



日本大学

生物資源科学部

専任講師

博士（農学）

古川 壮一

1996年 九州大学農学部食糧化学工学科卒業

1998年 日本学術振興会特別研究員（DC1）

2001年 九州大学大学院農学研究科博士課程修了

2001年 日本大学生物資源科学部助手

2005年 日本大学生物資源科学部専任講師

2005年 米国 Dartmouth College 研究員

酵母、乳酸菌及び酢酸菌の複合バイオフィーム形成

はじめに

東アジアにおける多くの伝統的発酵は「もろみ」の状態で行われる。「もろみ」は多く固形物を含むことから、「もろみ」中微生物の固体表面への付着は発酵の安定化に一定の役割を果たしているのではないかと考えられる。固液界面における微生物集落をバイオフィームと呼ぶが、このような観点から「もろみ」は一種のバイオフィームと見て差し支えないであろう。また、一般に清酒や醤油など、伝統的な発酵においては、酵母と乳酸菌が共存していることが多い。これらの酵母と乳酸菌の共生もまた発酵の安定に寄与しているものと考えられる。なお、伝統発酵食品における乳酸菌と酵母の共生現象は古くから広く知られている。

鹿児島県霧島市福山町に伝わる福山酢は、一つの壺の中で糖化、アルコール発酵、酢酸発酵が人工的な管理を施すことなく、一部並行しながら順次進行するトリプル発酵と称される形式を取る（図1）。本発酵の特徴は、嫌気的なアルコール発酵と好気的な酢酸発酵が一つの壺の中で連続して進行するところにある。伝統的な発酵においては、多種多様な微生物群集が相互作用しており、これらの相互作用の総和が、結果的に発酵の成立に大きく寄与している。このような伝統的な発酵における微生物動態には、まだ未解明な部分が多く、これらを明らかにすることを通して、伝統的な発酵を支える物質的基盤の一端を明らかにできればと考えている。

我々は、福山酢のもろみ試料から、複合培養において顕著に複合バイオフィームを形成する酵母と乳酸菌の組合せを見出した。また、福山酢より分離した酢酸菌の多くは、同じく分離した乳酸菌と複合バイオフィームを形成することを明らかにしている。この場合のバイオフィームは気液界面上に形成されていた。酢酸菌は、菌膜を形成するが、本複合バイオフィームと酢酸菌膜には、何らかの関連があるものと思われる。



図1. 福山酢の発酵風景（合資会社伊達醸造）。

酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成

我々は、福山酢のもろみ試料から、複合培養時に顕著にバイオフィルムを形成する乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* ML11-11）と酵母（*Saccharomyces cerevisiae* Y11-43）の組合せを見出し（図2）、その後それらの相互作用や複合バイオフィルム形成機構等に関して研究を行った。まず、複合バイオフィルムを電子顕微鏡により観察した結果、酵母と乳酸菌が直接接触した厚い構造を有していることが明らかになった（図3）。同時に、当該バイオフィルムの基底部には主として乳酸菌が存在し、その上に酵母と乳酸菌の凝集体が集積することを通して複合バイオフィルムが形成されていることが強く示唆された。また、当該乳酸菌は実験室株を含む出芽酵母と広く複合バイオフィルムを形成する能力を有し、その現象は出芽酵母の性や染色体の倍数性に依存しないことも明らかになった。これらの成果は、論文として公表することができた（1）。

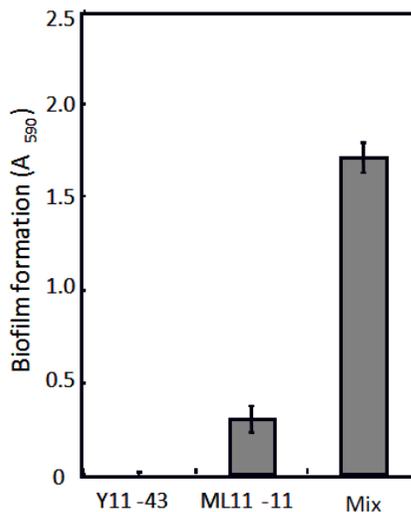


図2. 福山酢分離乳酸菌（*L. plantarum* ML11-11）と同分離酵母（*S. cerevisiae* Y11-43）の単独及び複合バイオフィルム形成。

