

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26740050

研究課題名(和文)好熱性バチルス属細菌による低環境負荷型・省エネ型新規乳酸生産プロセスの開発と解析

研究課題名(英文)Development and analysis of environmental friendly and energy saving lactic acid production process by thermophilic Bacillus sp.

研究代表者

田代 幸寛(Tashiro, Yukihiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90448481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コンポストより好熱性を示す新規なデンプン資化性L-乳酸生産菌Bacillus MC-07株を分離・同定し、Bacillus thermoamylovorans LMG 18084Tと99.2%の相同性を示すものの、異なる種であった。また、蒸煮デンプン(加熱してデンプン粉末を溶解したもの)12時間ごとにpH振動制御による直接乳酸発酵試験(糖化工程を伴わない)では、MC-07株の方が高い乳酸生産能を示した。さらに、無蒸煮デンプン(加熱せずに粉末状のデンプン)からも直接乳酸生産プロセスの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：New thermophilic L-lactic acid producing Bacillus sp. MC-07 strain with starch utilization was isolated and identified. This strain was different from Bacillus thermoamylovorans LMG 18084T at species level regardless of 99.2% similarity of 16S rRNA gene sequence. This strain showed higher lactic acid production by pH-swing control every 12 h using gelatinized starch with heat treatment than LMG 18084T strain. Furthermore, we could establish a direct lactic acid production process without saccharification process from non-gelatinized starch.

研究分野：環境微生物学

キーワード：デンプン Bacillus sp. MC-07株 直接高温乳酸発酵 L-乳酸光学純度

1. 研究開始当初の背景

(1) 常温性乳酸菌によるバイオマスからの乳酸発酵プロセス

資源の枯渇化や二酸化炭素排出による異常気象などの環境問題への方策として、再生可能でカーボンニュートラルな『バイオマス』を原料としたグリーンケミカル『乳酸』生産が期待されている。近年、乳酸はバイオプラスチック(ポリ乳酸)への利用が注目されているが、ポリ乳酸合成には光学活性乳酸であることが必要であるため、乳酸は光学活性乳酸生産微生物による乳酸発酵プロセスにより生産されている。そのほとんどでは、常温性乳酸菌(最適温度:25-40°C)が用いられている。しかしながら、乳酸菌には、高温での発酵が不可能であることや多量の窒素源(>10 g/L)の添加が必要、などの課題がある¹。

(2) 好熱性バチルス属細菌による乳酸発酵プロセス

高温乳酸発酵プロセスには、雑菌汚染に強いことに加えて、投入エネルギー(冷却水、殺菌にかかるエネルギー)が小さいなどの省エネ型メリットが存在する²。近年、好熱性バチルス属細菌を用いて、高温乳酸発酵プロセス(約50°C)が報告されつつある。申請者はこれまでに、多数のL-乳酸生産・好熱性バチルス属細菌を分離しており³、複数種のバチルス属細菌による生ゴミから高温L-乳酸生産(光学純度100%)にも成功している⁴。しかしながら、好熱性バチルス属細菌による効率的乳酸発酵プロセスに関する報告はわずか20~30報と乳酸菌に比べるとはるかに少なく、それらは主にグルコースを発酵原料とするものである。

2. 研究の目的

本研究では、「好熱性バチルス属細菌による低環境負荷型・省エネ型新規乳酸生産プロセスの開発と解析」を目的として、デンプンを用いて、糖化工程を伴わない直接乳酸発酵に関して以下の項目を検討した。

(1) 蒸煮デンプンからの高効率な直接高温L-乳酸生産プロセスの開発

(2) *Bacillus* sp. MC-07 株による無蒸煮デンプンを原料とする新規L-乳酸プロセスの開発

3. 研究の方法

(1) 蒸煮デンプンからの高効率な直接高温L-乳酸生産プロセスの開発

I. デンプン資化性好熱性乳酸生産 *Bacillus* 属細菌の分離、同定および性状解析

コンポストより寒天プレートを用いてデンプン資化性好熱性乳酸生産 *Bacillus* 属種 MC-07 株を分離した。MC-07 株を 16S rRNA 遺伝子解析および性状解析により同定した。

