

# 酵母，乳酸菌および酢酸菌の 複合バイオフィーム形成とその利用

古川 壮一\*・平山 悟・深瀬 栄・荻原 博和・森永 康

清酒や醤油をはじめとする我が国そして東アジアにおける多くの伝統発酵食品の製造において、その発酵プロセスは「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、その中では、固形物表面に微生物細胞が付着して一種のバイオフィーム (biofilm) のような状態となって発酵が進行するのではないかと考えられる。このような「もろみ」中微生物の固体表面への付着は発酵の安定化に何らかの形で寄与している可能性がある。

バイオフィームとは一般に固体液体界面上に形成されるフィルム状の微生物集落のことを指し<sup>1)</sup>、それ自体が菌体により生産される多糖に囲まれている場合が多い。ただ、広義には界面に形成されるフィルム状の微生物集落としてもよいであろう<sup>2)</sup>。バイオフィームという言葉が一般に用いられるようになったのはおよそ20年ほど前からであり<sup>1)</sup>、もとは微生物生態学の分野にその端を発している。なお、微生物付着などに関する研究の源流はさらに古い<sup>3)</sup>。

多くの伝統発酵食品においては乳酸菌と酵母が共存している場合が多く<sup>4)</sup>、それらを含む多種多様な微生物間の相互作用が発酵の安定性や品質に大きな影響を及ぼしていると考えられる。我が国においては、清酒の生酏系酒母における乳酸菌の働きに関しては先駆的な研究がなされている<sup>5)</sup>。

筆者らが研究対象としている福山酢は、鹿児島県霧島市福山町で約200年にわたり製造されてきた伝統的な米酢であり(図1)、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り、特に仕込み時によく乾燥させた麴を振り麴として用いる



図1. 福山酢の発酵風景 (合資会社伊達醸造)

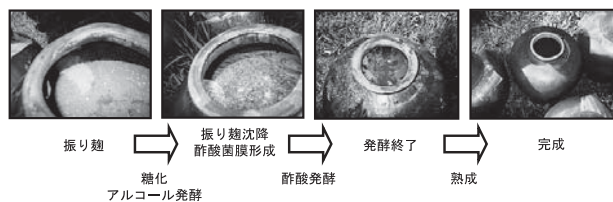


図2. 福山酢の製造工程

ところに特徴がある(図2)<sup>6,7)</sup>。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り、適切な時期に振り麴が沈降するのに伴い酢酸菌膜が形成されることがこの変遷を司っているものと考えられる<sup>7,8)</sup>。なお、この酢の作り方は最も原始的な米酒造り(米利用発酵)に近いのではないかと推察される。

伝統的な発酵においては多種多様な微生物群集が複雑に相互作用しており、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、筆者らは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。

## 酵母と乳酸菌の複合バイオフィーム形成

筆者らは、かねてより複合系のバイオフィームに焦点を当てて研究を行ってきた。その過程で、多数の微生物を用いた複合培養系のスクリーニングを行ったところ、酵母と乳酸菌を共培養すると、バイオフィーム形成が増加する組み合わせが存在することを見いだした<sup>9)</sup>。そこで、このような現象が実際の醸造試料由来の微生物間でも観察されるのか否かについて検討を行うことにした。その結果、福山酢のもろみ試料(合資会社伊達醸造より分与)から、複合培養時に顕著にバイオフィームを形成する乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* ML11-11)と酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Y11-43)の組み合わせを見いだすことができた(図3)。この複合バイオフィームの形成には乳酸菌と酵母の細胞同士が直接接触することが必要であり、また、電子顕微鏡観察の結果、本複合バイオフィームは酵母と乳酸菌の細胞間接着で形成された分厚い構造を有していることが明らかになった<sup>10)</sup>(図4)。

\* 著者紹介 日本大学生物資源科学部食品生命学科(専任講師) E-mail: furukawa@brs.nihon-u.ac.jp

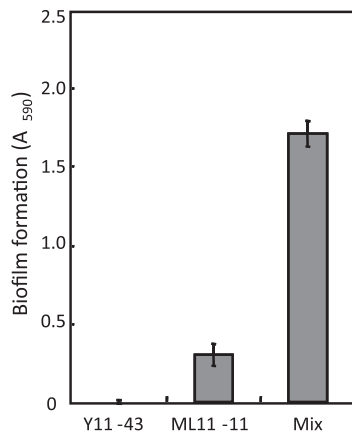


図3. 福山酢分離乳酸菌 (*L. plantarum* ML11-11) と同分離酵母 (*S. cerevisiae* Y11-43) の単独および複合バイオフィーム形成. 原典: 参考文献10 (一部改変).

