

第5章 焼酎粕原液及び焼酎粕を基質とした高温嫌気性発酵槽内からの高温乳酸菌の分離・培養と生理学的特性評価

5-1 はじめに

乳酸菌 (lactic acid bacteria) は乳酸を多量に作る細菌を意味し、慣用的な呼び名であって、分類学上の呼び方ではない。乳酸菌の定義としては、細胞はグラム陽性、細胞形態は桿菌または球菌、カタラーゼ反応は陰性を示し、消費したブドウ糖に対し、50%以上の乳酸を産生し、内生孢子を形成せず運動性をほとんど示さないものを乳酸菌と位置づけている¹⁾。乳酸菌もヒトと同様に、複雑な栄養要求性を示す¹⁾。エネルギーとなる糖成分 (glucose など発酵性の糖類)、菌体成分構築のためのアミノ酸類、生育因子のビタミン類やミネラル類を必須とする。さらに一部の乳酸菌では脂肪酸 (オレイン酸であることが多い) を要求することがある¹⁾。このように、乳酸菌が生育するには栄養成分が一様に整った環境を必要とする。

現在、廃水処理において用いられているメタン発酵槽では処理状況に応じて乳酸が生成されるという事例がある²⁾。また、廃水の種類によっても反応器内に乳酸が検出されることがある。これらのことから、メタン発酵槽内に乳酸菌が生息している可能性が考えられる。また、現在知られている乳酸菌のほとんどが中温性の菌であり、高温に耐えうる乳酸菌の種類はあまり見つかっていない。高温菌のメリットとしては、飼料の作製において、発酵をより早く行うことができることと、他の雑菌の生育を抑制できるということが考えられる。

本研究では、平成20年度から22年度にかけて、高温条件下 (55°C) で焼酎粕原液を処理しているメタン発酵槽の嫌気性汚泥及び焼酎粕原液から高温乳酸菌の分離を試みた。また、分離した菌株について発酵特性や生理学的特徴の評価を行った。

5-2 試験方法

(1) 分離に用いた試料

焼酎蒸留粕から高温乳酸菌の分離を試みるにあたり、O酒造とK酒造から排出される焼酎粕を植種汚泥として用いた。O酒造においては、排出されたばかりのフレッシュなもの、外気で数日保管していたもの、55°Cの高温域で焼酎粕原液を処理している Reversible-flow Anaerobic Baffled Reactor (RABR) の底の部分の嫌気性汚泥を用いて分離を試みた。K酒造においては、排出されたばかりの焼酎粕及び焼酎粕貯留タンクの壁面に付着している焼酎粕を用いて分離を試みた。嫌気性汚泥においては、変異している新種の高温乳酸菌が存在する可能性のある場所を考慮して、RABRの底の部分からサンプリングを行ったものを用いた。理由としては、温度が変動しにくいこと、Solids Retention Time (SRT; 固形物滞留時間) を16~20日と非常に長い期間で確保しているために汚泥が溜まり、菌が長期間生息することで変異が起りやすいことなどが考えられるためである。焼酎粕においては、排出直後の温度が高いことや貯留タンク内が高温で保持されていることから微生物の変異及び高温乳酸菌が生息しやすいと考え、分離試料とした。

(2) 高温乳酸菌の分離方法

高温乳酸菌を分離するにあたって、乳酸菌の要求栄養分を豊富に含んでいる MRS 培地 (Difco 社) を用いた。MRS 培地の組成を表 5-1 に示す。培地の調整では、系外からの混入細菌の生育を抑制するためにシクロヘキシミドを培地中で 10 mg/L になるように培地に添加し、寒天平板法では酸生成菌を見分けるために CaCO_3 を培地に添加して培養を行った。また、培地は調整後にオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。図 5-1 に MRS 固形培地のブランクの写真、図 5-2 に液体 MRS 培地のブランク写真を示す。

分離手法としては、以下に示す 3 つの方法で行った。1) 最初に試料を希釈したものを N_2 パージによるガス置換を行った MRS 培地で集積培養し、集積培養した菌を乳酸菌実験マニュアル¹⁾に準じて混釈法による寒天平板作製法により単離を試みる 2) N_2 パージによるガス置換を行った MRS 培地で集積培養を繰り返す。3) ロールチューブ法を用いてコロニーをピックアップする。分離手法及び分離株の名称、温度条件を表 5-2 に示す。このとき用いた器具はすべて 121°C、20 分間、オートクレーブで滅菌処理し、植菌などの作業はクリーンベンチ内で行った。寒天平板作製法における培養時には、嫌気状態で培養を行うために CO_2 発生剤であるアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学株式会社) を同封して培養を行った。

表 5-1 MRS 培地組成

Yeast Extract	5.0 g
Beef Extract	10.0 g
Manganese(II) sulfate	0.05 g
TWEEN 80	1.0 g
glucose	20.0 g
Sodium Acetate	5.0 g
Bacto Peptone	10.0 g
Potassium Dihydrogen phosphate	2.0 g
Ammonium Citrate	2.0 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Agar	15.0 g
D.W.	1 L

