

機関番号：32665
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780199
 研究課題名（和文） 海洋性乳酸菌を用いる未利用バイオマスの利用法開発に関する研究
 研究課題名（英文） Development of utilization method for unused biomass using marine lactic acid bacteria
 研究代表者
 糸井 史朗（ITOI, SHIRO）
 日本大学・生物資源科学部・講師
 研究者番号：30385992

研究成果の概要（和文）：未利用バイオマスの一つであるキチン関連物質を効率的に利用するため、海産魚由来乳酸菌 *Lactococcus lactis* のキチン関連糖の利用能をチーズスターターや淡水魚由来株のそれと比較した。その結果、魚類由来株は、単糖～6糖を発酵したのに対し、チーズスターター由来株では3糖までしか利用できなかった。また、生成乳酸の光学異性体比は、海水魚由来株ではL-乳酸が99%であったのに対し、他の由来源のものでは85～96%であった。さらに、海水魚由来株におけるL-乳酸生成量は、他の由来源のもの3.5～4.4倍であった。

研究成果の概要（英文）：To utilize effectively chitin and the associated materials which is one of unused biomass, availability of chitin-associated sugars in lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, derived from marine fish was compared with those from other sources, such as cheese starter and freshwater fish. As the results, fermentation of chitin oligosaccharides in the strains derived from fish were observed in the media containing GlcNAc - (GlcNAc)₆, whereas those from cheese starter were observed in GlcNAc - (GlcNAc)₃. In addition, ratio of optical isomer in products for L-lactic acid in marine fish derived strain culture was higher than those in other sources. Furthermore, the amount of L-lactic acid in marine strain culture was 3.5 - 4.4 folds higher than those in other sources.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：生物工学、海洋細菌

1. 研究開始当初の背景

エビやカニなどの甲殻類などに多く含有されるキチンは、セルロースに次ぐ莫大なバイオマスであるのに加え、キチンを分解して得られるオリゴ糖や多糖類は医薬品や健康

食品原料などのような様々な生理活性をもつことから幅広く利用されている。これまで一般的に、キチンを分解して利用するには強酸・強アルカリ等による化学的処理を必要とすることから、大量に生じる廃液の処理など

の問題が残され、効率の良い分解法が求められてきた。また、化学的な分解では多様な分解産物が生じ、特定のオリゴ糖を効率よく得られないのが現状である。一方、自然環境下ではこれら生物のキチン質は蓄積することなく速やかに消失する。環境中にはキチンを強力に分解する活性を有する細菌などが存在することが知られ、種々の細菌種由来キチナーゼが単離・同定されてきた。また、近年の地球温暖化対策の一つとしてカーボンニュートラルが注目されているが、乳酸の重合体であるポリ乳酸を利用したバイオプラスチックに関する研究が多数行われている。セルロースに次ぐバイオマスを誇るキチンを生理活性物質やバイオプラスチックの原料として利用できれば、これまで廃棄されてきた未利用バイオマスの高度利用につながるだけでなく、地球温暖化対策の一つの方策になることが期待される。

