

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07809

研究課題名(和文) 非加熱・無殺菌米副産物を単一原料とした環境調和型光学活性乳酸生産法の開発

研究課題名(英文) Development of optically active lactic acid producing system from non-sterilized by-product of the rice as single raw material using the environment-conscious bioprocess.

研究代表者

渡辺 昌規 (WATANABE, Masanori)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：20320020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高乳酸生成菌である*L. rhamnosus* M-23株のプロテアーゼ活性値は、他の分離菌よりも高く、T-RFLP法によるSSF培養液中菌叢構造解析の結果、培養初期にM-23株を含むSSF培養液中において、*Clostridium*属 クラスタ IXとXIVaから成るドミナントの形成が認められた。それに対し、低乳酸生成菌では、*Clostridium*属 クラスタ IXを主とするドミナントの形成と乳酸濃度の低下が認められた。これらの結果より、菌体外プロテアーゼによるデンプン表層のタンパク質成分の除去、*Clostridium*属 クラスタIXのドミナント形成抑制の相乗効果により、高乳酸生成が可能となった

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that extracellular protease activity of a high lactic acid producing bacterium *Lactobacillus rhamnosus* M-23 was relatively higher than the other isolated LABs from a rice washing drainage storage tank. The results of the T-RFLP analysis showed that SSF culture inoculated with strain M-23 was dominated by *Clostridium* sp. cluster IX and XIVa at an early stage of SSF culture, respectively. In comparison with an inoculation of relatively low lactic acid producing strain, *Clostridium* sp. cluster IX mainly dominated with the high accumulation of VFAs (acetic and propionic acid) and the decrease of produced lactic acid in SSF culture compared with the case of strain M-23 inoculation. These results demonstrated the synergetic effect of proteinaceous material removal of the starch particle surface by extracellular protease as well as a repressive effect of dominance formation of *Clostridium* sp. cluster IX in SSF culture.

研究分野：バイオマス資源学

キーワード：光学活性乳酸 米加工副産物 菌体外プロテアーゼ T-RFLP法

1. 研究開始当初の背景

(1)米由来非可食部バイオマスである洗米排水、米糠はそれぞれ、糖化酵素である -glucosidase、-amylase を含有していることが知られている。これらを背景に、洗米排水、米糠を混合することにより、糖化酵素を別途供給に依存しない SSF (同時糖化発酵) を着想し、その結果、澱粉の速やかな糖化、エタノール生成の双方を認めた。さらに、洗米排水から米由来バイオマス資化性を有する L-乳酸生成乳酸菌 (*L. rhamnosus* strain M-23) を新たに分離・同定し、非加熱・無殺菌状態の洗米排水・米糠混合物を単一基質とした乳酸生成試験に供した結果、高濃度且つ、高光学純度 (95%以上) の L-乳酸生成を認めた。また興味深い知見として、基本培地により培養した分離菌株の培養液中プロテアーゼ活性値 (*in vitro*) と生成乳酸濃度との間に高い相関性を認めた。以上を踏まえ、乳酸生成時における洗米排水、米糠からの糖質、糖化酵素、栄養供給ならびにプロテアーゼ活性、デンプン表層構造等の複合的要因を解明、最適化を検討する事により、非加熱・無殺菌状態の当該バイオマスからの更なる乳酸生成を可能にする着想を得た。

(2)乳酸製造時における SSF 発酵液中の微生物叢と乳酸生成能との関係を理解することは、当該バイオマスを原料とした高乳酸生成機構の解明ならびに、実用化を前提とした当該乳酸生成プロセスの構築に不可欠な基礎的知見を与えることが可能と考えられる。しかしながら、現在までに、非加熱・無殺菌バイオマスの SSF 発酵液中における乳酸生成菌を含む優勢微生物種の形成、バイオマスに常在する微生物叢の動態と光学活性乳酸生成への関与等、ほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

米の副産物である洗米排水、米糠は、国内自給が可能な未利用バイオマスであり、その有効利活用技術が求められている。本研究では、発酵法による米由来バイオマスを単一原料とした、高光学純度 D-、L-乳酸の低コスト生産技術の開発を目的とし、次の3点を明らかにすることを目的とした。

(1)非加熱・無殺菌状態の洗米排水・米糠混合物を糖質、糖化酵素および栄養供給源として利用可能な新規乳酸菌の分離とその生理・生化学的特徴および高乳酸生成機構を解明する。

