

## 1. はじめに

稲わらなど農業廃棄物の利用を目指して, その構成単糖類の高温 L-乳酸発酵における L-乳酸発酵性を見た<sup>1)</sup>. その結果, 例えば *Bacillus coagulans* JCM 2258 はペントースなど広く単糖類を資化できた. ここでは, 二糖類と多糖類に対して同様の L-乳酸発酵性試験を行い, これら糖質の資化性, 特に高温 L-乳酸発酵における加水分解能に関する知見を得ることとした. なお, *B.coagulans* はアミラーゼを誘導するとされる<sup>2)</sup>.

また, JCM 2258 はペントースを資化することができたが, 2 種類以上の単糖類が存在する場合においてどのような経過でそれぞれの単糖類を消費するのが不明である. 例えばグルコースとキシロースが共存する場合, 一般的にはグルコースを資化した後キシロースを資化するなど, 同時資化性は有さないとされる. JCM 2258 についてこの点を確認することとした.

## 2. 実験方法

## 2.1 二糖類および多糖類からの L-乳酸発酵性試験

実験装置・方法は, 既存研究と同様とした<sup>1)</sup>. 栄養液(表 1)と糖液(表 2)を各 5mL 注ぎ, あらかじめ LB 培地で前培養した(55 , 48 時間) *B.coagulans* 標準株を植菌させた. L-乳酸発酵性試験は, 温度 55 で 5 日間の振とう培養とした. 培養後, 糖質量と D-,L-乳酸量の測定を行った. 試験株は *B.coagulans* JCM 2257, JCM 2258 および JCM 9076 とした.

## 2.2 グルコースとキシロースの同時資化性試験

本研究で用いた実験装置の概略図を図 1 に示す. 反応器は 500mL 三角フラスコを用い, pH5.5, 55 で制御した. 中和剤はアンモニア水(1+2)を用いた. 培養液は, 糖液(グルコースとキシロースそれぞれ 5g/L) と栄養液(Tryptone と Yeast Extract; それぞれ 10g/L) を作成し, それぞれ滅菌の後 200mL ずつ混合して作成した. 植種株は, 単糖類の資化範囲の広い JCM 2258 を用いた. LB 培地で前培養した菌液を 1%量添加した.

表 1. 栄養液の組成

| (単位: g/50mL)                                     |                    |       |
|--------------------------------------------------|--------------------|-------|
| Yeast Extract                                    | Difco Laboratories | 0.5   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 和光純薬 特級            | 0.05  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O             | 和光純薬 特級            | 0.01  |
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O             | 和光純薬 特級            | 0.002 |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O             | 和光純薬 特級            | 0.001 |
| CaCO <sub>3</sub>                                | 和光純薬 特級            | 0.5   |

\*オートクレーブ滅菌(121 , 15分)

表 2. 糖液の組成

| (単位: g/50mL) |                    |   |
|--------------|--------------------|---|
| 試薬糖質(以下以外)   | Difco Laboratories | 1 |
| トレハロース       | 林原生物化学研究所          | 1 |
| 溶性でんぷん       | 和光純薬 一級            | 1 |
| コーン由来でんぷん    | 和光純薬 一級            | 1 |
| セルロース・微結晶    | Alfa Aesar         | 1 |
| ペクチン・かんきつ類由来 | 和光純薬 化学用           | 1 |

\*オートクレーブ滅菌(121 , 15分)

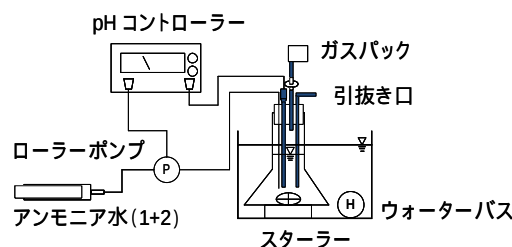


図 1. 実験装置の概略図

## 2.3 分析方法

D-,L-乳酸(HPLC, カラム; SUMICHIRAL OA-5000), 単糖(HPLC, カラム; SUGAR SP 0810)および全糖(フェノール硫酸法)を求めた. L-乳酸の変換率は, 生成 L-乳酸量を培養開始時の全糖量で除して算出した.

$$\text{変換率 (g/g)} = \frac{(\text{生成L-乳酸量})}{(\text{培養開始時の全糖量})} \quad (1)$$

## 3. 結果および考察

## 3.1 二糖類からの L-乳酸発酵性試験

二糖類の試験結果を図 2 に示す. JCM 2257 では, セロビオースとトレハロースから平均変換率 0.2 程度で L-乳酸を生成した. JCM 2258 では, スクロースを除く糖において平均変換率 0.2 から 0.4 で L-乳酸を生成した. 一方, JCM 9076 では, 今回の試験において L-乳酸生成を確認

