乳酸菌保存株の糖蜜アルコール蒸留廃液脱色能

鈴木昌治, 廉澤ひろみ, 長野晃弘*,

藤本尚志, 高橋力也

(東京農業大学応用生物科学部醸造科学科,

三機工業(株)開発本部*)

〒156-8502 世田谷区桜ヶ丘 1-1-1

平成 10 年 12 月 14 日受理

The Ability to Decolorize Wastewater from a Molasses Alcohol Distillery with culture stocks of Lactic Acid Bacteria strains

Masaharu SUZUKI, Hiromi KADOSAWA,

Akihiro NAGANO*, Naoshi FUJIMOTO

and Rikiya TAKAHASHI

(Department of Brewing and Fermentation,

Tokyo University of Agriculture, 1-1-1

Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502 Japan.

*Department of Development, Sanki Engineering

Co., Ltd., 1742-7 Shimotsuruma, Yamato,

Kanagawa 242, Japan.)

The ability of various culture stocks of Lactic acid bacteria strains to decolorize distilled wastewater from alcoholic molasses fermentation (distilled wastewater), so-called distilled wastewater-decolorizing activity (DWDA), was investigated. DWDA was found among the *Lactobacillus* sp. of a variety of culture stocks of Lactic acid bacteria, of which *Lactobacillus casei* showed a high level of with activity a decolorization yield of approximately 30% under semi-anaerobic conditions. The main DWDA of the *Lactobacillus casei* strains was found in the cell membrane fractions. Like *Lactobacillus casei* SM 3, decolorization by standard strains of the *Lactobacillus casei* group was thought to be based on specific enzymes in the cell membrane fraction that only decolorize the larger molecular weight fraction of the molasses pigment molecules.

Key words : *Lactobacillus casei*, 脱色能, 糖蜜アルコール蒸留廃液

結 言

前報¹⁾において, 植物質や動物質試料および糖蜜を原料とするアルコール製造工場内の土壌などの集積培養液より, 糖蜜アルコール蒸留廃液中の糖蜜色素を脱色する 113 株の酸生成通性嫌気性細菌を分離した。これらの菌株のうち, *Lactobacillus casei* と同定された SM 3 株は, 色度 12,000 程度に希釈された糖蜜アルコール蒸留廃液の直接処理において, 既に分離, 選出されている脱色菌^{2,3)}よりも強い脱色活性を発現し, また, 蒸留廃液中の糖蜜色素分子の高分子側色素を特異的に脱色することを明らかにした。これらの結果は, 乳酸菌に属する特定の菌種が糖蜜色素脱色能を有することを示唆する。

本報では, 既に分離, 同定されている乳酸菌の保存株に着目して, *Lactobacillus* 属, *Streptococcus* 属, *Leuconostoc* 属, *Pediococcus* 属に属する菌株の糖蜜色素脱色活性を調査した。その結果, *Lactobacillus* 属の菌種に強い脱色活性が認められ, なかでも *Lactobacillus casei* グループの菌種が強い傾向にあった。また, これら菌株の脱色活性は細胞膜に存在する酵素に起因することなどが明らかになったので報告する。

実 験 方 法

1. 供試廃液

前報¹⁾で用いたサトウキビ糖蜜を発酵原料としたアルコール発酵液の蒸留廃液(以下, 蒸留廃液)を供試した。

2. 供試菌株

東京農業大学菌株保存室より恵与された *Lactobacillus* 属の 32 種, 74 株, *Leuconostoc* 属の 7 種, 14 株, *Pediococcus* 属の 5 種, 20 株および *Streptococcus* 属の 9 種, 14 株の計 122 株を供試した。他に *Lactobacillus casei* グループの標準株である *Lacto. casei* subsp. *casei* NRIC 1042, *Lacto. casei* subsp. *pseudoplantarum* NRIC 1044, *Lacto. casei* subsp. *tolerans* NRIC 1045, *Lacto. casei* subsp. *alactosus* NRIC 1046 の株と, 前報¹⁾で脱色菌として選出した *Lacto. casei* SM 3, 低脱色活性の *Lacto. gasseri* 1818 を供試した。

