

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07670

研究課題名(和文) 有価物生産のための複合微生物高度制御化と機能解析基盤技術の開発

研究課題名(英文) Control of meta-fermentation process for valuable production and development of analytical method

研究代表者

田代 幸寛 (Tashiro, Yukihiro)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90448481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタ発酵(複合微生物系の制御による有価物発酵生産法)プロセスにおける、殺菌、かくはんおよびpH制御法がおよぼす影響を明らかにした。特に、pH切替制御法という新規pH制御法を開発し、光学活性L-乳酸生産の効率化に成功した。さらに、体系的フィードバック分離法を開発し、メタ発酵の主要細菌3種の分離に成功するとともに、固体培地を用いた効率的な分離法を提案した。さらに、異なる堆肥および消化汚泥を種菌とした場合でも、温度制御により乳酸生産菌*Bacillus coagulans*の優占化および光学活性L-乳酸生産が可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発展途上の学問分野である複合微生物工学領域において、本研究で確立したpH切替制御法は重要な技術として、広く応用されうる。また、微生物学領域全般で、固体培地による微生物の分離は100年以上も重要であるが、分離率はわずか1%である。本研究で確立した不体系的フィードバック分離法は、この分離率を向上させるとともに迅速化、すなわち杯スルーブット化の可能性を示し、微生物学領域の発展が期待される。また、生ごみから生分解性プラスチックポリL-乳酸生産が強化されれば、資源の循環利用だけでなく、近年問題となっている石油プラスチック(マイクロプラスチック)による環境・生態系の解決方法としても有望である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the parameters of sterilization, agitation, and pH control affected L-lactic acid production in meta-fermentation (the fermentative production of pure chemicals and fuels by a controlled mixed culture). In particular, a novel pH control by switching from swing to constant was newly proposed, and would be the most efficient method for L-lactic acid from food waste. Furthermore, systematic feed-back isolation method was established, and we succeeded in isolation of 3 major species in meta-fermentation, and it would be efficient method to the targeted bacteria using solid medium. Finally, lactic acid-producing *Bacillus coagulans* would be predominant by controlling fermentation temperature even using different composts and autothermal thermophilic aerobic digestion sludge, to produce L-lactic acid from food waste.

研究分野：複合微生物工学

キーワード：メタ発酵 有価物 バイオマス L-乳酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日まで続く応用微生物学の著しい発展には、コッホにより確立された純粋培養技術が貢献していることは周知の事実である(業績 18)。発酵研究や代謝・機能解析研究もその例に洩れず、いわゆる単一微生物による『純粋発酵』がほとんどの報告例である。これまでに、研究代表者らも純粋発酵系における多数の有価物生産プロセス(グリーンケミカルおよびバイオ燃料)の開発および酵素活性測定や安定同位体を用いたメタボロームによる代謝解析に関する研究果を遂行している。一方、複合微生物によるそれらの研究報告例は、メタン発酵やコンポスト発酵などを除き、純粋発酵に比べて圧倒的に少ないのが現状である。一方、研究代表者らは、複合微生物系による有価物生産のための発酵法として『メタ発酵』を提唱している。メタ発酵には、複合基質の変換、殺菌の有無、雑菌混入、コストなど、特に社会実装の点で、純粋発酵よりも優れたメリットがある一方、生成物の単一化、高度な微生物解析技術の必要性および発酵制御に関する理論の構築、など課題も多い。従って、『複合微生物』研究は学術的・産業的な側面からも新規性および独創性が高く、発展途上の領域である。これまでに、研究代表者の堆肥一種に加えて、他研究者による活性汚泥、嫌気消化汚泥、および自着微生物を種菌としてメタ発酵による乳酸生産が報告されているが、種菌の影響を調べた研究報告は少ない。また、純粋発酵と比較して、種々の発酵パラメータがメタ発酵に及ぼす影響は明らかとなっておらず、制御法の構築も皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、メタ発酵におけるパラメータが乳酸生産・細菌群集構造におよぼす影響の解明、主要乳酸生産菌群の効率的な分離法の開発と分離・同定、複数の種菌(異なる原料・製法により製造された3種の堆肥および自家熱型高温好気消化汚泥)によるメタ発酵プロセスの構築を目的とした。

3. 研究の方法

メタ発酵におけるパラメータが乳酸生産・細菌群集構造におよぼす影響の解明

堆肥 A を種菌として、標準モデル生ゴミ培地を用いて、殺菌の有無、かくはん、pH 制御法(pH 振動制御法、pH 切替制御法)について温度 50 °C でメタ発酵におよぼす影響を検討した。また、細菌群集構造を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法にて解析した。

