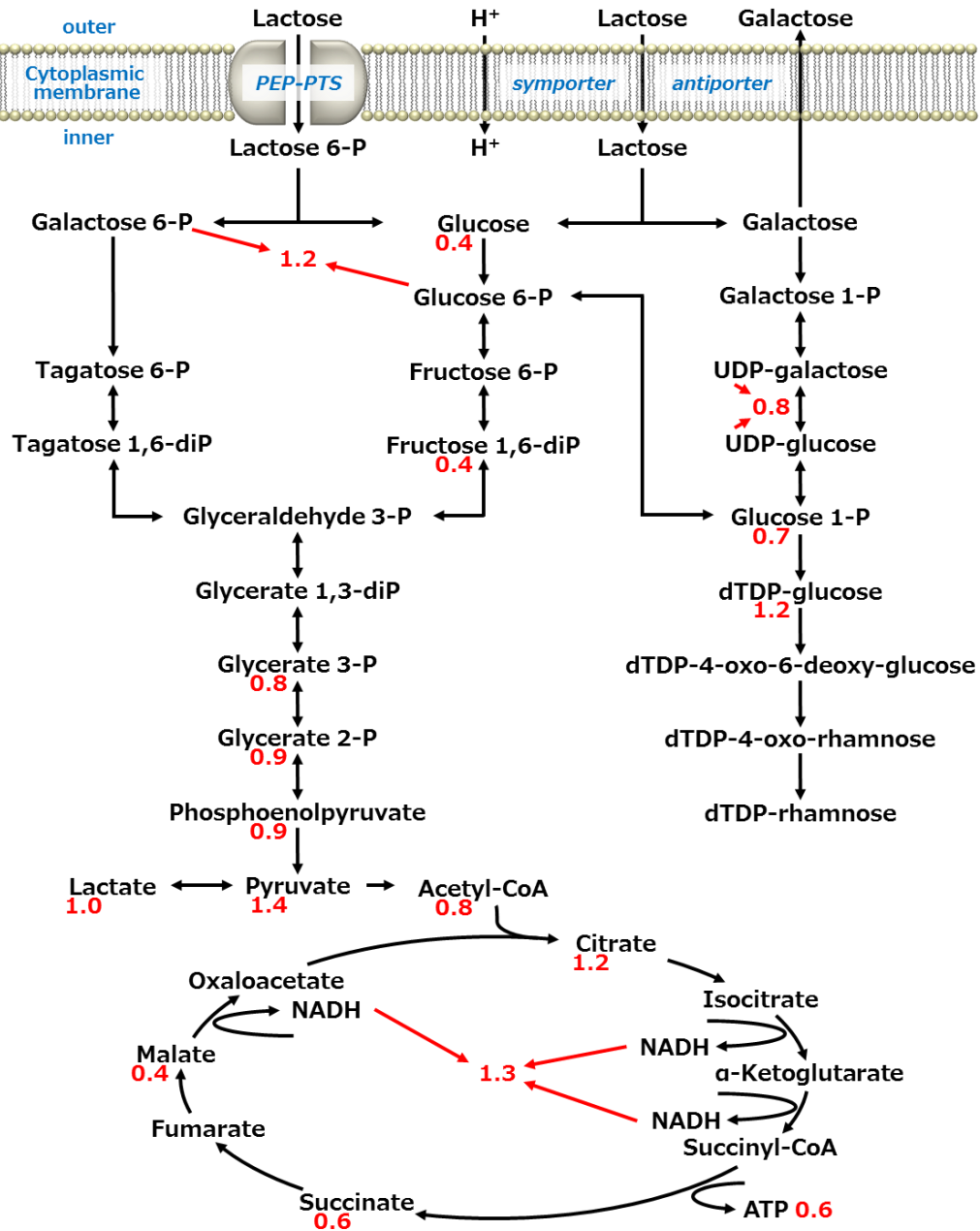


図 6.5 *L. cremoris* C4 菌のパルス電界処理による糖代謝への影響

図中各代謝物質に示した数字は、通常発酵した菌体（培養 16 時間後）における当該代謝物質の菌体内濃度に対して、パルス電界処理を行った菌体での濃度比を示している。1.0 を下回る代謝物質はパルス電界処理により低下したことを示し、1.0 を上回る場合は増加したことを示す。

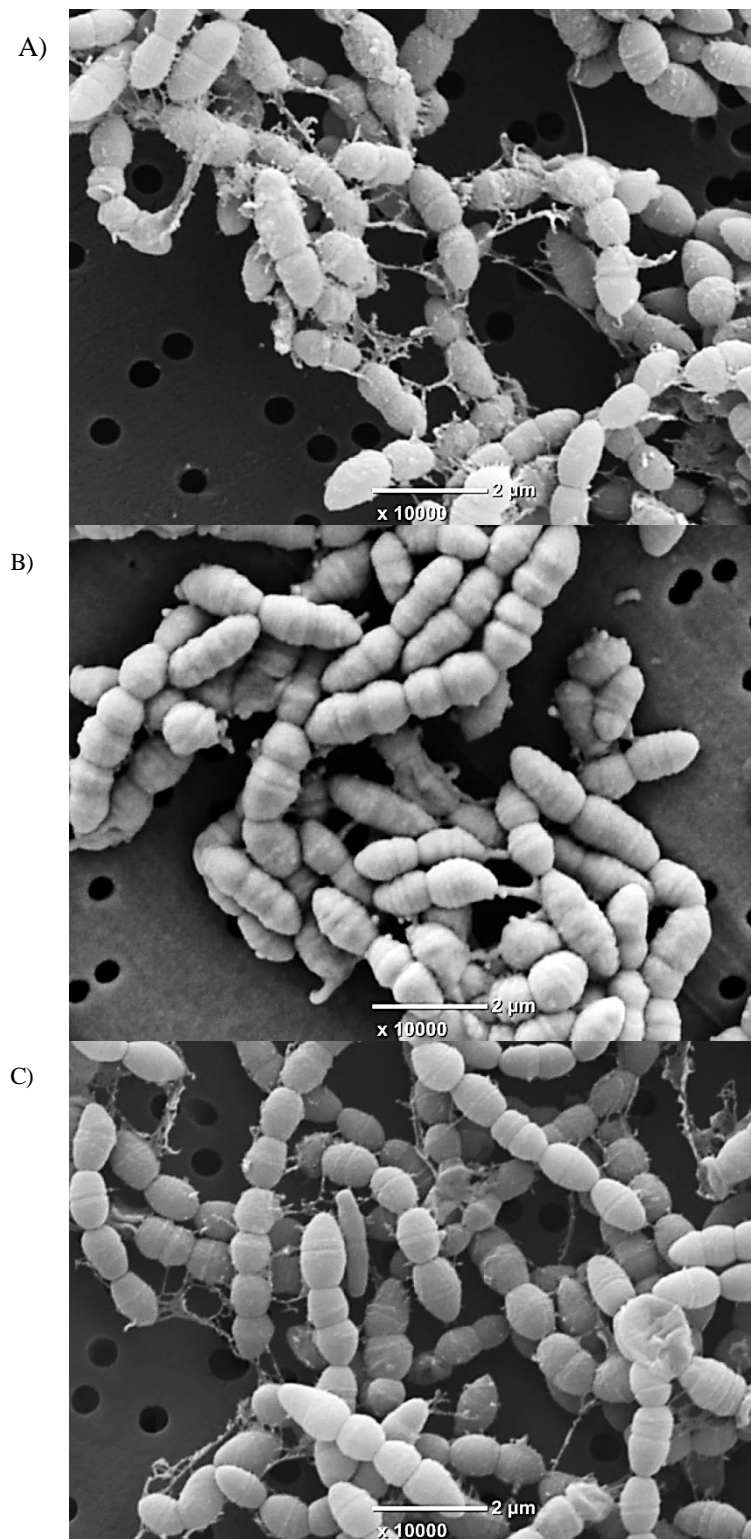


図 6.6 *L. cremoris* C4 菌の走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

A) 通常どおり 18 時間培養した菌体であり、B) は培養 13-15 時間においてパルス電界処理を行った直後の菌体を、C) は 13-15 時間のパルス電界処理後に 3 時間培養を継続した後の菌体を示す。

表 6.3 パルス電界処理によるウンデカプレノイドの形態変化

	Untreated cells (nmol/g-dry cells)	PEF-treated cells (nmol/g-dry cells)
Free undecaprenol (C ₅₅ -OH) *	ND****	ND****
Free undecaprenyl phosphate (C ₅₅ -P)*	23.8	305.8
Free undecaprenyl pyrophosphate (C ₅₅ -PP)**	94.0	20.3
Total undecaprenoid as C ₅₅ -OH***	324.9	428.5

* Free C₅₅-OH and C₅₅-P were determined for 1203 extract without any hydrolysis.

** Free C₅₅-PP was determined by subtracting the amount of free C₅₅-P from C₅₅-P after alkaline hydrolysis.

*** Total undecaprenoids as C₅₅-OH was determined as the amount of C₅₅-OH after acid hydrolysis.

**** ND stands for “not detected”

表 6.4 ウンデカプレニルリン酸 1 分子当たりの多糖類生産効率

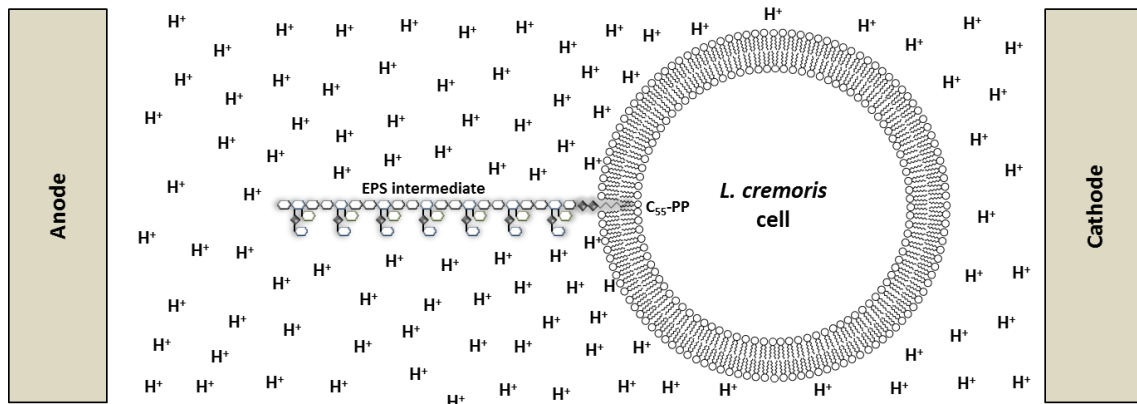
	Untreated cells	PEF-treated cells
Total undecaprenyl phosphate C ₅₅ -P (nmol/L-ferment)*	203.0	267.8
EPS yield during 13-15h without/with PEF (nmol/L-ferment)**	1.2	2.6
Specific EPS productivity (nmol-EPS/nmol-C ₅₅ -P)***	5.9 x 10 ⁻³	9.7 x 10 ⁻³

* Total C₅₅-P was calculated with a factor of 1.6 (g-dry cells/L-ferment) on the total undecaprenoids in Table 3.

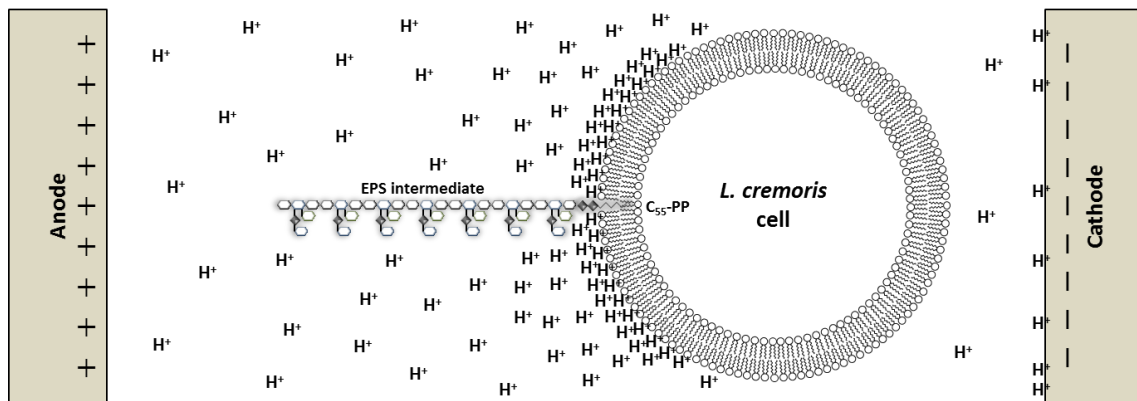
** EPS yield as molecular basis was converted using the molecular weight of EPS in Table 1.

