

Title	Cultivation Strategy for 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoic Acid Production by <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ET-3
Author(s)	古市, 圭介
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48545
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ふる いち けい すけ 古 市 圭 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 6 8 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 9 月 27 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Cultivation Strategy for 1, 4-Dihydroxy-2-Naphthoic Acid Production by <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ET-3 (プロピオン酸菌による 1, 4-Dihydroxy-2-Naphthoic Acid の高濃度培養)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 塩谷 捨明 (副査) 教 授 大竹 久夫 教 授 清水 浩 教 授 福井 希一 教 授 金谷 茂則 教 授 小林 昭雄 教 授 原島 俊 助教授 片倉 啓雄

論 文 内 容 の 要 旨

プロピオン酸菌の産生する 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) はビフィズス菌のみを選択的に増殖させる働きを持ち、DHNA の人への投与は腸内のビフィズス菌数を増加させ、腸内環境を改善することが確認された。本研究では、プロピオン酸菌による DHNA の高濃度培養法を検討した。

プロピオン酸菌を好気下で培養した場合、嫌気下で生産され DHNA 生産を阻害する代謝産物であるプロピオン酸をプロピオン酸菌が資化することを確認した。さらに、好気培養は DHNA を前駆体として生産されるメナキノン (ビタミン K₂) の生産を抑制し、DHNA の菌体外への放出を促進した。そこで、プロピオン酸が蓄積した時点で嫌気から好気に切替える培養を実施した結果、DHNA 濃度は嫌気培養の 1.6 倍に上昇した。一方で、プロピオン酸菌は酸素耐性が低いことから、長期間の好気培養は代謝活性を低下させ培養液中の溶存酸素濃度を上昇させた。非常に酸化されやすい構造を持つ DHNA は溶存酸素濃度の上昇と共に酸化され、消失した。

次に、培養中の DHNA の消失を避けるために、好気培養の最適化を検討した。酸素供給速度と DHNA 生産の関係を調べた結果、酸素供給速度が 0.23 mg/ (l・h) 以上で促進され、この値以上であれば DHNA の生産量に違いは見られなかった。一方で、酸素供給速度を大きくするほど溶存酸素濃度上昇、DHNA 消失までの時間は短縮された。そこで、酸素阻害とプロピオン酸阻害を軽減するために、嫌気培養と DHNA 生産を促進する最小の酸素供給速度による好気培養を繰り返す、嫌気－好気繰り返し培養を実施した。この培養では、プロピオン酸濃度を低く制御でき、また、培養中における溶存酸素濃度は市販の溶存酸素濃度計の検出限界以下であった。そして、DHNA は継続的に生産され、最大 DHNA 濃度は嫌気培養の 2.7 倍に上昇した。

更に DHNA の生産性を向上させるため、炭素源である乳糖を制限基質とした嫌気下での流加培養を実施した。その結果、流加培養は菌体増殖およびメナキノン生産を抑制し、DHNA 生産を促進することが明らかとなった。次に、乳糖流加速度の DHNA 生産に及ぼす影響を調べた結果、ある値までは流加速度を小さくするほど、菌体増殖およびメナキノン生産の抑制が強くなり、DHNA 生産がより促進されることを確認した。そこで、DHNA 生産を最大とする流加速度による流加培養を嫌気－好気繰り返し培養に応用した結果、DHNA 濃度は嫌気培養の 4.2 倍にまで上昇した。これにより、DHNA の生産コストは嫌気培養の 1/3 に低減できることを確認した。

論文審査の結果の要旨

本論文はプロピオン酸菌の産生する 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) の高濃度生産方法を述べたもので、プロピオン酸菌培養において好気培養および流加培養を最適化することにより、DHNA 生産が飛躍的に向上することを明らかにしている。

序論では、DHNA のビフィズス菌のみを選択的に増殖させる働き、DHNA 含有発酵物を摂取した臨床試験による、腸内環境改善に関する知見を記述している。

第1章では、DHNA 生産における好気培養の利点を明らかにした。好気培養は、嫌気下で生産され DHNA 生産を阻害する代謝産物であるプロピオン酸をプロピオン酸菌に資化させ、また、DHNA を前駆体とするメナキノン（ビタミン K₂）の生産を抑制し、DHNA の菌体外への放出を促進した。そして、プロピオン酸が蓄積した時点で嫌気から好気に切換える培養により DHNA 濃度を嫌気培養の 1.6 倍に上昇させた。一方で、長期間の好気培養がプロピオン酸菌の代謝活性を低下させ、溶存酸素濃度を上昇および DHNA 酸化を引き起こすことも確認した。

第2章では、培養中の DHNA 酸化を避けるため、好気培養の最適化を検討した。酸素供給速度と DHNA 生産の関係を調べ、酸素供給速度が 0.23 mg/ (l・h) 以上で促進され、この値以上であれば DHNA の生産量に違いが見られないことを確認した。そして、酸素阻害とプロピオン酸阻害を軽減するために、嫌気培養と DHNA 生産を促進する最小の酸素供給速度による好気培養を繰り返す、嫌気－好気繰り返し培養により、プロピオン酸濃度を低い値に、また、溶存酸素濃度を溶存酸素計の検出限界以下に制御した結果、嫌気培養の 2.7 倍の DHNA 濃度が得られることを明らかにした。

第3章では、炭素源である乳糖を制限基質とした嫌気下での流加培養が DHNA 生産を促進させることを明らかにした。また、流加培養は菌体増殖およびメナキノン生産を抑制すること、流加速度を小さくするほど、菌体増殖およびメナキノン生産の抑制が強くなり、DHNA 生産がより促進されることを確認した。そして、DHNA 生産を最大とする流加速度による流加培養を嫌気－好気繰り返し培養に応用した培養により、嫌気培養の 4.2 倍の DHNA 濃度が得られることを明らかにした。これにより、DHNA の生産コストは嫌気培養の 1/3 に低減できることを確認した。

結論では、各章のまとめ、本研究の産業規模での生産における工学的意義および乳業界での商品開発における重要性を述べている。

以上のように、本論文はプロピオン酸菌による DHNA 生産について、多くのメカニズムを新規に解明し、これらのメカニズムを考慮した工学的手法により DHNA の高濃度生産に成功している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。