

平成24年度

環境研究総合推進費補助金 研究事業

総合研究報告書

有機性廃棄物からの高効率有機酸発酵技術の

開発および反応機構解析

(K112005)

平成25年3月

土木研究所 日高 平

補助事業名 環境研究総合推進費補助金研究事業（平成23年度～平成24年度）  
所 管 環境省  
国庫補助金 20,575,000 円  
研究課題名 有機性廃棄物からの高効率有機酸発酵技術の開発および反応機構解析  
研究期間 平成23年6月1日～平成26年3月31日  
研究代表者名 日高 平（土木研究所）  
研究分担者名 西村 文武（京都大学）  
津野 洋（大阪産業大学）  
赤尾 聡史（鳥取大学）

## 目次

第1章 はじめに	1
【第1章参考文献】	
第2章 単純基質による $\alpha$ -アミラーゼ産出の最適条件の検討	2
2-1 概説	
2-2 実験方法	
2-3 結果および考察	
2-4 まとめ	
【第2章参考文献】	
第3章 生ごみを基質とした高温有機酸発酵における多糖分解率の向上	7
3-1 概説	
3-2 実験方法	
3-3 結果および考察	
3-4 まとめ	
【第3章参考文献】	
第4章 米を基質とした高温有機酸発酵の高効率化	12
4-1 概説	
4-2 実験方法	
4-3 結果および考察	
4-4 まとめ	
【第4章参考文献】	
第5章 生ごみおよびでんぶんの高温有機酸発酵における糖化機構の解析	20
5-1 概説	
5-2 文献考察	
5-3 実験方法	
5-4 結果および考察	
5-5 まとめ	
【第5章参考文献】	
第6章 リアルタイムPCR法の有機酸発酵への適用および数理モデル化	37
6-1 概説	

- 6-2 文献考察
- 6-3 実験方法
- 6-4 結果および考察
- 6-5 まとめ
- 【第6章参考文献】

第7章 結論

49

謝辞

研究発表

英文概要

## 第1章 はじめに

京都議定書が発効し、世界的にも地球温暖化効果ガス排出量の削減が求められ、また我が国においても、資源循環型社会の構築が重要との観点で施策や法律的な取り組みがなされつつある。カーボンニュートラルであるバイオマスとして、都市から発生する生ごみや食品廃棄物といった有機性廃棄物からのエネルギーの創出は、将来の化石燃料資源の枯渇への対応や地球温暖化の防止などにつながる。これらの処理・エネルギー創出技術として、より効率的な嫌気性消化技術を開発し、メタンガスを回収し電気や熱エネルギー源として活用することで、化石燃料の使用量削減を促し、二酸化炭素排出削減に寄与することが可能である（野池ら, 2009）。現在主として焼却処理されている、水分含量の大きい生ごみや食品廃棄物を別途処理することで、焼却炉での発電効率向上やダイオキシン類生成抑制、生ごみ回収の衛生化につながる。メタンガス以外でも、有機酸や水素を回収する技術が期待されており、様々な有機性廃棄物を対象として実用化が進んでいるものの、嫌気性消化技術の反応機構については、未だに不明な点が多い。特にメタン発酵前段の糖化や酸発酵過程において、効率化や反応機構の解明が求められている。そこで本研究では、有機酸発酵技術に着目し、効率化し現場での運転をより安定化させる運転・管理技術の提示に資する知見を得ることを目的とした。

以下に本報告の構成を示す。第2章では、単純基質にて基礎的な知見を得るために、グルコースおよびでんぷんを用いた回分式実験を異なる条件下で行った。第3章では、生ごみを対象として、発酵の途中で温度や pH 条件を変更する二段式発酵、および糖化効率の高い発酵液を添加する二系列発酵により、高効率化の検討を行った。第4章では、でんぷんの糖化の考察を行うための例として、食用ではない新規需要米も意図して、米を基質とした有機酸発酵の適用を検討した。微生物群集解析では、次世代シーケンスであるパイロシーケンス法を活用した。第5章では、有機性廃棄物を原料とする高温有機酸発酵において糖化を担う菌種を推定することを目的に、生ごみの糖化から有機酸発酵に至る過程の菌叢変化を観察した。また、でんぷん分解における培養条件の検討も行った。第6章では、実験的に得られた成果を一般化して議論するための手段として、数理モデルを活用するために、リアルタイム PCR の適用性を、微生物の異なる増殖相における有機酸発酵の観点から評価を試みた。そして、第7章で得られた成果をまとめた。

### 【第1章参考文献】

野池達也編著 (2009) メタン発酵, 技報堂出版.

## 第2章 単純基質による $\alpha$ -アミラーゼ産出の最適条件の検討

### 2-1 概説

本章では、生ごみからの有機酸発酵に関わる *Bacillus coagulans* の  $\alpha$ -アミラーゼ産出について、基礎的な知見を得ることを目的とした。そのために、単純物質としてグルコースおよび溶性でんぷんを対象とした回分式実験を行った。

### 2-2 実験方法

既往の  $\alpha$ -アミラーゼ産出乳酸菌を用いた並行復発酵 (SSF) や二段発酵に関する事例のなかで、*B.coagulans* に関する研究事例はない。特に生ごみを基質とした乳酸発酵においては、赤尾 (2006) によると平均乳酸生成速度が約 0.1~0.4 g/L/hr であることから、加水分解を伴う乳酸発酵の事例との比較では同等の速度が示されている。 $\alpha$ -アミラーゼ産出条件を考慮した発酵を行うことによって、他の SSF の乳酸生成速度を凌ぐ可能性があると考えられる。また他の生ごみ発酵の事例では基質を滅菌した後、菌を植種していることから、非滅菌環境下で優占する特徴を持つ *B.coagulans* の特異性は注目に値すると考えられる。

そこで、本章では *B.coagulans* の生成する  $\alpha$ -アミラーゼに着目し、生ごみの高温有機酸発酵の加水分解性の向上を目的とし、*B.coagulans* の  $\alpha$ -アミラーゼ産出至適条件について、実験的検討を試みる。

表 2.1 植種材料の種培地組成

グルコース	和光純薬 一級	20g/L
Yeast extract	日本製薬 D-3	2.5g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	和光純薬 一級	0.25g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	和光純薬 一級	0.05g/L
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	和光純薬 一級	0.01g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	和光純薬 一級	0.01g/L
L-乳酸	和光純薬 特級	10g/L

表 2.2 植種材料の性状

L-乳酸濃度 (g/L)	28.1
光学純度 (%)	100
DNA濃度 (copies/L)	$8.81 \times 10^9$

#### (1) 植種材料

本実験では、植種材料として L-乳酸発酵液を作成し使用した。この発酵液は、表 2.1 に示す組成 (赤尾ら、2006) の種培地に、本研究室で行われてきた模擬生ごみの L-乳酸発酵液を植種して、pH5.5 で培養温度 55°C の条件下で約 2 日間培養して作成した。不足した分は表 2.1 に示す組成の培地に先ほどの発酵液を植種したものを新たな植種材料として使用した。

この植種材料の性状を表 2.2 に示す。これを、20 mL/L 植種した。なお、ここでの 16S rRNA 遺伝子濃度は、L-乳酸生成菌である *B.coagulans* のものを表している。

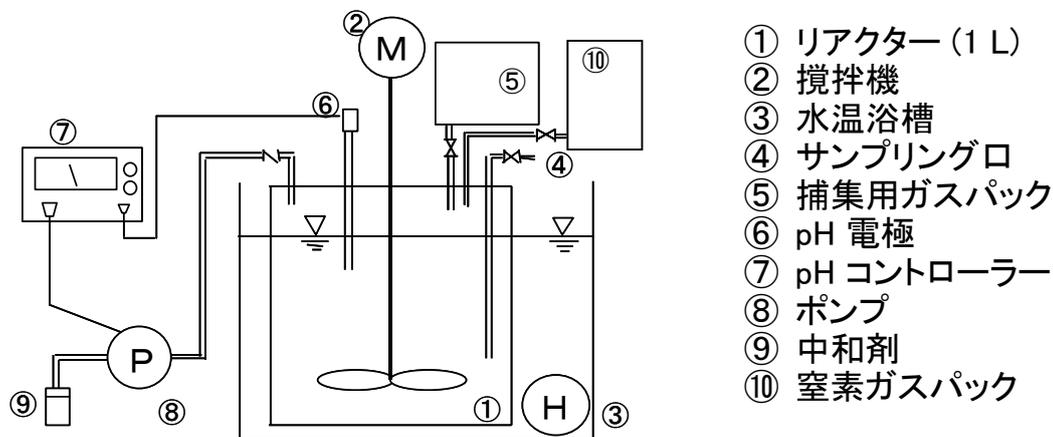


図 2.1 実験装置

## (2) 実験装置

本実験に用いた装置の概略図を図 2.1 に示す。リアクターとして容積 1 L のガラス製反応器を用いた。温度の設定は、リアクターをウォーターバス(アズワン(株)、TM-1)に浸漬することにより行った。リアクター内の発酵液は機械攪拌(アズワン(株)、SM-104)で完全混合となるよう攪拌した。pH の調整は、津野ら (2007) に従い 10%アンモニア水溶液を中和剤として用いて、pH コントローラー((株)日伸理化、NPH-660)の ON/OFF 制御で行った。リアクターは密閉構造とし、リアクター内の気相部は培養開始時に窒素で置換し、また窒素ガスを入れたガスパックも装備し、サンプリング時においてもリアクター内を常に嫌気性で保てるようにした。そして別途、ガスが発生した場合に備えて、コックの切り替えによる別の 2 L のガスパックも装備した。運転は回分式で行い、サンプリングは経時的に行い、発酵液をサンプリング口から毎回 5 mL 程度採取した。

## (3) 実験条件 (表 2.3)

まず基本条件 (Test1) として、pH5.5 および温度 55°C で発酵を行い、比較対象とした。グルコース量および全糖量の分析を同時に行うことによって、でんぷんの加水分解の様子を観察した。その他の条件は以下のとおりである。Test2 として、pH5.5、温度 55°C で、基質組成 (グルコースおよびでんぷんの組成比) を変化させアミラーゼ産出および有機酸発酵の挙動の違いを明らかにした。Test3 として、基質と pH の条件を基本条件と同一として、

温度の影響を観察した。Test4として、基質および温度を基本条件と同一として、pHの影響を観察した。Test5として、基質を予め121°C、30分間のオートクレーブによる前処理で、でんぷんの粒子サイズを細かくし、その後の有機酸発酵に与える影響を調べた。Test6として、栄養源の組成や濃度を変化させ、栄養源が $\alpha$ -アミラーゼ産出および有機酸発酵に及ぼす影響を把握した。

#### (4) 分析方法

全糖は、グルコース濃度として、フェノール硫酸法で測定した(DuBois et al., 1956)。CODcrは、Standard Method (APHA, AWWA, WEF, 1995) に従って分析した。全乳酸および他の有機酸は、(HPLC) (有機酸分析システム、カラム：Shima-pack SCR-102H、島津) により分析した。D- および L-乳酸は、別々に HPLC (カラム：SUMICHIRAL OA-5000 (40°C)、検出器：UV 254 nm、移動相：5% 2-propanol および 1 mM CuSO<sub>4</sub>、流速：0.8 mL/min) で測定し、光学純度は以下の式で算出した。

$$\text{光学純度 (\%)} = \frac{[\text{L-乳酸}] - [\text{D-乳酸}]}{[\text{L-乳酸}] + [\text{D-乳酸}]} \cdot 100 \quad (2-1)$$

総でんぷんの測定には、Megazyme の TOTAL STARCH ASSAY PROCEDURE (アミログルコシターゼ/ $\alpha$ -アミラーゼ法)を使用し、おおむねキット付属のプロトコルに従った。 $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定には、Megazyme の ALPHA-AMYLASE ASSAY PROCEDURE (CERALPHA METHOD)を使用し、おおむねキット付属のプロトコルに従った。溶解性試料は、0.45  $\mu\text{m}$  のろ紙によりろ過したろ液として分析した。

### 2-3 結果および考察

実験条件および実験結果のまとめを表 2.3 に、代表として Test1 での経時変化測定結果を図 2.2 に示す。

温度影響を検討した結果、 $\alpha$ -アミラーゼ生成の能力は、温度を 55°C および 45°C とした場合が優れていた。温度を 70°C とした場合は殆ど有機酸発酵が起きなかった。中温発酵である温度 37°C においては、高い  $\alpha$ -アミラーゼを産出したものの、有機酸収率は低い値で留まった。さらに、生成有機酸種が他の場合と異なっていたので、*B.coagulans* が他の細菌と競合していたと考えられた。

pH 影響を検討した結果、 $\alpha$ -アミラーゼ生成の能力は、pH を 5.5 とした場合が優れていた。pH を 7 もしくは 6.5 とした場合は、高い全糖分解率を示したものの、発酵途中から乳酸が減少し、酢酸と蟻酸が生成されていたことから、*B.coagulans* ではなく、酪酸菌による反応

が進んだと考えられた。pH を 4.5 とした場合は殆ど有機酸発酵が起きなかった。これは植種材料中に pH4.5 において糖分資化可能である菌類が存在しないためと考えられた。

でんぷんの対象にオートクレーブによる前処理の影響を比較したところ、オートクレーブ処理の有無が後段の有機酸発酵特性に殆ど影響しておらず、オートクレーブによる効果は低いと考えられた。

栄養源の影響を検討したところ、栄養源が全く存在しないと  $\alpha$ -アミラーゼ生成および有機酸発酵いずれも起きないことが示され、有機酸発酵に必要な最低必要量の栄養源が存在すると考えられた。ただし、必要以上の栄養源が存在する場合は、発酵および  $\alpha$ -アミラーゼ生成に大きな影響はなかった。

表 2.3 実験条件および実験結果のまとめ

Test No.	1	2-1	2-2	2-3	2-4	3-1	3-2	3-3
グルコース(g/L)	10	5	20	10	0	10	10	10
でんぷん(g/L)	10	5	20	0	10	10	10	10
栄養源(Test1に対して)	1	0.5	2	0.5	0.5	1	1	1
pH(-)	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
温度(°C)	55	55	55	55	55	70	45	37
オートクレーブ								
全糖分解率(-)	0.74	0.56	0.66	0.93	0.34	0.10	0.91	0.87
でんぷん分解率(-)	0.41	0.27	0.33	0.00	0.34	0.70	0.81	0.23
最大 $\alpha$ -アミラーゼ(Units/L)	277	127	136	14	56	28	381	244
Test No.	4-1	4-2	4-3	5-1	5-2	6-1	6-2	6-3
グルコース(g/L)	10	10	10	0	0	10	10	10
でんぷん(g/L)	10	10	10	10	10	10	10	10
栄養源(Test1に対して)	1	0.5	0.5	0.5	0.5	ミネラル	0.5	なし
pH(-)	7	4.5	6.5	5.5	7	5.5	5.5	5.5
温度(°C)	50	55	55	55	50	55	55	55
オートクレーブ				有	有			
全糖分解率(-)	0.73	0.27	0.80	0.46	0.86	0.76	0.88	0.00
でんぷん分解率(-)	0.30	0.01	0.53	0.46	0.86	0.48	0.74	0.00
最大 $\alpha$ -アミラーゼ(Units/L)	146	9	193	56	188	197	202	0

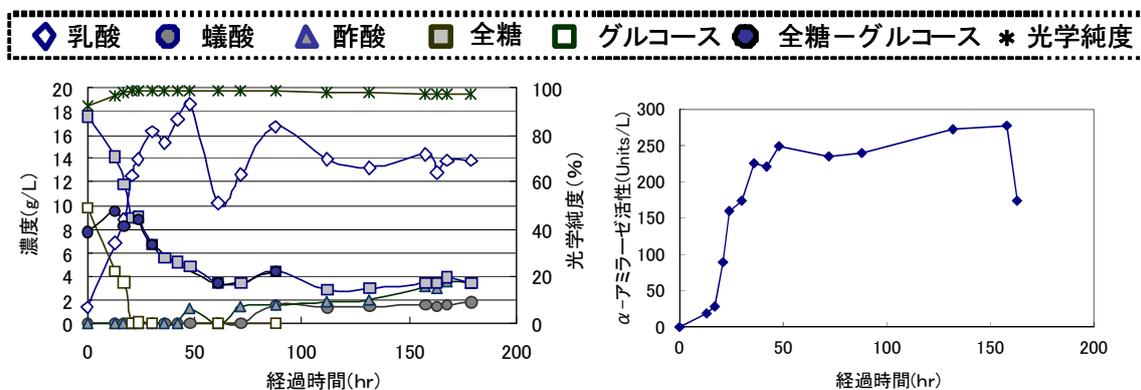


図 2.2 グルコースおよびでんぷんを基質とした回分式実験の経時変化 (Test1)

## 2-4 まとめ

$\alpha$ -アミラーゼ生成の能力は、温度については 55°C および 45°C とした場合が、pH については 5.5 とした場合が優れていた。でんぷんの対象にオートクレーブによる前処理の影響を比較したところ、オートクレーブによる効果は低いと考えられた。栄養源の影響を検討したところ、栄養源が全く存在しないと  $\alpha$ -アミラーゼ生成および有機酸発酵いずれも起きないことが示され、有機酸発酵に必要な最低必要量の栄養源が存在すると考えられた。

### 【第2章参考文献】

APHA, AWWA, WEF (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. Washington, DC. American Public Health Association Publications.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. (Wash. ) 28(3): 350-356.

赤尾聡史 (2006) 生ごみを原料とした高温 L-乳酸発酵法に関する研究, 京都大学博士論文.

赤尾聡史, 宮井公太郎, 堀江匠, 津野洋 (2006) 高温 L-乳酸発酵におけるバナナ果皮の基質化とその特性, 環境工学研究フォーラム講演集, 43, pp.74-76.

