

2019年度 生物工学奨励賞（斎藤賞） 受賞



持続可能・健康社会の構築に向けた複合微生物系の制御

佐々木建吾



Control of complex microbial community to construct sustainable and healthy society

Kengo Sasaki (Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501) Seibutsu-kogaku 98: 116-122, 2020.

はじめに

工業バイオテクノロジーは生物の代謝作用を利用して化合物、燃料、食品などを供給してきた。そのようなバイオプロセスにおいては、一般的に微生物または発酵済みの材料を接種する。多くのプロセスは単一菌で行われるようになってきてはいるものの、廃水処理・バイオガス生産や伝統的発酵食品の製造には複合微生物系が利用されてきた¹⁾。複合微生物系を利用する利点として、殺菌処理が不要である、廃棄物のような複雑な基質を利用できる、悪条件な環境に強い、ことなどがあげられる²⁾。何よりも、さまざまな酵素や微生物の代謝経路を組み合わせることで、基質をより効率的に利用して生成収率を増加させることが可能となる。実際にセルロースやヘミセルロースのような原料を含有するバイオマス資源に複合微生物系を利用した知見は多く得られているものの、工業スケールで成功した知見は乏しい。リグノセルロース系原料のような複雑な基質の利用には、未だコストが高く効率が低いことが問題となっている。一方、自然環境中に存在する微生物の90-99.8%は難培養であると考えられており、そのような菌を内包した状態で複合微生物系を利用しなければならない。上記の観点に立って、自然より複雑微生物系中の機構を学び、その利用法を考えなければならない。

ここでは、バイオガス発生を伴う嫌気性処理に関わる複雑微生物系、ないしはヒト腸管内の複雑微生物系を利用した筆者の研究を紹介する。前者の制御に当たっては導電性微生物附着担体・バイオ電気化学的システムを適

用し、後者の制御に当たってはpH可変型高度嫌気培養法を適用した。

嫌気性処理の制御

1) 加水分解菌とメタン生成菌の協力関係 背景として、筆者はまず(日本において年間2500万トン以上排出されている)食品廃棄物について安定的な嫌気処理を行うことを目指した。メタン発酵のような嫌気性処理は、発生するバイオガスを熱源や内燃機関の燃料として用いるため、注目を集めている。しかし、従来、廃水処理に利用されている上向流嫌気性汚泥床法では、固形分を多く含む食品廃棄物の処理には向いておらず、これに代わるメタン発酵法を確立することが求められていた。

メタン発酵は通常、複数の反応過程を含む(図1)。多種多様な高分子有機物が細菌によって加水分解されて低分子化し、さらに酸生成細菌によって低分子有機酸や水素に変換される。そして最終的に、メタン生成菌によってメタンに変換される。このように、嫌気性処理は複数の菌のバランスの上に成り立っており、これが破綻すると中間生成物が蓄積してpHが減少し、バイオガス生成・

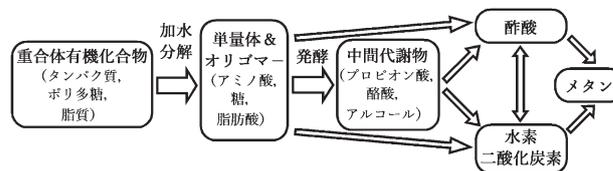


図1. メタン発酵の過程. 加水分解菌・酸生成菌・メタン生成菌の少なくとも3種類の菌が関与する。

著者紹介 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 (特命准教授) E-mail: sikengo@people.kobe-u.ac.jp

処理速度の低減を引き起こす。ここで、メタン生成菌の果たす役割を示すために、筆者が単離した好熱性のタンパク質分解菌である *Coprothermobacter proteolyticus* strain CT-1 と水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* を共培養して得られた知見を紹介する³⁾。Strain CT-1 と *M. thermautotrophicus* についてタンパク質を基質として共培養すると、Strain CT-1 を単独で培養したときと比べて Strain CT-1 の菌数が増加し、それに伴いタンパク質の分解が増加していた(図2)。同様の現象は、筆者らが単離したセルロース分解菌である *Clostridium clariflavum* strain CL-1 と *M. thermautotrophicus* の共培養時にも認められた⁴⁾。水素を除去する水素資化性メタン生成菌が系内に共存することにより、加水分解菌による ATP 生成を伴う酢酸生成が増加して加水分解菌の増殖が促され、結果的にタンパク質やセルロースのような高分子の分解が系内で増加する現象は興味深い。このようにメタン生成菌を系内に保持することはメタン発酵の安定化に重要ではあるが、メタン生成菌の増殖速度は細菌と比べて比較的遅いため工夫が必要となる。