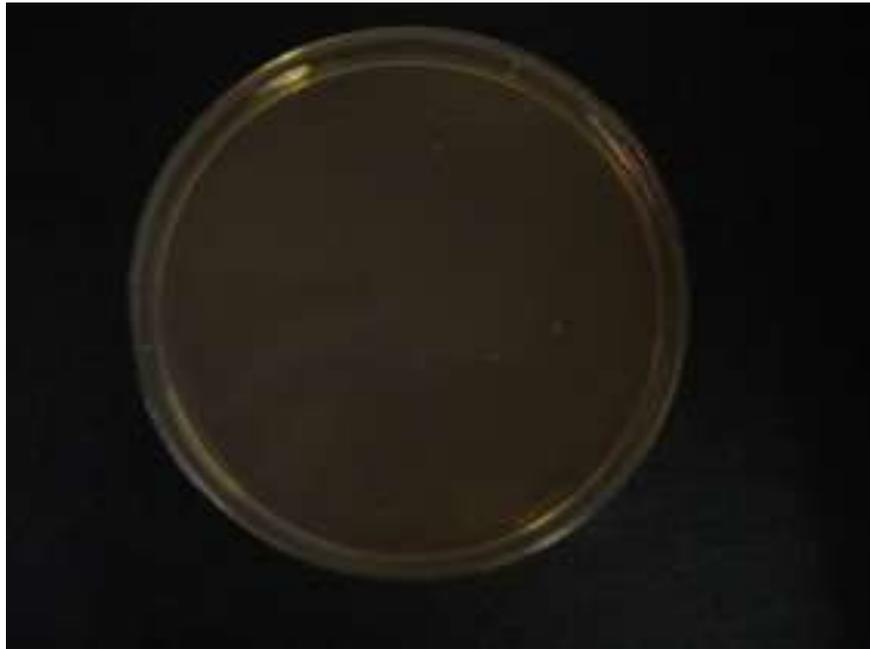


図 5-1 固形 MRS 培地ブランク



図 5-2 液体 MRS 培地ブランク

表 5-2 各試料における分離条件及び分離株名称

分離試料	O酒造の焼酎粕					K酒造の焼酎粕		
	フレッシュ	外気保存		嫌気性汚泥1	嫌気性汚泥2	嫌気性汚泥3	フレッシュ	壁面
培養法	寒天平板法	寒天平板法		寒天平板法	集積培養法	ロールチューブ	集積培養法	集積培養法
培養温度(°C)	50	30	50	50	55	50	50	50
分離株	OSF	KS1, KS2, KS3	OSO	OKC	P16H	RTP16	KL	KW

(3) 分析方法

ガス組成の分析方法は、液体培地では、菌発生後にどのようにガスの組成が変化してい

るか調べるために TCD 検出器ガスクロマトグラフでガス分析を行った。分析項目としては H₂、N₂、CH₄、CO₂ の 4 種である。

分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行った。DNA 抽出は、Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MO-BIO) を用いてビーズビーダー法で行った。DNA 抽出後、PCR 法で標的 16S rRNA 遺伝子を増幅させた。PCR 反応は 95°C で 9 分間初期変性を行い、95°C・40 秒、50°C・30 秒、72°C・2 分のサイクルを 34 サイクル行ったのち、最後に 72°C で 4 分間反応させた。プライマーペアには、EUB10f³⁾と Univ1500r³⁾のペア、EUB338f mix⁴⁾と Univ1500r のペア、EUB27f⁵⁾と 1392r⁵⁾のペア、EUB10f と 800r のペアを用いた。各々の分離株に用いたプライマーペアは表 5-3 に示した。PCR 反応試薬には *TakaRa ExTaq* Hot Start Version (TaKaRa)を用い、PCR 反応器には PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa)を使用した。PCR 法で増幅させた標的 16S rRNA 遺伝子を MinElute PCR Qualification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。その後、TOPO TA cloning Kit for sequencing (Invitrogen) のキットを用いてクローニングを行った。各分離株から 20 クローンを採取し、各クローンの *E. coli* position 338 から 800 付近までの V3 領域を含む遺伝子配列を Univ907r⁶⁾を用いてタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンター (<http://catalog.takarabio.co.jp/jutaku/>) に外注し、ドラフトシーケンスを決定した。

シーケンシング後、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の Blast 相同性検索ツール (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性検索を行った。相同性検索では、97%以上を同じ種と判断し Operational Taxonomic Unit を設定した。また、相同性が同じ種が複数あった菌は生理学的特徴を調査して既往の文献と比較し、菌種の同定を行った。

