

複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物変換法の制御と体系化

Control and Organization of Meta-Fermentation for Value-added Substance Conversions with Controlled Mixed Culture Systems

田代 幸寛*, 酒井 謙二
YUKIHIRO TASHIRO and KENJI SAKAI

九州大学大学院農学研究院 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

* TEL: 092-642-2862 FAX: 092-642-2861

* E-mail: tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8281, Japan

キーワード: 複合微生物系, メタ発酵, 光学活性 L-乳酸, 発酵制御, 体系的フィードバック分離

Key words: mixed culture systems, meta-fermentation, optically pure L-lactic acid, fermentation control, systematic feedback isolation

(原稿受付 2016年9月5日/原稿受理 2016年9月12日)

1. はじめに

あらゆる環境や動植物には、多種多様な微生物がいわゆる『複合微生物系 (mixed culture systems)』を形成して生息している。また、それらの複合微生物系はそれぞれ特有の機能・役割 (物質変換, 有機物・汚染物質分解, 栄養素供給, 感染・病原化, 健康維持など) を果たしており、程度の差があるものの環境および動植物に影響を与えている。一方、19世紀にコッホが純粋分離法を開発して以降、微生物学は分離した単一微生物 (純粋培養系) を用いた研究により著しく発展し、今後も貢献することは自明である。さらに、21世紀以降では、解析技術 (シーケンスや質量分析計など) の開発や進歩に伴い、微生物を分離せずに直接複合微生物系をターゲットとする細菌群集構造解析, メタゲノム, トランスクリプトーム, プロテオームやメタボロームなどの研究が活発に行われ、新しい知見が次々に報告されている。ところが、複合微生物系による有価物生産に関する発酵研究は、単一微生物を用いたものに比べて格段に少なく、知見も技術は蓄積されておらず、学問としても体系化されているとは言いがたい。そこで本項では、複合微生物系を用いた有価物変換法の制御および体系化に関する知見を紹介するとともに、今後の展望を概説する。

2. メタ発酵とは

著者らは、複合微生物系による有価物生産のための発酵法を『メタ発酵』と定義している。メタ発酵 (複合微生物) と純粋発酵 (単一微生物) の特徴を表1に示した¹⁾。メタ発酵では、純粋系の維持を厳密化する必要がないため、殺菌・雑菌混入・設備/エネルギーコストに関しては、純粋発酵よりも有利である。また、異なる基

質特異性を示す複合微生物を用いるメタ発酵では、広範な基質を利用できることから、多様な成分より構成されるバイオマスなどの複合基質の変換においても優れている。ところが、多様な代謝経路により、最終代謝物質である生成物は複雑であり、ホモ発酵が困難である。さらに、純粋発酵では、単一微生物の代謝解析 (菌数, 転写量, 酵素活性, 代謝物) は比較的容易であるが、メタ発酵では、各菌種の代謝解析は複雑である。また、純粋発酵で確立されている発酵制御技術は、メタ発酵では研究蓄積が乏しく、理論すら構築されていないのが現状である。これまでに、メタンや堆肥などの一部の有価物はメタ発酵によってのみ生産可能であるのは周知の通りである。一方、その他の有価物生産に関する報告は格段と少ないものの、メタ発酵によってエタノール²⁰⁾, ブタノール⁴⁾, 水素ガス¹⁴⁾, 乳酸⁸⁾, 酪酸³⁾などのバイオ燃料およびバイオケミカルを生産できることが報告されている。次項以降には、主に光学活性乳酸生産を目指したメタ発酵に関する著者らの成果を紹介する。

表1. メタ発酵と純粋発酵の比較¹⁾

	純粋発酵 (単一微生物)	メタ発酵 (複合微生物)
単一基質の変換	効率的	非効率的
複合基質の変換	非効率的	効率的
殺菌 (加熱/除菌)	必要	不必要
雑菌混入に対する強さ	弱い	強い
設備/エネルギーコスト	高い	安い
生成物	単純	複雑 (課題)
微生物・代謝解析	容易	複雑 (課題)
発酵制御研究	蓄積あり	困難 (課題)