2) 導電性微生物付着担体の利用 筆者は固定床式高温メタン発酵の研究に取りかかった。固定床式発酵とは、槽内に微生物付着担体を充填して行う処理のことである。微生物付着担体としては、疎水性の表面を持ち三次元網目構造を有する炭素繊維(厚さ:2.0 mm)を使用した(図3)⁵⁾。疎水性・三次元網目構造は、どちらの性質も微生物の保持に有効であった。特に三次元網目構造を有することで、炭素繊維の深部にメタン生成菌が多く保持されており、水素資化性メタン生成菌に加えて凝集を形成する酢酸資化性メタン菌 *Methanosarcina* 属が多く観察された⁶⁾。高負荷時、すなわち滞留時間が短いときには浮遊画分中の微生物は容易に wash-out されてし

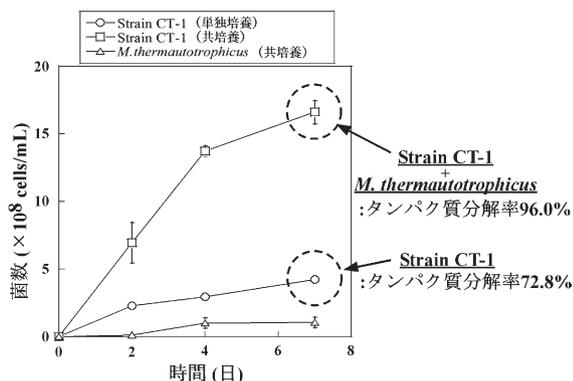


図2. タンパク質分解菌 *Coprothermobacter proteolyticus* strain CT-1 の単独培養と Strain CT-1・水素資化性メタン生成菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* の共培養の比較

まうが、メタン生成菌が炭素繊維深部で増殖することにより安定的に系内に保持されていた。

微生物付着担体の充填によるメタン生成菌の安定的な保持は、さまざまな価値をメタン発酵に与えていることが明らかとなった。メタン生成菌の増殖速度より短い滞留時間1.9時間で、酢酸や酪酸を含む廃水を処理してメタン生成することが可能であった⁷⁾。また、2.0 mm以下に裁断した稲わらの処理について、微生物付着担体を投じることにより分解率を高めることに成功している⁸⁾。稲わらは主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンから成っており、担体による稲わら分解の促進は、水素資化性メタン生成菌がセルロース分解菌の増殖を促進する先の知見と一致している⁴⁾。さらに、基質中に3000 mg-N/Lに相当するアンモニアが含まれていても、担体を充填していれば安定的にメタン生成を行うことが可能であった⁹⁾。通常であれば、3000 mg-N/Lのアンモニアが存在すれば、メタン生成菌は阻害される。しかし、微生物付着担体表面でアンモニアが消費されて深部ではアンモニア濃度が低く保たれているために、メタン生成菌が安定的にメタン生成を行うことが可能であったと考えられる。これらの例に示されるように、担体の充填により担体上にメタン生成菌を多く保持することは、固形分を含む複雑な基質の分解に有効であることが示唆された¹⁰⁾(炭素繊維の導電性としての効果は次の項で述べる)。

3) バイオ電気化学システムの利用(メタン発酵) バイオ電気化学システム(bioelectrochemical system)とは、微生物を触媒として用いて電極反応を促進する装置の総称であり、多くは微生物電池(microbial fuel cells)や微生物電解セル(microbial electrolysis cells)を指して、近年は廃水処理にも利用されている¹¹⁾。電気化学システムにおいては、酸化反応を行うアノード電極と還