*** Specific EPS productivity was determined by the EPS yield divided by the total C₅₅-P.

A)



B)



C)

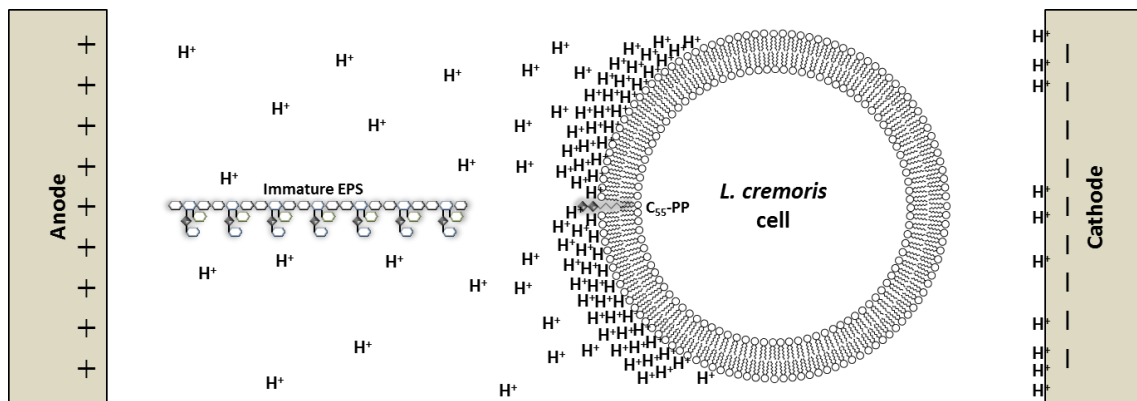


図 6.7 電気濃縮がリン酸 2 エステル結合を加水分解し中間体を解放する

A) パルス電界を印加する直前で乳酸発酵により、培地中の水素イオン濃度が高まっている状態、B) 陽極側菌体表面に濃縮する水素イオン、C) リン酸 2 エステル結合の加水分解により解放された、十分に重合が進んでいない多糖類中間体。

第7章 多糖類増産効果に対するパルス電界処理条件の検討

7.1. 序論

第5章および第6章において、パルス電界処理が供試菌株 C4 菌にもたらす多糖類増産効果と、その作用機序に関する知見をまとめた。通常多糖類生合成のメカニズムによらずに、パルス電界がもたらした電気濃縮作用により、多糖類糖鎖が中間体から切り離されて培地中へ放出され、一方で糖鎖重合の担体として機能する脂質（ウンデカプレノイド）の多糖類比生産性が高まることにより、多糖類が増産されることが明らかとなった。言い換えれば、パルス電界処理は乳酸菌体の細胞表層で進行中の物質合成に変化を与え、電気化学的に表層の糖鎖を切り離す効果をもたらしており、多糖類増産だけではなく菌体表層を改質する技術としても興味深い。

多糖類増産効果の要因となる現象は、陽極側に面する細胞表面での水素イオンの電気濃縮であり、乳酸発酵により培養液中の水素イオン濃度が高まり pH が低下した環境下であるほど、重合中の糖鎖と細胞質膜にアンカーされたウンデカプレノールをつなぐリン酸ジエステル結合を開裂するような低 pH 環境になるものと考えられ、発酵の進行状況もその効果に影響があるものと考えられる。

一方、パルス処理の方法についても、電界の向きが一定の単極型と向きが入れ替わる双極型、パルス波形に関しては矩形波・三角波・鋸歯状波などが挙げられる。パルスの強度は印加電圧とパルス幅によって決まり、さらに、パルス周波数により時間当たりのパルス回数が決まるため、処理時間との関係で累積パルス強度が決まる。なお、パルス処理時の電流値は処理する発酵物の電解質組成に依存し、電流値が高いほどジュール加熱効果により発酵物の温度が上昇することになる。また、パルスジェネレーターによるパルス発生方式によっても、パルス立ち上がりの際のオーバーシュートやアンダーシュート、パルス減衰におけるリングングなどの発生状況に違いがあり、同じ発酵液であってもパルスピーク電流や平均電流は、使用するパルスジェネレーターに依存する。

本技術の実用化のためには、パルス処理条件と多糖類増産効果との関係を解明するが重要であるが、それぞれのパルスジェネレーターの機構や能力には特徴があり、1台ですべての処理条件をカバーする要因実験は不可能である。本章では、多糖類増産効果とパルス処理条件の関連を明らかにするため、入手できた数基のパルスジェネレーターを用いて、単極・双極パルスでの効果の比較や、増産効果の要因となる水素イオンの電

気濃縮現象と関連する平均電流を一定に保ちながら、各種パルス処理条件との影響を調べる実験を行った。それらの結果から、パルス幅、電圧、パルス周期などの処理条件と多糖類増産効果との関係を考察した。

7.2. 実験材料および方法

7.2.1. 供試菌株と培養条件

第 5 章の検討に用いた C4 株を供試菌株に用い、乳糖 1%を配合した Chemically Defined Medium (CDM) 培地 (Otto *et al.*, 1983) を 0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌して培養に用いた。なお、以下の 7.2.2.の実験においては、別途凍結保存しておいたスターターカルチャーを 0.1% (vol/vol) 接種し、25°Cで 28 時間培養し、それ以外の実験においては、凍結スターターカルチャーから賦活カルチャーを培養し、それを本発酵に接種する第 5 章記載の培養方法に従った。賦活カルチャーからの培養では、対数増殖期への立ち上がりが 3-4 時間早くなるため、培養は 24 時間までとした。

凍結スターターカルチャーは、CDM 培地での対数増殖期の培養液を直ちに凍結したものであり、-80°Cで保存しながら培養実験に適宜使用した。また、菌数を測定する場合は、Oxoid 社の M17 培地 1 L 当たり 10 g の乳糖と 12.75 g の寒天を添加したプレート培地に、培養液の希釈液を塗抹してから 25°Cで 3 日間培養し、コロニー数を計測してから希釈倍率を換算した。

7.2.2. パルス電界処理

パルス電界処理には第 5 章 5.2.4.に記載した装置 (図 5.1) を用い、上記の賦活カルチャーを行うことにより改善された培養条件において、培養後 18-22 時間の 2 時間培養液を循環しながらパルス処理を行った。また、パルス処理チャンバーを通過した培養液は、電界がもたらすジュール加熱により温度が上昇するため、パルス処理チャンバー通過後は直ちに冷却コイルで培養温度 25°Cまで低下させたが、チャンバー出口付近に熱電対を設置して処理直後の温度をモニターした。

本章では、パルス処理条件の検討を行うため、以下 4 台のパルスジェネレーターを使用した。1) パルスコントローラー SPIK2000A-02 (Shen Chang Electric Co. Ltd., Taipei, Taiwan) + DC 電源 EnerStream 20 (EN Technologies Inc., Gyeongido, Korea)、2) パルスプラズマ発生装置 MPP-HV04 (Kurita Seisakusho Co. Ltd., Kyoto, Japan)、3) 高電圧パ

ルス発生器 TE-HP5K-HV5W (Tamaoki Electronics Co. Ltd., Saitama, Japan)、4) パルスジェネレーター-DEI PVX-4150 (Directed Energy Inc., Colorado, US) +ファンクションジェネレーター-1915 (NF Corporation, Yokohama, Japan) を実験目的の応じて使用し、各種のパルス条件で実験を行った。なお、パルス処理チャンバーに印加された実際のパルス電圧やピーク電流をデジタルオシロスコープ DSO-1052B (Keysight Technologies, California, US) と高電圧プローブ Agilent N2771A (Agilent Technologies, Colorado, US) でモニターしながらパルス強度を制御した。

7.2.3. パルス電界における極性の影響

7.2.2.に示した 4 台のパルスジェネレーターのうち、単極パルスと双極パルスの両方に対応可能な、パルスコントローラー-SPIK2000A-02+DC 電源 EnerStream 20 を使用し、パルス幅を最低の 5 μ s、パルス電圧は 8 kV/cm に設定し、パルス電界の極性が一定となる単極パルス (実験区 A) と、極性が交互に変わる双極パルス (実験区 B) とで、多糖類増産効果に影響が見られるかどうかを検討した。

第 5 章や第 6 章で実施したパルス処理でのパルス幅は 1 μ s に固定しており、本実験でのパルスジェネレーターの最低パルス幅 5 μ s を考慮し、パルス周波数を 5 分の 1 とする (図 7.1) ことにより補正した。

7.2.4. パルス累積時間と多糖類増産効果

4 台のパルスジェネレーターのうち、パルスプラズマ発生装置 MPP-HV04 ではパルス幅が 0-1.5 μ s の範囲で可変であるため、パルス電圧は 8 kV/cm に固定しながら、パルス幅 1 μ s でパルス周波数 2,265 Hz で処理した場合 (実験区 C) と、パルス幅 0.1 μ s でパルス周波数 22,650 Hz で処理した場合 (実験区 D) における、多糖類の増産効果への影響を調べた。パルス電圧が一定であれば、パルス幅とパルス周波数で決まるパルス累積時間が同じであれば、同等の多糖類増産効果が得られるかどうかを確認するための実験である。

7.2.5. パルス処理中の平均電流と多糖類増産効果

パルス幅を 1 μ s で固定した条件で、CDM 培地に対してパルス電界を印加し、平均電流値が一定 (5 mA または 10 mA) となるように、パルス電圧とパルス周波数を調整すると、図 7.2 に示したように両対数グラフにおいて直線関係が得られ、5 mA と 10 mA

の直線は平行関係を示した。そこで、第5章で約2倍の多糖類増産効果が得られたパルス処理条件をプロットし、同じ平行線上にある4つの点(8.0 kV/cm×2,265 Hz、4.4 kV/cm×4,000 Hz、2.9 kV/cm×6,000 Hz、1.7 kV/cm×10,000 Hz)が同じ平均電流値を示す、パルス処理条件の組み合わせになることが示唆された。

そこでまず、パルスプラズマ発生装置 MPP-HV04 でパルス幅 0.1 μ s に固定し、1 μ s の10分の1のパルス幅であることを、周波数を10倍にすることにより補正し、パルス電圧 8.0 kV/cm でパルス周波数 22,650 Hz (実験区 D)、パルス電圧 4.4 kV/cm でパルス周波数 40,000 Hz (実験区 E)、パルス電圧 2.9 kV/cm でパルス周波数 60,000 Hz (実験区 F)、パルス電圧 1.7 kV/cm でパルス周波数 100,000 Hz (実験区 G) の4水準の実験により、多糖類増産効果への影響を調べた。

一方、もう1台のパルスジェネレーターである高電圧パルス発生器 TE-HP5K-HV5W をパルス幅 1 μ s に固定し、パルス電圧 8.0 kV/cm でパルス周波数 2,265 Hz (実験区 H)、パルス電圧 4.4 kV/cm でパルス周波数 4,000 Hz (実験区 I)、パルス電圧 2.9 kV/cm でパルス周波数 6,000 Hz (実験区 J)、パルス電圧 1.7 kV/cm でパルス周波数 10,000 Hz (実験区 K) の4水準の実験を行って、同様に多糖類増産効果を調べた。

また、1 μ s 以上のパルス幅を出力可能でパルス電圧やパルス周波数を調整できるパルスジェネレーターは入手できなかったが、高電圧パルス発生器 TE-HP5K-HV5W によりパルス電圧を 8 kV/cm としながら、パルス幅 1.4 μ s でパルス周波数 1,616 Hz (実験区 L) の条件と、別のパルスジェネレーター DEI PVX-4150 を用いてパルス幅を 10 μ s まで拡大し、パルス電圧 3.7 kV/cm でパルス周波数を 1,000 Hz (実験区 M) とすることにより、実験区 L と実験区 M が同じ平均電流となることを確認して、多糖類増産効果について調べた。

7.3. 結果

7.3.1. パルス電界における極性の影響

単極パルス処理 (実験区 A) と双極パルス処理 (実験区 B) それぞれにおける、多糖類生産曲線を図 7.3 に示した。図からも明らかのように、極性を変化させることによる影響は見られず、いずれにおいても 16 mg/L 前後の多糖類生産となった。第6章において、パルス電界処理による多糖類増産効果の要因として、細胞質膜表面での電気濃縮による中間体のリン酸エステル結合の開裂について述べた。電界の向きの変化は電気濃

縮が発生する細胞質膜上の位置が変わるだけであり、増産効果への影響は無いものと想定されたが、その通りの結果となった。24 時間後の生菌数も差が無かった（表 7.1）ことから、極性の変化は多糖類増産効果と菌体の生活性のいずれにも、影響を及ぼさないことが明らかとなった。

7.3.2. パルス累積時間と多糖類増産効果

パルス電圧 8 kV/cm の条件でパルス累積時間を一定としながら、1 μ s 幅で 2,265 Hz の処理を行った実験区 C と、0.1 μ s 幅で 22,650 Hz の処理を行った実験区 D における、多糖類増産効果への影響を図 7.4 に示した。この実験で使用したスターターカルチャーは多糖類生産量が低く、通常約 10 mg/L の多糖類が生産されるのに対し、パルス処理をしない対象区では 5.7 mg/L となった。これに対し、培養 24 時間後の実験区 C では 10.2 mg/L、実験区 D では 10.7 mg/L の多糖類生産量となり増産効果は表れている。

なお、実験区 C と D の多糖類生産曲線、さらに培養終点での生菌数に大きな違いはなく、パルス電圧が一定の条件であれば、パルス幅を変更してもパルス周波数で補正することにより、同等の増産効果が得られることを示唆した。

