

## 自然環境下以外からの高温乳酸菌の分離の試みと利用方法の一考察

鹿児島高専 正 ○山田真義, 学 黒田恭平, 学 上瀧口知世, 正 山内正仁  
長岡技術科学大学 正 山口隆司  
鹿児島大学 八木士郎

### 1. はじめに

乳酸菌 (lactic acid bacteria) は乳酸を多量に作る細菌を意味し、慣用的な呼び名であって、分類学上の呼び方ではない。乳酸菌の定義としては、細胞はグラム陽性、細胞形態は桿菌または球菌、カタラーゼ反応は陰性を示し、消費したブドウ糖に対し、50%以上の乳酸を産生し、内生孢子を形成せず運動性をほとんど示さないものを乳酸菌と位置づけている<sup>1)</sup>。乳酸菌もヒトと同様に、複雑な栄養要求性を示す<sup>1)</sup>。エネルギーとなる糖成分 (glucose など発酵性の糖類)、菌体成分構築のためのアミノ酸類、生育因子のビタミン類やミネラル類を必須とする。さらに一部の乳酸菌では脂肪酸 (オレイン酸であることが多い) を要求することがある<sup>1)</sup>。このように、乳酸菌が生育するには栄養成分が一様に整った環境を必要とする。

現在、廃水処理において用いられているメタン発酵槽では処理状況に応じて乳酸が生成されるという事例がある<sup>2)</sup>。また、廃水の種類によっても反応器内に乳酸が検出されることがある。これらのことから、メタン発酵槽内に乳酸菌が生息している可能性が考えられる。また、現在知られている乳酸菌のほとんどが中温性の菌であり、高温に耐えうる乳酸菌の種類はあまり見つかっていない。高温菌のメリットとしては、飼料の作製において、発酵をより早く行うことができることと、他の雑菌の生育を抑制できるということが考えられる。

そこで本研究では、高温条件下 (55°C) で焼酎粕原液を処理しているメタン発酵槽の嫌気性汚泥および焼酎粕原液から高温乳酸菌の分離を試み、分離した菌の有効利用の方法について考察した。

### 2. 実験方法

高温メタン発酵槽から高温乳酸菌の分離を試みるにあたって、55°Cの高温域で焼酎粕を処理している RABR (Reversible-flow Anaerobic Baffled Reactor) の嫌気性汚泥および原水である焼酎粕原液をサンプリングして用いた。分離培地は乳酸菌の要求栄養分を豊富に含んでいる MRS 培地を用いた。MRS 培地をそのままの組成で用いた固形培地と、寒天を取り除いてつくった液体培地の二通りの方法で高温乳酸菌の分離を試みた。固形培地では生理食塩水で希釈した RABR の嫌気性汚泥および焼酎粕を植菌し、液体培地では固形培地で出現したコロニーをそれぞれ植菌した。器具や培地はオートクレーブで121°Cで20分間滅菌処理し、植菌などの作業はクリーンベンチ内で行った。培養は、固形培地では30°C~55°C、液体培地では30~50°Cで培養した。植菌後は培地の色の変化や、出現した菌の様子を顕微鏡で観察した。寒天培地と N<sub>2</sub> パージを行った液体培地を用いて菌の単離を試みた。

単離した菌を同定するために分析を行った。分析項目としては、菌の生育状態を見るために時間ごとにコロニーカウント法による菌数測定、イオンクロマトグラフによる有機酸分析装置での乳酸量測定、フェノール-硫酸法による吸光度での糖量測定、ポータブル pH 計により pH を測定した。また、菌の特徴を調べるために形態的・生理学的手法を用いて、乳酸生成の有無、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、運動性試験、ガス発生の有無、形状観察、大腸菌検査、発酵形態の調査を行った。

菌の49種類の糖の発酵を調査し、菌種を簡易同定することができるアピ50を行い、菌の同定を行った。次に、分子生物学的手法を用いて12%グリセリン溶液中に菌を浸し、-80°Cで凍結保存したサンプルからDNAをビーズビーディング法で抽出してPCR法を用いてDNAを増幅させ、シーケンサーで16S rRNAを遺伝子解析し、菌種の同定を行った。

また菌種の同定後、菌の特徴からどのような有効利用の方法があるかを考察した。

### 3. 実験結果

RABRの嫌気性汚泥および焼酎粕から高温乳酸菌の分離を試みた結果、固形MRS培地では24~72時間後に、嫌気性汚泥では50°C、焼酎粕では30°Cで培地の表面に白いコロニーを形成した。また液体MRS培地では、24時間後には培地の底が白濁していた。培養を繰り返すことで、嫌気性汚泥から1種類、焼酎粕から5種類の菌を単離した。本研究では高温乳酸菌の分離を目的としていたことから、50°Cで生育した菌を中心に以下の内容を述べる。