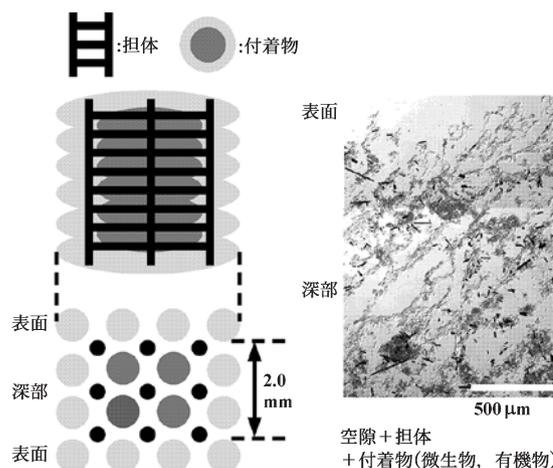


図3. 固定床式発酵における微生物付着担体と担体への付着物の模式図、およびその顕微鏡写真

元反応を行うカソード電極の電位差が電流の駆動力となる。バイオ電気化学システムを使用している電極界面上での電子授受に関する知見は過去に多く得られているものの、実用的な側面を考慮すると多くの電極が必要になる、電流値を上げるために高価な電極が必要になる、といった問題点があげられる¹²⁾。そこで、コストを低減する(使用する電極数を減らす、安価な炭素電極を使用する、微弱な電流を利用する)ために、筆者は溶液中の酸化還元電位を制御することで微生物代謝を改変することを目的とした。

作用電極、対電極、参照電極を使用する3電極方式を用いた。酸化還元電位がメタン発酵に与える効果を調べるために、作用極側と対極側をナフィオン膜で仕切り、作用極側に種汚泥を入れて、電子メディエーターであるアントラキノン-2,6-ジサルフェイト(AQDS)を含む模擬生ごみ基質で連続運転した¹³⁾。電位制御していないメタン発酵槽内の電位は -0.47 V (vs. Ag/AgCl) (以下、電位はAg/AgCl電極基準で示す)であり、作用極上の電位を -0.47 V より低く設定すれば作用極上で還元反応が起こり、 -0.47 V より高く設定すれば酸化反応が起こる。ただし、 -0.6 V 、 -0.8 V に設定したときの電流の絶対値は $250\text{ }\mu\text{A}$ 以下(発酵槽の容量: 500 mL)に抑えられており、水の電気分解による水素生成が起こっていないことを確認している。結果として、 -0.47 V より低い -0.6 V 、 -0.8 V に設定したときには、電位制御していないときと比較して、高負荷時にメタン生成を安定化することに成功した。逆に、 -0.47 V より高い 0.0 V 、 -0.3 V に設定したときにメタン生成は不安定化した。すなわち、メタン発酵には還元反応が資することが明らかとなった。逆に酸化反応はメタン発酵を阻害していた。なお、投じた電気エネルギーに対して、増加したメタンガスとしてのエネルギー量は350倍以上に達していた。すなわち、微弱な電流を投じて溶液中の酸化還元電位を制御することにより、複雑微生物系中のメタン生成菌を制御してメタン発酵槽をより高負荷で運転することが可能であることが示唆された。

さらにバイオ電気化学システムのカソード電極上に、上述の導電性の炭素繊維を貼り付けてAQDSを含まない模擬生ごみ基質で運転したところ、炭素繊維中にメタン生成菌を保持した状態で溶液中の酸化還元電位を制御することで、より高い負荷でも模擬生ごみ基質より安定してメタンガス生成を行うことが可能であった^{14,15)}。導電性の炭素繊維が電子メディエーターとしての役割を果たしていたと考えられる。還元反応が与えるメカニズムを調べるために、カソード電極槽側にタンパク質分解 *C. proteolyticus* strain CT-1と水素資化性メタン生成菌

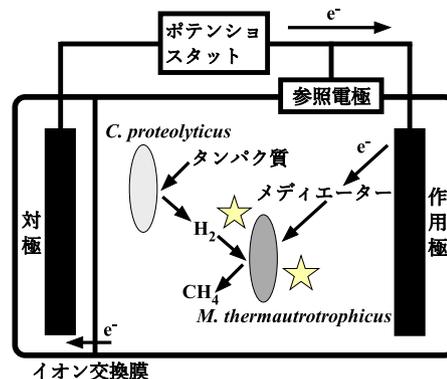


図4. 還元反応→*M. thermotrophicus*の増殖促進→水素除去→*C. proteolyticus*によるタンパク質分解促進

*M. thermotrophicus*を植菌して、AQDSを添加してカソード電極上の電位を -0.8 V に制御してバッチ培養を行った¹⁶⁾。その結果、還元反応により酸化還元電位を制御することにより、*M. thermotrophicus*の特に生育が促され、それに伴い、系内の水素からメタンへの変換が促進されることで*C. proteolyticus* strain CT-1によるタンパク質分解も増加することが示された(図4)。

