

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	中谷 友樹
論文題目	Functional analysis of lactic acid bacteria for efficient γ -aminobutyric acid production from processed tomato products (トマト加工品からの効率的な γ -アミノ酪酸生産に向けた乳酸菌の機能解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>γ-アミノ酪酸 (GABA) は降圧作用、抗不安作用等の様々な生理機能を有することから、サプリメント等の健康食品に利用されている。GABAは、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) によりL-グルタミン酸 (L-Glu) から生成されることが報告されている。これまでの乳酸菌によるGABA生産に関する研究では、合成培地等にグルタミン酸ナトリウム (MSG) を添加してGABAを発酵生産させる手法が主に検討されてきたが、食品に不適な培地成分を除去することに伴う生産コストの増大が問題となっていた。一方、トマトは農産物の中でもL-Gluを多く含むことが知られている。そこで、食品用途としても利用可能で精製工程も不要となるトマト加工品を原料としたGABAの発酵生産手法が検討されてきた。ところが、加熱濃縮の工程を経るトマト加工品には、乳酸菌によるGABA産生を阻害する化合物が含まれていること、ならびに、既存の乳酸菌を用いる際には、食品にとって好ましくない香味を付与するジアセチル等が副成することが問題となっていた。これらの課題を克服するためには、トマト加工品から効率よくGABAを生産し、かつ、ジアセチルの生成が少ない乳酸菌を見出すこと、さらに、高濃度のトマト加工品による阻害を回避し短時間にGABAを生産する手法を確立することが求められていた。</p> <p>本研究では、GABA高生産乳酸菌を選抜し、発酵法によるトマト加工品からのGABA生産手法の最適化を試みた。さらに、当該菌が有する2つのGADアイソザイムの生化学的な特徴を明らかにし、洗浄菌体を触媒として用いる酵素法にて、より高濃度のトマト加工品からGABAを効率的に生産できる手法を検討した。</p> <p>第一章では、トマト加工品からGABAを生産できる乳酸菌の探索と発酵生産条件の最適化を試みた。漬物から単離した10菌種、74株の乳酸菌を対象に、トマト加工品からのGABA生産を検討した結果、GABAを著量生産する<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> KB1253を見いだした。既報の乳酸菌では、トマト加工品を原料とした場合のGABA変換率は70%未満であったが、本菌は、トマト加工品 (5°Bx (トマト加工品の濃縮度の指標)) から93.2%の変換率でGABAを発酵生産することが可能であった。加えて本菌は、検討した菌株中、最もジアセチル生産性が低かった。本菌は2種類のGAD遺伝子 (<i>gadB₁</i>及び<i>gadB₂</i>) を有し、その発現は培養時のpHが3.0-4.0の際に顕著であった。また、休止菌体を用いたGAD反応の最適反応pHは3.0-4.5であった。一方、本菌は、20°Bxまでのトマト加工品において、培養24時間で定常期に達する増殖を示したが、25°Bxを超えるトマト加工品においては増殖できなかった。そこで、pH 4.0-5.0に調整した20°Bxのトマト加工品を原料として、GABAの発酵生産を試みたところ、初期pHが低くなるにつれて増殖は緩やかになるものの、いずれのpHにおいても培養24時間で</p>			

定常期に達し、その際の培養液のpHが4.0となることが観察された。特に、初期pH 4.0の発酵においては、対数増殖期にGADが顕著に発現し、その後、定常期において効率的にGABAが生産されることが見いだされた。以上の結果に基づき、20°Bx、初期pH 4.0に調整したトマト加工品を用い、35 °Cで24時間培養することにより、トマト加工品に含まれる46.8 mMのL-Gluから変換率87.6%にて41.0 mM のGABAを発酵生産することができた。