できなかった。L-乳酸生成を行えた二糖類と菌株の組み合わせにおいて、検体ごとにL-乳酸生成にバラツキが見られた。単糖類のような一貫した結果は得られなかった。

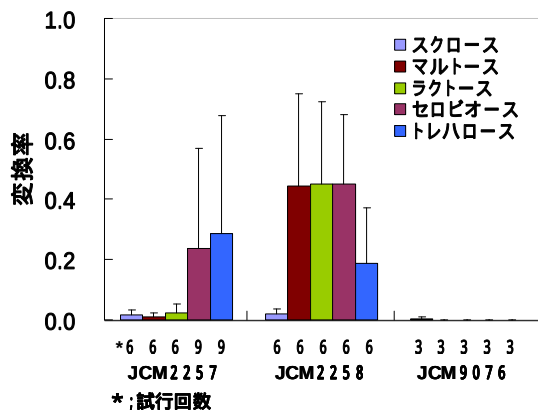


図 2. 二糖類からの L-乳酸発酵性試験結果

### 3.2 多糖類からの L-乳酸発酵性試験

多糖類の試験結果を図 3 に示す。JCM 2257, JCM 2258 および JCM 9076 とともに、ペクチンから平均変換率 0.3 以上で L-乳酸生成を行った。しかし、他の多糖では、L-乳酸生成をほとんど確認できなかった。今回の実験では、いずれの株についても期待したでんぷんの加水分解能を確認できなかった。

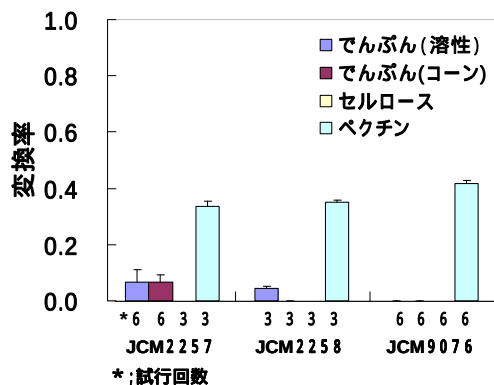


図 3. 多糖類からの L-乳酸発酵性試験結果

### 3.3 グルコースとキシロースの同時資化性試験

3.1 より、単糖類にとどまらず二糖類においても *B. coagulans* JCM 2258 の資化範囲の広いことがわかった。この株に対して、異なる糖質が存在する場合の同時資化性を見た。図 4 にグルコース、キシロースおよび乳酸濃度の経時変化を示す。図 4 より、グルコースは培養を開始して 12 時間後から急激に消費され、キシロースは 12 時間後から 46 時間後まで一貫して消費された。この結果より、グルコースとキシロースは同時に資化されるが速度差が大きく、キシロース資化が緩やかなのでキシロース資化速度に合わせた発酵時間の確保が必要となった。なお、変換率

は 48 時間後の段階で 0.81 であった。

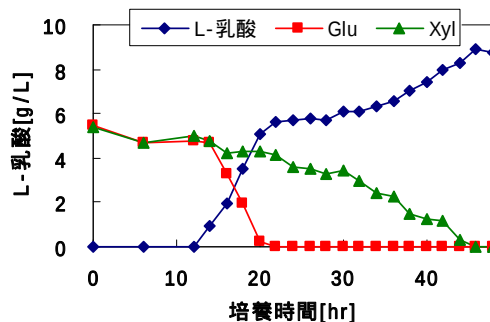


図 4. グルコースとキシロースの同時資化性試験結果

## 4. 結論

本研究では *Bacillus coagulans* JCM 2257, JCM 2258 および JCM 9076 の二糖類および多糖類の L-乳酸発酵性試験を行った。また、糖資化範囲の広い JCM 2258 についてグルコースとキシロースの同時資化性確認も行った。本研究で得られた結果を以下にまとめる。

- 1) 二糖類を用いた試験では、JCM 2258 が広い糖資化性を示した。同株はマルトース、ラクトース、セロビオースおよびトレハロースからの L-乳酸生成を確認できた。
- 2) 多糖類を用いた試験では、今回用いた 3 株はペクチンから L-乳酸生成するものの、期待したでんぷんの加水分解を確認できなかった。
- 3) グルコースとキシロースを基質とする同時資化性試験では、両糖を同時に資化するが速度差が大きく、キシロース資化が緩やかなのでキシロース資化速度に合わせた発酵時間の確保が必要となった。なお、生成 L-乳酸量を培養開始時の糖質量で除した変換率は 0.81 となった。

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) 中谷真悟, 赤尾聡史, 門木秀幸, 増田貴則, 細井由彦: *Bacillus coagulans* による草本・木質系廃棄物からの L-乳酸発酵の実施, 平成 20 年度土木学会中国支部研究発表会発表概要集
- 2) Babu, K.R., Satyanarayana, T., : Parametric Optimization of Extracellular  $\alpha$ -Amylase Production by Thermophilic *Bacillus coagulans*, Folia Microbiol. Vol. 38, No. 1, pp. 77-80, 1993.