

(70) 生ごみを用いた非滅菌高温L-乳酸発酵におけるD-乳酸生成が起こり得る時期と関与する菌種

榮 祐介¹・赤尾 聡史^{2*}・前田 光太郎²・細井 由彦²

¹日本上下水道設計株式会社 (〒532-0004大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29)

²鳥取大学大学院工学研究科社会基盤工学専攻 (〒680-8552鳥取県鳥取市湖山町南4-101)

* E-mail: akao@sse.tottori-u.ac.jp

非滅菌高温L-乳酸発酵の実用化を目的に、同発酵に持ち込まれる可能性のあるD-乳酸生成菌が多量に投入される場合の影響を見た。意図的に腐敗を進めた生ごみを用いた繰返し回分高温L-乳酸発酵を実施した結果、D-乳酸の生成を確認した(光学純度; 89.0%)。D-乳酸生成が起こる時期を把握するため、収集された直後の生ごみを用いた回分培養を実施したところ、同発酵に必要な培養条件(55℃, pH 5.5)に至らない培養開始3時間以内に平均0.4 g/LのD-乳酸生成を確認した。高温L-乳酸発酵において、基質添加時の培養条件維持の重要性を示した。PCR-DGGE法によりD-乳酸生成菌の推定を行ったところ、培養初期のD-乳酸生成に関与する微生物として*Weissella* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus sakei*に近縁な微生物を検出した。

Key Words : kitchen waste, thermophilic L-lactate fermentation, D-lactic acid bacteria, PCR-DGGE

1. はじめに

2006年3月に「バイオマス・ニッポン総合戦略」が再度閣議決定されるなど、下水汚泥や生ごみといった有機性廃棄物はバイオマスとして資源化されることが期待されている。しかし、生ごみは他の有機性廃棄物と比べて低い資源化率(27.6%, 2006年度)に留まっており、特に発生量の約5割を占める家庭系生ごみはほとんど資源化されていないのが現状である¹⁾。家庭系生ごみの資源化が進まない原因は、分散的に発生する生ごみの回収に手間がかかり資源化にコストを要する、あるいは、回収頻度が少ない結果原料としての品質低下を招いているためと考えられる。逆に言えば、付加価値のある製品を家庭系生ごみから安価に製造できれば、生ごみを原料として価値を持たすことが可能となり、鮮度の良い生ごみが得られることも期待される。

筆者らは、生ごみの資源化方法として資源化コストの低減に期待が持てる高温L-乳酸発酵を提案してきた²⁾。同技術は、非滅菌下でL-乳酸発酵を実施することから設備費や維持管理費の低減に期待が持たれるものである。得られるL-乳酸は、環境への負荷が小さいとされる溶剤(乳酸エステル)や生分解性プラスチックであるポリ乳

酸(PLA)の原料として需要が伸びている物質である^{3,4)}。また、L-乳酸発酵後に残る残渣(菌体)も整腸作用が期待されることから、高付加価値な飼料として利用することも可能と考えられる^{5,6)}。以上の理由から、付加価値のある製品を生み出せる可能性を有する高温L-乳酸発酵を生ごみ資源化のボトルネックとなっている家庭系生ごみに適用してきた⁷⁾。なお、高温L-乳酸発酵の原料は生ごみに限定されるものではなく、糖質であれば利用できる。ただし生ごみは、微量な栄養素を多く含むことから、ベースとなる原料として有望と考えている⁸⁾。

高温L-乳酸発酵の原料として生ごみを用いる場合、腐敗していない生ごみを用いることが望まれる。しかし、排出源で生ごみの保存管理を適正に行なったとしても、腐敗が進行した生ごみが混入する可能性は十分考えられる。腐敗した生ごみが混入した場合、光学純度低下の原因となるD-乳酸あるいはD-乳酸を生成する菌種の混入を招く⁹⁾。一方で、高温L-乳酸発酵を実施している既存研究^{2,10)}において、D-乳酸を生成する菌種を意図的に添加した例はない。以上のことから、高温L-乳酸発酵において、腐敗が進んだ生ごみが混入した場合の影響、腐敗した生ごみから供給されるD-乳酸生成菌の菌種推定、さらには対策を立てる意味で同菌種がどのような時期にD-乳酸を

生成するかを検討することとした。

本研究では、意図的に腐敗を進めた生ごみを用いた高温L-乳酸発酵を行いその影響を把握した。同発酵において、D-乳酸生成が起こる時期およびPCR-DGGE法¹²⁾により菌叢構造を明らかにし、高温L-乳酸発酵でも関係するD-乳酸生成菌を推定した。

2. 実験方法

(1) 生ごみ

生ごみは、因幡環境整備株式会社 (<http://www.inaba-kankyo.co.jp/index.html>) が液肥化を目的に鳥取市内のごみステーションから回収しているものを用いた⁷⁾。用いた生ごみを表-1にまとめる。採取した生ごみは、家庭用フードプロセッサでスラリー状になるまで破砕し、培養に供した。繰返し回分培養で使用する2008年8月4日採取の生ごみは、冷凍(-20℃)保存した。使用の際は、あらかじめ冷蔵庫にて丸1日自然解凍を加えた。回分培養で使用する2009年9月25日、10月16日、11月13日採取の生ごみは、採取後冷凍保存せずに使用した。いずれの生ごみも、培養で使用する際には、蒸留水で2倍希釈(vol/vol)したもの(以下、生ごみ培地とする)を、滅菌操作を行わずに用いた。