津野洋, 赤尾聡史, 宮井公太郎, 日高平, 堀江匠 (2007) 生ごみからの各種別 L-乳酸塩の発酵とポリ乳酸の合成に関する研究, 環境工学研究論文集, 44, pp.471-479.

### 第3章 生ごみを基質とした高温有機酸発酵における多糖分解率の向上

#### 3-1 概説

本章では、生ごみを基質とした高温有機酸発酵において、多糖分解率の向上を図るための比較実験を行った。生ごみによる高温有機酸発酵の基本条件に対して、発酵の途中で条件を変更する二段式発酵、および糖化効率の高い発酵液を添加する二系列発酵により、高効率化の検討を行った。また、発酵に用いている生ごみの素材が高温有機酸発酵に及ぼす影響を調査した。

表 3.1 模擬生ごみの材料

項目%	細目%		
野菜類	50	キャベツ	10
		じゃがいも	10
		ニンジン	10
		大根	10
		白菜	10
果物類	20	りんご	2.5
		オレンジの皮	7.5
		バナナの皮	10
穀物類	20	米	10
		パン	2.5
		麺類	7.5
肉類	2.5	挽肉	2.5
魚介類	5	魚	3.5
		魚の骨	1.5
卵	2.5	卵	2.5

表 3.2 模擬生ごみの性状

測定項目	単位	測定値
全糖	g-glucose/L	115.1
TS	g/L	186
SS	g/L	82.9
pH	-	4.5
COD	g/L	200.7

#### 3-2 実験方法

##### (1) 実験材料

本研究では模擬生ごみを基質として使用した。模擬生ごみの材料は、谷川ら（1997）の実生ごみ組成に関する調査結果を参考に表 3.1 のように決定されたもの（洪ら、2003）を使用した。なお、この生ごみの組成は、本研究室において継続使用されているものである。材料は、細断、混合、続いてスラリー状になるまでミキサー（FMI, R25B）破碎し、使用時まで冷凍庫で保存した。また、培養実験において、生ごみ培地は滅菌操作を行わずに利用した。次に、模擬生ごみの分析値を表 3.2 に示す。TS は約 19%、COD は約 200g-COD/L および糖質は約 12% であり、TS と糖質については白井（1999 ; 2005）や赤尾（2006）の報告する生ごみ成分とほぼ等しい内容であった。

##### (2) 実験条件

実験条件を表 3.3 に示す。

表 3.3 実験条件

	発酵期間(h)	温度(°C)	pH(-)	基質	その他
TEST1-1	96	55	5.5	生ごみ330g/L	
TEST1-2-1	120	40→55	8→5.5	生ごみ330g/L	72時間で条件変化
TEST1-2-2	120	40→55	5.5	生ごみ330g/L (100°C30分加熱)	26時間で条件変化
TEST1-2-3	120	55→40	5.5→8	生ごみ330g/L	72時間で条件変化
TEST1-2-4	72	40→55	8→5.5	生ごみ330g/L (100°C30分加熱)	26時間で条件変化
TEST1-2-5	72	55→40	5.5	生ごみ330g/L	24時間で条件変化
TEST1-2-6	168	55→40	5.5→8	生ごみ330g/L	120時間で条件変化
TEST1-3-1	120	55	5.5	生ごみ330g/L	開始直前に水素発酵液のろ液250mL
TEST1-3-2	120	55	5.5	生ごみ330g/L	開始直前に水素発酵液のろ液250mL
TEST1-4-1	120	55	5.5	生ごみ330g/L	魚抜き
TEST1-4-2	120	55	5.5	生ごみ330g/L	根菜類抜き
TEST1-4-3	120	55	5.5	生ごみ330g/L	大根抜き
TEST1-4-4	120	55	5.5	生ごみ330g/L	野菜果物抜き
TEST1-4-5	120	55	5.5	生ごみ330g/L	野菜抜き
TEST1-5	120	55	5.5	生ごみ300g/L	開始直前に米発酵液300mL

TEST1-1 では、生ごみを基本条件（温度 55°C、pH5.5、基質非滅菌、10%アンモニア水中和剤）で高温有機酸発酵を行った。

TEST1-2 では、発酵の途中で条件を変更する二段式発酵により多糖分解率の向上を目指した。TEST1-2-1 は、 $\alpha$ -アミラーゼの活性に最適な条件で乳酸発酵を行い、 $\alpha$ -アミラーゼが十分産出したと考えられる時点で高温有機酸発酵の条件へ変更し、でんぷんの分解を促進させることを目的とした。TEST1-2-2 は、TEST1-2-1 と同様で、40°Cで $\alpha$ -アミラーゼの産出の多い菌は高温耐性があるため、それ以外の菌を滅菌するためにあらかじめ生ごみを100°Cで30分加熱を行った。TEST1-2-3 は、最初に高温有機酸発酵を行い、発酵が停止した時点で温度および pH を中温発酵の条件に変更し、残存している多糖を十分に消費することを目的とした。TEST1-2-4 は、 $\alpha$ -アミラーゼの産出の多い菌の生育および $\alpha$ -アミラーゼの活性に最適な条件で乳酸発酵を行い、 $\alpha$ -アミラーゼが十分産出したと考えられる時点で高温有機酸発酵の条件へ変更し、でんぷんの分解を促進させることを目的とした。TEST1-2-5 は、最初に高温有機酸発酵の条件で発酵を開始し、発酵が盛んになる時点で $\alpha$ -アミラーゼ活性の最適温度である 40°C付近に温度を下げ、でんぷん分解率向上を目的とした。TEST1-2-6 は、最初に高温有機酸発酵を行い、発酵が停止した時点で温度および pH を中温発酵の条件に変更し、残存していると考えられる多糖を基質として発酵を行うことを目的とした。TEST1-2-3 とほぼ同じ条件であるが、条件を変更する時点を 120 時間とした。

TEST1-3 では、 $\alpha$ -アミラーゼが添加されることを目的として、でんぷんからの水素発酵液(Hidaka et al., 2011)の発酵液をろ過し、そのろ液を添加した実験を 2 回行った。

TEST1-4 では、発酵に用いている生ごみの素材が高温有機酸発酵に及ぼす影響を調査した。それぞれで生ごみの素材の一部を抜いた条件下で、比較した。

TEST1-5 では、多糖の含有の多い基質で発酵が成功している系の発酵液、すなわち  $\alpha$ -アミラーゼの産出が多いとされる *B. coagulans* を含有する発酵液を添加することによって、生ごみの多糖の分解率を向上させることを目的とした。第4章での米を基質として発酵を行っている発酵液を添加した。発酵液の添加は、運転開始時のみに行った。

表 3.4 TEST1～3 の全糖分解率、でんぷん分解率、乳酸生成量および乳酸収率

	全糖分解率(%)	でんぷん分解率(%)	乳酸生成量(g/L)	乳酸収率(-)
TEST1-1	70.0	46.2	29.6	0.64
TEST1-2-1	5.5	31.7	8.9	0.32
TEST1-2-2	54.4	67.5	11.4	0.39
TEST1-2-3	58.7	67.4	20.1	0.53
TEST1-2-4	73.2	59.8	17.9	0.57
TEST1-2-5	59.9	72.5	13.5	0.62
TEST1-2-6	68.1	83.1	21.1	0.61
TEST1-3-1	87.3	86.6	16.2	0.35
TEST1-3-2	85.4	86.2	31.6	0.86

### 3-3 結果および考察

#### (1) 二段式発酵での高温有機酸発酵

TEST1～3 の全糖分解率、でんぷん分解率、乳酸生成量および乳酸収率を表 3.4 に示す。TEST1-1 で、全糖濃度は、開始直後から急激に減少し始め、それと同時に乳酸濃度が急激に増加し始めた。約 80 時間後に全糖の消費および乳酸の生成が停止した。全糖濃度および乳酸濃度は、それぞれ約 48 g/L から約 13 g/L および約 0 g/L から約 29 g/L となった。またでんぷん濃度は約 15.1 g/L から約 6.9 g/L となった。乳酸以外の有機酸は生成しなかった。この結果は、赤尾 (2006) による生ごみの乳酸発酵の結果と概ね一致した。生ごみによる高温有機酸発酵基本条件で行った TEST1-1 では、全糖分解率は約 70% となり、乳酸生成量は約 30 g/L、乳酸収率は 0.64 となった。二段式発酵を行った TEST1-2 の各 TEST では、でんぷん分解率が TEST1-2-1 を除き、TEST1-1 よりも高くなったものの、全糖分解率にはあまり違いは無いが、もしくは減少した。TEST1-2-4 のみ、全糖分解率およびでんぷん分解率が TEST1-1 より高かったが、これは、 $\alpha$ -アミラーゼが生成・残存している時期に乳酸発酵に変更した効果とも考えられる。しかし、乳酸の生成量および乳酸収率は、TEST1-1 のほうが TEST1-2 の各 TEST よりも高かった。TEST1-2-1 はほとんど全糖が分解されていないことから、乳酸発酵が十分に生じなかったと考えられる。また、条件によって乳酸以外の有機酸生成状況が異なっていた。これらより、二段式発酵は、 $\alpha$ -アミラーゼの利用や

でんぷん分解に適している菌を利用することにより、でんぷんの分解率を向上させることはできる可能性があることなどが示された。

#### (2) 二系列発酵での高温有機酸発酵

二系列発酵を行った TEST1-3-1 および TEST1-3-2 では、多糖分解率およびでんぷん分解率が TEST1-1 よりも高かった。乳酸の生成量および乳酸収率は、TEST1-3-2 が TEST1-1 よりも多かった。これより、二系列発酵により、水素発酵微生物の産出した  $\alpha$ -アミラーゼを利用することで、模擬生ごみ中の多糖を分解し、*B. coagulans* による高温 L-乳酸発酵における多糖分解率、でんぷん分解率および乳酸収率を向上させることが可能であると考えられた。

#### (3) 生ごみ中の各素材の影響評価試験

模擬生ごみの素材から魚および魚の骨を抜いた TEST1-4-1 では、模擬生ごみによる高温有機酸発酵の基本条件で行った TEST1-1 より、乳酸の生成量が少なく、最終的に酢酸が生成した。また、乳酸の生成速度の低下も見られた。TEST1-4-2 では、乳酸が生成した後、乳酸濃度は徐々に減少し、それに伴って酢酸が生成した。TEST1-4-3 では、通常の模擬生ごみで発酵を行った場合と比較してあまり大きな違いは見られなかった。TEST1-4-4 および TEST1-4-5 の両方で根菜類が取り除かれているのにもかかわらず発酵は生じたものの、他の有機酸の生成も非常に多くなったことから、*B. coagulans* 以外の菌も増殖しており、根菜類が高温有機酸発酵の効率に大きく影響を及ぼしていると考えられる。

模擬生ごみを使用した高温有機酸発酵において、魚や魚の骨は発酵速度等に影響を及ぼしていることがわかった。魚や魚の骨の中で重要な成分であるミネラルは発酵速度を高めているが、乳酸の生成量や多糖の分解率の向上には影響していないことがわかった。また、模擬生ごみの素材のうち、根菜類が不足すると *B. coagulans* による高温乳酸発酵にならない可能性があることが示された。

#### (4) 米発酵液添加の影響

TEST1-5 でのでんぷん分解率を図 3.1 に示す。でんぷんの分解率および乳酸の生成量は徐々に低下していた。全糖分解率は、生ごみ基質による高温 L-乳酸発酵の基本条件で発酵を行った TEST1-1 よりも概ね高い値となっているものの、発酵が進むにつれて少しずつ減少した。これは、 $\alpha$ -アミラーゼの産出が多い *B. coagulans* の働きにより発酵初期は生ごみの全糖分解率、でんぷん分解率が増加するものの、模擬生ごみという多糖の少ない環境で

時間が経過すると、 $\alpha$ -アミラーゼの産出能が徐々に失われるからと考えられる。

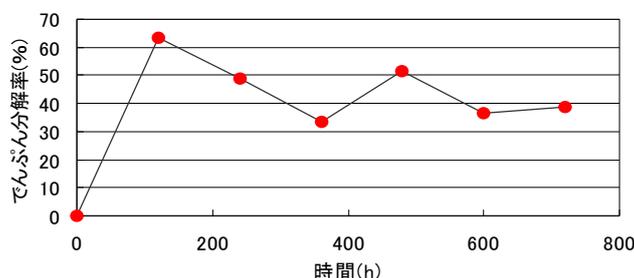


図 3.1 TEST1-5 におけるでんぷん分解率

### 3-4 まとめ

異なる温度や pH 条件を組み合わせた二段式発酵を行った結果、 $\alpha$ -アミラーゼの利用やでんぷん分解に適している菌を利用することにより、でんぷんの分解率を向上させる可能性があり、生成有機酸種が変化することなどが考えられた。二系列発酵により、他菌の産出した  $\alpha$ -アミラーゼを利用することで、模擬生ごみ中の多糖を分解し、*B. coagulans* による高温 L-乳酸発酵における多糖分解率、でんぷん分解率および乳酸収率を向上させることが可能であることが示された。

#### 【第 3 章参考文献】

Hidaka, T., Kosaka, Y., Yagi, H., Kusuda, Y., Nishimura, F., Tsuno, H. (2011) Bacterial competition for thermophilic L-lactate and hydrogen fermentation from glucose, 7th International Conference on Environmental Anaerobic Technologies and Bioenergy, Tianjin University, China, 89-99, November 12-13.

谷川昇, 武本敏男, 大木秀男, 川崎照夫 (1997) 生ごみの細組成, 都市清掃, 50, 116-119.

洪鋒, 津野 洋, 日高 平, 千 智勲 (2003) 1 日 1 回給餌操作での高濃度高温メタン発酵の生ごみ処理への適用性と操作因子に関する研究, 第 40 回下水道研究発表会講演集, pp1036-1038.

白井義人 (2005) 都市のゼロエミッションによる生ごみからポリ乳酸の生産, 生物工学, 83, 5, pp.238-241.

白井義人 (1999) 都市生ごみの工業用乳酸への資源化と環境コンビナート戦略, ECO INDUSTRY, 9, pp.38-45.

赤尾聡史 (2006) 生ごみを原料とした高温 L-乳酸発酵に関する研究, 京都大学博士論文.

## 第4章 米を基質とした高温有機酸発酵の高効率化

### 4-1 概説

本章では、生ごみに加えて、米も基質として、有機酸発酵の適用を検討した。米はでんぷんを多く含んでおり、でんぷんの糖化効率に焦点を置いた検討を行うため、また主食用ではない新規需要米を意図して、実験材料とした。生ごみおよび米の混合比を変化させた実験により、微生物群集の馴致が糖化効率や有機酸発酵へ及ぼす影響を調査した。微生物群集の解析では、次世代シーケンスであるパイロシーケンス法を用いた。

### 4-2 実験方法

#### (1) 回分式実験

前章までと同じ反応器を用いて、Run A1～A5 の条件で回分式実験を行った（表 4.1）。それぞれの実験開始時に、植種は行っていない。生ごみは前章までと同様に作成しており、全糖は 0.13 g グルコース/g 生ごみ含まれていた。米は炊いて実験に用いており、全糖は 0.71 g グルコース/g 米含まれていた。また、米のメタン発酵についての回分式実験を、下水汚泥を対象とした消化汚泥を用いて日高ら（2012）と同様に行い、米の分解特性を調査した。5.5g-wet のご飯および 400 mL の消化液を反応器に投入し、有機酸発酵と同じ 55°C とした。

表 4.1 回分式実験条件

	時間(h)	基質		全糖(g/L)
		生ごみ(g/L)	米 (g/L)	
Run A1	120	150	20	34
Run A2	96	100	50	49
Run A3	96	100	70	63
Run A4	120	50	50	42
Run A5	120	50	60	49

#### (2) 半連続式実験

5日に一度、混合液 1 L のうち 700 mL を引き抜き同量の基質を投入する半連続式実験を行った（表 4.2）。水理的滞留時間は 7.1 d に相当する。Run B1～B8 では、生ごみと米の混合割合を変化させることで、基質濃度や馴致が糖化に及ぼす影響を調査した。徐々に米の混合割合を増加させ、Run B8 では米だけを基質とした。Run B7 の最後には、別に 2 系列の反応器を用意し、Run C1～C3 および Run D1～D3 の運転を開始した。その際には、それ

ぞれ 300 mL の引き抜き混合液を植種材料とした。Run E では、でんぷんからの水素発酵液 (Hidaka et al., 2011) 300 mL を植種材料として運転を開始した。これは、もともと中温の畜産廃棄物を対象とした嫌気性消化槽汚泥に由来しており、*Clostridium* が含まれていた。Run F1 は、グルコース、ポリペプトンおよびイーストエクストラクトのみを基質とした。運転開始時には、*B. coagulans* を含む L 乳酸発酵液(Hidaka et al., 2010a) 300 mL を植種した。

表 4.2 半連続式実験条件

Run No.	期間 (h)	微生物 群集 解析	基質(g/L)				全糖 (g/L)	
			生 ごみ	米	グルコ ース	ポリペ プトン		イーストエク ストラクト
Run B								
Run B1	0-96		150	35			45	
Run B2	96-696	M1	150	20			34	
Run B3	696-816		150	35			45	
Run B4	816-1176		100	50			49	
Run B5	1176-1896		50	50			42	
Run B6	1896-2376		30	60			47	
Run B7	2376-2736	M2	15	60			45	
Run B8	2736-2976			60			43	
Run C								
Run C1*	2736-3096			60			43	
Run C2	3096-3456			45			32	
Run C3	3456-3816			30			21	
Run D								
Run D1*	2736-3096			60		3	3	43
Run D2	3096-3456			45		3	3	32
Run D3	3456-3816			30		3	3	21
Run E								
Run E1**	0-720			60		2	2	43
Run E2	720-960	M3		45		2	2	32
Run E3	960-1320			30		2	2	21
Run F								
Run F1***	0-72	M4			50	5	5	50