4) バイオ電気化学システムの利用(水素発酵) バイオ電気化学システムを実用化するためには、さらにイオン交換膜を除いてコストを削減する必要がある。そこで、安価な炭素電極・微弱電流のみを利用した3電極方式をメタン発酵槽の前処理(可溶化・酸生成を行う)である水素発酵に適用して、模擬生ごみ基質から効率的に水素発酵を行う複雑微生物系を構築することを試みた。良好な水素発酵を得るためには、水素を消費するメタン生成菌を抑制しながら乳酸発酵が起こらないpH域(経験的に5.5–6.5)で短い滞留時間で運転する必要がある。メタン生成菌を抑制する新規追加の条件として、高い対極電位 $+1.4\text{ V}$ – $+2.4\text{ V}$ を発酵槽内に与えた^{17,18)}(なお、作用極電位は -1.0 V ないしは -0.9 V に制御しているが、水の電気分解による水素生成が起こっていないことは確認している)。この条件で、効率的な水素生成を行う酢酸・酪酸発酵を優先化して、模擬生ごみ基質から容易に水素発酵を立ち上げることに成功した¹⁷⁾。一方、バイオ電気化学システムによる高い電位条件を与えないで運転した場合、メタン生成菌の増殖を抑制することが比較的困難であった¹⁸⁾。すなわち、高い電位を発酵槽内に与えることで、酸性域のpHにありながら乳酸発酵を抑制する比較的中性に近いpH条件で水素発酵を得ることが可能であることが明らかとなった。

バイオ電気化学システムを適用した水素発酵槽の廃液は、固定床式メタン発酵に投じて水素-メタン二段発酵を行うことが可能である(図5)。グルコースを主要な炭

素源として運転した場合に、前段の電気化学システム制御下の水素発酵槽中では二酸化炭素をより固定してプロピオン酸やエタノールが多く産生されており、結果として二段発酵における二酸化炭素発生量を抑制してメタン生成量を増加させていた¹⁹⁾。

培養系ヒト大腸細菌叢モデル

1) *In vitro*系でのヒト大腸細菌叢モデルの構築 1000菌種以上、100兆個にも及ぶ腸内細菌叢（腸内フローラ）は宿主に栄養分（短鎖脂肪酸やビタミンなど）を供給して、腸管免疫系に作用して恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている²⁰⁾。正常な腸内細菌叢が攪乱された状態（dysbiosis）は、腸管だけでなく腸管外のさまざまな疾病に関与するとされている。

ある種の食品には疾病予防や回復、体調調整、老化抑制などの助けとなる成分が含まれており、これらの機能をもった食品が機能性食品とされる。日本では2015年4月1日より機能性表示食品制度が始まり、事業者が製造販売する食品について安全性と機能性に関する科学的根拠などの必要な事項を揃えて、消費者庁長官に届け出て受理されれば、機能性を表示して販売できるようになった²¹⁾。食品成分の機能性評価は動物給餌試験やヒト介入試験の*in vivo*系で行われてきたが、倫理的制限が低く、繰り返し評価が可能な*in vitro*系での腸管内の細菌叢を模したモデルの開発が待たれている。日本に先駆けて

欧米諸国ではヒト腸内細菌叢モデルが開発されてきたが、いずれも実際のヒト腸内細菌叢とのギャップが大きかった。さらに、疾患患者腸内細菌叢のdysbiosis状態を構築することはより困難であった。これらのシステムの問題点を解決すべく、筆者らは神戸大学にて培養系ヒト大腸細菌叢モデル（KUHIMM：Kobe University Human Intestinal Microbiota Model）を開発した²²⁻²⁴⁾。本技術はヒト糞便を培養スターターとしている。培養槽は高度に嫌気状態を形成して、pH条件についてもヒト大腸内を再現するように努めた。その結果、①培養後にヒト大腸内のほぼ全菌種（500-1,500種）や菌多様性を保持し、個人ごとの菌叢を維持していた、②偏性嫌気性細菌（門レベルでFirmicutesとBacteroidetes）が優勢であった、③難培養とされている細菌種も増殖していた、④代謝プロファイルを維持していた。すなわち、短鎖脂肪酸の構成比が実際のヒト大腸内に近いものであった（酢酸：プロピオン酸：酪酸=3：1：1）（図6）。

