

第2章 グルコースを基質とした乳酸発酵

2-1 概説

本章では、グルコースを基質とした乳酸発酵実験を行い、乳酸阻害、基質阻害、NaCl 阻害、最大乳酸濃度などの影響を調べるとともに、real-time PCR により微生物の定量も試み、これらの結果を数理モデルに統合することを試みた。

2-2 乳酸発酵

乳酸菌とは、グラム陽性、カタラーゼ陰性で内生孢子を作らず、一般的に運動性を持たない細菌群で、消費したグルコース量に対して 50%以上の乳酸を生産するという特徴を持つ（細野・岡田, 2002）。乳酸の生成は以下の式で表される。



(2.1)式では、1モルのグルコースから2モルの乳酸が生成され、(2.2)式では1モルのグルコースから1モルの乳酸が生成される。このため、発酵法による乳酸の生成量は、消費したグルコース量に対して50%以上となる。乳酸発酵微生物が作る乳酸はL型とD型の光学異性体、さらに両異性体が均等に混じったDL(ラセミ)型がある。培養条件などで乳酸発酵微生物が異性体を作り分けることはなく、各微生物につき何れかの1つのタイプの乳酸を生成する（細野・岡田, 2002）。乳酸発酵微生物が生育に要求する栄養素は、糖類、アミノ酸類、ビタミン類およびミネラルで、不飽和脂肪酸を必要とする菌群もあり、人間に近い栄養要求をしている。

乳酸発酵微生物は一般的に25°Cから37°Cの範囲でよく生育し、至適温度は菌群の種類によって異なっている。至適pHは、一般的に5.0から8.0の範囲とされており、菌群の種類によって異なる（細野・岡田, 2002）。代表的な乳酸菌として *Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus* 属などがある。その他の乳酸発酵微生物としては、*Bacillus* 属の *B.coagulans* や *Sporolactobacillus* 属などが挙げられる（園元・石崎, 2001）。これらは形態や生理的特徴が乳酸菌に類似していて、内生孢子を形成するため、有孢子乳酸菌と呼ばれている。Akao ら（2007a ; 2007b）は非滅菌模擬生ごみから、糖化などの過程を経ずに、直接、高光学純度のL-乳酸を製造することに成功した。さらに、この一段式の方法は乳酸発酵微生物の植種をせず、温度とpHをある条件に設定することのみで、自然に有孢子乳酸菌である *B.coagulans* が優占化することを発見した。*B.coagulans* は至適pHが6~6.5、至適温度が50°C付近のL-乳酸生成微生物である（Chemaly・Fick, 1999）。また、この菌を用いて、さらに効率良くL-乳酸発酵を行うことができるpHと温度条件を提示して

いる。以上より、非滅菌生ごみから、一段式発酵法で滅菌せず比較的容易に高光学純度の L-乳酸を製造できる技術の開発がなされており、工業的に生産できる可能性が示されている。

乳酸菌などの嫌気性菌は、発酵時に電子受容体としての代謝生産物の蓄積を伴い、これが生産物阻害を引き起こし、発酵速度の著しい減衰を招き、その結果、発酵プロセスは効率の悪いものに留まってしまう。また、複雑な栄養要求性の問題もあって、工業化する上で培地開発を困難にしている(石崎, 2000)。しかし、未来型バイオプロセスを考える場合、嫌気性菌を制御する方法を生み出すことが非常に重要となってくる。そのためには、発酵を動力学的に解析し、数学的モデルを構築する必要がある。グルコースが嫌氣的に分解され、1分子のグルコースから2分子のピルビン酸(または乳酸)を生じ、2分子の ATP が得られる過程で、たくさんの酵素が関与している。この酵素を変性により失活させるのではなく、酵素分子中の特定の部位に結合して反応速度を低下させる阻害剤がある。特に、可逆的に結合する阻害剤を可逆的阻害剤と呼び、その阻害形式は、通常、拮抗型(competitive inhibition)、不拮抗型(uncompetitive inhibition)、非拮抗型(noncompetitive inhibition)および混合型の4つに大別される。その模式図を図 2.1 に示す。(a)の拮抗型では、阻害剤と基質が結合する酵素分子中の部位が同じであり、両者が結合部位を奪い合うため、阻害剤は ES 複合体に、基質は EI 複合体に結合することができない。(b)の不拮抗型では、酵素分子中には基質と阻害剤に対する2つの結合部位が存在し、阻害剤は ES 複合体に結合して ESI 複合体を形成するが、遊離酵素とは結合しない。(c)の非拮抗型にも、酵素分子中に基質と阻害剤に対する2つの結合部位が存在する。阻害剤は E に対しても ES に対しても結合し、また基質は E に対しても EI に対しても結合する。混合型では、阻害剤と基質の遊離酵素への結合の仕方は非拮抗型と同じだが、解離定数が一般的に異なる。Ohara ら(1992)は *Streptococcus faecalis* による乳酸発酵の動力学的解析を行っており、その阻害形式は非拮抗阻害としているのに対し、Ishizaki・Ohta(1989)は、*Streptococcus* sp.IO-1 による乳酸発酵の阻害形式を不拮抗阻害として解析している。また、指数型で表現している例もある(Nandasana and Kumar, 2008)。このように、生成物である乳酸の阻害形式について明確な提言をしているものはないため、それを特定することが重要である。

