

# 食用乳酸菌による化粧品素材としての機能性多糖の生産とその改質

新潟大学 工学部

谷口正之

Effect of co-existence of yeast cells on production of extracellular polysaccharide, (Kefiran) by *Lactobacillus kefiranofaciens* was investigated on the basis of the assumption of interaction between the yeast cells and the lactic acid bacterium in kefir grains. In the single culture of *L. kefiranofaciens*, not only the addition of yeast extract to the medium but also controlling the pH of the culture at 5.5 resulted in significant increase in amount of Kefiran produced. Since the yeast cells are considered to produce carbon dioxide and ethanol in kefir grains, the influences of aeration of gas containing carbon dioxide and addition of ethanol to the medium on Kefiran production by *L. kefiranofaciens* alone were also studied. The optimal gas composition for producing Kefiran was found to be  $N_2 : CO_2 = 9:1$ . By supplying ethanol at a concentration of 10 g/L, the amount of Kefiran produced was enhanced. Partially purified Kefiran was prepared from culture supernatant by ethanol precipitation, followed by anion-exchange chromatography. Gel filtration analysis indicated that the average molecular weight of partially purified Kefiran was several millions Da.

## 1 緒言

ケフィール粒は、図1に示すような、ケフィラン生産菌であるホモ型乳酸桿菌 *Lactobacillus kefiranofaciens* とヘテロ型乳酸短桿菌 *Lactobacillus kefir* などの乳酸菌と、乳糖発酵性および乳糖非発酵性の酵母などの複数の微生物から形成されている<sup>1)</sup>。その中で多糖ケフィランを主に生産しているのは、乳酸桿菌 *L. kefiranofaciens* であることが既に報告されている<sup>2)</sup>。これらの乳酸菌と酵母の間には、栄養源のやり取りや生育環境に関して相互作用や共生関係が存在すると推定されている。すなわち、乳酸菌は乳糖を分解し、ガラクトースを乳糖非発酵性酵母に提供し、酵母は乳糖発酵性酵母も含めてエタノールや二酸化炭素を生成して、乳酸菌の生育に適した環境を整えていると考えられている。

多糖ケフィランは、ケフィロヘキサオースを3

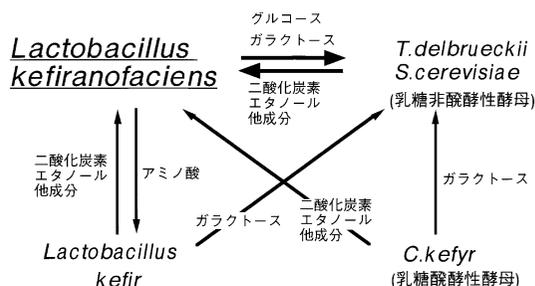


図1 ケフィール粒における微生物間の相互作用

～4単位連結した部分にケフィロヘプタオースが1単位組込まれた基本構造の繰り返しからできており、その分子量は約100万台であることが報告されている<sup>3)</sup>。ケフィールから得られるケフィール粒あるいは多糖ケフィランは抗腫瘍活性、抗血栓作用などの生理活性を示すことから、医療分野において利用すること、またケフィランの水溶液が強い粘性を有することから、食品用の増粘剤、安定化剤などとして利用することが考えられている。

筆者らは、これまでにセラミックフィルターや合成高分子膜を濾材として用いて代謝産物の除去と新鮮培地の供給が連続的にできる濾過培養システムを完成し、この膜濾過培養方式が種々の乳酸菌の高濃度培養および有用代謝産物の効



Production of Functional Polysaccharide as a Cosmetic Material by a Lactic Acid Bacterium for Food Processing and Modification of the Polysaccharide.

