

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05920

研究課題名(和文) 微生物叢任意制御による非加熱・無殺菌米副産物からの光学活性乳酸生産法の開発

研究課題名(英文) Development of production method of high-optically pure lactic acid from non-sterilized biomass derived from rice manufacturing process by the arbitrary control of microbial flora in SSF.

研究代表者

渡辺 昌規 (Watanabe, Masanori)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：20320020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光学活性乳酸生成菌(*L. rhamnosus* M23)を用いた、同時糖化発酵(SSF)による非加熱・無殺菌状態の米由来バイオマスからの高乳酸生成について検討を行った結果、SSF培養液中に抗菌性ペプチドの生成は認められなかったものの、T-RFLP法によるSSF中菌叢構造解析の結果、SSFへの酸性プロテアーゼの添加、pH・酸素分圧の任意制御により、乳酸資化性を示す*Clostridium*(属)クラスターIX, XIVa及び*Bacteroides*目による菌叢形成抑制、低級脂肪酸・エタノールの生成抑制の相乗効果により、高光学活性乳酸の生成が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題は、SSF発酵液中のバイオマス表層構造、菌体外プロテアーゼ等酵素系の挙動及び機能、微生物群集構造などの複合的要因と乳酸生成能の関係を解明し、「米副産物を原料とした環境調和型高光学活性乳酸製造技術を確立する」点に学術的特徴がある。本研究の実施により、米由来バイオマスを非加熱・無殺菌状態のまま、乳酸製造の炭素源、栄養源、糖化酵素供給源として安定的に利用可能となれば、当該バイオマスの再資源化の促進のみならず、関連する廃棄物・廃水の減量化、資源・エネルギー循環社会形成等、産業化にも社会的にもその波及効果は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluate the high-optically pure lactic acid production from non-sterilized biomass derived from rice by a newly isolated high-optically pure lactic acid producing bacterium (*L. rhamnosus* M23) under SSF cultivation. Antibacterial peptides were not produced in SSF culture. From the results of the T-RFLP analysis of SSF microbial flora, High lactic acid production was attained by the synergetic effect of decrease of dominance formation of *Clostridium* sp. cluster IX, XIVa and *Bacteroidales*, low accumulation of lower fatty acids and ethanol by the addition of acidic protease, pH control and oxygen partial supply SSF.

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 T-RFLP法 バイオマスリファイナリー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生分解性プラスチックであるポリ乳酸(PLA)は、可塑剤の開発ならびに、抗菌性を有する機能性素材としての需要増に伴い、PLA モノマー(原料)である乳酸の需要も近年高まりつつある。PLA は、その熱安定性を高める際に、光学純度の高いD-乳酸およびL-乳酸モノマーを必要とするため[1]、ラセミ体乳酸を生成する化学合成法に比べ、光学純度の高い乳酸を生成可能な発酵法による低コスト乳酸生成技術の確立が急務とされている。この事に関連し、発酵法による様々なバイオマスから安価なD-, L-乳酸の生成が試みられているが[2]、乳酸菌は高い栄養要求性を示すため、乳酸生成時に高価な酵母エキス、ポリペプトン等の供給が不可欠である上、澱粉を糖質として用いる場合、別途、液化・糖化プロセス等の付加的なコストを要する。従って、安価なバイオマスの利活用が可能とされる発酵法による乳酸生成の優位性が十分に生かされていない状況にある。

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  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase を含有していることが知られている[3]。そこで申請者は、洗米排水、米糠を混合することにより、別途糖化酵素の供給に依存しないSSF(同時糖化発酵)を着想し、澱粉の速やかな糖化、エタノール生成の双方を認めた[4]。さらに、洗米排水から米由来バイオマス資化性を有する高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[5]。2015年には、分離菌株の生成乳酸濃度とSSF発酵液中のプロテアーゼ活性値との間に高い相関性を有する事、米由来バイオマス中のデンプン粒子表面構造が培養初期段階からダイナミックに変化し、デンプンの結晶構造が露出する事をSEM、FT-IR解析により見出し、分離菌株により産生されたプロテアーゼがSSFを促すリファイナリ機能を有していることが示された[6]。また、2017年には、SSF培養液中微生物叢解析(T-RFLP)の結果、高L-乳酸生成乳酸菌であるM-23株において、培養初期(培養開始~24時間後)に、Clostridium(属)クラスターIX, XIVa, Bacteroides目から成る菌叢を形成し、その後、Lactobacillales目によるドミナント形成(80%以上)が認められた。それに対し、低L-乳酸生成乳酸菌は、培養初期にClostridium(属)クラスターIXによる菌叢形成と顕著なプロピオン酸生成と乳酸濃度の低下が認められた。このことは、SSF培養液中の微生物叢構造が乳酸生成・蓄積に影響を与えていることを示唆しており、安定且つ、効率的な乳酸生成を可能にするためには、乳酸製造時におけるSSF培養液中の微生物叢と乳酸生成能との関係を理解するとともに、プロテアーゼ(分離菌株由来)の微生物叢形成への関与について明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