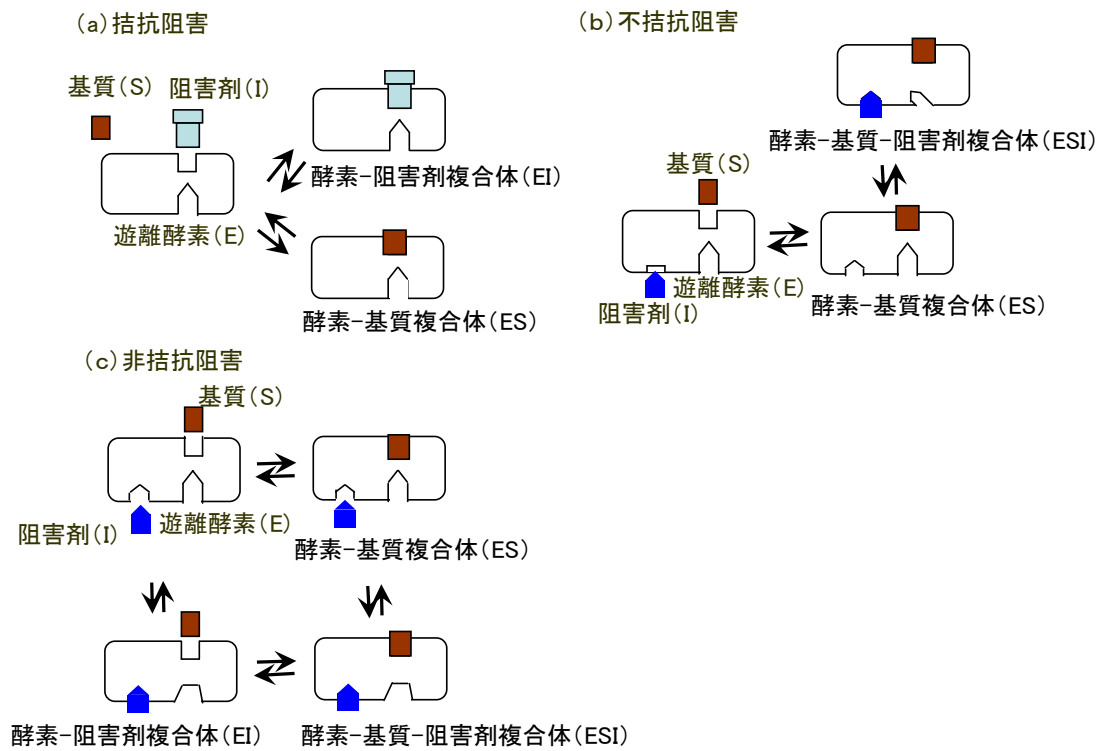


図 2.1 阻害型の模式図

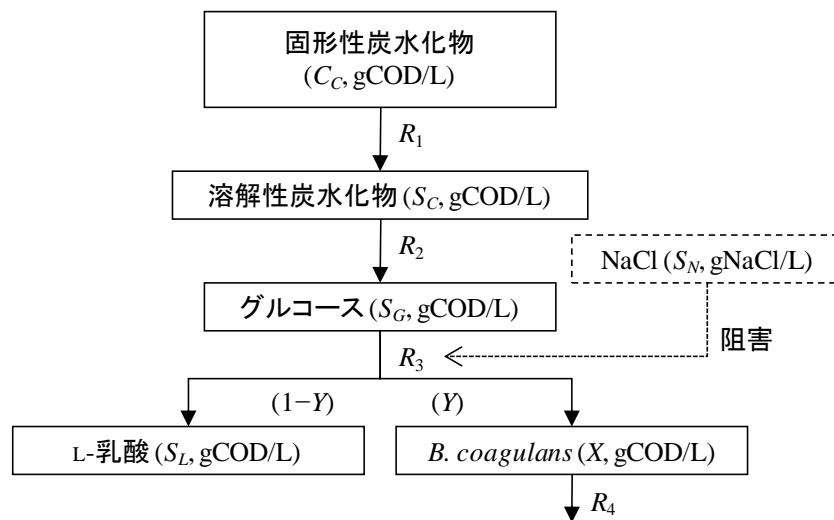


図 2.2 数理モデルの概念

表 2.1 各反応の速度表現

(反応速度)

固形性炭水化物の可溶化 (gCOD/(L·hr)):

$$R_1 = k_1 \cdot \frac{C_c/X}{K_{C_c} + C_c/X} \cdot X$$

溶解性炭水化物の加水分解 (gCOD/(L·hr)): $R_2 = k_2 \cdot \frac{S_c}{K_{S_c} + S_c} \cdot X$

乳酸発酵 (gCOD/(L·hr)):

$$R_3 = k_3 \cdot \frac{S_G}{K_{S_G} + S_G \cdot \left(1 + \frac{S_G}{K_{ES}}\right)} \cdot \frac{K_{EI}}{K_{EI} + S_L} \cdot \frac{K_{EIN}}{K_{EIN} + S_N} \cdot \left(1 - \frac{\max(0, S_L - S_{Lct})}{S_{Lmax} - S_{Lct}}\right) \cdot X$$

自己分解 (gCOD/(L·hr)): $R_4 = k_4 \cdot X$

(物質収支)

$$\frac{dC_c}{dt} = -R_1$$

$$\frac{dS_c}{dt} = R_1 - R_2$$

$$\frac{dS_G}{dt} = R_2 - R_3$$

$$\frac{dS_L}{dt} = (1 - Y) \cdot R_3$$

$$\frac{dX}{dt} = Y \cdot R_3 - R_4$$

k_1 , R_1 の反応速度定数(gCOD/(gCOD·hr)); k_2 , R_2 の反応速度定数(gCOD/(gCOD·hr)); k_3 , R_3 の反応速度定数(gCOD/(gCOD·hr)); k_4 , R_4 の反応速度定数(1/hr); K_{C_c} , R_1 の半飽和定数(gCOD/L); K_{S_c} , R_2 の半飽和定数(gCOD/L); K_{S_G} , R_3 の半飽和定数(gCOD/L); K_{ES} , R_3 のグルコースに関する阻害定数(gCOD/L); K_{EI} , R_3 (gCOD/L); K_{EIN} の乳酸に関する阻害定数, R_3 の NaCl に関する阻害定数(gNaCl/L); S_{Lct} , 乳酸阻害開始濃度 (gCOD/L); S_{Lmax} , 最大乳

酸濃度 (gCOD/L); Y , R_3 の菌体収率(gCOD/gCOD)

(R_1 および R_2 は、今後の研究展開にあわせたものであり、本報告では用いていない)

2.3 数理モデルの構築

数理モデルの概念を図 2.1 に示す。考慮した状態変数は、固形性炭水化物、グルコースを除く溶解性炭水化物、グルコース、L-乳酸、および *B. coagulans* (gCOD/L) である。各反応の速度表現は、表 2.1 に示すとおりである。組み込んだ反応は、固形性炭水化物の可溶化 (R_1)、溶解性炭水化物の加水分解 (R_2)、*B. coagulans* の増殖にともなう乳酸生成 (R_3)、および *B. coagulans* の自己分解 (R_4) である。各反応は、反応速度定数、影響関数および関連する微生物濃度の積で表した。固形性炭水化物の可溶化 (R_1) は通常 1 次式か Contois 式(Contois, 1959)で表される。本研究では、回分式実験開始時の微生物濃度が低く、培養を開始してからある程度の時間が経過した後に、グルコースの分解が加速されるので、Contois 式を用いた。溶解性炭水化物の加水分解 (R_2) は、一般的な Michaelis-Menten 形式で表した。*B. coagulans* の増殖にともなう乳酸生成 (R_3) は、基質であるグルコース、生成物である乳酸、および NaCl の阻害を受けることが知られている。本研究では、得られた実験結果に基づいて、非拮抗型とした。さらに、乳酸がある濃度に達すると乳酸生成が停止すること (Akao et al., 2007b) を反映するために、最大乳酸濃度(S_{Lmax}) 乳酸阻害開始濃度 (S_{Lct}) を設定し、反応式 R_3 の算出に組み込んだ。これは、Boonmee et al. (2003)と同様の形式である。乳酸やその他の有機酸生成にともない、培養液の pH は低下するものの、本研究では基本的に pH を制御した発酵を行ったので、解離/非解離有機酸の影響は、有機酸濃度のみによるものとして扱った。グルコースによる阻害は、典型的な基質阻害なので、Haldane 式 (Haldane, 1930) を用いた。NaCl による阻害は、非拮抗型とした (Kargi and Dincer, 1999)。自己分解は、ADM1 (Batstone et al., 2002)と同様の微生物濃度に対する一次式とした。各状態変数の物質収支は、各反応速度により表した。

2.4 実験方法

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 2.2 に示す組成の種培地に、京都大学水環境工学研究室で行われてきた模擬生ごみの L-乳酸発酵液 (津野ら, 2007) 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。この植種材料の L-乳酸濃度は 28.1 g/L、OP は 100% であり、*B. coagulans* の 16S rRNA 遺伝子濃度は、 8.81×10^9 copies/L であった。16SrRNA 遺伝子を標的とした微生物群集解析を行ったところ、分析したクローンすべてが、平均相同性 99% で *B. coagulans* に類似しており、種