※太字はメリットを示す。

表 2. 異なる温度 (30–65°C) におけるメタ発酵 (168 h) の生産物パターン

温度 (°C)	C_{L-LA} (g L ⁻¹)	C_{D-LA} (g L ⁻¹)	C_{AA} (g L ⁻¹)	C_{BA} (g L ⁻¹)	C_{PA} (g L ⁻¹)	C_{FA} (g L ⁻¹)	OP _{L-LA} (%)	S _{LA} (%)	S _{BA} (%)
30	0.330	0.755	2.27	24.8	2.41	0.219	-39.2	3.69	80.5
37	0	0	7.06	26.8	1.63	0.010	—	0	75.5
40	16.6	1.23	5.70	6.51	0.090	1.00	86.2	58.3	20.9
45	34.2	0.224	2.57	0	0	0.143	98.7	91.3	0
50	34.5	0	2.80	0	0	0	100	91.6	0
55	21.7	0.185	2.30	0	0	0	98.3	89.7	0
60	9.51	1.51	5.24	3.00	0	0	72.6	57.3	15.6
65	7.93	1.31	2.73	0	0.166	0.586	71.7	73.2	0

C_{L-LA} ; L-乳酸濃度, C_{D-LA} ; D-乳酸濃度, C_{AA} ; 酢酸濃度, C_{BA} ; 酪酸濃度, C_{PA} ; プロピオン酸濃度, C_{FA} ; ギ酸濃度, OP_{L-LA}; L-乳酸光学純度, S_{LA}; 乳酸選択性, S_{BA}; 酪酸選択性。

3. 温度制御による生産物の選択¹⁸⁾

微生物には、増殖可能温度領域と最適増殖温度が必ず存在するため、発酵温度は純粋発酵でもメタ発酵でも各微生物の増殖および代謝を制御する因子の一つである^{7,12,17)}。本項では、標準生ゴミ培地にコンポストを複合微生物系として用いて、異なる発酵温度 30–65°C で、発酵液中の pH を 24 h 毎に 7.0 に調整する pH 振動制御によるメタ発酵を行った。なお、先行研究により使用コンポストの主要細菌は *Bacillus* 属であることが明らかとなっている⁹⁾。

表 2 に各発酵温度における発酵 168 h 後の主要有機酸生産濃度、L-乳酸光学純度 ((L-乳酸生産濃度 - D-乳酸濃度) / (L-乳酸生産濃度 + D-乳酸濃度) × 100)、乳酸選択性 (乳酸生産濃度 / 全有機酸生産濃度 × 100) および酪酸選択性 (酪酸生産濃度 / 全有機酸生産濃度 × 100) を示した。酪酸 (30°C および 37°C)、L-乳酸 (45–55°C)、混合有機酸 (40°C、60°C および 65°C) と発酵温度によって主生産物が異なった。特に、30°C で酪酸生産濃度 24.8 g L⁻¹、酪酸選択性 80.5%、50°C で L-乳酸生産濃度 34.5 g L⁻¹、乳酸選択性 91.6%、L-乳酸光学純度 100% が得られ、メタ発酵の課題であった副産物生成をある程度抑制しながら、主生産物への高い変換率を達成できた。また、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) による細菌群集構造解析の結果、*Clostridium* 属細菌および *Bacillus coagulans* がそれぞれ、酪酸 (30°C および 37°C) および L-乳酸 (45–55°C) 生産細菌であることが明らかとなった。

メタ発酵による L-乳酸生産の過去の報告では、汚泥や発酵原料に元来生息している微生物を複合微生物として用いたが、本研究はコンポストを用いた初めての報告である。また、これまでにメタ発酵で L-乳酸光学純度 100% を報告した事例はなく、著者らが初めて達成した。以上のように、メタ発酵においても発酵温度は重要な制御因子であり、発酵温度を制御することで主生産物を選択できることが明らかとなった。

4. 新規 pH 制御法による L-乳酸生産の高効率化¹⁶⁾

純粋発酵では、pH 制御により乳酸生産 (濃度, 収率, 生産性など) が向上し、特に、pH 一定制御法が有効な手法であることが知られている^{2,17)}。一方、メタ発酵で