第二章では、*L. plantarum* KB1253が有する2つのGADアイソザイムの諸性質を解明した。*L. plantarum* KB1253は、これまで困難であった高濃度トマト加工品からの効率的なGABA発酵生産が可能な乳酸菌である。また、GABA生成に関与する2つの遺伝子(*gadB₁*及び*gadB₂*)を保持している点でも、同種の*L. plantarum*他菌株とは異なるユニークな特徴を有している。両遺伝子がそれぞれコードするGadB₁及びGadB₂の生化学的特性を評価したところ、GadB₁については、2量体を形成すること、活性発現に反応液へのPLPの添加を必要とすること、活性はpH 4.0、60 °Cで最大となることが明らかとなった。GadB₂については、4量体を形成すること、PLPを反応系に添加せずとも活性を発現すること、pH 4.5、50 °Cで最大活性を示すことを明らかにした。

第三章では、*L. plantarum* KB1253の洗浄菌体を利用した高濃縮トマト加工品からのGABA生産を試みた。発酵法は、微生物の増殖を阻害しない程度にトマト加工品の濃度を制限せざるを得ないという点と、GABA生成に24時間程度の時間を要するという欠点があった。そこで本菌の洗浄菌体を用いる酵素法について、増殖が困難な25°Bx以上の高濃度トマト加工品からGABAを短時間で効率的に生産する手法を検討した。その過程で、トマト加工品にGADとPLPの相互作用を阻害する化合物が含まれており、効率的なGABA生産にはPLPの添加が必要なこと、一方、高濃度の洗浄菌体の導入によりPLP添加と同様の効果が得られることを見いだした。この知見に基づきトマト加工品濃度と洗浄菌体濃度を最適化することにより、高濃度トマト加工品によるGABA生成阻害を軽減し、短時間でのGABA生産を実現した。結果、本菌の洗浄菌体150 g/Lをトマト加工品(40°Bx、pH 4.0)中にて、45 °Cで30分間インキュベーションすることで、PLPを添加することなくトマト加工品中のL-Gluを変換し、GABA濃度を初期含量から82.5 mM増大させるプロセスの構築に成功した(対L-Glu変換率97.7%)。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

降圧作用、抗不安作用等の様々な生理機能を有するGABAが注目されており、食品産業において広く利用可能なGABA富化素材の生産手法の確立が求められている。本論文は、これまで困難であった高濃度トマト加工品からのGABA生産を実現すべく、食品由来のGABA高生産乳酸菌を見だし、当該菌株を特徴づける遺伝学的、酵素学的諸性質を解明するとともに、得られた知見に基づき、効率的なGABA生産手法を確立したものである。評価すべき点として、以下の3点があげられる。

1. GABA高生産乳酸菌として*Lactiplantibacillus plantarum* KB1253を見だすとともに、当該菌株が有するGABA生成に関与する遺伝子等の解析結果に基づき、これまで効率的なGABA生産が困難であったトマト加工品を用いてGABAを効率的に発酵生産する培養条件を確立した。すなわち、酵素発現条件ならびに培養pHの最適化により、トマト加工品に含まれる46.8 mMのL-Gluから変換率87.6%にて41.0 mMのGABAを発酵生産することができた。
2. *L. plantarum* KB1253が、同種乳酸菌では例外的に2種類のGADアイソザイムを有することを見だし、それらの諸性質を解明した。すなわち2つのアイソザイムGadB₁及びGadB₂の至適反応条件の差異を明らかにするとともに、各酵素においてPLPとの相互作用の強度が異なること、特に、GadB₂が高いPLP親和性を示すことを見だした。
3. 発酵法の問題点を解決すべく高濃度処理が可能な酵素法の開発に取り組み、トマト加工品にGADとPLPの相互作用を阻害する化合物が含まれていること、高濃度の洗浄菌体の導入によりその阻害が軽減されることを見だした。*L. plantarum* KB1253の洗浄菌体を利用する酵素法の最適化により、高濃度トマト加工品に含まれるL-Gluを変換し、GABA濃度を初期含量から82.5 mM増大させるプロセスの構築に成功した(対L-Glu変換率97.7%)。

以上のように、本論文は、新規に見だしたGABA高生産乳酸菌*L. plantarum* KB1253の遺伝学的・酵素学的特徴や培養特性の解析、トマト加工品によるGABA生成阻害の解析を通して、高濃度トマト加工品からの実用的GABA生産の可能性を示したものであり、発酵生理学、応用微生物学、応用生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和5年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降(学位授与日から3ヶ月以内)