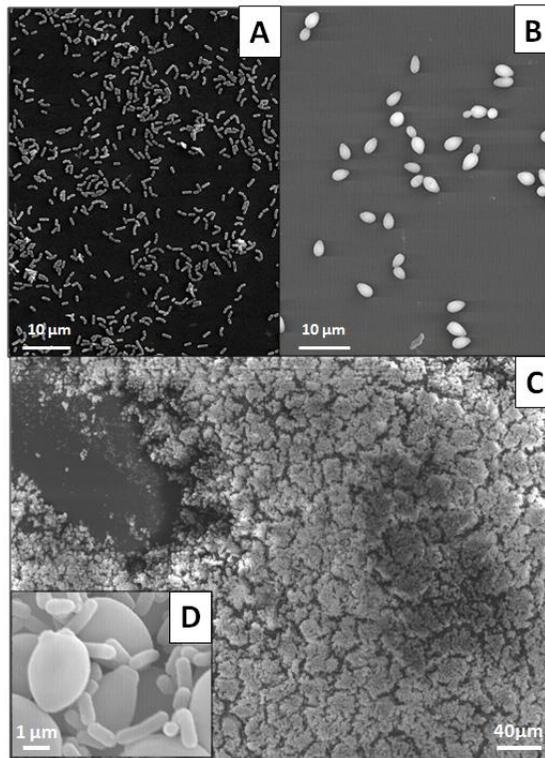


図 3. 福山酢分離乳酸菌 (ML11-11) と同分離酵母 (*S. cerevisiae* Y11-43) の単独及び複合バイオフィルムの走査型電子顕微鏡写真.

- A. 福山酢分離乳酸菌の単独バイオフィルム.
- B. 福山酢分離酵母の単独バイオフィルム.
- C. 福山酢分離乳酸菌と同分離酵母の複合バイオフィルム.
- D. 福山酢分離乳酸菌と同分離酵母の複合バイオフィルム.

複合バイオフィルム形成酵母と乳酸菌の共凝集

そこで酵母と乳酸菌 ML11-11 の細胞間の相互作用として、凝集について検討したところ、別々に培養した酵母及び乳酸菌細胞の間でも高い共凝集性を示すことが確認され、複合バイオフィルム形成には、酵母及び乳酸菌細胞間の共凝集が重要な役割を果たしていることが示唆された (図 4)。この共凝集は pH 3 以下と 12 以上の環境及びマンノースを添加した環境では抑制された (表 1)。また、乳酸菌表層をプロテアーゼで処理した場合も共凝集しなかった。また加熱処理を行った場合、酵母細胞を加熱しても共凝集は起こったが、乳酸菌細胞を加熱した場合には共凝集は起こらなかった。これらのことから、本乳酸菌と酵母の共凝集は、乳酸菌の表層タンパクと酵母の表層のマンナンを介して行われているのではないかということが示唆された。これらの成果は、現在論文投稿中である (2)。

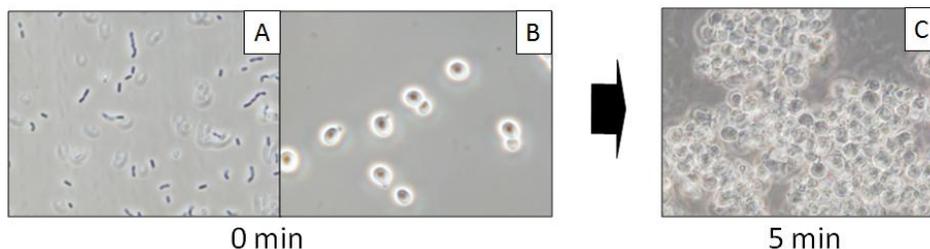


図4. 乳酸菌 (ML11-11) と酵母 (*S. cerevisiae* BY4741) の共凝集写真.