生ごみの成分分析として、食品の一般分析¹³⁾(炭水化物、粗タンパク質、粗脂肪、灰分)を実施した。粗タンパク質は、炭素と窒素量をCNコーダー(Elementar, vario EL III)により定量し、窒素量に窒素-タンパク質換算係数6.25を乗じることで求めた。

(2) 植種菌

高温L-乳酸生成菌*Bacillus coagulans* JCM 2258を用いた。前培養として、滅菌チューブ中のLB培地10 mLにJCM 2258を植菌し、インキュベータ(アズワン, PIC-100S)にて55℃で48時間の振とう培養を行った。本培養では、前培養済みの菌液を生ごみ培地に対して1%量添加した。

(3) 腐敗させた生ごみを用いた繰返し回分培養

意図的に腐敗を進めた生ごみ(以下、腐敗生ごみとする)を用いた繰返し回分培養に先立ち、腐敗生ごみの作製方法を決定するため生ごみの腐敗過程を把握した。2008年8月4日に採取し破砕した生ごみ(冷凍前)の一部をふた付きのコンテナ(400 mL)に入れ、夏場の室内(室温約35℃)に5日間放置した。分析用のサンプル採取は、コンテナ内を攪拌した後行った。腐敗生ごみの維持は、先の5日間放置した生ごみを別途冷凍・解凍した生ごみ(2008年8月4日採取)により植継ぎ、以降2日に1

回の頻度で同様の操作により継代培養した。

腐敗に関わる菌叢を添加した繰返し回分培養では、反応器に生ごみ培地1 L、植種10 mLを投入し、培養を開始した。培養温度とpHは、*B. coagulans*の非滅菌下での優占化に適当な55℃、pH 5.5²⁾に設定した。乳酸の生成に伴い低下するpH調整のための中和剤は、アンモニア水(1+2)を用いた。滞留時間(HRT)は5日とし、HRTに合わせて発酵液を400 mL+中和剤添加量分引抜き、新たに生ごみ培地を400 mL供給し発酵を継続した(以下、繰返し操作とする)。繰返し回分培養は30日間行い、腐敗に関わる菌叢の影響を見るため、繰返し回分培養の前半(14日目まで)は冷凍保存・解凍した生ごみを、後半(16日目から30日目まで)は同様の冷凍生ごみと意図的に腐敗を進めた生ごみを9:1の割合で混合した生ごみを使用した。全量腐敗を進めた生ごみを使用しなかった理由は、腐敗を進めた生ごみは冷凍保存・解凍した生ごみに比べてL-乳酸発酵の原料となる全糖量が少なく、そもそも発酵余地が少ないと考えたためである。一方、腐敗に関わる菌叢の存在量は、1オーダー低下するものの十分存在すると考えた。

(4) 未冷凍生ごみを用いた回分培養

回分培養の培養条件は(3)と同様である(ただし、繰返し操作を除く)。高温L-乳酸発酵過程における微生物群集構造の変化を把握する目的で、培養を開始してから0・3・6・9・12・24・48・72・96・120時間後に発酵液を約20 mL引抜いた。

(5) 分析項目

生ごみ培地と発酵液に対しては、全糖(フェノール硫酸法)とD,L-乳酸(HPLC, SUMICHIRAL OA-5000)の分析を行った。L-乳酸発酵の進捗は、生成L-乳酸量を生ごみ培地の全糖量で除した変換率(式1)で示した。光学

表-1 使用した生ごみ

採取日	使用目的	保存方法
2008年8月4日	繰返し回分培養	冷凍(-20℃)保存
2009年9月25日	回分培養	回収後すぐに使用
2009年10月16日	回分培養	回収後すぐに使用
2009年11月13日	回分培養	回収後すぐに使用

$$\text{変換率(一)} = \frac{(\text{生成L-乳酸量})}{(\text{生ごみ培地中の全糖量})} \quad (1)$$

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

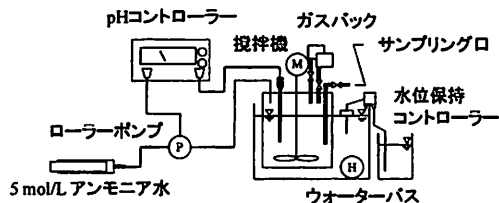


図-1 実験装置の概略図

表2 使用したプライマーのシーケンス

プライマー	シーケンス(5'→3')
EUB341f-GC	GC clamp-CCTACGGGAGGCGAGCAG
UNI518r	ATTACCGCGGCTGCTGG
GC-clamp:	CGCCGCGCGGCGCCCGCGCCGTCCG GCGGCGCCCGCGCCG

純度は、HPLCによりD,L-乳酸の絶対量を求め、その存在量から式2より求めた。回分培養ではDextrose Tryptone Agar (Difco Laboratories) 培地により生菌数も測定した。なお、本研究で用いた生ごみは実際に排出されたものであり、あらかじめD-乳酸も含まれていた。そこで、L-乳酸発酵の評価は、生成したD,L-乳酸に対するL-乳酸の割合で行った。

