土木学会論文集G（環境），Vol.67，No.7，III_425-III_432，2011.

(50) 甘藷焼酎蒸留粕からの高温乳酸菌の分離の試みと生理学的特性評価

黒田　恭平[1,2]・山田　真義[1]・川上　周司[2,4]・幡本　将史[2]
山口　隆司[2]・八木　史郎[3]・山内　正仁[1]*

[1]鹿児島工業高等専門学校　都市環境デザイン工学科（〒899-5193 鹿児島県霧島市隼人町真孝1460-1）

[2]長岡技術科学大学大学院　環境システム工学専攻（〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1）

[3]鹿児島大学　農学部　生物資源化学科（〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21-24）

[4]阿南工業高等専門学校　建設システム工学科（〒774-0017 徳島県阿南市見能林町青木265）

* E-mail: *yamauti@kagoshima-ct.ac.jp*

本研究では，蒸留直後の焼酎蒸留粕および外気温で保存した焼酎粕，高温条件下（55℃）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から高温乳酸菌の分離を行った．その結果，*Lactobacillus*に属する5つの菌種，*Thermoanerobacterium*に属する2つの菌種，3種の*Bacillus coagulans*を分離した．分離株の乳酸発酵特性評価を行った結果，6つの分離株はL-乳酸産生型であった．高温性*Lactobacillus*属の分離株はD-乳酸型およびDL-乳酸型であった．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．分離株の経時的乳酸生成速度を調査した結果，高温性分離株は中温性分離株と比較して代謝速度が速く，早い段階で乳酸発酵を終了していた．

Key Words : *thermophilic lactic acid bacteria, sweet potato-based Shochu lees*

1. はじめに

乳酸菌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，内生胞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]．現在知られている乳酸菌はほとんどが中低温域で生育し，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いる．また，一部の乳酸菌が生成するナイシンなどの抗菌物質が注目されており，微生物起源の抗菌性物質（バイオプリザベイティブ）として非常に有用であることが報告されている[2]．

Endo らは乳酸菌が焼酎製造過程においてどのような挙動を取っているかを明らかにしており，麹および酵母もろみ中に乳酸菌が存在することを報告している[3]．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，焼酎のもろみおよびアルコール発酵中の焼酎，焼酎蒸留粕から新種および既存の乳酸菌を分離した事例が報告されている[4)-8)]．以上の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．Akao らは高温で生育する L-乳酸産生型の *Bacillus coagulans* を優占化させて高温 L-乳酸発酵の研究を行っており，HRT を 10 時間で光学純度 96.7 %，乳酸収率 0.74 を得ている[9)-12)]．このように高温で乳酸発酵可能な微生物を焼酎粕排出直後の熱を利用して発酵させることで，乳酸発酵を他の雑菌が増殖する前に行うことができることなどから，サーマルリサイクルという観点からメリットがある．また，鹿児島県では焼酎製造過程で発生する焼酎粕を直接家畜飼料や堆肥化に利活用しているが，さらに付加価値の高い利用方法が望まれている．

以上のことから，焼酎粕から新種の高温乳酸菌を分離することにより焼酎粕の付加価値の高い利用方法および生物学的に新しい知見を得ることができると考えられた．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，分離できた微生物について発酵特性や生理学的特長の評価を行った．また，高温乳酸菌との発酵特性などの比較や焼酎粕に中温乳酸菌が存在しているのかを確認するために，焼酎粕から中温乳酸菌の分離を行った．

