

3L10-2 メシマコブと乳酸菌の混合培養を用いた新規機能性食品の研究

○王 奇, 許 善花, 武島 嗣英, 長谷川 英司, 杉 正人, 西 則雄, 松永 政司
(日生バイオ株式会社)

目的: メシマコブは、 β -グルカン等の免疫賦活物質を含み、癌やアレルギーなどの症状が緩和することが知られている。乳酸菌も、その菌体や代謝産物により、整腸作用、アレルギー抑制作用などが報告されている。メシマコブと乳酸菌を混合培養し、それら単独では得られない免疫賦活効果のある新規機能性食品を開発する。方法: メシマコブ菌糸体を液体培養によって得た。メシマコブ菌糸体を含む培養液に乳酸菌 *B. lactis*, *B. longum* として *L. blugarius* をそれぞれ接種して混合培養を行った。その際には培養液同量の20%スキムミルクを添加した。メシマコブ・乳酸菌混合培養は37℃で24時間行い、得られた培養物を凍結乾燥し混合培養物を得た。同時に混合培養と同じ培地組成でメシマコブ菌糸体培養と10%スキムミルクでの乳酸菌培養を37℃で24時間行った。混合培養物の免疫賦活効果とアレルギー抑制効果をマウス脾臓細胞を用い *in vitro* で調べた。

結果: *B. lactis*, *B. longum*, *L. bulgaricus* の混合培養での生菌数は単独で培養した時に比べてそれぞれ55倍, 349倍そして1.9倍に上昇していた。混合培養物と一緒に培養した脾臓細胞中のCD69陽性細胞の割合は単純混合物の場合に比べ高く、免疫細胞をより活性化させることがわかった。混合培養物刺激による脾臓細胞上清中のIL-4濃度は単純混合物と比較して低下していることもわかった。これらはTh1/Th2バランスをTh1優位にしていることを意味する。

New functional foods from mixed culture of *Inonotus linteus* and LAB strains

○Qj WANG, Shanhua XU, Tsuguhide TAKESHIMA, Eishi HASEGAWA, Masahito SUGI, Norio NISHI, Masaji MATSUNAGA
(NISSEI BIO CO., LTD.)

Key words *I. linteus*, LAB, culture

3L10-4 凝集性ポリマーにより固定化した糸状菌の高密度培養

○水沼 誉人, 市川 創作, 向高 祐邦, 國府田 悦男, 佐藤 誠吾
(筑波大院・生命環境)

【目的】糸状菌はその形態のため菌体濃度を高めると培養液の見かけ粘度が上昇し、培養が困難となる。このため、20 g/L以上の高濃度培養の報告は極めて少ない。高濃度化の手法として固定化が有効であり、一般的に包括法が用いられるが、固定化担体内部への物質移動の低下や、せん断応力に弱いという問題がある。本研究ではこれらの問題を解決する方法として凝集性ポリマーによる固定化方法を開発し、糸状菌 *Aspergillus niger* によるグルコン酸生産を行い、その有用性を検討した。【方法】プラスコ振とう培養により菌体を培養し、その菌体を純水で洗浄後、ジャーファーマンターによるグルコン酸生産を行った。固定化は、洗浄後の菌体懸濁液にアニオン性ポリマーであるポリビニル硫酸カリウムとカチオン性ポリマーであるメチルグリコールキトサンを攪拌しながら加えた。これによりイオンコンプレックスを形成させ、菌体を架橋する形で凝集、固定化した。グルコン酸生産は、酸素ガスまたは空気と酸素の混合ガスを1vvmで供給し、1000rpmで攪拌した。【結果】菌体とポリマーの重量比が1:0.5の条件で菌体を1cm程度の大きさに凝集、固定化でき、1000rpmの攪拌でも壊れなかった。大部分の菌体は培養液に直接接しており、ポリマーのゲルは大きな網目構造を持つため物質移動は大きく損なわれなと考えられた。さらに、グルコン酸生産において、菌体濃度が40 g/Lと高濃度な条件で同濃度の遊離菌体に比べ、約1.5倍の生産性を得ることができた。

High cell density fermentation of mycelial fungus immobilized by polymer flocculant

