

機関番号：15101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760418

研究課題名 (和文) 高温 L-乳酸発酵を用いた未利用有機物の機能性飼料化

研究課題名 (英文) L-Lactate fermentation of organic wastes by *Bacillus coagulans* for utilization as livestock feed

研究代表者

赤尾 聡史 (AKAO SATOSHI)

鳥取大学・工学研究科・助教

研究者番号：30448196

研究成果の概要 (和文) : 未利用有機物に高温 L-乳酸発酵というアクセントを加えることで、飼料保存性 (乳酸効果) と栄養分の易分解化 (タンパク質の低分子化, アミノ酸吸収効率の増加を期待) を期待した。飼料保存性について、抗菌効果のある乳酸を濃度 6%程度まで高めることで乳酸自体の保存を確認した。乳酸で阻害を受ける菌種のほか、乳酸を消費する菌種の繁殖を抑制する目安を示した。栄養分の易分解化について、タンパク質が豊富な農作物に対して高温 L-乳酸生成菌を植菌し、タンパク質の低分子化など飼料利用に有利となる変化を確認した。生ごみを材料に高温 L-乳酸発酵を実施し、発酵過程に出現する菌種を調べた。その結果、添加した乳酸生成菌の出現を確認したものの、その他の菌種由来 DNA が発酵期間を通じて検出された。安全性の面から、検出された菌種の生死判定と有害性の有無について今後確認する必要がある。

研究成果の概要 (英文) : Thermophilic L-lactic acid fermentation was conducted to utilize organic wastes as livestock feed. The aims are to preserve feed quality by fermented lactic acid and to accelerate feed digestion by partial hydrolysis in the fermentation. 6% of lactic acid prevented proliferation of bacteria consuming lactic acid; this concentration might be an indication for quality preservation of the fermented products. Thermophilic L-lactic acid fermentation partially hydrolyzed soy bean and jatropha proteins. The fermentation might provide easy digestion and absorption like natto's effect. PCR-DGGE analysis of the fermentation of kitchen wastes indicated that *Bacillus coagulans* as inoculum and some bacteria including lactic acid bacteria were detected. Hazard assessment of detected bacteria will be next challenges.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：環境工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：*Bacillus coagulans*, L-乳酸, PCR-DGGE, プロテアーゼ活性

## 1. 研究開始当初の背景

農作物可食部からのバイオエタノール製造は、飼料の価格高騰の原因の一つとなっている。米国などではバイオエタノール製造が国策であり、食料安定供給の観点から、我が国において国内の未利用有機物資源を積極的に飼料利用していく必要がある。未利用有機物資源の一部は廃棄物でもあり、これらの利用は廃棄物処理の一助となる。以上から、未利用有機物資源の飼料化を目指すこととした。

ところで、従来飼料とされてこなかった有機物資源を、飼料作物の高騰という理由だけで利用を促すことは、畜産経営上のメリットがない。そこで、未利用有機物資源に発酵というアクセントを加えることで、生菌の存在に拠るプロバイオティクス効果（生菌剤）および栄養成分の易分解化（飼料利用性改善）を備えた付加価値向上の図れる飼料化方法を検討した。家畜飼料におけるリキッド飼料を利用方法として想定している。

本研究では、飼料化発酵を担う中心的な菌種として *Bacillus coagulans* を用い、食品廃棄物あるいは農作物を原料に発酵を実施し、上記機能を付帯する飼料化方法を探る。なお、*B. coagulans* は、申請者が非滅菌L-乳酸発酵で見出した菌種であり、整腸剤として市販あるいは生菌剤として飼料添加が認められている菌種でもある<sup>1)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究では、*B. coagulans* による高温 L-乳酸発酵をベースとするものの、生菌剤効果を持つ飼料化が最終目的である。ここでの L-乳酸発酵は、原料中の栄養を極力維持（できれば易分解化）しながら *B. coagulans* を増殖させることが重要であり、必ずしも多量の L-乳酸を生成させる必要はない。これらの点を踏まえ、本研究は以下の 2 課題を設定した。

(1) 未利用有機物中での *B. coagulans* の増殖・維持（発酵条件、糖化方法、乳酸濃度の維持）

(2) L-乳酸発酵前後における飼料成分評価 (*B. coagulans* 生菌数、栄養成分の易分解化、毒性物質の無毒化)

飼料化に適する未利用有機物資源としては、食品製造副産物の資源化が既に図られていることから、食品廃棄物および廃棄農作物を原料に設定した。食品廃棄物の利用では、① *B. coagulans* の優占化に要する時間、② 高温 L-乳酸発酵において出現する菌種の把握