は、発酵温度同様に制御因子として pH についても pH 一定制御法や pH 振動制御法による L-乳酸生産の効率化が報告されている^{6,13)}。本項では、各種 pH 制御法を検討して前項に構築したメタ発酵による L-乳酸生産プロセスの高効率化を目指した。

pH 一定制御 (pH コントローラーにより 7.0 に常に維持) を行ったメタ発酵を行った結果、pH 振動制御 (24 h 毎に 7.0 に調整) よりも発酵時間は 168 h から 60 h に短縮されて、最大生産速度は 0.520 g L⁻¹ h⁻¹ に増加した (図 1)。ところが、予想に反して、乳酸生産濃度は 45.1 g L⁻¹ から 16.9 g L⁻¹ に大幅に減少し、副産物濃度が 0.604 g L⁻¹ から 11.5 g L⁻¹ に増加し、混合有機酸発酵となった (乳酸選択性: 59.5%)。また、DGGE 解析の結果、*B. coagulans* などの乳酸生産菌はほとんど増殖せず、ヘテロ乳酸生産菌である *Bacillus thermoamylovorans* が主要細菌であった。

そこで、pH 切替制御法を考案し、pH を 24 h まで非制御として 24 h 以降に 7.0 に一定制御する方法 (非制御 → 一定制御) と pH を 24 h まで 6 h 毎に 7.0 に振動制御して 24 h 以降に 7.0 に一定制御する方法 (振動制御 → 一定制御) を検討した (図 2)。その結果、両方法とも L-乳酸生産が向上し、特に、pH 切替制御 (振動制御 → 一定制御) 法では、すべてのパラメータ (発酵時間: 36 h, 生産濃度: 39.2 g L⁻¹, 光学純度: 100%, 選択性: 96.6%, 生産性: 1.09 g L⁻¹ h⁻¹) で最高の値を示した。よって、メタ発酵はもちろん純粋発酵でも報告例がない新規な pH 切替制御法による L-乳酸生産の高効率化に成功した。

5. 体系的フィードバック分離法の開発と主要細菌の分離¹¹⁾

近年では、ハイスループットシーケンサーを用いた細菌群集構造解析により、複合微生物系の主要細菌を網羅的かつ高精度に決定できる¹⁹⁾。主要細菌を分離できれば、分離細菌群の各特性や機能および分離細菌間の相互作用・機能等の解明に加えて、分離細菌群を用いたメタ発酵の再構成による生産プロセスの効率化も可能である。従来の細菌分離法では、固体培地によりコロニーを形成させた後、得られたコロニーを 16S rRNA 遺伝子解析などにより同定する方法が一般である¹¹⁾。ところが、①コロニー形成効率 (1%程度) が低く、標的細菌が必