7.3.3. パルス処理中の平均電流と多糖類増産効果

パルスプラズマ発生装置 MPP-HV04 によるパルス幅 0.1 μ s での、実験区 D-G の結果を図 7.5 に示した。これらの実験区での、パルス処理中の平均電流は 6.4-6.5 mA であり（表 7.1）、ほぼ一定の電流値となったことを確認した。また、7.3.2.に記載のように、この実験で使用したスターターカルチャーは多糖類生産量が低く、パルス処理をしない対象区では 5.7 mg/L であったが、実験区 E の 24 時間後では多糖類生産量が 10.7 mg/L に至り、パルス処理による増産効果は確認できた。ただし、実験区 E、F、G では 24 時間後でそれぞれ 7.6、6.5、6.6 mg/L であり（表 7.1）、特に実験区 G は菌の生育自体が遅延しパルス処理をずらしたこともあり実験区 D-F の結果との比較は困難であるが、実験区 F、G の多糖類生産量は対象区の多糖類生産量 5.7 mg/L とは差があるとは言い難い。平均電流が一定であってもパルス電圧が低くなるほど、あるいは、パルス周波数が高くなるほど、増産効果が低下することを示している。

また、高電圧パルス発生器 TE-HP5K-HV5W によるパルス幅 1 μ s での、実験区 H-K の結果は図 7.6 に示した。これらの実験区でのパルス処理中の平均電流は、必ずしも一定ではなく 12 mA から 7 mA まで変化している（表 7.1）。結果の傾向は図 7.5 と全く同

様であり、パルス処理をしない対象区では 11.2 mg/L であったのに対し、実験区 H-K の 24 時間後の多糖類生産量はそれぞれ 16.8、16.4、14.2、13.8 mg/L と低下（表 7.1）しており、実験区 D-G の結果ほどの低下率ではないが、パルス電圧が低くなるほど、あるいは、パルス周波数が高くなるほど、増産効果が低下する傾向を示している。なお、実験区 D-G と実験区 H-K のいずれにおいても、多糖類生産量が低下することと菌体の生活性が低下することが連動していることから、パルス周波数が高く印加回数が一定以上増加すると、パルス電圧が低くても菌体の生活性を低下させ、その結果として多糖類の生産性を低下させたと考えられる。

実験区 L と M においては平均電流値が約 10.0 mA とほぼ同じ（表 7.1）であり、多糖類生産量も実験区 L が 14.0 mg/L、実験区 M が 13.3 mg/L と同等の結果（図 7.7）になった。一方、培養終点での生菌数では、実験区 M よりも実験区 L の菌数が高く（表 7.1）、パルス周波数を低く設定し印加回数を下げたとしても、パルス幅が大きい場合は菌体の生活性を下げることが示唆された。

7.3.4. 全実験区の結果による重回帰分析

表 7.1 にまとめた全実験区のデータにおいて、使用した各パルスジェネレーターの特性や、実験シリーズ間の菌体の生育状況などの要因を考慮せずに、培養終点における多糖類生産量に関する重回帰分析や各実験要因との相関分析を行うと、いずれにおいても多糖類生産量にもっとも影響する要因はパルス周波数であり、周波数が高いほど生産量が低下する関係が示された。パルス周波数に次いで影響があるのは、ピーク電流や平均電流であり電流値が高いほど多糖類生産量が高くなる関係が示され、第 6 章で多糖類増産効果の要因として、パルス電界による細胞質膜表面での電気濃縮による中間体糖鎖の解放によるものであると結論したが、電流値は電気濃縮と直接関連する要因として多糖類生産量に関連があることが裏付けられた。

7.4. 考察

本章では 4 台のパルスジェネレーターを用いて 13 実験区を行うことにより、パルス極性、パルス累積時間、さらに平均電流と多糖類増産効果との関係を調べた。それぞれのパルスジェネレーターには、さまざまな処理条件を設定できる自由度が低く、系統的な要因実験は不可能であったが、パルスの極性が多糖類の増産効果に影響しないこと

と、パルス電圧が一定の条件であれば、パルス幅とパルス回数で積算される累積時間が同じ場合は、同等の増産効果が得られることが明らかになった。

第6章で考察した、多糖類増産効果の要因である水素イオンの電気濃縮現象は、パルス処理時の平均電流と比例する現象であることから、平均電流と多糖類増産効果との相関関係を想定することができる。しかしながら、パルス電圧を下げる一方でパルス周波数を高めて同じ平均電流とするか、パルス周波数を高める代わりにパルス幅を増幅して同じ平均電流を印加した場合には、菌の生活性が低下し多糖類の増産効果が十分に得られない傾向が示されたことから、パルス印加回数が多糖類増産効果に影響することも示唆された。

本研究では第5章で決定したパルス電圧 8 kV/cm が、菌体の電気穿孔の閾値を下回る条件として一貫して実験で採用してきたが、そのパルス電圧においてピーク電流では 3 A 以上、平均電流では 10 mA 以上印加し、パルス幅を 5 μ s 以下としながらパルス周波数を 3,000 Hz 以下にすることにより、高い多糖類増産効果が得られることが明らかとなった。すなわち、十分な多糖類増産効果を得るには、一定強度の電圧や電流が必要であるが、パルス幅を大きくしたりパルス周波数を極端に高くすると菌の生活性を低下させることから、結果的に十分な多糖類増産効果が得られない結果になることが示唆された。

なお、本章で行った 13 の実験区は、パルス発生機構が異なる 4 台のパルスジェネレーターを組み合わせて行っており、全ての実験結果を重回帰分析で解析することにより、パルス電界処理のパラメーターと多糖類増産効果との関係を把握することはできるが、これらの実験結果だけで各パラメーターの影響を結論してしまうのは尚早である。序論で述べたように、パルス立ち上がりの際のオーバーシュートやアンダーシュート、パルス減衰におけるリングングなどの発生状況はパルス発生機構によって大きく異なるため、パルス印加回数が多いほどこれらの現象が大きく影響することになる。

さらに装置的な側面から考察すると、パルス印加回数は電極表面の酸化や電蝕にも影響し、単極パルスを高い周波数で処理するとパルスの安定性や効率を低下させることになる。発酵と並行した連続的なパルス電界処理を装置的に実現していくためにも、同一のパルス発生機構によるジェネレーターを用い、パラメーターの検討にあたってはより系統的な実験計画法で実施する必要がある。本章で得られた知見は、これらの実験計画を組む上での初期知見であり、多糖類の生産量や菌体の生活性への影響について統計的に解析していくことが必要である。

7.5. 結論

パルス電界処理を決定する因子は、パルス電圧、パルス電流、パルス幅、パルス周波数であり、第5章で検討したようにパルス電圧については細胞穿孔を抑えた 8 kv/cm 程度が、多糖類増産に至適条件であった。パルス電流は、処理する培養液の電気伝導度やパルス幅やパルス周波数の設定条件に依存するが、パルス印加中のピーク電流値で 3 A 以上、平均電流では 10 mA 以上となるようなパルス幅やパルス周波数条件において、多糖類の増産効果が高いことが判明した。

一定のパルス電圧の条件下であれば、平均電流はパルス幅（印加時間）とパルス周波数（印加回数）の積によって決まる。本章での 13 実験区での結果を総括すると、幅の短いパルスを多数印加するよりは、幅の長いパルスで印加回数を抑える方が多糖類増産や菌体の生活性の維持は効果的であり、具体的にはパルス幅を 5 μ s 以下としながらパルス周波数を 3,000 Hz 以下にすることにより、高い多糖類増産効果が得られることが示された。しかしながら、パルス発生機構の異なるジェネレーターを組み合わせ得られた結果であり、パルス処理パラメーターの影響を正しく評価するためには、同一のパルス発生機構によるジェネレーターを用い、より系統的な実験計画法で解析することが必要である。

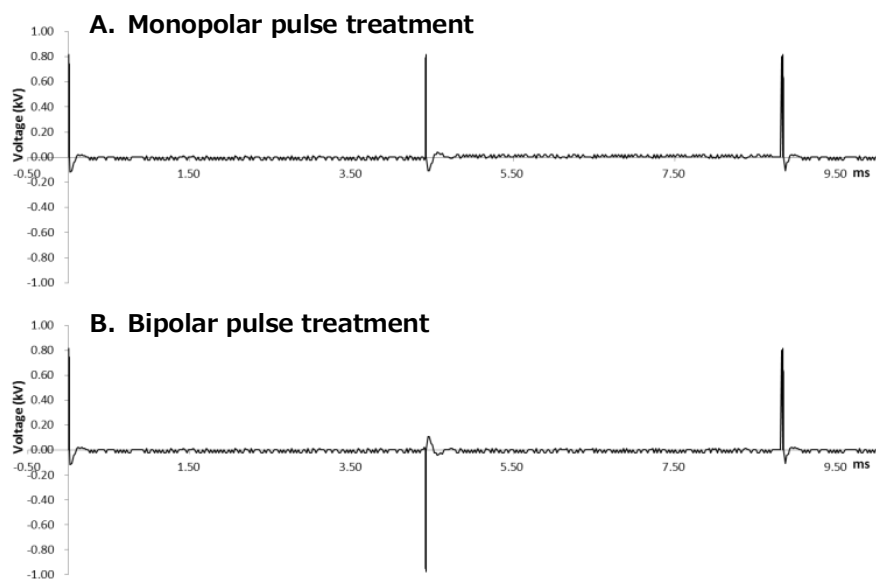


図 7.1 単極および双極パルス電界処理

パルス幅を $5 \mu\text{s}$ 、パルス電圧を 8 kV/cm に設定し、パルス電界の極性が一定となる単極パルス(A)と、極性が交互に変わる双極パルス(B)で、多糖類増産効果の比較を行った。

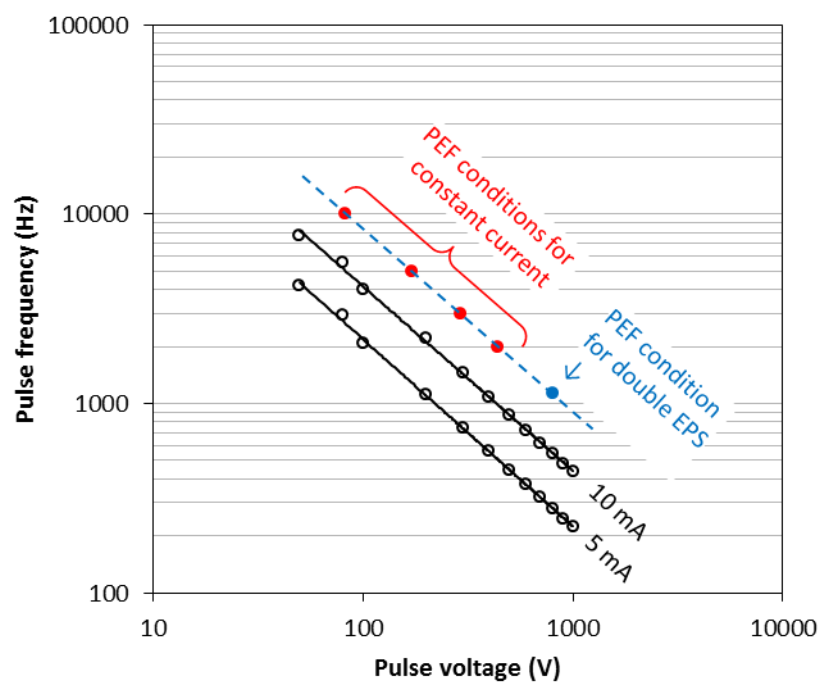


図 7.2 パルス処理中の平均電流値を一定とするパルス処理条件

CDM 培地を用いてパルス処理を行い、平均電流値が 5 mA と 10 mA となるパルス電圧とパルス周波数の関係を解析し、多糖類増産効果を示したパルス条件と同じ平均電流値となるパルス処理条件を策定した。

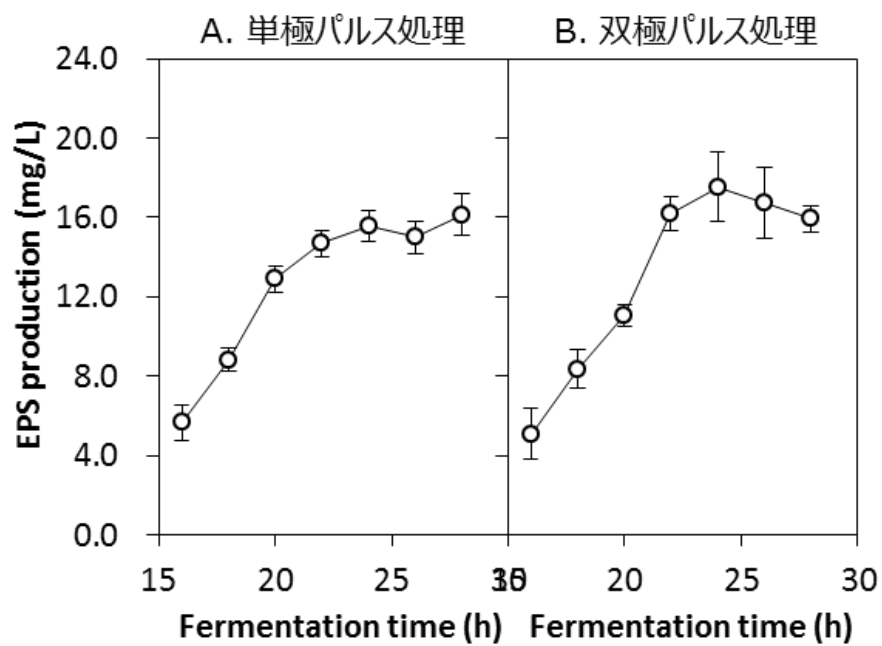


図 7.3 単極パルス処理と双極パルス処理での多糖類増産効果

図 7.1 に示した単極パルス (実験区 A) と双極パルス (実験区 B) を、いずれも培養 18-22 時間の 4 時間処理し、その後 28 時間まで培養を継続した。培養 16 時間以降の多糖類の生産量を 2 時間毎に測定して、多糖類生産曲線を図に示した。