(6) 実験装置

本研究で用いた実験装置の概略図を図-1に示す。発酵槽は有効容積1 Lのセパラブルフラスコを用い、温度制御はウォーターバス（アズワン、TM-1）と水位保持コントローラー（アズワン、WLC-SA）を用いた。pH制御は、pHコントローラー（日伸理化、NPH-660）のON/OFF制御により中和剤供給のためのローラーポンプ（東京理化機器、MP-1000）を用いて行った（下限値制御）。発酵槽内を嫌気状態に保つため、発酵槽の上層部を窒素ガスにて置換した。また、窒素ガスを充填したガスバッグを取り付けた。

(7) 微生物群集解析

微生物群集解析にはPCR-DGGE法を用いた。DNA抽出は、PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories)を用いて行った。PCRは16S rDNAのV3領域を標的とし、表2に示すEUB341f-GCおよびUNI518rのプライマーセット¹⁴⁾で行った。サーマルサイクラー (BIO-RAD Laboratories, My Cycler 170-9703JB) にてPCRを行い、温度条件は、94℃×5分+(94℃×30秒+53℃×30秒+72℃×1分)×35サイクル+72℃×5分とした。得られたPCR産物は2%アガロースゲル電気泳動によりサイズを確認後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精製し、DGGEに供した。

DGGEには、核酸電気泳動装置 DCode ユニバーサルミューテーション検出システム (BIO-RAD Laboratories, 170-9080~170-9104)を用いた。ポリアクリルアミドゲルは、変性剤の濃度勾配が15%~55%となるように調製した(変性剤濃度が100%のとき: 尿素 7M, ホルムアミド 40%に相当する)¹⁴⁾。20 μLのPCR産物と5 μLの2×Gel Loading Dyeの混合物を滴下し、1×TAE Bufferを用いて、60℃、130V、5時間の条件で電気泳動を行った¹²⁾。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 (ADVANCE, Mupid-Scope WD) によってバンドを確認した。主要なバンドを切出し、滅菌蒸留水の入った0.5 mL チューブに移してゲル断片を洗浄した。これをテンプレートとし同条件にてPCR、DGGE(変性剤濃度勾配; 30~55%)を行った。この精製操作をDGGEバンドが1本になるまで繰り返した後、バンドを再度切出し、シーケンス反応に用いた。シーケンス反応は、BigDye Terminator Ready Mix (Applied Biosystems)を用いて行い、塩基配列の解読は、鳥取大学生命機能研究支援センター (<http://grcl.med.tottori-u.ac.jp/identshi/ident-f-title2.html>) に委託した。DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) の提供する相同性検索プログラム BLASTnにより、解読した塩基配列と相同性の高い微生物を検索した。系統樹解析にはClustal Wを、系統樹描画にはTree View (Win32)を使用した。進化距離の計算にはKimura-2-parameter法を用い、近隣結合法により系統樹を作成した。なお、本研究で得られたDGGEバンドの塩基配列は、DDBJに登録済みである (Accession No.; AB558965~AB558977)。

3. 結果および考察

(1) 腐敗生ごみを用いた繰返し回分高温L-乳酸発酵

図-2に室内放置した生ごみ(破碎済み、未冷凍)の全糖および乳酸濃度の経時変化を示す。採取した生ごみはもともと夏場の屋外のポリペールにあったことから、採

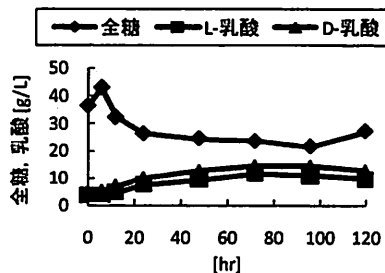


図-2 室内放置した生ごみの全糖および乳酸濃度の経時変化

表3 生ごみの組成分析結果

単位: %

	TS (g/L)	VTS	水分	乾燥分	乾燥分中の内訳				乾燥分中の内訳		C/N比 (-)	乳酸 (g/L)
					粗脂肪	粗タンパク質	灰分	炭水化物 ¹⁾	C	N		
2008.8.4	130.4	87.0	87.0	13.0	9.3	16.9	13.0	60.8	42.5	2.7	15.7	7.9
2009.9.25	219.0	89.4	78.1	21.9	4.2	15.6	10.6	69.6	43.8	2.5	17.5	7.8
2009.10.16	210.5	87.4	79.0	21.0	4.6	13.3	12.6	69.6	43.3	2.1	20.4	2.9
2009.11.13	153.6	83.9	84.6	15.4	2.9	10.9	16.1	70.2	40.8	1.7	23.5	2.5
平均	178.4	86.9	82.2	17.8	5.3	14.2	13.1	67.5	42.6	2.3	19.3	5.3

1) (乾燥分) - (粗脂肪 + 粗タンパク質 + 灰分)