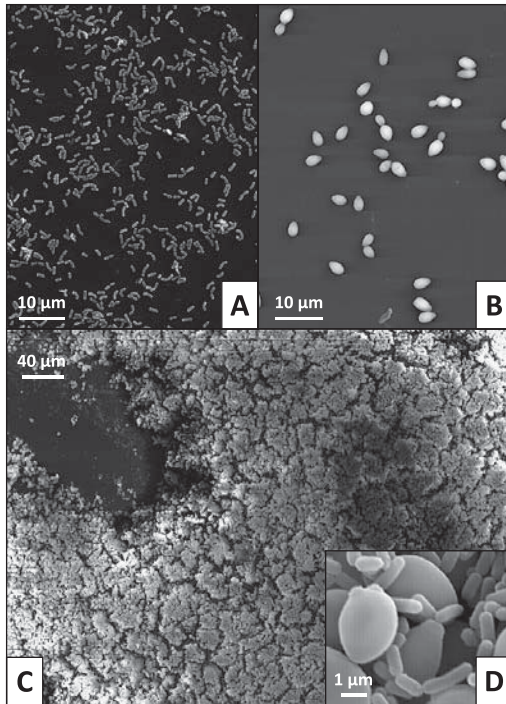


図4. 福山酢分離乳酸菌 (ML11-11) と同分離酵母 (*S. cerevisiae* Y11-43) の単独および複合バイオフィームの走査型電子顕微鏡写真. A, 福山酢分離乳酸菌の単独バイオフィーム; B, 福山酢分離酵母の単独バイオフィーム; C, 福山酢分離乳酸菌と同分離酵母の複合バイオフィーム; D, 福山酢分離乳酸菌と同分離酵母の複合バイオフィーム. 原典: 参考文献10 (一部改変).

さらに蛍光顕微鏡観察により、当該バイオフィームの基底部分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ームが形成されていることが強く示唆された<sup>10)</sup>。なお、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ー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<sup>10)</sup>。

### 複合バイオフィーム形成における酵母-乳酸菌間細胞間接着の役割

本複合バイオフィーム形成には、乳酸菌と酵母の細胞間の直接接触が必要であったことから、両細胞の接着性について共凝集活性を指標に解析した。その結果、別々に培養した酵母および乳酸菌の細胞間でも高い共凝集性を示すことが確認されたことから<sup>11)</sup>、複合バイオフィーム形成には、酵母および乳酸菌細胞間の共凝集、つまり細胞間接着が重要な役割を果たしていることが示唆された。この共凝集はpH 3以下と12以上の環境およ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(表1)。なお、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(表1)。これらのことから、本乳酸菌と酵母の細胞間接着は、乳酸菌の表層のレクチン様タンパクと酵母表層のマンナン糖鎖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。そこで、出芽酵母表層のマンナン糖鎖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一つ以上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<sup>12)</sup>。

乳酸菌の表層タンパクが酵母のマンナン糖鎖を認識して両細胞が接着するという報告は、片倉らの研究をはじめすでいくつかなされている<sup>13,14)</sup>。また、乳酸菌などの細菌の表層タンパクが動物の腸管上皮細胞表層の糖鎖を認識して接着することが、細菌の消化管への定着に重要な役割を果たしていることを示唆する報告もある<sup>15,16)</sup>。

次に、*L. plantarum* ML11-11から共凝集活性を喪失した自然変異株の取得を試みることにした。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、複数の非凝集性乳酸菌自然変異株を得ることができた<sup>17)</sup>。なお、酵母の非凝集変異株についても同様の方法を試みたが取得できなかった。こうして取得した乳酸菌非凝集性変異株は酵母への接着能が低下しただけでなく、複合バイオフィーム形成能も著しく低く<sup>15)</sup>、乳酸菌と酵母の複合バイオフィーム形成には、両者の接着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。そこで、*L. plantarum* ML11-11および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いだされたので、現在当該タンパクの同定を進めている。