表 7.1 各実験区でのパルス処理における計測値

実験区	パルス発生装置	パルス幅 (μ s)	パルス電圧 (kV/cm)	パルス周波数 (Hz)	ピーク電流 (A)	平均電流 (mA)	出口温度 ($^{\circ}$ C)	多糖類生産量* (mg/L)	生菌数* ($\times 10^7$ CFU/ml)
A	SPIK2000A-02	5.0	8.0	453	7.8	15.0	26.8	16.2	10.8
B	EnerStream 20	5.0	8.0	453	7.5	15.0	27.1	15.9	11.1
C		1.0	8.0	2,265	0.9	6.3	24.9	10.2	6.7
D		0.1	8.0	22,650	1.0	6.5	25.1	10.7	7.4
E	MPP-HV04	0.1	4.4	40,000	0.6	6.4	25.0	7.6	3.1
F		0.1	2.9	60,000	0.2	6.4	25.0	6.5	2.0
G		0.1	1.7	100,000	0.2	6.5	25.2	6.6	8.8
H		1.0	8.0	2,265	8.0	12.0	27.3	16.8	16.1
I		1.0	4.4	4,000	3.5	9.0	25.8	16.4	5.7
J	TE-HP5K-HV5W	1.0	2.9	6,000	1.8	8.0	25.2	14.2	4.2
K		1.0	1.7	10,000	1.0	7.0	25.0	13.8	3.3
L		1.4	8.0	1,616	2.8	10.2	26.5	14.0	9.9
M	DEIPVX-4150	10.0	3.7	1,000	2.9	10.1	26.0	13.3	3.1

* 培養終点での濃度を示す

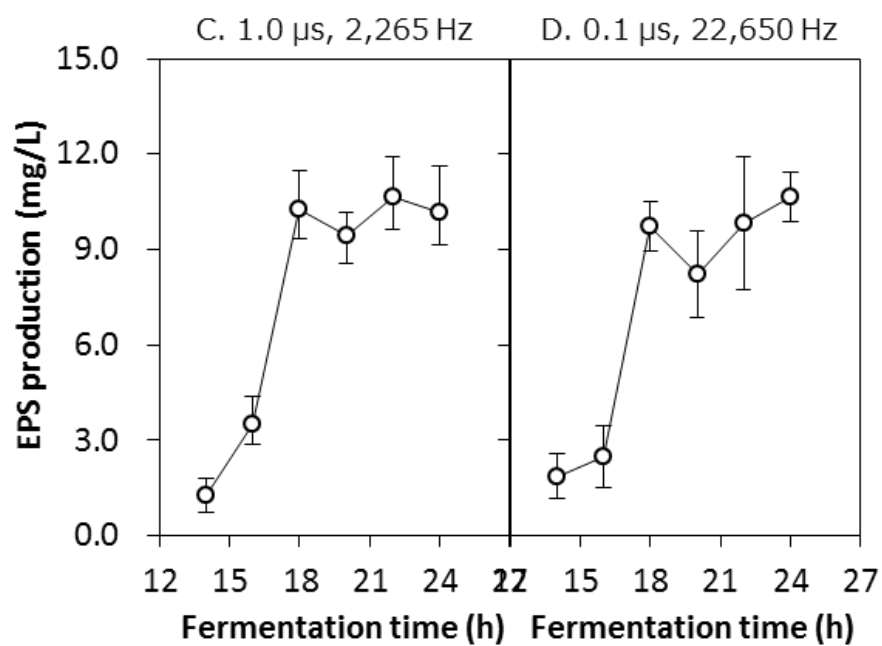


図 7.4 パルス幅とパルス周波数の検討

同じパルス電圧 8 kV/cm において、パルス幅とパルス周波数で累積される時間を一定とするように、1 μs 幅で 2,265 Hz (実験区 C) と 0.1 μs 幅で 22,650 Hz (実験区 D) のパルス条件で、いずれも培養 16-18 時間の 2 時間処理し、その後 24 時間まで培養を継続した。培養 14 時間以降の多糖類の生産量を 2 時間毎に測定して、多糖類生産曲線を図に示した。

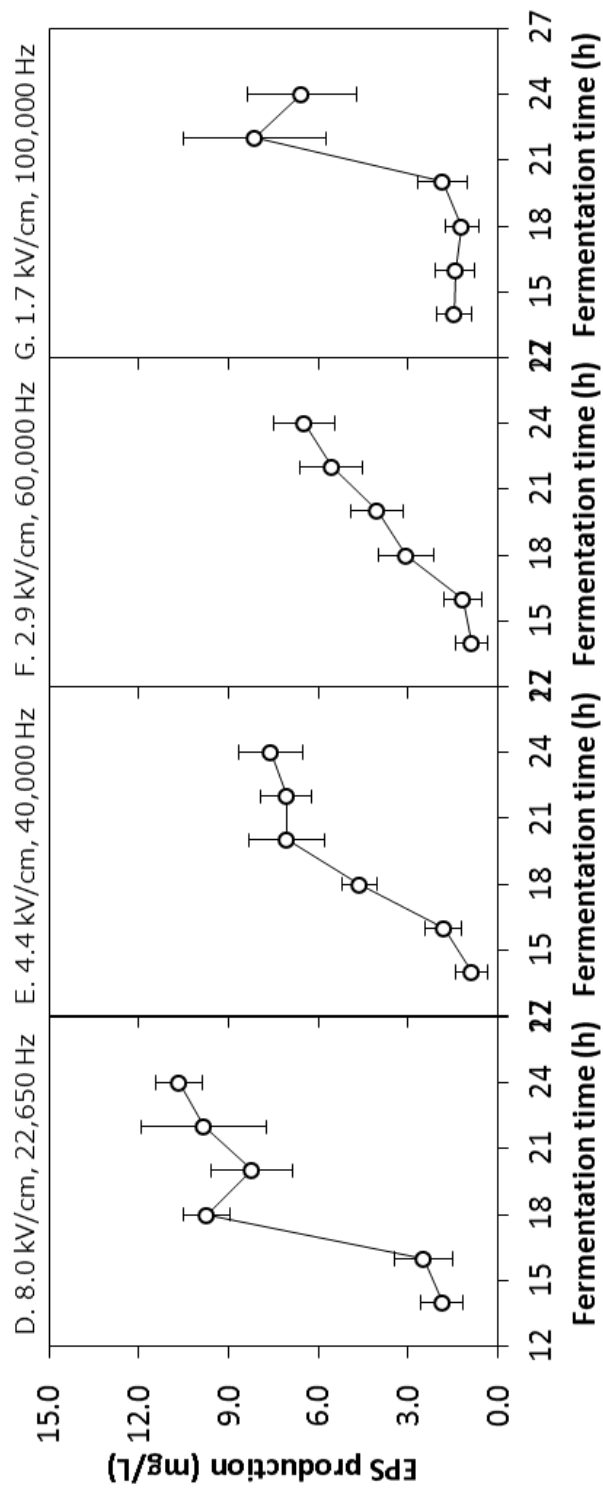


図 7.5 パルス処理中の平均電流と多糖類増産効果

パルス幅を $0.1 \mu\text{s}$ で固定し、パルス電圧とパルス周波数を $0.1 \mu\text{s}$ 幅で $2,265 \text{ Hz}$ (C) と $0.1 \mu\text{s}$ 幅で $22,650 \text{ Hz}$ (D) のパルス条件で、いずれも培養 16-18 時間の 2 時間処理し、その後 24 時間まで培養を継続した。培養 14 時間以降の多糖類の生産量を 2 時間毎に測定して、多糖類生産曲線を図に示した。

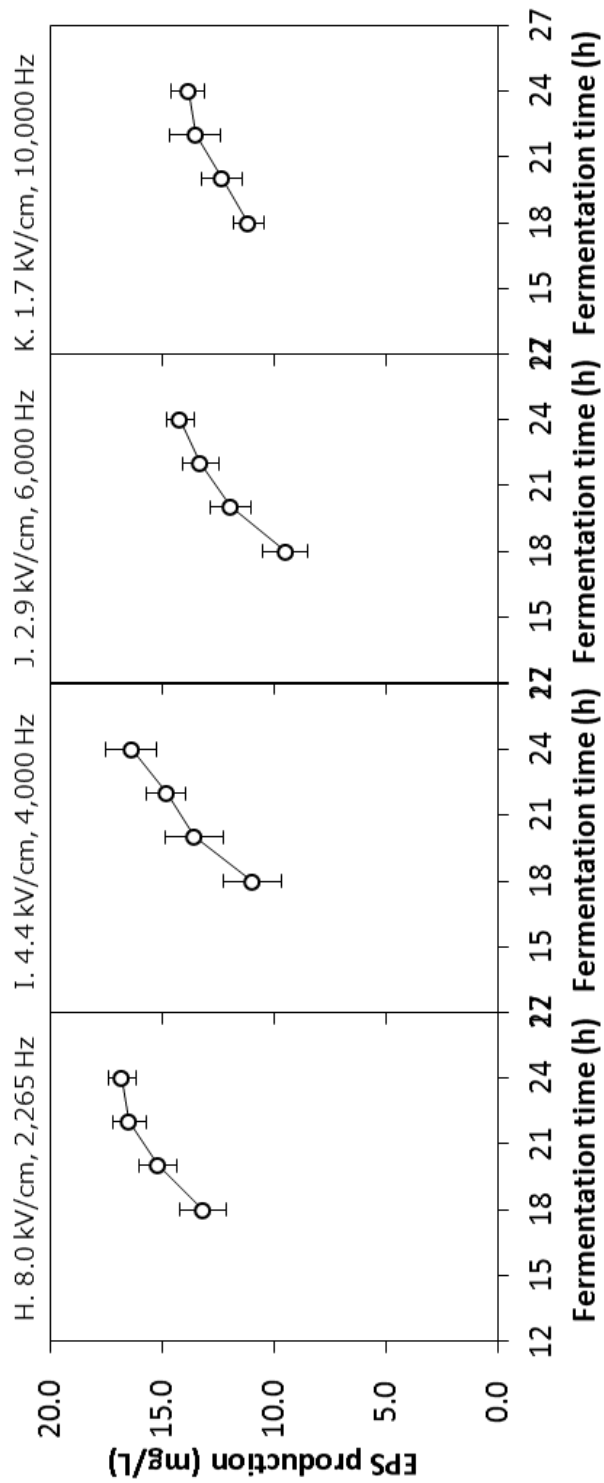


図 7.6 パルス電圧とパルス周波数の組み合わせにおける多糖類増産効果

パルス幅を 1 μ s で固定した実験区 I-L の結果であり、培養 14-16 時間の 2 時間パルス処理した。その後 24 時間まで培養を継続し、培養 18 時間以降の多糖類の生産量を 2 時間毎に測定して図示した

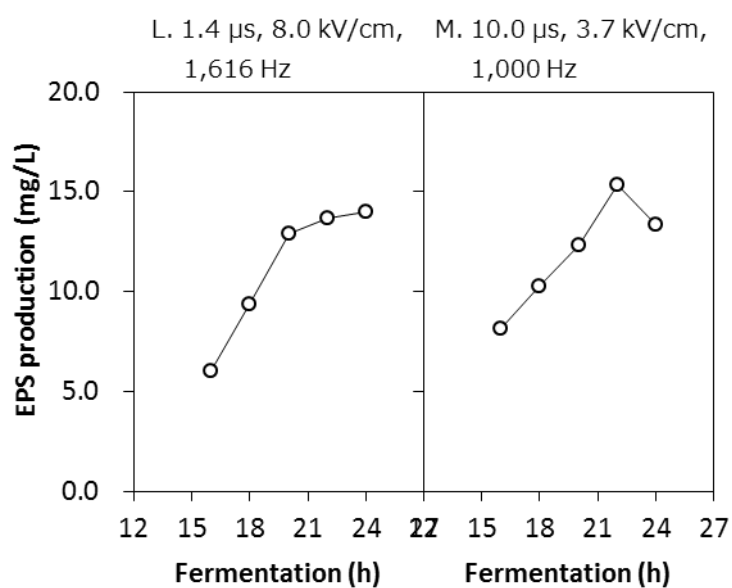


図 7.7 パルス処理中の平均電流と多糖類増産効果

高電圧パルス発生器 TE-HP5K-HV5W によりパルス電圧を 8 kV/cm としながら、パルス幅 1.4 μs でパルス周波数 1,616 Hz (実験区 L) の条件と、別のパルスジェネレーター DEI PVX-4150 を用いてパルス幅を 10 μs まで拡大し、パルス電圧 3.7 kV/cm でパルス周波数を 1,000 Hz (実験区 M) とする条件のいずれも、同じ平均電流を示したことから、多糖類増産効果について調べた。