米加工副産物(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。本課題では、米由来バイオマスを単一原料とした、非加熱・無殺菌プロセスによる光学活性乳酸の低コスト発酵生産技術の開発に関して研究を行う。洗米排水から分離された米由来バイオマス資化性を有する高L-乳酸生成乳酸菌(*L. rhamnosus* strain M-23)は、プロテアーゼを菌体外に産生することにより、バイオマス表面構造を改変し、高光学活性乳酸生成を可能にしている。また、使用菌株により、異なる微生物叢を形成し、乳酸生成に影響を与えている。本課題では、乳酸生成とSSF発酵液中微生物叢との関連性、微生物叢形成に与える菌体外プロテアーゼの影響を理解し、微生物叢任意制御による米副産物からの高光学活性乳酸生成の安定・高効率化技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分子的生物学的手法によるSSF発酵液中の微生物叢と乳酸生成能の関連

高光学活性乳酸生成能を有する分離菌株を非加熱・未殺菌の洗米排水・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、得られたSSF発酵液中の微生物叢構造解析は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(*Bs1* I)を実施した。その後、得られた上記DNA断片は、DNAシーケンサにより分析後、解析ソフトウェア(Gene Maths)によりフラグメント解析を実施する。本解析により明らかとなったSSF中菌叢構造と乳酸生成およびその他発酵生成物との関連について考察する。

#### (2) SSF発酵液中の微生物叢形成に与える分離菌(乳酸生成菌)由来プロテアーゼとの関連をタンパク質・ペプチド、菌叢解析

米糠にはオリザスタチンなどの抗菌性ペプチドを含有するほか、乳酸生成菌の産生するバクテリオシンはClostridium(属)に対し抗菌活性を示す。しかしながら、プロテアーゼは、その

作用により抗菌ペプチドを分解することが知られている。本検討では、分離菌株（乳酸生成菌）のバクテリオシン生成能、同時に産生するプロテアーゼのSSF菌叢構造に与える影響をタンパク・ペプチド解析、プロテアーゼ/プロテアーゼ阻害剤添加によるSSF乳酸生成試験/微生物菌叢構造解析により明らかにする。

### (3)SSF発酵液中の微生物叢の任意制御による光学活性乳酸の生成の効率化と安定性向上のための基盤的情報の取得

現有設備である微生物培養装置を用い、環境因子であるpH、酸化還元電位(ORP)、溶存酸素濃度(DO)の制御培養により、乳酸生成に悪影響（低級脂肪酸、アルコール類の副生）を与える微生物群（検討項目1,2の結果を反映）をターゲットにした任意微生物叢制御を実施し、高乳酸生成条件を確立する。併せて、微生物叢構造の再評価を実施するとともに、基質・生産物の定性・定量分析結果を基に、当該バイオマスからの乳酸生成効率等、生産性評価の際に必要な生物化学工学的知見を蓄積する。