\* Run B8 から植種；\*\*Hidaka et al. (2011)から植種；\*\*\*Hidaka et al. (2010a)から植種

### (3) 微生物群集解析

次世代シーケンスの一つであるパイロシーケンス法を用いて、Run B2、B7、E2 および F1 (以下、それぞれ M1、M2、M3、M4 とする)を行った。解析では、PowerSoil DNA isolation

kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA)を用いて抽出し、PCR増幅を行った(FastStart High Fidelity PCR System and PCR Nucleotide Mix, Roche, Germany)。プライマーは、Primer A-Key-MID-27F および Primer B-Key-519R を用いた。Genome Sequencer FLX Titanium system (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) を用い、96%の相同性により操作的分類単位 (OTU)を整理し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のBLASTで検索した。

#### 4-3 結果および考察

##### (1) 回分式実験

回分式実験での有機酸濃度およびでんぷん分解率を図4.1に示す。全糖の減少濃度に対する全糖の初期濃度の割合で算出した糖化率や同様に算出したでんぷん分解率は、設定条件により異なっていた。Run A1 および A4 でのみ、糖化が進行し乳酸が生成していた。全糖濃度 49 g/L 以上で、糖化が進行しにくい傾向が見られた。Hidaka et al. (2010a) は高濃度のグルコースで乳酸発酵が阻害されることを示しており、本研究では高濃度の糖でも乳酸発酵が阻害されることを示した。米を対象とした回分式のメタン発酵実験でのメタン発生経時変化を図4.2に示す。COD基準のメタン転換率は0.75程度であり、メタン発酵を行う場合には、でんぷん分解率が高いことが確認できる。

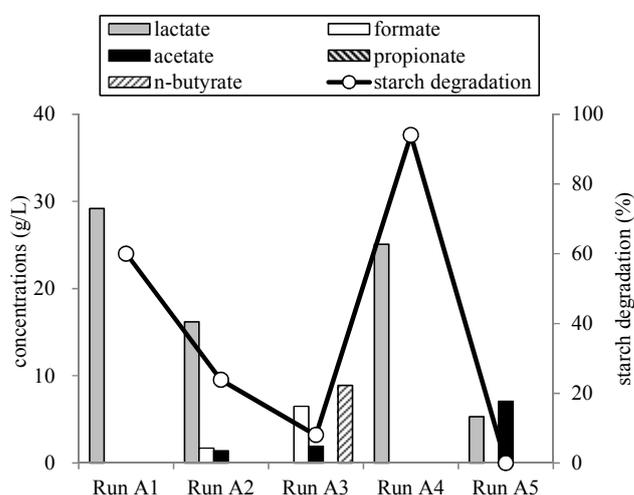


図 4.1 回分式実験での有機酸濃度およびでんぷん分解率

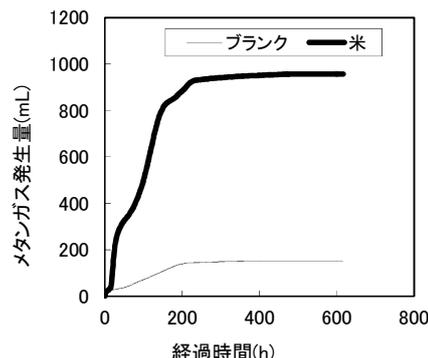


図 4.2 米のメタン発酵回分式実験におけるメタンガス発生経時変化

##### (2) 半連続式実験

Run B1~B8 の有機酸濃度経時変化を図4.3に示す。実験期間中、ガスの生成は見られな

かった。Run B1 では乳酸濃度が 21 g/L まで増加した後、徐々に減少し、酢酸の生成が見られた。基質濃度を变化させた Run B2 以降、乳酸濃度が増加し、酢酸濃度は低下した。糖化率は 50%以上であり、回分式実験より高い値であった。

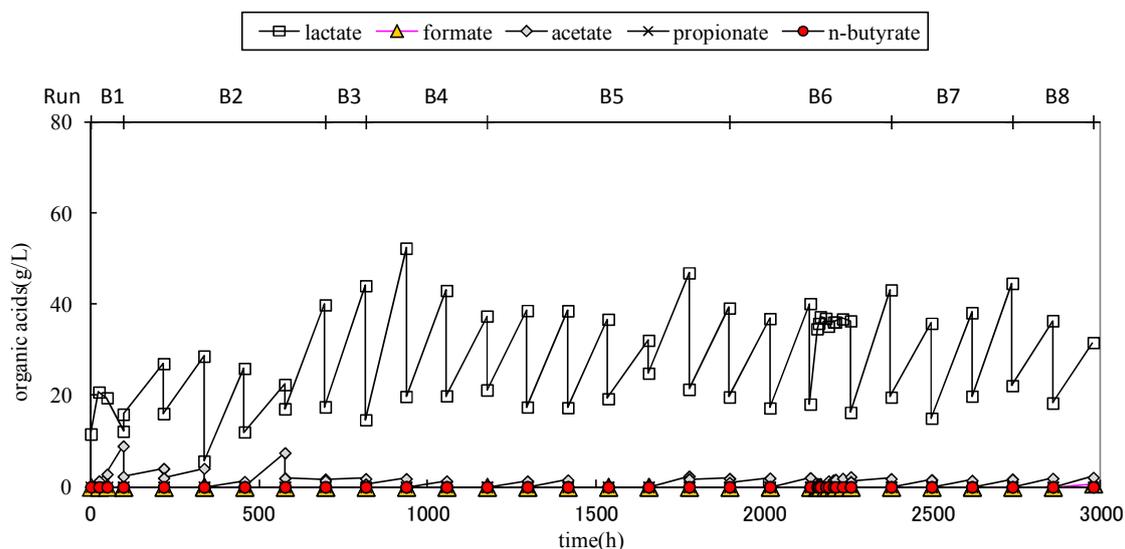


図 4.3 Run B1～B8 の有機酸濃度経時変化

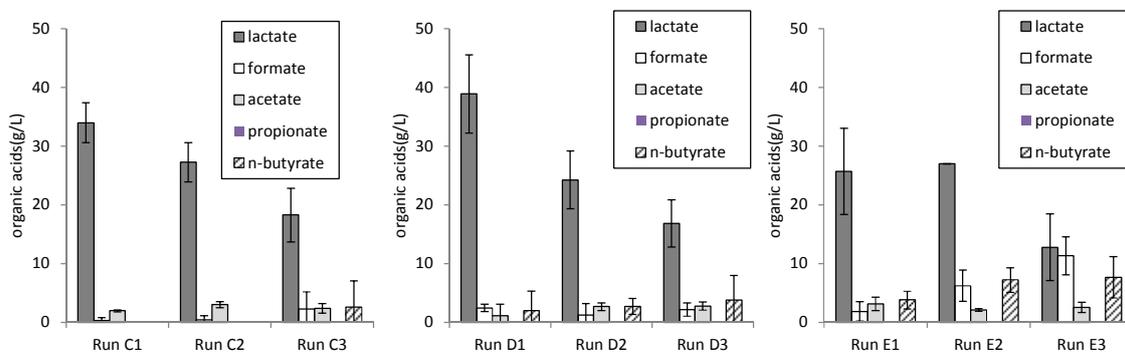


図 4.4 Run C～E の有機酸濃度および標準偏差

Run C～E の有機酸濃度および標準偏差を図 4.4 に示す。Run C1～C3 では、主として乳酸が生成し、濃度は 13～36 g/L であった。ギ酸および酢酸がそれぞれ 0.7～3.5 g/L および 1.5～3.6 g/L 生成した。Run D では、ポリペプトンおよびイーストエクストラクトを添加し、Run C よりも乳酸濃度および n-酪酸が高かった。Run E では、水素および二酸化炭素がそれぞれ毎 5 日間の運転で 1～6 L および 1.2～5.4 L 生成した。有機酸では、乳酸が 6.3～35 g/L、ギ酸が 0.3～15 g/L、酢酸が 1.5～5.1 g/L、および n-酪酸が 1.5～10 g/L 生成した。Run C およ

び D より乳酸濃度が低く、ギ酸や酪酸濃度が高いのは、水素発酵条件であったことに合致している。回分式実験では、でんぷんの分解効率が不安定であったのに対して、半連続式実験では微生物の馴致後に安定した。2736 時間の馴致後の植種材料を用いた Run C および D では、米のみを添加した運転で、60%以上のでんぷん分解率が得られた。でんぷんからの有機酸発酵やエタノール発酵ではアミラーゼを添加するのが一般的であるものの (Lin and Tanaka, 2006)、廃棄物利用の場合低コストでの発酵が望ましく、分解率がある程度得られれば、酵素の添加が不要な手法も有用であると考えられる。

### (3) 微生物群集解析

半連続式実験における微生物群集解析の結果を表 4.3 に示す。Run B2 (M1)、Run B7 (M2)、Run E2 (M3) および Run F1 (M4) で、それぞれ 21,626、22,991、60,999 および 20,274 の配列を解読し、96%の相同性でそれぞれ 468、1,007、746 および 247 の OTU に分類した。Run F1 では、グルコースを基質としており、98.1%が *B. coagulans* に近縁であった。これは、過去の研究におけるランダムクローニング法による結果 Hidaka et al. (2010a) と一致しており、L 乳酸発酵における *B. coagulans* 近縁種の関与が確認された。Kim et al. (2012) も、パイロシークエンスにより、同様の条件下で *B. coagulans* 近縁種を報告している。しかし、Run B2、B7 および E2 ではそれぞれ 52.8、16.7 および 17.8%にまで低下していた。Run B2 では、生ごみおよび米からの乳酸発酵が進行しており、*Aneurinibacillus* spp. 近縁種が 29.5%検出された。*Aneurinibacillus* spp. は高温細菌で  $\alpha$  アミラーゼを生産するという報告がある (Farahmand et al., 2009) ので、でんぷんの糖化に係わっていた可能性が考えられる。その後、Run B7 では基質に占める米の割合を増加しており、*Alcaligenes* spp.、*Citrobacter* spp.、*Enterobacter* spp. および *Pantoea* spp. 近縁種の割合がそれぞれ 26.5%、34.1%、5.8% および 4.0% であった。Kumar and Das (2000) により、*Enterobacter* spp. は  $\alpha$  アミラーゼを生産するという報告がある。Run E2 では、水素発酵条件下で、*Clostridium* spp. および *Thermoanaerobacterium* spp. 近縁種がそれぞれ 54.9% および 25.3% 検出された。これは、水素発酵での過去の微生物群集解析に一致している (Taguchi et al., 1992 ; Akutsu et al., 2008)。このように従来ランダムクローニング法よりも詳細な菌相解析が、基質条件や生成有機酸の違いとともに示された。

表 4.3 パイロシーケンス法による微生物群集解析結果

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Detected (%)			
						M1	M2	M3	M4
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	52.8	16.7	17.8	98.1
					[others]	4.9	0.6	0.3	0.8
					[others]	0.7	0.3		
				Paenibacillaceae	<i>Aneurinibacillus</i>	29.5	0.4		0.7
			Lactobacillales	[others]		1.6	1.5		0.1
			Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	4.9	1.2	0.2	
				[others]		0.1		54.9	0.1
			Thermoanaerobacteriales	Thermoanaerobacteriales	<i>Thermoanaerobacterium</i>	0.1			0.4
				Family III. Incertae Sedis				25.3	0.1
		[others]							0.4
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>		1.7	3.0	0.2	
					[others]			26.5	0.1
			Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>			34.1	
					<i>Enterobacter</i>	0.3	5.8	0.1	
					<i>Pantoea</i>			4.0	
					[others]	0.1	0.6		
			Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>			2.5	
				[others]				0.6	0.1
			[others]					0.8	
		[others]				3.3	0.8		

#### 4-4 まとめ

米に含まれるでんぷんの糖化および有機酸発酵は、生ごみを添加すること、もしくは長期間の馴致を行うことで向上することが示された。パイロシーケンス法による菌相解析で、従来のランダムクローニング法よりも詳細な菌相解析が、基質条件や生成有機酸の違いとともに示された。でんぷんの糖化率は *Clostridia* が含まれる水素発酵条件下で高く、乳酸発酵には *B. coagulans* が係わっている可能性が示された。

#### 【第4章参考文献】

- Akutsu Y, Li Y, Tandukar M, Kubota K, Harada H., 2008. Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(22), 6541–6548.
- Farahmand, M., Mozaffari, N. A., Mehrabian, S., and Khavarinejad, R., 2009. Characterization of  $\alpha$ -amylase produced by thermophilic bacteria isolated from Iranian hot spring waters. In *Animal and Fisheries Sciences*, v. 21(4).
- Hidaka, T, Horie, T., Akao, S., and Tsuno, H, 2010a. Kinetic model of thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification. *Water Res.* 44(8), 2554–62.
- Hidaka, T., Kosaka, Y., Yagi, H., Kusuda, Y., Nishimura, F., Tsuno, H. , 2011, Bacterial competition for thermophilic L-lactate and hydrogen fermentation from glucose, 7th International Conference on Environmental Anaerobic Technologies and Bioenergy, Tianjin University, China, 89-99, November 12-13.
- Kim, D.-H., Lim, W.-T., Lee, M.-K., and Kim, M.-S., 2012. Effect of temperature on continuous fermentative lactic acid (LA) production and bacterial community, and development of LA-producing UASB reactor. *Bioresour. Technol.* 119, 355–61.
- Lin, Y. and Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(6), 627–42.
- Kumar, N. and Das, D., 2000. Production and purification of  $\alpha$ -amylase from hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 23, 205–208.
- Taguchi, F., hang, J. D., Takiguchi, S., and Morimoto, M., 1992. Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73(3), 244–245.
- 日高 平, 内田 勉, 浅井圭介, 新井小百合, 岡本誠一郎, 戸茆丈仁 (2012) 下水汚泥と有機

性廃棄物の嫌気性消化に関する基礎的検討, 第 49 回下水道研究発表会講演集,  
pp.145-147.

## 第5章 生ごみおよびでんぷんの高温有機酸発酵における糖化機構の解析

### 5-1 概説

前章までの検討により、高温有機酸発酵菌である *Bacillus coagulans* 以外の菌による糖化の可能性が示された。本章では、有機性廃棄物を原料とする高温有機酸発酵において糖化を担う菌種を推定することを目的に、生ごみの糖化から有機酸発酵に至る過程の菌叢変化を観察した。また、*B. coagulans* によるでんぷん分解における培養条件の検討も行った。

### 5-2 文献考察

#### (1) 有機性廃棄物の加水分解

下水汚泥など有機性廃棄物の嫌気性発酵は、大きく加水分解 (disintegration/hydrolysis)、有機酸発酵およびメタン発酵の各過程から成り立つとされ、一連の反応をモデル化したものとして ADM1 あるいは類似のモデルが提案・利用されている (Batstone et al, 2002; Siegrist et al, 2002)。これらモデルでは、加水分解 (hydrolysis) は分解される物質 (多糖、タンパク質、脂質) 自身の 1 次反応として記述され、非常に簡略化された形であるものの運用上充分であるとされている (Batstone, 2006; Batstone et al, 2009)。でんぷんを基質として利用した最近の検討事例においても、多糖加水分解は 1 次反応として記述されている (Donoso-Bravo et al, 2011)。ただし、加水分解過程の 1 次反応による表記は、加水分解過程が全体プロセスの中で律速過程と考えられるという前提が必要となる (Vavilin et al, 2008)。このような前提が崩れる場合、例えば、易分解性の有機性廃棄物を材料とする、あるいは、分解者である細菌が基質量に対して相対的に多いなどといった状況では、必ずしも加水分解過程の 1 次反応による表記が充分であるとは言い切れない。実際、加水分解はその分解を担う細菌量に依存するとの報告があり (Fernandez et al, 2001)、分解物の表面積 (つまりは粒子サイズ) も重要とされ (Sanders et al, 2000)、活性汚泥モデル (Henze et al, 2000) と同じように分解物の分解しやすさに基づく分画を提案する報告もある (Yasui et al, 2008)。また、加水分解過程を 1 次反応から分解者および分解物の濃度に依存する Contois model で表現することも提案されている (Vavilin et al, 2008; Ramirez et al, 2009)。以上から、加水分解過程のモデル化は、発酵状況や対象有機物によっては詳細に検討する余地が残っていると言える。

また、提案されている Contois model による加水分解モデルでは、分解者は 1 種類とされている。しかし、複雑な材料と菌種が絡み合う有機性廃棄物の嫌気性発酵において、分解者が加水分解に係る形質として 1 種類に代表されるとは言い難い。そこで、登場する分解

者とその遷移に関する検討が行われている。Cirne et al (2007) は、ビート（でんぷん質）とクローバー（セルロース質）の嫌気性発酵を行い、可溶化・加水分解の進展した培養開始から 10 日間にかけてビートではアルファプロテオバクテリア綱のバクテリアが、クローバーではフィルミクテス門のバクテリアが出現・遷移したことを報告した。また、Kim et al (2010) は、食品廃棄に伴う排水の嫌気性発酵（pH5.7、44.5°C）において、その加水分解過程の菌叢から発酵初期に酪酸やプロピオン酸を生成する *Clostridium thermopalmarium* と *Clostridium novyi* が加水分解過程の主役であり、それらが遷移する様子を報告した。確かに、いたずらに分解者（変数）を増加させることはパラメータ数の増加と相まって嫌気性発酵モデルをより複雑なものへと導くが、上述した通り発酵状況や対象有機物によってはモデルの有効性を高めることにもつながる。例えば、メタン発酵と比べて発酵に係わる登場者の少ない有機酸発酵の場合、あるいは、易分解性の有機物を多く含む生ごみを対象とする場合、加水分解過程と有機酸発酵過程を精緻化することは有効と考えられる。

