

Abstract of Dissertation

Applicant

Doctoral Program in Animal and Food Hygiene
Graduate School of Animal Husbandry
Obihiro University of Agriculture and Veterinary

Medicine

Student ID: 17160002Name of Applicant: Mengi BharatSignature of Applicant: Bharat mengi

Title : Structure-viscosity relationship of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067 (Lactobacillus fermentum MTCC 25067 が生産する菌体外多糖の構造粘性相関)

Abstract

要 旨

インド産伝統的発酵乳「ダヒ」から単離された乳酸菌 *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067 株が生産する菌体外多糖 (HePS) はキサンタンガムと同等の高い粘性を示す。近年、同菌株の培養液が示す高粘性は複数の当該 HePS 分子が会合し超分子ネットワークを形成することに起因すると示された。予備実験として生菌数、pH 値、培養上清中の残存グルコース濃度、培養液の粘性を培養 144 時間にわたり測定した。その結果、生菌数は培養開始後 16 時間から 24 時間で最高値を示したのち漸減した。pH 値と残存グルコース濃度は培養開始後 24 時間で大幅に減少したのち一定値を示した。同菌株の培養液が示す粘性は培養開始後 48 時間で最大となり、その後、定常期の間、少なくとも培養開始後 144 時間までは低下した。生菌数、pH 値、残存グルコース濃度は 3 反復行った実験間での誤差は非常に小さい値であったのに対し、培養液粘性に関しては培養開始後 24 時間から 96 時間にかけて大きく変動した。そこで本博士論文は、同 HePS が示す構造粘性相関と、その物理化学的性質の培養期間中における経時変化を明らかにすることを目的とした。まず、同菌株の 48 時間培養上清と 144 時間培養上清から精製した HePS (以下それぞれ HePS_{48h} および HePS_{144h} と略す) の特徴を比較した。HePS_{48h} および HePS_{144h} の分子量分布パターンをゲル濾過クロマトグラフィーとフェノール硫酸法による糖濃度測定により見積もった

ところ、HePS_{48h} および HePS_{144h} はほぼ同様のピークパターンを示したが HePS_{144h} にのみ第 3 のピークが観察されたことから、HePS_{144h} がより多くの低分子画分を有することが示された。次に、600-MHz 1D ¹H-NMR を用いて HePS 分子の側鎖構造を解析した。3 位置換 D-Glcp のピーク面積に対する比として計算したところ、末端 D-Glcp、3 位置換 D-Glcp、2,3 位置換 D-Glcp、6 位置換 D-Galp のピーク面積比は HePS_{48h} と HePS_{144h} でほぼ同様であった。従って、HePS_{48h} および HePS_{144h} の側鎖構造に相違はないと結論した。次に、レオメーターを用いて HePS_{48h} および HePS_{144h} の 1% 水溶液の 25°C における 0.1/s to 100/s の範囲における定常ずり粘度を求めたところ、ずり速度の上昇に伴いずり応力が低下する非ニュートン流体に典型的なパターンを示した。そのような特徴を示す物質として大きな回転半径を有する直鎖状高分子が挙げられる。一方、低ずり速度における定常ずり粘度は HePS_{144h} 水溶液と比較して HePS_{48h} 水溶液は有意に高い値を示した。従って、HePS_{144h} 水溶液の粘性低下は HePS 分子の切断による低分子化が一因であると考えられた。さらに、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた HePS_{48h} および HePS_{144h} の微細構造観察の結果、両 HePS 共にネットワーク構造が観察されたが、HePS_{48h} とは対照的に HePS_{144h} は細く短い HePS 繊維が大きな割合を占めていることが示された。従って、これも HePS_{144h} 水溶液の低ずり速度における定常ずり粘度低下の一因であると示唆された。二次代謝産物や培地成分などバクテリア周囲に存在する物質と菌体との相互作用も培養液の物性に大きな影響を与えることが推定される。そこで菌体を含む培地成分と HePS 分子との相互作用が粘性に与える影響を調べるため、0.02% の HePS_{48h} または HePS_{144h} を MRS 培地に溶解し粘性を測定した。その結果、両 HePS 溶液ともニュートン流体の挙動を示し、菌体培養液と比較して有意に低い粘性を与えた。また、AFM により培養液そのものを用いて菌体の形状解析を実施したところ、48 時間培養では菌体周辺部に明瞭な HePS 超分子ネットワークが観察されたが 144 時間培養ではこれが消失していることが示された。さらに、144 時間培養液中で形成された HePS ネットワークには網の目の交点が他の部分よりも 1.9 倍高い構造が観察され、利湯は不明であるが 48 時間培養液中で同様の構造は観察されなかった。これらの発見により、長時間培養後、死菌体の細胞壁の脆弱化により菌体表層と HePS 超分子ネットワーク間の相互作用が低下し、その結果として培養液の粘性が低下したとする仮説を得た。また、同菌株のコロニーの走査型電子顕微鏡 (SEM) の結果、菌体周辺に幾層にも重なった明瞭な HePS 超分子ネットワークの存在を認めたことから、超分子ネットワーク形成は当該 HePS 分子が有する性質であることが支持された。以上から、正確な培養条件の制御と HePS 分解因子の探索が効果的に培養液粘性の低下を防ぐ方法であると示された。また、産業利用のためには当該 HePS と食品成分との相互作用を明らかにするべきである。さらに、当該 HePS 生産に関連する遺伝子の働きを明らかにする必要がある。本研究では、乳酸菌の遺伝子破壊株作製に汎用される二手法、すなわち抗生物質耐

性遺伝子をマーカーとして用いるプラスミドと温度感受性ベクターpORI28 プラスミドを使用し、当該菌株の糖転移酵素遺伝子 LF25067_00121 (GenBank ID: AP017973.1)遺伝子破壊株作製用プラスミドを構築し、同菌株の野生型を宿主として用いた HePS 生合成関連遺伝子破壊株を取得するため方法を最適化した。その結果、電気穿孔によるコンピテントセルへのプラスミド導入は、菌体の十分な洗浄による HePS 除去が重要であることが示された。以上、本研究で得られた知見を適用することで、培養上清や発酵食品の粘性を操作するために必要な当該 HePS 分子と菌体表層との相互作用の理解に関して重要な知見を得ることが今後期待される。