第8章 研究成果と今後の課題を含めた全体総括

8.1. 本研究で得られた結果の総括

本研究は、スカンジナビア地方やコーカサス地方の伝統的粘性発酵乳の主要スターター菌である *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (*L. cremoris* 菌) を供試菌とし、それが生産するリン酸化多糖類の発酵生産に対して、パルス電界処理という電気化学的手法により発酵をエンジニアリングする技術の確立を目指した。*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類については、異なる菌株間でもグルコース・ガラクトース・ラムノース・リン酸を含む一次構造の同一性があり、その生合成のスキームやそれに関与する遺伝子クラスター、さらに物理化学的な特性やそれに基づく発酵乳での物性発現など、様々な知見が解明されている。さらに、リン酸化多糖類がもたらす免疫賦活作用やインフルエンザウィルス感染抑制効果などの、保健機能に関する研究も報告されており、発酵乳製品製造での使用実績があることを踏まえると、極めて有用な研究対象である。ところが、多糖類生産を制御する発酵技術に関する研究には大きな進歩はなく、発酵温度や時間、発酵基質や発酵調整剤などによる技術にほかならない。こうした伝統的な発酵管理技術ではなく、新たにパルス電界処理という電気化学的手法により、多糖類発酵生産に寄与するエンジニアリング技術の確立を目指すことに、本研究の意義や新規性が生まれるものと考えた。

パルス電界処理技術は、食品加工における殺菌技術としてすでに応用され始めており、液体を処理する場合には特に複雑な装置を必要とせず、電源装置と電極およびパルスを発生させるジェネレーターにより処理が可能となる。パルス電界がもたらす電気化学的作用が、*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類の生産を促進するなど、有益な効果をもたらすのであれば、産業上の応用も容易な新規発酵技術となる。本研究の新規性は、電気穿孔で菌体を物理的に破壊し殺菌に至らしめるようなパルス電界処理ではなく、菌の生活性を一定レベルで維持する穏和な処理条件により、多糖類の生合成に有益な効果をもたらす新たなエンジニアリング技術開発にあり、有益な効果が認められる場合にはその作用機序を解明し、産業レベルでの応用を前提とした技術確立までを目標とした。

上記の研究目的を達成するためには、まず、乳酸菌による多糖類生産に関するこれまでの研究の中で、*L. cremoris* 菌の多糖類についての知見をまとめ、新たなエンジニアリング技術開発の有用性を確認することから始め、第1章ではこれまでの研究を総説と

してまとめた。また、限られた知見ではあるものの、パルス電界処理を殺菌目的以外で微生物に応用した研究例についても紹介し、本研究の目的および全体構想についてまとめた。パルス電界処理という電気化学的な処理によるエンジニアリング技術を検討する上では、*L. cremoris* 菌の発酵特性や多糖類生産のプロファイルを理解し、生産される多糖類が示す物理化学的性質をあらかじめ理解しておくことが重要であり、第2章と第3章においてそれらの検討結果をとりまとめた。

L. cremoris 菌が生産する多糖類には、異なる菌株間でもその構成糖や構造の相同性が見られ、いずれもグルコース・ガラクトース・ラムノースにリン酸基を含んだ酸性多糖類であること。また、多糖類生産は対数増殖期後半から定常期にかけて活発化するため、パルス電界処理がもたらす効果を判断するためには、その生育ステージで実施すべきであることを結論した。また、生産されたリン酸化多糖類は、構造中のリン酸基に由来するマイナスチャージにより多価電解質としての性質を示し、分子間・分子内のもつれにおいて静電的反発力を示したことや、ゲル形成能は示さないことなどが示唆された。パルス電界処理を困難にさせるようなレオロジー特性はないが、多糖類分子が有する電荷に対してパルス電界による電氣的モーメントがどのように作用するかが、本研究が目指す技術開発に関連するポイントであることが判明した。

一方、菌体の培養液に電界をかけると、細胞質内の電解質にもモーメントを与えることから、電気穿孔に至るほどの電界処理を行わなくても、細胞における代謝や生命活動に影響を与えるものと考えられる。そこで第4章では、*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類の生合成メカニズムやそれに関わる代謝物質を解析し、細胞質膜内面での重合ユニット形成に必要な糖ヌクレオチド前駆体や、多糖類の中間体形成や重合反応に関与するキャリアー脂質を同定した。*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類の生合成は、ウンデカプレノールという脂質をキャリアーとして重合ユニットが形成され、完成したユニットは細胞質膜を通して細胞質膜外面に反転した後、重合反応により巨大分子へ伸長していき、最後に培養液中に放出されるものと考えられる。パルス電界処理による細胞質内の電解質に与えるモーメントが、重合ユニット形成にどのような影響を与え、さらに、パルス電界の中で細胞質膜外面での重合反応がどのような影響を受けるかが、本エンジニアリング技術のポイントとなるものと考えた。

L. cremoris 菌による多糖類の生産特性、多糖類が示す物理化学的特性、さらに、生合成のメカニズムが明らかになったことから、第5章では、発酵中の *L. cremoris* 菌に対して初めてパルス電界処理を行い、多糖類生産に対する有益な効果の有無を検討した。

電気穿孔の閾値とされている $1 \text{ V}/\mu\text{m}$ ($= 10 \text{ kV}/\text{cm}$) を下回る $8 \text{ kV}/\text{cm}$ のパルス電圧で、 $1 \mu\text{s}$ の幅のパルスを供試菌 1 世代時間中に平均で 200 回印加する穏和な処理を、対数増殖期中期から後期の培養中に循環処理することにより、多糖類生産が促進され最大で生産量が約 2 倍となることが明らかとなった。劇的な効果ではないが多糖類を増産する効果が認められ、穏和なパルス電界処理が *L. cremoris* 菌による多糖類生産を促進する新規知見が得られた。なお、パルス電界処理を行いながら生産された多糖類では、分子量が低下することが明らかとなったため、重合反応が十分に完了する前に多糖類が培養液中に解放されたとする仮説を提起した。

第 6 章では、パルス電界処理による多糖類増産効果の作用機序を解明し、第 5 章で提起した仮説を検証するための実験を行った。第 5 章で多糖類増産効果が認められたパルス電界処理条件では、電気穿孔による細胞透過性の上昇は限定的で、実際に菌体の生活性を維持する穏和な処理であった。しかしながら、菌体内の代謝物質のプロファイルに変化を及ぼしている可能性もあるため、菌体の細胞質を回収してメタボローム解析に供した。また、代謝経路への影響だけではなく、第 4 章でまとめた多糖類の生合成のメカニズムに対する影響を調べるため、電子顕微鏡観察やウンデカプレノールの形態分析などを行った。

メタボローム解析の結果からは、細胞質膜の修復に関与すると見られる脂肪酸の濃度低下以外には、パルス電界処理の有無による大きな変化は見られなかったことから、本技術を発酵乳製品のような食品に応用したとしても、発酵物の風味に大きな影響を与える技術ではないことが示唆された。一方、電子顕微鏡観察やウンデカプレノールの形態分析の結果からは、糖鎖中間体とウンデカプレノールとを結合するリン酸 2 エステル結合が開裂し、通常よりも重合が進んでいない多糖類が培地中に放出されたことが示唆された。乳酸発酵が進み pH が低下した状態でパルス電界処理を行うことにより、細胞表面で水素イオンの電気濃縮が起こり、糖鎖中間体とウンデカプレノールとを結合するリン酸 2 エステル結合が開裂したと考えられ、パルス処理された菌体では遊離のウンデカプレノールリン酸の濃度が高くなっていた。この現象が繰り返されることにより、多糖類生合成におけるウンデカプレノールのリサイクルが向上し、増産効果となって現れたものと結論した。

パルス電界処理による多糖類増産効果が確認され、その作用機序も明らかになったことから、第 7 章では、増産効果を至適化するパルス電界処理条件について検討した。パルス電界の極性変化、パルス幅、パルス電圧、パルス周波数などの処理条件が、多糖

類増産効果や菌体の生活性とどのような関係を示すのかを解明し、本技術を産業スケールで応用するための技術の基礎をまとめることを目的とした。パルス電界における極性の変化は影響が無かったものの、パルス周波数が高いほど多糖類増産効果が低下する傾向が明らかであり、パルス電圧を低下させて平均電流を一定にする補正をしても、パルス周波数が高いほど多糖類増産効果が低下した。なお、多糖類増産効果の要因である水素イオンの電気濃縮は、パルスピーク時の電流や平均電流と相関のある現象であり、実験で行われた処理条件内であれば、電流値が高いほど多糖類増産効果も高くなることが示唆された。パルス電圧については 8 kV/cm 以下で全ての実験を行ったが、ピーク電流で 3 A 以上または平均電流で 10 mA 以上印加し、その際パルス周波数を 3,000 Hz 以下とすることにより、高い多糖類増産効果が得られることが明らかとなった。

以上が本研究で得られた結果の全体像であり、所期の目的通りパルス電界処理が *L. cremoris* 菌における多糖類生産を高める効果を有する新規知見を得て、さらにその作用機序を解明するとともに、各種のパルス処理条件と多糖類増産効果との関連を明らかにすることができた。電気化学的な処理が多糖類の生合成プロセスに作用することで起こる現象が、結果的に多糖類の増産効果となっており、乳酸菌の発酵途中にパルス電界処理を行うユニークな技術の基盤を構築することができた。パルス電界処理を行いながら発酵を継続して生産される多糖類は、通常発酵で生産される多糖類と比較すると分子量が低下するため、粘度などの物性が同等にはならない。従って、*L. cremoris* 菌による発酵乳の特有の物性をさらに差別化する目的には、本技術は適さないかもしれないが、リン酸化多糖類が示す免疫賦活作用などの保健機能はその構造に依存するものであるため、パルス電界処理で生産量を高めることができるのは大きな利点である。

8.2. 今後の研究課題

本研究では、発酵中のパルス電界処理により *L. cremoris* 菌のリン酸化多糖類生産を促進する効果を明らかにしたが、初めに提起される疑問としては、同じ効果がどのような乳酸菌もしくはグラム陽性菌が生産する多糖類にも適用される技術なのかという点である。この疑問に対しては、第 5 章の考察において *bulgaricus* 菌と *longum* 菌を用いた予備実験の結果を示したが、パルス電界処理において、菌体は誘電層としての細胞質膜が導電性の細胞質を覆った構造であり、実際に菌体に印加される電圧は菌体の大きさに比例するため、*L. cremoris* 菌のように直径 1 μm の球菌に対して、桿菌のように菌体の長さが 5 μm にもなる場合、菌体の長さの向きと電気力線が一致した場合には 5 倍の

印加電圧がかかることになるため、電気穿孔が発生し菌体構造の破壊が起こる。すなわち桿菌ではパルス電界の影響を均一にすることが困難であるため、多糖類の増産効果が得られるとしても適切なパルス処理条件を見つけ出すことが重要であり、桿菌での効果については別途検証する必要がある。

次に提起される疑問点は、この効果がどのような構造の多糖類にも現れるのかという点である。*L. cremoris* 菌のリン酸化多糖類はマイナスチャージを帯びた多価電解質であり、細胞質膜外面で進行中の多糖類中間体には、パルス電界の中で陽極側に引き寄せる静電氣的牽引力が負荷されたはずである。この牽引力がパルス電界処理による糖鎖の切り離しに寄与したのであれば、電解質としての性質が無い中性多糖類の生産における増産効果が発揮されないことも考えられる。中間体のキャリアー脂質であるウンデカブレノールと中間体糖鎖を結合する 2 リン酸のエステル結合は数 mM の塩酸で開裂するので、水素イオンの電気濃縮が発生するようなパルス処理条件や、より乳酸発酵が進んだ段階でパルス処理することにより、リン酸エステル結合を開裂させることは可能と考えられるが、増産効果に対する多糖類の静電氣的チャージの影響については検証の余地を残している。

上記の 2 課題は本技術の対象を広げる上で検討を要する課題であるが、本技術を食品などの産業スケールで応用していく上でも検討すべき課題がある。これまでの食品加工技術としてのパルス電界処理の応用は、電気穿孔による菌体の物理的破壊による殺菌効果を得ることにより加熱処理による殺菌効果の一部を代替し、加熱殺菌処理によって失われる食品の栄養価や風味さらに物性を抑制するための応用例がほとんどである。最近でも、果汁の殺菌 (Bobinaité *et al.*, 2014)、卵製品の殺菌 (Yogesh, 2015)、低脂肪乳の殺菌 (Lee *et al.*, 2016) などが報告されている。パルス電界処理だけで全ての殺菌効果を達成しようとするものではないものの、菌体を確実に電気穿孔させるには比較的強いパルス電界が必要であり、大量の処理を行うために必要となる大型のパルスチャンバーに高電圧を提供するための電気容量を満たす電源装置を必要とする。これに対して本技術は、電気穿孔が限定的に発生するレベルでの穏和な電界処理であり、電源装置への負荷が軽減されるが、乳酸菌の発酵工程と並行する連続処理を行うためには数時間の連続運転が必要であり、その間にパルス電極表面での金属の酸化やそれに伴う電蝕が進行する。また一方で、被処理物中のミネラル成分やタンパク成分が電極表面に堆積するため、電界の制御が時間とともに困難になる問題などが挙げられる。装置上の課題ではあるが、電蝕により処理した食品中にミネラル成分が移行するようであれば、食品加工技術とし

て応用するためには解決しなければならない課題である。

8.3. 今後の展望

第1章 1.4. に述べたように、乳酸菌が生産する多糖類には各種の保健機能が報告されており、抗腫瘍効果や免疫賦活効果 (Kitazawa *et al.*, 1991b, 1991c, 1993) を示す *L. cremoris* 菌のリン酸化多糖類や、ナチュラルキラー細胞の活性化 (Makino *et al.*, 2006) やインフルエンザ感染抑制 (Nagai *et al.*, 2011) を示す *bulgaricus* 菌のリン酸化多糖類を、パルス電界処理により増産することが確認できれば、それらの保健効果をさらに増幅する可能性も考えられる。

