

好アルカリ性乳酸生産微生物の探索 (I)

世嘉良宏斗、常盤豊、照屋全才、市場俊雄

乳酸は様々な食品に含まれているヒドロキシカルボン酸のひとつで、食品分野では主に乳酸菌の発酵生産物として知られている。食品以外の工業分野では生分解性プラスチックの原料としても利用されており、石油由来原料の代替物質として注目されている。一方、近年になってこれまで知られていた乳酸菌とは異なり、アルカリ条件で生育する乳酸生産微生物の存在が明らかになってきた。特異な性質をもつこれらの微生物の産業分野における利用可能性を検討するため、沖縄県内で採取した試料から微生物を分離してその発酵生産物などについて調べた。

1 はじめに

乳酸は食品等の様々な分野で利用されている重要な物質であり、近年では再生可能資源から生産される生分解性プラスチックの原料としても注目されている。乳酸には D-乳酸と L-乳酸の光学異性体が存在し、通常の化学合成法や発酵法による生産ではこれらの混合物 (D-/L-乳酸) として得られる。D-乳酸と L-乳酸には異なる機能性があり、例えば D-乳酸はヒトの体内では代謝されにくいいため、食品として用いる場合には一日の摂取許容量 (100mg/kg/day) が定められている¹⁾。また、乳酸の重合体であるポリ乳酸は、D-乳酸と L-乳酸が混合していると結晶性が低下するが、高純度なポリ-L-乳酸は結晶性が高く、プラスチックとして利用されている²⁾。

石油由来のプラスチックとは異なり、ポリ-L-乳酸は再生可能資源からの生産が可能で、最終的には微生物によって分解可能であることから、生分解性プラスチックと呼ばれている (図1)。生分解性プラスチックはいくつかの種類が知られているが³⁾、その中でも L-乳酸を原料とするポリ-L-乳酸は、現在商業的に生産されている主要な生分解性プラスチック素材で、食品包装材や自動車内装部材等として利用が広がっている。プラスチック素材としてのポリ-L-乳酸は 1997 年にカーギル・ダウ・ポリマーズ社 (アメリカ) によって商業生産 (8 千 t/年) が開始された。現在、カーギル社が出資するネイチャーワークス社 (アメリカ) が世界最大規模の商業生産施設 (14 万 t/年) を有しているほか、ピューラック社 (オランダ) はタイに 10 万 t/年の乳酸製造工場を完成させている。世界的な環境問題への関心の高まりから生分解性プラスチックの需要拡大が見込まれており、今後の生産拡大が期待されている。

ポリ-L-乳酸の原料となる L-乳酸は乳酸菌の発酵生産によって得られる。ポリ-L-乳酸をプラスチックとして利用するためには前述したように光学純度が重要となるため、高純度な L-乳酸を生産する菌株が用いられるが、

発酵生産では一般的に数%の D-乳酸が含まれるため、培養液から乳酸を精製する過程で光学純度を高める操作を行っている。乳酸生産のための発酵原料としてはデンプン等の糖質を含むバイオマス資源が利用可能である⁴⁾。特に食糧と競合しない産業副産物などの未利用バイオマス資源を活用することが重要であり、これらの発酵原料から効率的に高純度の L-乳酸を生産するための技術開発が行われている。

これまで産業利用されている乳酸菌は中性から弱酸性域で生育するものがほとんどで、アルカリ条件で生育する乳酸生産微生物についてはあまり知られていなかった。しかし近年になって、アルカリ条件で生育し、乳酸を生産する微生物の存在が明らかになってきた。アルカリ性域で乳酸を生育する微生物としては、2001 年に Ntougias らによって食用オリーブの洗浄廃水から *Alkalibacterium olivoapovlitticus* が報告されている^{5, 6)}。また、石川らは海洋生物から 2003 年に *Marinilactibacillus psychrotolerans*、2005 年には *Halolactibacillus halophilus* と *H. miurensis* を新属として報告している^{6, 7)}。その他、藍染液から *A. psychrotolerans* など 3 種^{8, 9, 10)}、海洋生物や発酵食品から *A. thalassium* など 4 種¹¹⁾、海底堆積物から *M. piezotolerans*¹²⁾ が報告され、好アルカリ性乳酸菌としてこれまでに *Alkalibacterium* 属、*Marinilactibacillus* 属、*Halolactibacillus* 属が知られるようになった¹³⁾。(表1)

