

# 乳酸生成糸状菌による植物性バイオマス構成糖の発酵特性解析

斎藤 勝一 [ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター寒地バイオマス研究チーム / 主任研究員 ]

## 背景・目的

農産物の生産過程や加工工程で発生する残渣には纖維質などの難分解性成分が多く含まれる。これらバイオマスの資源化は、まず発酵可能な分子への加水分解に多大なエネルギーを要し、加えて分解の結果生じる発酵基質についても、グルコースなどのヘキソースやキシロースなどのペントースなど多種多様な物質の混合物であり、これら構成糖の高効率変換が困難な現状にある。そこで本研究では、微生物として旺盛かつ幅広い糖資化性を有する糸状菌の中でも、糸状菌として希有な乳酸生成能を有する乳酸生成糸状菌*Rhizopus*属糸状菌に焦点を絞り、植物性バイオマスを構成する多種多様なヘテロ糖類の乳酸、エタノールへの高効率変換に適う菌株の取得とその発酵特性の解析を目的とした検討を行った。

## 内容・方法

### (1) 乳酸生成糸状菌による各種糖類の発酵解析

(独) 製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源部門( N B R C )で保有する*Rhizopus oryzae* のうち、これまでの検討の結果、馬鈴薯の加工副産物であるポテトパルプ発酵の最適株として選抜した乳酸生成糸状菌 *R. oryzae* NBRC4707株を用い、100 ml三角フラスコ中、2% or 5%炭素源、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids、0.5%カザミノ酸の液体培地50mlにより25℃、5日間の振盪培養を行った。炭素源としては、D-キシロース、L-アラビノース、D-アラビノース、D-マンノース、D-ガラクトースを各々用いた。培養時2.5%CaCO<sub>3</sub>の添加有無の二通りで培養を行い、培養後の上清をHPLC、TLCにより有機酸等の分析を行った。また、500mlの同培地を用い1L容培養装置による発酵解析も行った。

### (2) 植物性バイオマス発酵用菌株の新規探索

各種作物種子を次亜塩素酸ソーダを含む溶液により表面消毒後、PDB培地に接種し発生した糸状菌を単離し、ITSリボソームDNA配列による菌株同定を行った。取得した糸状菌及びNBRC保有の*Rhizopus*属および*Rhizomucor*属菌株を用い、2%炭素源、CaCO<sub>3</sub>無添加のフラスコ培養により(1)同様の発酵解析を行った。

## 結果・成果

### (1) 乳酸生成糸状菌による各種糖類の発酵解析

*R. oryzae* NBRC4707株を用いたフラスコレベルでの

検討の結果、2%炭素源、CaCO<sub>3</sub>無しの条件でD-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトースから各々0.55%、1.37%、0.48%の乳酸を生成し、いずれの場合においても培養上清のpHがpH2.7程度まで低下していた。これら炭素源については、炭素源濃度を5%と増やした場合にも2%の場合とほぼ同程度の乳酸生成量、pHであったことから、乳酸生成に伴うpH低下により発酵抑制が生じていると考えられた。一方、CaCO<sub>3</sub>を添加し pHの低下を抑制した条件下においては、これらいずれの炭素源においても全く乳酸を生成しないか顕著な生成量の低下が見られ、CaCO<sub>3</sub>による発酵阻害が生じているものと考えられた。以上のことから、*R. oryzae* NBRC4707株によるD-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトースからの乳酸発酵は可能であるものの、発酵時のpH条件に非常にセンシティブであり、発酵収率の向上にはpH制御が重要であることが明らかとなった。一方、L-アラビノース、D-アラビノースを炭素源とした場合には、いずれの条件においても乳酸生成が確認できず、本菌はこれら糖類の発酵能を保持しないものと思われた。

1L容培養装置を用い12%D-キシロースを炭素源とした場合の通気効果を検討した結果、培養6日後に1L/minの通気条件において0.39%の乳酸を生成したのに対し、通気無しの条件における乳酸生成量は0.11%に留まった。通常発酵は嫌気条件で行われるが、本菌の乳酸発酵は好気条件により促進されることが明らかとなった。また、本装置を用い12% D-キシロースと2% D-グルコースの共存下発酵を行った場合、D-グルコースのみが優先的に資化されるカタボライト・リプレッションが観察され、グルコース共存下でのキシロースの発酵が困難であることがわかった。

### (2) 植物性バイオマス発酵用菌株の新規探索と発酵性評価

ソバ( S1株 )ダックソバ( DS1株 )及び小麦( K1、K2株 )の種子より得られた糸状菌の菌株同定を行った結果、各々 *Rhizopus*属と同定された。これら4株とNBRC保有の*Rhizopus*属および*Rhizomucor*属菌株計12属86株を用い、フラスコレベルでのD-キシロースの発酵試験を行った結果、*R. oryzicola* NBRC5378株が最も高い10.89%の乳酸を生成し、*R. oryzicola*以外では*Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* NBRC4781が0.39%、分離株ではK1株が0.51%の乳酸を生成した。分離株についてはその他炭素源の検討も行い、D-マンノースではS1株、DS1株が各々1.53%、1.41%、D-ガラクトースではK1株が0.82%と、*R. oryzicola* NBRC4707株を上回る量の乳酸生成が確認でき、これら菌株が植物性バイオマス発酵用菌株として有望であり新規探索により更なる有望菌の取得が可能であることが示唆された。

## 今後の展望

本研究では、*R. oryzicola* およびその近縁種を用いることによりキシロース、マンノース、ガラクトースの発酵利用が可能であることを明らかとした。特にキシロースは、ヘミセルロースの構成糖として農産物や木質など自然界に広くそして多量に存在するが、五炭糖のペントースであることから発酵利用が困

難で利用法の開発が最も切望される糖類の一つである。現状では、発酵効率が十分ではなく直ちに実用化とはいえないものの、引き続きこれら菌株の発酵解析、更には代謝経路の分子生物学的解析を行い発酵効率の向上を目指すことで、植物性バイオマスの高効率変換と再資源化が可能になるものと考えている。