

好アルカリ性乳酸生産微生物の探索（Ⅱ）

世嘉良宏斗、越村匡博*1、常盤豊*2

低環境負荷型のプラスチック原料として注目されている L-乳酸は主に微生物による発酵生産によって得られる。特に好アルカリ性乳酸菌は高い光学純度の L-乳酸を生産し、発酵管理が比較的容易であることから、L-乳酸生産菌として有望である。これまでに我々は未利用バイオマス資源を原料とした L-乳酸生産を目的として、アルカリ条件で生育する L-乳酸生産菌を分離・収集してきた。本研究ではこれらの特異な乳酸菌を分類するとともに、L-乳酸生産に関する特性を調べた。

1 はじめに

高 pH 環境中で生育する好アルカリ性微生物については、生態学的な研究が中心に行われてきた一方、特殊環境中で生産される酵素の機能が注目されてきた。特に好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌が生産する酵素については数多くの報告があり、アルカリ条件で作用する特異なプロテアーゼが洗剤に利用される等、産業的な利用も進められている¹⁾。好アルカリ性微生物は pH10 程度の強アルカリ条件で分離・生育できるが、高 pH ではない様々な環境中にも存在する。好アルカリ性菌の明確な定義はないが、強アルカリ性条件でのみ生育可能な偏性好アルカリ性菌と中性付近でも生育する通性好アルカリ性菌に分けることができ、これらの性質を比較することで好アルカリ性菌の特殊な生体機能を解明しようという試みも行われている²⁾。一方、好アルカリ性乳酸菌については未だ工業的な利用がすすんでおらず、乳酸生産に関する研究も少ない。しかし、好アルカリ性乳酸菌はアルカリ条件で高光学純度の L-乳酸を生産可能であることから、バイオマス資源を発酵原料として、発酵管理が容易で高品質な L-乳酸の生産に利用できる可能性がある。

沖縄県では、県内の食品製造業者から廃棄物として排出されるバイオマス資源を有効活用するため「産業系副産物バイオマスからの有用物質生産技術の開発」に取り組んできた。本研究はその一環として、副産物バイオマスからの効率的な L-乳酸生産技術の開発を目的に、沖縄県内で収集した好アルカリ性乳酸菌を分類し、それらの乳酸生産特性について調べた。

2 実験方法

2-1 糖資化試験

基質として D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、スクロース、マルトース、D-キシロース、米澱粉の 8 種類の糖を用いた。基質濃度が 2%（米澱粉は 0.5%の懸濁液）となるように調整し

た pH10 の培養液 4mL を試験管に分注し、種菌 40 μ L を接種してから 30 $^{\circ}$ C で静置培養した。3 日間培養した後、培養液中の乳酸を HPLC で分析した。

2-2 その他

分離源、培地組成、HPLC 分析条件、16S rRNA 遺伝子解析等については、既報^{3,4)}に示した。

3 実験結果と考察

3-1 乳酸生産特性

分離株は pH10 のグルコース含有培養液中で乳酸を生産する株を乳酸菌として選抜したが、バイオマス資源に含まれる炭素源はグルコース以外にも様々な種類が想定される。分離株の資化性を知ることで発酵原料となるバイオマス資源に適した菌株の選択が可能になることから、分離株による異なる炭素源からの乳酸生産能を調べた。分離株のうち生育の良好な 33 株について、8 種類の糖質を炭素源として用いたときの乳酸生産量を調べた結果を表 1 に示した。果実等に含まれるフルクトースやスクロース、マルトースについては、調べた全ての分離株が資化することができた。ある種の植物や海藻類の構成成分であるマンノースやガラクトース、キシロースについては、一部の分離株を用いれば乳酸生産の原料になり得ることが分かった。米澱粉については No.1044 のみ乳酸を生産することができた。

いずれの菌株もグルコース以外の複数種類の炭素源を資化して乳酸を生産することが分かった。県内の食品系事業所から廃棄物として排出される未利用バイオマス（泡盛蒸留残渣、糖蜜、澱粉等）を発酵原料として利用するためには、グルコースやスクロースを資化する菌株が必要である。今回試験を行った分離株は全てグルコース及びスクロースから乳酸を生産した。特に分離株 No.1033、No.1066、No.1190、No.2024、No.2020、No.2065、No.2181、No.3038、No.4027、No.6012 はグル

*1 元非常勤職員（現（独）国立高等専門学校機構 佐世保工業高等専門学校）、*2 元任期付研究員

コース及びスクロースからの生産性が高く、さらにこのうち No.1066、No.1190、No.2024、No.2181、No.4027 は 99%ee (ee=鏡像異性体過剰率、enantiomeric excess) 以上の高純度 L-乳酸を生産することから L-乳酸生産菌株として有望である。また、五単糖であるキシロースを資化して 99%ee 以上の L-乳酸を生産する菌株 (No.2024、No.2026、No.2091、No.5094) は廃木材やバガス等のセルロース系バイオマスを発酵原料とした L-乳酸生産への利用が期待できる。米澱粉からの乳酸生産が確認され