ところで、清酒もろみ由来の乳酸菌と清酒酵母の凝集



表1. *L. plantarum* ML11-11と*S. cerevisiae* BY4741間の共凝集特性. 原典:参考文献11(一部改変)

Treatment	Condition	Microorganism	Co-aggregation <sup>a</sup>
Control		LAB+yeast <sup>b</sup>	+
Heat	121°C for 15 min	heated LAB+yeast	-
		LAB+heated yeast	+
		heated LAB+heated yeast <sup>b</sup>	-
pH	2	LAB+yeast <sup>b</sup>	-
	3		-
	3.5		-
	4		+
	6		+
	8		+
	10		+
	11		+
	11.5		+
	12		-
Proteinase K	0.1 mg/ml	treated LAB+yeast	-
Sugar	mannose	LAB+yeast <sup>b</sup>	-
	galactose		+
	glucose		+
	sucrose		+
	lactose		+

<sup>a</sup> coaggregation was assayed in 10 min test.

<sup>b</sup> In single culture, both LAB and yeast showed no aggregation in all condition.

現象は以前から知られており<sup>18)</sup>, また, 泡なし酵母の分離を乳酸菌との非凝集性を指標に行ったという報告もある<sup>19)</sup>. 上記の自然変異株分離法は, それらの清酒泡なし酵母の分離に用いられていた方法を一部改変したものである.

#### 酢酸菌と乳酸菌の共培養における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共培養時の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バイオフィーム形成が増加する組み合わせについてスクリーニングを行ったところ, ほとんどすべての組み合わせにおいて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に焦点を当てて詳細に検討を行ったところ, バイオフィームは主に気液界面上およびそれより上部に形成されており, それは主に絶対好気性の酢酸菌細胞からなるペリクルであって, 通性嫌気性の乳酸菌細胞はほとんど含まれていなかった<sup>20)</sup>. なお, 本バイオフィームは, 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, また乳酸添加によっても形成が促進されることが明らかになった<sup>20)</sup>. さらに, これらの結果は, 福山酢分離株だけでなく, *A. pasteurianus* ゲノム解読株においても再現された<sup>20)</sup>.

#### 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Y11-43は顕著に複合バイオフィームを形成し, 同様に福山酢由来酢酸菌A11-10は乳酸菌ML11-11の共存下および乳酸存在下で, 顕著な単独バイオフィーム(ペリクル)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<sup>21)</sup>. このことから, 筆者らは, 福山酢の発酵プロセスにおいて, 1) 乳酸菌と酵母の複合バイオフィームがまず仕込んだ蒸米の表面や壺の底面などに形成され, 2) その複合バイオフィームによりグルコースがエタノールおよび乳酸に変換され, 3) 生成したエタノールや乳酸により気液界面における酢酸菌バイオフィーム(ペリクル)の形成が促進され, その結果として, 4) エタノールの酢酸への転換が効率よく進行す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5). 本システムは, 壺内部の固液界面と気液界面の二つの界面に形成されるバイオフィー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.

今後は, 福山酢の発酵プロセスにおける酵母と乳酸菌および酢酸菌の共生やバイオフィーム形成の意義ならびにそれらを支える物質的基盤を明らかにすることを通して, 伝統的発酵プロセスが成立する要因の一端を明らかにすることができればと考えている. なお, 伝統的発酵プロセスにおけるバイオフィーム形成の意義があるとするれば, その一つは発酵に寄与する微生物の優先化にあるのではないかと考えている.