本モデルは小容量の培養槽を複数備えた装置であり、そのため複数のサンプルを同時に、かつ比較的短時間で培養することができる。また、経時的なpHモニタリングやサンプリングが可能で、培養液中の代謝物の分析結果と菌叢を関連付けて考察できる。ここで、水溶性食物繊維である α -シクロデキストリン（ α CD）をKUHIMMに投与した例を紹介する。 α CDは経口摂取されるとヒト生体内の消化酵素では分解されずに大腸まで届き、シクロデキストリナーゼ（CDase:EC.3.2.1.54）を産生する*Bacteroides ovatus*などの腸内細菌によって資化され、マウスに投与した際には*Bifidobacterium*属や*Bacteroides*属の細菌を増加させて肥満抑制効果を示した²⁵⁾。 α CDをヒトが1日に摂取する食物繊維量を反映した0.2 g/100 mL濃度でKUHIMMに投与した結果、酢酸・プロピオン酸の生成が増加していることを検出した。なお、酢酸やプロピオン酸の生成量は（*Bifidobacterium*属を含む）Actinobacteria門や（*Bacteroides*属を含む）Bacteroidetes門の割合と高い正の相関を示した²⁴⁾。すなわち、KUHIMMは現実的な濃度条件でActinobacteria

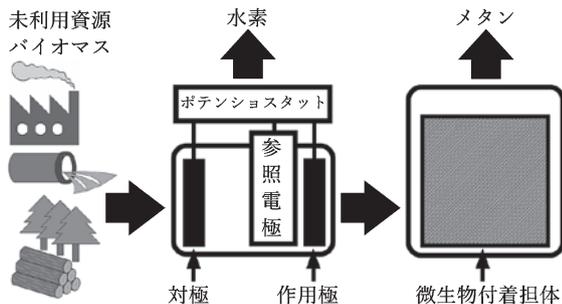


図5. 前段の可溶性・酸生成槽（水素発酵槽）をバイオ電気化学システムで制御→後段の固定床式メタン発酵槽

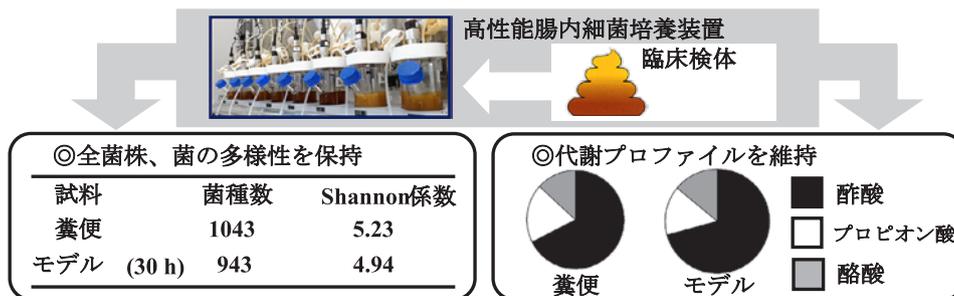


図6. *In vitro*系ヒト大腸細菌叢モデル

門や *Bacteroidetes* 門に含まれる微生物の代謝活性の増加を検出できていた。

2) 疾患患者のヒト大腸細菌叢モデルの構築 (潰瘍性大腸炎) 次に、疾患患者の腸内細菌叢の dysbiosis 状態を構築することを目指した。まずは、潰瘍性大腸炎患者の培養系ヒト大腸細菌叢モデル KUHIMM の構築に関する研究を紹介する。潰瘍性大腸炎は、大腸に限定されて炎症反応が過剰に進行する発症メカニズム不明の炎症性腸疾患であり、その根治的治療法は確立されていない。もともとは欧米で多いことが知られていたが、日本でも患者数が年々増加しており医療受給者交付数は現在16万人を超えている。

