

C12 高温 L-乳酸発酵におけるスターチ直接資化の試み

環境計画研究室 井原寛文

1. 研究背景および目的

農作物から L-乳酸やエタノールを作るためには、多糖を加水分解しなければならない。これは、発酵を担う微生物が直接多糖を利用することができないからである。スターチを原料とする場合、糖化处理として蒸煮処理、酵素処理をして生成された、単糖であるグルコースから発酵を行っている。糖化として 2 つの工程が行われており、この前処理プロセスが発酵生成物の高コスト化を引き起こし、農作物由来の石油代替品普及を妨げている。遺伝子組み換えも 1 つの手段であるが、本来生物が有している機能を利用して糖化工程を簡略化することや、糖化と発酵を同時に行えるならば、時間の短縮やコスト削減などが可能となると考えられる。

本研究では、土壌からスターチを糖化あるいは直接利用できる株の探索を行う。高温 L-乳酸発酵を想定していることから、高温性のアミラーゼ活性や L-乳酸発酵能を探索する。さらに探索された株によるアミラーゼ活性を利用した 1 つのリアクターによるスターチからの直接高温 L-乳酸発酵を試みる。

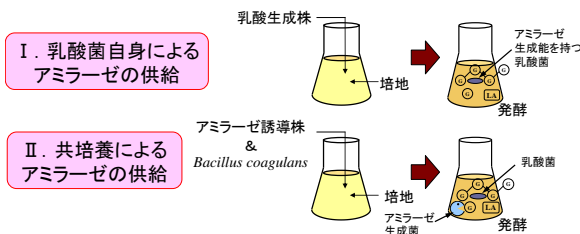


図 1. 単独あるいは共培養による発酵

2. 研究方法

本研究で用いた土壌は、2010年10月20日に大根、スイートソルガム、キャベツ、ネギ、梨、枝豆、里芋、人参、ブロッコリーの土壌から採取したものを用いた。採取した土壌から、1)高温性のアミラーゼ誘導株の探索(でんぷん培地)、2)高温性のL-乳酸生成株(Dextrose Tryptone Agar)の探索という2つの目的から単離を実施した。いずれも 55°C で 2 日間培養した。

単離株は DNA を抽出後(Power Soil Kit)、16SrDNA を用いて菌種推定を行った(厚生労働省, 2006)。また、単離株の好気培養あるいは嫌気培養におけるアミラーゼ活性値(J. Fitter et al., 2001)、グルコースとスターチからの L-乳酸発酵性(高畑, 2009)を確認した。最後にアミラーゼ活性を示した菌株についてアミラーゼ生成・乳酸発酵試験を行った。アミラーゼ活性を持つことが確認されたがスターチからの L-乳酸発酵性を持っていない株を用いてスターチを糖化し、その発酵槽に後から *Bacillus coagulans* JCM2258 を加えスターチからの L-乳酸発酵を試みた。

3. 結果および考察

本研究で単離した高温菌株を表 1 に示す。s1-s3 株はアミラーゼ誘導株で、梨(s1)、里芋(s2)、ブロッコリー(s3)から単離できた株である。3 つとも好気培養でも嫌気培養でもアミラーゼ活性を持っていた(図 1)。嫌気培養からもアミラーゼ活性が指摘されたことから L-乳酸発酵槽での利用も期待される。さらにグルコースについての L-乳酸発酵性の確認もできた(図 2)。d1-d5 株は L-乳酸生成株で、スイートソルガム(d1)、梨(d2, d3)、枝豆(d4)、里芋(d5)から単離できた株である。これらの 5 つの株は、すべてアミラーゼ活性を示さなかった。L-乳酸発酵性は、スターチについては有さなかったが、グルコースについては特に d4, d5 株では高い値を示した(図 2)。単離できた株の菌種

推定を行い、推定できた株は表 1 に示す通りである。なお、本研究で得られた DGGE バンドの塩基配列は、DDBJ に登録済みである(Accession No. ; AB610851~AB610857)。

s2 株および s3 株のアミラーゼ活性を利用し、スターチからの直接高温 L-乳酸発酵を試みた。s2 株および s3 株と JCM2258 を共培養したが、グルコース(L-乳酸)生成が確認されなかった。

表 1. 単離株の菌種推定結果

株名	単離土壌	菌種	Accession No.
高温 L-乳酸生成株	d1	スイートソルガム	<i>Bacillus licheniformis</i> AB610856
	d2	梨	<i>Bacillus licheniformis</i> AB610853
	d3	梨	<i>Bacillus licheniformis</i> AB610854
	d4	枝豆	<i>Bacillus smithii</i> AB610857
	d5	里芋	<i>Bacillus smithii</i> AB610855
アミラーゼ誘導株	s1	梨	
	s2	里芋	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> AB610851
	s3	ブロッコリー	<i>Geobacillus caldolosilyticus</i> AB610852

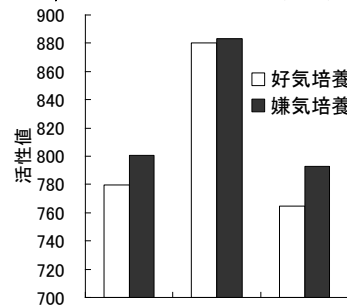


図 1. アミラーゼ活性値

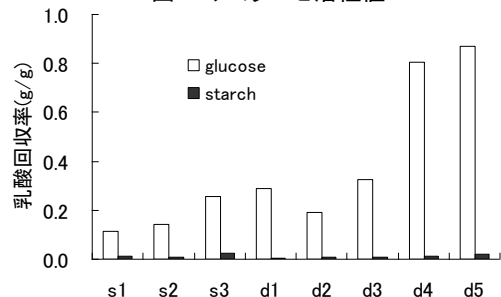


図 2. L-乳酸生成の結果

4. まとめと今後の課題

いずれの株も単独、あるいは二種類の組み合わせではスターチから直接 L-乳酸生成には至らず、β-アミラーゼあるいはグルコシターゼなどスターチあるいはその加水分解物から二糖、単糖へと加水分解する酵素群を補う必要性が指摘された。

また、スターチから直接 L-乳酸を生成する株が見つからなかったこともあり、もっと多くの土壌を採取し多くの株を見つけることが必要と考えられる。それに伴い、今回はアミラーゼ誘導株を用いたが農業廃棄物の利用を考えると、*Clostridium thermocellum* などのセルラーゼ誘導株でも同様に検討する必要がある。

参考文献

- 厚生労働省:第十五改正日本薬局方, pp1580-1581, 2006
- J. Fitter et al., *Biochemistry*, Vol.40, No.35, pp10723-10731, 2001
- 高畑美佳, 鳥取大学工学部卒業論文, pp. 5, 2009