2. 実験方法

(1) 分離試料

焼酎蒸留粕から高温，中温乳酸菌の分離を試みるにあたり，O酒造とK酒造から排出される焼酎粕を植種汚泥として用いた．O酒造においては，排出されたばかりの焼酎粕，外気で数日保管していたもの，55℃の高温域で焼酎粕原液を処理しているReversible-flow Anaerobic Baffled Reactor（RABR）の底の部分の嫌気性汚泥を用いて分離を試みた．K酒造においては，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を用いて分離を試みた．排出直後および焼酎粕貯留タンク内の焼酎粕を分離試料に用いた理由は，既往の焼酎粕からの分離報告がアルコール発酵中の焼酎や常温保存の焼酎粕であり[4)8)]，排出直後や焼酎粕貯留タンク内の焼酎粕は分離試料に用いられておらず，新規な高温乳酸菌が培養できる可能性があると考え，分離試料とした．嫌気性汚泥においては，温度が変動しにくいことや，固形物滞留時間が16～20日と非常に長い期間で確保しているために汚泥が溜まり，長期間微生物が生息することで新規の微生物が生息しやすいと考え，分離試料とした．

(2) 高温乳酸菌の分離方法

高温乳酸菌を分離するにあたり，乳酸菌の要求栄養分を豊富に含んでいる MRS 培地（Difco）を用いた．MRS 培地の組成を表-1 に示す．

培地の調整では，系外からの混入微生物の生育を抑制するためにシクロヘキシミドを培地中で 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 $CaCO_3$ を培地に添加して培養を行った．また，培地は調整後にオートクレーブで 121℃，20 分間滅菌した．

分離手法としては，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 N_2 パージによるガス置換を行った MRS 培地で集積培養し，集積培養した微生物を乳酸菌実験マニュアル [13)]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）N_2 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．分離手法および分離株の名称，温度条件を表-2 に示す．このとき用いた器具はすべて 121℃，20 分間，オートクレーブで滅菌処理し，植菌などの作業はクリーンベンチ内で行った．寒天平板作製法における培養時には，嫌気状態で培養を行うために CO_2 発生剤であるアネロパック・ケンキ（三菱ガス化学株式会社）を同封して培養を行った．

表-1 MRS 培地組成

Components	(g/L)
Yeast extract	5.0
Beef extract	10.0
Manganese(II) sulfate	0.05
Tween 80	1.0
Glucose	20.0
Sodium acetate	5.0
Bacto peptone	10.0
Potassium dihydrogen phosphate	2.0
Ammonium citrate	2.0
Magnesium sulfate	0.1
Agar	15.0

最終的に，顕微鏡観察により同じ形の微生物群が形成されているのを確認した後，12%グリセリン溶液に浸して-80℃で分離株を保存した．

(3) 分析方法

a) 16S rRNA遺伝子に基づく分離株の分子系統解析

DNA 抽出は，Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit（MO-BIO）を用いてビーズビーダー法で行った．DNA 抽出後，PCR 法で標的 16S rRNA 遺伝子を増幅させた．PCR 反応は 95℃で 9 分間初期変性を行い，95℃ - 40 秒，50℃ - 30 秒，72℃ - 2 分のサイクルを 34 サイクル行ったのち，最後に 72℃で 4 分間反応させた．プライマーペアには，EUB10f[14)] と Univ1500r[14)]のペア，EUB338f mix[15)] と Univ1500r のペア，EUB27f[16)] と 1392r[15)]のペア，EUB10f と 800r のペアを用いた．PCR 反応試薬には *TakaRa ExTaq* Hot Start Version（TaKaRa）を用い，PCR 反応器には PCR Thermal Cycler Dice（TaKaRa）を使用した．得られた PCR 産物は MinElute PCR Qualification Kit（QIAGEN）を用いて精製した．その後，TOPO TA cloning Kit for sequencing（Invitrogen）を用いてクローニングを行った．各分離株から 20 クローンを採取し，各クローンの 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を Univ907r[17)] プライマーを用いて決定した。塩基配列の解析はタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンター（http://catalog.takarabio.co.jp/jutaku/）に依頼して行った．

得られた塩基配列は National Center for Biotechnology Information の Blast 相同性検索ツール（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）により相同性検索を行った．相同性検索では，97%以上を同じ種と判断し近縁種を特定した．また，相同性が同じ種が複数あった微生物は生理学的特徴を調査し

