

有明海由来のキシロース資化性乳酸菌の分離

小林 元太^{1*}・岡 宏圭²・田代 幸寛¹・加藤富民雄²・神田 康三²・林 信行²

(2008年3月3日受付 2008年4月3日受理)

Isolation of Xylose-Utilizing Lactic Acid Bacteria from Ariake Sea —Note—

Genta Kobayashi^{1*}, Hiroyoshi Oka², Yukihiro Tashiro¹, Fumio Kato², Kohzo Kanda², and Nobuyuki Hayashi² (*Division of Microbial Technology, Ariake Sea Research Project*¹, and *Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture*², Saga University, Saga 840-8502) Seibutsu-kogaku: **86**, 217-220, 2008.

A screening test was carried out to obtain lactic acid bacteria utilizing xylose from bottom sediments in Ariake Sea as sources. About 100 xylose-utilizing bacterial isolates as acid producer were obtained from several sources. More than 50 isolates were catalase-negative and eight isolates produced more than 8 g/l lactic acid in MRS medium containing xylose at 20 g/l. The OTK-1 strain, which produced a high concentration of lactic acid (more than 12 g/l) was isolated from tideland in Ariake Sea. The OTK-1 strain was rod-shaped, as observed under a microscope. This strain was designated as *Lactobacillus brevis* OTK-1 on the basis of 16S rDNA sequence analysis. The maximum yield of produced lactic acid with respect to utilized xylose, and the lactic acid productivity were 1.15 mol/mol and 1.0 g/l/h, respectively. This strain was able to utilize xylooligosaccharide as a fermentative substrate.

[**Key words**: lactic acid fermentation, xylose utilization, biomass, Ariake Sea]

もみ殻や麦わらなどの農産廃棄物は年間約1600万トン発生し、一部は飼料や堆肥に利用されているが、約140万トンは焼却処分され、少なからず環境に負荷をかけている。このような過剰な農産廃棄物問題、また化石資源枯渇化の問題、さらには地球温暖化問題など、環境に対する関心が高まっている。そのため、近年、バイオマスを循環型有機資源として微生物による有用物質への変換が試みられている¹⁾。一般的に植物バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなり、セルロースはヘキソースであるグルコースを構成単糖としているのに対し、ヘミセルロースはキシロースやアラビノースなどのペントースを構成単糖としている。ヘミセルロースやその加水分解物であるキシロースやキシロオリゴ糖の有効利用法の確立には、それらを発酵原料として効率よく資化し有用物質を生産する微生物の分離が期待され

る。農業県である佐賀県内有明海湾奥部は干拓による稲作を中心とした農地が広がっており、稲わらやもみ殻などの農産廃棄物系の植物バイオマスが浅海域へ流出する可能性が高く、キシロースやキシロオリゴ糖資化能を有する細菌が存在していると考え、本報では有明海湾奥部の佐賀県小城市芦刈町干潟や鹿島市沖合より採取された底泥を分離源として新規キシロース資化性乳酸菌の分離を行った。まず、MRS-xylose培地(1%ペプトン、0.8%肉エキス、0.4%酵母エキス、0.5%CH₃COONa・3H₂O、0.2%K₂HPO₄、0.2%Tri-ammonium citrate、0.1%Tween 80、0.02%MgSO₄・7H₂O、0.005%MnSO₄・4H₂O、2%Xylose、pH6.5)に分離源を1白金耳接種し、酸素吸収剤であるアネロバックケンキ(三菱ガス化学社製)を用いた嫌気条件下にて30°Cで数日間静置培養を行った。次に上記の培養液を0.5%CaCO₃含有MRS-

*連絡先 ¹佐賀大学有明海総合研究プロジェクト微生物相研究部門(〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町1番地) TEL. 0952-28-8496 FAX. 0952-28-8496 E-mail: gentak@cc.saga-u.ac.jp