表 5-3 16S rRNA 遺伝子の分子系統解析結果

分離株	同定株	PCR primer	sequence primer	length (bp)	相同性(%)
OSF	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	338f mix, 1500r	907r	650	99
KS1	<i>Lactobacillus zeae</i>	10f, 800r	10f, 800r	783	100
KS2	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	10f, 800r	10f, 800r	782	97
KS3	<i>Lactobacillus casei</i>	10f, 800r	10f, 800r	783	100
OSO	<i>Bacillus coagulans</i>	10f, 1500r	907r	650	99
OKC	<i>Bacillus coagulans</i>	27f, 1392r	27f, 518r_f, 1392r	1355	100
P16H	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	10f, 1500r	907r	650	99
	<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>				99
RTP16	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	10f, 1500r	907r	650	100
KL	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	10f, 1500r	907r	650	99
KW	<i>Bacillus coagulans</i>	338f mix, 1500r	907r	650	100

分離株の形状を調査するために顕微鏡観察を行った。顕微鏡は BX41 (OLYMPUS) を用い、位相差で観察を行った。顕微鏡の倍率は 1000 倍に設定し、懸濁法を用いて標本作製した。その後、分離株の特性を評価するために乳酸菌実験マニュアル⁷⁾に準じてカタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、運動性試験、ガス発生試験、発酵形態の調査を行った。乳酸の測定は 761 compact IC (Metrohm) で行った。Column は RSpak KC-811 (Shodex)、Column Heater は U-620 TYPE 30VP (Sugai) を用いた。溶離液は 1mM HClO₄、再生液は 40mM NaOH、洗浄水はイオン交換水とし、Column 温度 50°C、流速 1.0 mL/min

で測定した。試料はメンブレンフィルター (0.45 μ m) を通して分析に用いた。糖の分析はフェノール-硫酸法を用いて 485 nm の波長で測定を行った。

乳酸の生成を確認後、生成された乳酸異性体について分析を行った。乳酸異性体の分析は、Okubo ら⁸⁾の分析方法に準じて HPLC で測定を行った。ポンプは 880-PU Intelligent HPLC Pump (JAS.C.O) を使用し、UV 検出器に UV-41 (Shodex) を用いた。Column は ORpak CRX-453 (Shodex) を用い、D-2500 Chromato-Integrator (HITACHI) でデータの処理を行った。移動相に 1mM CuSO₄ とメタノールを 9:1 で混合したものを用い、Column 温度 35°C、流速 0.3 mL/min で測定した。サンプルは 12 時間、MRS 培地で培養したものを 100 倍で希釈し、メンブレンフィルター (0.45 μ m) を通したのものを用いた。分離株の 49 種類の糖の発酵を調査し、菌種を簡易同定できる Api50 CH (BIOMERIEUX) を用いて発酵試験を行った。培地は Api50 CHL と Api50 CHB/CHE を用いた。

分離株の経時的な乳酸発酵能力を測定するために、培地中の乳酸濃度、pH、糖濃度を微生物の増殖終了まで測定した。基質には MRS 培地を 7 mL 用意し、接種は 0.1 mL で分析を行った。温度条件は KS1 株、KS2 株、KS3 株を 30°C、OKC 株、OSO 株、KW 株、OSF 株、KL 株を 50°C とした。

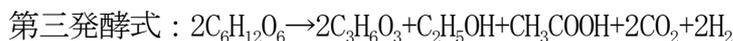
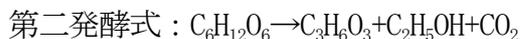
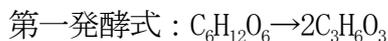
5-3 結果と考察

(1) ガス分析結果

バイアル瓶の中の液体 MRS 培地のガスの組成がどのように変化しているかを TCD のガスクロマトグラフにより調べた結果を図 5-3 に示す。

液体 MRS 培地のガスの組成は N₂ パージを 2 分間行っているためほとんどが N₂ で占められている。実際にブランクを打ってみると、N₂ がほとんどで、H₂ と CO₂ は微量であり、CH₄ は発生していなかった。しかし、菌発生後の培地のガスの組成を調べてみると、N₂ と CO₂ の量が大幅に増えており、H₂ と CO₂ で全体のガスの組成の 50 % 以上を占めているものもあった。しかも、CH₄ が発生していないことからメタン菌でないことは明らかである。

また、H₂ と CO₂ が発生しているのは乳酸発酵の際にグルコースが分解されと考えられる。このことから乳酸発酵がされているのであれば、以下の式が適用される菌であると考えられる。



(2) 高温乳酸菌の分離結果

O 酒造及び K 酒造の焼酎蒸留粕、RABR の嫌気性汚泥から高温乳酸菌の培養を行った結果、MRS 培地の底が白濁した。寒天平板法及びロールチューブ法では培養 2 日で培地にコロニーを形成した。集積培養法においては、1 日後に菌の増殖が確認できた。寒天平板法により生えた菌の単離を試みたが、ロールチューブ法及び集積培養法で生えた微生物は寒天平板法による MRS 培地にコロニーを形成しなかったため、集積培養を繰り返すことにより乳酸発酵に適した微生物群を形成させた。高温乳酸菌の分離を試みた結果、全条