表-2　各試料における分離条件および16S rRNA遺伝子の分子系統解析結果

分離株	分離試料		分離法	培養温度(℃)	近縁種	相同性(%)
OSF	O酒造の焼酎粕	排出直後	寒天平板法	50	*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*	99
KS1		外気保存		30	*Lactobacillus zeae*	100
KS2					*Lactobacillus manihotivorans*	97
KS3					*Lactobacillus casei*	100
OSO				50	*Bacillus coagulans*	99
OKC		焼酎粕固形画分を処理しているRABRの嫌気性汚泥		50	*Bacillus coagulans*	100
P16H			集積培養法	55	*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*	99
					Thermoanaerobacterium aotearoense	99
RTP16			ロールチューブ	50	*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*	100
KL	K酒造の焼酎粕	排出直後	集積培養法	50	*Lactobacillus amylolyticus*	99
KW		壁面		50	*Bacillus coagulans*	100

て既往の文献と比較し，菌種の同定を行った．

b) 分離株の生理学的特性評価

分離株の形状を調査するために顕微鏡観察を行った．顕微鏡は BX41（OLYMPUS）を用い，位相差で観察を行った．顕微鏡の倍率は1000倍に設定し，懸濁法を用いて標本を作製した．その後，分離株の生理学的特性を評価するために乳酸菌実験マニュアル[13]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（761 compact IC, Metrohm）で行った．Column は RSpak KC-811（Shodex），Column Heater は U-620 TYPE 30VP（Sugai）を用いた．溶離液は 1mM $HClO_4$，再生液は 40mM NaOH，洗浄水はイオン交換水とし，Column 温度 50℃，流速 1.0 mL/min で測定した．試料はメンブレンフィルター（0.45 μm）を通して分析に用いた．全糖の分析はフェノール-硫酸法を用いて 485 nm の波長で測定を行った．

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[18]の分析方法に準じて HPLC で測定を行った．ポンプは 880-PU Intelligent HPLC Pump（JAS.C.O）を使用し，UV 検出器に UV-41（Shodex）を用いた．Column は ORpak CRX-453（Shodex）を用い，D-2500 Chromato-Integrator（HITACHI）でデータの処理を行った．移動相に 1mM $CuSO_4$ と CH_3OH を 9 : 1 で混合したものを用い，Column 温度 35℃，流速 0.3 mL/min で測定した．サンプルは 12 時間，MRS 培地で培養したものを 100 倍で希釈し，メンブレンフィルター（0.45 μm）を通したものを用いた．

分離株の 49 種類の糖の発酵を調査し，菌種を簡易同定できる 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．測定は Api50 CH の分析方法に準拠して培地の色の変化で評価を行い，apiweb (https://apiweb.biomerieux.com/) に 49 種類の糖類発酵試験結果を入力することで分離株の簡易同定を行った．

分離株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，全糖濃度を微生物の乳酸生成が終了するまで経時的に測定を行った．基質には MRS 培地を 7 mL 用意し，植種は 0.1 mL で分析を行った．温度条件は KS1 株，KS2 株，KS3 株を 30℃，OKC 株，OSO 株，KW 株，OSF 株，KL 株を 50℃とした．

3. 実験結果および考察

(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 の嫌気性汚泥を MRS 培地で集積培養を行った結果，全条件において 24 時間以内に MRS 培地の底が白濁し微生物の増殖が確認された．集積培養後，寒天平板法およびロールチューブ法を用いて単離を試みたところ，培養 2 日で培地にコロニーを形成した．その後，継代培養を繰り返すことにより単離を行った．寒天平板法およびロールチューブ法においてコロニーを形成しなかった試料においては，集積培養を繰り返すことにより乳酸発酵に適した微生物群を形成させた．高温乳酸菌の分離を試みた結果，全条件において微生物を分離することに成功した．