3. 供試培地と培養法

前報¹⁾に従って, 脱色菌の選出用培地には蒸留廃液

10% (v/v) 含有のGYPM培地 (OD₄₇₅ の吸光度約 12,000) および 10% (v/v) 濃度に希釈した蒸留廃液 (色度値約 12,000) と、これにグルコースを 1% (W/V) 含有させた貧栄養培地を調製した。各々の廃液培地はスクリュキャップ付きの小型試験管に 10 ml 分注し、オートクレーブで 5 分間殺菌後、GYPM 培地で前培養した菌体を滅菌水で洗浄してから 10⁶/ml になるように接種し、密栓して 30°C、5 日間静置培養した。培養終了液は 10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清の脱色率を求めた。

4. 粗酵素液の調製と脱色活性の測定法

培養系において高い脱色能を示す菌種として選出した *Lacto. casei* グループの 4 種の標準株 (*Lacto. casei* subsp. *casei* NRIC 1042, *Lacto. casei* subsp. *pseudopiantarum* NRIC 1044, *Lacto. casei* subsp. *tolerans* NRIC 1045, *Lacto. casei* subsp. *alactosus* NRIC 1046) と、*Lacto. casei* SM 3 および低脱色性菌の *Lacto. gasserii* 1818 の菌体外と菌体内および細胞膜区分の粗酵素を前報¹⁾に準拠して調製した。すなわち、各供試菌は 100 ml の GYP 培地で 30°C、48 時間、密栓して静置培養した後、培養終了液は 10,000 rpm、10 分間遠心分離した。上清はセロファンチューブにより透析し、透析内液を凍結乾燥してから、pH 6.5 の McIlvain 緩衝液 10 ml に溶解し菌体外粗酵素液とした。一方、沈殿菌体は 10 ml の pH 6.5 の McIlvain 緩衝液で 3 回洗浄した後、洗浄時と同一の緩衝液で全量を 10 ml とし、フレンチプレス (SLM, Amicon 社, USA) により 20,000 psi. で菌体破碎した。破碎液は 4°C、15,000 rpm、20 分間遠心分離し、上清 (無細胞抽出液) と沈殿残渣 (細胞膜破碎物) に分別した。無細胞抽出液は菌体内粗酵素液とし、細胞膜破碎物は pH 6.5 の McIlvain 緩衝液で 2 回洗浄後、同一の緩衝液 10 ml を加えた懸濁液を細胞膜区分の粗酵素液とした。

各粗酵素液の脱色活性の測定は前報¹⁾に準拠し、pH 6.5 の McIlvain 緩衝液 6.0 ml に、蒸留廃液 1.0 ml と 10% グルコース溶液 1.0 ml 加えた反応基質に調製済みの各粗酵素液と、100°C で 10 分間加熱処理した失活粗酵素液を各々 2.0 ml 加え、ブチルゴム栓付きバイアル瓶内で、30°C、90 分間振とう反応 (30 oscillations/min) 後、直ちに波長 475 nm の吸光度を測定し、色度に換算した。脱色活性は失活粗酵素液による反応

終了後の色度からの減少割合を求め、脱色率として示した。

5. 分析方法

試料溶液の色度は、前報¹⁾に従って上水試験法の白金・コバルト法⁴⁾により測定した。脱色率は脱色反応前後の色度の減少率として示した。培養終了液の菌体濃度は分光光度計により、660 nm の波長で測定し、OD 値 1.0 = 0.36 mg/ml の相関から、乾燥重量として示した。

実験結果と考察

1. 乳酸菌保存株の蒸留廃液脱色能

乳酸菌保存株 122 株の GYPM 培地における脱色率の状況を Table 1 に示した。供試した 122 株のうち 119 株に脱色能が認められたが、いずれの菌株とも 30% 以内の脱色率であり、その脱色活性は弱かった。これらの菌株の中で脱色率が 20% 以上を示した 20 菌株は、*Lactobacillus* 属の菌種であり、そのうちの 6 株 (*Lacto. acidophilus* 90, *Lacto. planarum* 334, *Lacto. planarum* 392, *Lacto. paracasei* 395, *Lacto. fermentum* 797, *Lacto. casei* 784) は 25~30% の脱色率を示した。*Lactobacillus* 属以外の 3 属に属する菌株の多くは、10% 以下の脱色率であることから、蒸留廃液に対して比較的強い脱色活性を発現する菌株は *Lactobacillus* 属の菌種であることが示唆された。