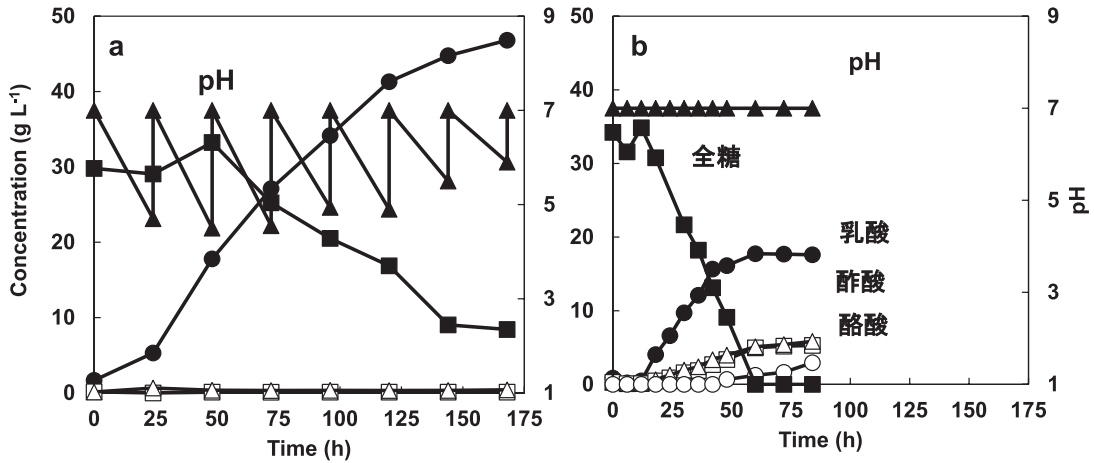


図1. pH 振動制御 (a) および pH 振動制御 (b) によるメタ発酵。

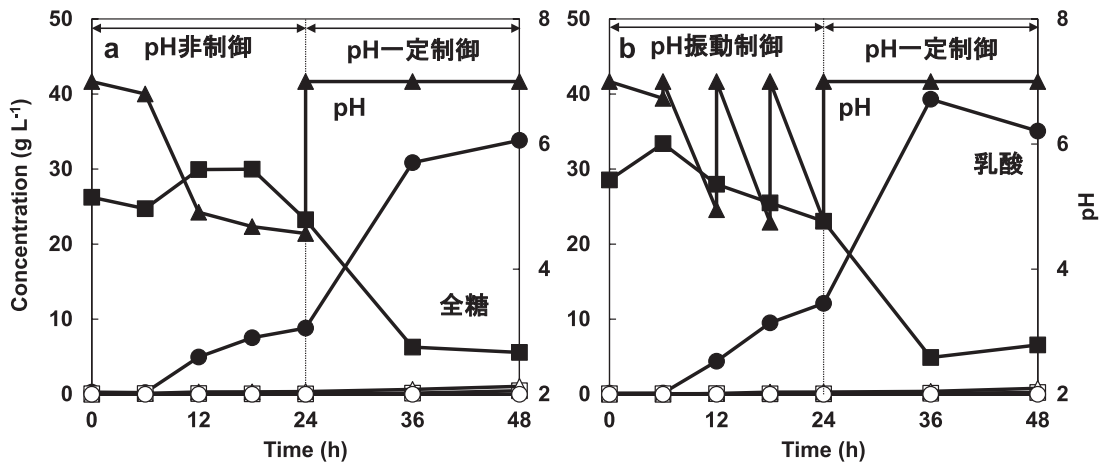


図2. pH 切替制御法 [pH 非制御→pH 一定制御 (a), pH 振動制御→pH 一定制御 (b)] によるメタ発酵。

ずしもコロニーを形成しない、②多数のコロニーの同定は、時間や費用を要する、などが課題であり、複合微生物系からの標的細菌の分離は容易ではない。本項では、『体系的フィードバック分離法』の開発および複合微生物系からの標的細菌の分離を試みた。

体系的フィードバック分離法のスキームを図3に示した。概略すると、フィードバック分離によるコロニー形成効率の向上と直接コロニー MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 法による標的微生物のスクリーニングの迅速化である。すなわち、標的細菌の培養条件を近縁細菌 (基準株等) の文献情報から決定するとともに、多数のコロニーからコロニーレベルで標的細菌候補株を選択する戦略である。これまでに、直接コロニー MALDI-TOF MS 法は 16S rRNA 遺伝子解析法に代わる新規同定方法として確立されつつあるが⁹⁾、迅速スクリーニング法としての応用は報告されていない。分離株および標準株を含む 27 コロニーを MALDI-TOF MS に供し、マススペクトルより Similarity distance を計算した。全 351 ペアに対して、Similarity distance と 16S rRNA 遺伝子配列の Similarity score をプロットした (図4)。一般に、Similarity score $\geq 97-98\%$ で同種と同定されることから¹⁵⁾、Similarity distance ≥ 0.55 を指標に、直接コロニー

MALDI-TOF MS 法による種レベルでの識別できることが示唆された。16S rRNA 遺伝子解析には通常 1 週間程度を要するが、本法では、2 日程度で解析が完了するため、多数のコロニーから標的細菌候補株の迅速スクリーニング法として有望である。

なお、体系的フィードバック法を用いて、6 種 (*Corynebacterium sphenisci*, *Bacillus thermocloacae*, *B. thermoamylovorans*, *Bacillus smithii*, *Bacillus humi*, *Bacillus coagulans*) を標的細菌として、コンポストおよびメタ発酵液からの分離を試みた。標準株との Similarity score が 99.0–100% であった三種 (*C. sphenisci*, *B. coagulans*, *B. smithii*) の分離に成功したが、Similarity score の低い他三種 (*B. thermocloacae*, *B. thermoamylovorans*, *B. humi*) は分離できなかった。よって、標準株との Similarity score が低い ($\leq 97-98\%$) 標的細菌の分離には、液系分離法¹⁰⁾ など他の分離法の開発が必要である。