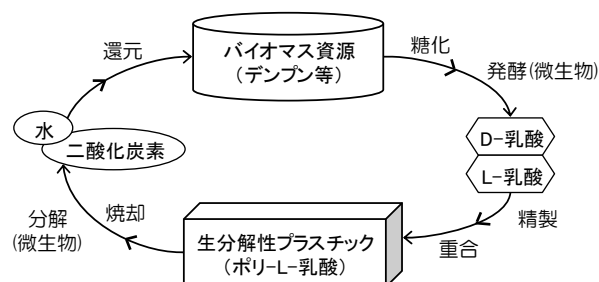


図1 生分解性プラスチックの生産

沖縄県では平成21年度より、県内の食品製造業者から主に廃棄物として排出されてい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」に取り組んでいる。本研究はその一環として、微生物機能を活用した副産物バイオマスからの効率的な乳酸生産技術の開発を目的に、亜熱帯地域である沖縄の自然環境や食品から特異な性質をもつ微生物を分離し、それらの乳酸生産性について調べた。

表1 好アルカリ性乳酸生産微生物

微生物名	生育pH範囲	乳酸収率 (対グルコース消費量)		L-乳酸 光学純度 (%)
		pH	(%)	
<i>A. olivoapovliticus</i> ^{5,6)}	8.5-10.8	8	67	41
		9	50	
		10	39	
<i>A. psychrotolerans</i> ⁸⁾	9-12	10	80-88	52
<i>A. iburiense</i> ⁹⁾	9-12	10	34-41	46
<i>A. indicireducens</i> ¹⁰⁾	9.0-12.3	10	76-88	46-47
<i>A. thalassium</i> ¹¹⁾	7.0-11.0	7	53	no data
		8	40	
		9	15	
<i>A. pelagium</i> ¹¹⁾	7.0-11.0	7	87	no data
		8	60	
		9	48	
<i>A. putridalgalicola</i> ¹¹⁾	6.5-10.0	7	88	no data
		8	51	
		9	48	
<i>A. kapii</i> ¹¹⁾	6.0-10.0	7	88	no data
		8	52	
		9	47	
<i>M. piezotolerans</i> ¹²⁾	5.5-10.0	7	80	no data
		8	59	
		9	48	
<i>M. psychrotolerans</i> ⁶⁾	8.0-9.5	7	101	75-94
		8	75	
		9	66	
<i>H. halophilus</i> ⁷⁾	6.5-9.5	7	75	80-95
		8	57	
		9	22	
<i>H. miurensis</i> ⁷⁾	6.0-10.0	7	65	80-95
		8	57	
		9	37	

2 実験方法

2-1 試薬および機器

微生物の分離及び培養には、ペプトン (Becton, Dickinson and Company)、酵母エキス (Becton, Dickinson and Company)、酢酸ナトリウム (関東化学)、リン酸水素ナトリウム (和光純薬工業)、リン酸二水素ナトリウム (和光純薬工業)、硫酸マグネシウム (関東化学)、モリブデン (VI) 酸ナトリウム二水和物 (和光純薬工業)、タングステン (VI) 酸ナトリウム二水和物 (和光純薬工業)、硫酸マンガン (II) 五水和物 (ナカライテスク)、水酸化ナトリウム (和光純薬工業)、炭酸ナトリウム (和光純薬工業)、炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業)、D-グルコース (和光純薬工業)、寒天 (和光純薬工業)、塩化ナトリウム (ナカライテスク) を使用した。HPLC

用移動相には、脱イオン水、硫酸 (和光純薬工業) を使用した。HPLC分析用標準試薬には、L-乳酸 (Sigma-Aldrich)、D-グルコース (和光純薬工業) を使用した。

D-及びL-乳酸の分析には、酵素試薬F-キット (Roche Diagnostics) を使用した。

HPLC分析は、送液システム (Waters 600 controller)、オートサンプラー (Waters 717 plus Autosampler)、カラムオープン (Waters CHM)、脱気システム (Waters SDM)、RI検出器 (Waters 410 Differential Refractometer)、UV検出器 (Shimadzu SPD-6AV)、イオン交換カラム (Bio-Rad Aminex HPX-87H, 7.8×300mm) を用いて行った。

