

B-19 *Bacillus coagulans* によるL-乳酸発酵の 糖資化性検討

赤尾 聡史^{1*}・○榮 祐介¹・中谷 真悟¹・増田 貴則¹・細井 由彦¹

¹鳥取大学大学院工学研究科社会基盤工学専攻（〒680-8552鳥取県鳥取市湖山町南4-101）

* E-mail: akao@sse.tottori-u.ac.jp

1. はじめに

L-乳酸は、生分解性プラスチックであるポリ乳酸（PLA）の原料として利用できるものであり、トウモロコシなどの農作物を原料に発酵により製造されている。しかし、これらの原料は農作物可食部であり、PLAを増産させることは食料や飼料の安定供給に不安要因をもたらす。そこで、新たな原料の開拓が必要であり、未利用のバイオマスである農業廃棄物などが有力視されている。

農業廃棄物はセルロースやヘミセルロースといった多糖から構成されるが、このうちヘミセルロースを構成する単糖（マンノース、キシロースおよびアラビノース）はエタノール発酵やL-乳酸発酵において資化困難な場合が多い。一方、著者らは*Bacillus coagulans*による非滅菌L-乳酸発酵を実施してきた¹⁾が、同菌種は資化可能な単糖の範囲が広いことが指摘されている²⁾。また、*B. coagulans*にはアミラーゼを誘導できる株も存在する³⁾。ペントース資化性や多糖加水分解性を備えることは、資化可能な糖質の拡大や糖化工程の簡略化をもたらし、L-乳酸生産性の向上につながる。しかし、L-乳酸生成菌において両方を備える菌株はまれである。

本研究では、農業廃棄物の資源化を目的とし、単糖資化性および多糖加水分解性を備えた*B. coagulans*株の探索を行った。また、食品廃棄物である生ごみを用いた非滅菌L-乳酸発酵を行い、*B. coagulans*株間にある糖資化性の差を確認した。さらに、ペントース資化性が確認された同株を用いて、稲わら・廃菌床糖化液のL-乳酸発酵を行った。

2. 実験方法

(1) 使用菌株

Bacillus coagulans JCM 2257, JCM 2258およびJCM 9076を

用いた。単糖資化実験では、鳥取市内の生ごみ（2007年10月1日採取）¹⁾と鳥取大学キャンパス内土壌から単離した高温酸生成菌株（以下、単離株とする）も用いた。なお、単離はDextrose Tryptone Agar（Difco）を用い、55℃で48時間後に黄変したコロニーを釣菌した。

(2) 単糖および多糖資化実験

滅菌済みの15mLチューブに単糖または多糖溶液（20g/L）と栄養源となる濃縮培地（表1）をそれぞれ5mL注ぎ、あらかじめLB培地で前培養（55℃、48時間）した(1)の菌株を植菌した。インキュベータ（アズワン、PIC-100S）を用い、55℃で5日間の振とう培養とした。

単糖は、グルコース、マンノース、キシロースおよびアラビノース（和光純薬、特級）を使用した。多糖は、でんぷん（和光純薬、一般、溶性）、でんぷん（和光純薬、一般、コーン由来）セルロース（Alfa Aesar, Cellulose, microcrystalline）およびペクチン（和光純薬、化学用、かんきつ類由来）を使用した。

表1. 濃縮培地の組成

(単位g/100mL)		
Yeast Extract	bacto	1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	和光純薬 特級	0.1
MgSO ₄ ・7H ₂ O	和光純薬 特級	0.02
MnSO ₄ ・4H ₂ O	和光純薬 特級	0.004
FeSO ₄ ・7H ₂ O	和光純薬 特級	0.002
CaCO ₃	和光純薬 特級	1

滅菌済み

(3) 生ごみを用いた非滅菌L-乳酸発酵

培地は、前述した生ごみを蒸留水で2倍希釈したもの（全糖量；30.5g/L）とした。実験装置は、既研究¹⁾と同様とした。植種としては、前培養（55℃、48時間）済みの*B. coagulans* JCM 2257またはJCM 2258を生ごみ培地1Lに対して1%量添加し、回分培養を行った。表2に実験条件を示す。乳酸の生成に伴い低下するpH調整のための中

和剤は、5mol/Lアンモニア水を用いた。

表2. 実験条件

培養温度(°C)	55
pH(-)	5.5
反応器の容積(L)	1.0
培養期間(日)	5

(4) 稲わら・廃菌床糖化液のL-乳酸発酵

粉末状に加工した稲わらと廃菌床を図1に示す希硫酸法⁹⁾により糖化处理をした。なお、廃菌床はハタケシメジ栽培のものである。得られた糖化液は、糖質濃度が薄いため、蒸発濃縮(約10倍)してL-乳酸発酵に用いた。培養条件は、(2)と同様とし、濃縮糖化液と濃縮培地を5mLずつ加えた。植種菌は、前培養(55°C, 48時間)済みの*B. coagulans* JCM 2258を用いた。

