

甘藷焼酎蒸留粕からの高温乳酸菌の分離の試みと特性評価

長岡技術科学大学 (学) ○黒田恭平, (正) 山口隆司
 鹿児島工業高等専門学校 (正) 山田真義, (正) 山内正仁
 阿南工業高等専門学校 (正) 川上周司
 鹿児島大学 八木史郎

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する慣用的な呼び名でありその定義としては、グラム陽性の桿菌または球菌で、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とされている¹⁾。現在乳酸菌は、発酵食品、飼料、ポリ乳酸 (PLA) など様々なものの生産に利用されており、有用微生物として注目されている。

現在、鹿児島では焼酎生産量の増加により焼酎製造過程で大量に発生する焼酎粕の処理の問題が生じている。焼酎粕は栄養価が高く、糖分が多量に含まれていることから乳酸菌が生育するのに十分適していると考えられる。また、焼酎のもろみ中には乳酸菌が存在していることから蒸留直後の焼酎粕には高温で生育できる乳酸菌が存在する可能性が考えられる。高温乳酸菌は、中温菌と比べて生育が早く、乳酸発酵を腐敗菌が増殖する前に行うことができることと、焼酎粕排出直後の熱を利用して発酵させることができるために、現場で利用しやすいというメリットがあげられる。

そこで、本研究では高温乳酸菌に注目し、焼酎粕および焼酎粕原液を処理しているメタン発酵槽の嫌気性汚泥から、高温乳酸菌の分離を行い、分離できた菌株について発酵特性や生理学的特長の評価を行った。

2. 実験方法

2.1 高温乳酸菌の分離方法

焼酎蒸留粕から高温乳酸菌の分離を行うため O 酒造から排出されたフレッシュな焼酎粕、外気で数日保管していた焼酎粕および、55℃の高温域で焼酎粕原液を処理している RABR (Reversible-flow Anaerobic Baffled Reactor) の底の部分の嫌気性汚泥を用いた。また K 酒造から排出されたばかりの焼酎粕および焼酎粕貯留タンクの壁面に付着している焼酎粕も用いて分離を試みた。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 (表-1) を用いた。培地の調整では、他の雑菌の生育を抑制するためにシクロヘキシミドを 10 mg/L になるように培地に添加し、寒天平板法では酸生成菌を見分けるために CaCO₃ を培地に添加して培養を行った。高温乳酸菌の分離を試みるにあたり、以下に示す 3 つの方法で行った。1) 最初に試料を希釈したものを N₂ パージによるガス置換を行った MRS 培地で集積培養し、集積培養した菌を乳酸菌実験マニュアル²⁾に準じて混釈法による寒天平板作製法により単離を試みる。2) N₂ パージによるガス置換を行った MRS 培地で集積培養を繰り返す。3) ロールチューブ法を用いてコロニーをピックアップする。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。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。

分離株の塩基配列を解析するために DNA 解析を行った。DNA 抽出はビーズビーダーで細胞壁を破碎し、不純物を取り除いて DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子を標的として PCR を行った。PCR で増幅させた DNA を精製し、その後、キットを用いてクローニングを行い、塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列を用いて NCBI の Blast によって菌種の同定を行った。

2.2 発酵特性評価方法

分離株の生理学的特長を評価するために乳酸菌実験マニュアル²⁾に準じてカタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、運動性試験、ガス発生試験、発酵形態の調査を行った。乳酸の測定はイオンクロマトグラフにより行い、糖濃度の測定はフェノール-硫酸法によって行った。乳酸の生成を確認後、生成された乳酸異性体について分析を行った。乳酸異性体の分析は、Okubo ら³⁾の分析方法に準じて HPLC で測定を行った。

分離した菌の経時的な乳酸発酵能力を測定するために、培地中の乳酸濃度、pH、糖濃度を菌の増殖終了まで測定した。基質には MRS 培地を 7 mL 用意し、植菌は 0.1 mL で分析を行った。また、49 種類の炭水化物の発酵能力を調査し、菌種を簡易同定す

表-1 MRS 培地組成

Yeast Extract	5.0 g
Beef Extract	10.0 g
Manganese(II) sulfate	0.05 g
TWEEN 80	1.0 g
glucose	20.0 g
Sodium Acetate	5.0 g
Bacto Peptone	10.0 g
Potassium Dihydrogen phosphate	2.0 g
Ammonium Citrate	2.0 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Agar	15.0 g
D.W.	1 L

キーワード：高温乳酸菌、メタン発酵槽、焼酎蒸留粕

〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学大学院 環境システム工学専攻 Tel.0258-47-1611 (6646)

ることができる Api50 CH (BIOMERIEUX) を用いて発酵試験を行った。培地は Api50 CHL と Api50 CHB/CHE を用いた。

3. 実験結果

3.1 高温乳酸菌の分離結果

O 酒造および K 酒造の焼酎蒸留粕, RABR の嫌気性汚泥から高温乳酸菌の培養を行った結果, 寒天平板法およびロールチューブ法では培養 2 日で培地にコロニーを形成した。集積培養法においては, 1 日後に菌の増殖が確認できた。そこで高温乳酸菌の分離を試みた結果, 全条件において菌を分離することに成功した。