Masayuki Taniguti  
Niigata University

率的生産に適用できる実用的な生産法であることを報告してきた<sup>4-8)</sup>。すなわち、A) 発酵乳製品のスターターとしてのホモ乳酸菌およびビフィズス菌の生産、B) 耐塩性乳酸菌の高濃度かつ高速生産、C) *Lactococcus lactis* によるペプチド性抗生物質ナイシンの連続生産、D) *Lactococcus lactis* による抗菌性を有する発酵フレーバーの生産、E) ビフィズス菌を用いた安全な食品保存用抗菌剤の生産などについて報告してきた。そこで、本研究では、多くの分野において利用可能な機能性多糖であるケフィランを、化粧品用の保水剤、潤滑剤などとして利用することを目的として、食用乳酸菌による機能性多糖ケフィランの生産を中心に検討した。

## 2 実験

### 2.1 ケフィラン生産菌とその培養培地

本研究では、予備的な検討の結果、*Lactobacillus kefiranofaciens* JCM6985 をケフィラン生産菌として用いた。本菌はラクトースを炭素源とした MRS 培地を用いて、培養温度を 30℃ として培養した。

### 2.2 培養方法

本研究では、乳酸桿菌 *L. kefiranofaciens* によるケフィラン生産に対する酵母の存在の影響を 3つの因子に分けて検討した。すなわち、1) 酵母エキスの添加の効果、2) 酵母の生育によって発生する二酸化炭素の通気の効果、および 3) 酵母によって生成するエタノールの添加の効果について検討した。

### 2.3 ケフィランの回収

培養液を回収した後、遠心分離によって菌体を除去した。得られた上澄液中の粗ケフィランは、上澄液と等量のエタノールを添加することによって沈殿させた。沈殿した粗ケフィランは遠心分離によって回収した。回収した粗ケフィランは、培養液の 1/10 容量の蒸留水に溶解した。この粗

ケフィラン溶液に再び等量のエタノールを添加して、再沈殿させ、再び遠心分離によって回収した。この操作を合計 3 回繰り返して、粗ケフィランを部分精製しながら回収した。

粗ケフィラン溶液中の全糖をフィノール・硫酸法によって測定し、培養液中の粗ケフィラン濃度を算出した。

### 2.4 ケフィランの精製

回収した多糖溶液を精製するために陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。陰イオン交換クロマトグラフィーには、DEAE-Toyopearl 650 M (東ソー(株)) を担体として用いた。その担体は、0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.8) で平衡化した後に使用した。溶出液をフラクションコレクターにより 10.0mL ずつ採取し、タンパク量を 280nm における吸光度によって、全糖量をフェノール・硫酸法によってそれぞれ測定した。

### 2.5 ケフィランの分子量測定

エタノール沈殿によって回収した多糖溶液および陰イオン交換クロマトグラフィーより得られた成分について分子量を測定した。分子量は、カラム (Asahipak GS-710) を用いた高速液体クロマトグラフィーによって測定した。検出器は示差屈折計を使用した。分子量マーカーとしてプルラン標準品を用いた。

### 2.6 培地成分の分析

培養液中のラクトース濃度は、示差屈折計を検出器とした高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。また、培養液中の乳酸濃度は、電気伝導度検出器を備えた有機酸分析システムを用いて測定した。