件において微生物を分離することに成功した。

分離した微生物を顕微鏡で観察した結果、すべての分離株は桿状の菌であった。しかし、条件が異なる培地ごとに桿菌の形、大きさは異なっていた。顕微鏡による形状観察写真を図 5-4 に示す。

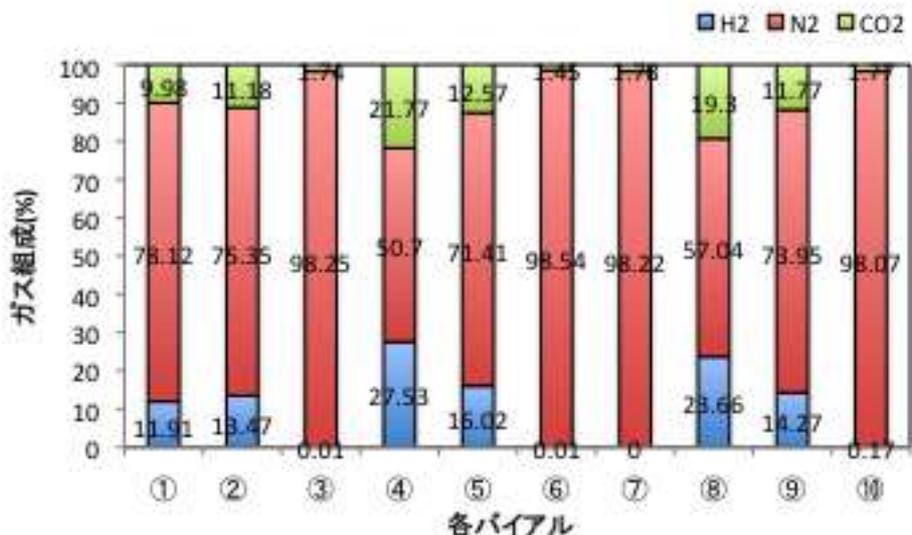


図 5-3 各バイアル内のガス組成

(3) 16S rRNA 遺伝子の分子系統解析結果

分離株の塩基配列の解析を行った結果、全分離株において Blast 検索により 97%以上の相同性が得られた。結果として、分離株は *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *L. z-eae*, *L. casei*, *L. manihotivorans*, *Bacillus coagulans*, *L. amylolyticus*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *T. aotearoense* であると同定できた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析結果を表 5-3 に示す。P16H 株以外の分離株は純菌として分離することに成功した。P16H 株は 2 種類の菌種が存在していることから、単離する必要性が示唆された。

芋焼酎粕の排出直後の試料において OSF 株と KL 株で菌種の違いが見られた。これは、O 酒造と K 酒造の焼酎の製造方法及び酵母や麹の種菌の違いなどが原因として考えられる。また、排出直後の焼酎粕に存在した OSF 株が常温で焼酎粕を保存することによって同じ高温性微生物でも OSO 株が分離された。この OSO 株は *B. coagulans* という芽胞を形成する微生物⁹⁾であり、元々排出直後の焼酎粕に存在していたが優占種ではなく、環境の変化に対応し、中温条件下でも生存することができていた可能性が示唆された。また、KS1 株、KS2 株、KS3 株においては、焼酎粕を常温で保存している際に自然環境下から混入し、優占化した可能性が考えられた。