が飼料利用の観点から重要と考えられる。廃棄農作物の L-乳酸発酵では、原料を加水分解する糖化工程が必要となる。そこで、③ *B. coagulans* 自身で糖化酵素を誘導できる株<sup>2)</sup> の探索のほか、④ それら酵素を誘導できる他菌種との共培養を検討する。

上記目的を達成する L-乳酸発酵の終点時期に関しては、発酵終了後も品質（L-乳酸濃度、*B. coagulans* 菌数）を保持できる条件を確認しておく必要がある。ここでは抗菌作用を有する乳酸による他の菌種の繁殖防止を念頭に置いているため<sup>3)</sup>、⑤ 他の菌種による L-乳酸の消費が起こらない乳酸濃度を求める。

飼料化に向けた発酵処理について、*B. coagulans* による発酵処理前後の構成栄養素の変化、特に栄養素の易分解化（摂取者の消化・吸収促進）などについて検討した。*B. coagulans* はプロテアーゼ活性を有することから<sup>4)</sup>、タンパク質の分解に着目して⑥ タンパク質の易分解化（栄養価値の向上）、タンパク様毒性物質であるトリプシンインヒビターの分解、およびフィチン酸の分解を調べる。また、⑦ 発酵前後の *B. coagulans* 生菌数変化も見る。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用株

本研究では、*B. coagulans* JCM 2258 を主に使用した。L-乳酸資化性を見る培養などで、JCM 2257、JCM 9076 および単離株 d1~d5（高温 L-乳酸生成株）を使用した。また、アミラーゼ誘導を目的に単離株 s1~s3（高温アミラーゼ誘導株）も使用した。いずれの株も LB 培地にて継代培養した。

単離株 d1~d5 は、Dextrose Tryptone Agar (Difco, 55°C で培養) により黄変するコロニーについてグルコースを糖質源とする L-乳酸資化試験を行い、D-乳酸を生成せず L-乳酸を生成した株として単離したものである。単離株は 16S rRNA 遺伝子に基づく菌種推定を行い<sup>5)</sup>、*Bacillus licheniformis* あるいは *B. coagulans* と確認した (Accession No. AB610853~610857)。

単離株 s1~s3 は、スターチ寒天培地 (55°C で培養) にヨウ素液を加えた際にハロー形成したコロニーである<sup>6)</sup>。同様に菌種推定を行い、s2 および s3 について *Aneurinibacillus thermoaerophilus* および *Geobacillus caldxylosilyticus* と推定された (Accession No. AB610851, AB610852)。

### (2) 発酵材料と培養方法

#### ① 生ごみ

鳥取市の生ごみステーションから回収し

たものを用いた<sup>7)</sup>。生ごみの高温L-乳酸発酵試験では、異なる3日の生ごみを未冷凍のまま用いた。生ごみの高温L-乳酸発酵試験は、破碎後2倍希釈した生ごみを1Lの反応器に投入して実施した(5日間)。温度55°C、pH5.5に制御した。攪拌機で常時攪拌した。

#### ②L-乳酸発酵終了後を想定した培地

L-乳酸発酵終了後、自身の濃度を維持できる乳酸濃度を求めるために使用した培地である。組成は、スターチ10g/L、セルロース10g/L、yeast extract 10g/Lおよびtryptone 10g/Lであり、これに段階的に乳酸アンモニウムを添加し、pHを調整した。100 mL容器に上記培地50 mLずつ添加し、冷凍・解凍した生ごみを白金耳で植菌後、密栓して30°Cで7日間培養した。スターラーで常時攪拌した。

#### ③L-乳酸資化を見た培地

糖質からのL-乳酸発酵性を見るために使用した培地である。組成は、糖質10g/L、yeast extract 5g/Lおよびその他栄養塩から構成される<sup>8)</sup>。オートクレーブした培地を滅菌15 mLチューブに10 mL添加し、各株を植菌した(3本/株)。55°Cで120時間培養後、培地中のL-乳酸濃度を測定し、収率(g-L-乳酸/g-糖質)を求めた。