た分離株 No.1044 は、他の糖についても優れた資化性を示したが、生産する L-乳酸の光学純度は高くなかった (73%ee)。

3-2 分離株の分類

Alkalibacterium 属や *Halolactibacillus* 属、*Marinilactibacillus* 属等の一部の好アルカリ性微生物は乳酸を生産することが報告されている。これらの好アルカリ性乳酸菌は強アルカリ性排水等の特殊な環境中からだけでなく、海産物や発酵食品等からも分離されている。今回我々が分離した好アルカリ性乳酸菌についても、強アルカリ性の藍染料から分離された一部の菌株を除いて、陸上植物や海水等、pH がそれほど高くない環境中から多数分離されている。このように環境中に広く分布している好アルカリ性乳酸菌は強アルカリ条件だけではなく、中性からアルカリ性域で生育可能なものが多い。

16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行ったところ、分離株は *Microbacterium* 属、*Enterococcus* 属、*Alkalibacterium* 属、*Oceanobacillus* 属、*Bacillus* 属、*Exiguobacterium* 属に分類されることが分かった (表2)。また、分離株によってグルコースから生産された L-乳酸の光学純度を表3に示す。

Microbacterium 属細菌は土壌や海水等から分離・報告されており、中性からアルカリ性の pH 域で生育可能なものが多い。No.4027 株は食品から、No.5077 株は藍染料から分離した。No.4027 株は高純度の L-乳酸 (99%ee) を生産した。

Enterococcus 属細菌は今回最も多くの株が分離され、特に植物由来の株が多かった。グルコースから生産した L-乳酸は全ての分離株が 98%ee 以上の高い光学純度を示した。これまでに報告されている *Enterococcus* 属は動物の腸内や食品、海水等の様々な分離源から報告されており、一部はアルカリ条件でも生育することが知られている。*Enterococcus mundtii* や *Enterococcus casseliflavus* は L-乳酸生産菌として知られている^{5,6)}。

Alkalibacterium 属は強アルカリ性の藍染料や海産物等から報告されている好アルカリ性細菌で、今回得られた3株も pH10 以上を示す藍染料から分離された。分離株がグルコースから生産した L-乳酸の光学純度は 89~94%ee だった。

Oceanobacillus 属は深海の堆積物等から分離・報告されている細菌で、中性からアルカリ性域で生育する。分離株 No.1143 と No.1203 がグルコースから生産した L-乳酸の光学純度は 61%ee と 73%ee だった。

Bacillus 属には様々な特徴をもつ種が含まれており、好アルカリ性細菌として報告されているものも多い。芽

表1 分離菌株の糖資化性

菌株	グルコース		ガラクトース		スクロース		キシロース	
	マンノース	フルクトース	マルトース	米澱粉				
No.1033	+++	+	+	+++	+++	+++	w	nt.
No.1044	+	+	+	+	+	+	w	+
No.1055	+	+	+	+	+	+	w	-
No.1066	+++	+++	w	+++	+++	++	w	nt.
No.1128	+++	-	-	+	+	+	+	-
No.1142	++	+	-	+	+	+	-	-
No.1143	+	+	-	+	+	+	w	nt.
No.1144	+	+	+	+	+	+	w	-
No.1190	+++	+++	+	+++	+++	++	-	-
No.1203	+	+	-	+	+	+	-	-
No.2022	+	+	-	+	+	w	+	-
No.2024	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	nt.
No.2025	++	++	+	++	++	++	+	-
No.2026	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	-
No.2028	++	++	+	++	++	+++	+	-
No.2029	++	++	+	++	++	++	+	-
No.2020	+++	+++	+	++	+++	++	+	-
No.2064	++	+	-	+	+	++	-	-
No.2065	+++	+++	+	++	+++	++	++	nt.
No.2090	+++	+++	+	++	+	+++	+	-
No.2091	+++	+++	++	++	+	+++	+	-
No.2102	+	-	-	w	+	+	w	-
No.2169	++	++	+	++	++	++	+	-
No.2181	+++	+	w	+++	+++	++	-	-
No.3011	+	w	-	+	+	w	w	-
No.3038	+++	+++	+	++	++	++	+	-
No.4027	+++	+++	w	++	++	++	w	-
No.5011	++	++	+	++	++	++	+	-
No.5018	++	++	+	++	++	++	+	-
No.5032	++	++	+	++	++	++	+	-
No.5094	++	++	+	++	++	+++	+	-
No.6011	+	+	+	+	+	+	w	-
No.6012	+++	+++	+	++	++	+++	+	-

乳酸生産量：15.0g/L 以上=+++、10.0g/L 以上=++、1.0g/L 以上=+、1.0g/L 未満=w、なし=-、未測定=nt.