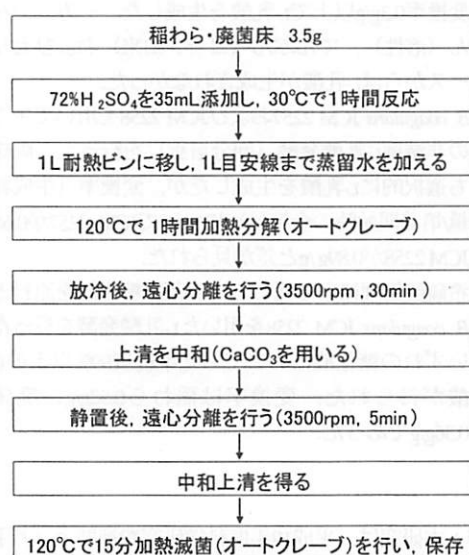


図1. 希硫酸法による糖化处理のフロー

(5) 分析方法

全糖はフェノール硫酸法、D,L-乳酸量はHPLC (SUMICHIRAL OA-5000)、全有機炭素(TOC)および全窒素(T-N)はTOC/T-N計(島津製作所、TOC-VCSN)、全リン(T-P)はアスコルビン酸還元・モリブデン青吸光光度法にて求めた。光学純度は、HPLCによりD,L-乳酸の絶対量を求め、その存在量から式1より算出した。変換率は、式2に示すように生成乳酸量を基質中の全糖量で除して算出した。

$$\text{光学純度}(\%) = \frac{(\text{L-乳酸}) - (\text{D-乳酸})}{(\text{L-乳酸}) + (\text{D-乳酸})} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{変換率}(\text{g/g}) = \frac{(\text{生成乳酸量})}{(\text{基質中の全糖量})} \quad (2)$$

3. 結果および考察

(1) 単糖資化実験

農業廃棄物を構成するセルロース、ヘミセルロースに含まれるグルコース、マンノース、キシロースおよびアラビノースを炭素源とするL-乳酸発酵を行った。図2に結果を示す。単離株では、いずれの株もグルコースからL-乳酸生成を行ったが、キシロースとアラビノースは資化されなかった。なお、マンノースについてはL-乳酸発酵を試みていない。*B. coagulans*の各株では、JCM 2257は、キシロースとアラビノースとも資化しなかったが、マンノースからはL-乳酸を生成した。JCM 2258とJCM 9076は、キシロースとアラビノースからL-乳酸生成を行った。両株のうちマンノースに関しては、JCM 2258はL-乳酸生成を行ったが、JCM 9076は行わなかった。以上より、JCM 2258が試みたいずれの単糖からも変換率0.5g/g以上でL-乳酸を生成し、農業廃棄物の糖化物を資化する株として有望であることがわかった。

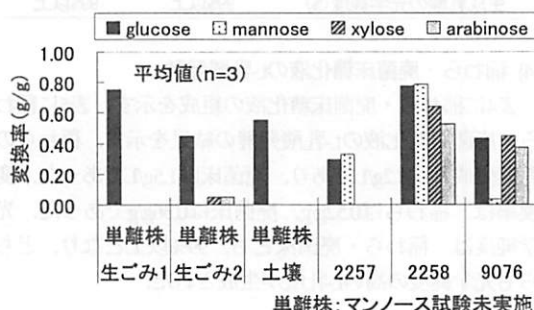


図2. 単糖資化実験結果

(2) 多糖資化実験

多糖加水分解性を確認するために、でんぷん(溶性)、でんぷん(コーン由来)、ペクチンおよびセルロースを炭素源とするL-乳酸発酵を行った。図3に結果を示す。ペクチンについては、用いたいずれの株でも変換率0.3g/g以上でL-乳酸を生成した。でんぷん(溶性)、でんぷん(コーン由来)およびセルロースについては、ここで実施した条件での資化(加水分解)は困難であった。ただし、*B. coagulans*にはアミラーゼ誘導が行える株もあり、同性質を備えた株の探索を今後も続ける。なお、*B. coagulans*のアミラーゼ誘導およびアミラーゼ活性には至適条件(50°C, pH 7.0付近)³⁾があり、ここでの培養条件