分離した微生物を顕微鏡で観察した結果，すべての分離株は桿状の微生物であった．顕微鏡による形状観察写真を図-1に示す．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．写真に示すように，分離株の細胞の大きさは約4~10 μmであった．

(2) 16S rRNA遺伝子の分子系統解析結果

分離株の16S rRNA遺伝子の塩基配列解析を行った結果，全分離株において97%以上の相同性を持つ近縁種が確認

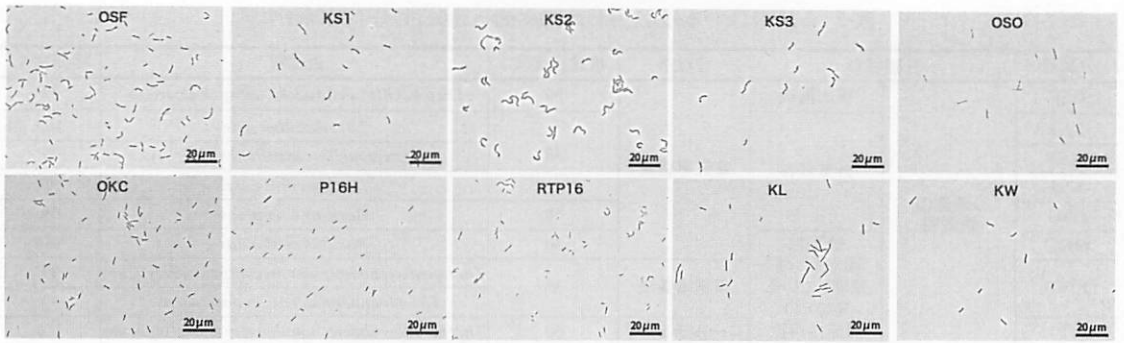

図-1　分離された微生物の顕微鏡写真

できた. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析結果を表-2 に示す. 解析の結果, 分離株は *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus, L. zeae, L. casei, L. manihotivorans, Bacillus coagulans, L. amylolyticus, Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, T. aotearoense* であると推定された. また, P16H 株は 2 種類の菌種が存在していることから, 単離する必要性が示唆された.

芋焼酎粕の排出直後の試料において OSF 株と KL 株で菌種の違いが見られた. これは, O 酒造と K 酒造の焼酎の製造方法および酵母や麹の種菌の違いなどが原因として考えられる. また, 排出直後の焼酎粕に存在した OSF 株が常温で焼酎粕を保存することによって同じ高温性微生物でも OSO 株が分離された. これは OSO 株は *B. coagulans* という芽胞を形成する微生物 [19]であり, 元々排出直後の焼酎粕に存在していたが優占種ではなく, 環境の変化に対応し, 中温条件下でも生存することができていた可能性が示唆された.

(3) 生理学的特性評価結果

分離株の生理学的特性評価を行った結果を表-3 に示す. 分離株はすべてホモ乳酸発酵していることが分かった. これはサイレージやコンポストなどの高い乳酸収率を必要とする利用方法に有効であることから, 非常に利用しやすい微生物であると考えられる. また, *B. coagulans* である OSO 株, OKC 株, KW 株は *Lactobacillus* 属の菌種と異なりカタラーゼ陽性, 運動性陽性であることが分かる. *B. coagulans* は微好気または通性嫌気性の微生物で, カタラーゼ陽性, 運動性陽性の他に芽胞を形成するなど乳酸菌と異なった性質を示すことが報告されている [19]ことから, 分子系統解析による菌種の推定は強く支持されるものであった.