(2)SSF による新規高光学化性乳酸生成プロセスを構築する。

(3)SSF 発酵液中の乳酸菌を含む微生物叢と乳酸生成との関係を理解する。

3. 研究の方法

(1)非加熱・無殺菌状態の洗米排水・米糠混合物を糖質、糖化酵素および栄養供給源として利用可能な新規乳酸菌の分離とその生

理・生化学的特徴および高乳酸生成機構の解明

GYP-炭酸カルシウム寒天培地、MBCP 寒天培地を用い、無洗米製造装置より回収された洗米排水から乳酸生成微生物を分離、さらに、洗米排水・米糠混合物を単一基質とした回分培養試験に供し、分離菌株から高光学活性乳酸生成菌のスクリーニングを実施した。

分離株の基質資化性、生理的性質の特徴付けは、アピウェブデータベース解析、SEM 観察によりそれぞれ行った。乳酸生成分離株の *in vitro* プロテアーゼ生成能の評価は、アゾコラーゲン、アゾカゼインを基質としたプロテアーゼ活性試験により実施した。SSF 発酵液中バイオマス (不溶性糖質成分) 表層構造は、SEM-EDX、FT-IR により実施した。

(2)SSF による高乳酸生成プロセスの構築

微生物培養装置を用い、環境因子である pH、培養温度の最適化及び窒素置換による嫌気雰囲気条件の付与を行った。SSF 培養液上清画分中の発酵生成物 (乳酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、エチルアルコール)、生成乳酸の光学活性は、HPLC により、定性・定量分析を実施し、当該バイオマスからの乳酸生成効率等の物質収率の評価を行った。

(3)SSF 発酵液中の乳酸菌を含む微生物叢と乳酸生成との関係の理解

研究目的(1)により得られた光学活性乳酸の生成能を有する分離菌株を洗米排水・米糠混合物を単一原料とした SSF による乳酸生成試験に供した。SSF 発酵液中の微生物菌叢構造解析は T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法により実施した。SSF 発酵液から DNA を回収後、PCR により全真正細菌の 16SrDNA 断片の増幅後、制限酵素処理 (制限酵素 *Bs* I I) を実施した。その後、上記により得られた DNA フラグメントは、DNA シークエンサにより分析後、解析ソフトウェア (Gene Maths) によりフラグメント解析を実施した。

4. 研究成果

(1)洗米排水より高光学純度 (光学純度 95%以上) の L(+) 乳酸を当該バイオマスより、それぞれ生成可能な乳酸生成菌の分離を行い、既に高乳酸生成菌としてスクリーニングされている 5 株高乳酸生成菌において、光学純度 97%以上の L(+) 乳酸の生成を認めた。

上記 5 株の分離株は、16SrDNA 塩基配列に基づく分子系統解析による微生物同定、生理・生化学的特徴付けを実施した結果、嫌気性グラム陽性桿菌 *L. rhamnosus*、*L. paracasei* であることを明らかにした。また、分離された高乳酸生成菌の SSF 発酵液中プロテアーゼ活性 (*in vitro*) の値は、図 1 に示す通り、他の乳酸生成菌 (低乳酸生成菌) と比べ高い値を示した。

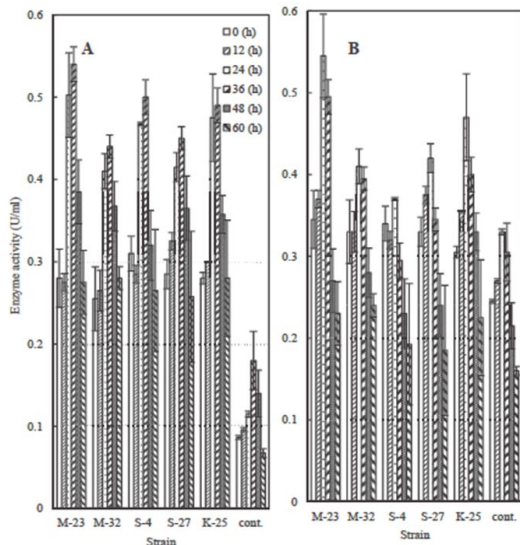


図1 分離乳酸生成菌のSSF発酵液中プロテアーゼ活性

FT-IR による SSF 発酵液中に含有する糖質バイオマス (固形成分) 表面構造解析の結果、デンプンに特異的な官能基由来の吸収 (C-O, C-C) と乳酸生成との間に高い相関関係を示すこと (図2) さらに、SSF 発酵液中プロテアーゼ活性 (*in vitro*) 値と乳酸生成との間にも高い相関 (図3) が認められたことから、高乳酸生成菌の高乳酸生成能は、菌体外プロテアーゼが SSF において、原料である米副産物に対して、糖化・乳酸発酵を促進するリファイナリー機能を果たしていることが示唆された。