分光光度計は、UV/VIS Spectrophotometer V-550 (日本分光) を使用した。

2-2 分離源

微生物の分離源として、2009年5月から2010年3月までに沖縄県内で採取した試料 (107検体) を用いた。

2-3 培地組成

培地の組成は蒸留水 1L に対して、ペプトン 5g、酵母エキス 10g、酢酸ナトリウム 1.5g、リン酸水素ナトリウム 1.5g、リン酸二水素ナトリウム 1.5g、硫酸マグネシウム 0.2g、モリブデン (VI) 酸ナトリウム二水和物 0.5mg、タングステン (VI) 酸ナトリウム二水和物 0.5mg、硫酸マンガン (II) 五水和物 0.5mg、グルコース 20g とした。pH は水酸化ナトリウムと炭酸-重炭酸緩衝液を用いて調整した。平板培地は上述の培地に寒天 15g を加えて固めたものを用いた。

2-4 微生物の分離

分離源となる試料は、液体の場合は直接、固体の場合は pH10 に調整した液体培地に浸して 30℃ で 1 日間集積培養したものを適宜希釈して、pH10 の平板培地に塗布した。これを 30℃ で数日間培養した後、出現したコロニーから菌株を分離した。

2-5 乳酸生産試験

分離菌株のコロニーから 1 白金耳をとり、pH10 の液体培地に接種して 1 日間培養したものを種培養液とした。これを液体培地 (pH10 または pH7) に対して 2% 量添加し、30℃ で 3~10 日間静置培養した。

3 実験結果と考察

3-1 微生物の分離

自然環境や食品等の様々な試料から、pH10 のアルカリ条件で生育する微生物 142 株を分離した。分離した菌

株は液体培地で3～10日間培養してから乳酸生産の有無を調べた。その結果、50株が1g/L以上の乳酸を生産することが分かった(表2)。

表2 分離源と乳酸生産株

分離源		分離株	乳酸生産株
海洋	51	35	14
植物	26	31	17
土壌	4	9	2
食品	12	19	5
その他	14	48	12
合計	107	142	50

3-2 乳酸生産試験

分離した乳酸生産株50株のうち、7日以内に10g/L以上の乳酸を生産する23株について、中性とアルカリ性の培養液で発酵試験を行った(図2)。ほとんどの菌株が中性よりもアルカリ性の培養液で良く生育し、乳酸を多く生産した。No.4078株とNo.5076株はpH7では生育しなかった。また、No.2022株とNo.5032株の乳酸生産量はpH7で培養した方がわずかに多かったが、いずれも4g/L以下であった。