穏和なパルス電界処理が *L. cremoris* 菌のリン酸化多糖類生産を促進する効果をもたらしたのは、パルス電界により発生した細胞質膜表面での水素イオンの電気濃縮により、多糖類中間体糖鎖とキャリアー脂質とを結合するリン酸エステル結合を開裂させたことが要因であった。ウンデカプレノールというキャリアー脂質上で糖鎖が形成される生合成メカニズムは、菌体外多糖類だけではなく莢膜多糖類の合成や、細胞表層を構成するリポテイコ酸 (Mancuso & Chiu, 1982) やペプチドグリカン (Bickford *et al.*, 2013) の合成にも共通するメカニズムであり、これらの物質生産にも同じような作用をもたらすことが想定される。

菌体外多糖類の生合成では、中間体糖鎖がウンデカプレノールから解放されることにより、ウンデカプレノールのリサイクル効率が上がり多糖類増産効果の要因となったが、ペプチドグリカンの生合成ではウンデカプレノール上で糖鎖形成がされた後に、ペプチド部分の架橋が形成されて細胞質膜外側を取り巻く 3 次元構造の外層を形成する。したがって、菌が増殖中にパルス電界処理を行うと、ペプチドグリカン架橋が形成されずに外層構造を形成できない可能性もある。実際に、第6章で示したパルス電界処理直後の *L. cremoris* の菌 SEM 写真では、菌体表面に皺が形成されており明らかに通常の菌体のスムーズな表面ではない。このことから、パルス電界処理は微生物の細胞表層の状態に変化を与え、生合成される複合糖質の存在形態にも変化を与えるものと思われ、菌体同士の連結や生育環境への接着など、菌体表面において複合糖質の糖鎖が本来果たすべき機能や、それを受容体として認識する現象に変化をもたらす可能性が考えられる。

また、乳酸菌は発酵食品に広く利用されてきた細菌であるが、その発酵の妨げになる現象として、バクテリオファージによる感染が問題となってきた。Rakhuba ら (2010) がバクテリオファージの受容体やその接着や侵入のメカニズムを総説にまとめており、

グラム陽性菌でのバクテリオファージ受容体として、ペプチドグリカン、テイコ酸、リポテイコ酸を挙げているが、特に *L. cremoris* 菌が属する *Lactococcus lactis* 種では、多糖類のラムノース、グルコース、ガラクトースからなる部分構造がバクテリオファージに認識されると報告している。*L. cremoris* 菌のリン酸化多糖類もファージ感染を防ぐために生産するようになったのかもしれないが、パルス電界により細胞質膜表層から糖鎖を切り離す処理を継続しながら発酵を行うことにより、バクテリオファージの感染を防ぐ効果を高める可能性も期待される。

本研究では、乳酸菌の発酵中に穏和なパルス電界処理を組み合わせるという、全く新たな発想に基づいた発酵方法を提起した。殺菌効果を代替する技術として開発が進んでいるパルス電界処理を殺菌以外の目的で応用し、電気化学的な処理が菌体による物質の生合成のメカニズムにもたらす影響を、リン酸化多糖類の増産という有益な効果として見出すことができたことは大きな成果となった。発酵における物質生産のエンジニアリング技術として、電気化学的な処理を応用した例は極めて限られるが、上記のように新規技術を応用した様々な研究の可能性が考えられ、産業スケールの処理を目的とした装置の改良などと並行し、この発酵エンジニアリング技術が食品加工技術として今後さらに発展していくことを期待したい。

参考文献

- Abramson, J., Iwata, S., & Kaback, H. R. (2004). Lactose permease as a paradigm for membrane transport proteins (Review). *Molecular Membrane Biology*, 21, 227–236.
- Ariga, H., Urashima, T., Michihata, E., Ito, M., Morizono, N., KIMURA, T., & Takahashi, S. (1992). Extracellular Polysaccharide from Encapsulated *Streptococcus sajivarius* subsp. *thermophilus* OR 901 Isolated from Commercial Yogurt. *Journal of Food Science*, 57, 625–628.
- Ayala-Hernandez, I., Goff, H. D., & Corredig, M. (2008). Interactions Between Milk Proteins and Exopolysaccharides Produced by *Lactococcus lactis* Observed by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Dairy Science*, 91, 2583–2590.
- Azizan, K. A., Baharum, S. N., & Noor, N. M. (2012). Metabolic profiling of *Lactococcus lactis* under different culture conditions. *Molecules*, 17, 8022–8036.
- Barreteau, H., Magnet, S., Ghachi, M. El, Touzé, T., Arthur, M., Mengin-Lecreulx, D., & Blanot, D. (2009). Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of the pool levels of undecaprenyl phosphate and its derivatives in bacterial membranes. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877, 213–220.
- Bartlett, G. R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 234, 466–468.
- Bickford, J. S., & Nick, H. S. (2013). Conservation of the PTEN catalytic motif in the bacterial undecaprenyl pyrophosphate phosphatase, BacA/UppP. *Microbiology*, 159, 2444–2455.
- Bickford, J. S., & Nick, H. S. (2013). Conservation of the PTEN catalytic motif in the bacterial undecaprenyl pyrophosphate phosphatase, BacA/UppP. *Microbiology*, 159, 2444–2455.
- Bobinaitė, R., Pataro, G., Lamanauskas, N., Šatkauskas, S., Viškelis, P., & Ferrari, G. (2014). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5898–5905.
- Boels, I. C., Kranenburg, R. Van, Marja, W., Chong, B. F., Vos, W. M. De, Kanning, M. W., & Kleerebezem, M. (2003). Increased Exopolysaccharide Production in *Lactococcus lactis* due to Increased Levels of Expression of the NIZO B40 eps Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5029–5031.
- Bossio, J. C., Semino, C. E., Iñón de Iannino, N., & Dankert, M. A. (1996). The in vitro biosynthesis of the exopolysaccharide produced by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, strain NA 30. *Cell Molecular Biological Letter*, 42, 737–758.

- Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D. H., & Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 208-233.
- Bouzar, F., Cerning, J., & Desmazeaud, M. (1996). Exopolysaccharide Production in Milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by Two Colonial Variants. *Journal of Dairy Science*, 79, 205–211.
- Bubb, W., Urashima, T., Fujiwara, R., Shinnai, T., & Ariga, H. (1997). Structural characterisation of the exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR 901. *Carbohydrate Research*, 301, 41–50.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. ., & Landon, M. (1986). Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.*, 8, 625–628.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. ., & Landon, M. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.*, 10, 255–260.
- Cerning, J., Renard, C. M., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., & Topisirovic, L. (1994). Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3914–3919.
- Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75, 463–472.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 113–130.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., & Desmazeaud, M. (1992). Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 75, 692–699.
- Chassagne, C., Dubois, E., Jiménez, M. L., van der Ploeg, J. P. M., & van Turnhout, J. (2016). Compensating for Electrode Polarization in Dielectric Spectroscopy Studies of Colloidal Suspensions: Theoretical Assessment of Existing Methods. *Frontiers in Chemistry*, 4, 1–19.
- Chassy, B. M., & Thompson, J. (1983). Regulation of lactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and β -D-phosphogalactoside galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*. *Journal of Bacteriology*, 154, 1195–1203.
- Costerton, J., Cheng, K., Geesey, G., Ladd, T., Nickel, J., Dasgupta, M., & Marrie, T. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435–464.

- Cox, W. P., & Merz, E. H. (1958). Correlation of dynamic and steady-flow viscosities. *Journal of Polymer Science*, 28, 619–622.
- Cuthbertson, L., Mainprize, I. L., Naismith, J. H., & Whitfield, C. (2009). Pivotal Roles of the Outer Membrane Polysaccharide Export and Polysaccharide Copolymerase Protein Families in Export of Extracellular Polysaccharides in Gram-Negative Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 155–177.
- Dabour, N., & Lapointe, G. (2005). Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7414–7425.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van De Ven, S., & Degeest, B. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1059–1068.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153–177.
- Degeest, B., Van de Ven, S., & De Vuyst, L. (1997). Isolation and production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* and strong evidence for their growth-associated biosynthesis. In Proceedings of the 11th Forum for Applied Biotechnology, Gent, Belgium (pp. 1199–1206).
- Doco, T., Carcano, D., Ramos, P., Loones, A., & Fournet, B. (1991). Rapid isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research*, 58, 147–150.
- Doco, T., Wieruszkeski, J., Fournet, B., Carcano, D., Ramos, P., & Loones, A. (1990). Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research*, 198, 313–321.
- Dubois, M., Gilles, K. a, Ton, J. K. H., Rebers, P. a, & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Ewe, J.-A., Wan-Abdullah, W.-N., Alias, A. K., & Liong, M.-T. (2012). Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk by electroporation. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 63, 580–596.
- Ewe, J.-A., Wan-Abdullah, W.-N., Alias, A. K., & Liong, M.-T. (2012). Bioconversion of isoflavones and the probiotic properties of the electroporated parent and subsequent three subcultures of *Lactobacillus fermentum* BT 8219 in biotin-soymilk. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 947–959.

- Faber, E. J., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. G. (2001). Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291. *Carbohydrate Research*, 331, 183–194.
- Folkenberg, D. M., Dejmek, P., Skriver, A., & Ipsen, R. (2006). Interactions between EPS-producing *Streptococcus thermophilus* strains in mixed yoghurt cultures. *The Journal of Dairy Research*, 73, 385–393.
- Fontana, C., Li, S., Yang, Z., & Widmalm, G. (2015). Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. *Carbohydrate Research*, 402, 87–94.
- Forde, A., & Fitzgerald, G. F. (1999). Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *International Dairy Journal*, 9, 465–472.
- Gabriel, O. (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology (pp. 504–511).
- Garcia-Garibay, M., & Marshall, V. M. E. (1991). Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 325–328.
- Gerwig, G. J., Dobruchowska, J. M., Shi, T., Urashima, T., Fukuda, K., & Kamerling, J. P. (2013). Structure determination of the exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Carbohydrate Research*, 378, 84–90.
- Lee, G. J., Han, B. K., Choi, H. J., Kan, S. H., Baick, S. C., & Lee, D-U. (2015). Inactivation of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus brevis* in Low-fat Milk by Pulsed Electric Field Treatment: A Pilot-scale Study. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35, 800–806.
- Gorin, P., & Spencer, J. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Chemistry*, 44, 993–998.
- Górska, S., Jachymek, W., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P. B., & Gamian, A. (2010). Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus johnsonii* 142. *Carbohydrate Research*, 345, 108–114.
- Górska-Frączek, S., Sandström, C., Kenne, L., Paściak, M., Brzozowska, E., Strus, M., Heczko, P., & Gamian, A. (2013). The structure and immunoreactivity of exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus johnsonii* strain 151. *Carbohydrate Research*, 378, 148–153.

Górska-Frączek, S., Sandström, C., Kenne, L., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P., & Gamian, A. (2011). Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a nonasaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B. *Carbohydrate Research*, 346, 2926–2932.

Graessley, W. W. (1982). Entangled linear, branched and network polymer systems. Molecular theories. *Advances in Polymer Science*, 47, 67–117.

Graninger, M., Nidetzky, B., Heinrichs, D. E., Whitfield, C., & Messner, P. (1999). Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase and dTDP-4- dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 25069–25077.

Grobben G. J., Smith M .R., Sikkema, J., Bont, J. A. M. (1996). Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotide in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 196–199.

Grobben, G. J., Sikkema, J., Smith, M. R., & Bont, J. D. (1995). Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 103–107.

Gruter, M., Leeflang, B. R., Kuiper, J., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. (1993). Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrückii* subspecies *bulgaricus* rr grown in skimmed milk. *Carbohydrate Research*, 239, 209–26.

Gruter, M., Leeflang, B., Kuiper, J., Kamerling, J., & Vliegthart, J. (1992). Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydrate Research*, 231, 273–291.

Hancock, R., Marshall, K., & Weigel, H. (1976). Structure of the levan elaborated by *Streptococcus salivarius* strain 51: an application of chemical-ionisation mass-spectrometry. *Carbohydrate Research*, 49, 351–360.

Hartmann, E., & König, H. (1991). Nucleotide-activated oligosaccharides are intermediates of the cell wall polysaccharide of *Methanosarcina barkeri*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 372, 971–974.

Hassan, A. N. (2008). ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 91, 1282–1298.

- Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., & Qvist, K. B. (2003). Microstructure and Rheology of Yogurt Made with Cultures Differing Only in Their Ability to Produce Exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86, 1632–1638.
- Honda, S., Suzuki, S., & Taga, A. (2003). Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1689–1714.
- Hülshager, H., Potel, J., & Niemann, E. G. (1983). Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 22, 149–162.
- Hutkins, R. W., & Ponne, C. (1991). Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for a galactose-lactose antiporter. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 941–944.
- Ielpi, L., Couso, R. O., & Dankert, M. A. (1993). Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology*, 175, 2490–2500.
- Ielpi, L., Couso, R., & Dankert, M. (1981). Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. *FEBS Letters*, 130, 253–256.
- Islam, S. T., & Lam, J. S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian Journal of Microbiology*, 60, 697–716.
- Ismail, B., & Nampoothiri, K. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC9510. *Archives of Microbiology*, 192, 1049–1057.
- Jeanson, S., Hilgert, N., Coquillard, M. O., Seukpanya, C., Faiveley, M., Neveu, P., Abraham, C., Georgescu, V., Fourcassié, P., & Beuvier, E. (2009). Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 75–81.
- Jolly, L., Newell, J., Porcelli, I., Vincent, S. J. F., & Stingele, F. (2002). *Lactobacillus helveticus* glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis. *Glycobiology*, 12, 319–327.
- Kandušer, M., Šentjurc, M., & Miklavčič, D. (2006). Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing. *European Biophysics Journal*, 35, 196–204.
- Kang, K., & Pettitt, D. (1993). Industrial Gums; Polysaccharides and their derivatives. In *Polysaccharides and their derivatives* (pp. 341–397).