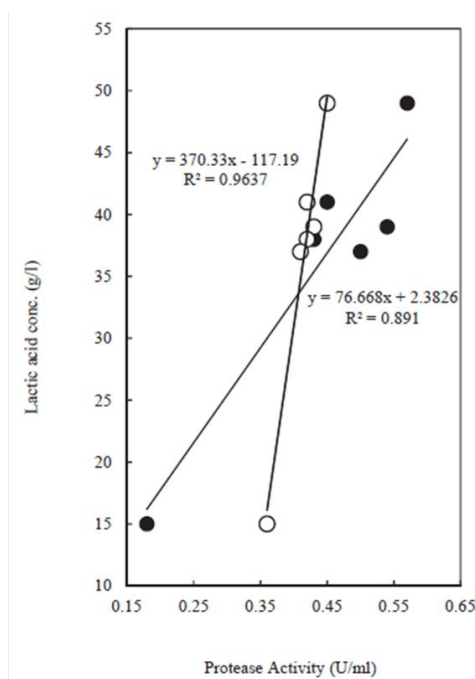


図2 SSF発酵液中プロテアーゼ活性と乳酸生成との関係

(2) 微生物培養装置を用い、SSF による高乳酸生成プロセスの最適化を行った結果、至適培養温度、pH 値はそれぞれ、37、6.5であった。また、上記(1)の結果より、菌体外

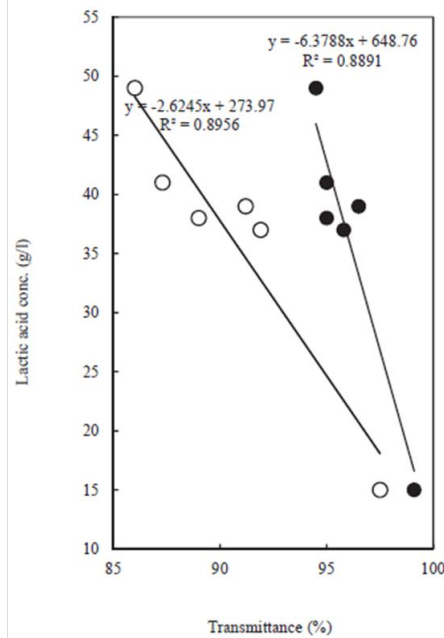


図3 SSF発酵液中乳酸濃度と澱粉 (固形成分) の特定官能基 (C-O, C-C伸縮) 由来FT-IR透過率値との関係

プロテアーゼがリファイナリー機能を有し、糖化・乳酸発酵を促進させる効果が認められた事から、任意でプロテアーゼを SSF 発酵液中に添加したところ、生成乳酸濃度の値の変化は認められなかったが、乳酸生成速度の増大が認められた。

(3) T-RFLP 法による SSF 発酵液中の乳酸菌を含む微生物叢解析の結果、培養初期に高乳酸生成菌である *L. rhamnosus* strain M-23 株を含む SSF 培養液中において、Clostridium 属 クラスタ IX (約 40%) と クラスタ XIVa (約 10%) の双方から成るドミナントの形成が認められた。その後、培養時間の経過とともに、Lactobacillales 目によるドミナント

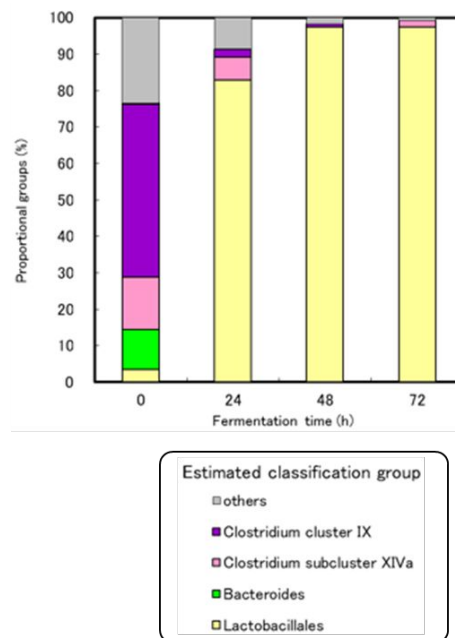


図4 洗米排水・米糠混合物を基質としたSSF発酵液中微生物叢構造の経時変化 (*L. rhamnosus* M-23株)