13人の健常人ボランティアおよび13人の潰瘍性大腸炎患者ボランティアより、臨床検体 (ヒト糞便) の提供を受け、それぞれをモデル培養装置に植菌して KUHIMM を構築した²⁵⁾。臨床検体および KUHIMM についてメタ16S解析を行った結果、健常人および潰瘍性大腸炎患者ともに細菌種数は臨床検体中のものが KUHIMM 中に再現されており、 α 多様性 (細菌の多様性の指数) も再現されていた。ただし、臨床検体中において、細菌叢の構成は健常人と潰瘍性大腸炎患者で異なっており、この腸内細菌叢の違いは KUHIMM 中に再現されていた。細菌叢について科レベルで評価した結果、興味深いことに *Lachnospiraceae* 科に関連する細菌の割合が潰瘍性大腸炎患者の臨床検体中で健常人の臨床検体中と比べて有意に減少しており、同様に KUHIMM 中においても *Lachnospiraceae* 科に関連する菌の割合の減少を潰瘍性大腸炎患者モデル中に再現していた。過去の知見においても *Lachnospiraceae* 科の菌が潰瘍性大腸炎患者で減少することが報告されており²⁷⁾、筆者らの結果と一致している。さらに、KUHIMM 発酵液中において、酪酸生成量が潰瘍性大腸炎患者のもので健常人と比べて有意に減少していた (図7)。 *Lachnospiraceae* 科の菌は哺乳動物の腸管内において大部分を占めており、酪酸生成に重要な役割を果たしている。また、酪酸は制御性T細胞の生成を誘導して炎症を抑制することが知られてい

る。以上の結果より、KUHIMM は *Lachnospiraceae* 科の減少とそれに付随する酪酸生成の減少を再現できる系であり、潰瘍性大腸炎患者の重症度を腸内環境の観点から迅速にスクリーニングできる系であると考えられる。

潰瘍性大腸炎の活動指数として、Mayo score ないしは Partial mayo score が使用される。しかし、潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢における *Lachnospiraceae* 科の割合と Partial mayo score に相関は認められなかった²⁵⁾。すなわち、潰瘍性大腸炎患者の大腸内には活動指数の大小に関わらず、*Lachnospiraceae* 科が少ない異常な状態が継続されており、そのため本疾患が再燃、寛解を繰り返してしまうと推察される。

3) 疾患患者のヒト大腸細菌叢モデルの構築 (冠動脈疾患) 最後に、冠動脈疾患患者の培養系ヒト大腸細菌叢モデル KUHIMM の構築に関する研究を紹介する。冠動脈疾患とは、心筋に血液を運ぶ冠動脈の内壁にコレステロールなどが沈着して内腔が狭められることにより血液供給が減少する病気であり、世界においても35歳以上のヒトの死因の3分の1以上を占めているとされている。冠動脈疾患患者の腸内細菌叢において、健常人と比べて *Bacteroides* 属が減少しており、特に *Bacteroides vulgatus* と *B. dorei* が減少しており、これらの菌を回復させることが炎症反応を抑制するのに効果的であることが明らかとなっている²⁸⁾。そこで、冠動脈疾患患者ないしは健常人の臨床検体それぞれより KUHIMM モデルを作製した。その結果、冠動脈疾患患者の KUHIMM モデルにおいては、健常人のモデルと比較して *Bacteroides* 属および *B. vulgatus* や *B. dorei* の量が有意に減少して既報の結果と一致しており、本疾患の特徴を KUHIMM 中に再現していた²⁹⁾。さらに、冠動脈疾患患者のモデルに対してレジスタントスターチを0.5%投与することにより、*B. vulgatus* や *B. dorei* の量が有意に増加していた。患者の一部には効果が認められないものも存在しており、KUHIMM モデルは患者個人ごとの特性を評価できると考えられる。

おわりに

筆者は前項にて、複雑微生物系を利用して未利用資源バイオマスから水素・メタンといったバイオガスを効率的に回収するために、複合微生物系の制御法としてバイオ電気化学システムや固定床式発酵を適用した取組みを紹介した。近年、再生可能エネルギーによる発電が期待されている。中でも、燃料電池自動車や家庭用燃料電池 (エネファーム) の普及を目指した水素社会の構築が求められている。しかし現在、水素は大部分が化石資源由来である。安定的に水素を供給するためには再生可能な

