

Bacillus coagulansによるスターチ同時糖化 発酵における pH と培養温度の影響

環境計画研究室 横部梓

1. 研究背景と目的

工業的な L-乳酸生成はスターチを原料に用いて糖化し、発酵を行う。発酵を担う微生物は通常直接スターチを分解することはできないため、スターチを加水分解して単糖を得る必要がある。一方で、発酵を担う微生物が糖分解酵素であるアミラーゼを誘導可能な場合、同種に糖化までも担わせる乳酸発酵が可能となる。例えば、糖分解酵素であるアミラーゼを誘導できる *Bacillus coagulans* を用いた糖化・L-乳酸発酵が考えられる。*B. coagulans* を用いた L-乳酸発酵としては、生ごみなどを材料に検討が進められてきた高温 L-乳酸発酵がある。本研究では、高温 L-乳酸発酵においてスターチの糖化を付加した同時糖化発酵(SSF)を提案する。本研究では、糖分解酵素を誘導する能力を持つ *B. coagulans* を用いたスターチ同時糖化発酵において、pH と培養温度について最も効率的に L-乳酸を生成できる条件を検討する。

2. 研究方法

B. coagulans を用いた同時糖化発酵において、pH(5.5,6.5,7.5)、温度(45℃,50℃,55℃)の合計9点と中心条件繰り返し4回で回分培養を行った。5日間培養を行って得られた発酵液を用いて分析を行った。アミラーゼ活性では、*B. coagulans* が誘導した糖分解酵素であるアミラーゼの活性値をヨウ素デンプン反応にて測定した。スターチ測定では、与えたスターチをいかにグルコースに分解して使用しているかを判断するため、スターチ F キットを用いて発酵液中のスターチの残量を測定した。糖分析、乳酸分析では、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて L-乳酸の生成量、発酵液中のグルコースの残量を測定し、これらの値を用いてスターチ利用率を計算した。スターチ利用率={L-乳酸生成量-(グルコース初期量-グルコース最終量)}÷(スターチ初期量÷0.9)で求められる。得られた結果に応答曲面法を適用し、Microsoft Office 2007 Excel を用いて2次応答曲面を求めた。今回はアミラーゼ活性値とスターチ利用率の両観点において曲面を求めた。また、その際に得られた重回帰式で検定を行い、求めた応答曲面の適合性を危険率 0.05 で判断した。

3. 結果と考察

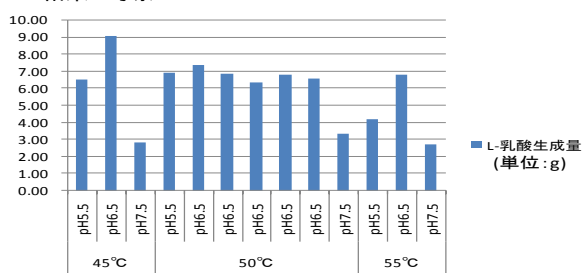


図1 L-乳酸生成量

図1に L-乳酸濃度を発酵液量に乗じて L-乳酸生成量を示した。最も L-乳酸の生成量が多いのは pH6.5、温度 45℃の点であった。pH7.5 はどの温度でも生成量は少なかった。なお、グルコースの残量は、ほとんどの点でほぼすべてのグルコースを利用できていた。

スターチ利用率は、アミラーゼ活性値と同じく pH7.5 がすべて未利用であった。pH7.5 での L-乳酸生成量が少ないこと、アミラーゼ活性が見られなかったことやスターチの利用率もないことから、どの温度についても pH7.5 での L-乳酸発酵では

スターチからの生産性は見込めないと考えた。

アミラーゼ活性値について、pH7.5 の条件は、どの温度でもアミラーゼ活性が見られていないという結果が出た。pH7.5 ではスターチの利用もない点からも見て、アミラーゼ活性はしていないと考えた。*B. coagulans* によるアミラーゼ生産の最適 pH・温度は pH7.0・50℃だとされているが、活性値の計算結果だけで考えると、pH6.5 の 50℃が最も活性であり、およそアミラーゼ生産の最適条件通りの結果となった。また pH6.5、50℃でのアミラーゼ活性値にばらつきがあったが、これはアミラーゼが活性がすでに終了しているために活性値が低くなり、*B. coagulans* の成長条件である pH6.5、52℃やアミラーゼ生産の最適条件に最も近く、活性するとした pH6.5、50℃の値が結果としてばらついたからだと考えた。

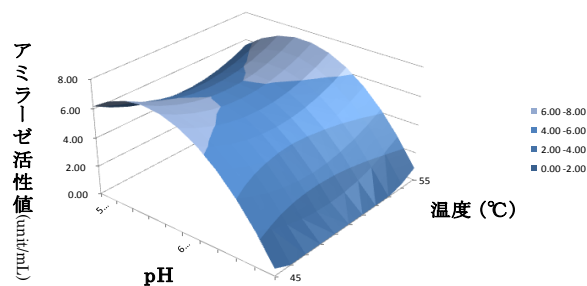


図2 アミラーゼ活性値の二次応答曲面

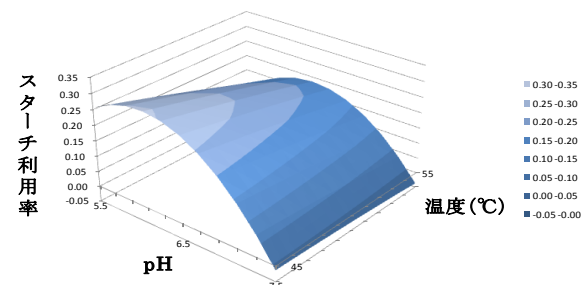


図3 スターチ利用率の二次応答曲面

応答曲面法により得られたアミラーゼ活性値とスターチ利用率の2次応答曲面を図2、図3に示した。図から、アミラーゼ活性値、スターチ利用率ともに pH6.1、45℃が最も活性・利用率が高いと考えた。求めた重回帰式の検定を行った。スターチ利用率の式の実験データは重回帰のモデルに適合しており、利用率の予測は可能であった。アミラーゼ活性値の式は適合せず、活性値の予測は傾向を示す程度だった。

4. 結論

本実験の今回の培養条件では pH6.1、45℃がアミラーゼ活性値、スターチ利用率の両方の観点から見て最も L-乳酸の生成効率のよい pH、温度として考えた。また、pH7.5 では効率的な L-乳酸生成は見込めないと考えた。pH6.1、45℃を中心として本実験の培養条件から低 pH 化、低温化した新たな培養条件を設定して、実験を行うことで *B. coagulans* を用いた同時糖化発酵としてどの条件が最も L-乳酸生成の効率が良いか、さらに検討できると考えた。