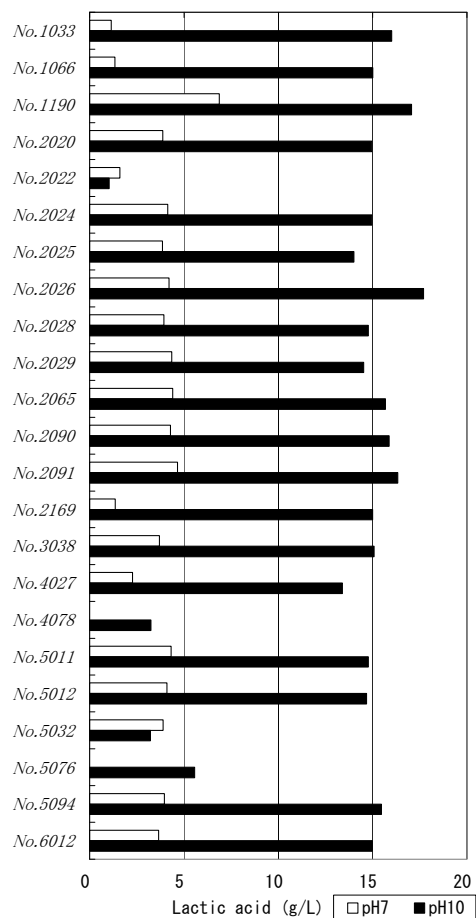


図2 pH7及びpH10での乳酸生産

表3 分離菌株の発酵生産物

菌株	D-/L-乳酸 (g/L)		グルコースに対する乳酸収率 (%)	その他の生産物
		L-乳酸 (%)		
No.1033	13.7	99.2	81.0	ギ酸、酢酸、エタノール
No.1066	14.9	99.5	75.9	ギ酸、酢酸、エタノール
No.1190	15.7	99.8	86.3	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2020	14.6	99.2	75.7	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2024	16.5	99.6	75.7	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2025	13.7	98.8	70.8	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2026	17.4	99.7	89.5	酢酸
No.2028	14.1	99.2	74.8	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2029	13.9	99.2	73.5	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2065	14.0	99.4	79.3	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2090	15.1	99.4	80.3	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2091	15.3	99.6	82.6	ギ酸、酢酸、エタノール
No.2169	14.5	99.4	75.8	ギ酸、酢酸、エタノール
No.3038	14.4	99.4	76.3	ギ酸、酢酸、エタノール
No.4027	13.9	98.6	67.8	ギ酸、酢酸、エタノール
No.5011	14.4	99.4	74.7	ギ酸、酢酸、エタノール
No.5012	13.5	99.1	74.3	ギ酸、酢酸、エタノール
No.5094	14.7	99.4	78.2	ギ酸、酢酸、エタノール
No.6012	14.4	99.3	75.8	ギ酸、酢酸、エタノール

3-3 乳酸の光学純度

乳酸生産株のうち生産性が高かった 19 株について、pH10 の培養液中で生産した乳酸の光学純度を調べた(表3)。その結果、すべての菌株が高純度(98%以上)のL-乳酸を生産することが分かった。また、これらの菌株は乳酸の生産と同時にギ酸、酢酸、エタノールを生産していることから、ヘテロ型の乳酸発酵形式であることが分かった。

4 まとめ

沖縄県内で採取した試料を分離源として、アルカリ条件下で生育する微生物を探索した結果、142 株を分離した。これらの菌株のうち 50 株はアルカリ条件下でグルコースから乳酸を発酵生産し、さらにこのうち 19 株は高純度(98%以上)のL-乳酸を生産することが分かった。

参考文献

- 1) Ninth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, "Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids, and bases", FAO nutrition meetings report series No. 40; WHO technical report series No. 339, p20, (1966).
- 2) 小原仁実, 奥山久嗣, 澤誠治, 藤井康宏, 檜山圭一郎, 再生可能資源からの高分子量ポリ-L-乳酸の工業的製造法開発, 日本化学会誌, 6, 323-331, (2001).
- 3) 常盤豊, バイオプロセスと生分解性プラスチック, 環境バイオテクノロジー学会誌, 4 (1), 5-17, (2004).
- 4) Y. Tokiwa, B. P. Calabia, Biological production of functional chemicals from renewable resources, *Can. J. Chem.*, 86, 548-555, (2008).
- 5) S. Ntougias, N. J. Russell, *Alkalibacterium olivoapovliticus*, gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive washwaters, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 1161-1170, (2001).
- 6) M. Ishikawa, K. Nakajima, M. Yanagi, Y. Yamamoto, K. Yamasato, *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtr-opical areas of Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 711-720, (2003).
- 7) M. Ishikawa, K. Nakajima, Y. Itamiya, S. Furukawa, Y. Yamamoto, K. Yamasato, *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 711-720, (2003).
- 8) I. Yumoto, K. Hirota, Y. Nodasaka, Y. Yokota, T. Hoshino, K. Nakajima, *Alkalibacterium psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant obligate alkaliphilic that reduces an indigo dye, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 2379-2383, (2004).
- 9) K. Nakajima, K. Hirota, Y. Nodasaka, I. Yumoto, *Alkalibacterium iburiense* sp. nov., an obligate alkaliphilic that reduces an indigo dye, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1525-1530, (2005).
- 10) I. Yumoto, K. Hirota, Y. Nodasaka, Y. Tokiwa, K. Nakajima, *Alkalibacterium indicireducens* sp. nov., an obligate alkaliphilic that reduces an indigo dye, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 901-905, (2008).
- 11) M. Ishikawa, S. Tanasupawat, K. Nakajima, H. Kanamori, S. Ishizaki, K. Kodama, A. Okamoto-Kainuma, Y. Koizumi, Y. Yamamoto, K. Yamasato, *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium putridalgicola* sp. nov. and *Alkalibacterium kapii* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 1215-1226, (2009).
- 12) L. Toffin, K. Zink, C. Kato, P. Pignet, A. Bidault, N. Bienvenu, J. L. Birrien, D. Prieur, *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 345-351, (2005).
- 13) 石川森夫, 好塩性・好アルカリ性乳酸菌の多様性と特性, 日本食品微生物学会誌, 26 (2), 49-59, (2009).

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

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.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。