²佐賀大学農学部

xylose 寒天培地に植菌し、同条件下で数日間静置培養を行い、コロニー周辺部分にクリアゾーンを形成した約100株を釣菌し、同条件下で10 mlのMRS-xylose培地を張り込んだ試験管培養を静置にて行った。その培養液を遠心分離操作(10,000 rpm, 10 min)にて得られた菌体ペレットに3%過酸化水素水溶液を1 ml加え、カタラーゼ試験を行った。発泡が観察されなかったカタラーゼ陰性のキシロース資化性酸生成菌約50株を分離した。それぞれの培養液上清中の乳酸濃度とキシロース濃度をShibataら²⁾の手法に従いHPLCにて測定した。その結果、8株において8 g/l以上の顕著な乳酸生産を確認でき、その中でも小城市芦刈町の干潟より分離したOTK-1株が12 g/l以上の高い乳酸生産を示した。F-キット(J.K.インターナショナル社製)を用いて生成乳酸異性体タイプを調べたところ、OTK-1株が生産する乳酸はDL-乳酸であり、L-乳酸とD-乳酸の生成比は8.9:3.2であった。そこで本菌株を今後の実験に供することとし、菌種の同定を行った。位相差顕微鏡(ECLIPSE 80i, ニコン社製)を用いて細胞の形態を観察した結果、OTK-1株は桿菌であった。次に以下に示すように16S rDNA解析による同定を行った。OTK-1株のゲノムDNA抽出には、QIAmp DNA Mini Kit(Qiagen社製)を用い、抽出したDNAを鋳型として、細菌ユニバーサルプライマー(8UA; 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and 1510r; 5'-CTG AAG CTT ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3')を用いて³⁾、16S rDNAのV1-V9領域の約1500 bpを増幅した。PCR反応は以下の条件(変性95°C 30 s, アニールンク55°C 30 s, 伸長72°C 1 min; 30 cycles)でTグラジェントサーモサイクラー96(Biometra社製)を用いて行った。得られたPCR産物をQIAquick PCR Purification Kit(Qiagen社製)を用いて精製した。精製PCR産物をpGEM-T Easy Vector(Promega社製)にTAクローニングを行い、*Escherichia coli* JM109(TOYOBO社製)にて形質転換後、形質転換株からHigh Pure Plasmid Isolation Kit(Roche社製)を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドの当該部分の塩基配列を決定後、データベース(BLAST program of the National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)にて相同性検索を行った。その結果、OTK-1株の16S rDNA配列はGeneBank Accession numbers DQ523492, AB266535, AB024299, AJ422044などの*Lactobacillus brevis*の16S rDNA配列と99%以上の相同性を有することが明らかとなった。このことより本菌株を*Lactobacillus brevis* OTK-1と同定した。MRS-xylose培地を用いた時の*L. brevis* OTK-1株の最大乳酸生産濃度と対キシロースモル収率は13.9 g/lおよび1.15 mol/molであ

あった。Gardeら⁴⁾、*L. brevis* CHCC2097を用いた時に20.9 g/lのキシロースから11.5 g/lの乳酸を生産したと報告しており、この時の生産された乳酸の対キシロースモル収率は0.91 mol/molと算出され、本*L. brevis* OTK-1は同じ*L. brevis*ではあるがCHCC2097株と比較して非常にすぐれた乳酸生産能および対キシロースモル収率を有していることが明らかとなった。乳酸菌のキシロース代謝は、ホスホケトラーゼ経路で代謝される場合は1 molのキシロースから乳酸と酢酸が1 molずつ生産されるために対キシロースモル収率は1.00 mol/molとなるが、今回のように対キシロースモル収率が1を超える場合にはペントースリン酸経路を経て代謝されていることが考えられる。この経路では、キシロース5-リン酸をトランスケトラーゼやトランスアルドラーゼの働きによりすべてグリセルアルデヒド3-リン酸に変換し、理論的には3 molのキシロースから5 molの乳酸が生産される。理論的には対キシロースモル収率は1.67 mol/molとなるが、これら2つの経路のうち一方だけ利用する場合もあれば両方を利用する場合もあると報告されている⁵⁾。本菌株もホスホケトラーゼ経路とペントースリン酸経路の両方を併せ持っていると推察される。次に*L. brevis* OTK-1の至適発酵温度を調べるために、MRS-xylose培地を用いて、培養温度をそれぞれ25, 30, 37, 43°Cとしたフラスコ培養(200 ml容三角フラスコに100 mlの培地張込)を行った。その時の乳酸生産とキシロース資化の経時変化をFig. 1に示す。25, 30, 37, 43°Cの時の最大乳酸生産濃度はそれぞれ11.5, 11.7, 8.8, 0.7 g/lであり、最大乳酸生産濃度では25°Cと30°Cでは顕著な差は見られなかったが、乳酸生産速度およびキシロース資化速度が大きかった温度30°Cを至適条件と決定した。さらに至適pHを決定するために、初発キシロース濃度を40 g/lに調製したMRS-xylose培地を用いて、温度30°CにてpH