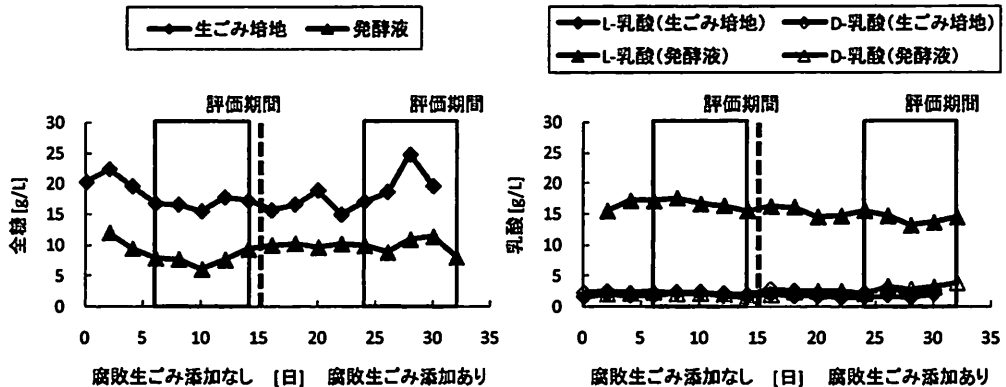


図3 腐敗生ごみを添加した繰返し回分高温L-乳酸発酵

取するまでにD-L-乳酸が生成され腐敗が進行していた(L-乳酸; 3.5 g/L, D-乳酸; 4.4 g/L)。破砕処理後12時間から全糖の減少とD-L-乳酸の増加が顕著となり、96時間後にD-L-乳酸濃度が最大となった(L-乳酸; 11.8 g/L, D-乳酸; 14.5 g/L)。腐敗生ごみを作製する際は、室内放置後48時間でも生ごみの腐敗に関与する菌種は十分に増殖すると考え、植継ぎ間隔を48時間と設定した。

表3に使用した生ごみ(2008年8月4日採取)の組成を、図3および表4に繰返し回分培養の結果を示す。評価期間は、それぞれ培養開始から1HRT経過した6日目から14日目、24日目から32日目と設定した。腐敗に関わる菌叢を添加していない前半の培養では、選択的にL-乳酸を生成した。評価期間における平均L-乳酸濃度は、14.7 g/Lであり、生成乳酸(発酵液中のD-L-乳酸量から生ごみ培地中のD-L-乳酸量を引いたもの)に対する平均光学純度は99%以上であった。腐敗に関わる菌叢を添加した後半では、平均値の比較(検定, 自由度8)において変換率が有意($p < 0.05$)に低下し、D-乳酸の生成を確認した。生成乳酸に対する平均光学純度は89.0%であった。ところで、腐敗した生ごみを添加した期間において光学純度(生成L-乳酸; 12.6 g/L, 生成D-乳酸; 0.7 g/L)が低いとは言え、L-乳酸がより多く生成されていた。このことから、

表4 腐敗生ごみを添加した繰返し回分高温L-乳酸発酵結果

	添加なし	添加あり
生ごみ培地の全糖(g/L)	16.8	19.0
L-乳酸(g/L)	16.5	14.3
D-乳酸(g/L)	2.0	3.1
生成乳酸の光学純度(%)	>99.0	89.0
変換率(-)	0.87	0.69
評価期間(1HRT経過後)の平均値		

ら、発酵槽内ではD-乳酸を生成する菌種の繰返し操作間隔にわたる継続した増殖は防いでいるものの、D-乳酸の生成を防ぐまでには至っていないと考えられる。

(2) 培養初期のD-乳酸生成に注目した高温L-乳酸発酵

(1)で行った腐敗を進めた生ごみを原料とした繰返し回分培養において、D-乳酸の生成が確認された。そこで、高温L-乳酸発酵においてD-乳酸がどのタイミングで生成されるのかを回分培養により把握することとした。高温L-乳酸発酵は異なる生ごみで3回実施し、その再現性を確認した。生ごみは、2009年9月25日、10月16日、11月13日に採取したものを使用した。本実験では生ごみ中に存在する菌叢とD-乳酸生成との関係を把握することを目的としたことから、冷凍保存により微生物の活性が失われ

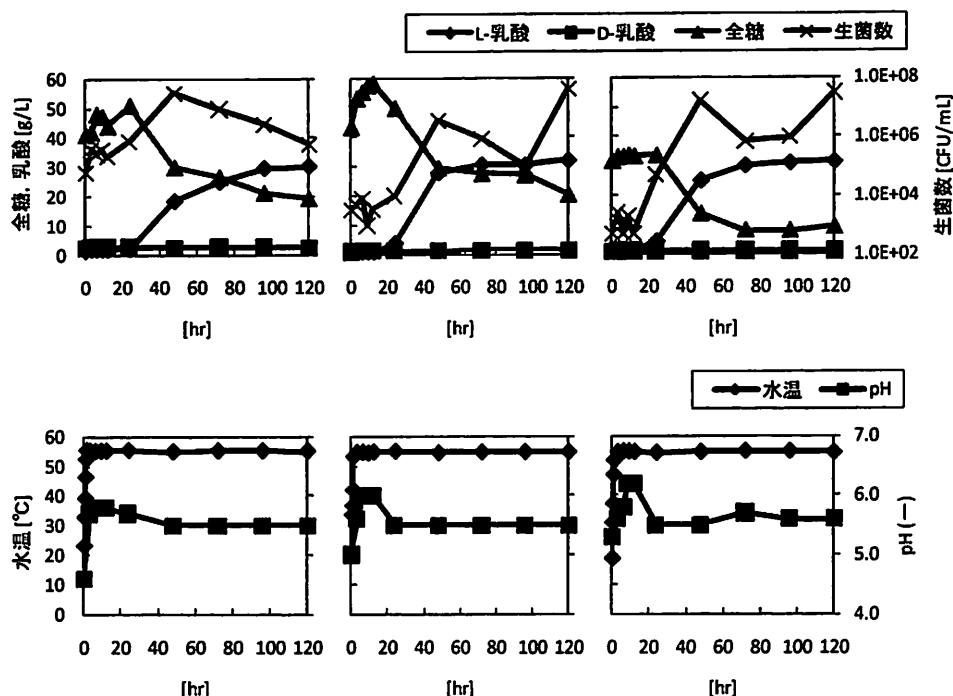


図4 回分培養による生ごみの高温L-乳酸発酵結果
(左: 9/25, 中: 10/13, 右: 11/13)