#### ④乾燥大豆とジャトロファ

乾燥大豆は、スーパーで購入した。ジャトロファは、研究協力者より提供を受けた。いずれも家庭用ミルで破碎し、培養に供した。なお、ジャトロファは、脱脂後の残渣利用が課題であることから、食品分析における粗脂肪のソックスレー抽出を行い、残渣を培養に供した。乾燥バイオマス20gに対して蒸留水40gと濃縮菌液(*B. coagulans*, 0.9%食塩水)1gを添加し、乾燥を防ぎつつ55°C、24時間培養した。好気培養と嫌気培養を実施し、嫌気培養ではアネロパックを使用した。*B. coagulans*の植菌を行わない冷凍系(ただちに冷凍)とコントロール(55°C・好気培養)を用意した。

#### (3)分析方法

##### ①PCR-DGGE

DNA抽出(DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN)、プライマー(EUB341f-GC, UNI518r)、DGGE(DCodeユニバーサルミュレーション検出システム, BIO-RAD)は、既報<sup>7)</sup>と同じである。

##### ②SDS-PAGE

ミニプロティアンTetraセル(BIO-RAD)を用いた。手順は添付マニュアルに従った。Laemmliバッファー系のSDS-PAGEを行い、Bio-Safe CBB G-250ステイン(BIO-RAD)により染色した。

試料0.5gを0.9%食塩水10 mLに溶解させ、遠心分離により上澄みを回収しサンプルとした。サンプルアプライ量は20 μLとした。

#### ③その他

D-, L-乳酸はHPLC(カラム; SUMICHIRAL OA-5000)により分析した。高温L-乳酸生成菌の生菌数はDextrose Tryptone Agar(55°C)によりカウントした。アミラーゼ活性はヨウ素デンプン反応を用いた<sup>9)</sup>。トリプシンインヒビターはBAPNAを基質として用いる方法で測定した<sup>10)</sup>。フィチン酸は外注分析(日本食品分析センター)した。

#### 4. 研究成果

##### (1)*B. coagulans*の優占化に関する検討

###### ①生ごみの高温L-乳酸発酵<sup>7)</sup>

異なる3日の生ごみを使って、高温L-乳酸発酵を3回実施したが、概ね同様の結果を得た(終端平均濃度L-乳酸31.4g/L、D-乳酸0.4g/L)。L-乳酸発酵は非滅菌下で実施可能であった。なお、D-乳酸は培養開始後3時間以内に生成されていた。

発酵過程についてPCR-DGGEによる微生物群集解析を実施した。3回の培養とも概ね同様の変化を示した。*B. coagulans*と思われるバンドは、培養開始後24~48時間に明瞭となり、同菌種の優占化を確認した(生菌数でも確認)。その他、特徴的なバンドは*Weissella*属、*Leuconostoc*属、あるいは*Lactobacillus sakei*と推定された。これらは、いわゆる乳酸菌であり、D-乳酸生成菌でもある。検出された菌種の生育条件などから、高温L-乳酸発酵の培養条件(pH5.5, 55°C)が満たされない時間帯に、これら菌種によりD-乳酸生成が起こったと考えられる。また、病原性が疑われる*Enterobacter*属などのDNAも検出された。今後、これらの生死判定や有害性有無について検討していく予定である(Accession No. AB558965~AB558977)。

###### ②高温L-乳酸発酵後における*B. coagulans*の維持

乳酸は抗菌性を有しており、雑菌の繁殖防止あるいは*B. coagulans*の維持において重要である。ここでは、乳酸の抗菌性維持の観点から、培地に乳酸を添加し、その乳酸が減少しない(消費されない)濃度を求めた。

多糖(スターチ、セルロース)を含む培地に乳酸アンモニウムを段階的に添加し、生ごみ(冷凍・解凍)を植菌して30°C、疑似嫌気状態で培養した。その結果、乳酸濃度を6%程度まで高めることで、乳酸濃度が維持された(図1)。6%は既報<sup>3)</sup>より高濃度であるが、現実に既報値程度では乳酸濃度の低下が起こり、その際例えば*Clostridium*属が増殖することを経験している。確かに高濃度ではあ

るものの、乳酸濃度を6%とすることで、嫌気状態を保てば数日間は乳酸、さらには*B. coagulans*が維持<sup>8)</sup>されると思われる。なお、7日目のサンプルを用いて菌叢解析(PCR-DGGE)を行ったが、乳酸が維持される系・消費される系とも共通のバンドが検出され、乳酸消費を行う菌種の推定は行えなかった。

ところで、乳酸濃度6%は一般的な乳酸発酵において上限濃度に相当する。また、生ごみであれば含有する糖質の過半以上を乳酸に変換しないと至らない濃度でもある。乳酸発酵を完全に進めるためには糖化過程が鍵となることから、次に糖化に関する検討を実施した。