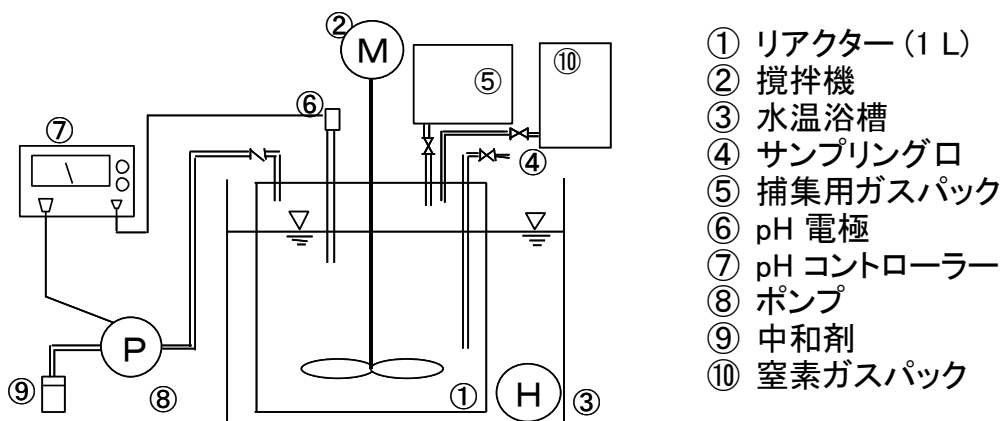
培地がほぼ *B.coagulans* で優占化されていると判断できた。この植種材料を、発酵開始時に 10 mL 添加した。

本実験に用いた装置の概略図を図 2.3 に示す。リアクターとして容積 1L 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 340rpm で攪拌した。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 2L 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、発酵液をサンプリング口から毎回 5 mL 程度採取した。

実験条件を表 2.3 および 2.4 にまとめて示す。回分式実験(Run 1– Run 6)および連続式実験(Run 7)を行った。発酵温度は 55°C に制御し、pH は、NH₄OH により 5.5 に制御した。Run 1 は再現性の確認のため 2 回行った。(Run 1a および 1b)。基質はグルコースとし、Run により乳酸および NaCl を最初から添加した。連続式実験では 3 日おきにリアクターから発酵液を 2/3L 抜いた後に基質を 2/3L 投入するという操作を行った。人工培地には、Ohara (1992) ら、Ishizaki (1989) らの培地条件を参考に、栄養源としてポリペプトン (和光純薬、一級) と Yeast extract (日本製薬、D-3) を用い、グルコース濃度 : ポリペプトン濃度 : Yeast extract = 10 : 1 : 1 とした。

表 2.2 植種材料の性状

グルコース	和光純薬 1級	20g/L
Yeast extract	日本製薬 D-3	2.5g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	和光純薬 1級	0.25g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	和光純薬 1級	0.05g/L
MnSO ₄ ·4H ₂ O	和光純薬 1級	0.01g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	和光純薬 1級	0.01g/L
L-乳酸	和光純薬 特級	10g/L



- ① リアクター (1 L)
- ② 攪拌機
- ③ 水温浴槽
- ④ サンプルングロ
- ⑤ 捕集用ガスパック
- ⑥ pH 電極
- ⑦ pH コントローラー
- ⑧ ポンプ
- ⑨ 中和剤
- ⑩ 窒素ガスパック

図 2.3 実験装置

表 2.3 回分式実験条件

Run		1a	1b	2	3	4	5	6
グルコース	(g/L)	10	10	10	10	50	50	100
乳酸	(g/L)	-	-	20	-	-	6	-
NaCl	(g/L)	-	-	-	20	-	-	-

表 2.4 連続式実験条件

Run		7a	7b	7c
経過日数	(h)	0-864	865-1512	1513-2088
基質のグルコース濃度	(g/d)	50	100	25
OLR	(g/(L·d))	11.1	22.2	5.55

有機酸は HPLC (有機酸分析システム, Shima-pack SCR-102H, 島津製作所)により、DL-乳酸は HPLC (SUMICHIRAL OA-5000 (40°C), UV (254 nm), 島津製作所)により分析した。ここで「T-」は全、「S-」は溶解性を表し、溶解性の試料は孔径 0.45 μ m のフィルターにてろ過した。乳酸の光学純度は、従来は旋光度計により求めていたが、現在では D, L-乳酸の絶対量を求め、その存在量から算出することが主流である。本研究でも、HPLC により D, L-乳酸の絶対量を求めたことから、次式により光学純度 (OP) を求めた。

$$(OP) = \frac{|(L\text{-乳酸}) - (D\text{-乳酸})|}{|(L\text{-乳酸}) + (D\text{-乳酸})|} \times 100(\%) \quad (2.1)$$

乳酸収率は、ホモ発酵において理論上グルコース 1 g から乳酸 1 g が生成される（金子, 1996）ことに基づき、実験開始時の糖質濃度に対して以下の式で計算した。

$$(\text{乳酸収率}) = \frac{(\text{発酵液中の乳酸濃度})}{(\text{発酵液中の糖質濃度})} (-) \quad (2.2)$$

炭水化物はフェノール硫酸法(Dubois ら, 1956)により測定した。発生ガスとして、二酸化炭素およびメタンは CGT-7000 (島津製作所)により測定した。COD は、Standard Method (APHA, 1995)により測定した。濁度は透過光測定法により分析した。

2.5 微生物解析方法

反応器内の微生物群集の解析を、千ら (2007) および Cheon ら (2008) と同様のランダムクローニング法で試みた。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。電気泳動により抽出 DNA を確認した後、それを鋳型 DNA として PCR を行った (PTC-200, MJ research)。PCR は、TaKaRa の premix taq 酵素、ならびに大半の真正細菌・真核細菌・古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とする Univ.519F-Univ.1406R プライマー (Lane, 1991) を用いた。PCR 条件は、94°C×4 分 + (94°C×1 分 + 60°C×1 分 + 72°C×1 分) ×30 サイクル + 72°C×10 分とし、900 bp の目的バンドを確認した。回収・精製後、TA-cloning を行い、シーケンス解析 (Univ.519F プライマー) を行った。シーケンス解析は、タカラバイオのジェノミクスセンターのシーケンシングサービスを利用した。得られたデータは、ほとんどシーケンス長 600~700bp 程度であり、相同性検索プログラム (BLAST ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) により解析した。相同性 98% 以上で、操作的分類単位 (OTU) を分類した。