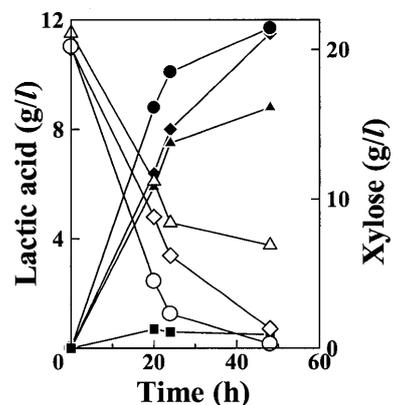


Fig. 1. Effect of temperature on production of lactic acid and consumption of xylose. Lactic acid concentrations at 25°C (◆), 30°C (●), 37°C (▲), and 43°C (■), xylose concentrations at 25°C (◇), 30°C (○), 37°C (△), and 43°C (□).

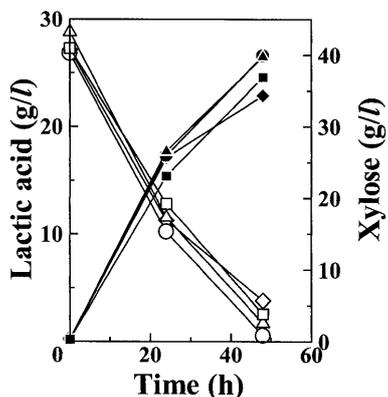


Fig. 2. Effect of initial pH on production of lactic acid and consumption of xylose. Lactic acid concentrations at pH 5.5 (◆), 6.0 (▲), 6.5 (●), and 7.5 (■), xylose concentrations at pH 5.5 (◇), 6.0 (△), 6.5 (○), 7.5 (□).

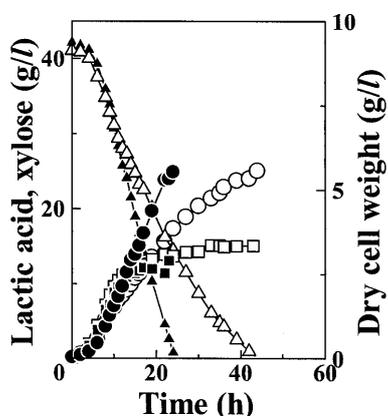


Fig. 3. Time courses of production of lactic acid and consumption of xylose at pH 6.0 and 6.5. Lactic acid concentrations at pH 6.0 (○) and 6.5 (●), xylose concentrations at pH 6.0 (△) and 6.5 (▲), dry cell weights at pH 6.0 (□) and 6.5 (■).

をそれぞれ5.5, 6.0, 6.5, 7.0としたフラスコ培養(200 ml 容三角フラスコに100 mlの培地張込)を行った。その時の乳酸生産とキシロース資化の経時変化をFig. 2に示す。pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0の時の最大乳酸生産濃度はそれぞれ22.9, 26.5, 26.6, 24.6 g/lであった。pH 6.0と6.5の場合の最大乳酸生産濃度がほぼ同じであったことから、pHコントローラー(Able社製)によりpH 6.0および6.5に制御したジャーフェーマンターを用いた回分培養(1000 ml 容ジャーフェーマンターに400 mlの培地張込, かくはん速度 100 rpm)を行い, 至適 pH を詳細に検討した。その時の乳酸生産, キシロース資化, 菌体増殖の経時変化をFig. 3に示す。最大乳酸生産濃度は, pH を6.0および6.5にコントロールした場合のどちらも24-25 g/l と差はなかったが, pH 6.5にコントロールした場合は培養24時間目でキシロースをほぼ資化しつくし, その時の乳酸生産速度は1.0 g/l/hであったのに対して,

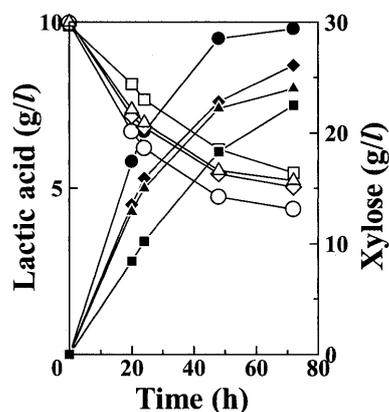


Fig. 4. Effect of NaCl on production of lactic acid and consumption of xylose. Lactic acid concentrations at NaCl 0% (●), 3% (◆), 4% (▲), and 6.5% (■), xylose concentrations at NaCl 0% (○), 3% (◇), 4% (△), and 6.5% (□).