6. おわりに

以上のように、従来の温度制御および新規な pH 制御法において、複合微生物系によるメタ発酵による L-乳酸生産の高効率化を達成した。メタ発酵による有価物生

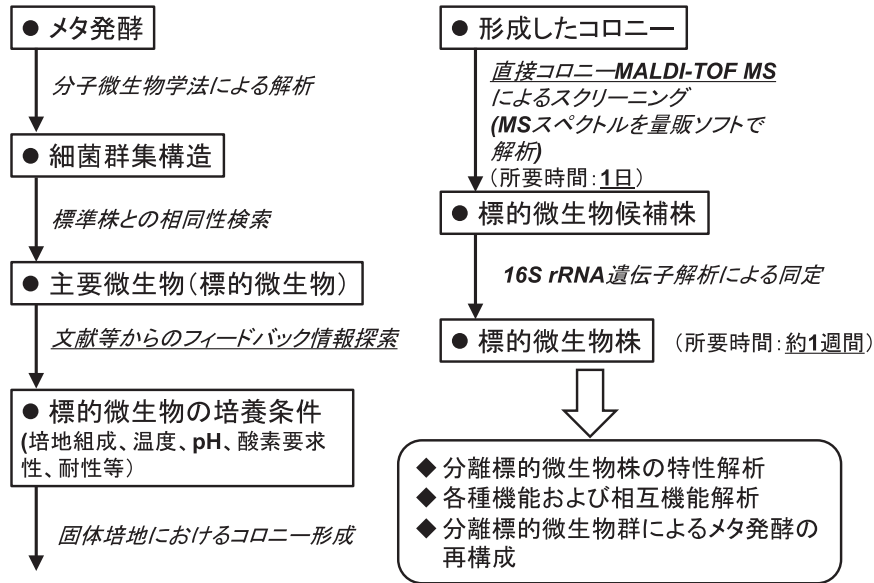


図3. 体系的フィードバック分離法のスキーム。

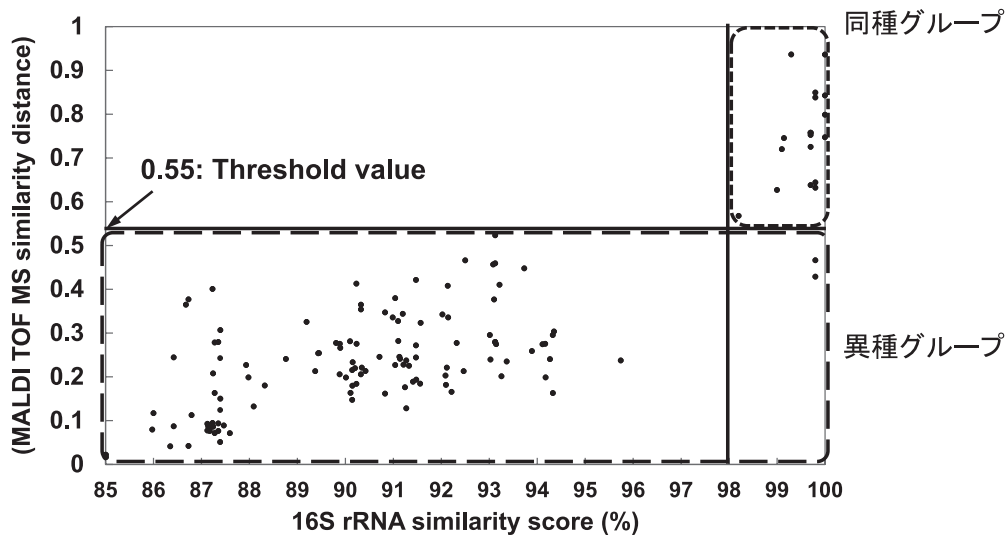


図4. 27株(分離株および基準株)におけるMALDI-TOF MS similarity distanceと16S rRNA similarity scoreの比較。

産は、ますますホットな研究課題となり得るだろうが、著者らの知見は、蓄積されている知見・技術に基づく制御方法と全く新しい制御方法の開発および体系化の重要性を示唆している。メタ発酵を制御する技術としては端緒についたばかりであるが、複合微生物系を制御して各発酵原料から任意の有価物を生産するメタ発酵プロセスの構築を目指したい。