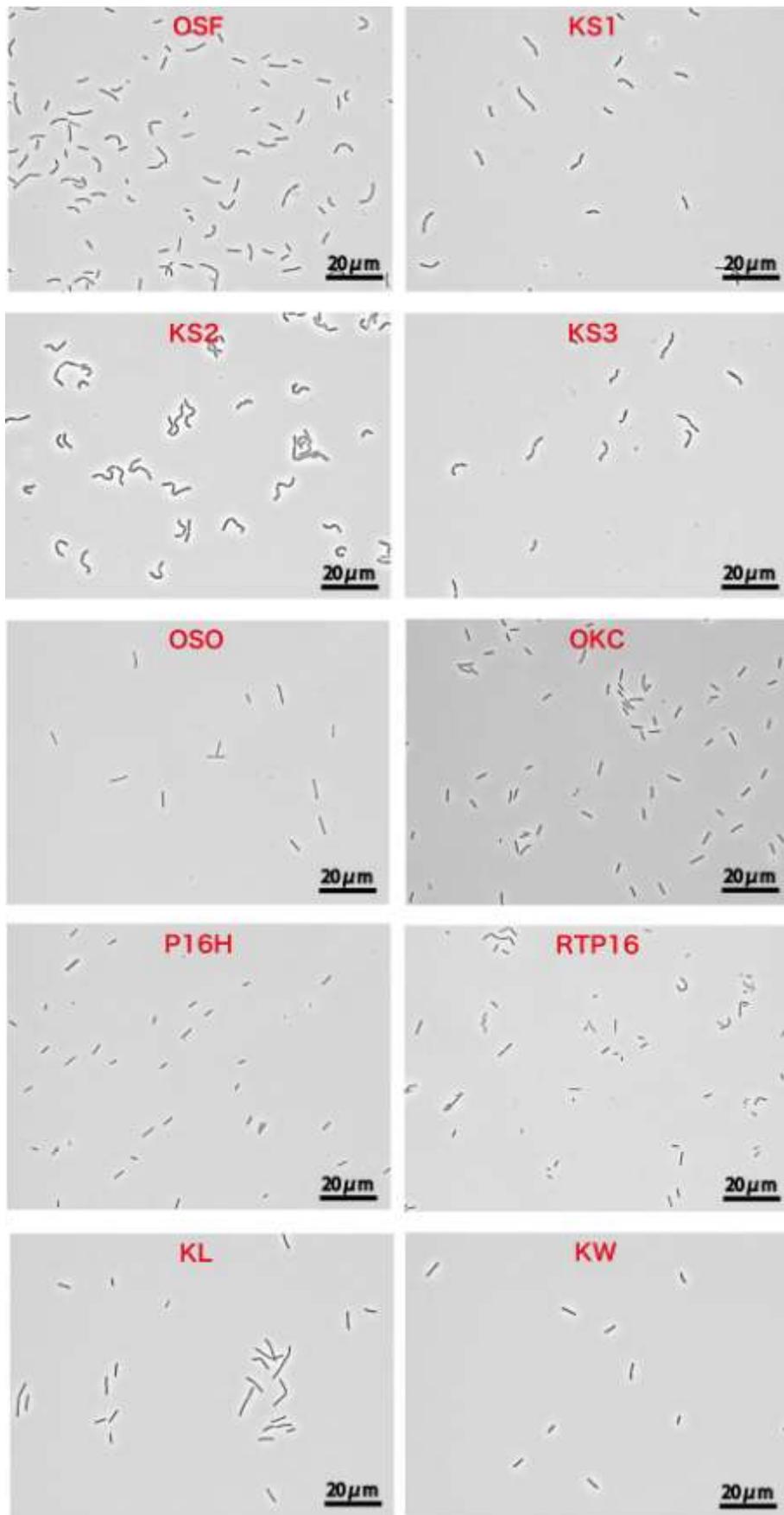


図 5-4 分離した微生物の顕微鏡写真

(4) 生理学的特性評価の結果

分離株の生理学的特性評価を行った結果を表 5-4 に示す。表 5-4 を見ると、分離株はすべてホモ発酵していることが分かった。これは高い乳酸収率を必要とする利用法に有効であることから、非常に利用しやすい菌であると考えられる。また、*B. coagulans* である OSO 株、OKC 株、KW 株は *Lactobacillus* 属の菌種と異なりカタラーゼ陽性、運動性陽性であることが分かる。*B. coagulans* はカタラーゼ陽性、運動性陽性の他に芽胞を形成するなどの性質を示すことが報告されている⁹⁾ことから、遺伝子解析による同定結果は信頼性が高いと考えられた。

表 5-4 分離された微生物の特性評価結果

	OSF	KS1	KS2	KS3	OSO	OKC	KL	KW	乳酸菌	大腸菌
乳酸発生	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
オキシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
運動性	-	-	-	-	+	+	-	+	+/-	+/-
ガス発生	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+
大腸菌検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
発酵形態	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ/ヘテロ	第三発酵式

表 5-5 分離株の乳酸異性体の測定結果

	OSF	KS1	KS2	KS3	OSO	OKC	KL	KW
L-Lactate (mM)	18.3	174.4	151.0	164.9	77.6	81.5	98.1	78.7
D-Lactate (mM)	267.2	31.3	1.8	4.4	0.0	0.0	175.7	0.0
L-Lactate (%)	6.4	84.8	98.8	97.4	100.0	100.0	35.8	100.0
D-Lactate (%)	93.6	15.2	1.2	2.6	0.0	0.0	64.2	0.0
Optical form	D	L	L	L	L	L	DL	L