表-3　分離株の生理学的特性評価結果

	OSF	KS1	KS2	KS3	OSO	OKC	KL	KW	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	−	−	−	−	−	−	−	−	+/−	+
大腸菌検査	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
発酵形態	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ/ヘテロ	第三発酵式

+: positive reaction, -: negative reaction, +/-: variable reaction

表-4　MRS 培地における 12 時間培養後の分離株の乳酸異性体測定結果

	OSF	KS1	KS2	KS3	OSO	OKC	KL	KW
L-Lactate (mM)	18.3	174.4	151.0	164.9	77.6	81.5	98.1	78.7
D-Lactate (mM)	267.2	31.3	1.8	4.4	0.0	0.0	175.7	0.0
L-Lactate (%)	6.4	84.8	98.8	97.4	100.0	100.0	35.8	100.0
D-Lactate (%)	93.6	15.2	1.2	2.6	0.0	0.0	64.2	0.0
Optical form*	D	L	L	L	L	L	DL	L

*分離株が同じ乳酸異性体を80 %以上産生しているという基準でOptical formを定めた.

表-5　分離株のApi50CHによる糖類発酵試験結果

Carbohydrate	OSF	KS1	KS2	KS3	OSO	OKC	KL	KW
	api50CHL	api50CHL	api50CHL	api50CHL	api50CHB/CHE	api50CHB/CHE	api50CHL	api50CHB/CHE
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	+	W	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	+	-	-	-
Ribose	-	+	+	+	+	+	-	+
D-Xylose	-	-	-	-	+	-	-	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	+	-	-	-	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	+	+	+	+	+	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	W	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	W	-	W
Rhamnose	-	+	+	-	+	-	-	-
Dulcitol	-	+	+	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	-	+	W	+	-	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-	W	+	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-	-	+
N-Acetyl-glucosamine	W	+	+	+	+	+	+	+
Amygdaline	W	+	+	W	-	+	-	+
Arbutine	W	+	+	W	+	+	-	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	W	+	+	W	W	+	+	+
Cellobiose	W	+	+	-	+	+	+	+
Maltose	-	W	+	W	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	-	+	-	-	+
Melibiose	-	-	-	-	+	+	-	+
Saccharose	-	-	-	W	-	W	-	W
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	+	+	+	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	+	+	-	+
Amidon	-	-	-	-	+	+	+	+
Glycogene	-	-	-	-	-	-	W	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	-	+	W	-	+	+	+	+
D-Turanose	-	+	+	+	-	W	-	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	+	+	+	-	W	-	W
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	+	W	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Arabitol	-	+	W	W	-	-	-	-
Gluconate	-	W	W	W	+	-	-	-
2-keto-gluconate	-	W	W	-	-	-	-	-
5-keto-gluconate	-	-	-	-	W	+	-	W

+: positive reaction, -: negative reaction, w: weakly positive reaction.

分離株の乳酸発酵特性について調査を行った結果を表-4に示す. この結果から *B. coagulans* と同定したOSO株, OKC株, KW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 KS1 株, KS2株, KS3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 株は産生した乳酸のうち, D-乳酸64.2 %, L-乳酸35.8 %という結果となった. このことから, KL 株はDL-乳酸を産生する微生物であることが分かった. OSF株においては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-乳酸を産生する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