分離した菌株を顕微鏡で観察した結果,

すべての分離株は桿状の菌であった。しかし条件が異なる培地ごとに桿菌の形, 大きさは異なっていた。

分離した菌の塩基配列の解析を行った結果, 分離株は表-2に示すように *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. zeae*, *L. casei*, *L. manihotivorans*, *Bacillus coagulans*, *L. amylolyticus*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *T. aotearoense* であると同定できた。

3.2 発酵特性評価結果

分離した菌の糖の発酵特性を評価した結果, 分離した菌はすべてホモ乳酸発酵していることが分かった。また, OSO 株, OKC 株, および KW 株は, 他の分離株と異なりカタラーゼ陽性, 運動性陽性であった。*B. coagulans* はカタラーゼ陽性, 運動性陽性, 芽胞を形成するなどの性質を示すことが報告されており⁴⁾, この生理学的特長からも遺伝子解析による同定結果は信頼性が高いと考えられた。

分離株の乳酸発酵特性について調査を行った結果, *B. coagulans* と同定した分離株の産生した乳酸は, ほぼすべてが L-乳酸であった。また, 中温性 *Lactobacillus* 属と同定した分離株は産生した乳酸のうち, L-乳酸が 80%以上を占め, D-乳酸の割合は少量であった。高温性の *Lactobacillus* 属である KL 株は DL-乳酸を産生する菌であったが, OSF 株は D-乳酸が 93.6%と非常に高い割合を占めていることから, D-乳酸産生菌であると考えられた。これらの結果を基に生成した乳酸のうち同じ乳酸異性体を 80%以上産生しているという基準で分類すると, L-乳酸産生型が OSO 株, OKC 株, KW 株, KS1 株, KS2 株, KS3 株, D-乳酸型が OSF 株, DL-乳酸型が KL 株であると考えられた。

分離株を植種した MRS 培地中の乳酸濃度, 糖濃度, pH を経時的に調査した結果, 50℃の温度条件で生息する分離株は比較的早い時間で乳酸の生成が律速になっていた。また, 高温性 *Lactobacillus* 属の分離株については培地の pH を 4.0 以下まで低下させ, 乳酸の生成量は OSF 株において 14 g/L, KL 株において 16 g/L 以上であった。OSO 株, OKC 株, KW 株においては, pH が 4.4 程度, 乳酸濃度が 6~11 g/L 程度までしか増加しなかった。これは *B. coagulans* が乳酸の生成による pH の低下から菌体を守るために芽胞を形成し, 乳酸発酵を休止したことが原因として考えられた。中温性 *Lactobacillus* 属の分離株は pH を 3.7 程度まで低下させ, 16 g/L 以上の乳酸を生成していた。

Api50 CH による糖類発酵試験を行ったところ, ほとんどの分離株が多種類の糖類を乳酸に変換していた。OSO 株, OKC 株, KW 株の糖の資化性が多少の差異はあるが似たような結果となった。また, OSF 株における糖の資化能力が他の分離株と比較して低いという結果がみられた。これは, OSF 株が特異的な環境でしか生息できない菌種である可能性が示唆された。

4. おわりに

O 酒造および K 酒造の焼酎蒸留粕, RABR の嫌気性汚泥から高温性の乳酸菌と同程度の能力を有する *B. coagulans* および 5 種類の高温および中温性乳酸菌の分離に成功した。分離株の乳酸発酵特性の評価を行ったところ, L-乳酸産生型が OSO 株, OKC 株, KW 株, KS1 株, KS2 株, KS3 株, D-乳酸型が OSF 株, DL-乳酸型が KL 株であることが分かった。

分離株の経時的乳酸生成能力を調査した結果, *Lactobacillus* 属の分離株は乳酸濃度 10 g/L 以上, pH を 4.0 以下まで低下させた。また, 高温性の分離株は中温性の分離株と比較して比較的早い時間で乳酸の生成が律速になっていた。

謝辞

本研究は, 平成 22 年度環境省循環型社会形成推進科学研究費補助金 (課題番号 K22046, 代表: 山内正仁) の交付を受けて実施した。ここに記して感謝の意を表する。

参考文献

1) 乳酸菌研究集談会 編, 1996, 乳酸菌の科学と技術, 学会出版センター。 2) 小崎道雄 (監修), 1992, 乳酸菌実験マニュアル—分離から同定まで—, 朝倉書店。 3) Shigeno Okubo et al., 2000, *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY*, 14, 474-477。 4) E De Vecchi, and L Drago, 2006, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1, 1, 3-10。

表-2 分離条件および遺伝子解析結果

分離試料		培養法	培養温度(℃)	分離株	同定株	相同性(%)
O酒造の 焼酎粕	フレッシュ	寒天平板法	50	OSF	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
	外気保存		30	KS1	<i>Lactobacillus zeae</i>	100
				KS2	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	97
				KS3	<i>Lactobacillus casei</i>	100
				50	OSO	<i>Bacillus coagulans</i>
	嫌気性汚泥1		50	OKC	<i>Bacillus coagulans</i>	100
	嫌気性汚泥2	集積培養法	55	P16H	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	99
	嫌気性汚泥3	ロールチューブ	50	RTP16	<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	99
K酒造の 焼酎粕	フレッシュ	集積培養法	50	KL	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	100
	壁面		50	KL	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	99
			50	KW	<i>Bacillus coagulans</i>	100