次いで、GYPM 培地での脱色率が 25~30% の範囲にある前記の *Lactobacillus* 属の 6 菌株の貧栄養培地

Table 1 The distilled wastewater from alcoholic molasses fermentation (distilled wastewater)-decolorizing activity of the culture stocks of Lactic acid bacteria strains.

Decolorization (%)	Lactic acid bacteria			
	<i>Lb.</i> *1	<i>St.</i> *2	<i>Leu.</i> *3	<i>Ped.</i> *4
—20~0	0	1	2	0
1~9	8	11	11	18
10~19	46	2	1	2
20~24	14	0	0	0
25~30	6	0	0	0
Total numbers	74	14	14	20

The culture stock strains were cultured on modified GYP medium containing 10% (v/v) distilled wastewater at 30°C for 5 days under semi-anaerobic conditions.

*1, *Lactobacillus* sp.; *2, *Streptococcus* sp.;

*3, *Leuconostoc* sp.; *4, *Pediococcus* sp.

(希釈蒸留廃液と、これに1% (w/v) のグルコースを加えた培地)での脱色率を調べ、その結果をTable 2に示した。希釈蒸留廃液の直接処理における6菌株の増殖状態は微弱であり、脱色率もGYPM培地に比べて低下したが、唯一、*Lacto. casei* 784 Lは20%以上の脱色率を示し、同じ*Lactobacillus*属の菌種でありながら、他の5菌種よりも強い脱色活性を発現した。この希釈蒸留廃液の直接処理における脱色率は、好気下での脱色菌として報告例のある*Mycelia sterilia* D 90²⁾ や通性嫌気性細菌の*Lactobacillus hilgardii* W-NS³⁾の脱色率を上回るものであった。一方、グルコースを1%添加した蒸留廃液では、各菌株とも菌体の増殖量が高まると共に、脱色率も向上した。特に*Lacto. casei* 784 L株は、GYPM培地での脱色率(27.1%)よりも高い30.8%の脱色率を示した。この脱色率は、前報¹⁾で脱色菌の最優良株として分離、選出した*Lacto. casei* SM 3株の脱色率と同程度であることを考え合わせると、蒸留廃液脱色能を有する*Lactobacillus*属の菌種の中でも、*Lacto. casei* グループの菌種は特に強い脱色活性を発現することが示唆さ

れた。

2. *Lacto. casei* グループ標準株の脱色活性

前述のとおり、蒸留廃液中の糖蜜色素に対して脱色活性を発現する乳酸菌の中でも*Lactobacillus*属の菌種は相対的に強い活性を示し、なかでも*Lacto. casei* グループの菌種に強い傾向が認められた。そこで、*Lacto. casei*の標準株4種と、対照株として前報¹⁾で脱色菌として最終選出した土壌からの分離菌である*Lacto. casei* SM 3および*Lactobacillus*属の保存菌株中で、最も脱色率が低かった*Lacto. gasseri* 1818を含めた計6株の蒸留廃液に対する脱色能を比較した。Table 3に示すとおり*Lacto. gasseri* 1818を除く、*Lacto. casei*の標準株4株と*Lacto. casei* SM 3の脱色率は、GYPM培地で約27~29%、1% (w/v) グルコース含有蒸留廃液で約29~32%、希釈蒸留廃液で約20~24%であり、その脱色傾向は類似していた。また、これら5菌株は、いずれも栄養素が豊富なGYPM培地よりも、貧栄養培地の1% (w/v) グルコース含有の蒸留廃液において、菌体の増殖量は低下したが、脱色率の向上が認められた。さらに、希釈蒸

Table 2 Distilled wastewater-decolorizing activity of the selected strains.