## 3 結果と考察

### 3.1 酵母エキスの影響

図 2 は、*L. kefiranofaciens* によるケフィラン生産に対する酵母エキスの添加濃度の影響を示

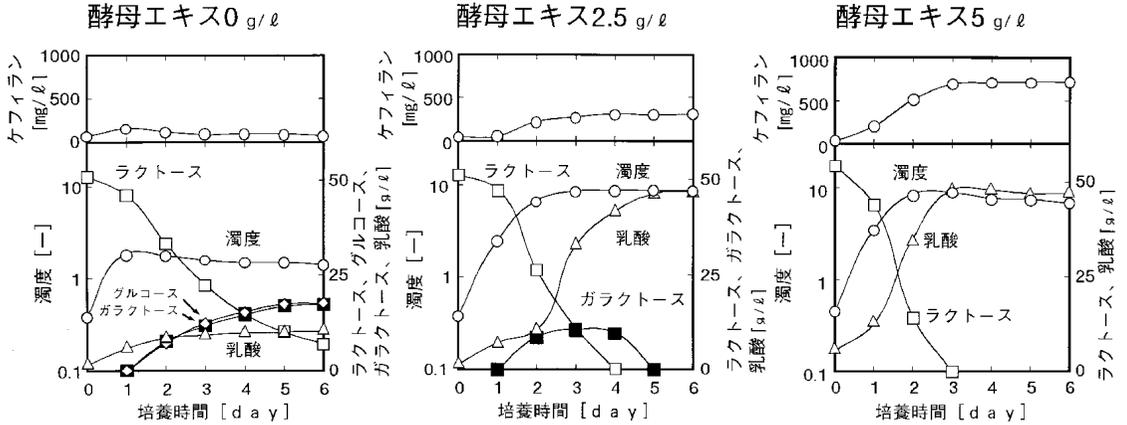


図2 酵母エキスの影響

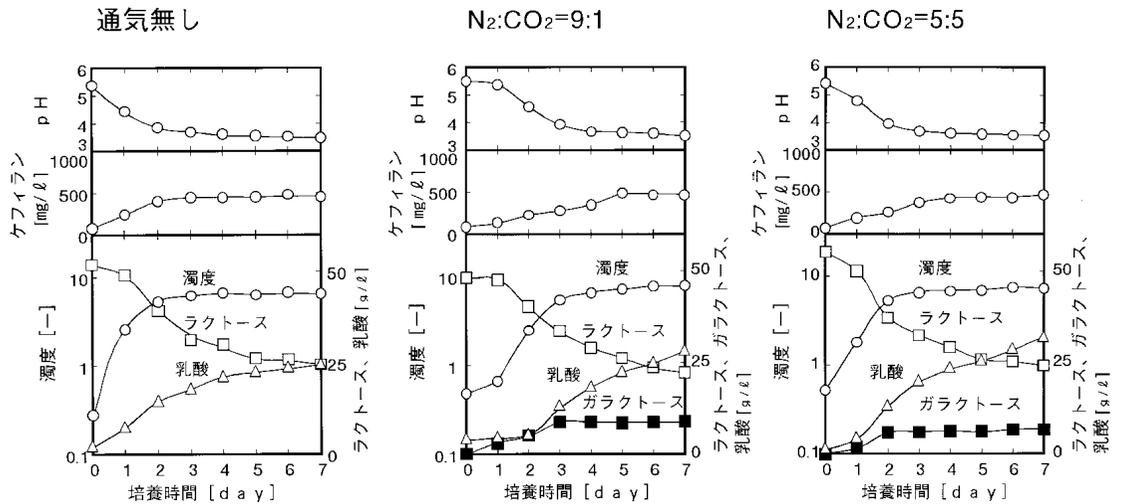


図3 気ガス組成の影響

す。これらの培養において、初期ラクトース濃度は50g/L、通気するガスの組成はN<sub>2</sub>対CO<sub>2</sub>を9対1とし、その混合ガスを0.3vvmになるように気した。またpHは予備的に検討した結果をもとに、ケフィラン生産にとって最適な5.5に設定した。

酵母エキスを添加しない場合には、菌体の増殖が非常に悪く、ケフィランもほとんど生産しなかったが、酵母エキスの添加濃度を増加するにつれて、濁度の値が高くなり、また、ケフィランの生産量も増加した。特に、ケフィラン生産量は酵母

エキスを5g/L添加した場合に、2.5g/Lとした場合に比べて増加した。したがって、5g/L程度の酵母エキスは*L. kefiranofaciens*の増殖とケフィラン生産にとって必要であることが判明した。以下の実験では、酵母エキスを5g/Lとなるように添加してケフィランを生産した。

### 3.2 気ガス組成とpH制御の影響

図3は、*L. kefiranofaciens*によるケフィラン生産に対する気ガス組成の影響を示す。これらの培養において、pHは制御せず、初期ラクトー

ス濃度は 50g/L とした。結果は左から通気をしない場合、 $N_2$  と  $CO_2$  の割合を 9 対 1、および 5 対 5 になるように調節した結果を示す。この図の一番上に示す pH の変化からわかるように、いずれの培養においても pH は培養 3 日目以降 4 以下となり、濁度からわかるように、生育はほとんど停止した。