○Takato MIZUNUMA, Sosaku ICHIKAWA, Sukekuni MUKATAKA, Etsuo KOKUFUTA, Seigo SATO
(Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words immobilized cell, high cell density fermentation, polymer flocculant

3L10-3 メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* の連続培養による一本鎖抗体生産

○山脇 伸哉¹, 松本 偉大¹, 大西 由夏¹, 勝田 知尚², 塩見 尚史³, 加藤 滋雄¹
(¹神戸大院・自科, ²神戸大・工・応化, ³神戸女学院大・人間科学)

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は遺伝子高発現宿主として注目されている。この酵母はメタノールで誘導可能なAOX1プロモーターを有しているため、遺伝子発現を容易に制御することができる。また目的タンパク質の遺伝子を染色体内に導入することができるため、安定したタンパク質生産が期待できる。本研究では、抗bisphenol A scFv発現株 *P. pastoris* (Mut⁺) の連続培養を行い、scFvの生産について検討した。培養は2.0 Lのジャーファーマンター中で1.0 Lの基礎培地、温度30℃、pH 5.0-7.0で行い、溶存酸素(DO)は攪拌速度(400-1000 rpm)と空気流量(1.0-2.0 vvm)を調節することで、空気飽和の10%以上に維持した。

連続培養は、グリセロールを用いて菌体を高密度に増殖させた後、メタノールの供給にはDOを指標として基質を供給するDO-statを用い、同時に培地を連続的に供給した。希釈率(D)はD=0.0067-0.0528 h⁻¹の範囲で行った。

低希釈率においてscFv生産濃度は高くなり、D=0.0067のとき、定常状態においてscFv濃度は約200 mg/Lに達した。このときの生産性は1.32 mg/L・hとなり、半回分培養(D=0.0041)において得られた生産性1.17 mg/L・hを上回った。低希釈率で運転することは培地コストの削減など工業的に有利であるため、DO-statを用いた連続培養が有効であると考えられる。

Single-chain Fv production by continuous culture of methylophilic yeast *Pichia pastoris*

○Shinya YAMAWAKI¹, Takehiro MATSUMOTO¹, Yuka ONISHI¹, Tomohisa KATSUDA², Naofumi SHIOMI³, Shigeo KATO^H
(¹Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ., ³Dept. Human Sci., Kobe Coll.)

Key words *Pichia pastoris*, continuous culture, scFv

3L10-5 馬乳酒由来乳酸菌 *Enterococcus faecalis* 11-5 株が生産するバクテリオシン

○多賀 直彦, 村井 栄策
(九東大・農・バイオ)

【目的】モンゴルの伝統的発酵飲料である馬乳酒から、バクテリオシン生産菌 *Enterococcus faecalis* 11-5株およびそのバクテリオシンに対する感受性菌 *Enterococcus* sp. 数株を分離同定した。本研究は、発酵槽培養によるバクテリオシンの高抗菌力価生産条件および構造解析のための精製について検討した。【方法と結果】バクテリオシン生産菌は、*Enterococcus faecalis* 11-5株を用いた。抗菌活性検出および抗菌力価測定は、検定菌として馬乳酒から分離した *Enterococcus* sp. 8-1株を用いて spot on lawn methodで行った。1 L容発酵槽培養でのバクテリオシン生産は、MRS培地500 mLを用い、培養温度37℃、無通気、かくはん速度200 rpm、およびpH 6制御で行った。最大抗菌力価は、対数増殖期後期である培養8 hに12800 AU/mLが得られた。その後、抗菌力価は低下し、バクテリオシン生産は極大値を示した。本バクテリオシンの精製は、アンバーライトXAD樹脂を用いた非特異的吸着による濃縮により抗菌力価を高めることができた。しかし、次の陽イオン交換樹脂SP Sephadex Fast Flowを用いたクロマトグラフィーでは、全ての溶出画分で抗菌活性が得られず、また、溶出画分を組み合わせる混合しても抗菌活性が得られなかった。これらの結果から、本バクテリオシンは自己的あるいはタンパク質分解酵素により分解されやすいことが示唆された。

The bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 11-5 isolated from fermented mare milk

○Naohiko TAGA, Eisaku MURAI
(Dept. of Biosci. Fac. of Agr., Kyushu Tokai Univ.)

Key words bacteriocin, fermentor, *Enterococcus*, purification