## 4. 研究成果

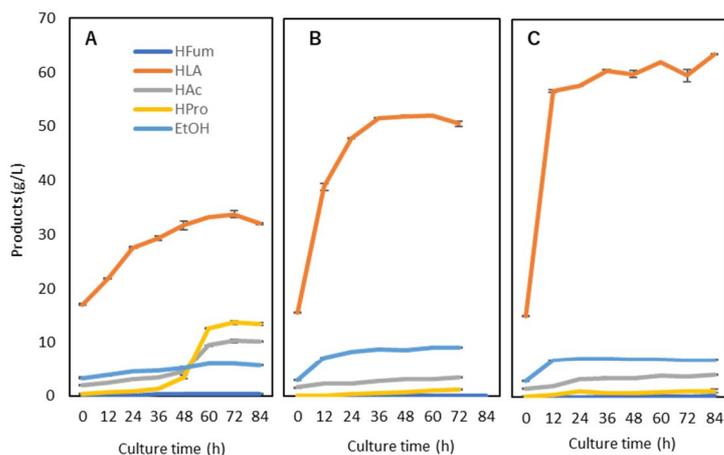


図1 洗米排水・米糠混合物を単一原料としたSSF発酵液中発酵生成物濃度の経時変化 (A: コントロール, B: pH制御, C: pH制御+プロテアーゼ添加, 使用菌株: *L. rhamnosus* M23株)

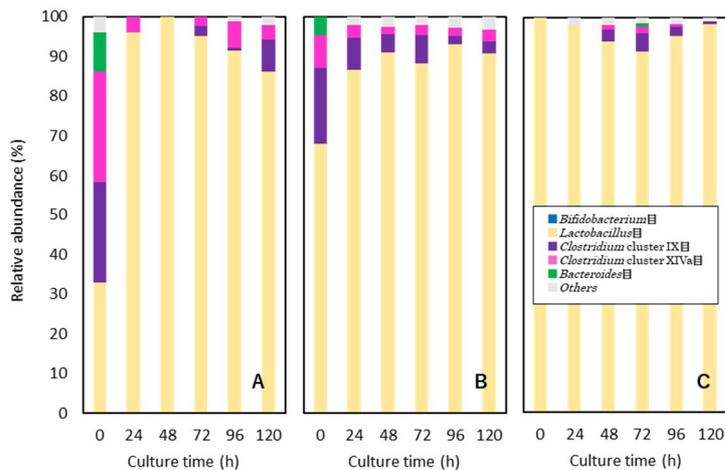


図2 洗米排水・米糠混合物を単一原料としたSSF発酵液中微生物菌叢構造の経時変化 (A: コントロール, B: pH制御, C: pH制御+プロテアーゼ添加, 使用菌株: *L. rhamnosus* M23株)

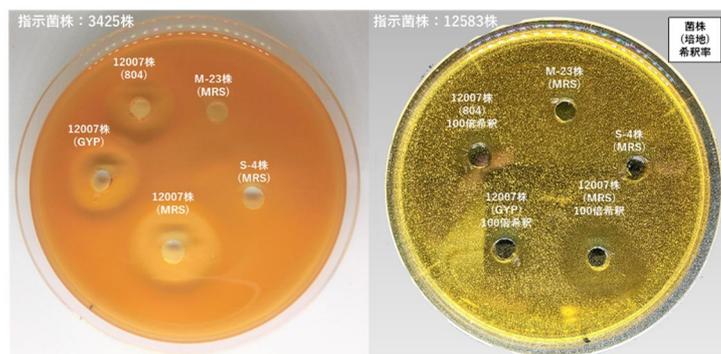


図3-1 寒天ゲル法による抗菌活性試験(指示株: 3425株) 図3-2 寒天ゲル法による抗菌活性試験(指示株: 12583株)

(1)非加熱無殺菌米由来副産物を基質とした同時糖化発酵(SSF)における乳酸を含む発酵産物の生成および菌叢構造の経時変化に与えるpH値制御、プロテアーゼ添加の効果について検討を実施した結果を、図1、2に示す。

pH制御(図1-B)により、pH未制御(図1-A)と比べ、SSF中乳酸濃度の増大が認められた。pH未制御では、培養中期(48-60h)に酢酸、プロピオン酸などの低級脂肪酸の生成が認められていたが、pH制御(pH6.5)により、低級脂肪酸類の生成が抑えられ、乳酸生成濃度の向上につながったものと推察された。pH未制御における菌叢構造解析の結果(図2-A)、培養初期において、乳酸を資化し低級脂肪酸の生成能を有するClostridium(属)クラスターIX, XIVaがドミナントの形成が認められた。このことから、上記、pH未制御時の低乳酸生成は、この微生物群による乳酸資化と低級脂肪酸生成に起因するものと考えられた。また、プロテアーゼ添加は、特に培養初期(0-12h)における乳酸生成を促進し、乳酸生成菌による安定したドミナント形成が認められた。