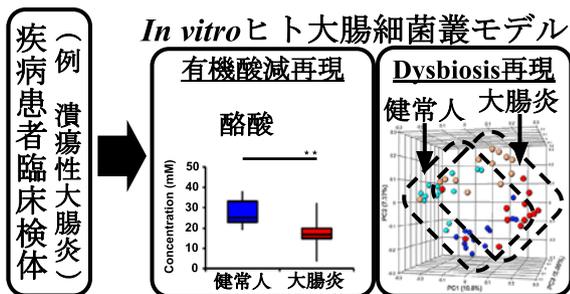


図7. 疾患患者のヒト大腸細菌叢モデルの構築

バイオマス資源からの生産が必要になると考えられる。筆者が提唱する新規の二段システムが、水素社会ひいてはカーボンニュートラル社会の構築の一助になることを祈念している。一方、筆者の3電極方式と似た2本の電極を利用して極間電圧を0.6 Vに設定する2電極方式を適用することで廃水からのメタン生成を促進した知見も得られている³⁰⁾。この方式では高い電位を与えていないためにメタン生成菌は阻害されずに、むしろメタン生成菌と他の微生物の直接的種間電子伝達が促進されたと考えられる。このようにバイオ電気化学システムについては制御法が少し変われば異なる結果が得られる。筆者も現在、バイオ電気化学システムによる新しい制御法を構築させており、今後の研究の進展に期待していただきたい。

筆者は後項にて、複合微生物系であるヒト腸内細菌叢のモデル系を構築する取組みを紹介した。本培養系ヒト大腸細菌叢モデルは、投与成分の機能的評価や疾患患者の腸内環境の評価などをハイスループットに行うことができる強力かつ便利なツールであると考えられる。現在、疾患モデルについて拡充しており、何よりも疾患患者腸内細菌叢のdysbiosis状態の是正に向けて有効な投与物の構築、探索を進めており、こちらも今後の研究の進展に期待していただきたい。

謝 辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用微生物学研究室、財団法人電力中央研究所バイオテクノロジー領域、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科にて行われた研究である。固定床式発酵の研究の実施にあたり、複合微生物系の研究に導いていただき、多大なご指導・ご鞭撻を賜りました五十嵐泰夫先生（現中国西南大学生物能源環境修復研究センター長・教授）をはじめ、石井正治先生（東京大学教授）、春田伸先生（現首都大学東京教授）、ならびに共同研究実施の場を提供していただきご指導を賜りました上野嘉之博士（鹿島建設株式会社技術研究所）に深く感謝致します。バイオ電気化学システムの研究について多大なご助力、ご助言を頂きました上司であった森田仁彦博士（電力中央研究所）をはじめ、大村直也博士（電力中央研究所）、松本伯夫博士（電力中央研究所）、平野伸一博士（電力中央研究所）に深く感謝致します。培養系ヒト大腸細菌叢モデルの研究の実施にあたり、多大なご助言・ご支援を頂き本奨励賞にご推薦を頂きました近藤昭彦教授（神戸大学）をはじめ、大澤朗教授（神戸大学）、蓮沼誠久教授（神戸大学）、荻野千秋教授（神戸大学）、松田史生教授（現大阪大学）、栢植陽太助教（現金沢大学）、電力中央研究所時代から共同研究を進めて頂いた佐々木大介特命助教（神戸大学）に深く感謝申し上げます。疾患患者モデルの研究について多大なご助言・ご協力を頂きました星奈美子講師（神戸大学）をはじめ、山下智也准教授（神戸大学）、井上潤特定助教（神戸大学）、生田直子博士（神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター）、吉田尚史研究員（神戸大学）に深く

感謝申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたり多くのテクニカルスタッフの皆様からサポートを頂いたお陰で受賞に至ったことに深く感謝申し上げます。

本研究の一部は、科学技術振興機構、日本学術振興会、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の支援を得て行われたものです。