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。

2.6 回分式実験の結果および数理モデル

図 2.4 に、Run 1a の経時変化の測定結果を示す。培養開始 4 時間後から RNA 遺伝子濃度および乳酸濃度が急速に増加し始め、同時にグルコース濃度が減少し始めた。RNA 遺伝子濃度の増加は 7 時間後に停止し、それ以降は、 1×10^{11} copies/L 程度を維持した。それに対して、乳酸濃度は 10 時間後まで増加し、グルコース濃度がほぼ 0 になった時点で停止した。最終乳酸濃度は 8.6 g/L であり、発酵中の OP はほぼ 100%であった。他の Run も含めた、実験結果のまとめを表 2.5 に示す。Run 1a および Run 1b でほぼ同じ結果が得られたので、本実験の再現性が確認できた。Run 1 および Run 2 を比較すると、最初に 20 g/L の乳酸を添加した場合には、乳酸生成が遅延していることが分かる。Run 1 および Run 4 では、初期グルコース濃度がそれぞれ 10 g/L および 50 g/L であり、乳酸生成開始時間およびグルコースからの乳酸転換率はほぼ同じである。しかしながら、Run 6 で初期グルコース濃度が 100 g/L の場合は、最終乳酸濃度が 52 g/L であり、一部のグルコースが残存した。Run 4 と比較して、乳酸生成開始も遅延していた。この最大乳酸濃度は、*B. coagulans* による乳酸生成を報告した Payot ら (1999) と同程度である。Run 3 では、NaCl を 20 g/L 最初に添加しており、Run 1 と比較して最終乳酸濃度は同程度であったものの、乳酸生成開始が遅延した。OP はいずれの場合も 98.3% 以上であった。

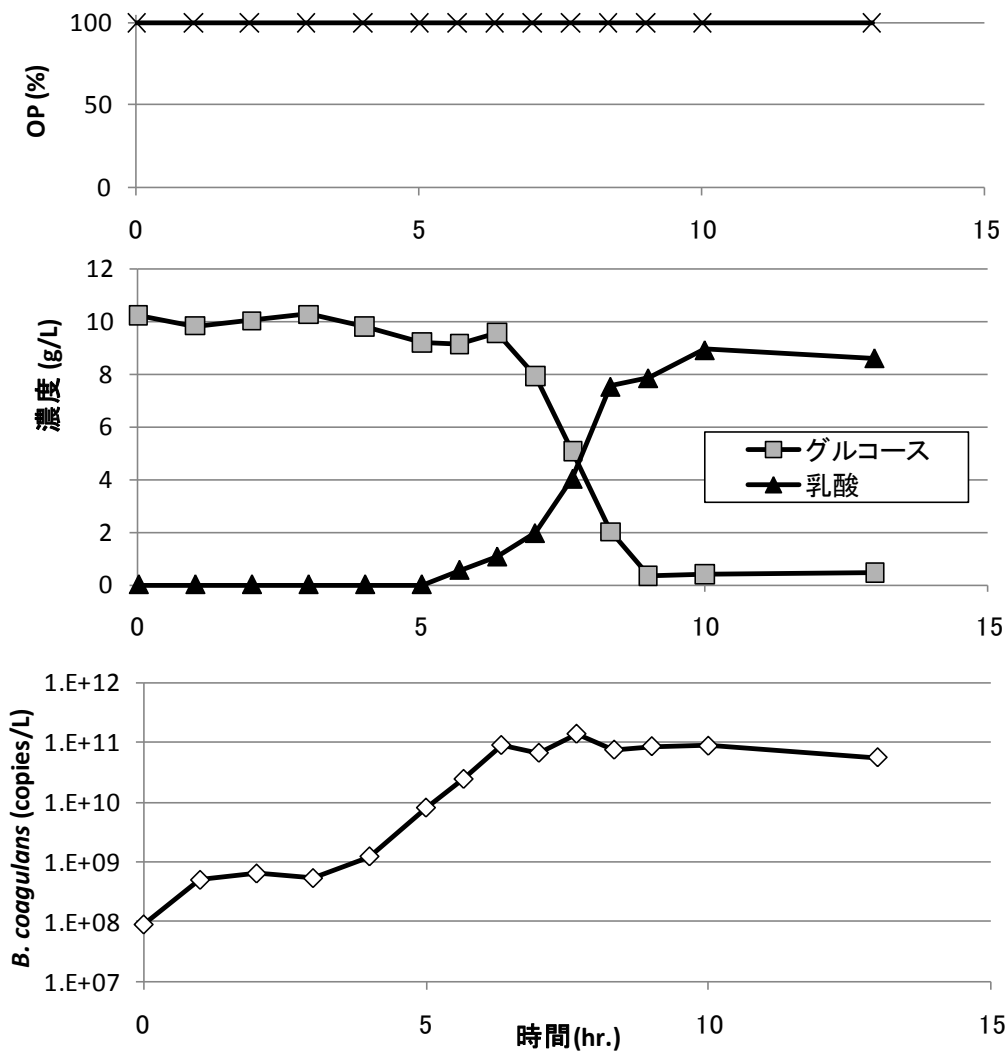


図 2.4 Run 1a の経時変化の測定結果

表 2.5 Run 1~6 の結果

Run		1a	1b	2	3	4	5	6
発酵開始時間	(h)	6	6	20	11	6	7	9
最終乳酸濃度	(g/L)	8.6	9.3	29	9.3	45	48	52
乳酸転換率	(-)	0.86	0.93	0.74	0.89	0.90	0.84	0.52
OP	(%)	100	100	100	100	100	100	98.3

表 2.6 数理モデルの計算で用いた値

parameter	value
k_3	12.8 (gCOD/(gCOD·hr))
k_4	0.01 (1/hr)
K_{S_G}	3.1 (gCOD/L)
K_{ES}	180 (gCOD/L)
K_{EI}	5.11 (gCOD/L)
K_{EIN}	30 (gNaCl/L)
S_{Lct}	40 (gCOD/L)
S_{Lmax}	56 (gCOD/L)
Y	0.12 (gCOD/gCOD)