## (2) 菌叢変化の観察方法

種々の細菌が存在するサンプルに対してその存在菌種を推定する方法としてリボソーム RNA 遺伝子(リボソーム DNA: rDNA)を利用する方法が一般化されている。細菌の場合、16S rDNA について塩基配列データベース (RDP、DDBJ など) が整備されており、サンプル中に存在する細菌の 16S rDNA を解読することにより菌種を推定することができる。ただし、種々の細菌が混在するサンプルでは、菌種ごとに 16S rDNA を分ける必要がある。この菌種ごとに 16S rDNA を分ける方法として、クローニング法と DGGE 法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) が一般によく用いられている。

クローニング法は、抽出した DNA から 16S rDNA をクローン化し、その塩基配列を解析する手法である。比較的長い塩基配列を解読できるが、菌叢を知るためには複数 (例えば 96 穴プレート分) のクローンを解析する必要があり、手間と費用がかかることから時系列に比較するような複数サンプル解析には向かない。一方、DGGE 法は、種々存在する 16S rDNA をその塩基配列の違いにより先に分け、その後 1 つずつの塩基配列を解析する方法である。DNA 変性剤(尿素とホルムアミド)の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行うことにより、塩基配列の違いにより DNA を分離できる。塩基配列の違いにより目的ゲノムを分けられることから、それらを染色することにより複数のサンプルの微生物群集構造を視覚的に比較することができる。しかし、この電気泳動法の都合から比較的短い部位(一般的には 16S rDNA の最も特異的な塩基配列を示すとされる V3 領域を標的)を比較・解析することとなり、得られる系統学的情報に限られる (五十嵐ら、2002 ; 野田

ら、2003)。本章では菌叢変化の観察をまずもっての目的としたことから、DGGE 法によるアプローチを採用した。なお、先の Kim et al (2010) による報告も DGGE 法によるものである。

### 5-3 実験方法

#### (1) 人工生ごみ

本章では前章まで同じ人工生ごみを用いた。高温有機酸発酵で使用する際は、冷凍保存された人工生ごみを室温 (26°C) にて時々攪拌しながら解凍し、蒸留水で 2 倍希釈した (以下、生ごみ培地とする)。同培地は、滅菌操作を行わずに用いた。生ごみ培地の糖組成を表 5.1 に示す。全糖 4.8% (うち溶存する二糖・単糖 3.0%) およびでんぷん 0.8% (全糖などと比較する際は、加水分解後で比較する必要から 180/162 を乗じる) であった (表 5.2)。

表 5.1 生ごみ培地の糖組成

	全糖 (%)	二糖・単糖 (%)
Maltose	0.1	1.4
Glucose	3.9	0.9
Galactose	0.1	0.0
Arabinose	0.1	0.0
Fructose	0.6	0.7

表 5.2 生ごみでんぷん培地の糖組成

	全糖 (%)	二糖・単糖 (%)
Maltose	0.1	1.5
Glucose	4.1	0.5
Galactose	0.0	0.0
Arabinose	0.0	0.0
Fructose	0.4	0.4

表 5.1 の生ごみを 2 倍希釈した生ごみ培地を高温有機酸発酵に用いた際、有機酸生成量の上限と培養開始時の糖量の関係から、でんぷんの消費が明瞭とならなかった。そこで、人工生ごみを蒸留水で 3 倍希釈し、可溶性でんぷん (和光純薬、一級) を 20 g/L となるように添加した培地 (以下、生ごみでんぷん培地とする) を用意した。同培地は、滅菌操作を行わずに用いた。生ごみでんぷん培地の糖組成を表 5-2 に示す。全糖 4.6% (うち溶存する二糖・単糖 2.4%) およびでんぷん 2.1% (全糖などと比較する際は、加水分解後で比較する必要から 180/162 を乗じる) であった。

#### (2) 植種源

生ごみ培地を用いた培養では、前培養された *B. coagulans* JCM 2258 を有機酸発酵菌として利用した。前培養では、LB 培地に JCM 2258 株を植種し、55°C で 24 時間振とう培養した。前培養済みの菌液を生ごみ培地へ 1% 量添加した。また、*B. coagulans* 以外の植種源として、市販されている腐葉土 (苗一番) を用いた。上記土 1 g に 0.9% 食塩水 30 ml を加え、振と

う機(アズワン、ASCM-1)で5分間(2000 rpm)攪拌し腐葉土液とした。腐葉土液を生ごみ培地へ0.1%量添加した。

生ごみでんぷん培地を用いた培養では、*B. coagulans* JCM 2258のほか、土壌より単離したs2株(*Aneurinibacillus thermoaerophilus*と推定)およびs3株(*Geobacillus caldoxylosilyticus*と推定)を植菌した。s2株とs3株は、高温有機酸発酵条件で高いアミラーゼ活性を示す菌株である。また、畑土壌を前培養に用いた菌液も用意した。いずれの前培養も、表5.3に示すでんぷん培地を用いた。前培養条件は、55°Cで24時間振とうとした。植菌量は、いずれも生ごみでんぷん培地に対して0.5%量とした。なお、*B. coagulans*以外の植種源は、でんぷん分解の促進とともに発酵に対するコンタミネーションの目的で用いた。

表 5.3 でんぷん培地/でんぷん寒天培地の組成

			(単位 : g/L)
Yeast extract	Difco		0.5
KCl	和光純薬	特級	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	和光純薬	特級	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	和光純薬	特級	0.1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	和光純薬	特級	0.1
Starch	和光純薬	特級	20
Agar (寒天培地のみ)	和光純薬	特級	8

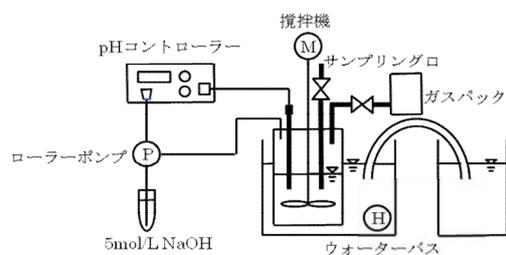


図 5.1 実験装置の概略図

表 5.4 実験条件

	生ごみ培地	生ごみでんぷん培地
培養温度(°C)	55	55
pH(-)	5.5	5.5
反応器の容積(L)	1	1
実施期間(日)	5	10
培養繰り返し数(回)	3	2

### (3) 生ごみ培地/生ごみでんぷん培地を用いた培養装置および条件

実験装置も前章までと同様である。図5.1に本章で用いた実験装置の概略図を示す(反応器、有効容積1L; 反応器内攪拌機、アズワン SM-104; 温度制御、ウォーターバス、アズワン TM-1; pH制御、pHコントローラー、日伸理化 NPH-680D/NPH-690D、ローラーポンプ、東京理科器械 MP-1000; 中和剤、5 mol/Lの水酸化ナトリウム)。反応器内を嫌気状態に保つため、反応器の上部を窒素ガスで充填した。また、窒素ガスを充填したガスパックを取り付け、引き抜きなど操作時の容積バッファーとした。

表 5.4 に実験条件を示す。培養温度と pH は *B.coagulans* の非滅菌下での優占化に最適な 55°C、pH5.5 に設定した。

#### (4) でんぷん分解条件の検討における培養装置と条件

でんぷん分解の回分培養を、pH (5.5、6.5、7.5)、温度 (45°C、50°C、55°C) の合計 9 点で行った。培養期間は 5 日間とした。植菌は、*B. coagulans* JCM2258 を LB 培地にて前培養されたストックソリューションを用いた。ストックソリューションの培地に対する添加量は 1%量とした。培地について、グルコース 3 g、溶性でんぷん 13.5 g、蒸留水 150 mL を 300 mL フラスコに加え、別途、yeast extract (Difco) 2.88 g と蒸留水 150 mL を加えた 300 mL フラスコに用意した。それぞれを 121°C、20 分でオートクレーブした後、yeast extract 溶液を糖液へ添加し培地とした。pH や温度の制御は(3)と同様である。

#### (5) 分析方法

表 5.5 に分析項目と分析方法を示す。溶解性成分の分析には、0.45 µm シリンジフィルターを用いてろ過した試料を用いた。一般的でない分析項目について、以下に詳細を示す。

##### ①全糖

全糖は、図 5.2 に示す実験フローに従って分析を行った (赤尾、2006)。ただし、フルクトースは酸性触媒の存在で脱水され熱分解されるおそれがあることから (Román-Leshkov et al, 2006)、二糖・単糖分析で得たフルクトース量を加水分解後のフルクトースとした (スクロースは検出されず)。

##### ②菌叢変化

菌叢変化は PCR-DGGE 法により観察した。植種源、生ごみでんぷん培地および発酵液からの DNA 抽出では PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) を用いた。PCR では、プライマーセット EUB341f-GC および UNI518r を用い、温度条件は、94°C×5 分 + (94°C×30 秒 + 53°C×30 秒 + 72°C×1 分) ×35 サイクル + 72°C×5 分とした (堆ら、2008)。得られた PCR 産物を DGGE に供した。DGGE (DCode ユニバーサルミュレーション検出システム、Bio-Rad) では、ポリアクリルアミドゲル中の変性剤の濃度勾配が 35%–65%となるように調製し、15 µL の PCR 産物をアプライ後 60°C、130V および 5 時間の条件で電気泳動を行った (大坊ら、2008)。電気泳動終了後、SYBR Green I 染色液で 30 分間染色した後、UV トランスイルミネーターにてバンドを確認した。DGGE マーカーとして、DGGE Makker II (ニッポンジーン) を用いた (15 µL アプライ)。

##### ③Substrate-PAGE

培養液中に存在するアミラーゼの消長を可視化することを目的に、substrate-PAGE (Native-PAGE、Martinez et al, 2000) を試みた。遠心力 15,000×g、5 分間で遠心分離した培養液上澄みを 1mL 回収し、これを遠心濃縮して固形物を得た。ここに、20 μL の蒸留水を添加して攪拌後、7.5 μL を採取しサンプルバッファーと混合した。サンプルバッファーは参考文献の通り用意し、7.5 μL をサンプルと混合して合計 15 μL を電気泳動へアプライした。ゲル作成条件、電気泳動条件および染色条件は基本的には参考文献と同じとしたが、電気泳動の加電圧のみ 100V (濃縮ゲル) および 200V (分離ゲル) とした。電気泳動時のマーカーは、プレジジョン Plus デュアルスタンダード (250 kDa~10 kDa、Bio-rad) を使用した。

#### ④アミラーゼ活性

アミラーゼ活性値は、生ごみ培地を用いた培養時は CERALPFA KIT を用いた。しかし、検出される活性値が僅かであった。そこで、生ごみでんぷん培地を用いた培養では、培養条件に即した pH と温度条件を採用するためヨウ素でんぷん反応を用いた測定方法に変更した(Fitter et al, 2001)。

活性測定試験は、pH5.5 で 55°C の条件で実施した。サンプルの 0.45 μm シリンジフィルターろ過液を酵素溶液とした。表 5.6 の組成物を pH5.5 に合わせた 50mM リン酸緩衝液で溶解させた基質溶液を 5 mL と、酵素溶液を 55°C で 10 分間保温した。10 分後、酵素溶液を 0.5 mL 加えて 5 分間保温した。5 分後に反応停止試薬である 0.1 M の塩酸を 5 mL 添加し、反応を停止させた。5 mL の iodine-iodide solution (表 5.7) に反応停止した溶液を 0.5 mL 添加し、懸濁させた。混合後、分光光度計(日立, U-2800)を用いて 620 nm で吸光度を測定した。求めた吸光度より式(5-1)を計算することで、アミラーゼ活性値を算出した。

α-アミラーゼ生成菌の単離では、でんぷん寒天培地(表 5.3)に発酵液を植菌し、55°C で培養した。出現したコロニーについてヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し (Mishra and Behera, 2008)、ハロ形成したコロニーを別途 LB 培地で培養した。単離株の菌種推定では、DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行い、16S rDNA の一部を増幅するプライマー10F および 800R (厚生労働省、2006) を用いて PCR 後、BigDye Terminator Ready Mix (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。塩基配列の解読は、鳥取大学生命機能研究支援センターに委託した。

表 5.5 分析項目と分析方法

分析項目	単位	分析方法	使用機器・メーカー
固形物濃度	%	MLSS 法（下水試験法） （3500rpm×2 回）	遠心分離機：KOKUSAN, H-103n
全糖, 単糖	%	塩酸による加水分解（全糖） HPLC	HPLC（溶離液, 脱気水, 1 mL/min ; カラム, SUGAR-SP0810, 80°C ; 検出器, RI）
でんぷん	%	F キットスターチ Roche (2007748)	分光光度計：HITACHI, U-2800
有機酸	%	HPLC	HPLC（溶離液, 5mM p-トルエンスルホン酸, 0.8 mL/min ; 反応試薬, 5mM p-トルエンスルホン酸・20mM Bis-tris・0.1mM EDTA 2NA, 0.8 mL/min ; カラム, Shim-pack SCR-102H, 43°C ; 検出器, CDD）
DL-乳酸	%	HPLC	HPLC（溶離液, 5% 2-プロパノール・1mM CuSO <sub>4</sub> , 1 mL/min ; カラム, OA-5000, 43°C ; 検出器, UV-VIS, 254 nm）
アミラーゼ活性	U/mL	α-アミラーゼ活性キット CERALPHA KIT (110308-8)	分光光度計：HITACHI, U-2800
	U/mL	ヨウ素でんぷん反応 (Fitter et al, 2001)	分光光度計：HITACHI, U-2800
菌叢変化	-	PCR-DGGE	BIO RAD, DCode System
生菌数	CFU/mL	希釈平板法	でんぷん寒天培地
α-アミラーゼ生成菌	-	単離	でんぷん寒天培地

表 5.6 基質溶液の組成

	(g/L)
NaCl	2.9
CaCl <sub>2</sub>	0.1
可溶性でんぷん	10

表 5.7 iodine-iodide solution の組成

	(g/L)
ヨウ素	0.05
ヨウ化カリウム	0.5

$$\text{Activity}(\text{unit/mL}) = D[(R_0 - R)/R_0] \times 100 \quad \dots (5-1)$$

R<sub>0</sub> : 酵素を加えていない溶液の値

R : 酵素を加えた溶液の値

D : 酵素溶液の希釈倍率

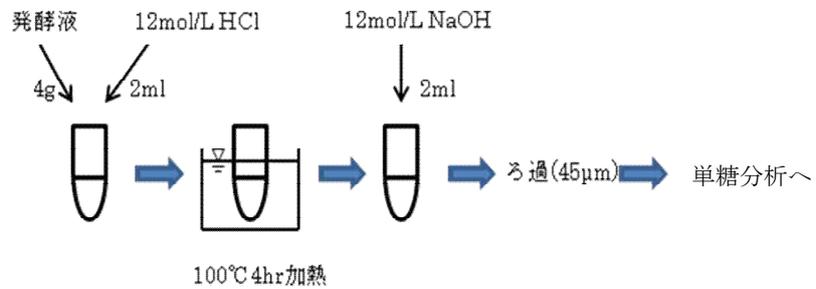


図 5.2 全糖実験フロー

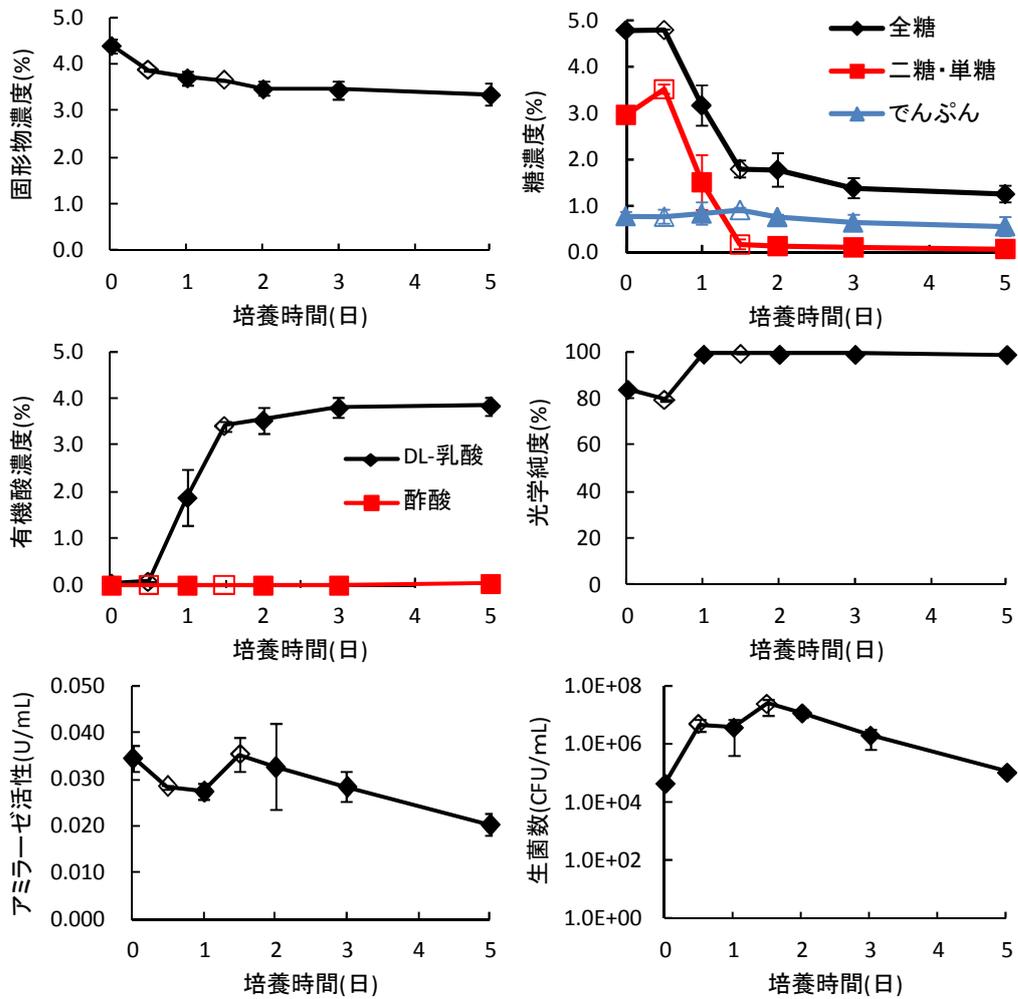


図 5.3 生ごみ培地の変化

(3回の平均、barは標準偏差を示す、0.5日目と1.5日目は2回の平均)