形成が認められた(図4)。それに対して、低乳酸生成菌株である *L. paracasei* strain S-4 株では、培養初期から Clostridium 属 クラスタ-IX を主とするドミナントの形成(約70%)(図5)と高濃度のプロピオン酸、酢酸等の低級脂肪酸の生成、生成乳酸濃度の低下が認められた(data not shown)。Clostridium 属 クラスタ-XIVa は、乳酸、酢酸、酪酸、フマル酸の生成能を有する微生物種が含まれているのに対し、Clostridium 属 クラスタ-IX は、乳酸から酢酸及びプロピオン酸を生成する微生物種を含んでいるため、本菌群のドミナント形成はSSF培養液中に生成・蓄積された乳酸を消費し低級脂肪酸等を生成するため、乳酸生成に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。このことから、Clostridium 属 クラスタ-IX の菌叢形成を任意で抑えることにより、さらなる高乳酸生成の可能性が示唆された。

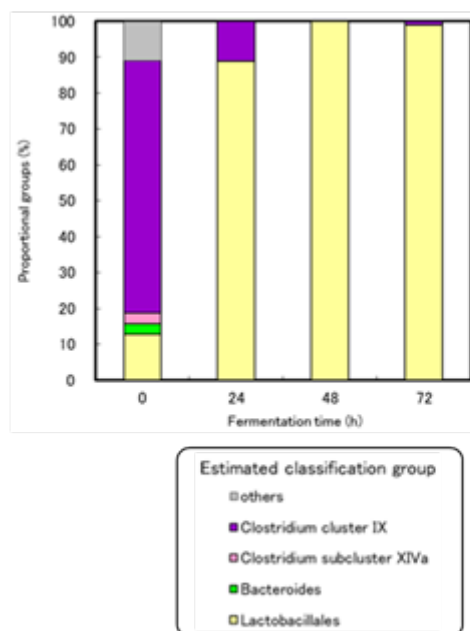


図5 洗米排水・米糠混合物を基質としたSSF発酵液中微生物叢構造の経時変化 (*L. paracasei* S-4株)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

M. Watanabe, C. Techapun, A. Kuntiya, N. Leksawasdi, P. Seesuriyachan, T. Chaiyaso, S. Takenaka, I. Maeda, M. Koyama and K. Nakamura:

Extracellular protease derived from lactic acid bacteria stimulates the fermentative lactic acid production from the by-products of rice as a biomass refinery function. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読あり, Vol. 123, No. 2, 245-251 (2017)

〔学会発表〕(計6件)

M. Watanabe, C. Techapun, N. Leksawasdi, A.

Kuntiya, P. Seesuritachan, T. Chaiyaso, S. Takenaka (2016): Recovery of protein and phosphorus compound and fermentative lactic acid production from defatted rice bran by using pilot scale plant. JSPS Core to core program A (CCP), Advanced research networks, the 2nd joint seminar, 14-15 November 2016, Chonburi, Thailand.

M. Watanabe, C. Techapun, A. Kuntiya, N. Leksawasdi, P. Seesuriyachan, T. Chaiyaso and S. Takenaka, Extracellular protease derived from lactic acid bacteria stimulates the fermentative lactic acid production from the by-products of rice as a biomass refinery function. The 7th International conference on fermentation technology for value added agricultural products (FerVAAP2017) & The 12th Asian biohydrogen & Biorefinery Symposium with joint session from JSPS-NRCT New Core to Core Program A. Advanced research networks. 25-28 July 2017. Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen, Thailand.

渡辺昌規、米由来副産物のバイオリファイナリー技術開発とその事業化への取り組み、2017年度北日本支部シンポジウム“生物プロセスによるモノづくり・資源循環を目指して”、日本生物工学会、2017年10月23日、札幌

Y. Yamamura, C. Techapun, A. Kuntiya, N. Leksawasdi, P. Seesuriyachan, T. Chaiyaso, S. Takenaka and M. Watanabe. Characteristics of fermentative *L*-(+)-lactic acid production from non-sterilized by-product of rice by LAB's and its relationship with formation of microbial consortia in SSF. The international conference on food and applied bioscience (FAB2018). 1-2 February 2018. The Empress hotel, Chiang Mai, Thailand

渡辺昌規、山村勇太、牧野将浩、柏村崇、竹中慎治、塩野忠彦、佐々野和雄、非加熱・無殺菌米副産物からの光学活性乳酸の生成とSSF中微生物菌叢構造との関連、日本農芸化学会、2018年3月16日、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺昌規 (WATANABE, Masanori)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：20320020

(2)研究協力者

佐々野和雄 (SASANO, Kazuo)
柏村崇 (KASHIWAMURA, Takashi)
塩野忠彦 (SHIONO, Tadahiko)