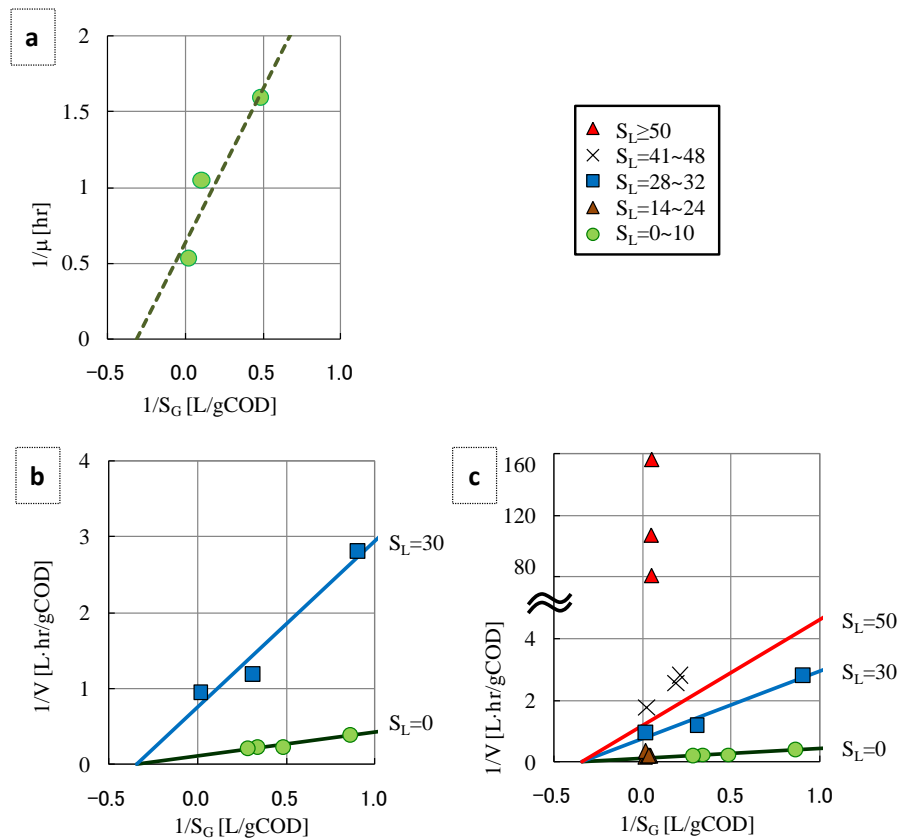


図 2.5 Lineweaver-Burk plots

数理モデルの計算で用いた値を表 2.6 に示す。すべての値は実験により求めたものである。

炭水化物からの乳酸生成割合(1-Y)は、初期グルコース濃度の阻害がなくほとんどのグルコースが乳酸に転換した Run 1、Run 4 および Run 5 の平均値として 0.88 (gCOD/gCOD)とした。いくつかの値は、Lineweaver-Burk plots により求めた (図 2.5)。ここでは、分析が問題なく行えた二つのサンプリング間で増加した微生物濃度の自然対数をその間の時間で除することで、比増殖速度(μ)を、減少したグルコース濃度をその間の時間で除することでグルコース消費速度(V)を算出した。乳酸生成に関する反応速度(k_3)および半飽和定数(K_{SG})は、乳酸濃度(S_L)が 0~10 gCOD/L の時のデータにより、乳酸による阻害がないとして求めた(図 2.5a)。最大比増殖速度は、1.54(1/h)であり、それを Y (= 0.12)で除して k_3 を算出した。 k_3 は 12.8(gCOD/gCOD-hr)、 K_{SG} は 3.1 (gCOD/L)であった。既往文献での報告値は、発行条件により異なるものの、本研究で求めた値は、既往文献で報告されている値の範囲内である (Payot et al., 1999; Burgos-Rubio et al., 2000; Skiadas et al., 2000; Nandasana and Kumar, 2008)。生成乳酸による乳酸発酵への阻害も Lineweaver-Burk plot で検討した (図 2.5b)。ここで、グルコース濃度(S_G)および乳酸濃度(S_L)いずれも 10 gCOD/L 以下の時は阻害影響がなく、乳酸濃度が 28~32 gCOD/L の時、一定の阻害影響があると考えた。 $S_L = 0$ gCOD/L および $S_L = 30$ gCOD/L の場合の直線は、X 軸上で交わったので、非拮抗阻害であると判断した。そして、乳酸阻害についての半飽和定数(K_{EI})は 5.11 gCOD/L と算出された。この値は、Ohara ら (1992) が報告した 5.9~12 gCOD/L に近い。乳酸濃度が 40 gCOD/L 以上の時は、実測値の V^{-1} の値が、これらの値から非拮抗阻害の式により算出されるよりも高かった (図 2.5c)。これは、乳酸濃度が 40 gCOD/L 以上の時に、さらに乳酸生成が阻害されることを意味している。Run 6 では、乳酸濃度が 56 gCOD/L を超えると、一部のグルコースが残存していたにもかかわらず乳酸生成が停止した。これらより、蓄積乳酸による二つの値、 S_{Lct} および S_{Lmax} をそれぞれ 40 gCOD/L および 56 gCOD/L と定めた。これらの値は、30°Cでの *Lactococcus lactis* NZ133 について報告した Boonmee ら (2003)と同程度である。グルコースによる阻害は、Haldane 式(Haldane, 1930)を用いた。Run 4~Run 6 でグルコース濃度が 13~62 gCOD/L の範囲内で、最大グルコース消費速度はグルコース濃度(S_{Gmax})が 23.2 gCOD/L の時に得られた。阻害定数(K_{ES})は、 $S_{Gmax} = (K_{SG} \cdot K_{ES})^{1/2}$ の関係より 180 gCOD/L と求めた。この値は、Burgos-Rubio ら (2000)による報告値である、127 gCOD/L に近い。NaCl についての阻害定数(K_{EIN})は、Run 3 による実験結果から 30 gNaCl/L と求めた。これは、Kargi・Dincer (1999)が報告した 70 gNaCl/L に近い値である。*B. coagulans* の自己分解速度定数 (k_4)は、ADM1 (Batstone ら, 2002) や Biazar ら(2003)を参考に、0.01 (1/h)とした。

増殖した微生物濃度と real-time PCR の測定結果の関係を図 2.6 に示す。増加した微生物濃度は、発酵開始から減少したグルコース濃度に *B. coagulans* の収率(0.12 gCOD/gCOD-除

去)を乗じることで算出した。これらの二つの濃度の増加は、増殖段階によって同じ比ではないものの、増加傾向は一致していた。増殖段階で比が異なるのは、無菌状態での *Microcystis aeruginosa* NIES 102 の培養実験で、細胞数と real-time PCR による測定を比較した研究と同じである(Ha et al., 2009)。その比は、平均で 6.47×10^{10} copies/gCOD-バイオマスであった。本研究ではより簡単に real-time PCR による測定値を用いるために、この値を用いて COD 値に換算した。