Strain		A *1		B *2	
		Decolorization Growth ^{*3}		Decolorization Growth	
		(%)	(mg/ml)	(%)	(mg/ml)
<i>Lacto.acidophilus</i>	90	12.0	0.20	27.6	0.48
<i>Lacto.plantarum</i>	334	12.4	0.19	26.4	0.47
<i>Lacto.plantarum</i>	392	15.0	0.21	26.2	0.46
<i>Lacto.paracasei</i>	395	12.5	0.20	26.1	0.48
<i>Lacto.fermentum</i>	797	13.2	0.18	27.2	0.49
<i>Lacto.casei</i> 784L		21.8	0.20	30.8	0.49

The strains were cultured at 30°C for 5days under semi-anaerobic conditions.

*1, 10% (v/v) Distilled wastewater ; *2, 10% (v/v) Distilled wastewater supplemented with 1% glucose. ; *3, Dry cell weight.

Table 3 Distilled wastewater-decolorizing activity of four standard strains of the *Lactobacillus casei* group, *Lacto. casei* SM 3 and *Lacto. gasseri* 1818.

Strain	NRIC No.	A *1		B *2		C *3	
		Decolorization Growth		Decolorization Growth		Decolorization Growth	
		(%)	(mg/ml)	(%)	(mg/ml)	(%)	(mg/ml)
<i>Lacto.casei subsp.casei</i>	1042	28.2	1.25	31.8	0.51	22.4	0.20
<i>Lacto.casei subsp.pseudoplanarum</i>	1044	27.4	1.15	29.4	0.42	20.8	0.21
<i>Lacto.casei subsp.tolerans</i>	1045	27.0	1.10	30.7	0.45	20.3	0.17
<i>Lacto.casei subsp.alactosus</i>	1046	27.4	1.25	30.6	0.43	20.2	0.22
<i>Lacto.casei</i> SM3 ^{*4}		29.2	1.22	32.0	0.44	24.5	0.21
<i>Lacto.gasseri</i> 1818 ^{*5}		4.8	1.17	3.2	0.44	2.1	0.19

The strains were cultured at 30°C for 5days under semi-anaerobic conditions. *1, Modified GYPM medium containing 10% (v/v) distilled wastewater ; *2, 10% (v/v) Distilled wastewater supplemented with 1% glucose; *3, 10% (v/v) Distilled wastewater; *4, Strain with high decolorizing activity ; *5, Strain with low decolorizing activity.

留廃液の直接処理においても供試菌 5 株が 20% を越える脱色率を示すことは、*Lacto. casei* グループの菌種は、他の乳酸菌菌種よりも強い脱色活性を有することを示唆する。一方、GYPM 培地で脱色率が低い *Lacto. gasseri* 1818 は、貧栄養培地での増殖量が他の 5 菌株と同程度であるのにもかかわらず、極めて低い脱色率にとどまった。

3. *Lactobacillus casei* の菌体外、菌体内および細胞膜区分粗酵素の脱色活性

Lactobacillus 属の菌種の中でも蒸留廃液に対する脱色活性が高い、*Lacto. casei* グループの標準株 4 菌種と、*Lacto. casei* SM3 および脱色活性が弱い、*Lacto. gasseri* 1818 の菌体外、菌体内および細胞膜区分の粗酵素の脱色活性を Table 4 に示した。菌体外粗酵素の脱色活性は全菌株とも微弱であり、菌株間に差はなかった。一方、菌体内粗酵素は全菌株とも 20% 前後の脱色率を示し、特に培養系において脱色率が低かった *Lacto. gasseri* 1818 も 19.4% の脱色率を示した。また細胞膜区分の粗酵素は *Lacto. casei* グループの標準株 4 菌種は 26% 前後の脱色率を示し、*Lacto. casei* SM3 は、それらを上回る 29.7% の脱色率を示した。また、*Lacto. casei* に属する菌種の各粗酵素間の脱色活性の発現傾向は類似するものであり、特に細胞膜区分の粗酵素は、菌体内や菌体外粗酵素よりも強い活性を示すことから、蒸留廃液の脱色に主要な役割を果たしているものと推察した。一方、低脱色菌の *Lacto. gasseri* 1818 の細胞膜区分の粗酵素の脱色活性は著しく低く、脱色率は 2.8% にとどまった。この結果は本菌が培養系において低い脱色率を示すことと一