分離株の乳酸発酵特性について調査を行った結果を表 5-5 に示す。この結果から *B. coagulans* と同定した OSO 株、OKC 株、KW 株の産生した乳酸は、ほぼすべてが L-乳酸であった。また、中温性 *Lactobacillus* 属と同定した KS1 株、KS2 株、KS3 株は産生した乳酸のうち、L-乳酸が 80%以上を占め、D-乳酸の割合は少量であった。高温性の *Lactobacillus* 属である KL 株は産生した乳酸のうち、D-乳酸 64.2%、L-乳酸 35.8%という結果となった。このことから、KL 株は DL-乳酸を産生する菌であることが分かった。OSF 株においては D-乳酸が 93.6%と非常に高い割合を占めていることから、D-乳酸を産生する菌であると考えられた。これらの結果を基に生成した乳酸のうち同じ乳酸異性体を 80%以上産生しているという基準で分類すると、L-乳酸産生型が OSO 株、OKC 株、KW 株、KS1 株、KS2 株、KS3 株、D-乳酸型が OSF 株、DL-乳酸型が KL 株であると考えられた。Akao らは L-乳酸を生成する *B. coagulans* を非滅菌状態の生ごみ中で優先化させることにより高純度の L-乳酸を回収する研究を行っている¹⁰⁻¹³⁾。高い光学純度を有する L-乳酸は、生分解性プラスチックであるポリ乳酸 (PLA) の原料として利用でき、昨今では非常に注目されている材料である。そこで、今回分離した微生物のうち、L-乳酸産生型の微生物を利用して未利用バイオマスから L-乳酸を生成することが可能となれば、非常に有用であると考えられる。

表 5-6 分離株の Api50CH による糖類発酵試験結果

Carbohydrate	OSF	KS1	KS2	KS3	OSO	OKC	KL	KW
	api50CHL	api50CHL	api50CHL	api50CHL	api50CHB/CHE	api50CHB/CHE	api50CHL	api50CHB/CHE
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	+	W	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	+	-	-	-
Ribose	-	+	+	+	+	+	-	+
D-Xylose	-	-	-	-	+	-	-	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	+	-	-	-	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	+	+	+	+	+	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	W	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	W	-	W
Rhamnose	-	+	+	-	+	-	-	-
Dulcitol	-	+	+	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	-	+	W	+	-	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-	W	+	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-	-	+
N-Acetyl-glucosamine	W	+	+	+	+	+	+	+
Amygdaline	W	+	+	W	-	+	-	+
Arbutine	W	+	+	W	+	+	-	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	W	+	+	W	W	+	+	+
Cellobiose	W	+	+	-	+	+	+	+
Maltose	-	W	+	W	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	-	+	-	-	+
Melibiose	-	-	-	-	+	+	-	+
Saccharose	-	-	-	W	-	W	-	W
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	+	+	+	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	+	+	-	+
Amidon	-	-	-	-	+	+	+	+
Glycogene	-	-	-	-	-	-	W	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	-	+	W	-	+	+	+	+
D-Turanose	-	+	+	+	-	W	-	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	+	+	+	-	W	-	W
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	+	W	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Arabitol	-	+	W	W	-	-	-	-
Gluconate	-	W	W	W	+	-	-	-
2-keto-gluconate	-	W	W	-	-	-	-	-
5-keto-gluconate	-	-	-	-	W	+	-	W

+: positive reaction, -: negative reaction, w: weakly positive reaction.

Api50 CH による糖類発酵試験を行ったところ、ほとんどの分離株が多種類の糖類を乳酸に変換していた。Api50 CH の結果を表 5-6 に示す。糖類発酵試験結果から、*B. coagulans* である OSO 株、OKC 株、KW 株の糖の資化性が多少の差異はあるが似たような結果となった。また、OSF 株は 4 種の糖類発酵と 6 種のわずかな糖類発酵という結果がみられた。これは、他の分離株と比較すると発酵できる糖類の数が少なく、OSF 株が特異的な環境でしか生息できない微生物である可能性が示唆された。この 4 種の糖類は分離株すべてで資

化しており、焼酎粕から分離した微生物については D-Glucose、D-Mannose、Esculine、Trehalose を資化できる可能性が示唆された。Api50 CH の分析結果を基にして、有効利用のための基質を決定することが可能であると考えられた。

