

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大羽 哲郎

本論文は、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であり、全八章で構成されている。

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がまとめられている。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られている。

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イオンが分子間・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、ウンデカブ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、さらに重合途中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上の中間体が、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至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  $8 \text{ kV}/\text{cm}$  以下で全ての実験を行ったが、ピーク電流で  $3 \text{ A}$  以上または平均電流で  $10 \text{ mA}$  以上印加し、その際パルス周波数を  $3,000 \text{ Hz}$  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られている。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られている。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。