主要乳酸生産菌群の効率的な分離法の開発と分離・同定、分離微生物群によるメタ発酵プロセスの再構築

堆肥 A もしくは堆肥 A を種菌とするメタ乳酸発酵液を分離源として用いた。体系的フィードバック分離法(文献情報より既知の同種・近縁菌種が増殖可能な培養条件の選定およびコロニーレベルの MALDI TOF-MS スペクトルによる標的細菌のスクリーニング)により分離された菌株を 16S rRNA 遺伝子解析により同定した。また、16S rRNA 遺伝子解析による相同性と MALDI TOF-MS スペクトルパターンによるデンドログラムにより、その相関を調べた。

複数の種菌(異なる原料・製法により製造された3種の堆肥および自家熱型高温好気消化汚泥)によるメタ発酵プロセスの構築

異なる材料より製造された堆肥 A (未利用小型魚類を原料)、堆肥 B (下水汚泥を嫌気消化した汚泥を原料)、堆肥 C (生ゴミを原料)および自家熱型高温好気消化汚泥(ヒトし尿および浄化槽汚泥を原料)を複合種菌として、標準モデル生ゴミ培地を用いて、温度(30, 37, 45, 50, 55, 60, 65°C)がメタ発酵におよぼす影響を調べた。メタ発酵は 24 h 毎に pH を 7.0 に調整する pH 振動制御を行った。細菌群集構造は DGGE 法にて解析した。

4. 研究成果

メタ発酵におけるパラメータが乳酸生産・細菌群集構造におよぼす影響の解明

本メタ発酵では、非殺菌でも 24.3 g/L 乳酸および光学純度 100% が得られ、殺菌の場合の 24.9 g/L、光学純度 100% と同等の乳酸生産であった。また、乳酸生産性 0.204 g/L/h、乳酸選択性 96.2% と殺菌の場合の 0.149 g/L/h、87.6% よりも高い値を示したことから、非殺菌下でのメタ乳酸発酵が可能であることが明らかとなり、コストの削減が期待される。また、発酵中のかくはんにより乳酸生産濃度 45.1 g/L、乳酸生産性 0.269 g/L/h に大きく向上したが、光学純度が 52.5% と大幅に低下した。さらに、単一微生物による発酵で効果的な pH 一定制御法はメタ発酵では、発酵時間が 60 h に短縮され、光学純度が 74.0% に増加したものの、乳酸生産濃度は 16.9 g/L、乳酸選択性は 59.5% に激減したことから、有効でないことが明らかとなった。そこで、2 つの pH 切替制御法(非制御 一定制御および振動制御 一定制御)を世界で初めて考案した。その結果、振動制御 一定制御による pH 切替制御法では、発酵時間 36 h、乳酸生産濃度 39.2 g/L、光学純度 100%、乳酸選択性 96.6%、乳酸生産性 1.09 g/L/h と最高のパフォーマンスを示した。以上、新規な pH 制御法によるメタ発酵の高効率化に成功した。(図 1)。

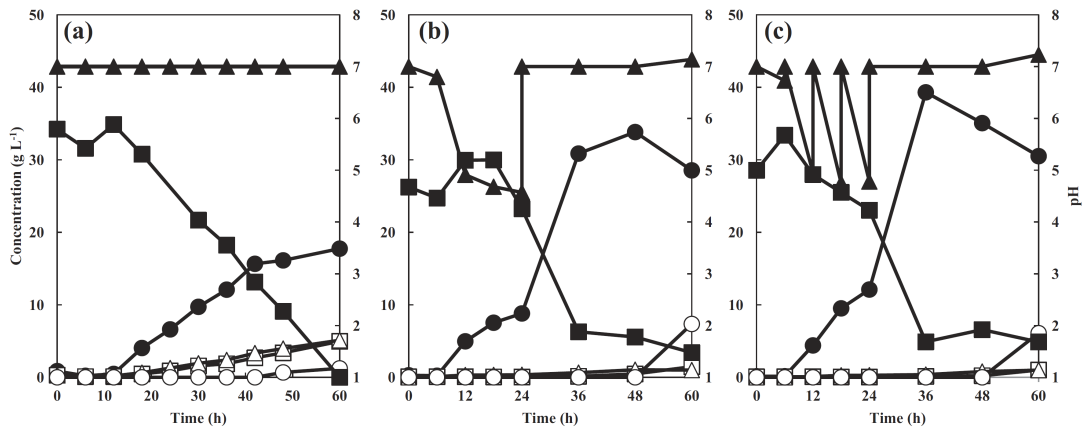


図1 異なる pH 制御法によるメタ発酵プロセスの経時変化。(a) pH 一定制御法, (b) pH 切替制御法 (非制御 (0-24 h) 一定制御 (24 h 以降)) (c) pH 切替制御法 (振動制御 (0-24 h; 6 h 毎) 一定制御 (24 h 以降)). ; 乳酸, ; pH, ; 全糖量, ; 酢酸, ; 干酸