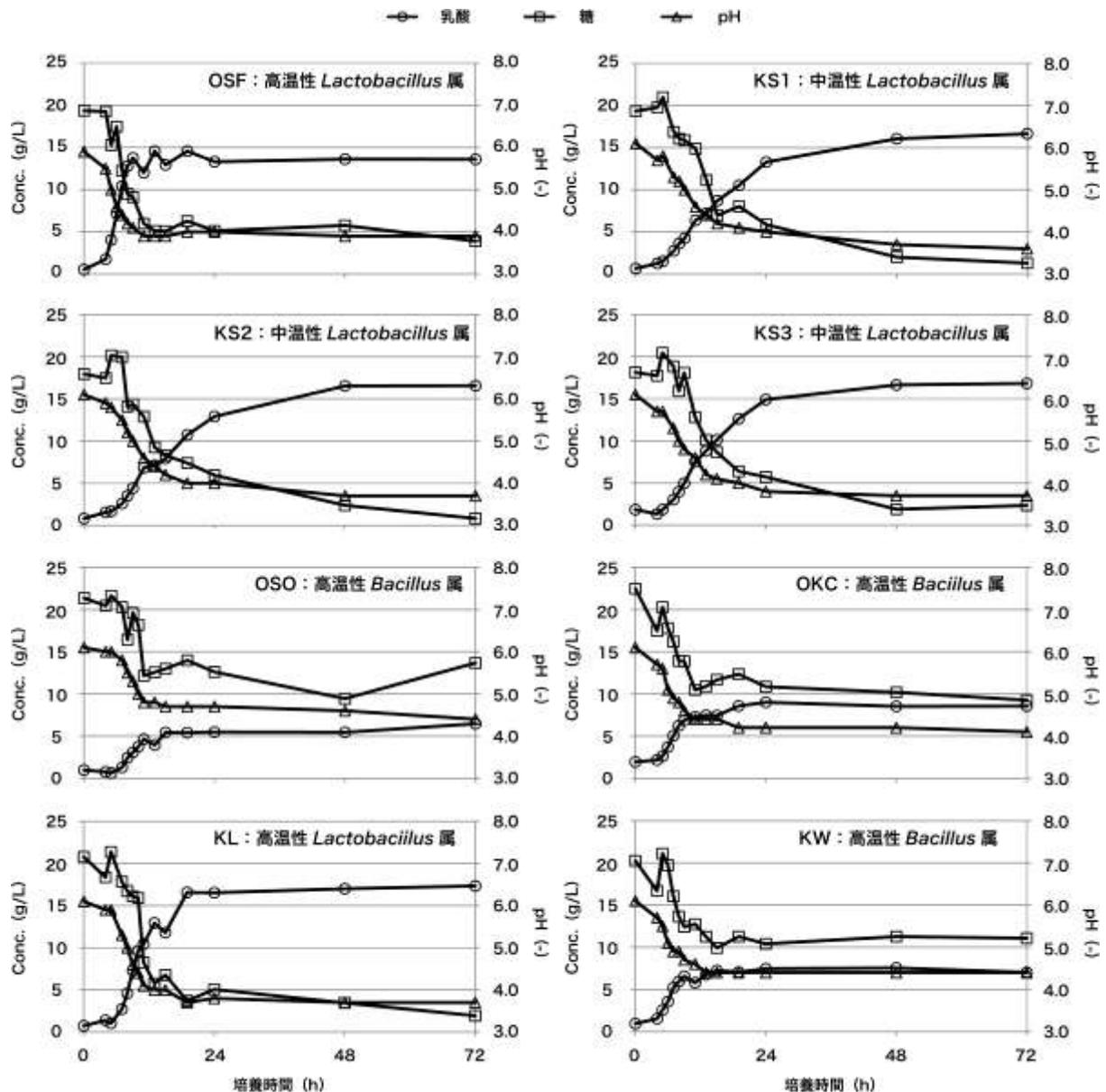


図 5-5 分離株の経時的乳酸生成能力の調査結果

分離株を植種した MRS 培地中の乳酸濃度、糖濃度、pH を調査した結果を図 5-5 に示す。50℃の温度条件で生息する OSF 株、OSO 株、OKC 株、KL 株、KW 株は比較的早い時間で乳酸の生成が律速になっていた。また、高温性 *Lactobacillus* 属である OSF 株、KL 株については pH を 4.0 以下まで低下させ、OSF 株において 14 g/L、KL 株において 16 g/L 以上の乳酸を生成していた。*B. coagulans* である OSO 株、OKC 株、KW 株においては、pH が 4.4 程度、乳酸生成が 6~11 g/L 程度までしか増加しなかった。これは *B. coagulans* が乳酸の生成による pH の低下から菌体を守るために芽胞を形成したことが原

因として考えられた。30℃の温度条件で生息する KS1 株、KS2 株、KS3 株は pH を 3.7 程度まで低下させ、16 g/L 以上の乳酸を生成していた。前述した Akao らの研究では、*B. coagulans* を優先化させて L-乳酸を回収しているが、図 5-5 に示すように *B. coagulans* は *Lactobacillus* 属の微生物と比較して乳酸生成能力が低く、高い乳酸濃度を得ることができなかった。そのため、工業的に高温 L-乳酸発酵を利用する場合には、高い乳酸濃度を得ることができる L-乳酸産生型である高温性 *Lactobacillus* 属を利用したほうが良いと考えられた。高温性の乳酸菌は 12 時間程度で乳酸の生成が律速になっていることから、回分試験では短い HRT で高い乳酸濃度を得ることができると考えられた。