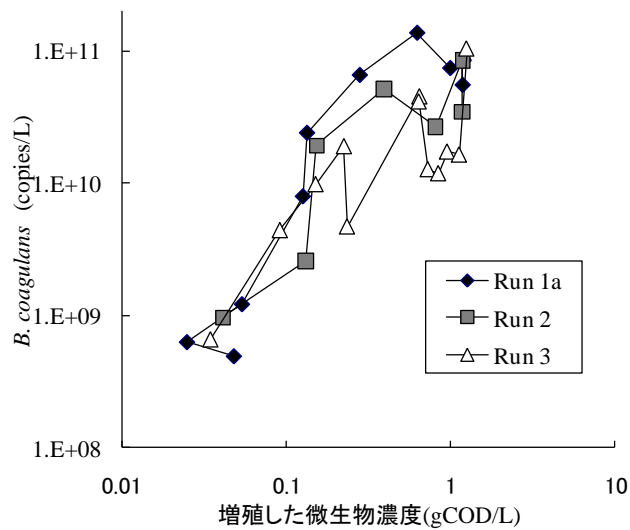


図 2.6 増殖した微生物濃度と real-time PCR の測定結果の関係

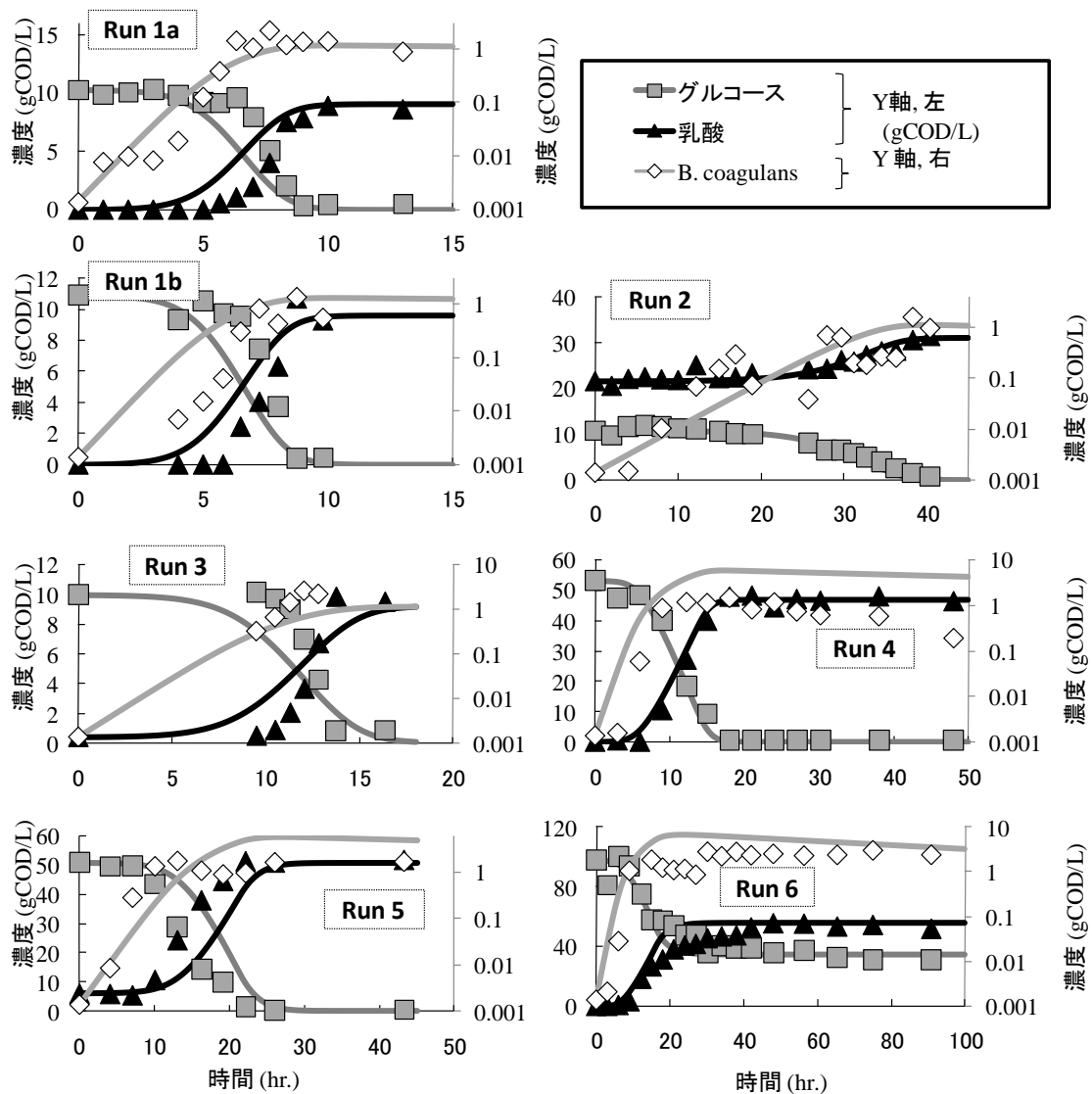


図 2.7 発酵実験結果および数理モデルによる計算結果

Run 1～ Run 6 での発酵実験結果および数理モデルによる計算結果を図 2.7 に示す。それぞれの Run で、グルコースの消費および乳酸生成について、実験結果および数理モデルによる計算結果がおおむね一致していた。Run 2 での乳酸阻害、Run 3 での NaCl 阻害、Run 6 での基質および最大乳酸濃度による阻害が再現された。指数関数的な微生物の増加や自己分解も再現できた。本研究では、発酵開始時の遅滞相は考慮せずに、実測の RNA 遺伝子濃度を初期値として入力した。そのため、微生物濃度の増殖の計算結果が、実測値より早い場合もあった。しかし、すべての Run の範囲で、グルコース消費、乳酸生成および微生物の増殖が同時に計算できた。これらの結果により、開発した数理モデルや、real-time PCR による測定が適用可能であることが示された。

2.7 連続式実験

連続式実験の結果を図 2.8 に示す。各項目の測定は 3 日おきの基質交換の直前に行った。

OLR が 11.1g/(L·day) (添加グルコース濃度 50g/L)での運転時(0~864hr)では、乳酸濃度は約 40~50g/L、光学純度は 98~100%の間を推移した。残存グルコース濃度は、1.0~4.0g/L となった。また、乳酸以外の有機酸である蟻酸と酢酸は検出されず、気体の生成も見られなかった。乳酸発酵のみが進行していたと判断できる。16S rRNA 遺伝子濃度は 1×10^{12} copies/L から 2×10^{12} copies/L の間を推移した。濁度は発酵開始 433 時間後までは 1300 度前後であったが、その後緩やかに増加し、発酵開始 864 時間後には 2000 度となった。

OLR が 22.2g/(L·day) (添加グルコース濃度 100g/L)での運転時(937~1512hr)では、乳酸濃度は約 70~90g/L、光学純度は 90~97%の間を推移した。残存グルコース濃度は、約 15~30g/L となった。また、乳酸以外の有機酸である蟻酸と酢酸は検出されず、気体の生成も見られなかった。乳酸発酵のみが進行していたと判断できる。16S rRNA 遺伝子濃度は 2×10^{12} copies/L から 5×10^{12} copies/L の間を推移した。濁度は発酵開始 936~1152 時間後までは 2500~3000 度であったが、その後増加していき、発酵開始 1225~1512 時間後では 3500~4000 度となった。

OLR が 5.55g/(L·day) (添加グルコース濃度 25g/L)での運転時(1584~2088hr)では、乳酸濃度は約 25g/L であったが、光学純度は発酵開始 1728 時間後以降急激に低下し、最終的に約 70%まで低下した。これは、長期間乳酸菌密度が高い状態で維持されると、元来 L-乳酸を産生する菌から D-乳酸やその他の有機酸が生産されるようになるという例が報告されており (辻, 2008)、それらと同様の現象が生じた可能性が高いと判断される。残存グルコース濃度は、0.5~2.0g/L となった。また、乳酸以外の有機酸である蟻酸と酢酸は検出されず、気体の生成も見られなかった。乳酸発酵のみが進行していたと判断できる。16S rRNA 遺伝子濃度は 6×10^{11} copies/L から 2×10^{12} copies/L の間を推移した。濁度は 1000~1500 度の間を推移した。