申請者は本申請に先立ち、魚類腸内細菌から分離された海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* が α 型結晶キチンを速やかに分解することを見出し、当該遺伝子のクローニングおよび大腸菌を用いた過剰発現系の構築を行って、詳細な検討を加えてきた。その結果、当該キチナーゼリコンビナントは、2糖 (di-*N*-acetyl chitobiose) を主な最終産物として生成するエンド型の酵素であることが明らかとなった。一方、これまでに海洋環境から *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の分離例は報告されていなかったが、海産魚類腸管内に高い頻度で *L. lactis* subsp. *lactis* が分布する可能性を示す報告がなされていた。そこで申請者は、海産魚類腸管内から海洋性乳酸菌 *L. lactis* の分離を試み、海洋環境からの例としては初めてとなる当該乳酸菌株の分離に成功した。この海洋性乳酸菌は、16S rRNA 遺伝子配列をもとにした系統解析では、これまで知られているチーズスターター由来の乳酸菌 *L. lactis* subsp. *lactis* と同一のクラスタを形成するとともに、発酵可能な糖の利用パターンも典型的な *L. lactis* subsp. *lactis* のものと一致することから、*L. lactis* subsp. *lactis* と同定した。さらに、この海洋性 *L. lactis* subsp. *lactis* の塩分耐性について調べたところ、チーズスターター由来の *L. lactis* subsp. *lactis* が4% NaCl まで生育できるのに対し、海洋性 *L. lactis* subsp. *lactis* は、6% NaCl 含有培地でも生育できることが明らかとなった。また、この海洋性 *L. lactis* subsp. *lactis* は、チーズスターター由来の乳酸菌 *L. lactis* subsp. *lactis* が生育できない200%の人工海水培地でも生育できることが確認され、既知の *L. lactis* subsp. *lactis* と比較して高い塩分耐性および高い増殖能を有することが明らかとなった。

この海洋性 *L. lactis* subsp. *lactis* は、既知の *L. lactis* subsp. *lactis* と同様、*N*-acetyl

glucosamine (単糖) や cellobiose (2糖) などの糖を資化できることが明らかとなっており、これは、di-*N*-acetyl chitobiose (2糖) などキチンオリゴ糖を利用できる可能性を示唆する。また、高い耐塩性のような、一般に知られている *L. lactis* subsp. *lactis* とは異なる能力をも有することが明らかとなったことから、キチンオリゴ糖を資化して生成される乳酸のほか、海洋環境に特化した性質の利用とともに、当該乳酸菌の養殖分野への応用が期待される。

2. 研究の目的

キチンオリゴ糖は、医学・工学・食品分野と多岐にわたって利用され、その効率的な製造方法の確立を目指して酵素学的手法の開発が試みられてきている。従来のキチンオリゴ糖の製造過程では、カニやエビなどの外骨格を強酸で処理するなど激しい化学反応が必要となり、廃液および生成物の不均一さが問題となる。申請者は、これまでにキチン分解活性の高い海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* およびその分泌キチナーゼを利用することで、2糖 (di-*N*-acetyl chitobiose) が主たる生成物として産生可能なことを明らかにした。これとは別に、海産魚類腸管内から海洋性乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の分離に成功した。一般に、*Lactococcus* 属はホモ乳酸発酵を行い、その生成乳酸は、L-乳酸であることが知られている。そこで本研究では、キチンに *V. proteolyticus* を作用させて得られる最終生成物であるキチンオリゴ糖を効率的に利用することを目的に、キチン関連糖を *L. lactis* subsp. *lactis* の培養液中に添加することで乳酸発酵を行い、その利用能について調べた。また、本研究の結果を養殖業への応用やバイオプラスチックの原料生成につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 海洋性乳酸菌 *L. lactis* subsp. *lactis* によるキチンオリゴ糖利用能の検討

強酸を用いてキチンを処理した場合に得られるキチンオリゴ糖は、構成糖の種類が多様であること、キチンに海洋細菌 *V. proteolyticus* 由来キチナーゼを作用させて得られる最終産物が2糖 (di-*N*-acetyl chitobiose) であることから、2糖から6糖までのキチンオリゴ糖について利用可能か試験した。試験にはバイオメリー社の API50CH システムを応用し、2糖から6糖までのキチンオリゴ糖標準標品を発酵可能か否か調べた。この際、すでに利用が可能であることが明らかな *N*-acetyl glucosamine およびグルコースを陽性コントロールとして、糖無添加区を比較対照

として同時に試験した。なお、キチンオリゴ糖の発酵試験は、所属研究室で保有しているチーズスターおよび淡水魚由来 *L. lactis* subsp. *lactis*、および *L. lactis* subsp. *cremoris* を比較対照として、上述と同様に試験を行い、*L. lactis* 株の由来による違いがあるのか調べた。