ることを避けるため、生ごみは破碎後冷凍保存せずに使用した。

図4に3回の回分培養の結果を示す。3回の生ごみの高温L-乳酸発酵において、概ね同様の結果を得た。培養を開始して24～48時間後からL-乳酸濃度が増加していることが伺える。120時間後の終端L-乳酸濃度は平均31.4 g/Lであり、安定してL-乳酸が得られた。一方、各回とも培養開始3時間後にD-乳酸が平均0.4 g/L生成され、発酵初期にD-乳酸を生成する菌種の存在していることが示唆された。なお、培養開始直後は発酵槽内の水温が低く、pHも不安定であり、非滅菌高温L-乳酸発酵に必要な培養条件である55℃、pH 5.5に達していない。この過渡期における不安定な状態がD-乳酸生成菌の生育をもたらし、D-乳酸生成を引き起こしたものと考えられる。また、この生成されたD-乳酸が消費されることなく培養期間中発酵槽内に留まる形となった。この生成されたD-乳酸を含めた回分培養における生成乳酸に対する光学純度は平均98.0% (98.8%, 97.4%, 97.9%)であり、例えば、ポリ乳酸化に必要な光学純度97%はクリアしていることから、L-乳酸発酵自体は非滅菌下でも実施できた。一方、生ごみが回収されるまでに生成したD-乳酸を加味した発酵液

中の乳酸に対する光学純度は平均90.2%となった。

全糖に着目すると、培養開始後から増加していることが伺える。これは、生ごみ中の多糖が加水分解されて全糖分析対象に加わり増加したものと考えられる。そこで、多糖の加水分解反応を触媒する酵素である α -グルコシダーゼの活性および糖化力を糖化力分別定量キット (Kikkoman Corp.) で測定したが、同キットでは多糖加水分解反応を確認することができなかった。しかし、筆者らがこれまで行ってきた生ごみを原料とした高温L-乳酸発酵の場合、用いている *B. coagulans* に多糖資化性がない¹⁹⁾にも関わらず、生ごみにあらかじめ加水分解 (糖化) 処理を施さずに高温L-乳酸発酵が行えること、*B. coagulans* にはアミラーゼを誘導できる株も存在する¹⁹⁾ことから、担い手は不明なものの生ごみ中に存在する菌種や酵素によって生ごみ中の多糖が加水分解されていることが推察される。

(3) 培養初期にD-乳酸生成が見られた高温L-乳酸発酵における微生物群集解析

(2)の生ごみの高温L-乳酸発酵を対象とし、PCR-DGGE法により微生物群集解析を行った。図5に生ごみの高温

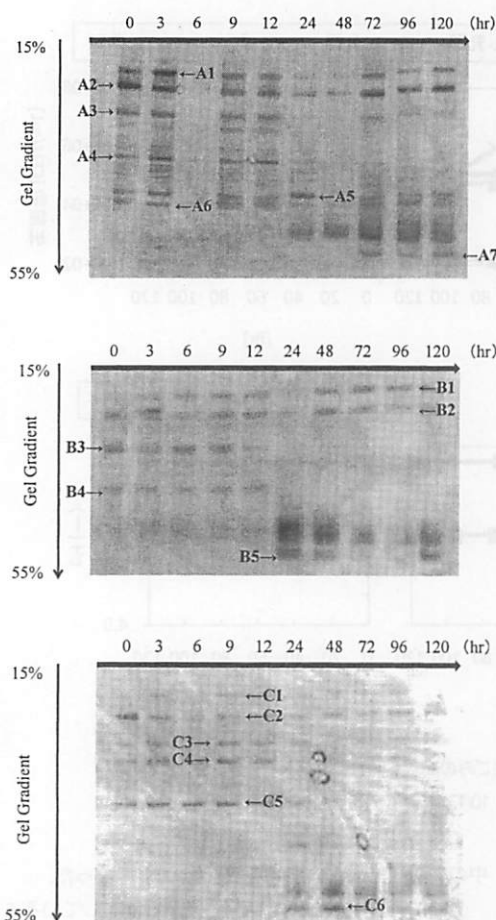


図-5 高温L-乳酸発酵におけるDGGEバンドプロファイル
(上段: 9/25, 中段: 10/16, 下段: 11/13)

L-乳酸発酵におけるDGGEバンドプロファイルを示す。3回の高温L-乳酸発酵は概ね同じバンドパターンを示し、PCR-DGGE法により高温L-乳酸発酵過程の微生物群集構造およびその時系列変化が確認できた。図-5によると、培養を開始してから24時間までとそれ以降でバンドパターンが大きく変化した。その中でもDGGEゲルの中程に現れるバンド(図-5中のA3, A4, B3, B4, C3, C4, C5)は培養開始直後にはバンドが確認できるが、高温L-乳酸発酵が安定してきた24時間後以降にバンドが明瞭でなくなることが伺える。一方、ゲルの上方に現れるバンド(図-5中のA1, A2, B1, B2, C1, C2)は培養期間中常に確認できた。各回において特徴的なバンドであるA1~A7, B1~B5, C1~C6を切出し、塩基配列を解読した。表-5にBLASTnによる同源性検索結果を、図-6にClustal Wによる系統樹解析結果を示す。なお、系統樹解析ではア