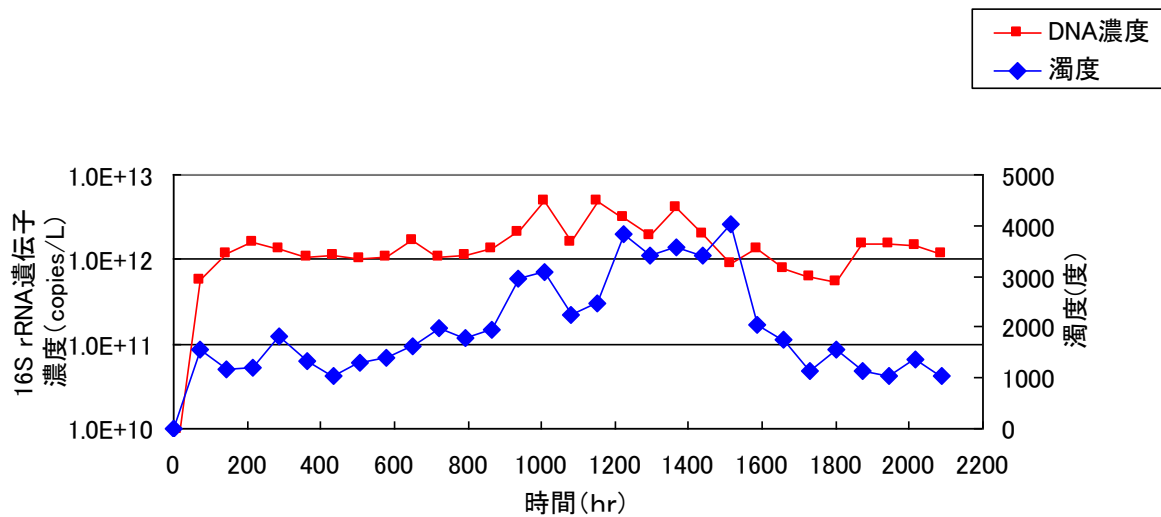
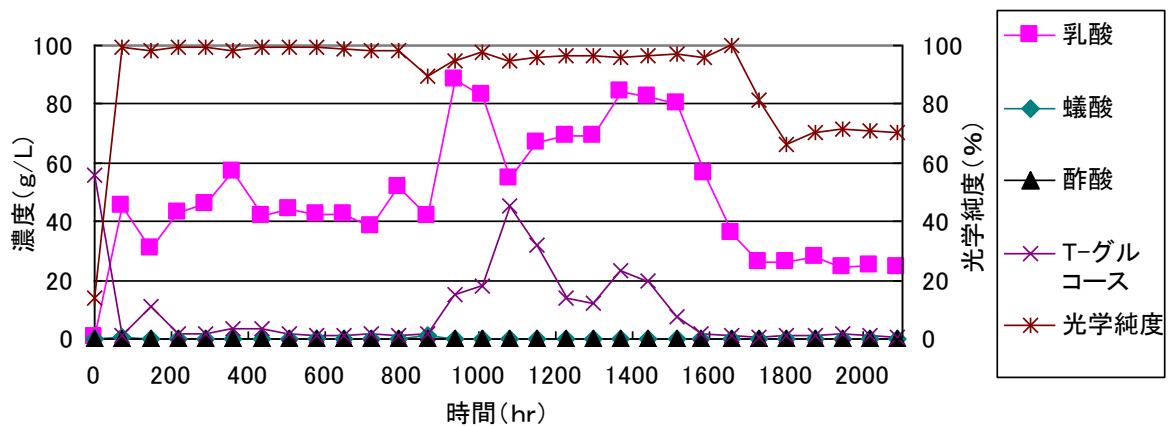


図 2.8 連続式実験結果

投入基質濃度と濁度の関係を図 2.9 に、投入基質濃度と 16S rRNA 遺伝子濃度の関係を図 2.10 に示す。濁度と 16S rRNA 遺伝子濃度の値は、それぞれ各 OLR において 72 時間おきの基質交換直前に測定したデータのうち、OLR 変更直後の値や、明らかに異常な値をそれぞれ 2 点ずつ除いたものを採用した。また、図 2.9 においてプロットされている点は、これらの値の平均値であり、エラーバーは最大値から最小値までの範囲を示している。投入基質濃度が高くなれば、濁度および 16S rRNA 遺伝子濃度が増加する傾向が見られた。よって、基質阻害が生じない範囲であれば、投入基質濃度が高くなれば、菌体量もそれに従って増加すると判断できる。16S rRNA 遺伝子濃度と濁度の関係を図 2.11 に示す。OLR が増加すると、16S rRNA 遺伝子濃度と濁度がともに増加するという相関関係が見られる。これらの結果により、連続式運転において、異なる OLR における比較をする際には、16S