(2) 生成乳酸の組成・生成効率の検討

海洋性 *L. lactis* subsp. *lactis* がキチンオリゴ糖を発酵基質として生成された培養上清を対象に、Roche 社の F-キット (D-乳酸/L-乳酸) により、生成乳酸中の L-および D-乳酸の光学異性体組成を調べるとともに、生成効率の評価を行った。また、基質のキチン関連糖の構成糖数が当該 *L. lactis* 株の発酵能に及ぼす影響について調べるため、種々の濃度の単糖から 6 糖までのキチン関連糖を基質として生成乳酸量を測定した。これらの項目は、キチン関連糖標準標品を用いて得られる発酵試料について行った。

4. 研究成果

(1) 由来の異なる *L. lactis* 株間におけるキチン関連糖利用能の違い

すでに分離済みの海産魚由来の *L. lactis* subsp. *lactis* 株のキチンオリゴ糖の利用能について調べるため、API 50 CH システムを応用し、2 糖から 6 糖までのキチンオリゴ糖標準標品を培地中に添加してその利用能について調べた。また、チーズスターおよび淡水魚由来 *L. lactis* subsp. *lactis*、および *L. lactis* subsp. *cremoris* を比較対照として同様の試験を行った。その結果、25°Cでの培養では、魚類由来の *L. lactis* subsp. *lactis* 株は、2 糖から 6 糖までのキチンオリゴ糖を利用可能であったのに対し、チーズスター由来 *L. lactis* subsp. *lactis* は、3 糖までしか利用できず、チーズスター由来 *L. lactis* subsp. *cremoris* は、2 糖以上を利用できないことが明らかとなった (表 1)。また、海産魚由来のものは、淡水

表 1. キチン関連糖を基質に対する由来の異なる *L. lactis* 株の発酵パターンの違い

Strain	Fermentation pattern ^a					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>						
Marine fish (MFL)	+	+	+	+	+	+
Freshwater fish (FFL)	+	+	+	+	+	+
Cheese starter (CSL)	+	+	+	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>						
Cheese starter (CSC)	+	-	-	-	-	-

^a I, (GlcNAc); II, (GlcNAc)₂; III, (GlcNAc)₃; IV, (GlcNAc)₄; V, (GlcNAc)₅; VI, (GlcNAc)₆.

魚由来のものと比較して 2 糖から 6 糖までのキチンオリゴ糖を速やかに利用可能であった。

(2) 由来の異なる *L. lactis* 株間における生成乳酸の光学異性体比

2 糖を基質とした場合に生成される乳酸の光学異性体比について調べた結果、L-乳酸の純度は、チーズスター由来 *L. lactis* subsp. *lactis* で 85%、*L. lactis* subsp. *cremoris* で 96%、淡水魚由来の *L. lactis* subsp. *lactis* で 93%、海産魚由来の *L. lactis* subsp. *lactis* で 99%であった (図 1)。

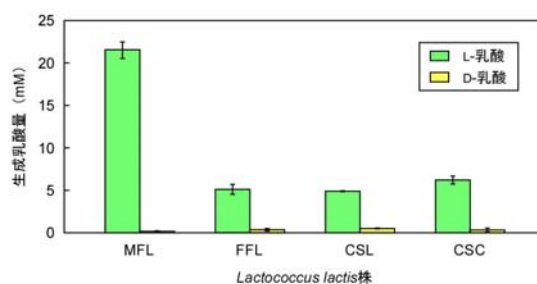


図 1. 由来の異なる *L. lactis* 株間での生成乳酸量の違い。MFL, 海産魚由来 subsp. *lactis*; FFL, 淡水魚由来 subsp. *lactis*; CSL, チーズスター由来 subsp. *lactis*; CSC, チーズスター由来 subsp. *cremoris*. 基質には、di-N-acetyl chitobiose を用いた。