pH 6.0にコントロールした場合の24時間目ではキシロースは14 g/l以上残存しており, その時の乳酸生産速度は0.73 g/l/hであった。最終的な対キシロースモル収率はpH 6.0と6.5のいずれの場合も1.00 mol/molであり, Gardeら⁴⁾による*L. brevis* CHCC2097の0.91 mol/molよりも高い値であった。ヘテロ乳酸発酵では培養条件によってホスホケトラーゼ経路とペントースリン酸経路の両代謝の変化が起こることが報告されており^{5,6)}, 本菌株における対キシロースモル収率がpHをコントロールしない場合の1.15 mol/molからpHをコントロールした場合の1.00 mol/molへと変化したことから, かくはんなどの培養条件の変化によって代謝経路バランスが変化したことが示唆された。一方, *L. brevis* OTK-1は有明海干潟泥から分離した菌株であることからNaClが乳酸発酵に及ぼす影響についても検討を行った。MRS-xylose培地にNaClを3, 4, 6.5%となるように添加し, 30°Cで培養を行った結果をFig. 4に示す。一般的に海水中の塩濃度は3.5%程度と言われているが, 本菌株は3-4%以上のNaCl濃度では乳酸生産やキシロース資化に阻害を示し, 本菌株はNaClを添加しない場合に最も良好な乳酸生産を示し, 有明海由来ではあるが本菌株は好塩性ではないことが明らかとなった。次に将来的なバイオマス有効利用を考慮して, キシロオリゴ糖を炭素源とした場合の乳酸発酵を検討した。市販キシロオリゴ糖(和光純薬社製)をMRS-xylose培地中のキシロース代替として培地を調製し, 前述のようにフラスコ培養を行った。その結果をFig. 5に示す。市販オリゴ糖の主成分はキシロピオースとキシロトリオースであり, わずかにキシロースが含まれていた。本菌株はキシロピオースとキシロトリオースもキシロースと同様に炭素源として乳酸生産を行うことが可能であり, 資化したオリゴ糖を単糖に換算した乳酸

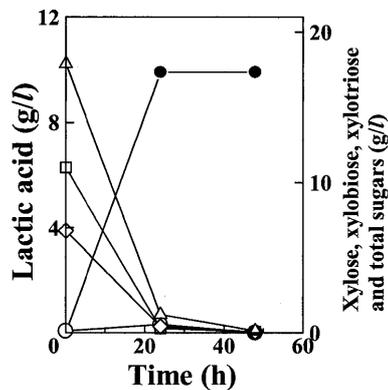


Fig. 5 Time courses of production of lactic acid and consumption of sugars using xylooligosaccharide. Lactic acid concentration (●), xylose concentration (○), xylobiose concentration (□), xylotriose concentration (◇), total sugar concentration (△).

の対キシロースモル収率は1.15 mol/molであった。さらに我々はソフトバイオマスの一種である稲わらから加圧熱水法により抽出したバイオマス分解物を本乳酸発酵原料として利用可能であることも明らかとしており、今後はバイオマスの有効利用に大きく貢献することが期待される。

要 約

有明海の底泥よりキシロースを炭素源として乳酸を高

生産する乳酸菌を分離し、*Lactobacillus brevis* OTK-1と同一命名した。本菌は既報の*L. brevis* CHCC2097よりも高い乳酸生産速度 (1.0 g/l/h) および対キシロースモル収率 (1.15 mol/mol) で乳酸を生産することが可能であった。この乳酸菌はキシロオリゴ糖からも乳酸を生産することが可能であり、ヘミセルロース系バイオマス分解物からの乳酸生産の可能性が示された。

文 献

- 1) Saha, B. D.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 279–291 (2003).
- 2) Shibata, K., Flores, D. M., Kobayashi, G., and Sonomoto, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 149–155 (2007).
- 3) Nakayama, J., Hoshiko, H., Fukuda, M., Tanaka, H., Naoshige, S., Tanaka, S., Ohue, K., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 481–489 (2007).
- 4) Garde, A., Jonsson, G., Schmdt, A. S., and Ahring, B. K.: *Bioresource Technology*, **81**, 217–223 (2002).
- 5) 園元謙二, 石崎文彬: 発酵ハンドブック, (財) バイオインダストリー協会編, p.316–319, 共立出版社, 東京 (2001).
- 6) Tanaka, K., Komiyama, A., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Hall, S. J., and Stanbury, P. F.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 160–167 (2002).
- 7) 林 信行, 岡 宏圭, 小林元太, 熊谷 聡, 坂木 剛: 第16回日本エネルギー学会大会講演要旨集, p.192–193 (2007).