

# 菌体外多糖を生産する微生物の分離と食品製造への利用

横井 健二 (食品研究所長)

## ●はじめに

微生物を利用した発酵食品は、健康機能性の高い食品として注目されています。微生物が有する機能性物質の一つとして、免疫賦活能と菌体外多糖(EPS)との関連性が指摘されており、一部企業では EPS に注目した製品を上市しています。本研究では、EPSの中でも機能性多糖として知られるイヌリン、レバン生産菌単離を目標に、既存ライブラリおよび自然界などから EPS 生産菌を見出し、その性質を解明して応用の可能性を検討しました。

## ●EPS 生産菌の単離・収集

EPS 生産菌は、砂糖を含む培地上で、コロニーが粘液状または糸引きを示すことが知られます(図左)。この方法で EPS 生産菌単離を試み、5 菌種 8 株が得られました(表)。これらの EPS は酵素試験の結果、デキストランであることがわかりました。これらの内、特に *Leu. lactis* (L44 株) が、培養液の粘性が非常に高く、粘性付与などに利用できる可能性がありました。さらに当所の乳酸菌ライブラリや保存菌株が、砂糖からイヌリンやレバンを生産する酵素遺伝子を持つか否かについて、PCR 法による検出を試みました。その結果、*L. gasserii* (LG 株)、*L. johnsonii* (LJ 株)、*A. krulwichiae* JCM11691 (AK 株) からイヌリン合成酵素遺伝子、*P. chlororaphis*、*B. circulans* からレバン合成酵素遺伝子を検出しました(表)。産業上はイヌリンの重要性が非常に高く、イヌリン合成酵素研究を進めました。これらの酵素の性質を遺伝子配列から推測した結果、LG 株と LJ 株は既知の酵素でした。一方 AK 株の酵素は、特許や報告等はなく、新規性が極めて高いと考えられたため、この酵素が砂糖からイヌリンを作る能力を有するか調べました。

## ●砂糖からイヌリンを作る新規酵素の発見

菌株	分離源	多糖の種類	粘液/糸引き
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	漬物	デキストラン	粘液
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	漬物	デキストラン	粘液
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	鮎ずし	デキストラン	粘液
<i>Leuconostoc citreum</i>	米麴	デキストラン	粘液
<i>Leuconostoc citreum</i>	米麴	デキストラン	粘液
<i>Weissella confusa</i>	麴	デキストラン	糸引き
<i>Leuconostoc fallax</i>	麴	デキストラン	粘液
<i>Leuconostoc lactis</i>	麵生地	デキストラン	糸引き
<i>Lactobacillus gasserii</i>	ヤギ	イヌリン	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	ヤギ	イヌリン	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	土壌	レバン	-
<i>Bacillus circulans</i>	土壌	レバン	-
<i>Alkalihalobacillus krulwichiae</i>	JCM	イヌリン	-

AK 株のイヌリン合成酵素(InuBK)は 456 アミノ酸から成り、相同性比較の結果、*B. agaradohaerens* の Inu0 に 72.7%の相同性を示しましたが、それ以外に相同性の高い酵素は無く、新規酵素と考えられました。遺伝子組み換えにより InuBK だけを大量発現させ、InuBK を精製して性質を調べました。その結果 20%ショ糖溶液(pH7)に酵素を 50  $\mu$ g/ml の濃度で加え、50°Cで 6 時間反応させたところ、ショ糖は 2%となり反応効率 90%の高い効率で多糖が形成されました。イオンクロマトグラフなどにより精密解析した結果、得られた多糖はイヌリンであることが判明しました。酵素の至適温度は 50°C、至適 pH は 7~9 で既知の酵素よりアルカリ寄りであることが特徴でした。InuBK により作られたイヌリンの平均分子量は 3800、溶解性は 14%でしたが、市販イヌリン(植物由来)ではそれぞれ 4600、11%であり、InuBK によるイヌリンの方が分子量が小さく、水に溶けやすいことがわかりました。現在市販イヌリンは植物からの抽出が大半で、抽出コストが高く、砂糖からの製造はコスト低減につながる技術です。本研究成果は特許出願(特開 2021-177712)、論文公表(Biosci. Biotech. Biochem., 85, 1830-)しました。

## ●デキストラン生産菌のヨーグルト製造への応用

L44 株は、ヨーグルト発酵に応用した場合、好ましい粘性を付与できると考えられました。しかし、L44 株は 30°C以上では粘質デキストランを生成しません。ヨーグルトの発酵は、37~45°Cで行われることが多いため、発酵法を検討しました。脱脂粉乳に砂糖を加え、ヨーグルト用乳酸菌スターターと共に L44 株を仕込み、25°Cで 24 時間発酵した後、42°Cに温度を上げて 8~24 時間発酵させることにより、独特の粘性をもつヨーグルトが得られました(図右)。

横井 健二 (食品研究所長)



図 左: 粘液状コロニー、右: 試作ヨーグルトの粘性。細いピペットの先から押し出すと糸を引く。