図5. 福山酢の発酵モデル

### 酵母と乳酸菌の複合バイオフィルムによる物質生産

次に、酵母と乳酸菌の複合バイオフィル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。カラムリアクター（50 ml）に複合バイオフィルムを形成させたセルロースビーズを充填後に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時間毎に繰り返して反復回分発酵を行った結果、酵母単独での回分発酵の場合と同等のアルコールが生産され、培養を10回繰り返しても安定して高いアルコール収率が得られた<sup>22)</sup>。一方、複合バイオフィルムで培養中に生産される乳酸量は0.6%（w/v）程度にとどまった<sup>22)</sup>。以上の結果より、酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム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された。

次に、スケールアップと発酵の連続化について検討を行った。全容670 ml容のガラス容器に複合バイオフィルムを形成させたセルロースビーズを充填したリアクターを用いて連続発酵システムを構築し、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。10日間の連続発酵の結果、アルコールが安定的に連続生産可能であった。そこで、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ところ、運転トラブルの発生にもかかわらず、安定的にエタノールを連続生産することが可能であった。これらの結果より、酵母と乳酸菌の複合バイオフィルムを用いたリアクターは、長期間の連続使用に適したロバスト性（堅固な安定性）を有しているものと考えられた<sup>23)</sup>。なお、酵母と乳酸菌の共培養系に、試験的に大腸菌や枯草菌などをモデル雑菌として接種してコンタミネーション耐性試験を行ったところ、共培養系は優れた雑菌排除能を有することが示唆された<sup>22)</sup>。酵母と乳酸菌の複合バイオフィルムを用いた連続発酵リ

アクターで安定した連続運転が可能な理由は、バイオフィルムとして酵母細胞が固定化されて系外へ流出しにくくなったことに加えて、その優れた雑菌排除能によるのではないかと考えられた。

今後は、酵母と乳酸菌の複合バイオフィルムによる物質生産システムの実用化に向けて、更なる検討を重ねたい。

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山崎真狩前教授には特段のご指導並びにご助力を賜りましたこと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および学部学生諸氏、特に岡崎佐知子様、吉田可奈子様、能島菜積様、磯前亮介様、野坂草馬様および渡辺真哉様には深く感謝申し上げます。サンプルを頂きました合資会社伊達醸造・伊達英史様には心より感謝申し上げます。また、ご支援を頂きました文部科学省21世紀COEプロジェクト（プロジェクトリーダー別府輝彦先生）、文部科学省私立大学高度化推進事業（プロジェクトリーダー中嶋睦安先生・高橋秀夫先生）、文部科学省科学研究費補助金、および、財団法人サッポロ生物科学振興財団には衷心より感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) O'Toole, G. A. *et al.*: *Microbial Biofilms* (O'Toole, G. A. *et al.*) ASM Press, Washington (2004).
- 2) 森崎久雄ら：界面と微生物、学会出版センター (1986).
- 3) Henrici, A. T.: *J. Bacteriol.*, **25**, 277 (1933).
- 4) 小崎道雄：乳酸発酵の新しい系譜（小崎道雄・佐藤英一編），p. 184, 中央法規 (2004).
- 5) 秋山裕一：醗酵工学, **56**, 618 (1978).
- 6) 柳田藤治：化学と生物, **28**, 271 (1990).
- 7) 小泉幸道ら：日食工誌, **35**, 670 (1988).
- 8) Okazaki, S. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **56**, 205 (2010).
- 9) Kawarai, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4673 (2007).
- 10) Furukawa, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2316 (2010).
- 11) Furukawa, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press)
- 12) 平山 悟ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 271 (2011).
- 13) Katakura, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 319 (2010).
- 14) Pretzer, G. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **187**, 6128 (2005).
- 15) Barbosa, M. S. *et al.*: *Infect. Immun.*, **74**, 382 (2006).
- 16) Kinoshita, H. *et al.*: *J Appl Microbiol.*, **104**, 1667 (2008).
- 17) 能島菜積ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 72 (2009).
- 18) Momose, H. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 19 (1969).
- 19) Ouchi, K. *et al.*: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1024 (1971).
- 20) 深瀬 栄ら：第2回酢酸菌研究会講演要旨集, p. 2 (2010).
- 21) 飴山 實：酢の生化学とバイオテクノロジー/酢の科学（飴山 實ら），p. 121 (2002).
- 22) 渡辺真哉ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 82 (2009).
- 23) 渡辺真哉ら：日本乳酸菌学会2011年度大会講演要旨集，発表予定。