致する。前述のとおり、本菌の菌体内粗酵素は脱色活性が高い *Lacto. casei* グループの菌株と同程度の脱色活性を有しているが、以上の結果を考えあわせると、培養系における乳酸菌の蒸留廃液中の糖蜜色素の脱色は、そのほとんどが細胞膜区分の粗酵素に起因するものと推察した。

また、データは示さないが、脱色活性が高い *Lacto. casei* グループの標準株 4 株の細胞膜区分の粗酵素により脱色された反応終了液の糖蜜色素の分子量分布を、前報¹⁾に従って Sephadex G-75 を用いたゲルクロマトグラフィーにより調べたところ、いずれの反応終了液とも、幅広い分子量領域を持つ糖蜜色素の高分子側色素を特異的に脱色しており、その脱色パターンは前報¹⁾で脱色菌の最優良株として選出、同定した *Lacto. casei* SM3 と類似していた。従って、*Lacto. casei* グループの菌種による蒸留廃液の脱色は、主に細胞膜区分に存在する脱色酵素の高分子側色素を対象とした脱色反応であることが推察された。Ohmomo ら³⁾は既に、糖蜜色素の低分子側色素を特異的に脱色する乳酸菌として *Lacto. hilgardii* W-NS を分離している。今後は、*Lacto. casei* グループ以外の乳酸菌を対象として、糖蜜色素の低分子側色素に対して脱色活性を発現する有効菌の検索が課題となる。

要 約

乳酸菌保存株 (*Lactobacillus* 属の 32 種, 74 菌株・*Leuconostoc* 属の 7 種, 14 株・*Pediococcus* 属の 5 種, 20 菌株・*Streptococcus* 属の 9 種, 14 菌株の計 122 菌株) の糖蜜アルコール蒸留廃液 (蒸留廃液) に対する

Table 4 Distilled wastewater-decolorizing activity of extracellular, intracellular crude enzymes and crude enzymes from the membrane fraction prepared from cells of four standard strains of the *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus casei* SM3 and *Lactobacillus gasseri* 1818.

Strain	NRIC No.	Decolorization(%)		
		Extracellular enzyme	Intracellular enzyme	Enzymes of the membrane fraction
<i>Lacto.casei subsp.casei</i>	1042	1.4	20.4	26.5
<i>Lacto.casei subsp.pseudopiantarum</i>	1044	1.2	19.6	25.1
<i>Lacto.casei subsp.tolerans</i>	1045	1.5	19.4	25.6
<i>Lacto.casei subsp.alactosus</i>	1046	1.3	19.7	25.7
<i>Lacto.casei</i> SM3 ^{*1}		1.3	21.7	29.7
<i>Lacto.gasseri</i> 1818 ^{*2}		1.2	19.4	2.8

Experiments were carried out as described in the text.

*1, Strain with high decolorizing activity; *2, Strain with low decolorizing activity.

脱色能を調べたところ、脱色活性の強い菌株は *Lactobacillus* 属の菌種に限定されて存在した。

Lactobacillus 属の菌種の中でも *Lacto. casei* グループの菌種は共通して脱色活性が強く、その脱色反応は蒸留廃液中の糖蜜色素分子の高分子側色素を特異的に脱色する細胞膜区分の酵素に基づく反応であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重な乳酸菌保存株を分譲くださいました東京農業大学菌株保存室の岡田早苗先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 鈴木昌治, 廉沢ひろみ, 長野晃弘, 藤本尚志, 高橋力也: 醸協, **93** (12), 982 (1998)
- 2) S. Sirianuntapiboon, P. Somchai, S. OHMOMO and P. Atthasampunna: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 387-392 (1988)
- 3) S. OHMOMO, W. Daengsubha, H. YOSHIKAWA, M. YUI, K. NOZAKI T. NAKAJIMA and I. NAKAMURA: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2429-2435 (1988)
- 4) 日本水道協会: 上水試験法, 厚生省生活衛生局・水道環境部監修, 192-193 (1985)