## 5-4 結果および考察

### (1) 生ごみ培地の変化

生ごみ培地の固形物濃度、糖濃度、有機酸濃度、L-乳酸光学純度、アミラーゼ活性およびでんぷん寒天培地生菌数（図 5.3）それぞれの変化を示す（繰返し数 3 回の平均値）。

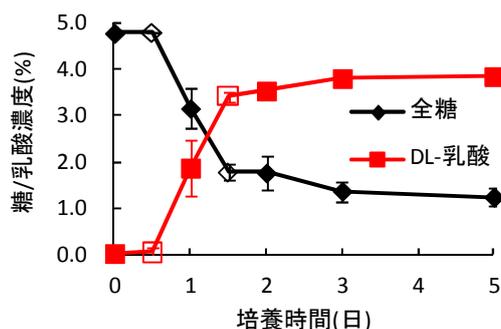


図 5.4 生ごみ培地中の全糖および DL-乳酸変化 (図 5-3 より加工)

固形物濃度は 2 日目まで緩やかに減少(減少幅 10 g/L)したものの、5 日目において 34 g/L 存在し、可溶化の進展は 24 %程度に留まった。糖について、全糖濃度は 0 日目で培養液中に 48 g/L あったのが、2 日目までに 18 g/L へと減少した。その間、二糖・単糖は 30 g/L あったものがほぼ 0 g/L となった一方、でんぷんは 8 g/L のままであった。5 日目でもでんぷんは 6 g/L 残存したことから高温有機酸発酵におけるでんぷんの加水分解は明瞭でない結果となった。

生成物について、培養を通じて生成した有機酸は DL-乳酸と酢酸のみであった (C=1~5 の主だった有機酸を測定)。また、生成した有機酸の大部分が L-乳酸であり、L-乳酸の光学純度は 99%であった。全糖濃度と DL-乳酸濃度の関係を見ると (図 5.4)、消費全糖量に対する DL-乳酸収率は 100%以上となることから L-乳酸発酵が充分に行えたと考えられる。

アミラーゼ活性について、用いた分析キットマニュアルから比べると培養液中の活性値は全般的に極めて僅かであった。アミラーゼ活性が低い点については、酵素至適温度や pH など活性測定条件に問題がある可能性もある (Bezbaruah et al, 1991; キットでは 40°C で pH6.5 を採用)。その中で変化に着目すると、活性値は培養開始時に最も高く、2 日目前後に再度活性値が上昇している。培養開始時に活性値が高いことは、材料 (生ごみ) あるいは植菌由来のアミラーゼ活性が相対的に高いことを意味している。また、培養 2 日目前後に活性値が上昇し、かつ、でんぷん寒天培地の生菌数も同時期にピークとなることから、菌由来のアミラーゼ活性も僅かながら存在することが推察された。

なお、*B. coagulans* JCM2258 を中心とする高温有機酸発酵では、DL-乳酸が 40 g/L 付近になると発酵自体が停止することが経験も含めて観察される。一方で、今回の培養では、でんぷんを資化せずとも DL-乳酸濃度がほぼ発酵停止濃度付近に至った。これは、発酵初期に既に加水分解された糖が十分存在したことを意味し、設定した実験条件（人工生ごみを 2 倍希釈）はでんぷん資化を観察するには適切でないとも考えられた。でんぷんの分解が 2 日目以降で若干観察されたこと、アミラーゼ活性値の最大値が 2 日目付近にあったことは、わざわざでんぷんを加水分解する必要がなかったことと関連すると考えられる。そこで、次回の培養では既加水分解糖の濃度を抑え、一方ででんぷんの濃度の変化を明確にするため、人工生ごみを蒸留水で 3 倍希釈し、20 g/L となるように可溶性でんぷんを添加する培地（生ごみでんぷん培地）を用いることとした。

## (2) 培養液からの単離株

2 日目までのでんぷん寒天培地生菌について、コロニー形状を意識した上でランダムにでんぷん寒天培地に再移植し、形成されたコロニーにヨウ素染色を施した際ハロが確認できた株についてその菌種の推定を行った。20 コロニー中 15 コロニーについて菌種推定が行えたが、そのうち 14 コロニーは *B. coagulans* と推定された。このことから、でんぷん寒天培地で確認される生菌数の大部分は同菌と考えられ、**図 5.3** の 2 日目前後で上昇したアミラーゼ活性をもたらす菌種も *B. coagulans* と考えられた。

一方、15 コロニー中 1 コロニーは *Thermosporothrix hazakensis* と推定された。単離された *T. hazakensis* の性質は、既報によると生育条件は温度 31~58°C(最適温度 50°C)、pH5.4~8.7(最適 pH7.0)であり、セルロース、キシラン、キチンを糖化するとあった(Yabe et al, 2010)。培養条件から判断して発酵液中に存在してもおかしくない菌種であり、セルロースやキシランなど食物繊維に該当する部分を糖化することから *B. coagulan* 以外の糖化菌の存在も確認できた。仮に *B. coagulans* のアミラーゼ活性が低いとするとそれらを補う菌種の存在、あるいは、セルラーゼなど *B. coagulans* が持たない糖化活性を有する菌種の存在は、高温有機酸発酵の糖化部分の促進につながり有意義となり得る。単離された *B. coagulans* 以外の菌種が有機酸発酵にどのような影響を与えるかは不明であるため、負の側面を確認しつつ発酵槽内において共存化の方向性を今後探りたい。

## (3) 生ごみでんぷん培地の変化

生ごみでんぷん培地の糖濃度、L-乳酸濃度、アミラーゼ活性およびでんぷん寒天培地生菌数 (**図 5.5**) それぞれの変化を示す (繰返し数 2 回、それぞれを図示)。

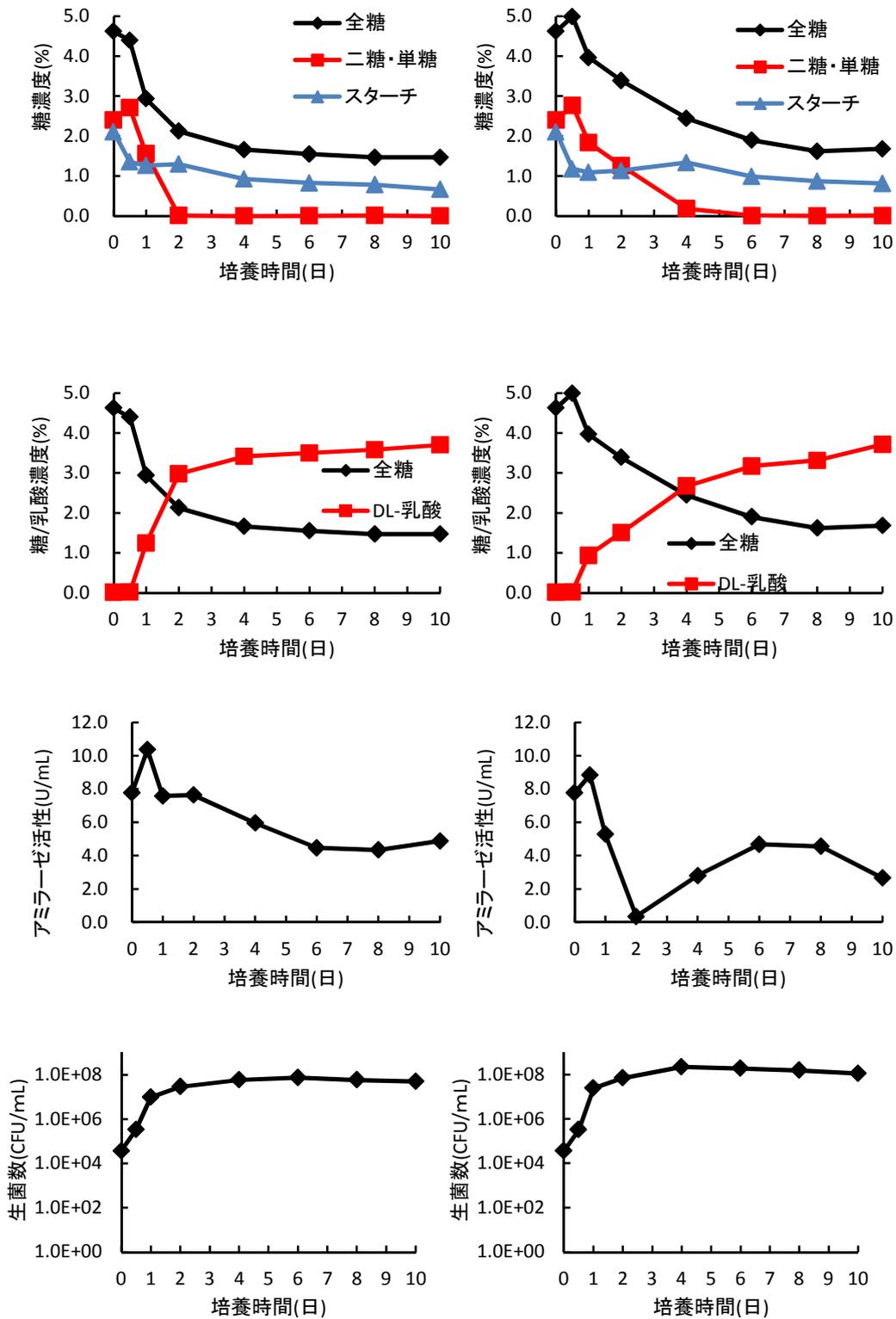


図 5.5 生ごみでんぷん培地の変化 (左 1 系、右 2 系)

全糖濃度は0日目で培養液中に46 g/L あったのが、徐々に低下し10日目に16 g/L (平均値) へと減少した。その間、二糖・単糖は24 g/L あったものが4日目までにほぼ0 g/L となり、でんぷんは21 g/L あったものが初めの0.5日間で13 g/L まで低下し、以後10日目まで減少を続け8 g/L となった。でんぷんの明瞭な減少とその時期を確認した。

生成物について、培養を通じて生成した有機酸はDL-乳酸とギ酸(6日目以降で最大1 g/L 未満)のみであった(C=1~5の主だった有機酸を測定)。また、生成した有機酸の大部分がL-乳酸であり、L-乳酸の光学純度は99%であった。全糖濃度とDL-乳酸濃度の関係を見ると(図5.5)、消費全糖量に対するDL-乳酸収率は100%以上となることからL-乳酸発酵が充分に行えたと考えられる。

アミラーゼ活性は、培養開始時に既に高く、0.5日目に最大値(平均9.6 U/mL)を示した。以降もアミラーゼ活性値は4 U/mL程度を保ち、関連してでんぷん濃度の継続した減少、生菌数の維持( $10^7$  CFU/mL以上)が観察された。

生ごみ培地を用いた培養と比べると、培養初期に高いアミラーゼ活性値およびでんぷんの分解を示した。これは、材料由来のアミラーゼ活性のほか、高いでんぷんの分解活性を有する株を植種に用いたこと、また、植種の際にでんぷん分解酵素が持ち込まれたことによると考えられる。

#### (4) 培養液の菌叢変化

生ごみでんぷん培地を用いた発酵液についてPCR-DGGEの結果を示す(図5.6、1系)。図中0日目は生ごみでんぷん培地の菌叢を示している。これらのうち一部(図5.6中;バンド1、2、8、9、10、14)は、培養の序盤(2日目まで)に消失している。このことから有機酸生成とは関連しない菌種と考えられる。一方で、アミラーゼ活性は2日目まで比較的高いことから(1系)、アミラーゼ生成とは関連が考えられる。バンド8については、*Bacillus oleronius*あるいは*Bacillus sporothermodurans*(いずれも適合率142/142)と推測される。いずれも*Bacillus firmus*に性質は類似していると報告されている菌種であり(Kuhnigk et al, 1995; Pettersson et al, 1996)、*B. firmus*はアミラーゼ活性を有することが知られている(Sneath 1986)。バンド8が培養初期においてアミラーゼ誘導を行った可能性も示唆される。培養開始1日後あたりから明瞭なバンド(12)を示す菌種は*B. coagulans*(適合率73/73)と推測される。バンドの濃淡は遺伝子量(ここでは16Sr DNA量)と関連しており、有機酸発酵の進捗、あるいはでんぷん寒天培地における生菌数は*B. coagulans*の生長で説明がつくと思われる。一方、一部の菌種(図5.6中;バンド3、4、5、6、13)は、培養初期と培養後半で観察される。バンド3、4、5、6は植菌に用いたs2株にも見られるバンドであり、バンド6については*A. thermoaerophilus*(適合率147/147)と推測された。これらバンドは、バンド

12 (*B. coagulans* と推測) が相対的に増加する時期において菌叢電態の相対的な割合を低下させるものの (1~4 日目の期間)、培養後半で相対的な割合を増加させ発酵槽内で存在を示している。*A. thermoaerophilus* についてはアミラーゼ誘導を目的に発酵に導入した菌種でもあり、培養後半で相対的な割合を増加させる菌種もアミラーゼ誘導に関わっている可能性が示唆される。第 4 章の実験でも、生ごみを多く含む基質の場合に *A. thermoaerophilus* が検出されている。

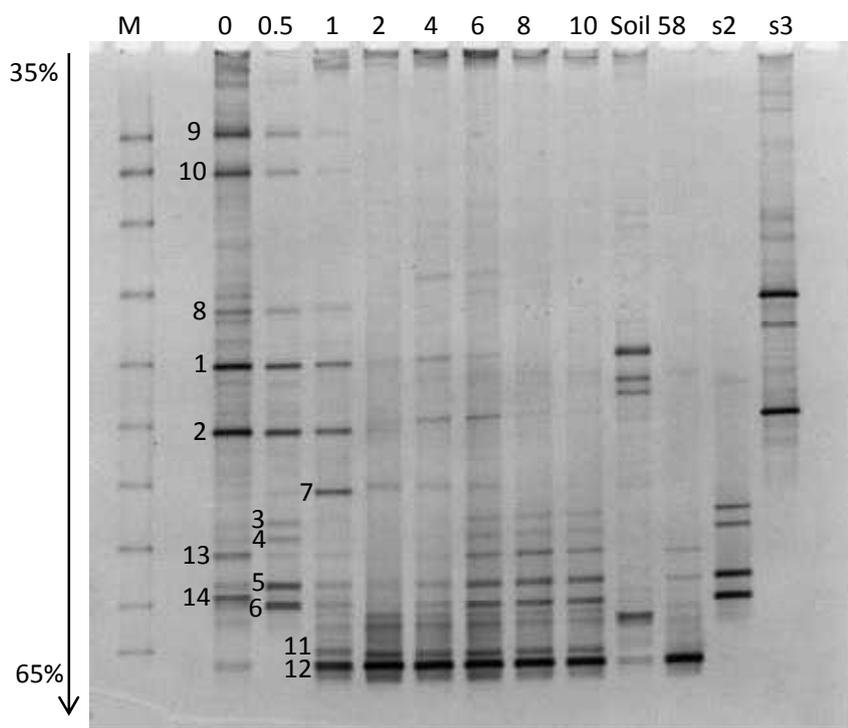


図 5.6 培養液の菌叢変化

上部: M, DGGE Maker II; 0~10, サンプル日; Soil, 畑土壌培養液; 58, JCM258; s2, s2 株; s3, s3 株. 35~65%: 変性剤グラジエント. 図中バンド: 6, *A. thermoaerophilus*; 7, *Bacillus smithii*; 8, *Bacillus sp.*; 12, *B. coagulans*

#### (5) Substrate-PAGE の試み

培養液中に存在するアミラーゼの消長を可視化することを目的に、substrate-PAGE を試みた。この方法では、アミラーゼ活性を示すタンパク質バンドの検出を行いつつ、分子量などが異なるアミラーゼを分離することができる。その結果 (図 5.7)、0 日目と 0.5 日目についてそれぞれ 2 か所アミラーゼ活性を示す領域が確認できた。アミラーゼ活性値が高い時期 (0 日目、0.5 日目) についてアミラーゼ活性領域を確認できた。

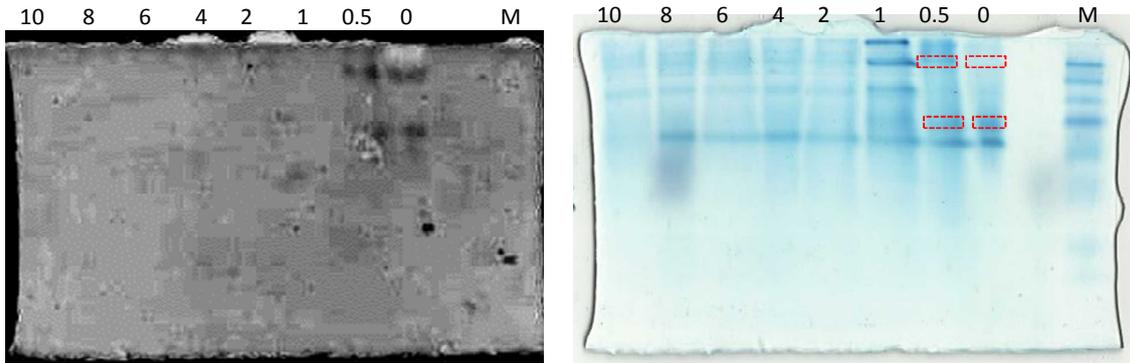
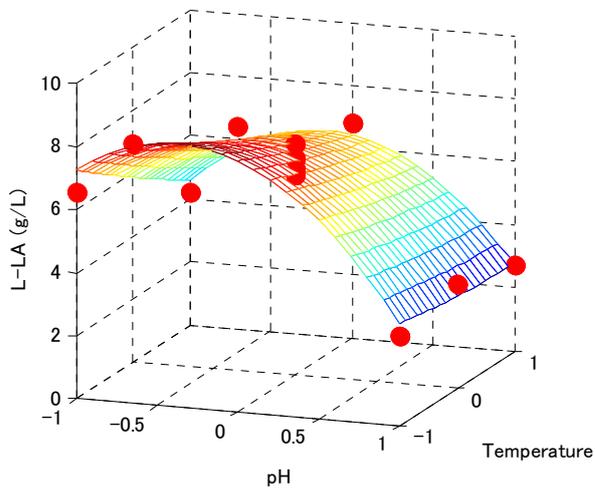