表1. *L. plantarum* ML11-11と*S. cerevisiae* BY474間の共凝集特性.

treatment	condition	microorganism	co-aggregation*		
control		LAB + yeast**	+		
heat	121°C for 15 min	heated LAB + yeast	-		
		LAB + heated yeast	+		
		heated LAB + heated yeast**	-		
pH	2.0	LAB + yeast**	-		
	3.0		-		
	3.5		-		
	4.0		+		
	6.0		+		
	8.0		+		
	10.0		+		
	11.0		+		
proteinase K	0.1 mg/ml	treated LAB + yeast	-		
		sugar	mannose	LAB + yeast**	-
			galactose		+
			glucose		+
			sucrose		+
lactose		+			

* coaggregation was assayed in 10 min test

** In single culture, both LAB and yeast showed no aggregation in all condition.

そこで、本共凝集活性を喪失した変異株の分離を得ることとした。両菌液を混合した後、凝集沈殿後の上清部分から菌液を採取し、それらを乳酸菌もしくは酵母の選択培地で培養する方法を選択した。その後、再度、先の凝集沈殿実験を行うというサイクルを20回ほど繰り返したところ、15株の非凝集性乳酸菌自然変異株を得ることが出来た。一方、同様の検討を繰り返したが、酵母の変異株は取得できなかった。こうして取得した乳酸菌非凝集性変異株の複合バイオフィルム形成能は著しく低く、乳酸菌と酵母の複合バイオフィルム形成には、それらの凝集に関与する因子が重要な役割を果たしていることが示唆された。

酵母と乳酸菌の共凝集とそれに必要な表層因子

乳酸菌 ML11-11 と出芽酵母の共凝集に関する検討より、本共凝集は乳酸菌の表層タンパクと酵母の表層のマンナンを介して行われていることが示唆された。そこで、出芽酵母表層マンナン合成に関する遺伝子の欠損株を用いて検討を行った結果、マンナンの主鎖にマンノースがひとつつ付加した構造を乳酸菌表層のタンパクが認識していることが示唆された。

次に、非凝集性乳酸菌自然変異株の表層タンパクを抽出し SDS-PAGE によりそのプロファイルと比較したところ、非凝集性変異株において発現が著しく減少しているタンパクが見出されたので、現在当該蛋白の同定を進めている。なお、加えて、現在乳酸菌 ML11-11 のトランスポゾン変異株ライブラリーのスクリーニングと乳酸菌 ML11-11 非凝集性変異株を用いた ML11-11 ゲノム DNA のショットガンクローニングライブラリーのスクリーニングを並行して進めている。

酵母と乳酸菌の複合バイオフィームによる物質生産

次に、酵母と乳酸菌の複合バイオフィームを固定化菌体として使用可能なのではないかと考え検討を行うこととした。カラムリアクタ (50 ml) に複合バイオフィームを形成させたセルロースビーズをいれた後に YPD 培地 (グルコース濃度 10%) を入れ、30°C で発酵試験を行った。この操作を 24 時間毎に繰返して反復回分発酵を行った結果、10%濃度グルコースからほぼ理論上の最高濃度 5.1%(w/v)に近いアルコールが生産され、培養を 10 回繰返しても安定して高いアルコール収率が得られた (図 5)。一方、複合 BF で培養中に生産される乳酸量は 0.60%(w/v)程度にとどまった。以上の結果より、酵母と乳酸菌の複合 BF を固定化菌体として反復使用可能で、アルコールの収率は酵母単独とほぼ同等であり、乳酸の副生は大きな問題点にはならないことが示めされた。