主要乳酸生産菌群の効率的な分離法の開発と分離・同定, 分離微生物群によるメタ発酵プロセスの再構築

堆肥 A および堆肥 A を種菌とするメタ乳酸発酵の主要菌 6 種 (*Corynebacterium sphenisci*, *Bacillus thermocloacae*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus smithii*, *Bacillus humi*, and *Bacillus coagulans*) を分離の標的細菌とした. 文献情報を元に作製した培養条件 (培地, 温度, pH, 酸素要求性など) で分離した結果, 136 コロニーを得た. さらに, 各標的細菌種の基準株および分離した 136 株をコロニーレベルで MALDI TOF-MS に供して, 20 コロニーを候補菌としてスクリーニングした. さらに, 16S rRNA 遺伝子解析により, 標的細菌と 99.5%-100% の相同性を示す *C. sphenisci*, *B. coagulans* および *B. smithii* 菌の分離に成功するとともに, 95.1%-96.9% の相同性を示す *B. thermocloacae*, *B. humi* および *B. thermoamylovorans* 類縁菌を分離した. さらに, 16S rRNA および MALDI TOF-MS スペクトラムによる相同性を比較した結果, MALDI TOF-MS スペクトラムによる相同距離 0.55 以上で同種を示すことが明らかとなった. 以上, 標的細菌の有用な体系的フィードバック分離法を開発するとともに, 標的細菌の分離に成功した. (図 2)

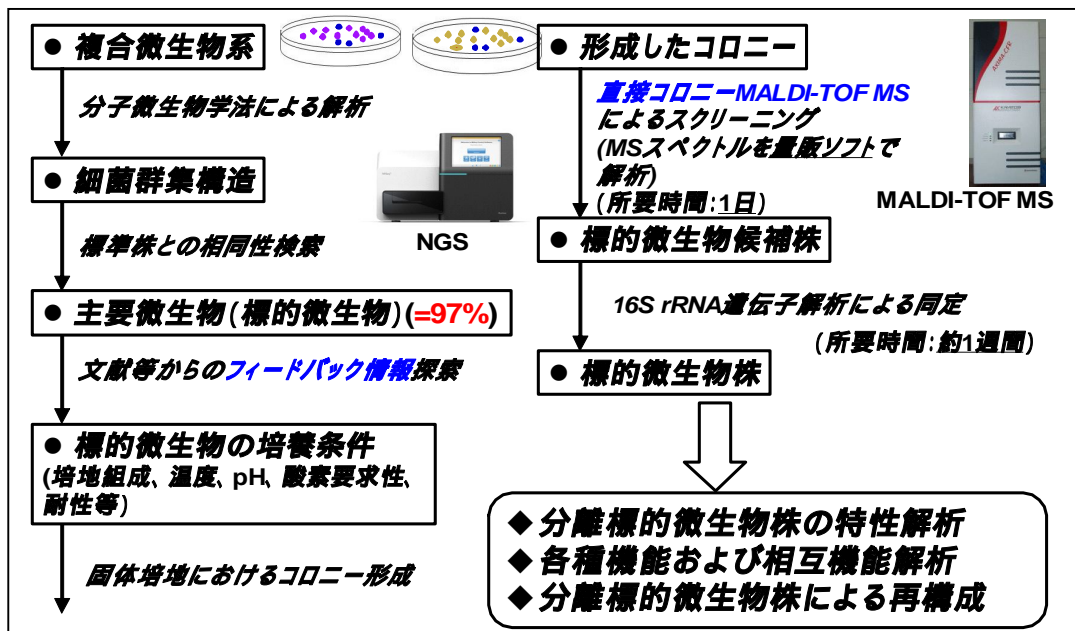


図2. 開発したフィードバック分離法の概要図

複数の種菌 (異なる原料・製法により製造された 3 種の堆肥および自家熱型高温好気消化汚泥) によるメタ発酵プロセスの構築

堆肥 A (未利用小型魚類), 堆肥 B (嫌気消化汚泥) および堆肥 C (生ゴミ) を種菌としたメタ発酵では, それぞれ温度 55°C, 45°C および 50°C で最大乳酸生産濃度, 乳酸収率, 光学純度 100% を示し, 種菌による温度依存性が明らかとなった. ところが, DGGE 解析では, いずれの種菌を用いた場合も *B. coagulans* 種が優占菌となっている大変興味深い結果となった. 一方, 自家熱型高温好気消化汚泥を種菌とした場合, 45°C で最大乳酸生産濃度, 乳酸収率, 光学純度 100%