文 献

- 1) Sabra, W., Dietz, D., Tjahjajari, D., and Zeng, A. P.: *Eng. Life Sci.*, **10**, 407–421 (2010).
- 2) Marshall, C. W., LaBelle, E. V., and May, H. D.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**, 391–397 (2013).
- 3) Sasaki, K., Morita, M., Sasaki, D., Nagaoka, J., Matsumoto, N., Ohmura, N., and Shinozaki, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 469–472 (2011).
- 4) Sasaki, D., Morita, M., Sasaki, K., Watanabe, A., and Ohmura, N.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1096–1099 (2013).
- 5) Sasaki, K., Sasaki, D., Morita, M., Hirano, S., Matsumoto, N., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 1573–1583 (2010).
- 6) Sasaki, K., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 941–952 (2007).
- 7) Sasaki, K., Haruta, S., Tataru, M., Yamazawa, A., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 271–273 (2006).
- 8) Sasaki, K., Morita, M., Hirano, S., Sasaki, D., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1579–1586 (2010).
- 9) Sasaki, K., Morita, M., Hirano, S., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 1555–1561 (2011).
- 10) Sasaki, K., Morita, M., Hirano, S., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 130–135 (2009).
- 11) Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Benneton, X. D., Strik, D. P. B. T. B., Sarma, P. M., and Pant, D.: *Renew. Energ.*, **98**, 153–170 (2016).
- 12) Sasaki, K., Sasaki, D., Kamiya, K., Nakanishi, S., Kondo, A., and Kato, S.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **50**, 182–188 (2018).
- 13) Sasaki, K., Sasaki, D., Morita, M., Hirano, S., Matsumoto, N., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *Bioresour. Technol.*, **101**, 3415–3422 (2010).
- 14) Sasaki, K., Sasaki, D., Morita, M., Hirano, S., Matsumoto, N., Watanabe, A., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *Bioresour. Technol.*, **102**, 6837–6842 (2011).
- 15) Sasaki, D., Sasaki, K., Watanabe, A., Morita, M., Matsumoto, N., and Ohmura, N.: *Bioresour. Technol.*, **129**, 366–373 (2013).
- 16) Sasaki, D., Sasaki, K., Morita, M., Hirano, S., Matsumoto, N., and Ohmura, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 59–63 (2012).
- 17) Sasaki, K., Morita, M., Matsumoto, N., Sasaki, D., Hirano, S., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 64–69 (2012).
- 18) Sasaki, K., Morita, M., Sasaki, D., Ohmura, N., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 7005–7013 (2013).
- 19) Sasaki, K., Sasaki, D., Tsuge, Y., Morita, M., Kondo, A.:

- Biotechnol. Biofuels.*, **11**, 173 (2018).
- 20) Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Petterson, S.: *Science*, **336**, 1262–1267 (2012).
 - 21) 消費者庁 : https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/about_fofoo_with_function_claims/ (2019/08/09).
 - 22) Takagi, R., Sasaki, K., Sasaki, D., Fukuda, I., Tanaka, K., Yoshida, K., Kondo, A., and Osawa, R.: *PloS One*, **11**, e0160533 (2016).
 - 23) Sasaki, K., Sasaki, D., Okai, N., Tanaka, K., Nomoto, R., Fukuda, I., Yoshida, K., Kondo, A., and Osawa, R.: *PloS One*, **12**, e0180991 (2017).
 - 24) Sasaki, D., Sasaki, K., Ikuta, N., Yasuda, T., Fukuda, I., Kondo, A., and Osawa, R.: *Sci. Rep.*, **8**, 435 (2018).
 - 25) Nihei, N., Okamoto, H., Furune, T., Ikuta, N., Sasaki, K., Rimbach, G., Yoshikawa, Y., and Terao, K.: *Biofactors*, **44**, 336–347 (2018).
 - 26) Sasaki, K., Inoue, J., Sasaki, D., Hoshi, N., Shirai, T., Fukuda, I., Azuma, T., Kondo, A., and Osawa, R.: *Biotechnol. J.*, **14**, 1800555 (2019).
 - 27) Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., and Harpaz, N. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13780–13785 (2019).
 - 28) Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., Hoshi, N., Hatano, N., Ozawa, G., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Amin, H. Z., Hirora, Y., Ogawa, W., Yamada, T., and Hirata, K. I.: *Circulation*, **138**, 2486–2498 (2018).
 - 29) Yoshida, N., Sasaki, K., Sasaki, D., Yamashita, T., Fukuda, H., Hayashi, T., Tabata, T., Osawa, R., Hirata, K. I., and Kondo, A.: *J. Atheroscler. Thromb.*, **26**, 705–719 (2019).
 - 30) Zhao, Z., Zhang, Y., Wang, L., and Quan, X.: *Sci. Rep.*, **5**, 11094 (2015).