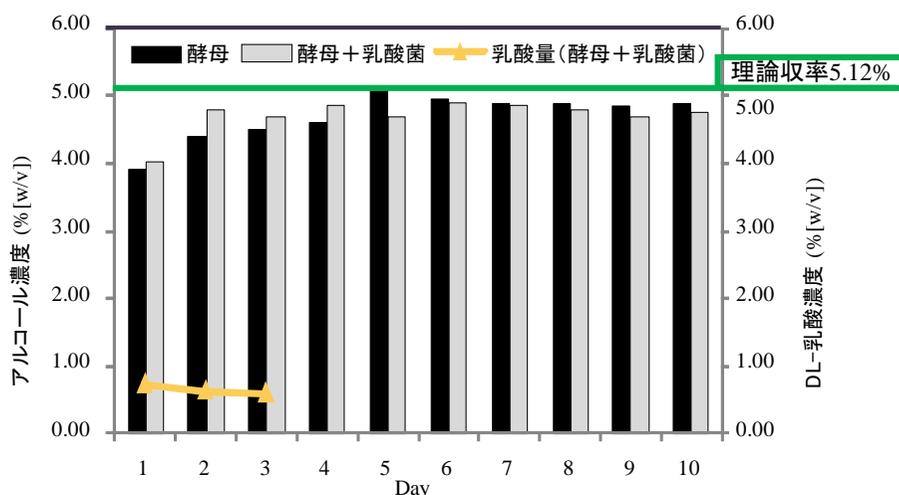


図 5. 乳酸菌 (ML11-11) と酵母 (*S. cerevisiae* BY4741) の複合バイオフィームを用いた反復回分発酵試験。

次に、スケールアップと連続化について検討を行った。リアクターとして 500 ml 容の容器とセルロースズビーズを用いて連続発酵システムを構築し、リアクターにチューブポンプにより連続的に YPD 培地(グルコース濃度 10%)を供給して連続発酵試験を行った(図 6)。その後、約 1 カ月にわたり、菌を追加接種することなく、リアクターを連続運転した。その結果、その期間を通して概ね理論収率に近いアルコールが生産されたことから、酵母と乳酸菌の複合バイオフィームを用いた連続発酵リアクターは、長期間の連続使用が可能と考えられた。なお、酵母と乳酸菌の複合バイオフィームを用いた本連続リアクターは、酵母単独バイオフィームによるリアクターに比べてコンタミネーションに対する抵抗性は非常に高く、相対的に安定した連続運転が可能であった。このことから、試験的に大腸菌や枯草菌などをモデル雑菌として添加してコンタミネーション耐性試験を行ったところ、本システムは一定の雑菌排除能を有することが示唆された。



図 6. 乳酸菌 (*L. plantarum* ML11-11) と酵母 (*S. cerevisiae* BY4741) の複合バイオフィームを用いた連続発酵試験リアクター。

酢酸菌と乳酸菌の複合バイオフィーム形成

次に、福山酢より分離した乳酸菌と酢酸菌の複合バイオフィーム形成について検討を行った。福山酢より分離した乳酸菌と酢酸菌を共培養して複合バイオフィーム形成が増加する組み合わせのスクリーニングを行ったところ、殆ど全ての組み合わせにおいて複合バイオフィーム形成が増加した。そこで、乳酸菌 *L. plantarum* ML11-11 と酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* A11-10 に焦点を当てて検討を行ったところ、複合バイオフィームは主に気液界面上及びそれより上部に形成されており、それは主に酢酸菌からなっていた(図 7)。なお、本複合バイオフィームは、乳酸菌の培養上清を添加することにより形成が促進されること、同時に乳酸添加によりその形成が誘導されることが明らかになった。なお、これらの結果は、福山酢分離株 A11-10 以外の、*A. pasteurianus* ゲノム解読株においても再現されることが明になった。

*Biofilm was formed on the slide glass. 24 h.