表-5 DGGEバンドの同源性検索結果

バンド	同源性検索結果	同源性
A1	<i>Weissella</i> sp. PSMS4-4	122/133 91%
A2	<i>Lactobacillus rossiae</i>	126/132 95%
A3	-	-
A4	<i>Lactococcus lactis</i>	131/133 98%
A5	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	135/136 99%
A6	<i>Enterobacter asburiae</i>	149/150 99%
A7	<i>Bacillus coagulans</i> ※	-
B1	<i>Weissella</i> sp. PSMS4-4	146/147 99%
B2	<i>Leuconostoc</i> sp. F12	146/147 99%
B3	<i>Lactobacillus sakei</i>	143/154 92%
B4	<i>Lactococcus lactis</i>	149/152 98%
B5	<i>Bacillus coagulans</i> ※	-
C1	<i>Weissella</i> sp. PSMS4-4	144/145 99%
C2	<i>Leuconostoc</i> sp. F12	139/140 99%
C3	-	-
C4	<i>Lactobacillus sakei</i>	128/139 92%
C5	<i>Lactococcus lactis</i>	150/154 97%
C6	<i>Bacillus coagulans</i> ※	-

※*Bacillus coagulans*は、塩基配列を解読していない

ウトグループとして*Escherichia coli*を用いた。

培養期間中常にバンドが現れていたA1, A2, B1, B2, C1, C2のグループについて、A1, B1およびC1はD-L-乳酸菌である*Weissella* sp. PSMS4-4に近縁であった。A2は*Lactobacillus rossiae*, B2およびC2は*Leuconostoc* sp. F12に近縁であった。培養途中でバンドが不明瞭となったA3, A4, B3, B4, C3, C4, C5のグループについて、B3およびC4はD-L-乳酸菌である*Lactobacillus sakei*に近縁であった。A3およびC3についてはDGGEを繰り返してもバンドの分離が行えず¹⁷⁾、塩基配列の解読ができなかったが、A3についてはDGGEバンドの位置からB3およびC4と同様の*L. sakei*に近縁であると考えられる。A4, B4およびC5はL-乳酸菌である*Lactococcus lactis*に近縁であった。

生ごみ中に存在する乳酸菌について調査しているWang et al.¹⁸⁾の報告によると、生ごみ中では*L. lactis*, *Lactobacillus*属や*Leuconostoc*属といった微生物が存在しており、本研究で検出した微生物もこのWang et al.の報告と一致する。これらの微生物が自然環境中で放置されている間に繁殖し、D-L-乳酸を生成しているものと考えられる。また、検出された微生物のうち、D-乳酸を生成する菌種の生育環境について着目してみると、*Weissella*属はサイレージ発酵に用いられる菌種であり、例として*Weissella cibaria*の生育温度は15~45℃という報告がある¹⁹⁾。*Leuconostoc*属は基準種である*Leuconostoc mesenteroides*で考えた場合、生育温度は20~30℃、pHは6.5付近²⁰⁾である。

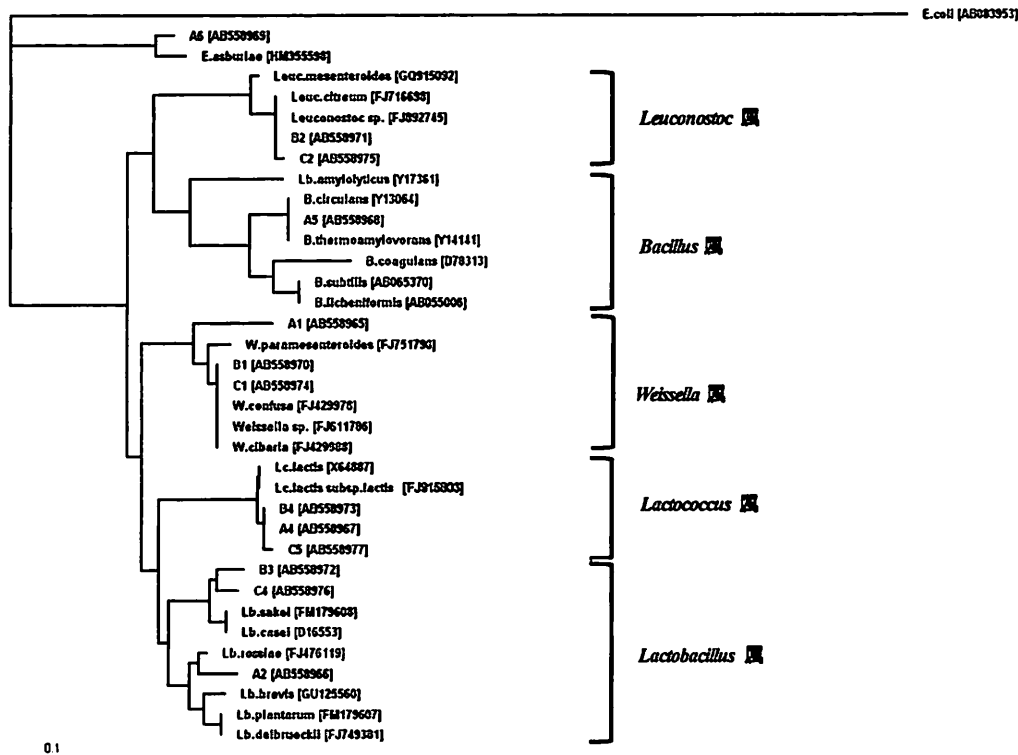


図-6 系統樹解析結果
(*Bacillus* ; *B.*, *Weissella* ; *W.*, *Lactobacillus* ; *Lb.*, *Leuconostoc* ; *Leuc.*, *Lactococcus* ; *Lc.*)