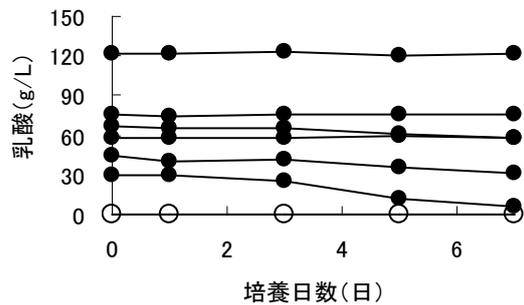


図1 乳酸アンモニウムの段階的添加系における乳酸濃度の経日変化

(2) 高温 L-乳酸発酵をより進めるための糖化に関する検討

① *B. coagulans* によるスターチ糖化の検討

有機性廃棄物に存在する多糖は、大きくスターチとセルロースに分けられると考えられる。このうちスターチについて、*B. coagulans* によるアミラーゼ生成の報告も存在することから、同菌も含めた高温 L-乳酸生成菌のアミラーゼ活性を調べた。

単離株5株を含めた8株についてアミラーゼ活性を測定したところ、好気培養において JCM 2258 (138 unit/mL) および JCM 9076 (106 unit/mL)、嫌気培養において JCM 9076 (61 unit/mL) から僅かにアミラーゼ活性を認めた。ただし、スターチ(コーン由来)を糖質源とする L-乳酸発酵試験を実施したところ、上記株も含めていずれの株とも L-乳酸収率は0.1未満に留まった。高温 L-乳酸生成菌自身で糖化・L-乳酸発酵できることが理想であるが、現時点ではそれを可能とする株は見つけられていない。

② 高温性のアミラーゼ誘導株の単離

高温 L-乳酸発酵において、糖化菌を共培養することで糖化・L-乳酸化を1つのリアクターで進めることを検討した。まず、高温性のアミラーゼ誘導株の単離を試みた。その結果、s1, s2 (*A. thermoaerophilus*) および s3 (*G.*

*caldoxylosilyticus*) の3株が単離された。これらのアミラーゼ活性値は、高温嫌気培養においてそれぞれ 801, 883 および 793 unit/mLであった。

単離株 s1 と s2 を用いて、高温 L-乳酸発酵の発酵条件下で48時間の糖化を実施した。しかし、グルコースあるいは乳酸の生成は確認できなかった。また、48時間後に *B. coagulans* を植種し、さらに72時間培養したが、乳酸生成は確認できなかった。確認のため、単離株 s1, s2 および s3 についてグルコースおよびスターチを糖質源とする L-乳酸発酵試験を実施したところ、グルコースからは僅かに L-乳酸生成を認めたが(収率0.1以上)、スターチからは確認できなかった。高温 L-乳酸発酵条件下でスターチの糖化・L-乳酸生成には課題が残った。

(3) 生菌剤としての *B. coagulans* 添加効果に関する検討

*B. coagulans* を用いたセルロース成分の並行発酵(糖化, L-乳酸発酵)を実施した際、添加したセルラーゼの分解が観察された<sup>11)</sup>。*B. coagulans* はプロテアーゼ活性を有することが指摘されていることから、同活性の利用法を検討した。乾燥大豆およびジャトロファ種子破砕物に *B. coagulans* を植種・培養した結果を表1に示す。程度の差はあるものの、好気・嫌気を問わず *B. coagulans* は増殖した。

表1 *B. coagulans* の培養結果

	(CFU/mL)	
	大豆	ジャトロファ
植種時	3.8E+05	8.2E+03
コントロール	カウントできず	
<i>B. coagulans</i> , 好気	1.1E+07	3.8E+06
<i>B. coagulans</i> , 嫌気	4.4E+06	4.3E+04

コントロールでは高温酸生成菌とは異なる菌種の増殖が観察された。

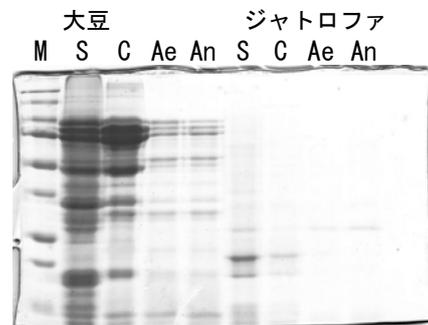


図2 乾燥大豆および脱脂ジャトロファ中のタンパク質変化 (M マーカー 5  $\mu$ L, S 冷凍系 以下 20  $\mu$ L, C コントロール, Ae 好気培養, An 嫌気培養)