通気ガス中の  $CO_2$  の割合を増加することによって、ラクトースの分解物であるガラクトースが蓄積し、消費されなかった。一方、最終的なケフィランの生産量は、通気ガス中の  $N_2$  対  $CO_2$  の割合を変えてもほとんど影響を受けなかった。これは、 $CO_2$  はラクトースの代謝に何らかの影響を与えるものの、pH が低下するために生育が停止し、ケフィランの生産量には差がでなかったためと考えられる。

そこで、次に全く同じ培養条件で pH を 5.5 に制御して、ケフィラン生産に対する通気ガス組成の影響を検討した。図 4 は、pH 制御をした培養の結果を示す。いずれの培養においても、pH を制御することによって 50g/L のラクトースは 4 日間で全て消費され、いったん生成したガラクトースもすべて消費された。また、菌体の生育量も増加し、乳酸の生産量も、pH を制御しない場合に比べて約 2 倍に増加した。一方、ケフィラン生産量は、pH を制御しない培養に比べて、 $N_2$  と  $CO_2$

の割合を 9 対 1 とした場合には約 1.4 倍多くなり、ケフィラン生産にとって pH 制御が有効であることがわかった。しかし、ケフィランの生産量はラクトースの消費量に応じて増加せず、消費したラクトース量当たりのケフィラン収率は増加しなかった。

### 3.3 ラクトース濃度の影響

ケフィラン生産に対する炭素源の初期濃度の影響を検討した。図 5 は通気ガスの組成を 9 対 1、pH を 5.5 に制御して、ラクトース濃度を 50、75、および 100g/L として培養した結果を示す。いずれの培養においても、乳酸濃度が 30g/L 以上になると生育はほとんど停止したが、ラクトースは消費され続けた。初期のラクトース濃度が高くなるにつれて、ラクトースをすべて消費するまでに必要な時間は徐々に長くなり、分解産物であるガラクトースとグルコースが培養液中に残存するようになった。一方、ケフィランの生産量は、初期のラクトース濃度が高くなるにつれて増加した。ただし、ラクトースの消費量に応じてケフィランの生産量は増加せず、消費したラクトース量当たりのケフィラン収率は低下した。

たとえば、初期ラクトース濃度を 100g/L とした培養において、ラクトースは 6 日目にすべて消費されたが、ガラクトースとグルコースはそれぞれ

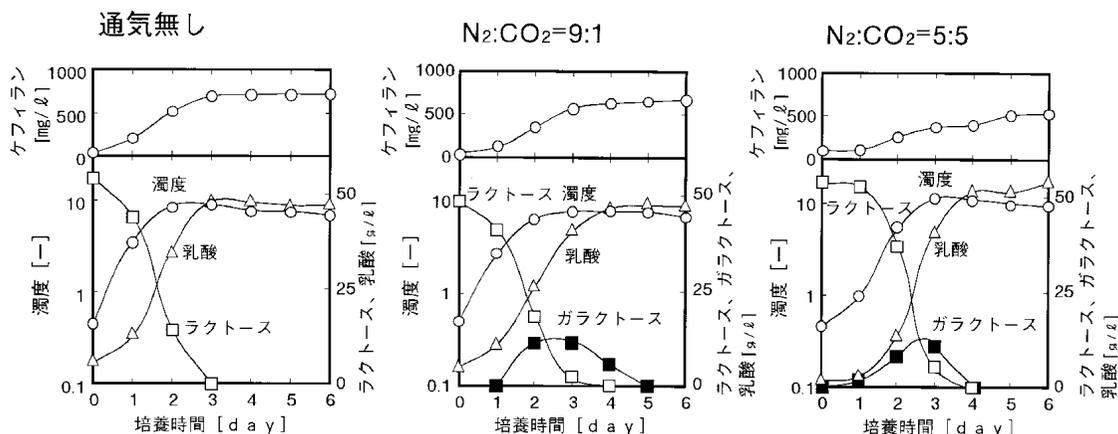


図 4 pH 制御培養における 気ガス組成の影響

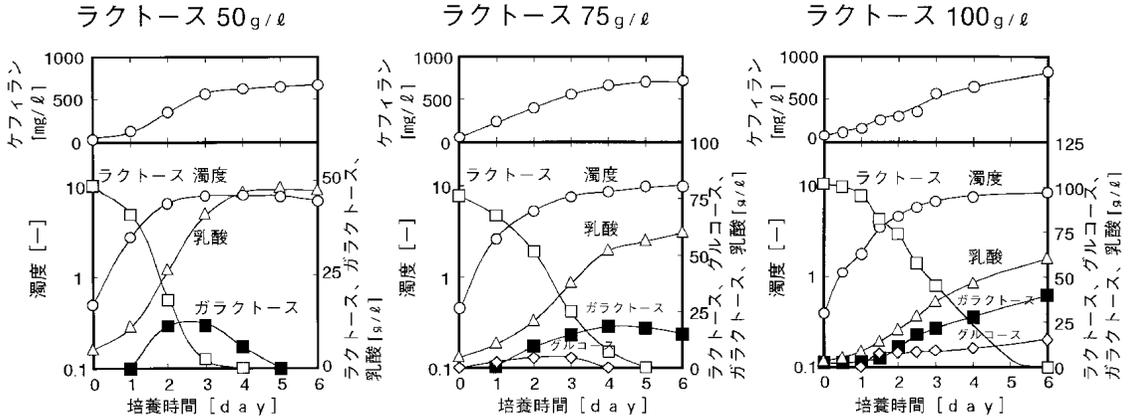


図5 ラクトース濃度の影響

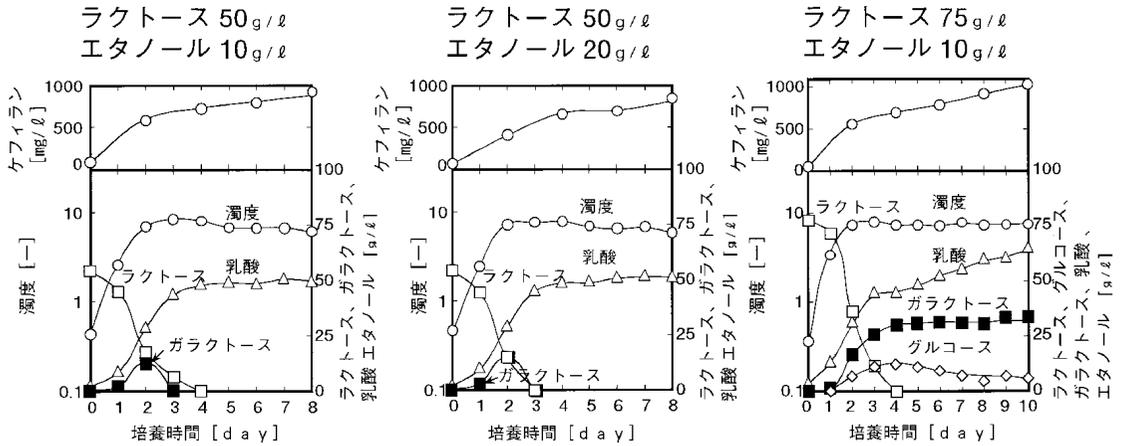


図6 エタノール添加の影響

れ約40と約11g/L残存しており、乳酸の蓄積が糖代謝、およびその結果としてケフィラン生産に影響を及ぼしたと考えられた。

### 3.4 エタノール添加の影響

酵母の存在に関係する第三の因子であるエタノールのケフィラン生産に対する効果について検討した。図6は、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の割合を9対1、pHを5.5に制御した培養における、エタノール添加の影響を示す。初期ラクトース濃度を50g/Lとし、エタノールを10g/Lと20g/Lとなるように添加した。また、初期ラクトース濃度を75g/Lとし、エタノールを10g/Lとなるように添加した。

エタノールを添加して培養した場合と添加しない場合を比較して、ラクトース消費速度、乳酸生成量、生育量に大きな変化はなかったが、ケフィランの生産量は増加した。しかし、添加するエタノール濃度を20g/Lに増加しても、ケフィラン生産は、エタノール濃度を10g/Lにした場合に比べて、増加しなかった。

### 3.5 ケフィラン生産量の比較

図7は、これまで述べてきた各培養における粗ケフィラン生産量を比較した結果を示す。すなわち、ケフィラン生産に対する通気ガス組成、pH制御、初期ラクトース濃度およびエタノール添加

量の影響についてまとめた結果を示す。

pHを制御しない培養において、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の割合を変えても粗ケフィランの生産量に影響しなかったが、同一の通気ガス条件では、pHを5.5に制御した場合に粗ケフィラン生産量は増加した。しかし、二酸化炭素の割合を増加した場合には、pHを制御しても粗ケフィラン生産量はわずかしこ増加しなかった。なお、窒素のみを通気した場合、*L.kefiranofaciens*は増殖できなかった。これらの結果より、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の割合を9対1として通気し、pHを制御することによって、*L.kefiranofaciens*の増殖速度および粗ケフィランの生産量を増加できることがわかった。また、初期ラクトース濃度を50、75、100g/Lと順次増加するにつれて、ケフィランの生産量は、徐々に増加した。また、エタノールを添加すると、初期ラクトース濃度を50g/Lと75g/Lにした培養において、ケフィランの生産量はともに増加した。

以上の結果より、初期ラクトース濃度を増加することによって、およびエタノールを10g/L程度添加することによって、ケフィランの生産を増大できることがわかった。

最終的に、pHを5.5に制御し、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の割合を9対1とした混合ガスを通気し、10g/Lのエタノールを添加することによって、最も多くのケフィランを生産できることがわかった。