MRS培地の白濁した部分を顕微鏡で観察してみると、RABRの嫌気性汚泥および焼酎粕から分離した培地のすべてに桿状

キーワード：高温乳酸菌、分離、メタン発酵槽、焼酎粕

〒899-5193 鹿児島県霧島市隼人町真孝1460-1 鹿児島高専 都市環境デザイン工学科 Tel.0995-42-9123

の菌が見られた。時間ごとに RABR の嫌気性汚泥から分離した菌の生育状態を分析した結果、菌数においては 50°C の条件が一番多く生えていた。しかし、30、40°C においても増殖までの時間はかかるが同程度の菌の生育はしていた。この結果は pH、乳酸生成量、糖量にも同じことが言える。これらのことから、分離した菌は生育温度が 30~50°C のときが一番適していると考えられ、特に 50°C では菌数の伸びや乳酸の生成で一番高い能力を発揮している。

RABR の嫌気性汚泥から分離した 1 種類の菌および焼酎粕原液から分離した 5 種類の菌の特徴を調査した結果、分離した菌はほとんど乳酸菌と同じ特徴を示していた。しかし、嫌気性汚泥から分離した菌はカタラーゼ陽性であることと、運動性試験で陽性反応が出たことから乳酸菌であるとは完全に断定できなかった。アピ 50 を行った結果、菌自体はきちんと乳酸菌と同じような発酵をしたが、結果をアピ 50 のデータベースに打ち込んだところ、アピ 50 のデータベースが少ないためにすべての菌において相同性が低くなった。このことより、信頼性が低いことから、さらなる同定が必要と考え、16S rRNA の遺伝子解析を行った。分離したすべての菌の特徴および同定の結果をまとめて表-1 に示す。この 16S レベルの結果により嫌気性汚泥から分離した高温菌は、*Bacillus coagulans* であることが分かった。ここで、*Bacillus coagulans* と *Bacillus*, *Lactobacillus* を比較したものを表-2 に示す。この表を見ると、分析結果と同じような結果になっていることから分離した菌は *Bacillus coagulans* であったと言える。

表-1 分離した菌の特徴および同定結果

	嫌気性汚泥	焼酎粕1	焼酎粕2	焼酎粕3	焼酎粕4	焼酎粕5	乳酸菌	大腸菌
乳酸発生	+	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	+	-	-	-	-	-	-	+
オキシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	+
運動性	+	-	-	-	-	-	+/-	+/-
ガス発生	-	-	-	-	-	-	+/-	+
形状	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌又は球菌	桿菌
大腸菌検査	-	-	-	-	-	-	-	+
発酵形態	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ/ヘテロ	第三発酵式
菌種同定結果	<i>B. coagulans</i>	<i>Lb. zeae</i>	<i>Lb. manihotivorans</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. manihotivorans</i>	<i>Lb. manihotivorans</i>	-	-
相同性(%)	100	100	97.2	100	97.2	97.2	-	-

嫌気性汚泥から分離した菌は *Bacillus coagulans* という芽胞を形成し、高温で生存し乳酸を多量に産出する菌であることから、サイレージなどの家畜の飼料やコンポストなどの肥料作製に適用できると考えられる。高温で生育できるというメリットから前述したような試料や肥料作製の高速化および従来使われている中温菌よりも高い雑菌抑制効果が期待できると考えられる。*Bacillus coagulans* は分離されたことのある既存菌だが、発酵させるものの組み合わせによって今ある発酵物よりもさらに良いものをつくるのが可能だと考えられるので、今後検討を行っていく予定である。

4. おわりに

高温メタン発酵槽から高温性の乳酸菌と同程度の能力を有する *Bacillus coagulans* および 3 種類の乳酸菌の分離に成功した。今後は、この *Bacillus coagulans* の処理性能に応じた生態を調査してどのような影響をメタン発酵槽内に与えているのかを調査していく予定である。また、この分離した菌以外にどのような菌がメタン発酵槽の処理状況に応じて変動しているかを調査することで、RABR の菌叢を解析していきたいと考えている。

高温菌のメリットは先に述べた通りだが、この分離した *Bacillus coagulans* をただ分離しただけでなく、家畜の飼料や肥料の作製などを試み、有効利用方法について実際に製品化が可能か検討を行う。

参考文献

1) 乳酸菌研究集団会, 乳酸菌の科学と技術。  
 2) 賀澤拓也ら (2008), 食品廃棄物を対象とした中温無加水メタン発酵技術の開発, 第26回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会論文集, p336-337。  
 3) E De Vecchi, and L Drago (2006), LACTOBACILLUS SPOROGENES OR BACILLUS COAGULANS: MISIDENTIFICATION OR MISLABELLING?, International Journal of Probiotics and Prebiotics Vol. 1, No. 1, pp. 3-10.

表-2 *Bacillus coagulans* と *Bacillus*, *Lactobacillus* の特徴の比較<sup>3)</sup>

Property	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Catalase	+	+	-
Oxidase	-	+	-
Nitrate reduction	-	+	-
Spores	+	+	-
Motility	+	+	±
Production of lactic acid	+	-	+
Meso-diaminopimelic acid	+	+	±