

Title	Comparison of Lactate Reduction Strategies for Enhancement of Nisin Production by <i>Lactococcus lactis</i>
Author(s)	Agustin, Krisna Wardani
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48546
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	アグスティン クリスナ ワルダニ AGUSTIN KRISNA WARDANI		
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)		
学位記番号	第 2 1 1 3 1 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	Comparison of Lactate Reduction Strategies for Enhancement of Nisin Production by <i>Lactococcus lactis</i> (<i>Lactococcus lactis</i> によるナイシン生産増強のための乳酸生産抑制方法に関する研究)		
論文審査委員	(主査) 教授 塩谷 捨明		
	(副査)		
	教授 清水 浩	教授 関 達治	教授 卜部 格
	教授 大竹 久夫	教授 金谷 茂則	教授 小林 昭雄
	教授 仁平 卓也	教授 原島 俊	教授 福井 希一
	教授 四方 哲也		

論 文 内 容 の 要 旨

第 1 章では、本研究の導入や目的を述べた。ナイシンは *Lactococcus* の一種が生産する抗菌ペプチドで、安全な物質であることから食品保存料として利用されている。しかし、培養中の乳酸の蓄積はナイシン生産を阻害することが知られている。それ故に、本研究は乳酸生産の抑制ということに注目し、その方法論について比較研究を行った。

第 2 章では、乳酸生産量を減らす方法として、乳酸に向かう代謝の流れを別の代謝経路に流すことを考えた。その候補として、アラニンやエタノールへと代謝の流れを変えることを考えたが、その前に代謝変化の予測を行った。ナイシンの生産性向上という観点からどちらの経路に変更すればいいのかを予測するために、数学的なモデルを構築しシミュレーションを行って、アラニンへの変更がよりよいことを明らかにした。

第 3 章では、シミュレーション結果に基づいて、*Bacillus sphaericus* 由来アラニン脱水素酵素遺伝子 *alaD* の導入により、代謝の流れをアラニンに向けることを試みた。*L. lactis* 細胞内での *alaD* 遺伝子の発現は成功し、発現したアラニン脱水素酵素の比活性は、乳酸脱水素酵素の比活性より高いことが確認できた。しかしながら、代謝の流れをアラニンへと変えることはできず、乳酸生成量は野生株とほぼ同じであった。

第 4 章では、ヘミン添加培養による乳酸生産の抑制に関して、その効果を最適化するために様々な培養条件を検討した。全ての培養条件でヘミン添加の効果が現れ、細胞増殖がよくなり乳酸生産がより抑制されるといったことが観察された。最も乳酸生産抑制効果を示した培養条件は、培養開始 4 時間に微好気条件にするというもので、培地中の乳酸の最大蓄積量は 4.9 g で、その後乳酸量は減少していった。しかしながら、ナイシンの生産性は増加しなかった。

第 5 章では、別の乳酸生産抑制の方法として、乳酸を資化できる *Kluyveromyces marxianus* との共培養を試みた。培養中に *L. lactis* が生産した乳酸は *K. marxianus* が資化するため、乳酸の蓄積が起らない。pH の揺れが最少になる安定な共培養系を確立するために、カスケードコントロールを用い、そのパラメーターを最適化した。その結果、ナイシン生産量が大幅に改善し、乳酸生産抑制とナイシン生産増強の両方を達成することができた。

第6章では本研究の結論を記述した。代謝の流れを変える方法については、改善の余地は残されているものの、これまでの研究では酵母との共培養による乳酸生産抑制方法が最も効果的であることがわかった。

論文審査の結果の要旨

第1章では、本研究の導入や目的を述べた。ナイシンは *Lactococcus* の一種が生産する抗菌ペプチドで、安全な物質であることから食品保存料として利用されている。しかし、培養中の乳酸の蓄積はナイシン生産を阻害することが知られている。それ故に、本研究は乳酸生産の抑制ということに注目し、その方法論について比較研究を行った。

第2章では、乳酸生産量を減らす方法として、乳酸に向かう代謝の流れを別の代謝経路に流すことを考えた。その候補として、アラニンやエタノールへと代謝の流れを変えることを考えたが、その前に代謝変化の予測を行った。ナイシンの生産性向上という観点からどちらの経路に変更すればいいのかを予測するために、数学的なモデルを構築しシミュレーションを行って、アラニンへの変更がよりよいことを明らかにした。

第3章では、シミュレーション結果に基づいて、*Bacillus sphaericus* 由来アラニン脱水素酵素遺伝子 *alaD* の導入により、代謝の流れをアラニンに向けることを試みた。*L. lactis* 細胞内での *alaD* 遺伝子の発現は成功し、発現したアラニン脱水素酵素の比活性は、乳酸脱水素酵素の比活性より高いことが確認できた。しかしながら、代謝の流れをアラニンへと変えることはできず、乳酸生成量は野生株とほぼ同じであった。

第4章では、ヘミン添加培養による乳酸生産の抑制に関して、その効果を最適化するために様々な培養条件を検討した。全ての培養条件でヘミン添加の効果が現れ、細胞増殖がよくなり乳酸生産がより抑制されるといったことが観察された。最も乳酸生産抑制効果を示した培養条件は、培養開始4時間に微好気条件にするというもので、培地中の乳酸の最大蓄積量は4.9 gで、その後乳酸量は減少していった。しかしながら、ナイシンの生産性は増加しなかった。

第5章では、別の乳酸生産抑制の方法として、乳酸を資化できる *Kluyveromyces marxianus* との共培養を試みた。培養中に *L. lactis* が生産した乳酸は *K. marxianus* が資化するため、乳酸の蓄積が起らない。pHの揺れが最少になる安定な共培養系を確立するために、カスケードコントロールを用い、そのパラメーターを最適化した。その結果、ナイシン生産量が大幅に改善し、乳酸生産抑制とナイシン生産増強の両方を達成することができた。

第6章では本研究の結論を記述した。代謝の流れを変える方法については、改善の余地は残されているものの、これまでの研究では酵母との共培養による乳酸生産抑制方法が最も効果的であることがわかった。

以上のように、本論文はナイシン生産増強のための乳酸生産抑制に有効な方法を明らかにしており、代謝工学に大きく貢献するものである。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。