(3) 由来の異なる *L. lactis* 株間の発酵効率の違い

由来の異なる *Lactococcus lactis* 株間におけるキチン関連糖を基質とした場合の発酵能の違いについて調べた。培養液に 1%の 2 糖を基質として添加し、生成 L-乳酸量を測定した結果、チーズスター由来 *L. lactis* subsp. *lactis*、*L. lactis* subsp. *cremoris* および淡水魚由来 *L. lactis* subsp. *lactis* と比較して海産魚由来 *L. lactis* subsp. *lactis* では 3.5~4.4 倍と有意に高かった (図 1)。

(4) 海洋性 *L. lactis* 株の発酵能に及ぼすキチン関連糖の構成糖数の影響

基質の糖構成 (単糖~6 糖) が海産魚由来 *L. lactis* subsp. *lactis* 株の発酵能に及ぼす影響について調べた結果、構成糖数の増加に伴って生成される乳酸量が減少することが明らかとなった (図 2)。特に 4 糖~6 糖では、生成される乳酸量がきわめて小さかったため、産業利用の際の基質には単糖~2 糖を使用する必要性が示された。これまでに高いキチナーゼ活性を有する *V. proteolyticus* から単離したキチナーゼによる生成糖が 2 糖であることが明らかとなっており、当該生成糖を海産魚

由来 *L. lactis* subsp. *lactis* 株の有用な発酵基質として産業的に利用可能であることが示唆される。

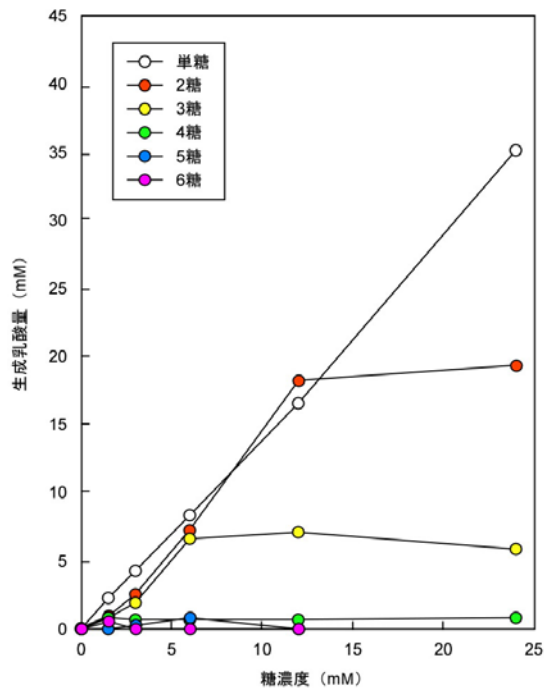


図 2. 種々のキチン関連糖を基質とした場合の海産魚由来 *L. lactis* subsp. *lactis* 株の生成乳酸量。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sugita, H., Mizuki, H., Itoi, S., 2010. Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. *Aquaculture Research* (印刷中). 査読有
- ② Sugita, H., Sugiyama, K., Itoi, S., 2010. Culturable bacterial flora in the intestinal tract of Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Aquaculture Science* 58, 437-438. 査読有
- ③ Sugita, H., Fujie, T., Sagesaka, T., Itoi, S., 2009. The effect of *Lactococcus lactis* on the abundance of aeromonads in the rearing water of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus). *Aquaculture Research* 41, 153-156. 査読有
- ④ Itoi, S., Yuasa, K., Washio, S., Abe, T., Ikuno, E., Sugita, H., 2009. Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fishes. *Journal of Applied Microbiology* 107, 867-874. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Takanashi, S., Oie, R., Itoi, S., Sugita, H.: Comparison of the ability to utilize chitin oligosaccharides in *Lactococcus lactis* strains isolated from various sources. 9th Asian Fisheries and Aquaculture Forum, 21-23 Apr. 2011, Shanghai, China.
- ② Itoi, S., Sugita, H.: Characterization of a marine lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from the pufferfish. 9th International Marine Biotechnology Conference (IMBC2010), 10 Oct. 2010, Qingdao, China.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸井 史朗 (ITOI, SHIRO)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：30385992