II. pH 振動制御法による *Bacillus* sp. MC-07 株と *B. thermoamylovorans* LMG 18084^T 株の発酵

挙動の比較

Bacillus sp. MC-07 および *Bacillus thermoamylovorans* LMG 18084^T を用いた。直接乳酸発酵試験を温度 50°C で、20 g/L 蒸煮デンプン・有機窒素源 0.001% 含有培地を用いて、pH6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 でそれぞれ 12 時間ごとに振動制御した回分発酵を行った。発酵液をサンプリングし、デンプン濃度、有機酸濃度を定量した。

(2) *Bacillus* sp. MC-07 株による無蒸煮デンプンを原料とする新規L-乳酸生産プロセスの開発

Bacillus sp. MC-07 を用いた。無蒸煮デンプンからの直接乳酸発酵試験を温度 50°C で、20 g/L 無蒸煮デンプン(粉末状)・有機窒素源 0.001% 含有培地を用いて、pH7.0 で 12 時間ごとに振動制御した回分発酵を行った。培地成分の改変、ヒートショックの有無、振とう速度、およびデンプンの種類(バレイショ、サゴ、サゴタピオカ)の影響を検討した。発酵液をサンプリングし、デンプン濃度、有機酸濃度を定量した。

4. 研究成果

(1) I. デンプン資化性好熱性乳酸生産 *Bacillus* 属細菌の分離、同定および性状解析⁵

コンポストより、デンプン加水分解せずに乳酸に変換できる MC-07 株を分離した。16S rRNA 遺伝子解析の結果、*Bacillus thermoamylovorans* LMG 18084^T と 99.2% の相同性を示したが、糖類発酵性の違いが大きく、*Bacillus* sp. MC-07 株と同定した。MC-07 株は内生孢子形成、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性で 50°C-62°C で活発に増殖する中等好熱性菌であった。

(1) II. pH 振動制御法による *Bacillus* sp. MC-07 株と *B. thermoamylovorans* LMG 18084^T 株の発酵挙動の比較⁵

発酵温度 50°C にて、窒素分を 0.001% しか含まず、炭素源を蒸煮デンプンとする培地で両菌株を用いて嫌氣的に直接乳酸発酵試験を行った。発酵液の pH を 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 でそれぞれ 12 時間ごとに振動制御した。その結果、両菌株とも pH7.0 で最大菌体濃度、最大乳酸生産濃度、最大乳酸生産性、最大乳酸選択性を示し、いずれの pH でも L-乳酸光学純度は 100% であった(表 1)。また、pH7.0 における MC-07 株と LMG18084 株のそれぞれの乳酸生産濃度(16.6 g/L、11.7 g/L)、乳酸生産性(0.701 g/L/h、0.195 g/L/h)、乳酸収率(0.977 g/g、0.789 g/g)、乳酸選択性(92.1%、57.0%)より、MC-07 の方が高い乳酸生産能を有することが明らかとなった(表 1)。

これまでに、蒸煮デンプンを用いた直接乳酸発酵に関する報告はあるが、本成果は、デンプンからの直接乳酸発酵に関する報告の中で、最小有機窒素源濃度(0.001%)、最高発酵温度(50°C)、L-乳酸光学純度(100%)、

乳酸収率 (0.977 g/g) となった。

表 1 MC-07 株と 18084^T 株による乳酸発酵

Strains	pH	濃度 (g/L)	収率 (g/g)	選択性 (%)	生産性 (g/L·h)
MC-07	6.0	6.40	0.653	66.7	0.133
	6.5	7.98	0.851	78.2	0.221
	7.0	16.6	0.977	92.1	0.701
	7.5	8.22	0.944	66.8	0.171
	8.0	1.79	0.364	43.3	0.029
LMG 18084 ^T	6.0	3.25	0.644	57.7	0.054
	6.5	8.01	0.877	56.3	0.111
	7.0	11.7	0.789	57.0	0.195
	7.5	5.90	0.771	53.6	0.082
	8.0	2.16	0.352	33.8	0.030

(2) *Bacillus* sp. MC-07 株による無蒸煮デンブンを原料とする L-乳酸発酵試験

(1) で使用した培地では、調製時の沈殿の発生に伴う乳酸生産濃度の低下など、乳酸生産が不安定であった。そこで、硫酸鉄からクエン酸鉄および塩化マグネシウムを硫酸マグネシウムに改変することで、沈殿の発生を防ぐことが可能であった。無蒸煮デンブンをを用いて、改変前の培地および改変培地を用いた乳酸生産濃度および乳酸選択性はそれぞれ 1.20 g/L と 15.8% および 1.31 g/L と 36.8% であった。改変培地でも同等以上の乳酸生産が得られたので、以後は改変培地を使用した。よって、無蒸煮デンブンからも *Bacillus* sp. MC-07 株による直接乳酸生産が可能であり、蒸煮に係るコスト削減の可能性が示された。