がこれらと離れていることも加水分解が行えなかった原因として考えられる。

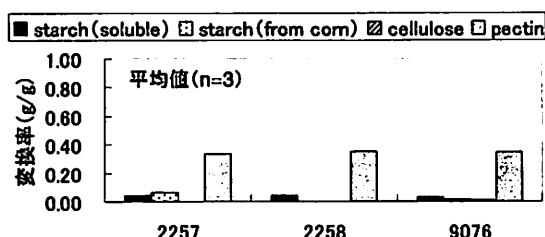


図3. 多糖質化実験結果

(3) 生ごみを用いた非滅菌L-乳酸発酵

B. coagulans JCM 2257およびJCM 2258を用いて生ごみの非滅菌L-乳酸発酵（回分培養）を行った。表3に結果を示す。両株とも選択的にL-乳酸を生成したが、変換率についてJCM 2257が0.65g/g、JCM 2258が0.89g/gと差が見られた。これは、図2で示された変換率あるいは糖質化性によるものと考えられる。

表3. ペントース質化性の比較

	JCM 2257	JCM 2258
L-乳酸生成量(g/L)	21.7	25.6
変換率(g/g)	0.65	0.89
生成乳酸の光学純度(%)	99%以上	99%以上

(4) 稲わら・廃菌床糖化液のL-乳酸発酵

表4に稲わら・廃菌床糖化液の組成を示す。表5に稲わら・廃菌床糖化液のL-乳酸発酵の結果を示す。稲わらの乳酸生成量は2.2g/Lであり、廃菌床は1.5g/Lであった。変換率は、稲わらは0.52g/g、廃菌床は0.36g/gであった。光学純度は、稲わら・廃菌床とも、99%以上となり、どちらも光学純度の高いL-乳酸が生成された。

表4. 稲わら・廃菌床糖化液の組成

	稲わら		廃菌床	
	濃縮前	濃縮後	濃縮前	濃縮後
TOC(g-C/L)	0.4	8.7	0.6	8.2
T-N(g-N/L)	0.01	0.13	0.04	0.35
T-P(g-P/L)	0.00	0.00	0.01	0.02
糖質(g/L)	3.5	8.4	1.0	6.8
pH(-)	8.1	6.7	6.3	6.0

表5. 稲わら・廃菌床糖化液のL-乳酸発酵の結果

	稲わら	廃菌床
L-乳酸生成量(g/L)	2.2	1.5
変換率(g/g)	0.52	0.36
生成乳酸の光学純度(%)	99%以上	99%以上
平均値(n=3)		

4. まとめ

本研究では、農業廃棄物の資源化を目的とした単糖質化性および多糖加水分解性を備えた*B. coagulans*株の探索を行った。また、生ごみを用いた非滅菌L-乳酸発酵を行い、*B. coagulans*株間にある糖質化性の差を確認した。さらに、稲わら・廃菌床の利用を検討した。本研究で得られた成果を以下にまとめる。

- (1) グルコース、マンノース、キシロースおよびアラビノースを炭素源とするL-乳酸発酵を行った結果、*B. coagulans* JCM 2258がいずれの単糖からも乳酸変換率0.5g/g以上でL-乳酸を生成し、農業廃棄物の糖化物を資化する株として有望であることがわかった。
- (2) でんぷん（溶性）、でんぷん（コーン由来）、セルロースおよびペクチンを炭素源とするL-乳酸発酵を行った結果、ペクチンからは用いたいずれの株でも変換率0.3g/g以上でL-乳酸を生成した。一方、でんぷん（溶性）、でんぷん（コーン由来）およびセルロースからはL-乳酸が生成されなかった。
- (3) *B. coagulans* JCM 2257およびJCM 2258を用いて生ごみの非滅菌L-乳酸発酵（回分培養）を行った。両株とも選択的にL-乳酸を生成したが、変換率（生成乳酸量/培養開始時の全糖量）についてJCM 2257が0.65g/g、JCM 2258が0.89g/gと差が見られた。
- (4) 希硫酸処理による稲わら・廃菌床糖化液を原料とし、*B. coagulans* JCM 2258を用いたL-乳酸発酵を行った。いずれの糖化液においても光学純度99%以上のL-乳酸が得られた。変換率は稲わら0.52g/g、廃菌床0.36g/gであった。

謝辞：本研究は、平成19年度科学研究費補助金（若手研究スタートアップ；課題番号19860052）を受けて実施されたものである。

参考文献

- (1) 赤尾聡史，榮祐介，岩崎翔志，門木秀幸：家庭系生ごみの組成分析と非滅菌L-乳酸発酵での利用，環境工学研究論文集，Vol. 45，印刷中。
- (2) Sneath, P.H.A.: Endospore-forming gram-positive rods and cocci, Holt J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2, pp. 1104-1200, Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.
- (3) Babu, K.R., Satyanarayana, T.: Parametric Optimization of Extracellular α -Amylase Production by Thermophilic *Bacillus coagulans*, Folia Microbiol. Vol. 38, No. 1, pp. 77-80, 1993.
- (4) 吉田隆：バイオマスエネルギーの特性とエネルギー変換・利用技術，pp. 259, (株)NTN, 2002.