胞を形成するため様々な環境中に存在していると考えられ、今回分離した株も様々な試料から得られている。分離株が生産する L-乳酸の光学純度は株によって大きく異なり、No.1044、No.1104、No.1128、No.1142、No.1144、No.5076 株はそれぞれ 73、96、92、97、99、97%ee を示した。*Bacillus* 属の L-乳酸生産菌としては、弱酸性域で生育する *B. coagulans* 等も知られている⁷⁾。

Exiguobacterium 属は、永久凍土や温泉等の特殊な環境中や食品加工排水から分離が報告されており、様々な環境中に広く分布していると考えられる。芽胞を形成しないが生育温度が広く、菌株によっては氷点下（-3℃）でも生育する⁸⁾。生育 pH についても中性からアルカリ性の広い範囲で生育可能なものが多い。基準種である *Exiguobacterium aurantiacum* は L-乳酸生産菌として報告されている⁹⁾。今回分離した株は海水や海岸の泥、海岸付近の植物から分離されたもので、全ての株が 98%ee 以上の L-乳酸を生産した。

表2 分離した好アルカリ性乳酸菌の分類

分類	分離源			
	海洋	植物	土壌	その他
<i>Microbacterium</i>				No.4027 No.5077
<i>Enterococcus</i>	No.1190	No.2020 No.2024 No.2025 No.2026 No.2028 No.2029 No.2065 No.2090 No.2091 No.2169	No.3038	No.5011 No.5012 No.5016 No.5018 No.5032 No.5094 No.5149 No.6011 No.6012
<i>Alkalibacterium</i>				No.5078 No.5106 No.5138
<i>Oceanobacillus</i>	No.1143 No.1203	No.2124		
<i>Bacillus</i>	No.1044 No.1102 No.1104 No.1128 No.1144 No.1167 No.1201	No.2102	No.3011	No.4078 No.4079 No.5076
<i>Exiguobacterium</i>	No.1033 No.1055 No.1066	No.2181		
未分類		No.2022 No.2023 No.2027 No.2064		

表3 分離株が生産する乳酸の光学純度

分類	L-乳酸(%ee)
<i>Microbacterium</i>	99.7
<i>Enterococcus</i>	97.6–99.7
<i>Alkalibacterium</i>	89.2–94.3
<i>Exiguobacterium</i>	97.8–99.6
<i>Oceanobacillus</i>	61.2–73.1
<i>Bacillus</i>	72.8–98.9

4 まとめ

沖縄県内の様々な試料を分離源（107 検体）として、pH10 で生育した微生物のうち 50 株を乳酸菌として分離し、糖資化性を調べるとともに、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。その結果、分離株は 6 属に分類され、中性からアルカリ性域で生育可能な好アルカリ性乳酸菌であることが分かった。分離株の多くは高い光学純度の L-乳酸を生産し、グルコースやスクロースを資化することから、県内の食品製造事業所から排出されるバイオマス資源を発酵原料とする L-乳酸生産への利用が期待できる。特に *Enterococcus* 属や *Exiguobacterium* 属に分類された株は生育が良好で純度の高い L-乳酸を生産することから、今後はこれらの菌株を用いて実際のバイオマス資源からの L-乳酸発酵試験を行い、培養条件や生産性等を検討する予定である。

本研究は「バイオマスからの高機能化学物質生産技術の実証（2012 技 002）」の一環として行ったものである。

参考文献

- 1) K. Horikoshi, Alkaliphilic: some applications of their products for biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63 (4), 735–750, (1999)
- 2) I. Yumoto, Bioenergetic of alkaliphilic *Bacillus* spp., *J. Biosci. Bioeng.*, 93 (4), 342–353, (2002)
- 3) 世嘉良宏斗, 常盤豊, 照屋全才, 市場俊雄, 沖縄県工業技術センター研究報告, 第 12 号, 1–4, (2009)
- 4) H. Yokaryo, Y. Tokiwa, Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 60, 270–275, (2014)
- 5) M. A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, T. Zendo, K. Shibata, K. Sonomoto, Isolation and characterization of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo L-(+)-lactic acid, *Appl. Microbiol.*

Biotechnol., 89, 1039–1049, (2011)

- 6) M. Taniguchi, T. Tokunaga, K. Horiuchi, K. Hoshino, K. Sakai, T. Tanaka, Production of L-lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacterium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 160–165, (2004)
- 7) R. H. W. Maas, R. R. Bakker, M. L. A. Jansen, D. Visser, Ed de Jong, G. Eggink, R. A. Weusthuis, Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 751–758, (2008)
- 8) T. A. Vishnivetskaya, S. Kathariou, J. M. Tiedje, The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography, *Extremophiles*, 13, 541–555, (2009)
- 9) J. M. Gee, B. M. Lund, G. Metcalf, J. L. Peel, Properties of a new group of alkaliphilic bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, 117, 9–17, (1980)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

TEL (098)929-0111

FAX (098)929-0115

URL : <http://www.pref.okinawa.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。