- Kato, J. I., Fujisaki, S., Nakajima, K. I., Nishimura, Y., Sato, M., & Nakano, A. (1999). The *Escherichia coli* homologue of yeast Rer2, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis. *Journal of Bacteriology*, 181, 2733–2738.
- Kitazawa, H., Toba, T., Kumano, N., Adachi, S., Yamaguchi, T. (1991a). Antitumoral Activity of Slime-forming, Encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk, “viili.” *Animal Science and Technology*, 62, 277–283.
- Kitazawa, H., Itoh, T., & Yamaguchi, T. (1991b). Induction of macrophage cytotoxicity by slime products produced by encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Animal Science and Technology*, 62, 861–866.
- Kitazawa, H., Nomura, M., Itoh, T., & Yamaguchi, T. (1991c). Functional alteration of macrophages by a slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 74, 2082–2088.
- Kitazawa, H., Yamaguchi, T., Miura, M., Saito, T., & Itoh, T. (1993). B-cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from ropy sour milk, viili. *Journal of Dairy Science*, 76, 1514–1519.
- Kojic, M., Vujcic, M., Banina, a, Cocconcelli, P., Cerning, J., & Topisirovic, L. (1992). Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4086–4088.t
- Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7, 200–211.
- Kosaka, A., Yan, H., Ohashi, S., Gotoh, Y., Sato, A., Tsutsui, H., Kaisho, T., Toda, T., & Tsuji, N. (2012). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC triggers IFN- γ production from NK and T cells via IL-12 and IL-18. *International Immunopharmacology*, 14, 729–733.
- Kumagai, H. (2008). Physical Properties of Foods and the Effect of Water on Them II Electrical Properties and Dielectric Relaxation. *Japan Journal of Food Engineering*, 9, 123–134.
- La Rivière, J., & Kooiman, P. (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archives of Mikrobiologie*, 59, 269–278.
- Lamothe, G., Jolly, L., Mollet, B., & Stingele, F. (2002). Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Archives of Microbiology*, 178, 218–228.
- Lau, E., & Bacic, A. (1993). Capillary gas chromatography of partially methylated alditol acetates on a high-polarity, cross-linked, fused-silica BPX70 column. *Journal of Chromatography A*, 637, 100–103.

- Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszeski, J. M., Strecker, G., Favre, N., & Neeser, J. R. (1997). Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3512–3518.
- Lennarz, W., & Scher, M. G. (1972). Metabolism and function of polyisoprenol sugar intermediates in membrane-associated reactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 265, 417–441.
- Levander, F., & Svensson, M. (2002). Enhanced Exopolysaccharide Production by Metabolic Engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 784–790.
- Lifely, M. R., Tarellit, E., & Baddiley, J. (1980). The teichuronic acid from the walls of *Bacillus licheniformis* ATCC9945. *Biochemical Journal*, 191, 305–318.
- Linker, A., & Jones, R. (1966). A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 3845–3851.
- Lipiński, T., Jones, C., Lemercinier, X., Korzeniowska-Kowal, A., Strus, M., Rybka, J., Gamian, A., & Heczko, P. B. (2003). Structural analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* strain KL37C exopolysaccharide. *Carbohydrate Research*, 338, 605–609.
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50, 353–380.
- Looijesteijn, P. J., Trapet, L., De Vries, E., Abee, T., & Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 71–80.
- Lye, H. S., Khoo, B. Y., Karim, A. A., Rusul, G., & Liong, M. T. (2012). Growth properties and cholesterol removal ability of electroporated *Lactobacillus acidophilus* BT 1088. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 981–989.
- Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., & Oda, M. (2006). Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Journal of Dairy Science*, 89, 2873–2881.
- Malang, S. K., Maina, N. H., Schwab, C., Tenkanen, M., & Lacroix, C. (2015). Characterization of exopolysaccharide and ropy capsular polysaccharide formation by *Weissella*. *Food Microbiology*, 46, 418–427.
- Manca De Nadra, M. C., Strasser De Saad, A. M., Pesce De Ruiz Holgado, A. A., & Oliver, G. (1985). Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft*, 40, 409–411.

- Mancuso, D. J., & Chiu, T. H. (1982). Biosynthesis of glucosyl monophosphoryl undecaprenol and its role in lipoteichoic acid biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 152, 616–625.
- Marshall, V., Cowie, E., & Moreton, R. (1995). Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*, 62, 621–628.
- Maruo, T., Gotoh, Y., Nishimura, H., Ohashi, S., Toda, T., & Takahashi, K. (2012). Oral administration of milk fermented with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC protects mice against influenza virus infection. *Letters in Applied Microbiology*, 55, 135–140.
- Mattar, J. R., Turk, M. F., Nonus, M., Lebovka, N. I., El Zakhem, H., & Vorobiev, E. (2015). *S. cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments. *Bioelectrochemistry*, 103, 92–97.
- Milas, M., Rinaudo, M., Knipper, M., & Schuppiser, J. L. (1990). Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions. *Macromolecules*, 23, 2506–2511.
- Miyaji, H., & Misaki, A. (1973). The structure of a dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1397: the linkages and length of the branches. *Carbohydrate Research*, 31, 277–287.
- Mohamed, M., & Eissa, A. (2012). Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology. Structure and Function of Food Engineering, (pp. 275–306), InTech
- Morales-de la Peña, M., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2011). Food Preservation by Pulsed Electric Fields: An Engineering Perspective. *Food Engineering Reviews*, 3, 94–107.
- Morris, E. R. (1990). Shear-thinning of “random coil” polysaccharides: Characterisation by two parameters from a simple linear plot. *Carbohydrate Polymers*, 13, 85–96.
- Mozzi, F., Savoy de Giori, G., & Font de Valdez, G. (2003). UDP-galactose 4-epimerase: A key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 175–183.
- Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Oliver, G., & Font de Valdez, G. (1996). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft*, 51, 670–673.
- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T., & Adachi, S. (1990). Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranofaciens* K1. *Carbohydrate Research*, 204, 227–232.
- Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H., & Yamada, H. (2011). Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *International Immunopharmacology*, 11, 2246–2250.

- Nakajima, H., Hirota, T., Toba, T., Itoh, T., & Adachi, S. (1992). Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydrate Research*, 224, 245–253.
- Nakajima, H., Toyoda, S., Toba, T., Itoh, T., Mukai, T., Kitazawa, H., & Adachi, S. (1990). A Novel Phosphopolysaccharide from Slime-Forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *Journal of Dairy Science*, 73, 1472–1477.
- Navarini, L., Cesàro, A., & Ross-Murphy, S. B. (1992). Viscoelastic properties of aqueous solutions of an exocellular polysaccharide from cyanobacteria. *Carbohydrate Polymers*, 18, 265–272.
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 174–229.
- Nierop Groot, M. N., & Kleerebezem, M. (2007). Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2645–2656.
- Nilsson, G. (1950). The bacterial flora of Swedish slimy milk. *Svenska Mejeritidn*, 42, 411–416.
- Nomura, M., Kobayashi, M., & Okamoto, T. (2002). Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2209–2213.
- Oba, T., Doesburg, K. K., Iwasaki, T., & Sikkema, J. (1999a). Identification of biosynthetic intermediates of the extracellular polysaccharide viilian in *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *Archives of Microbiology*, 171, 343–349.
- Oba, T., Higashimura, M., Iwasaki, T., Matser, A. M., Steeneken, P. A. M., Robijn, G. W., & Sikkema, J. (1999b). Viscoelastic properties of aqueous solutions of the phosphopolysaccharide “viilian” from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydrate Polymers*, 39, 275–281.
- Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., Kambe, M., & Tsuchiya, F. (1983). Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 1623–1625.
- Ohba, T., Uemura, K., & Nabetani, H. (2016). Moderate pulsed electric field treatment enhances exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *Process Biochemistry*, 51, 1120–1128.
- Otto, R., ten Brink, B., Veldcamp, H., & Konings, W. N. (1983). The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiology Letters*, 16, 69–75.

- Pachekrepapol, U., Horne, D. S., & Lucey, J. A. (2015). Effect of dextran and dextran sulfate on the structural and rheological properties of model acid milk gels. *Journal of Dairy Science*, 98, 2843–2852.
- Pick, M. (1933). Beitrage zur Kenntnis der typischen Bacterienflora im Kefir (Bac. cancasi [nova species]). *Milchwirtschaftliche Forschungen*, 15, 115–153.
- Pidoux, M., Marshall, V., Zaroni, P., & Brooker, B. (1990). Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 311–320.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Szwajcer Dey, E., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59, 145–155.
- Richardson, R. K., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Non-linear viscoelasticity of polysaccharide solutions. 2: Xanthan polysaccharide solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9, 257–264.
- Robijn, G. W., Gutiérrez Gallego, R., van den Berg, D. J., Haas, H., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. (1996a). Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydrate Research*, 288, 203–218.
- Robijn, G. W., Thomas, J. R., Haas, H., van den Berg, D. J., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. (1995a). The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. *Carbohydrate Research*, 276, 137–154.
- Robijn, G., van den Berg, D., Haas, H., Kamerling, J., & Vliegthart, J. (1995b). Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1. *Carbohydrate Research*, 276, 117–136.
- Robijn, G., Wienk, H., van den Berg, D., Haas, H., Kamerling, J., & Vliegthart, J. (1996b). Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydrate Research*, 285, 129–139.
- Robinson, G., Ross-Murphy, S. B., & Morris, E. R. (1982). Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. *Carbohydrate Research*, 107, 17–32.
- Ross-Murphy, S. (1994). Rheological Methods. In *Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers* (pp. 343–392).

- Säwén, E., Huttunen, E., Zhang, X., Yang, Z., & Widmalm, G. (2010). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST1 solely by NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*, 47, 125–134.
- Semino, C. E., & Dankert, M. A. (1993). In vitro biosynthesis of acetan using electroporated *Acetobacter xylinum* cells as enzyme preparations. *Journal of General Microbiology*, 139, 2745–2756.
- Sijtsma, L., Wouters, J. T., & Hellingwerf, K. J. (1990). Isolation and characterization of lipoteichoic acid, a cell envelope component involved in preventing phage adsorption, from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110. *Journal of Bacteriology*, 172, 7126–7130.
- Sjoberg, A., & Hahn-Hagerdal, B. (1989). β -Glucose-1-phosphate, a possible mediator for polysaccharide formation in maltose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1549–1554.
- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., & Nishioka, T. (2003). Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2, 488–494.
- Stingele, F., Lemoine, J., & Neeser, J. R. (1997). *Lactobacillus helveticus* Lh59 secretes an exopolysaccharide that is identical to the one produced by *Lactobacillus helveticus* TN-4, a presumed spontaneous mutant of *Lactobacillus helveticus* TY1--2. *Carbohydrate Research*, 302, 197–202.
- Stingele, F., Neeser, J. R., & Mollet, B. (1996). Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, 178, 1680–1690.
- Sundman, V. (1953). On the Protein Character of a Slime Produced by *Streptococcus cremoris* in Finnish Ropy Sour Milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 7, 558–560.
- Sutherland IW. (1993). Polysaccharides and their derivatives. In *Industrial Gums* (3rd ed., pp. 69–85). Academic Press Inc.
- Sutherland IW. (1986). Industrially useful microbial polysaccharides. *Microbiological Sciences*, 3, 5–9.
- Toba, T., Abe, S., Arihara, K., & Adachi, S. (1986). A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 2673–2674.

- Toba, T., Nakajima, H., Tobitani, A., & Adachi, S. (1990). Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nordic ropy sour milk. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 313–320.
- Uchida, K., Akashi, K., Motoshima, H., Urashima, T., Arai, I., & Saito, T. (2009). Microbiota analysis of Caspian Sea yogurt, a ropy fermented milk circulated in Japan. *Animal Science Journal*, 80, 187–192.
- van Calsteren, M.-R., Gagnon, F., Nishimura, J., & Makino, S. (2015). Structure determination of the neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Carbohydrate Research*, 413, 115–122.
- van Calsteren, M.-R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., & Roy, D. (2002). Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *The Biochemical Journal*, 363, 7–17.
- van den Berg, D. J. C., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Ledebøer, A. M., Verrips, C. T. (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2840–2844.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (1997a). Biosyntheses of exopolysaccharides in lactic acid bacteria. *Voedingsmiddelentechnologie*, 30, 11–13.
- van Kranenburg, R., Marugg, J. D., van Swam, I. I., Willem, N. J., & de Vos, W. M. (1997b). Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 24, 387–397.
- van Kranenburg, R., van Swam, I. I., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (1998). Expression, disruption, and complementation of eps genes essential for exopolysaccharide biosynthesis in *L. lactis*. In Abstracts of the ASM Conference on Streptococcal Genetics (pp. 45–46). Vichy, France.
- Vescovo, M., G. L. Scolari, G. L., & Bottazzi, V. (1989). Plasmid-encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biothechnology Letters*, 11, 709–712.
- Vincent, S. J. F., Faber, E. J., Neeser, J.-R., Stingele, F., & Kamerling, J. P. (2001). Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiology*, 11, 131–139.
- Waeghe, T., Darvill, A., MacNeil, M., & Albersheim, P. (1983). Determination, by methylation analysis, of the glycosyl-linkage compositions of microgram quantities of complex carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 123, 281–304.