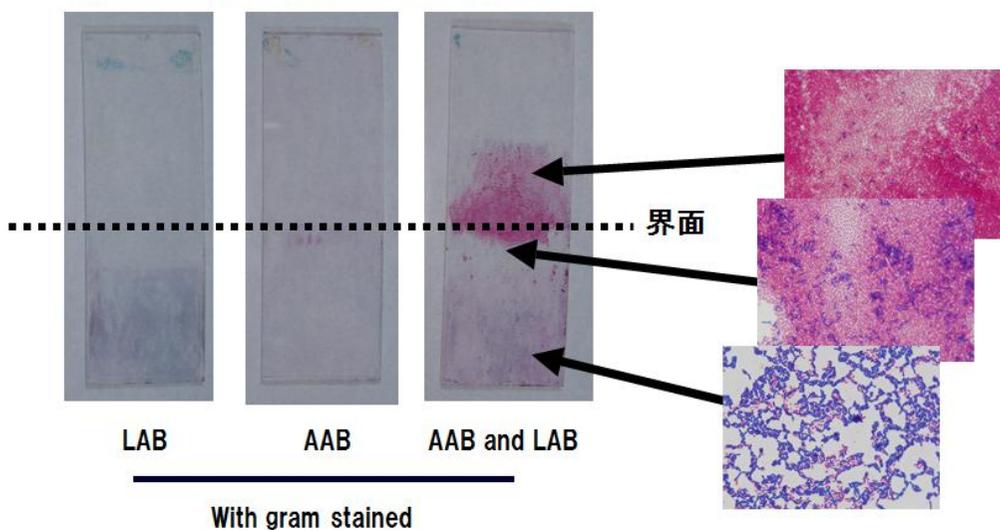


図7. スライドガラス上に形成させた乳酸菌 (ML11-11) と酵母 (*A. pasteurianus* A11-10) の複合バイオフィルム.

ここで、LAB は乳酸菌で、AAB は酢酸菌.

福山酢の発酵モデル

これまでの結果から、福山酢由来乳酸菌 ML11-11 と福山酢由来出芽酵母は顕著に複合バイオフィルムを形成し、同様に福山酢由来乳酸菌酢酸菌 A11-10 は乳酸存在下で顕著なバイオフィルムを形成することが明らかになった。ところで、酢酸菌 *A. pasteurianus* は、グルコースよりも乳酸、そして乳酸よりもエタノールの資化速度が速いことが知られている。このことから、我々は、福山酢の発酵プロセスにおいて、乳酸菌と酵母の複合バイオフィルムがまず壺の底面に形成され、その複合バイオフィルムによりグルコースがエタノール及び乳酸に変換され、その結果気液界面における形成が誘導された酢酸菌のバイオフィルムにより、エタノールがさらに酢酸に転換されるというシステムが成立しているのではないかと考えている (図8)。本システムは、壺底部の固液界面と上部の気液界面の二つのバイオフィルムにより成立しているため、Bi-Layer Biofilm Fermentation と称することができるのではないかと考えている。



図 8. 福山酢の発酵モデル.

謝辞

本研究の遂行にあたり、多くの方々のご助力を頂きました。特に、日本大学食品微生物学研究室の森永康教授、山崎眞狩前教授及び荻原博和教授には特段のご指導並びにご助力を賜りましたので心より感謝申し上げます。さらに、当研究に従事して頂いた研究室の大学院生及び学部学生諸氏に感謝申し上げます。また、支援を頂きました財団法人サッポロ生物科学振興財団には、重ねて感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Soichi Furukawa, Kanako Yoshida, Hirokazu Ogihara, Makari Yamasaki, and Yasushi Morinaga, Mixed-Species Biofilm Formation by Direct Cell-Cell Contact between Brewing Yeasts and Lactic Acid Bacteria, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 2316-2319 (2010).
- (2) Soichi Furukawa, Natsumi Nojima, Kanako Yoshida, Satoru Hirayama, Hirokazu Ogihara, Makari Yamasaki, and Yasushi Morinaga, Importance of Inter-species Cell-Cell Co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11, NCIMB8826 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in Mixed-Species Biofilm formation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in submitting.