rRNA 遺伝子濃度が菌体量把握の指標として有用であると判断できる。生ごみなどを基質とする場合でも、菌体量を把握する指標として活用できると考えられる。

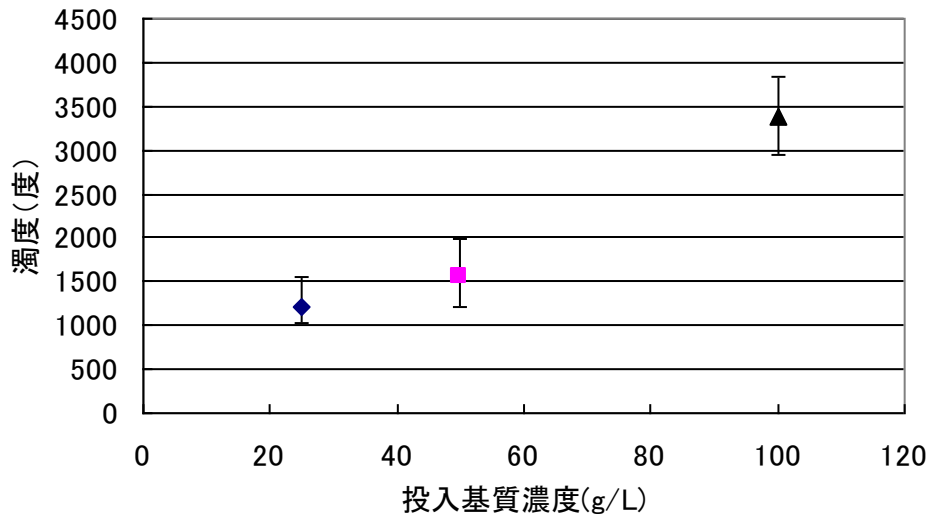


図 2.9 投入基質濃度と濁度の関係

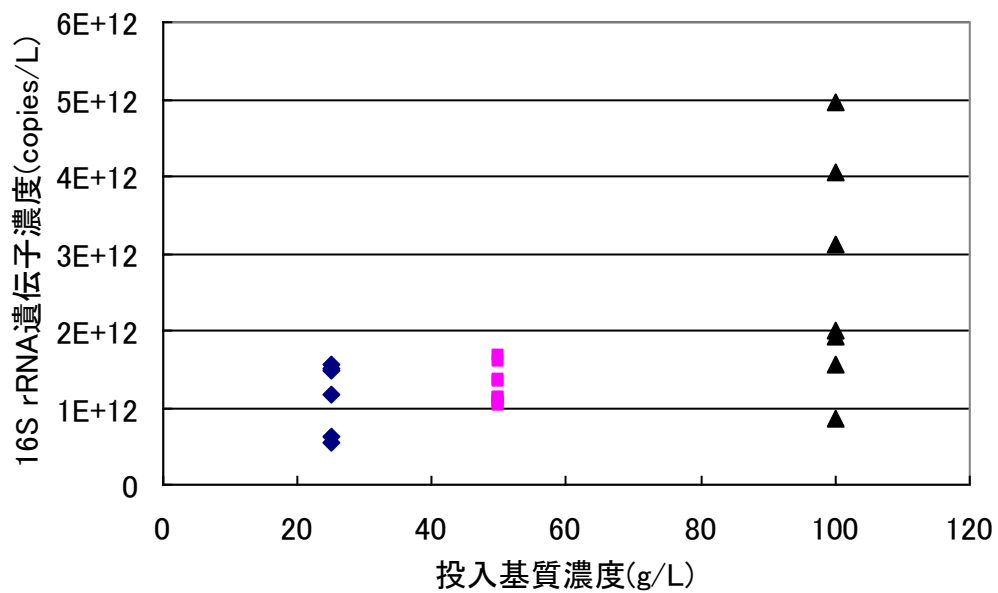


図 2.10 投入基質濃度と 16S rRNA 遺伝子濃度の関係

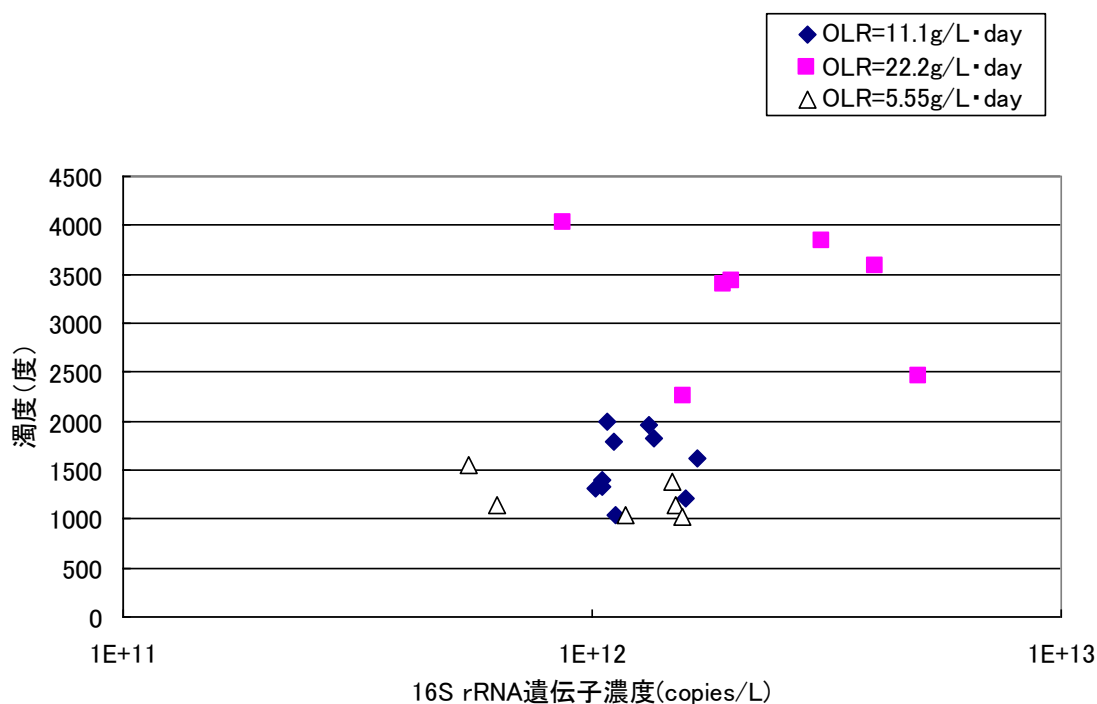


図 2.11 16S rRNA 遺伝子濃度と濁度の関係

2.8 まとめ

回分式実験では乳酸やグルコースの阻害影響などを把握でき、それを元に構築した数理モデルでは、グルコース消費、乳酸生成および微生物の増殖が同時に計算できた。連続式実験では、OLR が増加すると、16S rRNA 遺伝子濃度と濁度がともに増加するという相関関係が見られ、異なる OLR における比較をする際に 16S rRNA 遺伝子濃度が菌体量把握の指標として有用であると判断できた。これらの結果により、real-time PCR による測定は、生ごみなどを基質とする場合、菌体量を把握する指標として活用できると考えられる。

【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.

Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J. (2007a) Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure. Water Res. **41**(8), 1774-1780.

Akao, S., Tsuno, H., Horie, T., Mori, S. (2007b) Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition. Water

- Res. **41**(12), 2636-2642.
- 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.
- Biazar, J., Tango, M., Babolian, E., Islam, R. (2003) Solution of the kinetic modeling of lactic acid fermentation using Adomian decomposition method. *Applied Mathematics and Computation* **144**(2-3), 433-439.
- Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W., Rogers, P. L. (2003) Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. *Biochem. Eng. J.* **14**(2), 127-135.
- 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**(3), 305-314.
- Chemaly P. Z., Fick M. (1999) Lactic acid production by *Bacillus coagulans*—Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations, *Enzyme Microbiology.Technology*, **24**, pp.191-199.
- 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**(2), 134-140.
- Contois, D. E. (1959) Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. *J. Gen. Microbiol.* **21**(1), 40-50.
- 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.
- Ha, J. H., Hidaka, T., Tsuno, H. (2009) Quantification of toxic microcystis and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environmental Science and Technology* **43**(3), 812-818.
- Haldane, J. B. S. (1930) *Enzymes*, Longmans, London.
- Ishizaki, A. and Ohta, T. (1989) Batch culture kinetics of l-lactate fermentation employing *Streptococcus* sp. IO-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **67**(1), 46-51.
- Kargi, F. and Dincer, A. R. (1999) Salt Inhibition Effects in Biological Treatment of Saline Wastewater in RBC. *J. Envir. Engrg.* **125**(10), 966-971.
- Lane, D. J. : 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., Goodfellow, M., editors. Chichester: Wiley, pp.115-175, 1991.

- Nandasana, A. D. and Kumar, S. (2008) Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Biochem. Eng. J.* **38**(3), 277-284.
- Ohara, H., Hiyama, K., Yoshida, T. (1992) Noncompetitive Product Inhibition in Lactic-Acid Fermentation from Glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**(6), 773-776.
- 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**(3-4), 191-199.
- Skiadas, I. V., Gavala, H. N., Lyberatos, G. (2000) Modelling of the periodic anaerobic baffled reactor (PABR) based on the retaining factor concept. *Water Res.* **34**(15), 3725-3736.
- 石崎文彬 (2000) 嫌気性微生物による有用物質生産に関する生物工学的研究, 生物工学会誌, pp.2-12.
- 金子勉, 森田英利, 阿部敬悦, 内田金治, 山本直之, 森田隆 (1996) 乳酸菌の栄養・代謝, 乳酸菌研究集談会編, 乳酸菌の科学と技術, 学内出版センター.
- 千 智勲, 日高 平, 洪 鋒, 越川博元, 岩崎大介, 津野 洋 (2007) 生ごみを対象とした高温メタン発酵槽における微生物群集解析. 環境工学研究論文集, **44**, 625-632.
- 園元謙二, 石崎文彬 (2001) 発酵ハンドブック, 共立出版, pp.316-319.
- 辻秀人 (2008) ポリ乳酸—植物由来プラスチックの基礎と応用—, 米田出版, pp.59-62.
- 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.
- 細野明義, 岡田早苗 (2002) 発酵乳の科学, アイ・ケイコーポレーション, 川崎, pp.178-186.