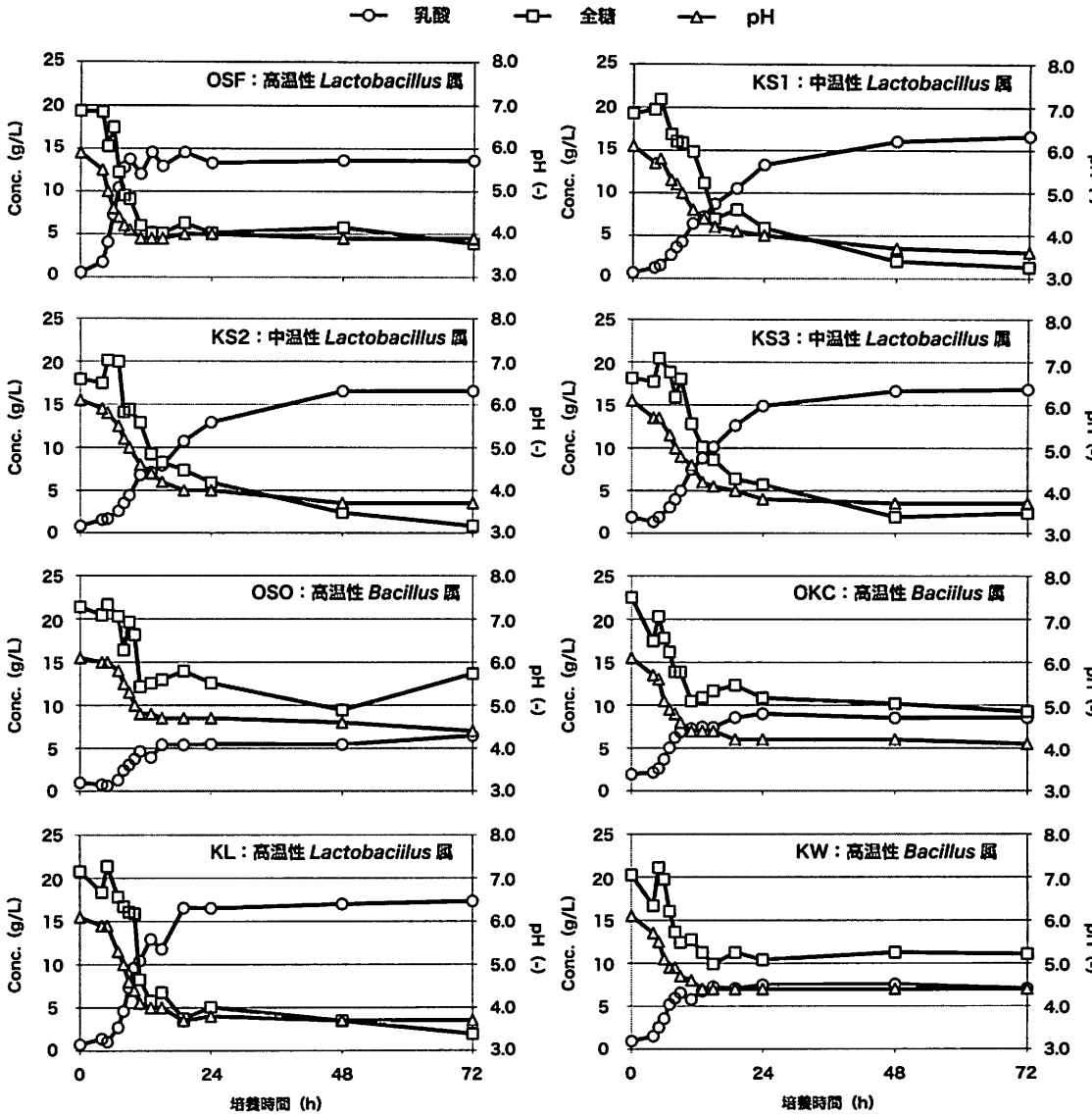

図-2　分離株の経時的乳酸生成速度調査結果

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．Akao らは L-乳酸を生成する *B. coagulans* を非滅菌状態の生ごみ中で優占化させることにより高純度の L-乳酸を回収する研究を行っている[9-12]．高い光学純度を有する L-乳酸は，生分解性プラスチックであるポリ乳酸の原料として利用でき，昨今では非常に注目されている材料である．そこで，今回分離した微生物のうち，L-乳酸産生型の微生物を利用して焼酎粕から L-乳酸を生成することが可能となれば，非常に有用であると考えられる．

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．Api50 CH の結果を表-5 に示す．糖類発酵試験結果から，*B. coagulans* である 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 株は 4 種の糖類発酵と 6 種のわずかな糖類発酵という結果がみられた．これは，他の分離株と比較すると発酵できる糖類の数が少なく，OSF 株が特異的な環境でしか生息できない微生物である可能性が示唆された．この 4 種の糖類は分離株すべてで資化しており，焼酎粕から分離した微生物については D-Glucose，D-Mannose，Esculine，Trehalose を資化できる可能性が示唆された．Api50 CH の