*L. sakei*は45℃では生育できないという報告がある²¹⁾。以上を踏まえると、*Weissella* sp.、*Leuconostoc* sp.や*L. sakei*といったD-乳酸を生成する菌種は、本研究での培養環境(55℃, pH 5.5)で生育することは考えにくい。D-乳酸生成が培養開始後3時間までであったことから、上記のようなD-乳酸生成菌が培養条件の揃わない過渡期にD-乳酸を生成したと考えられる。今後、非滅菌高温L-乳酸発酵を実用化していくにあたって、反応器のスケールアップに伴いこの過渡期をいかに短縮できるかが大きな課題であると考えられる。

一方、A7、B5およびC6はDGGEにより同じ位置にバンドを形成したが、これについてもDGGEを繰り返してもバンドの分離が行えず、塩基配列の解読ができなかった。しかし、この3本のバンドの特徴として、高温L-乳酸発酵が安定した24時間後以降現れたことから、本研究ではこの3本のバンドが高温L-乳酸生成菌として植菌した*B. coagulans*ではないかと考えた。図-4および図-5において生菌数増加のタイミングと一致する。そこで、植菌で用いた*B. coagulans*から抽出したDNAをPCR増幅し、得られたPCR産物をDGGEに供することとした。その結

果、植菌した*B. coagulans*のDGGEバンドが上記3本(A7、B5、C6)のバンドと同じ位置に現れた。この結果より、A7、B5およびC6は*B. coagulans*であると推定した。ところで、各回ともこのA7、B5およびC6のバンドは植菌した*B. coagulans*であると推定したが、植菌した*B. coagulans*であれば培養開始直後から発酵槽内に存在しており、DGGEでも常にバンドが現れてもよいはずである。しかし、本研究における3回のDGGEにおいて培養初期では常に現れなかった。培養開始直後はもと生ごみ中に存在していた*Leuconostoc*属や*Lactobacillus*属といった雑菌の数が多く、*B. coagulans*のDNAがPCRで増幅されなかったことが考えられる。その後、55℃, pH 5.5という培養条件が維持されるに伴って、これらの雑菌がスクリーニングされ、*B. coagulans*のバンドが現れることになったと考えられる。

4. 結論

本研究では、生ごみの腐敗に関わる菌叢が高温L-乳酸

発酵に与える影響を把握するため、意図的に腐敗させた生ごみを原料とする繰返し回分高温L-乳酸発酵を実施した。また、回分培養により高温L-乳酸発酵においてD-乳酸生成が起こる時期を把握し、高温L-乳酸発酵中の菌叢構造およびその時系列変化を確認した。本研究で得られた主な結果を以下に記す。

- (1) 意図的に腐敗を進めた生ごみ（冷凍・解凍生ごみ：腐敗生ごみ=9：1で混合したもの、2倍希釈）を用いた繰返し回分培養（HRT；5日、繰返し操作間隔；2日）において、生成された乳酸のうちL-乳酸（12.6 g/L）が多いもののD-乳酸（0.7 g/L）も確認された。生成乳酸の平均光学純度は89.0%であった。なお、腐敗生ごみを添加していない同様の繰返し回分培養では、光学純度99%以上を得た。
- (2) 回収した直後の生ごみ（未冷凍）を用いた高温L-乳酸発酵の結果、同発酵に必要な培養条件（55℃、pH 5.5）に至らない培養開始3時間以内にD-乳酸が平均0.4 g/L生成されることを確認した（3回実施）。また、D-乳酸生成に関与する微生物の存在が示唆された。
- (3) PCR-DGGE法による微生物群集解析の結果、高温L-乳酸発酵中の微生物群集構造およびその時系列変化を確認した。培養を開始してから24時間までとそれ以降で菌叢構造が大きく変化した。24時間までの菌叢構造からD-乳酸生成に関与する微生物として、*Weissella* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus sakei*に近縁な微生物を検出した。

非滅菌高温L-乳酸発酵にD-乳酸を生成する菌種が多量に持ち込まれると、D-乳酸が生成される可能性があることがわかった。ただし、このD-乳酸生成は、基質添加により高温L-乳酸発酵条件が崩れた過渡期に起こる結果を得た。今後同発酵を実施していく際は、特に基質添加時の同発酵に必要な培養条件の維持が重要であり、加温方法や培養方法（連続培養）での対処が重要であると考えられる。

謝辞：本研究は、平成20年度鳥取県環境学術振興事業および科研費21760418の助成を受けて実施されたものである。また、本研究で用いた生ごみは、因幡環境整備株式会社の高塚雅史氏の多大な協力を得て入手した。