- Wang, H., Zhao, J., Li, D., Wen, C., Liu, H., Song, S., & Zhu, B. (2015). Comparison of polysaccharides of *Haliotis discus hannai* and *Volutharpa ampullacea perryi* by PMP-HPLC-MS(n) analysis upon acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 13, 48–53.
- Wang, M., Orwar, O., Olofsson, J., & Weber, S. G. (2010). Single-cell electroporation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 3235–3248.
- Weiner, R., Langille, S., & Quintero, E. (1995). Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 339–346.
- Whitfield, C., & Valvano, M. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 35, 135–246.
- Whitfield, C. (2010). Polymerases: Glycan chain-length control. *Nature Chemical Biology*, 6, 403–404.
- Yamamoto, Y., Murosaki, S., Yamauchi, R., Kato, K., & Sone, Y. (1994). Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydrate Research*, 261, 67–78.
- Yang, X., Zhao, Y., Wang, Q., Wang, H., & Mei, Q. (2005). Analysis of the monosaccharide components in *Angelica* polysaccharides by high performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 21, 1177–1180.
- Yogesh, K. (2016). Pulsed electric field processing of egg products: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 934–945.
- Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T., & Adachi, S. (1991). Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 257–264.
- Zang, X., & Bremer, H. (1995). Control of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 Promoter Strength by ppGpp. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 11181–11189.
- Zimmermann, U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 105, 176–256

論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* が生産する多糖類の増産を
目的としたパルス電界処理に関する研究

氏 名 大羽哲郎

1. 研究の背景と目的

乳酸菌による多糖類生産に関する研究としては、多糖類の一次構造解明、ゲル形成能や粘弾性などの物性研究、多糖類が示す保健機能、さらには、多糖類が生合成されるメカニズムや生合成に関わるゲノム研究などが行われてきた。中でも *Lactococcus lactis* 種の乳酸菌は、発酵乳やフレッシュチーズ製造に伝統的に利用されており、特に北欧の国々やコーカサス地方で利用されてきた多糖類産生能を有する亜種 *cremoris* 乳酸菌 (*L. cremoris* 菌) は、生産された多糖類がもたらす特有の物性や、免疫賦活作用やインフルエンザウィルス感染抑制効果などの保健機能が注目されている。ところが、多糖類生産を制御する発酵技術に関する研究には大きな進歩はなく、発酵温度や時間、発酵基質や発酵調整剤などによる技術にほかならない。

一方、遺伝子組み換えを実施する際において、細胞や核への物理的な遺伝子導入手段として利用されてきたパルス電界処理は、近年、加熱処理に替わる殺菌技術としても実用化されており、電気穿孔がもたらす細胞構造の破壊による殺菌効果を食品加工へ応用した技術である。電界処理は、細胞質内外の電解質にモーメントを与えることから、電気穿孔に至るほどの電界でなくても、細胞における代謝や生命活動に影響を与えるものと考えられる。本研究の新規性は、電気穿孔で菌体を物理的に破壊し殺菌に至らしめるようなパルス電界処理ではなく、菌の生活性を一定レベルで維持する穏和な処理条件により、多糖類の生合成に有益な効果をもたらす新たなエンジニアリング技術開発があり、有益な効果が認められる場合にはその作用機序を解明し、産業レベルでの応用を前提とした技術確立までを目標とした。

2. 各章の研究で得られた知見

第1章は乳酸菌による多糖類に関する既存の研究に関する総説であり、多糖類の一次構造の解明、ゲル形成能や粘弾性などの物性研究や多糖類が示す保健機能の研究、さらには、多糖類が生合成されるメカニズムや生合成に関わるゲノム研究で得られた知見の概要をとりまとめた。また、限られた知見ではあるものの、パルス電界処理を殺菌目的以外で微生物に応用した研究例についても紹介し、本研究の目的および全体構想についてまとめた。

第2章では、*L. cremoris* 菌 0495 株および C4 株に関して、培地成分や培養方法を変化させることにより、発酵特性や多糖類生産性および多糖類の構成糖がどのように変化を示すか調べた。その結果、既報の知見も含めて *L. cremoris* 菌株間で構成糖や構造の相同性があり、いずれもグルコース・ガラクトース・ラムノースにリン酸基を含んだ酸性多糖類であることが示唆された。また、多糖類生産は対数増殖期後半から定常期にかけて活発化することから、パルス電界処理はその生育ステージで実施すべきであることを結論した。

第3章では、*L. cremoris* 菌が生産するリン酸化多糖類が示す物性について調べ、パルス電界処理を行う上で障害となるようなゲル形成能を示さないこと、リン酸基によるマイナスチャージが分子間・分子内のもつれにおいて静電的反発力となっていることなどが明らかとなった。これにより、発酵中のパルス電界処理が可能であるものの、多価電解質であるリン酸化多糖類やその生合成において、パルス電界処理がもたらす影響を考察することが重要であることが示唆された。

第4章では、*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類の生合成を解明するため、菌体から抽出した糖前駆体や多糖類重合ユニット構造の中間体を分析した。その結果、ウンデカプレノールを中間体キャリアーとして、グルコース、ガラクトース、ラムノースの順でユニットの合成が進むことを明らかにした。完成したユニットが細胞質膜外側に転送され、さらに重合途上の中間体に組み込まれるように進行する重合反応に対して、パルス電界処理による細胞質内の電解質に与えるモーメントがどのような影響を与え、さらに、パルス電界の中で細胞質膜外面での重合反応がどのような影響を受けるかが、本エンジニアリング技術のポイントとなることが示唆された。

第5章では、化学合成培地で発酵中の *L. cremoris* 菌に対して初めてパルス電界処理を検討し、電気穿孔の閾値とされている $1 \text{ V}/\mu\text{m}$ ($= 10 \text{ kV}/\text{cm}$) を下回る $8 \text{ kV}/\text{cm}$ のパルス電圧で、 $1 \mu\text{s}$ の幅のパルスを供試菌 1 世代時間中に平均で 200 回印加する穏和な処理

において、多糖類生産が促進され最大で生産量が約 2 倍となることが明らかとなった。なお、パルス電界処理により多糖類の分子量が低下することが判明し、細胞質膜外側にウンデカプレノールで固定されている重合途中の中間体が、パルス電界処理により解放され培地中に放出されたとする仮説を提起した。

第 6 章では、パルス電界処理による多糖類増産効果についての仮説を検証するために、メタボローム解析・走査電子顕微鏡観察・ウンデカプレノールの形態分析などを行った。メタボローム解析の結果からは、細胞質膜の修復に関与すると見られる脂肪酸の濃度低下以外には、パルス電界処理の有無による大きな変化は見られなかったことから、本技術を発酵乳製品のような食品に応用したとしても、発酵物の風味に大きな影響を与える技術ではないことが示唆された。一方、電子顕微鏡観察やウンデカプレノールの形態分析の結果から、乳酸発酵が進み pH が低下した状態でパルス電界処理を行うことにより、細胞表面で水素イオンの電気濃縮が起これ、糖鎖中間体とウンデカプレノールとを結合するリン酸 2 エステル結合が開裂したことが示唆された。それによりウンデカプレノールのリサイクルが向上し、多糖類の増産効果となったことが検証された。

第 7 章では、多糖類増産効果を目的としたパルス電界処理条件の最適化について検討し、パルス電界の極性、パルス幅、パルス電圧、パルス周波数などの処理条件の違いによる、多糖類増産効果や菌体の生活性への影響を調べ、本技術を産業スケールで応用するための基礎的知見をまとめた。パルス電界における極性の変化は影響が無かったものの、パルス周波数が高いほど多糖類増産効果が低下する傾向が明らかであり、パルス電圧を低下させて平均電流を一定にする補正をしても、パルス周波数が高いほど多糖類増産効果が低下した。なお、多糖類増産効果の要因である水素イオンの電気濃縮は、パルスピーク時の電流や平均電流と相関のある現象であり、実験で行われた処理条件内であれば、電流値が高いほど多糖類増産効果も高くなることが示唆された。パルス電圧については 8 kV/cm 以下で全ての実験を行ったが、ピーク電流で 3 A 以上または平均電流で 10 mA 以上印加し、その際パルス周波数を 3,000 Hz 以下とすることにより、高い多糖類増産効果が得られることが明らかとなった。

第 8 章では、本研究で新規発見となったパルス電界処理による乳酸菌の多糖類増産効果を踏まえ、多糖類発酵におけるエンジニアリング技術として総括し、実用化のために要する検討事項についてまとめた。また、穏和なパルス電界処理がもたらす細胞表層への影響から考えられる、微生物発酵におけるエンジニアリング技術としての潜在性についてまとめた。

3. 研究総括

所期の目的どおり、パルス電界処理が *L. cremoris* 菌における多糖類生産を高める効果を有する新規知見を得て、さらにその作用機序を解明するとともに、各種のパルス処理条件と多糖類増産効果との関連を明らかにすることができた。電気化学的な処理が多糖類の生合成プロセスに作用することで起こる現象が、結果的に多糖類の増産効果となっており、乳酸菌の発酵途中にパルス電界処理を行うユニークな技術の基盤を構築することができた。パルス電界処理を行いながら発酵を継続して生産される多糖類は、通常発酵で生産される多糖類と比較すると分子量が低下するため、粘度などの物性が同等にはならない。従って、*L. cremoris* 菌による発酵乳の特有の物性をさらに差別化する目的には、本技術は適さないかもしれないが、リン酸化多糖類が示す免疫賦活作用やインフルエンザウィルス感染抑制効果などの保健機能は、その構造に依存するものであるため、パルス電界処理で生産量を高めることができるのは大きな利点となる。

本研究の供試菌株である球菌で認められた多糖類増産効果が、他のどのような乳酸菌であっても、また、どのような構造の多糖類であっても同様に現れるのかという疑問に対して十分な回答はできないが、桿菌の長さの向きとパルス電界の電気力線が一致する場合には、クーロン力が高まり電気穿孔による菌体破壊で多糖類が十分に生産されなくなる可能性や、多糖類に電氣的チャージがある方が多糖類中間体を切り離す効果が高まる可能性が考えられるが、検証の余地を残している。

パルス電界処理は微生物の細胞表層の状態に変化を与え、生合成される複合糖質の存在形態にも変化を与えるものと思われ、菌体同士の連結や生育環境への接着など、菌体表面において複合糖質の糖鎖が本来果たすべき機能や、それを受容体として認識する現象に変化をもたらす可能性が考えられる。乳酸菌の発酵でしばしば問題となるバクテリオファージによる感染も、細胞表層の糖鎖タンパク質を受容体とすることが知られており、発酵中にパルス電界処理を継続することにより、バクテリオファージの感染を防ぐ効果を高める可能性も期待される。乳酸菌の発酵中に穏和なパルス電界処理を組み合わせるといふ、全く新たな発酵エンジニアリング技術として、新たな研究への発展や新たな食品加工技術として今後さらに発展していくことを期待したい。

謝辞

本研究の実施および論文作成にあたり、日清食品ホールディングス株式会社との共同研究をご承認いただき、パルス電界処理の実験環境をご提供いただいた上、研究全般でご指導やご助言を賜りました、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門部門長 鍋谷 浩志 博士、同研究部門食品加工流通研究領域先端食品加工技術ユニットユニット長 植村 邦彦 博士に謹んで感謝の意を表します。

本論文をとりまとめるに際しまして、研究全般に渡るご指導やご高配を賜りました、東京大学 阿部 啓子 名誉教授・特任教授、東京大学大学院農学生命科学研究科 朝倉 富子 特任教授に謹んで感謝の意を表します。

学位論文の作成にあたって共同研究の実施に理解と支援を賜りました、日清食品ホールディングス株式会社および同社グローバルイノベーション研究センター所長 田中 充氏に謹んで感謝の意を表します。また、共同研究へのご指導やご助言をいただきました、同研究センター健康科学研究部 松尾 伸二 博士、田辺 創一 博士に心から感謝申し上げます

本研究の中で各種菌株をご提供いただいた、日清食品ホールディングス株式会社グローバルイノベーション研究センター健康科学研究部 大木 篤氏、砂田 洋介氏、糖質分析にご協力いただいた同研究部 新村 修一氏、電子顕微鏡観察にご協力いただいた同研究部 瀧沢 秀樹氏、菌種の同定にご協力いただいた同社グローバル食品安全研究所品質保証部 前島 秀樹氏に深く御礼申し上げます。

さらに、本論文の基礎研究となる多糖類のレオロジー解析や生合成経路の解明においては、当時の雪印ヨーロッパ研究所有限会社における共同研究者としてご協力いただいた Jan Sikkema 博士、Gerard Robijn 博士、Klaas Doesburg 氏に深く御礼申し上げます。

2017年3月

大羽 哲郎