分離した OSO 株、OKC 株、KW 株は *B. coagulans* という芽胞を形成し、高温で生存し乳酸を多量に産出する菌であることから、サイレージなどの家畜の飼料やコンポストなどの肥料作製に適用できると考えられる⁴⁾。サイレージでは、材料草に共生する酪酸菌、好気性細菌、糸状菌及び酵母などの微生物が乳酸菌の発酵を競合的に阻害し、品質の劣化や発酵損失を招くことが報告されている¹⁴⁾。このような微生物はほとんど中温性であることから、分離した微生物の至適生育温度 50℃で発酵を行うことにより、高い雑菌抑制効果が期待できると考えられた。また、高温で生育できるというメリットから前述したような試料や肥料作製の高速化も可能であると考えられた。*B. coagulans* は分離されたことのある既存の微生物だが、発酵させるものの組み合わせによって今ある発酵物よりもさらに良いものをつくることが可能だと考えられる。また、RABR の嫌気性汚泥から分離した OKC 株は長期間 RABR の中で変異している可能性が十分に考えられる。これらのことから、焼酎粕の糖基質を用いることにより既存の *B. coagulans* よりも高い発酵能力を発揮できると考えられる。高温発酵のサイレージには、*B. coagulans* が優先的に生息することが報告されている¹⁵⁾ことから、分離した微生物も高温発酵サイレージに適している可能性が示唆された。

また、分離した高温及び中温性の *Lactobacillus* 属もホモ乳酸発酵であることから、*B. coagulans* と同じようにサイレージ発酵に用いることが可能であると考えられた。

4-4 おわりに

O 酒造及び K 酒造の焼酎蒸留粕、RABR の嫌気性汚泥から高温性の乳酸菌と同程度の能力を有する *B. coagulans* 及び 5 種類の高温及び中温性乳酸菌の分離に成功した。

分離株の乳酸発酵特性の評価を行ったところ、L-乳酸産生型が OSO 株、OKC 株、KW 株、KS1 株、KS2 株、KS3 株、D-乳酸型が OSF 株、DL-乳酸型が KL 株であることが分かった。Api50 CH による糖類発酵試験を行ったところ、ほとんどの分離株が多種類の糖類を乳酸に変換していた。

分離株の経時的乳酸生成能力を調査した結果、*Lactobacillus* 属の分離株は乳酸濃度 10 g/L 以上、pH を 4.0 以下まで低下させた。また、高温性の分離株は中温性の分離株と比較して比較的早い時間で乳酸の生成が律速になっていた。

参考文献

- 1) 乳酸菌研究集談会編 (1996) : 乳酸菌の科学と技術, 株式会社学会出版センター
- 2) 賀澤拓也ら (2008), 食品廃棄物を対象とした中温無加水メタン発酵技術の開発, 第 26

回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会論文集, p336-337.

- 3) Endo, A. and Okada, S. (2005). *Lactobacillus satsumensis* sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and starchy materials, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 83-85.
- 4) 阿部憲一, 大橋晶良, 井町寛之, 原田秀樹, 徳富孝明 (2006). スポンジ・エアリフト型リアクターによる亜硝酸型硝化に及ぼすアンモニア濃度と温度の影響, 環境工学研究論文集, 43, 343-351.
- 5) Noda, S., Inoue, T., Hongoh, Y., Kawai, M., Charunee, A. N., Charunee, V., Kudo, T., Ohkuma, M. (2006). Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in *Bacteroidales* attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. *Environmental Microbiology*, 8(1), 11-20.
- 6) Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (1991). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- 7) 小崎道雄(監修), 内村泰, 岡田早苗(著)(1992). 乳酸菌実験マニュアル -分離から同定まで-, 朝倉書店.
- 8) Okubo, S., Mashige, F., Omori, M., Hashimoto, Y., Nakahara, K., Kanazawa, H., Matsushima, Y. (2000). Enantiomeric determination of L- and D-lactic acid in human cerebrospinal fluid by chiral ligand exchange high-performance liquid chromatography, *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY*, 14, 474-477.
- 9) Vecchi, E. De. and Drago, L. (2006). LACTOBACILLUS SPOROGEN-ES OR BACILLUS COAGULANS : MISIDENTIFICATION OR MISLABELLING?, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1(1), 3-10.
- 10) 赤尾聡史, 津野洋, 堀江匠(2007). 非滅菌模擬生ごみを原料とする高温 L-乳酸発酵の半連続式培養への適用, 土木学会論文集 G, 63(1), 68-76.
- 11) Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J. (2007). Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure, *WATER RESEARCH*, 41, 1774-1780.
- 12) Akao, S., Tsuno, H., Horie, T., Mori, S. (2007). Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, *WATER RESEARCH*, 41, 2636-2642.
- 13) Hidaka, T., Horie, T., Akao, S., Tsuno, H. (2010). Kinetic model of thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification, *WATER RESEARCH*, 44, 2554-2562.
- 14) 蔡義民 (2004). サイレージ発酵乳酸菌, 微生物遺伝資源利用マニュアル(15), 1-12.
- 15) 佐々木博, 高尾彰一 (1976). サイレージ発酵中の *Bacillus coagulans* について, 北海道大学農学部邦文紀要, 10(3), 241-246.