図 5.7 Substrate-PAGE の結果

左; ヨウ素染色後 (着色反転、黒く表示) : 右; CBB G-250 染色後 (点線部分が左図でんぷん分解領域)



曲面は 2 次近似式を示す (式 5-2). pH ; 5.5 (-1) ~7.5 (+1). 温度 ; 45 (-1) ~55 (+1)

図 5.8 でんぷん分解培養における L-乳酸生成量

$$(L\text{-乳酸生成量 } g) = 7.11 - 1.47X_1 - 0.78X_2 + 0.55X_1X_2 - 2.73X_1^2 + 0.083X_2^2 \quad (5-2)$$

$X_1$  : コード化された pH、 $X_2$  : コード化された温度

#### (6) でんぷん分解の培養条件検討

*B. coagulans* のでんぷん分解を、pH (5.5、6.5、7.5)、温度 (45°C、50°C、55°C) の合計 9 点の条件にて比べた。評価は L-乳酸生成量で行った。その結果、pH6.5 で 45°C の条件が最大の L-乳酸生成量 (9.1 g) を示した。一方、pH7.5 の条件では L-乳酸生成量は低調であり、3 g/L 程度となった。培養実験において添加したグルコース量が 3 g/L であることから、pH7.5 の条件ではほとんどでんぷんの資化が進んでいないと思われる。

L-乳酸の生成量を pH と温度を変数とする二次重回帰式にて評価した (式 5-2)。この際、pH と温度は実験巾をそれぞれ 1 (-) と 5 (°C) と設定し、実験領域を -1 から +1 へとコード

化した。求めた式は重回帰式の検定を行い、危険率 0.05 で実験データは重回帰モデルに適合していると判断された。実験結果と式(2)をプロットした結果を図 5.8 に示す。これによると、pH は 6.5 付近、温度は 45°C に近づくにつれて L-乳酸生成量が高まっていることが分かる。*B. coagulans* を用いたでんぷんからの L-乳酸生成の至適条件は、現在の高温有機酸発酵条件より高 pH 側、低温側にあると考えられる。

#### 5-5 まとめ

本章では、人工生ごみを用いた高温有機酸発酵（回分培養）を非滅菌条件のもとで行い、糖化の確認、糖化時期の把握および糖化関連菌種の推定を行った。同発酵では、植種に *B. coagulans* と土壌由来菌培養液を用いた。その結果、でんぷんの糖化は発酵初期（1 日目まで）に起こること、アミラーゼ活性も発酵初期（1 日目まで）が高いことを確認した。材料あるいは植菌由来のアミラーゼが作用したと考えられる。なお、発酵後半（6 日目以降）においてもアミラーゼ活性が維持され、でんぷんの緩やかな減少、有機酸生成の継続と生菌数の維持を観察した。このことは継続したでんぷんの糖化を示すものと考えられる。時期を同じくして *A. thermoaerophilus* の相対的な増加を観察したことから、高温有機酸発酵槽内で同菌種がでんぷんの糖化を担っている可能性が示唆された。

#### 【第 5 章参考文献】

- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. (2002) Anaerobic Digestion Model No.1. IWA Publishing.
- Batstone, D.J. (2006) Mathematical modelling of anaerobic reactors treating domestic wastewater: Rational criteria for model use. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* **5**(1), 57–71.
- Batstone, D.J., Tait, S., Starrenburg, D. (2009) Estimation of hydrolysis parameters in full-scale anaerobic digesters. *Biotechnol. Bioeng.* **102**(5), 1513–1520.
- Bezbaruah, R.L., Gogoi, B.K., Pillai, K.R., Nigam, J.N. (1991) Amylase production by three *Bacillus* strains active at alkaline pH. *J. Basic Microbiol.* **31**(1), 13-20.
- Cirne, D.G., Lehtomäki, A., Björnsson, L., Blackall, L.L. (2007) Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *J Appl. Microbiol.* **103**(3), 516-527.
- Donoso-Bravo, A., Mailier, J., Martin, C., Rodriguez, J., Aceves-Lara, C.A., Vande Wouwer, A. (2011) Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review. *Water Res.* **45**(17), 5347-5364.
- Fernández, B., Porrier, P., Chamy, R. (2001) Effect of inoculum-substrate ratio on the start-up of

- solid waste anaerobic digesters. *Water Sci. Technol.* **44**(4), 103-108.
- Fitter, J., Herrmann, R., Dencher, N.A., Blume, A., Hauss, T. (2001) Activity and stability of a thermostable  $\alpha$ -amylase compared to its mesophilic homologue : mechanisms of thermal adaptation. *Biochemistry.* **40**, 10723-10731.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M. (2000) Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. IWA Publishing.
- Kim, M.D., Song, M., Jo, M., Shin, S.G., Khim, J.H., Hwang, S. (2010) Growth condition and bacterial community for maximum hydrolysis of suspended organic materials in anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(5), 1611-11618.
- Kuhnigk, T., Borst, E.M., Breunig, A., König, H., Collins, M.D., Hutson, R.A., Kämpfer, P. (1995) *Bacillus oleronius* sp.nov., a member of the hindgut flora of the termite *Reticulitermes santonensis* (Feytaud). *Can. J. Microbiol.* **41**(8), 699-706.
- Martinez, T.F., Alarcon, F.J., Diaz-Lopez, M., Moyano, F.J. (2000) Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. *Electrophoresis.* **21**(14), 2940-2943.
- Mishra, S., Behera, N. (2008) Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *African J. Biotechnol.* **7**(18), 3326-3331.
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E., Priest, F.G. (1996) *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(3), 759-64.
- Ramirez, I., Mottet, A., Carrère, H., Déléris, S., Vedrenne, F., Steyer, J.P. (2009) Modified ADM1 disintegration/hydrolysis structures for modeling batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated waste activated sludge. *Water Res.* **43**(14), 3479-3492.
- Roman-Leshkov, Y., Chheda, J.N., Dumesic, J.A. (2006) Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose. *Science.* **312**(5782), 1933-1937.
- Sanders, W.T., Geerink, M., Zeeman, G., Lettinga, G. (2000) Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates. *Water Sci. Technol.* **41**(3), 17-24.
- Siegrist, H., Vogt, D., Garcia-Heras, J.L., Gujer, W. (2002) Mathematical model for meso- and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Environ Sci. Technol.* **36**(5), 1113-1123
- Sneath, P.H.A. (1986) Endospore-forming gram-positive rods and cocci. Holt J.G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. 1104-1200. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Vavilin, V.A., Fernández, B., Palatsi, J., Flotats, X. (2008) Hydrolysis kinetics in anaerobic

- degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Manag.* **28**(6), 939-951.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Yokota, A. (2010) *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov., isolated from compost, description of *Thermosporotrichaceae* fam. nov. within the class *Ktedonobacteria* Cavaletti et al. 2007 and emended description of the class *Ktedonobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**(8), 1794-1801.
- Yasui, H., Goel, R., Li, Y.Y, Noike, T. (2008) Modified ADM1 structure for modelling municipal primary sludge hydrolysis. *Water Res.* **42**(1-2), 249-259.
- 赤尾聡史. (2006) 生ごみを原料とした高温L-乳酸発酵に関する研究. 京都大学大学院工学研究科博士論文. 108-109.
- 堆洋平, 李玉友, 久保田健吾, 原田秀樹. (2008) デンプンの高温水素発酵細菌群の構造解析. *生物工学会誌.* **86**(4), 157-163.
- 五十嵐泰夫, 春田伸, 中村浩平. (2002) 環境中の微生物集団を解析するための分子生物学的手法の概説. *環境技術.* **31**(9), 674-678.
- 厚生労働省. (2006) 第十五改正日本薬局方. 1580-1581.
- 大坊彩乃, 栗栖 (長谷川) 聖, 花木啓祐. (2008) 高温接触酸化型トイレ実証試験における処理槽内の細菌群集構造解析. *水環境学会誌.* **31**(5), 253-259.
- 野田尚宏, 金川貴博. (2003) 分子微生物生態学のこれまでとこれから. *日本微生物生態学誌.* **18**(2), 38-43.

## 第6章 リアルタイム PCR 法の有機酸発酵への適用および数理モデル化

### 6-1 概説

本章では、*Bacillus coagulans* のみが反応に関わっている非滅菌下での高温乳酸発酵を対象として、リアルタイム PCR の適用性を、異なる増殖相における有機酸発酵の観点から評価した。菌体重量と 16S rRNA 遺伝子との関係を詳細に把握するために、回分式および半連続式実験を行い、グルコースを基質とした異なる条件下で比較検討した。溶解性の基質のみを用いたので、固形性 COD<sub>Cr</sub> よりも正確に測定できる濁度を測定して、菌体重量の評価を試みた。最後に、数理モデルを適用して、得られた結果を再現しうる一般化手法の検証を行った。

### 6-2 文献考察

嫌気性消化反応は、酸発酵段階およびメタン発酵段階が組み合わされている。酸発酵段階は、乳酸、酪酸、酢酸などの有機酸および水素ガスが生成する複雑な過程であり、種々の微生物群が反応に関わっている。微生物群の構成により、反応動力学や反応生成物は大きな影響を受ける(Batstone et al., 2002; Hidaka et al., 2010a)。これらの特性を議論の上では微生物群の濃度を把握する必要がある、古典的には浮遊性物質 (SS) (Michelson ら, 2006)、化学的酸素要求量 (COD) (Batstone et al., 2002)や、濁度(Payot et al., 1999)を指標に用いてきた。しかしながら、これらの指標は、生ごみや食品廃棄物のように固形性有機成分を含む混合液での微生物群の濃度を把握するには適切でない。近年分子生物学的手法としてリアルタイム PCR 法により、特定の微生物群をターゲットとしたプライマーを作成することで定量する技術が開発されてきた。この手法によるメタン細菌への定量技術が報告されている(Kobayashi et al., 2009)。Furet et al. (2004)は、ミルクの発酵産物を対象に、乳酸生成細菌をリアルタイム PCR 法により定量する技術を開発し、古典的な細菌の定量手法と比較している。しかしながら、数理モデルでより重要であるバイオマス重量としての細菌の定量は行っていない。水素発酵において、微生物の増殖に関するパラメータと、分子生物学的手法による微生物の定量の関係を議論する研究が報告されている(Wang et al., 2008a; 2008b)。しかし、反応器の運転時間は 120 h 程度に限られている。

一方 Akao et al. (2007)は、pH 5.5 および 55°C の条件下で生ごみの発酵を行うと、非滅菌下で *Bacillus coagulans* が優占し、L-乳酸発酵になり、他の微生物群は増殖しないことを示している。乳酸発酵の動力学的解析として、基質や生成物の阻害影響、最大生成物濃度、微生物群集の増殖などを含めて、リアルタイム PCR による *B. coagulans* の定量と組み合わせ

た解析がなされている(Hidaka et al., 2010a)。非滅菌下での高温乳酸発酵は *B. coagulans* のみが反応に関わっているため、リアルタイム PCR の適用性を議論する上で都合がよい。さらに、L 乳酸発酵自身も、生分解性プラスチックの原料として注目されている。しかしながら、既往研究での議論において、菌体重量の測定は COD<sub>Cr</sub> の減少および菌体収率から算出したそれほど正確でない固形性 COD<sub>Cr</sub> の間接的な測定に基づいており、この方法では、自己分解による菌体重量の減少を把握できないことや、異なる増殖相の評価を行えない点で課題が残っている。さらに、菌体重量と 16S rRNA 遺伝子との関係を、長期的なかつ負荷率が異なる連続運転条件下で正確には評価されていない。

そこで本章では、リアルタイム PCR による *B. coagulans* の定量について、異なる増殖相における有機酸発酵の観点から評価を試みた。正確に菌体重量と 16S rRNA 遺伝子との関係を把握するために、回分式および半連続式実験を行い、グルコースを基質とした異なる条件下で比較した。溶解性の基質のみを用いたため、固形性 COD<sub>Cr</sub> よりも正確に測定できる濁度を測定することで、菌体重量の評価を試みた。最後に、数理モデルを適用して、包括的に得られた結果を再現しうるかの検証を行った。

### 6-3 実験方法

#### (1) 反応器および実験条件

酸発酵実験を、有効容積 1 L のガラス製三角フラスコで作成した反応器で行った。反応器は嫌気性条件として、完全混合状態を攪拌機により確保した。回分式実験 (Run A1–Run A5) および半連続式実験 (Run B1–Run B3) を行った。実験条件はそれぞれ表 6.1 および表 6.2 に示すとおりである。恒温水槽により 55°C を維持し、pH は 10 N NH<sub>4</sub>OH および pH コントローラー (NPH-660、日伸理化製) を用いて 5.5 に制御した。反応器のヘッドスペースは、それぞれの発酵実験開始前に窒素ガスによりパージした。反応器は 121°C および 20 分のオートクレーブ操作により滅菌したものの、基質については滅菌操作を行わず、反応は基質に含まれている雑多な微生物群が元になり行われていることを示した。Run A1–Run A5 では、異なる初期グルコース濃度を設定し、乳酸発酵における基質阻害や生成物阻害の影響を把握した。栄養塩の必要性を確認するために、ポリペプトンおよび酵母抽出液の添加割合を Run A2 では減らした設定とした。植種汚泥は、事前に pH 5.5 および 55°C にて 2 日間、非滅菌下で培養して確保した。培養液の組成は以下の通りである：グルコース (20 g/L)、酵母抽出液 (2.5 g/L)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.25 g/L)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.05 g/L)、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.01 g/L)、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.01 g/L)、L-lactate (10 g/L)、および発酵させた人工生ごみ (Akao et al., 2007) である。この植種液をそれぞれ 10 mL ずつ、1 L の反応器に、実験開始時に投入した。植種液

に含まれる L 乳酸は 28.1 g/L であり、光学純度 (OP) はほとんど 100%であった。

半連続式実験 (Run B1–Run B3) では、2/3 L の消化液を引き抜き、同様の基質を投入する操作を 3 日ごとに行った。これは水理的滞留時間 (HRT) 4.5 d に相当する。基質のグルコース、ポリペプトンおよび酵母抽出液は Run A1 と同様である。Run B1、Run B2 および Run B3 では、有機物負荷率 (OLR) をそれぞれで 11.1、22.2、および 5.55 g/(L·d) にした。この際には、投入基質の濃度を変化させることで対応した。半連続式実験は 2,088 時間 (87 日間) 行った。Run B1 では実験開始時に植種汚泥を 10 mL 添加した。

表 6.1 回分式実験の実験条件および結果

	RunA1	RunA2	RunA3	RunA4	RunA5
Glucose (g/L)	50	100	100	150	200
Polypeptone (g/L)	5	5	10	15	20
Yeast extract (g/L)	5	5	10	15	20
Starting time of lactic acid production (h)	7	12	10	17	18
16S rRNA gene (copies/L)	$4 \times 10^{11}$	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{12}$	$9 \times 10^{12}$	$2 \times 10^{11}$
Final concentrations					
Turbidity (kaolin mg/L)	2000	2400	4500	5000	4600
L-lactate (g/L)	48	60	78	82	63
Remaining glucose (g/L)	2	28	5	32	115
Lactate conversion ratio <sup>a</sup> (%)	95	72	84	52	28
OP (%)	100.0	99.9	99.7	98.7	98.1

<sup>a</sup>produced lactate (g) / consumed glucose (g) × 100(%)

表 6.2 半連続式実験の実験条件

	Run B1	Run B2	Run B3
Experimental time (h)	0–864	864–1512	1512–2088
HRT (d)	4.5	4.5	4.5
Glucose (g/L)	50	100	25
Polypeptone (g/L)	5	10	2.5
Yeast extract (g/L)	5	10	2.5
OLR (g/(L·d))	11.1	22.2	5.55

## (2) 分析方法

それぞれの回分式実験の途中で、定期的にサンプリングを行い、分析を行った。濁度は、吸光度 (600、630 および 660 nm) (UV-1650PC, 島津) により測定した。その他の項目の分析方法は、第 2 章～第 4 章と同様である。

### (3) リアルタイム PCR による定量

DNA 抽出は、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を利用し Lysis 法に基づいてサンプリング直後に行った。定量プライマーは、*B.coagulans* を特定しうるよう設計された BACO186F (gcatggaggaaaaggaa) および BACO447R (cccggcaacagagtttta) を使用した。16S rRNA 遺伝子の定量は、蛍光色素 (SYBR Green I, Roche) によるリアルタイム PCR で行った (Light Cycler 1.2, Roche)。PCR 条件は、95°C×10 分 + (95°C×10 秒 + 60°C×10 秒 + 72°C×30 秒) ×30 サイクルとした。外部標準 DNA 溶液は混合液より抽出された DNA 溶液を用いて PCR によって DNA を増幅することで作成し、その DNA 濃度は吸光度の測定により決定した (ND-1000, NanoDrop)。これにより作成された検量線を用いて、サンプル中に含まれる DNA 濃度を決定した。