① タンパク質の変化

*B. coagulans*の好気・嫌気培養およびコントロールにおける SDS-PAGE 結果を図 2 に示す。*B. coagulans*が植種された系では、特に大豆についてタンパク質の著しい消失が確認された。仮にタンパク質の消失がペプチド化あるいはアミノ酸化であるならば、*B. coagulans*を植菌することで、納豆にあるようなアミノ酸の吸収促進効果が期待される。

### ②トリプシンインヒビターの活性変化

ジャトロファについて、*B. coagulans*培養によるトリプシンインヒビターの変化を観察した(図 3)。*B. coagulans*の好気培養において、トリプシンインヒビターの減少傾向が僅かに観察された(冷凍保存に対して14%の減少)。今後、現象の再現性を確認する。

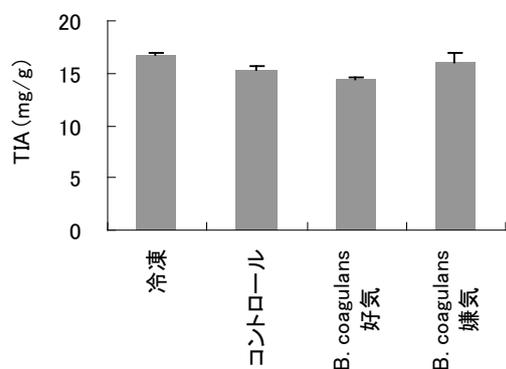


図 3 *B. coagulans* 培養による脱脂ジャトロファ中のトリプシンインヒビター変化 (bar: 3 回分析における標準偏差)

### ③フィチン酸の変化

ジャトロファについて、*B. coagulans*培養によるフィチン酸変化を観察した(図 4)。*B. coagulans*の嫌気培養において、フィチン酸の減少傾向が僅かに観察された(冷凍保存に対して10%強の減少)。今後、現象の再現性を確認する。

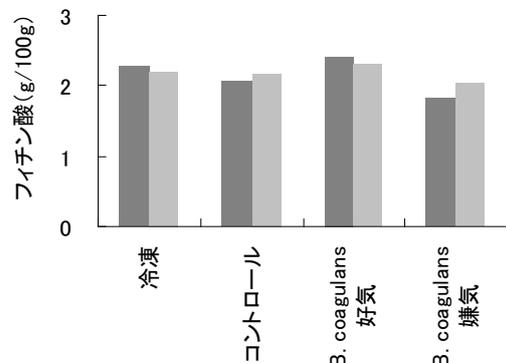


図 4 *B. coagulans* 培養による脱脂ジャトロファ中のフィチン酸変化 (2 回分析)

参考文献

- 1) 押田敏雄, 畜産コンサルタント, 41(8), p28-32, 2005.
- 2) K.R. Babu and T. Satyanarayana, Folia Microbiol. 38(1), p77-80, 1993.
- 3) 松田敏生, 食品微生物制御の化学, 幸書房, p302-308, 1998.
- 4) 鶴大典, 船津勝, 蛋白質分解酵素 II, 学会出版センター, p204, 1993.
- 5) 厚生労働省, 第十四改正日本薬局方第二追補, p145-147, 2004.
- 6) S. Mishra and N. Behera, African J. Biotech. 7(18), p3326-3331, 2008.
- 7) 榮祐介ら, 環境工学研究論文集, 47, p585-593, 2010.
- 8) S. Akao et al, Proc. of 12<sup>th</sup> IWA Anaerobic Digestion, 2010, CD-ROM.
- 9) J. Fitter et al, Biochemistry, 40(35), p10723-10731, 2001.
- 10) K. Liu and P. Markakis, Analytical Biochemistry, 178(1), p159-165, 1989.
- 11) S. Akao et al, Proc. of 8<sup>th</sup> IWA Agro, 2011.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①榮祐介, 赤尾聡史, 前田光太郎, 細井由彦, 生ごみを用いた非滅菌高温L-乳酸発酵におけるD-乳酸生成が起こり得る時期と関与する菌種, 環境工学研究論文集, 巻 47, p585-593, 2010, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ①榮祐介, 赤尾聡史, 増田貴則, 細井由彦, 生ごみを用いた高温L-乳酸発酵における微生物群集の時系列解析, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010 年 3 月 15 日, 福岡大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

該当なし

[その他]

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤尾 聡史 (AKAO SATOSHI)

鳥取大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 30448196

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし