

氏名	小林 美水
授与学位	博士(工学)
学位記番号	博乙第41号
学位授与年月日	令和6年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	機械学習を適用した乳酸菌培養におけるアミノ酸組成最適化と重要アミノ酸の効果の解析
論文審査委員	主査 教授 小 西 正 朗 教授 齋 藤 徹 教授 佐 藤 利 次 准教授 邱 泰 瑛 准教授 陽 川 憲 教授 八久保 晶 弘

学位論文内容の要旨

乳酸菌は代表的なプロバイオティクスであり、ヘルスケア関連の用途開発の期待が高いが、培養においては栄養要求性の複雑さが課題となる。特に、乳酸菌はアミノ酸生合成に関わる遺伝子の多くを喪失しているため、多種のアミノ酸を培地に供給する必要がある。これまでに多くの乳酸菌に対して増殖の必須成分が調査されてきたが、これらは単一成分に対する効果の観察による実験的探索に則った調査であり、増殖に必須ではないが、新規合成のみでは十分ではない栄養素の最適濃度について考慮されていない。増殖に適したアミノ酸組成の検討のためには、成分相互作用を考慮して検証する必要があるが、アミノ酸20種の適正な組成の検討は実験的探索では困難である。

本研究は、乳酸菌 *Limosilactobacillus fermentum* をモデル菌とし、培地最適化による菌体生産の効率化及びアミノ酸組成の変化に対する増殖挙動を調査することを目的とした。

各アミノ酸濃度を4水準設定し、 L_{64} 直交表を用いて実験配置したアミノ酸溶液を加えた完全合成培地を用いて、*L. fermentum* をマイクロプレートで培養した。8時間後の OD_{600} は最小値 0.214 ± 0.039 、最大値 0.842 ± 0.013 となり、アミノ酸組成の変化により最大で3.9倍の差が認められた。アミノ酸組成を説明変数、 OD_{600} を目的変数としたDNNモデルを構築すると、モデルの学習データ、検証データの予測値に関する決定係数は $R^2_{train} = 0.989$ 、 $R^2_{test} = 0.992$ 、二乗和誤差は $MSE_{train} = 0.309 \times 10^{-3}$ 、 $MSE_{test} = 0.246 \times 10^{-3}$ のモデルが得られた。さらに、学習モデルの最適値をベイズ最適化(DNN-BO)により適正培地組成を推測し、予測培地は検証培養すると、全てのアミノ酸を最大濃度で配合した培地と比較し、最大48%のアミノ酸を削減した上で同等の増殖性を示したことにより、本手法を用いて菌体生産コスト削減の可能性が示唆された。

当該菌のアミノ酸要求調査の結果、DNN-BOにより見出された重要アミノ酸成分の内、Thrは必須アミノ酸、Tyrは増殖刺激性アミノ酸、Asn、Asp、Thr、Tyr、Lys、Gln、Pro、Serは非必須アミノ酸であった。DNN-BOは、増殖に必須ではないが増殖を促進する重要成分の適した濃度を予測できることが示唆された。重要アミノ酸が微生物増殖に与える影響を検証すると、Gln欠乏の影響はその他のアミノ酸組成によって変化し、その抑制効果はPro、Ser欠乏によってさらに強調された。単一アミノ酸を高濃度添加し培養すると、Asnの添加のみ有意に増殖を阻害した。これらの結果から、乳酸菌高密度培養のためには最適なアミノ酸比率探索の必要があることが示唆された。乳酸菌 *L. fermentum* は培地中の複数アミノ酸が増殖に対して相互作用(相乗効果)を示すことを明らかにし、その培養特性を理解するうえで本手法の有用性が示された。本手法は乳酸菌の培地を迅速に最適化し、培地中の遊離アミノ酸が増殖挙動に与える影響を評価検証する手法として期待される。

審査結果の要旨

栄養要求性が高い乳酸菌の増殖に適した培地を設計する手法が確立されていないため、乳酸菌の工業培養にはロット間の組成の変動が大きい天然成分を主体とする培地が多用され、効率の不安定化を招くことが課題であった。本論文はこの課題を解決するため、少量多検体培養による培養データの効率的な取得ならびに深層学習およびベイズ最適化を組合せた新しい培地最適化手法を乳酸菌の合成培地設計について提案した。プロバイオティクス作用など様々な生理活性が報告されている *Limosilactobacillus fermentum* について、既知の乳酸菌合成培地に加えるアミノ酸組成を最適化した。提案された方法により天然培地に迫る性能をもつ合成培地を設計できた。さらには、アミノ酸同士が相互作用を示し、合成代謝経路上で関連性が高いアミノ酸同士が生合成を補完し合っていることを明らかにした。

申請者は本論文で乳酸菌を良好に増殖させることができる合成培地の新規設計手法を提案しており、発酵関連技術の発展に資する成果が得られていると判断できた。したがって、申請者は博士(工学)の学位を授与される資格があるものと認められる。