次に、リフレッシュ培養前のヒートショック処理が乳酸生産に与える影響を調べた。ヒートショックを 70°C で 1, 1.5, 2, 20 min 行った場合、最大乳酸生産濃度および乳酸選択性はそれぞれ 0.51 g/L と 34.5%, 0.42 g/L と 53.8%, 0.62 g/L と 38.0% および 0.84 g/L と 21.8% であった。一方、100°C で 1, 1.5, 2 min 行った場合、最大乳酸生産量と乳酸選択性はそれぞれ 1.13 g/L と 39.9%, 1.00 g/L と 43.7% および 1.73 g/L と 32.8% であった。よって、100°C でヒートショック処理を行うことによる乳酸生産の安定性の可能性が示唆された。

次に、発酵中の振とう速度が乳酸生産におよぼす影響を調べた。振とう速度 0, 90, 110, 120, 140 rpm において、最大乳酸生産量と乳酸選択性はそれぞれ 0.46 g/L と 64.4%, 0.30 g/L と 15.7%, 1.20 g/L と 93.0%, 0.73 g/L と 39.0%, 1.13 g/L と 64.4% であった。また菌体

増殖の指標となる ΔOD₆₆₀ (660 nm における濁度) はそれぞれ 0.132, 0.241, 0.740, 0.451, 0.635 であった。この結果から、振とう速度 110 rpm のとき乳酸生産量および菌体増殖は最も高く、ΔOD₆₆₀ も最も高い値となったため、発酵試験における振とう速度は 110 rpm が最適であると考えられた。

次に、原料となるデンブン種の影響を調べた。サゴデンブン、バレイショデンブン、タピオカデンブンをを用いた発酵試験において、最大乳酸生産濃度と乳酸選択性はそれぞれ 0 g/L と 0%, 1.31 g/L と 59.0%, 0.63 g/L と 24.8% となり、サゴデンブンからの乳酸生産がなかった。蒸煮デンブンをを用いた直接乳酸発酵の報告では、サゴデンブンをを用いた場合に最大乳酸生産濃度が得られており、無蒸煮デンブンをを用いた場合と乳酸生産におよぼす効果が異なることが示唆された。

これまでに、無蒸煮デンブンをを用いた直接乳酸発酵は 2 例報告がある。本研究成果は既報と比較して、最高発酵温度 (°C), 最小有機窒素濃度 (0.001%), 最安培地コスト (43.2 yen/L) および最高乳酸収率対有機窒素濃度 (138 g/g) を示した (表 2)。今後、乳酸生産濃度を向上させることにより、さらなる乳酸生産の高効率化が期待できる。

表 2. MC-07 株および既報との無蒸煮デンブンからの直接乳酸発酵

使用菌株	温度 (°C)	有機窒素 (%)	濃度 (g/L)	選択性 (%)	培地コスト (yen/L)	窒素源収率 (g/g)
<i>S.bovis</i> 148	37	1.75	14.73	nd	5536.1	0.84
<i>Lb.plantarum</i>	30	1	41	nd	168.3	4.1
<i>Bacillus</i> sp. MC-07	50	0.001	138	36.8	43.2	138

< 引用文献 >

- 1) Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnology Advances*, 31, 877–902, 2013
- 2) Poudel P, Tashiro Y, Sakai K. New application of *Bacillus* strains for optically pure L-lactic acid production: general overview and future prospects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80, 642–654, 2016
- 3) Tongpim S, Meoydong R, Poudel P, Yoshino S, Okugawa Y, Tashiro Y, Taniguchi M, Sakai K. Isolation of thermophilic L-lactic acid producing bacteria showing homo-fermentative manner under high aeration condition, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 318–324, 2014
- 4) Tashiro Y, Matsumoto H, Miyamoto H, Okugawa Y, Poudel, Miyamoto H, Sakai K. A novel production process for optically pure L-lactic acid from kitchen refuse using a bacterial consortium at high temperatures. *Bioresource Technology*, 146, 672–681, 2013