を示す一方、温度 30℃ では別の有価物である酪酸が主生産物となった。以上より、種菌の選択および温度により、目的生産物を制御できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

宮本浩邦, 宮本久, 田代幸寛, 酒井謙二, 児玉浩明, 好熱性微生物を活用した未利用バイオマス資源からの高機能性発酵製品の製造と学術的解明, 日本生物工学会誌, 96, 56-63, 2018 (査読無)

Pramod Poudel, Yukihiro Tashiro, Hirokuni Miyamoto, Hisashi Miyamoto, Yuki Okugawa, Kenji Sakai. Development of a systematic feedback isolation approach for targeted strains from mixed culture systems. Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, 63-70, 2017 (査読有)

Yukihiro Tashiro, Shota Inokuchi, Pramod Poudel, Yuki Okugawa, Hirokuni Miyamoto, Hisashi Miyamoto, Kenji Sakai. Novel pH control strategy for efficient production of optically active L-lactic acid from kitchen refuse using a mixed culture system. Bioresource Technology, 216, 52-59, 2016 (査読有)

田代幸寛, 酒井謙二, 複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物変換法の制御と体系化, 環境バイオテクノロジー学会誌, 16, 11-15, 2016 年 (査読無)

〔学会発表〕(計 12 件)

田代幸寛, 溝口尊春, 古原俊哉, 宮本浩邦, 酒井謙二, 分離菌群による光学活性 L-乳酸生産のためのメタ発酵プロセスの再構築, 日本農芸化学会 2019 年度大会 (東京), 東京農業大学, 2019 年

溝口尊春, 田代幸寛, 酒井謙二, 複合微生物系によるメタ乳酸発酵プロセスの再構築と機能解析, 第 25 回日本生物工学会九州支部鹿児島大会 (2018), 鹿児島大学, 2018 年

Takaharu Mizoguchi, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai, Reconstruction of a complex microbial system for producing optically pure L-lactic acid, JSBBA West 1st Student Forum, Fukuoka (Japan), 2018 年

Yukihiro Tashiro, Takeshi Zendo, Vichien Kitpreechavanich, Kenji Sonomoto, Kenji Sakai, Establish of efficient meta-fermentation process for optically pure lactic acid production from waste biomass using mixed culture system, The 2nd e-ASIA Joint Research Program Seminar, Laos, 2018 年 (国際, 招待)

田代幸寛, 酒井謙二, 宮本浩邦, 複合微生物系から考える発酵生産, 第 71 回日本生物工学会大会, 関西大学 (大阪), 2018 (招待)

田代幸寛, 石田勇貴, 木村 知弘, 奥川 友紀, 宮本 浩邦, 酒井 謙二, 異なる種菌による複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物生産, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学, 2018 年

溝口尊春, 古原俊哉, 田代幸寛, 宮本浩邦, 酒井謙二, 高光学活性 L-乳酸の生産のための複合微生物系の再構築, 第 69 回日本生物工学会大会, 早稲田大学, 2017 年

Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai, Establish of efficient meta-fermentation process for optically pure lactic acid production from waste biomass using mixed culture system", The 4th Satellite Seminar, New Core to Core Program A. Advanced Research Networks on "Establishment of an international Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas", Berlin (Germany), 2017 (国際, 招待)

古原俊哉, 田代幸寛, 酒井謙二, L-乳酸の生産のための混合培養系の再構築, 第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会 (2016), 九州工業大学飯塚キャンパス, 2016 年

Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai, Establish of efficient meta-fermentation process for optically pure lactic acid production from waste biomass using mixed culture system, THE 2nd JOINT SEMINAR, New Core to Core Program A. Advanced Research Networks on "Establishment of an international Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas", Chonburi (Thailand), 2016 (国際, 招待)

Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai, Establishment of efficient meta-fermentation process for value-added substance conversions with controlled mixed culture systems, 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2016), Miyazaki (Japan), 2016 (国際, 招待)

田代幸寛, Poudel Pramod, 奥川友紀, 酒井謙二, 複合微生物系からの体系的フィードバック分離法の開発と応用, 2016 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 長崎大学 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：酒井 謙二
ローマ字氏名：SAKAI Kenji
所属研究機関名：九州大学
部局名：大学院農学研究院
職名：教授
研究者番号（8桁）：50205704

(2)研究協力者

研究協力者氏名：古原 俊哉
ローマ字氏名：KOHARA Toshiya

研究協力者氏名：溝口 尊春
ローマ字氏名：MIZOGUCHI Takaharu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。