## 6-4 結果および考察

### (1) 回分式実験

表 6.1 に Run A1–Run A5 の結果をまとめて示す。これらの実験中にギ酸や酢酸は生成されず、乳酸の OP はほぼ 100%であった。Run A1 では、グルコースの消費および L 乳酸の生成が 7 時間後に開始した。そして、20 時間後には減少した。濁度は急速に増加し、そのタイミングは L 乳酸の生成時期と同じであった。16S rRNA 遺伝子濃度は、5 時間後より急速に増加し始めた。これは、濁度の増加開始よりも早い。遺伝子の増幅は、細胞重量の増加以前に観察されたことを示している。細胞増殖初期段階において、16S rRNA 遺伝子濃度の指数的な増加は、細胞重量よりも急速に進行していた。濁度および 16S rRNA 遺伝子の増加は 12 時間後に停止し、その後は、徐々に減少した。ポリペプトンおよび酵母抽出液のグルコースに対する割合は、Run A2 で Run A3 の半分とした。その結果、Run A2 では Run A3 よりも乳酸生成量が少なかった。Run A4 では、82 g/L の乳酸が生成され、32 g/L のグルコースが残存していた。これは、本反応器で得られる最大乳酸濃度を示している。この値は、Payot et al. (1999) や Akao et al. (2007) が示した 50 g/L 程度の値よりも高濃度である。Run A5 では、63 g/L の乳酸生成が観察された。これは、Run A4 よりも低い値である。さらに、濁度および 16S rRNA 遺伝子濃度も Run A5 では、Run A4 よりも低かった。これは、高濃度のグルコースによる阻害影響によるものと考えられる。同じグルコース、ポリペプトンおよび酵母抽出液の割合であった Run A1、Run A3、Run A4 および Run A5 を比較して、初期グルコース濃度の増加は、乳酸生成開始時期の遅延につながっている。

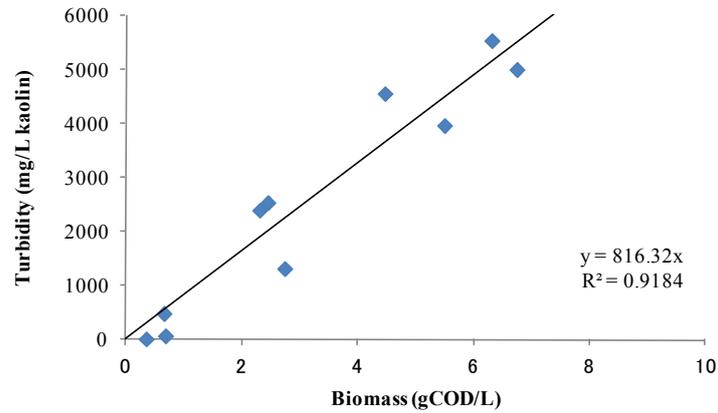


図 6.1 Run A1 および Run A3 での対数増殖相における細胞増殖に使用されたグルコース量と濁度増加の関係

図 6.1 に、Run A1 および Run A3 での対数増殖相における細胞増殖に使用されたグルコース量と濁度増加の関係を示す。ここでは乳酸濃度が、最大蓄積可能乳酸濃度よりも低い状況のものとして選んでいる。収率として、0.120 g-*B. coagulans*-COD/g-consumed-glucose-COD (Hidaka et al., 2010a)を用いて、細胞増殖に使用されたグルコース量 (X 軸) を算出した。COD と濁度の相関関係は、816 mg-kaolin/g-*B. coagulans*-COD で表された。濁度の増加は、固形性 COD の増加で示される菌体重量の増加に対応していると考えられる。

Run A4 の結果より、乳酸の蓄積は乳酸生成に対する阻害効果があることが分かる。阻害影響  $f_L (-)$  は、式 (6-1) (Hidaka et al., 2010a) で表される。

$$f_L = \frac{K_{EI}}{K_{EI} + S_L} \cdot \left( 1 - \frac{\max(0, S_L - S_{Lct})}{S_{Lmax} - S_{Lct}} \right) \quad (6-1)$$

ここで、 $K_{EI}$  は最初の乳酸阻害に関する半飽和定数 (gCOD/L)、 $S_L$  は乳酸濃度 (gCOD/L)、 $S_{Lct}$  は二段目の乳酸阻害開始濃度 (gCOD/L)、 $S_{Lmax}$  は最大蓄積乳酸濃度 (gCOD/L) である。

基質阻害については、Monod 型の式 (Lin et al., 2004) や、Haldane 型の式 (Haldane, 1930) で表される。ここでは、Haldane 型の式を用いて、微生物増殖に伴う 16S rRNA 遺伝子濃度の増加の観点での評価を試みた。16S rRNA 遺伝子濃度の比増殖速度に対するグルコースの阻害は以下の式で表される。

$$\frac{\mu}{f_L} = \mu_{max} \cdot \frac{Sg}{Ks + Sg \cdot \left( 1 + \frac{Sg}{K_{RES}} \right)} \quad (6-2)$$

ここで、 $\mu$  は 16S rRNA 遺伝子の比増殖速度 (1/h)、 $\mu_{max}$  は 16S rRNA 遺伝子の最大比増

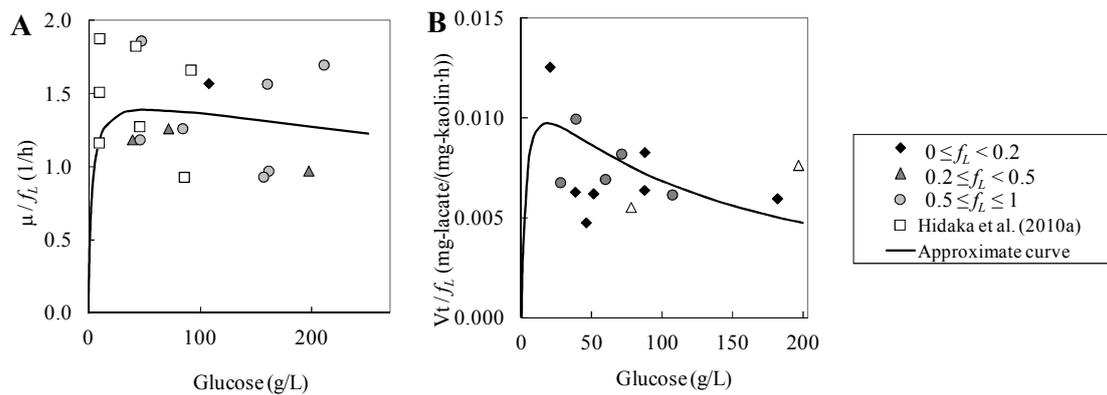
殖速度 (1/h)、 $K_S$  はグルコースに対する半飽和定数 (gCOD/L)、 $K_{rES}$  はグルコースの 16S rRNA 遺伝子に対する阻害影響についての半飽和定数 (gCOD/L)、および  $S_g$  はグルコース濃度 (gCOD/L) である。

微生物重量 (ここでは濁度を利用) あたりの乳酸生成に対するグルコースの阻害は以下の式で表される。

$$\frac{V_t}{f_L} = V_{t\max} \cdot \frac{S_g}{K_S + S_g \cdot \left(1 + \frac{S_g}{K_{rES}}\right)} \quad (6-3)$$

ここで、 $V_t$  は微生物重量あたりの乳酸生成速度 (mg-lactate/(mg-kaolin·h))、 $V_{t\max}$  は微生物重量あたりの最大乳酸生成速度 (mg-lactate/(mg-kaolin·h))、および  $K_{rES}$  は濁度に対するグルコースの阻害影響についての半飽和定数 (gCOD/L) である。

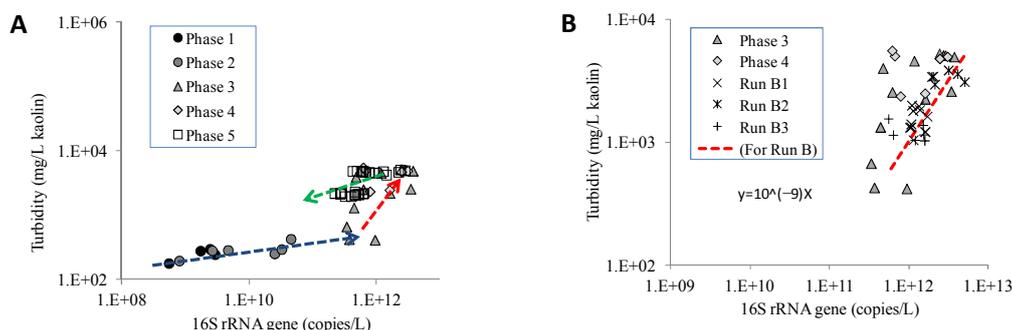
ここでは、以下の値を用いた： $K_{EI} = 5.11$  (gCOD/L)、 $S_{Lc} = 40$  (gCOD/L)、 $\mu_{\max} = 1.54$  (1/h)、 $K_S = 3.1$  (gCOD/L)、 $V_{t\max} = 0.013$  (mg-lactate/(mg-kaolin·h)) (Hidaka et al., 2010a)、および  $S_{L\max} = 87.5$  (gCOD/L) (本研究で求めた値)。そして、 $K_{rES} = 1.1 \times 10^3$  (gCOD/L) (図 6.2a) および  $K_{rES} = 1.2 \times 10^2$  (gCOD/L) (図 6.2b) を、誤差の二乗和が最小となるようにして求めた。 $f_L$  の値が変動していたことから、これらの図での値は変動が大きいものの、グルコースが高濃度の場合の阻害影響がはっきりとモデル式により示されている。算出した Haldane 式の値は、リアルタイム PCR および濁度で全く異なっていた。Burgos-Rubio et al. (2000) および Hidaka et al. (2010a) は、同様の阻害影響値をそれぞれ 127 gCOD/L および 180 gCOD/L と報告している。これらは、本研究での  $K_{rES}$  の値に近く、 $K_{rES}$  の値とは異なっていた。



(A) 16S rRNA 遺伝子に対する阻害; Hidaka et al. (2010a) のデータを含む;

(B) 微生物重量あたりの乳酸生成速度に対する阻害

図 6.2 Haldane 型の式による阻害影響の比較



(A)回分式実験; (B) 半連続式実験

図 6.3 Run A1、Run A3、Run A4、Run B1、Run B2 および Run B3 での  
16S rRNA 遺伝子濃度と濁度の関係

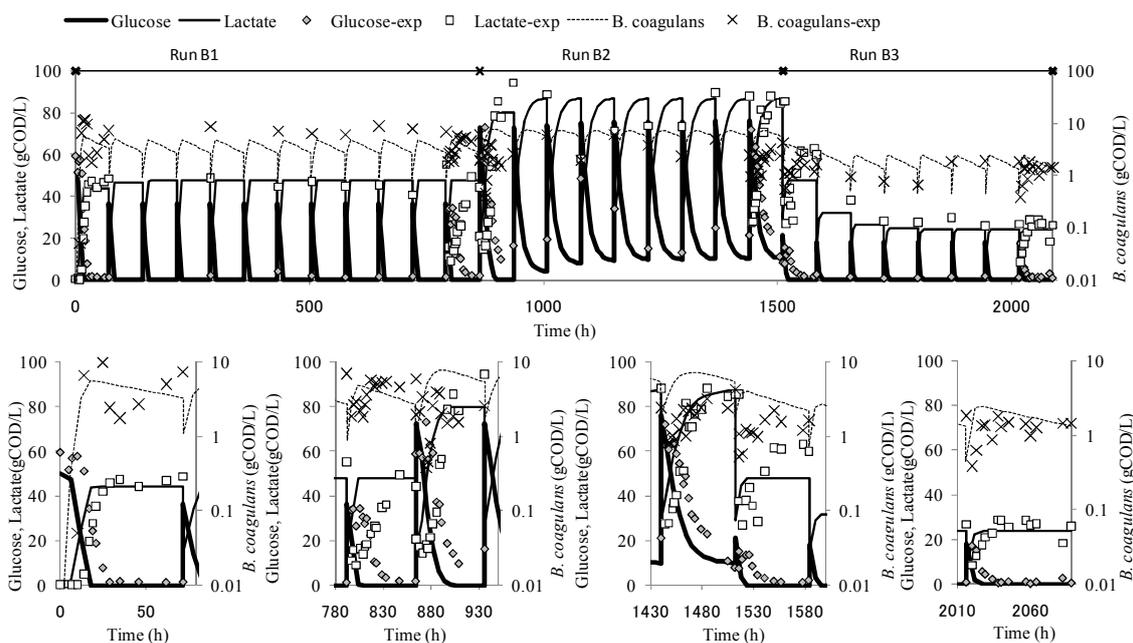
(2) リアルタイム PCR による定量と微生物重量の関係

図 6.3 に、Run A1、Run A3、Run A4、Run B1、Run B2 および Run B3 での 16S rRNA 遺伝子濃度と濁度の関係を示す。ポリペプトンおよび酵母抽出液の割合が少なかった Run A2 および初期グルコース濃度を高く設定した Run A5 の実験結果は除外している。Run A の結果 (図 6.3a) より、以下に示すとおり 16S rRNA 遺伝子濃度の変動にあわせて 5 つの相に分類した。

- 相 1 (遅滞相) : 増殖開始前の段階
- 相 2 (初期対数増殖相) : 最大増殖速度に達する前の段階
- 相 3 (対数増殖相) : 最大増殖速度に達してから増殖終了まで
- 相 4 (定常相) : 増殖終了から 6 時間まで
- 相 5 (死亡相) : 相 4 の後実験終了まで

相 1 および相 2 では、16S rRNA 遺伝子濃度の増加速度は、濁度の増加速度よりも速かった。相 3 では、濁度も 16S rRNA 遺伝子濃度もいずれを同程度の速度で増加した。相 4 では、グルコースがほとんど残存していないので、濁度は減少し始めた。相 5 では 16S rRNA 遺伝子濃度が濁度よりも速く減少した。これは、細胞そのものは、16S rRNA 遺伝子に比べて分解されにくいと考えられる。これらの結果は、よく知られた、単位体積あたりの細胞数および細胞重量の、二つの細胞増殖曲線の違いに一致しており、細胞の大きさや細胞内物質の合成は細胞重量に大きく影響を与えるものの、細胞数とは異なるので、細胞数および細胞重量は互いに単純な換算ができない(Gray, 2004)。Run A の相 3 および相 4 の結果を、Run B の結果とあわせて比較すると (図 6.3b)、互いの点は比較的一致している。Run B では、濁度および 16S rRNA 遺伝子濃度を、基質投入直前で乳酸発酵および *B. coagulans* の増

殖がほぼ完了している段階、すなわち対数増殖相の後で測定している。高い有機物負荷条件下では、より高い濁度および 16S rRNA 遺伝子濃度が得られている。濁度 (kaolin mg/L) と 16S rRNA 遺伝子濃度 (copies/L) の比率は、Run B でおおむね  $10^{-9}$  (mg/copies) 程度である。これより、16S rRNA 遺伝子濃度は、半連続運転において、異なる有機物負荷条件下で、古典的な微生物量把握指標である MLSS と同様に、微生物量を把握する指標となり得ると考えられる。



exp は実験値を、曲線は計算値を示す

図 6.4 数理モデルの計算結果

Hidaka et al. (2010a) が提示した数理モデルを、本研究の半連続式実験に当てはめた。ほとんどの定数の値は変更しなかったものの、いくつかの定数値は本研究で得られた値を用いた。阻害定数 ( $K_{ES}$ ) は 119 gCOD/L、最大蓄積乳酸濃度 ( $S_{Lmax}$ ) は 87.5 gCOD/L とした。測定した 16S rRNA 遺伝子濃度は、図 6.3b および図 6.1 に示す関係を用いて順に濁度および gCOD/L に換算した。実測値と計算値の比較は、図 6.4 に示すとおりである。上の図は、全期間の包括的な比較結果であり、下の図は同じデータを元にしたものであり、各 Run の前後で分析をより細かに行った際の部分を拡大したものである。全体を通して、グルコースの消費や乳酸の生成が、異なる有機物負荷条件下で、また条件を変更した直前直後を含めて、精度よく再現されている。B. coagulans の増殖および自己分解も同様に精度よく再現されている。16S rRNA 遺伝子濃度から gCOD/L への換算では多少の誤差が生じているものの、

全体としてはおおむね状態変数それぞれの挙動が再現されている。さらに、半連続式実験におけるリアルタイム PCR による 16S rRNA 遺伝子濃度測定の適用性が、包括的な数理モデルにより、古典的な手法と比較しながら、示されている。

### (3) 微生物群集解析から数理モデル化へ

COD は、嫌気性消化過程において保存されるため、微生物重量の収支を議論する上で、有用である。実際、IWA の ADM1 モデル(Batstone et al., 2002)でも、微生物重量は COD で議論している。しかしながら、COD、MLSS、濁度などでは、異なる微生物群集および固形性基質を区別して測定するのが難しい。Cicek et al. (2001)は、中程度の強度の人工都市下水を処理するために開発した膜分離生物処理反応器において、異なる滞留時間で gVSS あたりの酵素活性を比較したところ、劇的には変化しないことを報告している。生物学的硝化において、硝化活性測定試験は、硝化反応の結果生じる生成物である硝酸性窒素を測定する手法であり、硝酸性窒素は消費されないので、硝化細菌の定量に有用な手法である(Tsuno et al., 2002; Hidaka et al., 2003)。メタン発酵におけるメタン生成速度の測定も同様である(Angelidaki et al., 2009)。もし特定の反応を評価するのであれば、その反応に関する遺伝子濃度の測定も、評価手法としての可能性がある。Wang et al. (2008b)は、水素発酵の回分式実験において、16S rRNA 遺伝子濃度と水素生成との直接的な関係はなく、水素生成遺伝子 (*hydA*) の濃度が直接水素生成と比例していたことを報告している。16S rRNA 遺伝子濃度の結果は本研究での回分式実験と一致する一方、本研究での半連続式実験では、反応器の処理特性や微生物濃度の指標として 16S rRNA 遺伝子濃度の有用性を実証している。硝化反応に係わる *amoA* 遺伝子(Harms et al., 2003)や、マイクロシスチンの生成に係わる *mcyA* 遺伝子(Ha et al., 2011)は、環境工学における他のリアルタイム PCR 法の適用の例である。しかしながら、嫌気性有機酸発酵はより複雑な反応であり、実有機性廃棄物の有機物組成は複雑で数多くの種類の反応が連続して起こっている。全微生物濃度ですら、COD などで簡単に測定することはできない。本研究では、濁度が微生物濃度や COD と関連していることが示されたものの、濁度も同様に、固形性有機物を基質に含む系では実用上適用が難しい。