(2)上記(1)の結果より、微生物叢形成が乳酸生成に影響を与えており、微生物叢形成に影響を与える因子として、乳酸菌が生成する抗菌性ペプチドが関与している可能性がある。そこで、高乳酸生成菌であるM-23株、低乳酸生成菌であるS-4株を供試菌株として、寒天ゲル法による抗菌活性試験を実施した(図3-1, 3-2)。その結果、上記の両乳酸生成菌において、指示菌株(*L.*

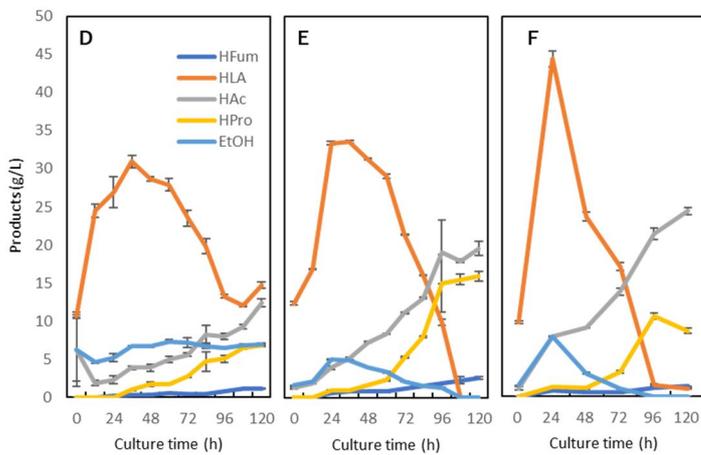


図4 洗米排水・米糠混合物を単一原料としたSSF発酵液中で発酵生成物濃度の経時変化 (D: コントロール (N<sub>2</sub>置換)、E: 通気有 (Air 0.1 vvm)、F: 通気有 (Air 0.3 vvm)、使用菌株: *L. rhamnosus* M23株)

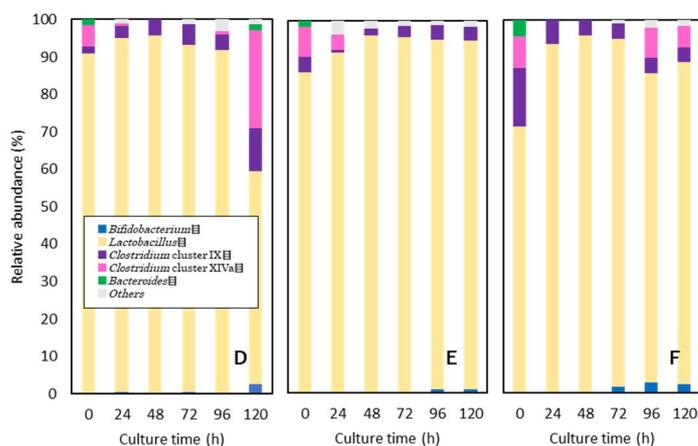


図5 洗米排水・米糠混合物を単一原料としたSSF発酵液中で微生物菌叢構造の経時変化 (D: コントロール (N<sub>2</sub>置換)、E: 通気有 (Air 0.1 vvm)、F: 通気有 (Air 0.3 vvm)、使用菌株: *L. rhamnosus* M23株)

*rhamnosus* NBRC 3425、*B. coagulans* NBRC 12583) に対する抗菌活性は認められなかった。したがって、SSF菌叢構造変化にバクテリオシンの関与は低いものと推察された。

(3) 通気量の増大に伴い、生成乳酸の値は増大する傾向を示し、0.3L air/min 通気下において、44.3g HLA/l (培養開始24時間後)までに達した(図4-F)。生成された乳酸は、最高濃度に達した後、全ての条件において、培養時間の経過とともに、減少する傾向を示した。それに対し、酢酸、プロピオン酸は、培養開始直後から濃度の増大が認められ、エタノールは、通気条件下(図4-E, F)において、乳酸と同様に、生成・蓄積後、減少する傾向を示した。

図5において、通気条件下では、培養初期から *Lactobacillus* 目によるドミナント形成が認められ、培養後期から *Bifidobacterium* 目が検出されている。