分析結果を基にして，有効利用のための基質を決定することが可能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を調査した結果を図-2に示す．50℃の温度条件で生息するOSF株，OSO株，OKC株，KL株，KW株は比較的早い時間で乳酸発酵が終了していた．また，高温性*Lactobacillus*属であるOSF株，KL株についてはpHを4.0以下まで低下させ，OSF株において14 g/L，KL株において16 g/L以上の乳酸を生成していた．*B. coagulans*であるOSO株，OKC株，KW株においては，pHが4.4程度，乳酸生成が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たことが原因として考えられた．30℃の温度条件で生息するKS1株，KS2株，KS3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．前述したAkaoらの研究では，*B. coagulans*を優占化させてL-乳酸を回収しているが，実験結果から図-2に示すように*B. coagulans*は*Lactobacillus*属の微生物と比較して乳酸生成能力が低く，高い乳酸濃度を得ることができなかった．そのため，高温性*Lactobacillus*属を優占化させることにより効率的に高温L-乳酸発酵することできると推察された．

Milliereらは*L. delbrueckii subsp bulgaricus*が25-50℃で生育でき，ホモ乳酸発酵を行い，L-(+)-LDHとD-(-)-LDHの活性を示していることを報告している[20]．一方で，*L. delbrueckii subsp bulgaricus*と同定した我々の分離株OSF株はD-乳酸産生型であり，L-乳酸は少量しか産生しない．また，最適生育温度が50℃であることからOSF株は新規な株であると考えられた．

Bohakらは*L. amylolyticus*が52℃まで生育でき，最適生育温度が45-48℃，ホモ乳酸発酵を行い，DL-乳酸産生型でDextrin, Fructose, Galactose, Glucose, Maltose, Mannose, Sucrose (条件によりSalicine, Amygdaline, Raffinose, Melibiose)を用いて酸発酵を行うことを報告している[21]．一方で，*L. amylolyticus*と同定した我々の分離株KL株は最適生育温度が50℃で，ホモ乳酸発酵を行い，DL-乳酸産生型でD-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, N-Acetyl-glucosamine, Esculine, Salicine, Cellobiose, Maltose, Trehalose, Amidon, Glycogene, ß-Gentiobioseを用いて酸発酵を行うことが実験結果から明らかになった．Bohakらの報告と我々の分離株の最適生育温度と糖類発酵試験結果には多少の違いが見られたことからKL株は新規な株であると考えられた．これは生育環境の違いが原因として考えられた．

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．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．

分離株の経時的乳酸生成速度を調査した結果，*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代謝速度が速く，早い段階で乳酸発酵が終了していた．

OSF株とKL株において，既往の報告と異なる実験結果を得ることができた．これは分離株の生育環境の違いが原因として考えられた．

謝辞

本研究は，平成22年度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: 乳酸菌の科学と技術, 学会出版センター, 1996.

2) 森地敏樹: バイオプリザベーション: その意義と乳酸菌の利用性, 日本食生活学会誌, Vol. 16, No. 3, pp.190-193, 2005.

3) Endo, A. and Okada, S.: Monitoring the lactic acid bacterial diversity during *shochu* fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 99, No. 3, pp. 216-221, 2005.

4) Endo, A. and Okada, S.: *Lactobacillus satsumensis* sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and starchy materials, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 55, pp. 83-85, 2005.

5) Endo, A. and Okada, S.: *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 55, pp. 2345-2348, 2006.

6) Endo, A. and Okada, S.: *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 57, pp. 708-712, 2007.

7) Endo, A. and Okada, S.: *Lactobacillus composti* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from a compost of distilled shochu residue, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 57, pp. 870-872, 2007.