本研究では、反応器の処理特性や微生物濃度の指標として、16S rRNA 遺伝子濃度の有用性を実証している。16S rRNA 遺伝子濃度と古典的な測定方法との関係は、増殖相によって異なっていた。この相違点は、Haldane 阻害式の係数値がリアルタイム PCR での定量と、濁度や COD での定量とで異なっていたことから説明できる。これは、リアルタイム PCR での相 1 および相 2 の測定結果が、Haldane 阻害式の係数値を求める際に含まれていたからである。しかしながら、対数増殖相以降のリアルタイム PCR の測定値と濁度の関係が明確

であったことは、半連続式実験で、異なる有機物負荷条件下を 16S rRNA 遺伝子濃度が反映していたことを説明している。Furet et al. (2004) は、乳酸発酵における対数増殖相の後期での乳酸細菌の定量について、PCR による定量手法が、colony forming units (CFU) よりも正確であると結論づけている。回分式実験では、16S rRNA 遺伝子濃度と微生物濃度の関係が増殖相によって異なるものの、連続運転条件下における定常状態では、この効果はそれほど影響せず、リアルタイム PCR による 16S rRNA 遺伝子濃度の定量手法は微生物濃度の把握に適用可能である。実際、16S rRNA 遺伝子濃度は、半連続式実験での数理モデルの検討でもその適用性が示された。

乳酸および水素の両発酵を含む系では、少なくとも 2 種類以上の微生物群を把握する必要がある、リアルタイム PCR 法の複雑な有機物を対象とした嫌気性有機酸発酵への適用性が示されている(Hidaka et al., 2010b)。ただし、古典的な微生物濃度測定との比較は十分に評価されているとはいえない。Ramirez et al. (2009) は、ADM1 モデルを拡張し、複数の微生物種を各反応に当てはめ、それぞれの動学的定数值も微生物種によってランダムに与えることを提案しているものの、特定の微生物種に対応しているわけではない。実施設の運転においては、投入基質の組成が日々変動し、処理特性や微生物群集も常に変化し続ける(Cheon et al., 2008)。本研究で提示しているリアルタイム PCR の手法は、微生物の生死を区別できないものの、この欠点は古典的な微生物濃度測定方法でも同じである。本手法の古典的手法に対する長所は、特定の微生物種に対応したプライマーを設計することで生死を区別するよりも簡単に適用でき、実施設の現場での酸発酵において異なる微生物群集を管理するのに有用である点である。

## 6-5 まとめ

反応器の処理特性や微生物濃度の指標として、16S rRNA 遺伝子濃度の有用性を実証した。本研究で提示しているリアルタイム PCR の手法は、微生物の生死を区別できないものの、この欠点は古典的な微生物濃度測定方法でも同じである。本手法の古典的手法に対する長所は、特定の微生物種に対応したプライマーを設計することで、生死を区別するよりも簡単に適用でき、実施設の現場での有機酸発酵において異なる微生物群集を管理するのに有用であると考えられる。

### 【第 6 章参考文献】

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

- Res. 41: 2636-2642.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J. B. (2009) Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* 59: 927-934.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H., Vavilin, V. A. (2002) *Anaerobic Digestion Model No.1*. International Water Association (IWA), Publishing, London, UK.
- Burgos-Rubio, C. N., Okos, M. R., Wankat, P. C. (2000) Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Prog.* 16: 305-314.
- Cheon, J., Hidaka, T., Mori, S., Koshikawa, H., Tsuno, H. (2008) Applicability of random cloning method to analyze microbial community in full-scale anaerobic digesters. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 134-140.
- Cicek, N., Macomber, J., Davel, J., Suidan, M. T., Audic, J., Genestet, P. (2001) Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bioreactor. *Water Sci. Technol.* 43(11): 43-50.
- Furet, J., Quénee, P., Tailliez, P. (2004) Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 97(2): 197-207.
- Gray, N. F. (2004) *Biology of Wastewater Treatment*, 2<sup>nd</sup> ed., Imperial College Press, London.
- Ha, J. H., Hidaka, T., Tsuno, H. (2011) Analysis of factors affecting the ratio of microcystin to chlorophyll-a in cyanobacterial blooms using real-time polymerase chain reaction. *Environmental Toxicology* 26: 21-28.
- Haldane, J. B. S. (1930) *Enzymes*. Longmans, London
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G., Sayler, G. S. (2003) Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 37: 343-351.
- Hidaka, T., Horie, T., Akao, S., Tsuno, H. (2010a) Kinetic model of thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification. *Water Res.* 44: 2554-2562.
- Hidaka, T., Asahira, T., Koshikawa, H., Cheon, J., Park, Y., Tsuno, H. (2010b) Effect of microbial composition on thermophilic acid fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 47: 127-133.
- Hidaka, T., Tsuno, H., Kishimoto, N. (2003) Advanced treatment of sewage by pre-coagulation and biological filtration process. *Water Res.* 37: 4259-4269.

- Kobayashi, T., Yasuda, D., Li, Y., Kubota, K., Harada, H., Yu, H. (2009) Characterization of start-up performance and archaeal community shifts during anaerobic self-degradation of waste-activated sludge. *Bioresour. Technol.* 100: 4981-4988.
- Lin, J. Q., Lee, S. M., Koo, Y. M. (2004) Modeling and simulation of lactic acid fermentation with inhibition effects of lactic acid and glucose. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 52-58.
- Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I., Nurk, A. (2006) L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 861-867.
- Payot, T., Chemaly, Z., Fick, M. (1999) Lactic acid production by *Bacillus coagulans*—kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 191-199.
- Tsuno, H., Hidaka, T., Nishimura, F. (2002) A simple biofilm model of bacterial competition for attached surface. *Water Res.* 36: 996-1006.
- Wang, M. Y., Olson, B. H., Chang, J. S. (2008a) Relationship among growth parameters for *Clostridium butyricum*, *hydA* gene expression, and biohydrogen production in a sucrose-supplemented batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 525-532.
- Wang, M., Tsai, Y., Olson, B. H., Chang, J. (2008b) Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *Int J Hydrogen Energy* 33: 4730-4738.
- Ramirez, I., Volcke, E. I. P., Rajinikanth, R., Steyer, J. (2009) Modeling microbial diversity in anaerobic digestion through an extended ADM1 model. *Water Res.* 43: 2787-2800.

## 第7章 結論

本研究では、有機性廃棄物を対象とした有機酸発酵技術として、生ごみや米の *B. coagulans* による乳酸発酵を中心に、でんぷんの糖化の観点を含めて高効率化の検討および反応機構の解析を試みた。

第2章では、単純基質にて基礎的な知見を得るために、グルコースおよび溶性でんぷんを用いた回分式実験を異なる条件下で行った。その結果、温度 55°C および 45°C、pH 5.5、栄養塩添加の条件下で、 $\alpha$ -アミラーゼ生成の能力が高く、糖化および有機酸生成の効率が高いことが示された。

第3章では、生ごみを対象として、発酵の途中で温度や pH 条件を変更する二段式発酵、および糖化効率の高い発酵液を添加する二系列発酵による高効率化の検討を行った。二段式発酵では、 $\alpha$ -アミラーゼの利用やでんぷん分解に適している菌を利用することにより、でんぷんの分解率を向上させることはできる可能性があり、および生成有機酸種が変化すると考えられた。二系列発酵では、他菌の産出した  $\alpha$ -アミラーゼを利用することで、高効率化が可能であることが示された。

第4章では、でんぷんの糖化効率に焦点を置いた検討を行うため、また主食用ではない新規需要米を意図して、米を基質として有機酸発酵の適用を検討した。米に含まれるでんぷんの糖化および有機酸発酵は、生ごみを添加すること、もしくは長期間の馴致を行うことで向上することが示された。パイロシーケンス法による微生物群集解析で、従来のランダムクローニング法よりも詳細な微生物群集解析が基質条件や生成有機酸の違いとともに示された。でんぷんの糖化率は *Clostridia* が含まれる水素発酵条件下で高く、乳酸発酵には *B. coagulans* が係わっている可能性が示された。生ごみが多い条件下では、*Aneurinibacillus thermoaerophilus* が検出された。

第5章では、有機性廃棄物を原料とする高温有機酸発酵において糖化を担う菌種を推定することを目的に、生ごみの糖化から有機酸発酵に至る過程の菌叢変化を観察した。また、*B. coagulans* によるでんぷん分解における培養条件の検討も行った。でんぷんの糖化は発酵初期に起こること、アミラーゼ活性も発酵初期が高いことを確認した。*A. thermoaerophilus* の相対的な増加を観察したことから、高温有機酸発酵槽内で同菌種がでんぷんの糖化を担っている可能性が示唆された。

第6章では、実験的に得られた成果を一般化して議論するための手段として、数理モデルを活用するために、リアルタイム PCR の適用性を異なる増殖相における有機酸発酵の観

点から評価した。その結果、発酵特性や微生物濃度の指標として、16S rRNA 遺伝子濃度の有用性を実証した。本手法の古典的手法に対する長所は、特定の微生物種に対応したプライマーを設計することで、生死を区別するよりも簡単に適用でき、実施設の現場での有機酸発酵において異なる微生物群集を管理するのに有用であると考えられた。

以上により、温度や pH 条件を適切に組み合わせることで、糖化効率や有機酸生成効率を向上でき、糖化に関わる酵素の解析や反応に関わる微生物群集の遺伝子解析によりその反応機構を示し、遺伝子定量技術と数理モデルを組み合わせることで現場の運転を一般化して議論する手法を提示した。生ごみなどの有機性廃棄物は、雑多な菌が含まれている点や含水率が高い点から、発酵による利活用が有用な手段である。バイオマス利活用が推進されている中、得られた成果は、有機性廃棄物の利活用において、効率化・安定化を進めるための知見となる。また非主食用である新規需要米活用を促進する技術開発にもつながることが期待できる。

## 謝辞

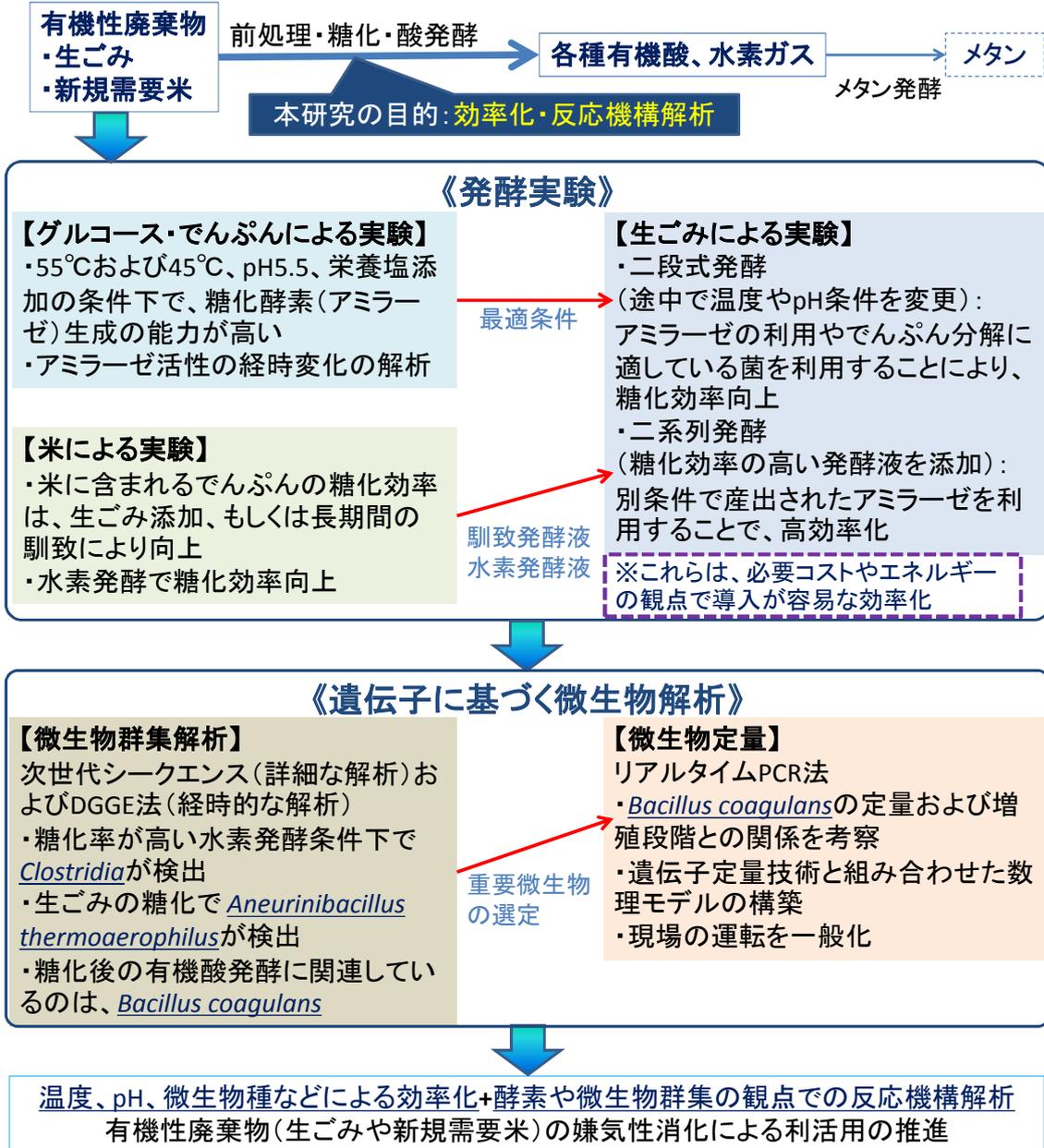
本研究を遂行するにあたり、京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻技術職員の楠田育成氏、ならびに京都大学、大阪産業大学および鳥取大学の学生・大学院生の皆様にも大変お世話になりました。ここに記して、深く感謝の意を表します。

## 研究発表

- T. Hidaka, Y. Kosaka, H. Yagi, Y. Kusuda, F. Nishimura, H. Tsuno : Bacterial competition for thermophilic L-lactate and hydrogen fermentation from glucose, 7th International Conference on Environmental Anaerobic Technologies and Bioenergy, pp.89-99, Tianjin, China, November 12-13, 2011. (Invited Speaker)
- Taira Hidaka, Hiroshi Tsuno, Haruka Yagi, Yusuke Kosaka : Fundamental analysis of real-time PCR quantification and modeling for thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* from glucose, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vol.17, No.2, pp.290-297, 2012. (査読有)
- 日高 平, 津野 洋, 向阪悠佑, 八木春香, 西村文武 : 有機酸発酵における微生物群集解析およびモデル化, 第15回日本水環境学会シンポジウム講演集, p.75, 2012.
- 西村文武, 篠本知沙, 水野忠雄, 日高 平, 津野 洋 : 生ごみおよび多収穫米を原料とした高温L-乳酸発酵における多糖利用の効率化に関する研究, *環境衛生工学研究*, 第27巻第3号, pp.107-110, 2013.

K112005 有機性廃棄物からの高効率有機酸発酵技術の  
開発および反応機構解析  
(研究代表者)土木研究所 主任研究員 日高 平

有機性廃棄物(バイオマス)の嫌気性消化技術が循環型社会形成のために有望  
 ・有機酸として回収:マテリアル利用  
 ・メタンや水素ガスとして回収:エネルギー利用



## 英文概要

・ 研究課題名 = 「Development and analysis of reaction mechanisms of efficient organic acid fermentation technology from organic waste」

・ 研究代表者名及び所属 = Taira HIDAKA (Public Works Research Institute)

・ 共同研究名及び所属 = Fumitake NISHIMURA (Kyoto University), Hiroshi TSUNO (Osaka Sangyo University), Satoshi AKAO (Tottori University)

・ 要旨 = Organic acid fermentation is a promising technology to utilize organic wastes. Kitchen garbage (KG) and rice produced for non-food purposes can be utilized by fermentation. The objectives were to develop efficient organic acid fermentation and to analyze its reaction mechanisms. Batch and semi-continuous fermentation experiments were compared under different operating conditions using glucose, starch, KG and rice as a substrate to investigate the effect of microbial communities and adaptation on saccharification and acid fermentation. Microbial communities were analyzed also in much greater depth using pyro-sequencing than by conventional random cloning. The different pH and temperature conditions affected amylase activity. The starch degradation performance was superior under the hydrogen fermentation condition by *Clostridia*. *Bacillus coagulans* possibly contributed to lactate production from glucose, and other bacterial species also possibly contributed to the degradation of starch included in KG and rice to glucose. Reactor performance and biomass concentrations were assessed by real-time polymerase chain reaction quantification of 16S rRNA genes, and the mathematical model was developed to evaluate the reactor operation practically. These results are useful to develop more efficient and stable organic acid fermentation processes.

・ キーワード = organic waste, organic acid fermentation, saccharification, microbial community, real time PCR