*Bifidobacterium* 目は、ピフィズス型ヘテロ乳酸発酵能を有し、グルコースから乳酸、酢酸生成し、酸化ストレス下においては、エタノールからアセトアルデヒドを生成する事が知られている。このことから、通気操作により生成促進が認め

られた、酢酸、アセトアルデヒドの生成・蓄積を抑えたSSFによる安定した乳酸生成を可能にするにあたり、より厳密な通気制御による菌叢構造の任意制御による乳酸生成後の乳酸の代謝管理の重要性が明らかとなった。

#### < 引用文献 >

- [1] Okano et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.85: 413-423 (2010)
- [2] Gao et al., *Biotech. Adv.*, Vol. 29: 930-939 (2011)
- [3] Iwata et al., *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 93(3): 296-302 (2002)
- [4] Watanabe et al., *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 108(6): 524-526 (2009)
- [5] Watanabe et al., *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 115(4): 449-452 (2013)
- [6] Watanabe et al., *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 123(2): 245-251 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 渡辺昌規、板垣泰士、阿部龍也、遠藤修二郎、星野友紀、西澤隆	4. 巻 18
2. 論文標題 低真空窒素置換加熱法による新規米糠安定化技術の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 山形大学紀要（農学）	6. 最初と最後の頁 11-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chaiyaso Thanongsak, Srisuwan Wimada, Techapun Charin, Watanabe Masanori, Takenaka Shinji	4. 巻 48
2. 論文標題 Direct bioconversion of rice residue from canteen waste into lipids by new amylolytic oleaginous yeast <i>Sporidiobolus pararoseus</i> KX709872	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Preparative Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 361～371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10826068.2018.1446155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Masanori, Yamada Chikako, Maeda Isamu, Techapun Charin, Kuntiya Ampin, Leksawasdi Noppol, Seesuriyachan Phisit, Chaiyaso Thanongsak, Takenaka Shinji, Shiono Tadahiko, Nakamura Kozo, Endo Shujiro	4. 巻 99
2. 論文標題 Evaluating of quality of rice bran protein concentrate prepared by a combination of isoelectronic precipitation and electrolyzed water treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 LWT	6. 最初と最後の頁 262～267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lwt.2018.09.059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masanori Watanabe, Chiako Yamada, Charin Techapun, Noppol Leksawasdi, Thanongsak Chaiyaso, Phisit Seesuriyachan, Shinji Takenaka
2. 発表標題 Development of biomass refinery technology of rice manufacturing byproducts in Yamagata, Japan, for contribution to sustainable development goals.
3. 学会等名 The international conference on food and applied bioscience 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Tada, Pilairuk Intipunya, Charin Techapun, Noppol Leksawasdi, Thanongsak Chaiyaso, Phisit Seesuriyachan, Shinji Takenaka, Masanori Watanabe.
2. 発表標題 Physiological significance of high accumulation of phytic acid in rice bran and its relation with the taste and physical properties of rice.
3. 学会等名 The international conference on food and applied bioscience 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenta Kubota, Thanongsak Chaiyaso, Charin Techapun, Noppol Leksawasdi, Phisit Seesuriyachan, Shinji Takenaka, Masanori Watanabe.
2. 発表標題 Lipid production from defatted rice bran hydrolysate by using newly-isolated oleaginous yeasts.
3. 学会等名 The international conference on food and applied bioscience 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Watanabe, Yuta Yamamura, Charin Techapun, Noppol Leksawasdi, Thanongsak Chaiyaso, Phisit Seesuriyachan, Ampin Kuntiya, Shinji Takenaka
2. 発表標題 Characteristics of fermentive L-(+)-lactic acid production from non-sterilized by-product of rice by LAB's and its relationship with formation of microbial consortia in SSF
3. 学会等名 The final joint seminar of core to core program advanced research networks (2014-2019) on Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanori Watanabe
2. 発表標題 Simultaneous recovery and purification of rice protein and phosphorus compounds from rice bran with environmentary harmonized process.
3. 学会等名 1st International symposium on "Recent trend/technology of food security and management in Asia" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺昌規
2. 発表標題 環境調和型プロセスにより脱脂米糠から回収・精製された完全アレルギーフリータンパク質及び機能性リン化合物の機能性食品原材料としての用途開発・市場導入に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学大学院農学研究科・渡辺研究室 バイオマス資源学研究室ホームページ  
<https://watanabelab.com/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関