- 5) Poudel P, Tashiro Y, Miyamoto H, Miyamoto H, Okugawa Y, Sakai K. Direct starch fermentation to L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain, *Bacillus* sp. MC-07. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42, 143-149, 2015
- 6) Shibata K, Flores DM, Kobayashi G, Sonomoto K. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. *Enzyme Microbial Technology*, 41, 149-155, 2007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

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生産プロセスの開発と制御. *バイオサイエンスとインダストリー*, 査読無, 第 72 巻, 第 6 号, 486-487, 2014

Pramod Poudel, Yukihiro Tashiro, Hirokuni Miyamoto, Hisashi Miyamoto, Yuki Okugawa, Kenji Sakai. Direct starch fermentation to L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain, *Bacillus* sp. MC-07. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 査読有, Vo. 42, No.1, 143-149, 2015, doi: 10.1007/s10295-014-1534-0

Pramod Poudel, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai. New application of *Bacillus* strains for optically pure L-lactic acid production: general overview and future prospects. *Bio science, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vo.80, No.4, 642-654, 2016. (DOI:10.1080/09168451.2015.1095069)

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*, 査読有, Vol.216, 52-59, 2016, doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.031

〔学会発表〕(計 11 件)

井ノ口翔太, 石橋侑子, 田代幸寛, 酒井謙二. 複合微生物系を活用したメタ発酵における発酵諸条件の影響, 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 佐賀大学, 2014 年 9 月

石田勇貴, 井ノ口翔太, 田代幸寛, 酒井謙二. 複合微生物系を用いたメタ発酵に及ぼす種菌と温度の影響, 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 佐賀大学, 2014 年 9 月 (口頭発表, 査読なし)

Pramod Poudel, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai. Development of total recycle system of food waste biomass to produce value added

products under thermophilic conditions. International Scientific Conference in Environmental Research, Lumbini (Nepal), 2014 年 11 月

Pramod Poudel, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai. Mixed culture system for sustainable utilization of food waste biomass to produce value added products under high temperature. The 8th International Symposium on the East Asian Environmental Problems (EAEP2014), Fukuoka (Japan), 2014 年 12 月

鷹川恵利, 藤崎紗織, 奥川友紀, 田代幸寛, 酒井謙二. スクロースを炭素源とした高温 L-乳酸発酵における生ゴミ中の発酵促進因子, 第 21 回日本生物工学会九州支部大会(2014), 熊本大学, 2014 年 12 月

田代幸寛, 井ノ口翔太, 石橋侑子, 宮本浩邦, 奥川友紀, 酒井謙二. 複合微生物系による有価物発酵生産(メタ発酵)における発酵諸条件の影響. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学, 2015 年 3 月

古原俊哉, プラモド ポウデル, 奥川友紀, 田代幸寛, 酒井謙二. L-乳酸の生産のための混合培養系の構築. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場, 2015 年 6 月

Clament Chin Fui Seung, Pramod Poudel, Hirokuni Miyamoto, Yuki Okugawa, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai. A novel bacterial species of yet unidentified genus isolated from thermophilic compost prepared from marine animal resources material. 2015 年第 30 回日本微生物生態学会土浦大会, 土浦亀城プラザ, 2015 年 10 月

石橋侑子, Pramod Poudel, 奥川友紀, 田代幸寛, 宮本浩邦, 酒井謙二. 無蒸煮デンプンの直接高温乳酸発酵に関する研究. 第 67 回日本生物工学会大会, 城山観光ホテル(鹿児島), 2015 年 10 月

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. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 2016 年 3 月 (招待講演)

Clament Chin Fui Seung, Pramod Poudel, Hirokuni Miyamoto, Yuki Okugawa, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai. Characterization of a novel bacterium species isolated from thermophilic compost prepared from marine animal resources material. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 2016 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: デンプンから生分解性プラスチック原料の L 型乳酸を高効率に生産可能な好熱菌

資材，並びにL型乳酸の製造方法
発明者：酒井謙二，田代幸寛，プラマド ポ
ウデル，宮本浩邦，宮本久
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2014-194405
出願年月日：2014 年 9 月 4 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004553/>

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/dobi/>

6．研究組織

(1)研究代表者

田代 幸寛 (TASHIRO Yukihiro)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：90448481

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

酒井 謙二 (SAKAI Kenji)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：50205704