### 3.6 ケフィランの部分精製

これまでの、ケフィランを培養液からエタノール

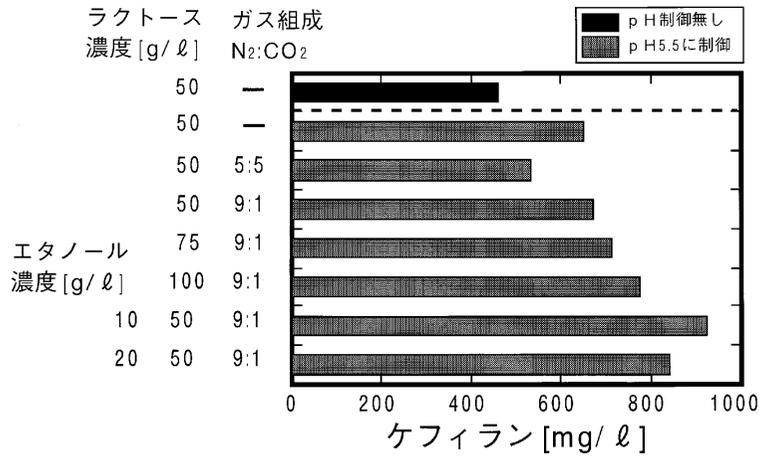


図7 ケフィラン生産の比較

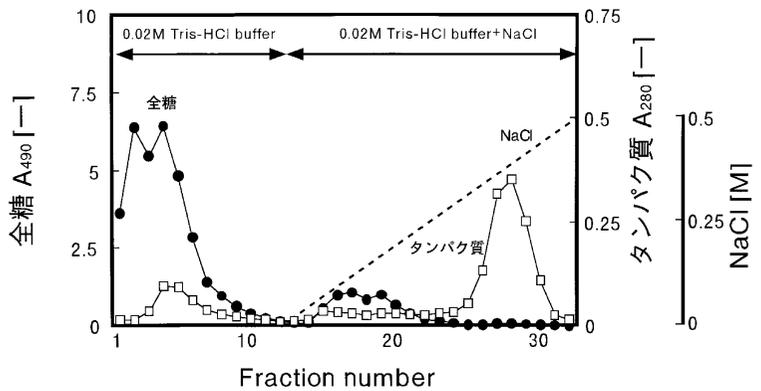


図8 陰イオン交換クロマトグラフィーによるケフィランの精製

ル沈殿によって回収し、フェノール・硫酸法によって求めた全糖量として、ケフィラン生産量を表してきた。しかし、エタノール沈殿によって回収した粗ケフィランには、不純物を含んでいる可能性がある。そこで、つぎにエタノール沈殿によって回収したケフィランの水溶液を陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、さらに部分精製した。図8は、培養して得られた粗ケフィランをDEAE-Toyopearlを用いて、精製した結果を示す。おおよそ8割の全糖は未吸着画分に溶出されたが、低い濃度のNaClを含むフラクションにもわずかに検出された。また、大部分のタンパク質はNaClの濃度が0.4M付近のフラクションに溶出された。ケフィランはグルコースとガラクトー

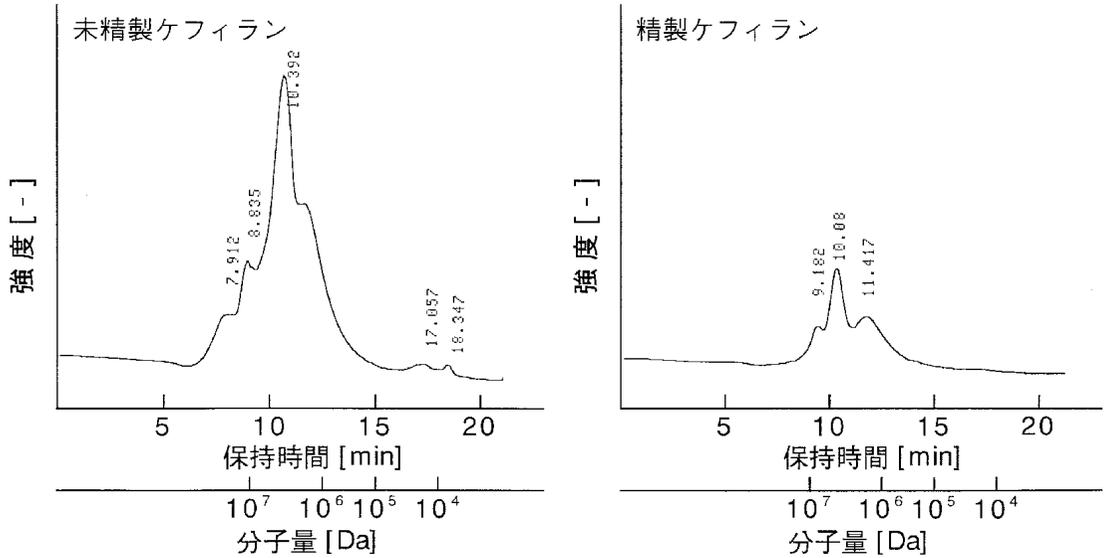


図9 ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子の測定

スからなる中性糖であることから、未吸着画分をエタノール沈殿によって再回収し、部分精製ケフィランとした。また、培養条件を変えても得られる粗ケフィランの成分はほとんど同じであり、このクロマトグラフィーの結果と同じようなプロファイルを示した。

### 3.7 ケフィランの分子量

ゲル濾過クロマトグラフィーによってケフィランの分子量分布を検討した。図9は、エタノール沈殿によって得られたケフィラン水溶液、および陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、再回収されたケフィラン水溶液の分子量分布を示す。

保持時間が約8分の高分子量ピークと17分、18分の低分子量ピークは未精製ケフィランにおいて検出されたが、それらのピークは精製ケフィランでは消失しており、先ほど示したイオン交換クロマトグラフィーによってケフィランがさらに精製されたことを確認できた。また、3つのピークが存在するが、精製ケフィランの分子量はおおよそ数百万であることがわかった。

### 3.8 精製ケフィラン生産量の比較

図10は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって部分精製したケフィランの濃度を比較した結果を示す。部分精製ケフィランは代表的な培養において得られた粗ケフィランから調製した。各培養条件とも、陰イオン交換クロマトグラフィー後、エタノールで再沈殿して得られた部分精製ケフィランの回収率は、55%程度であった。