参考文献

- 1) 環境省：平成21年度版環境白書、ぎょうせい、pp.188,2009.
- 2) Akao S., Tsumo H., Horie T. and Mori S.: Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, *Water Research*, Vol. 41, No. 12, pp.2636-2642, 2007.
- 3) (独)新エネルギー・産業技術総合開発研究所：ポリ乳酸製造における環境負荷低減システムの開発、pp.3,2005.
- 4) (独)新エネルギー・産業技術総合開発研究所：新規好アルカリ性乳酸菌を用いた乳酸の低コスト生産法の研究開発、2008.
- 5) 井上雄三：乳酸発酵による食品廃棄物からの乳酸回収と飼料化のコンバインドシステム、廃棄物学会研究時論会講演論文集、Vol.2007,pp.30-37,2007.
- 6) 押田敏雄：機能性飼料とプロバイオティクスー没得しつつある機能性飼料の効果とその可能性、畜産コンサルタント、pp.28-32,2005.
- 7) 赤尾聡史、榮祐介、岩崎翔志、門木幸幸：家庭系生ごみの組成分析と非滅菌高温L-乳酸発酵での利用、環境工学研究論文集、Vol.45,pp.451-458,2008.
- 8) 酒井謙二、白井毅人：ポリ乳酸生産を基軸とした都市生ごみのトータルリサイクルシステム、廃棄物学会誌、Vol.15, No.2, pp.89-96,2004.
- 9) Wang Q., Narita J., Xie W., Ohsumi Y., Kusano K., Shirai Y. and Ogawa H.I.: Effects of anaerobic/ aerobic incubation and storage temperature on preservation and deodorization of kitchen garbage, *Bioresource Technology*, Vol.84, pp.213-220, 2002.
- 10) Sakai K. and Ezaki Y.: Open L-Lactic Acid Fermentation of Food Refuse Using Thermophilic *Bacillus coagulans* and Fluorescence *In Situ* Hybridization Analysis of Microflora, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.101, No.6, pp.457-463, 2006.
- 11) Patel M., Ou M., Ingram L.O., Shanmugam K.T.: Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L-(+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp., *Biotechnol. Lett.*, 26, 11, pp.865-868, 2004.
- 12) 大坊彩乃、栗栖（長谷川）盟、花木啓祐：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、Vol.31, No.5, pp.253-259, 2008.
- 13) 文部科学省：五訂増補 日本食品標準成分表 分析マニュアル、pp.1-38, 国立印刷局, 2004.
- 14) 堆洋平、李玉友、久保田健吾、原田秀樹：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、Vol.86, No.4, pp.157-163, 2008.
- 15) 赤尾聡史、榮祐介、中谷真悟、増田貴則、細井由彦：*Bacillus coagulans*によるL-乳酸発酵の糖質化性検討、環境工学研究フォーラム講演集、Vol.45, pp.70-71, 2008.
- 16) Babu K.R. and Satyanarayana T.: Parametric Optimization of Extracellular α -Amylase Production by Thermophilic *Bacillus coagulans*, *Folia Microbiol.* Vol.38, No.1, pp.77-80, 1993.
- 17) Sekiguchi H., Tomioka N., Nakahara T. and Uchiyama H.: A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis, *Biotechnology Letters*, Vol.23, No.15, pp.1205-

- 1208, 2001.
- 18) Wang Q., Yamabe K., Nanita J., Morishita M., Ohsumi Y., Kusano K., Shirai Y. and Ogawa H.L. : Suppression of growth of putrefactive and food poisoning bacteria by lactic acid fermentation of kitchen waste, *Process Biochemistry*, Vol.37, pp.351-357, 2001.
- 19) Björkroth K.J., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel W.H., Korkeala H.J. and Vandamme P. :Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 52, pp. 141-148, 2002.
- 20) Schleifer K.H. : Gram-positive cocci. Holt J.G. (ed.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, pp. 999-1103, Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.
- 21) Kandler O. and Weiss N. :Regular, nonsporing gram-positive rods. Holt J.G. (ed.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, pp. 1208-1234, Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.

(2010.5.21受付)

Timing of D-Lactate Production in Thermophilic L-Lactate Fermentation of Non-Sterile Kitchen Wastes and Identification of Causative Bacteria

Yusuke SAKAE¹, Satoshi AKAO², Koutarou MAEDA² and Yoshihiko HOSOI²

¹NIPPON JOGESUIDO SEKKEI CO., LTD.

²Dept. of Management of Social Systems and Civil Engineering, Tottori University

For practical use of thermophilic L-lactate fermentation under non-sterile condition (55°C, pH 5.5), we investigated how large amount of D-lactate producing bacteria existing in kitchen wastes naturally affected the fermentation process. As a result of semi-continuous L-lactate fermentation using intentionally putrefied kitchen wastes (HRT, 5 days; fill-and-draw time, 2 days), D-lactate was produced and optical purity of L-lactate produced was stayed at only 89%. In order to confirm the D-lactate producing phase in the fermentation, batch fermentation was conducted three times using freshly collected kitchen wastes from a local dump, which would contain D-lactate producing bacteria. Concentration of D-lactate was 0.4 g/L at 3 hours later when operational conditions of temperature and pH were not stable. Concentration of L-lactate at 120 hours later was around 30 g/L and the optical purity of L-lactate produced was around 98%. By PCR-DGGE analysis, bacteria closely related to *Weissella* spp., *Leuconostoc* spp. and *Lactobacillus sakei* were detected as D-lactate producing bacteria at the beginning of the fermentation. For prevention of D-lactate production, it would be important to maintain the operational conditions of thermophilic L-lactate fermentation especially at feeding time that usually provides low temperature and high pH.