文 献

- 1) 田代幸寛, 酒井謙二. 2014. 複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物生産プロセスの開発と制御. *バイオサイエンスとインダストリー*. 72: 486-487.
- 2) Abdel-Rahman, M.A., Y. Tashiro, T. Zendo, K. Sakai, and K. Sonomoto. 2015. *Enterococcus faecium* QU 50: a novel thermophilic lactic acid bacterium for high-yield L-lactic acid production from xylose. *FEMS Microb. Lett.* 362: 1-7.
- 3) Ai, B., J. Li, X. Chi, J. Meng, A.K. Jha, C. Liu, and E. Shi. 2014. Effect of pH and buffer on butyric acid production and microbial community characteristics in bioconversion of rice straw with undefined mixed culture. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19: 676-686.
- 4) Cheng, C.-L., P.Y. Che, B.Y. Chen, W.J. Lee, C.Y. Lin, and J.S. Chang. 2012. Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. *Appl. Energy*. 100: 3-9.
- 5) Freiwald, A. and S. Sauer. 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 4: 732-742.
- 6) Itoh, Y., K. Tada, T. Kanno, and J.I. Horiuchi. 2012. Selective production of lactic acid in continuous anaerobic acidogenesis by extremely low pH operation. *J. Biosci. Bioeng.* 114: 537-539.
- 7) Kim, D.H., W.T. Lim, M.K. Lee, and M.S. Kim. 2012. Effect of temperature on continuous fermentative lactic acid (LA) production and bacterial community, and development of LA-producing UASB reactor. *Bioresour. Technol.* 119: 355-361.
- 8) Maeda, T., T. Yoshimura, T. Shimazu, Y. Shirai, and H.I. Ogawa. 2009. Enhanced production of lactic acid with reducing

- excess sludge by lactate fermentation. *J. Hazard. Mater.* 168: 656–663.
- 9) Niisawa, C., S. Oka, H. Kodama, M. Hirai, Y. Kumagai, K. Mori, J. Matsumoto, H. Miyamoto, and H. Miyamoto. 2008. Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from the compost. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54: 149–158.
 - 10) Nishizawa, T., K. Tago, Y. Uei, S. Ishii, K. Isobe, S. Otsuka, and K. Senoo. 2012. Advantages of functional single-cell isolation method over standard agar plate dilution method as a tool for studying denitrifying bacteria in rice paddy soil. *AMB Express.* 2: 50.
 - 11) Poudel, P., Y. Tashiro, H. Miyamoto, H. Miyamoto, Y. Okugawa, and K. Sakai. In press. Development of a systematic feedback isolation approach for targeted strains from mixed culture systems. *J. Biosci. Bioeng.* doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.07.019
 - 12) Probst, M., J. Walde, T. Pümpel, A.O. Wagner, and H. Insam. 2015. A closed loop for municipal organic solid waste by lactic acid fermentation. *Bioresour. Technol.* 175: 142–151.
 - 13) Sakai, K., Y. Murata, H. Yamazumi, Y. Tau, M. Mori, M. Moriguchi, and Y. Shirai. 2000. Selective proliferation of lactic acid bacteria and accumulation of lactic acid during open fermentation of kitchen refuse with intermittent pH adjustment. *Food Sci. Technol. Res.* 6: 140–145.
 - 14) Shi, X., D.H. Kim, H.S. Shin, and K.W. Jung. 2013. Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* by anaerobic mixed cultures. *Bioresour. Technol.* 144: 225–231.
 - 15) Stackebrandt, E. and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846–849.
 - 16) Tashiro, Y., S. Inokuchi, P. Poudel, Y. Okugawa, H. Miyamoto, H. Miyamoto, and K. Sakai. 2016. Novel pH control strategy for efficient production of optically active L-lactic acid from kitchen refuse using a mixed culture system. *Bioresour. Technol.* 216: 52–59.
 - 17) Tashiro, Y., W. Kaneko, Y. Sun, K. Shibata, K. Inokuma, T. Zendo, and K. Sonomoto. 2011. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 1741–1750.
 - 18) Tashiro, Y., H. Matsumoto, H. Miyamoto, Y. Okugawa, P. Poudel, H. Miyamoto, and K. Sakai. 2013. A novel production process for optically pure L-lactic acid from kitchen refuse using a bacterial consortium at high temperatures. *Bioresour. Technol.* 146: 672–681.
 - 19) Tashiro, Y., H. Tabata, A. Itahara, N. Shimizu, K. Tashiro, and K. Sakai. In press. Unique hyper-thermal composting process in Kagoshima City forms distinct bacterial community structures. *J. Biosci. Bioeng.* doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.04.006
 - 20) Zhang, F., Y. Chen, K. Dai, and R.J. Zeng. 2014. The chemostat study of metabolic distribution in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 10267–10273.