部分精製ケフィランの量も、粗ケフィランの場合と同じように、pHを5.5に制御し、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の割合を9対1とした混合ガスを気し、10g/Lのエタノールを添加することによって、気もpH制御もしない培養に比べて約1.8倍増加できることがわかった。

## 4 総括

本研究では、ケフィール中の乳酸菌と酵母の相互関係を推定して、乳酸桿菌 *L. kefirifaciens* によるケフィラン生産に対する酵母の存在の影響を検討した。また、得られたケフィランを部分精製し、その分子量を推定した。本研究の結果は、以下のようにまとめられる。

1. 酵母エキスを添加した培地を用いて、混合ガ

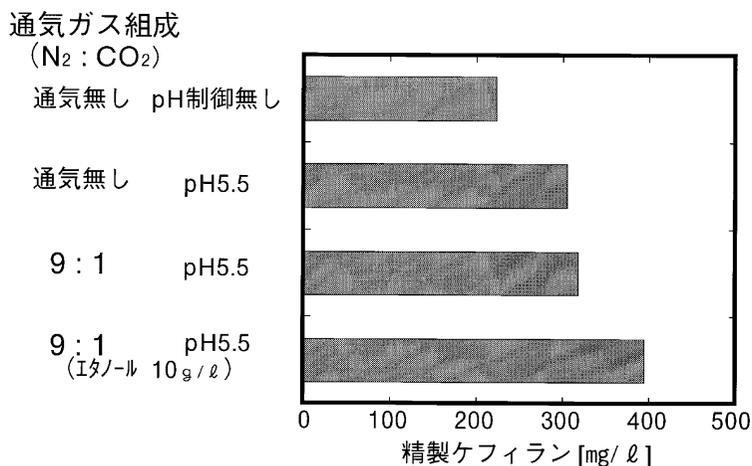


図 10 精製ケフィラン生産の比較

ス (N<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> = 9 : 1) を通気し、pH を 5.5 に制御することによって、*L. kefirifaciens* による粗ケフィランの生産量を増加できた。

- 初期ラクトース濃度を増加することによって、および 10g/L のエタノールを添加することによって、粗ケフィランの生産量を増大できた。
- 陰イオン交換クロマトグラフィーによってケフィランを精製した結果、その分子量は数百万であった。また、精製ケフィランは、粗ケフィランと同じように培養条件を工夫することによって増加できた。

## 謝 辞

本研究をご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に対しまして、厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- 戸羽隆宏：中温性乳酸菌を使った発酵乳、*Japanese Journal of Dairy and Food Science*, 36, 235-244, 1987.
- 戸羽隆宏、足立 達：ケフィール粒の微生物学、*バイオサイエンスとバイオインダストリー*, 47, 383-388, 1989.
- 足立 達、伊藤敏敏、戸羽隆宏、ほか 2 名：乳酸菌の生態、*微生物*, 6, 15-26, 1990.
- 小林 猛、谷口正之：膜型バイオリアクターによる醗酵生産、*化学工学会編*、：バイオリアクター、アイピーシー、東京、1988、139-161 頁。
- Taniguchi M., Nakagawa I., Hoshino K., et al.: Production of Superoxide Dismutase from *Streptococcus lactis* by Using a Bioreactor with a Microfiltration Module. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2447-2453, 1989.
- Hoshino K., Taniguchi M., Marumoto H., et al.: Continuous Lactic Acid Production from Raw Starch in a Fermentation System Using a Reversibly Soluble-Autoprecipitating Amylase and Immobilized cells of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 479-485, 1991.
- Taniguchi M., Hoshino K., Ito T., et al.: Production of Superoxide Dismutase in *Streptococcus lactis* by a Combination of Use of Hyperbaric Oxygen and Fermentation with Cross-Flow Filtration. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 886-890, 1992.
- Taniguchi M., Hoshino K., Urasaki H., et al.: Continuous Production of an Antibiotic Polypeptide (Nisin) Using a Bioreactor Coupled to a Microfiltration Module. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 704-708, 1994.