8) 高山消子, 工藤哲三, 水谷政美, 山本英樹, 柏田雅徳: 焼酎もろみ

中の乳酸菌(第2報),宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告,Vol. 50, pp. 117-119, 2005.
9) 赤尾聡史, 津野洋, 堀江匠: 非滅菌模擬生ごみを原料とする高温L-乳酸発酵の半連続式培養への適用, 土木学会論文集G, Vol. 63, No. 1, pp. 68-76, 2007.
10) Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J.: Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure, *Water Research*, Vol. 41, pp. 1774-1780, 2007.
11) Akao, S., Tsuno, H., Horie, T., Mori, S.: Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, *Water Research*, Vol. 41, pp. 2636-2642, 2007.
12) Hidaka, T., Horie, T., Akao, S., Tsuno, H.: Kinetic model of thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification, *Water Research*, Vol. 44, pp. 2554-2562, 2010.
13) 小崎道雄(監修), 内村泰, 岡田早苗(著): 乳酸菌実験マニュアル-分離から同定まで-, 朝倉書店, 1992.
14) William, G. W., Susan M. B., Dale, A. P., David, J. L.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, Vol. 173, No. 2, pp. 697-703, 1991.
15) 阿部悠一, 大橋晶良, 井町寛之, 原田秀樹, 徳富孝明: スポンジ-エアリフト型リアクターによる亜硝酸型硝化に及ぼすアンモニア濃度と温度の影響, 環境工学研究論文集, Vol. 43, pp. 343-351, 2006.
16) Noda, S., Inoue, T., Hongoh, Y., Kawai, M., Charunee, A. N., Charunee, V., Kudo, T., Ohkuma, M.: Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in *Bacteroidales* attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. *Environmental Microbiology*, Vol. 8, No. 1, pp. 11-20, 2006.
17) Stackebrandt, E., Goodfellow, M.: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 1991.
18) Okubo, S., Mashige, F., Omori, M., Hashimoto, Y., Nakahara, K., Kanazawa, H., Matsushima, Y.: Enantiomeric determination of L- and D-lactic acid in human cerebrospinal fluid by chiral ligand exchange high-performance liquid chromatography, *Biomedical Chromatography*, Vol. 14, pp. 474-477, 2000.
19) Vecchi, E. De. and Drago, L.: *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: Misidentification or mislabelling?, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, Vol. 1, No. 1, pp. 3-10, 2006.
20) Milliere, J. B., Abidi, F. Z., Lefebvre, G.: Taxonomic characterization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolates from a Cameroonian zebu's fermented raw milk, *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 80, pp. 583-588, 1996.
21) Bohak, I., Back, W. Richter, L., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H.: *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., isolate from beer malt and beer wort, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 21, pp. 360-364, 1998.

(2011.5.30受付)

Isolation and characterization of thermophilic lactic acid bacteria from sweet potato-based *Shochu* lees

Kyohei KURODA[1,2], Masayoshi YAMADA[1], Shuji KAWAKAMI[2,4], Masashi HATAMOTO[2], Takashi YAMAGUCHI[2], Fumio YAGI[3] and Masahito YAMAUCHI[1]

[1]Dept. of Urban Environmental Design and Engineering, Kagoshima National College of Technology
[2]Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology
[3]Dept. of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
[4]Dept. of Construction Systems Engineering, Anan National College of Technology

Ten lactic acid bacterial strains were isolated from sweet potato-based *Shochu* lees, which were just after the distillation, storage at air temperature, and treated by using reversible-flow anaerobic baffled reactor at 55℃.The isolates were identified as *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus, L. zeae, L. casei, L. manihotivorans, Bacillus coagulans, L. amylolyticus, Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, T. aotearoense* on the basis of 16S rRNA gene sequence. From the lactic acid fermentation tests and analysis of lactate enantiomers, six strains produced L-lactate, two thermophilic strains produced D-lactate and DL-lactate. The most of isolates produced lactate from the variety of carbohydrates determined with Api50 CH. From the Lactic acid fermentation tests in the batch cultivation, thermophilic isolates produced lactate faster than mesophilic isolates.