

## 1. はじめに

糖分を多く含む有機性廃棄物の資源化技術として、材料の滅菌を必要としない高温 L-乳酸発酵の検討を筆者らは進めてきた。例えば、家庭から排出された生ごみ<sup>1)</sup>や農作物の非可食部<sup>2)</sup>などを材料に、高温 L-乳酸発酵を実施してきた。有機性廃棄物中に存在する糖分としては、発酵において速やかに資化される単糖類、二糖類のほか、食物由来であればでんぷん、植物構造体由来であればセルロースといった多糖類がある。一般に、多糖類を発酵利用する際は、発酵の前段として糖化(加水分解)が必要とされる。ただし、でんぷんに関しては、これを加水分解できる微生物種は非常に多く、発酵方法によっては前段の糖化を必要としない。

高温 L-乳酸発酵は、土壌細菌である *Bacillus coagulans* によって主になされ<sup>3)</sup>、この種はでんぷんの糖化能を有する。したがって、でんぷんの利用において高温 L-乳酸発酵は糖化の必要がない。一方で、*B. coagulans* のみを用いた L-乳酸発酵では、でんぷんの利用率が低いことを経験として得ている。でんぷん糖化を含めた高温 L-乳酸発酵は、滅菌を実施していないことから *B. coagulans* のみが機能しているとは考え難く、でんぷん糖化に関しては他菌種の貢献も期待される。

本研究では、でんぷん糖化効率の向上を目的に、高温条件でも生育できるでんぷん糖化能を有する菌株を高温 L-乳酸発酵へ意図的に導入し、発酵槽内の菌種の消長を観察した。これら導入した菌種は発酵槽内で存在し、少なくとも L-乳酸発酵を妨げないことを確認したことからそれらを報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 生ごみでんぷん培地と発酵条件

生ごみの組成調査を基にした人工生ごみ<sup>3)</sup>を用いた。人工生ごみを蒸留水で 3 倍に希釈し、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、これを生ごみでんぷん培地として発酵に供した。発酵では、容量 1 L の発酵槽<sup>4)</sup>を用いた。発酵

条件は、55°C で pH6 とした。発酵は 2 回行ったが、ほぼ同様の結果となったことからそのうちの一方を以下の結果で示す。

### 2.2 植種

L-乳酸生成菌として *B. coagulans* JCM2258 株を、でんぷん糖化酵素誘導菌として畑土壌より単離した s2 株 (*Aneurinibacillus* sp. と推定)、s3 株 (*Geobacillus* sp. と推定)を用いた。さらに、コンタミネーションを目的に、畑土壌培養液を添加した。いずれの植種源も、でんぷんを主要基質とする培地にて 24 時間前培養 (55°C, 振とう) した。前培養液の添加量は、生ごみでんぷん培地に対して各々 0.5% 量とした。

### 2.3 分析方法

単糖類・二糖類は HPLC (カラム SUGAR-SP0810; 検出器 RI) を用いた。全糖は、4N HCl 中で 100°C, 4 時間加水分解し、中和後の単糖類・二糖類量で評価した。でんぷんは、F キットスターチを用いた。D,L-乳酸は、HPLC (カラム OA-5000; 検出器 UV 254 nm) を用いた。でんぷんの糖化活性であるアミラーゼ活性はヨウ素でんぷん反応を用いた<sup>4)</sup>。生菌数は、でんぷんを主要基質とする寒天培地により求めた。コロニーの菌種推定では、DNA 抽出後、16S rDNA (10F-800R プライマーを使用) により菌種推定した。

PCR-DGGE は、DNA の抽出から手順まで既報<sup>1)</sup>と同様とした。ただし、変性剤の濃度勾配を 35-65% とした。DGGE マーカーは、DGGE Makker II (ニッポンジーン) を用いた。Substrate-SDS-PAGE は、Martinez et al<sup>5)</sup> の手順に準拠した。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。

## 3. 結果および考察

### 3.1 生ごみでんぷん培地の変化

培養結果を図 1 に示す。乳酸発酵について、減少

した全糖以上の D,L-乳酸が生成され、L-乳酸の光学純度が 99%以上であったことから、問題なく L-乳酸発酵が行えた。でんぷん糖化菌種や畑土壌培養液を意図的に添加しても高温 L-乳酸発酵が実施できることを確認した。

でんぷんに着目すると、減少するでんぷんの半分が培養開始後 0.5 日間のうちに加水分解された。糖化は培養初期に起こった。また、残りのでんぷんの減少は、以後緩やかに継続して培養開始 10 日目まで観察された。生菌数は、培養開始時に  $10^4$  オーダーであったものが培養開始後 1 日目で  $10^7$  オーダーに到達し、以後 10 日目までこの生菌数が維持された。培養開始後 6 日目以降の生菌数カウントプレートから、特徴的なコロニーを釣菌し、16S rDNA により菌種推定した結果、1つ(6 日目, *Geobacillus sp.*)を除いて *B. coagulans* と推定された。

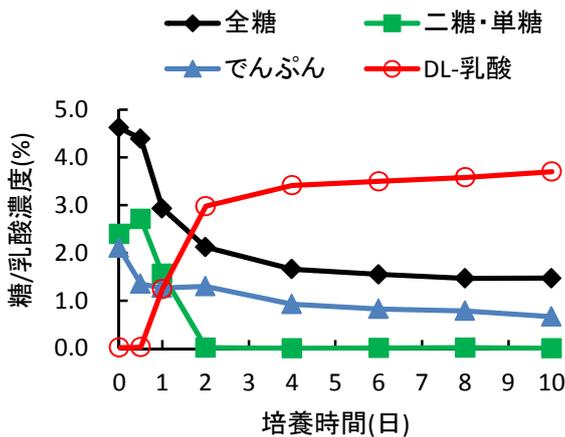


図 1 培養の経日変化

### 3.2. アミラーゼ活性の変化

アミラーゼ活性の変化を図 2 に示す。アミラーゼ活性は培養開始時にもともと高く、培養開始後 0.5 日目でピークとなり、その後緩やかに減少した。ただし、10 日目まで活性は維持された。もう 1 つの発酵では、培養開始後 2 日目で活性値が 0.3 U/mL まで低下したもののその後回復し、2 日目と回復途上の 4 日目を除いて同様の結果となった。

アミラーゼ活性が培養開始時に高いことは、材料由来、植菌由来の でんぷん糖化酵素 (持ち込み糖化酵素) が多いことを意味する。ただし、培養開始後 0.5 日目で活性値のピークを示すことから、高温 L-

乳酸発酵によってでんぷん糖化活性の上昇が起きていると示された。一方で、培養初期は培養条件 (特に温度) が高温 L-乳酸発酵で設定したものに至っていないことも考えられる<sup>1)</sup>。これも回分培養における高温 L-乳酸発酵の一部であるが、過渡的な状態において、でんぷん糖化酵素を誘導する菌種が増殖したことも可能性として考えられる。

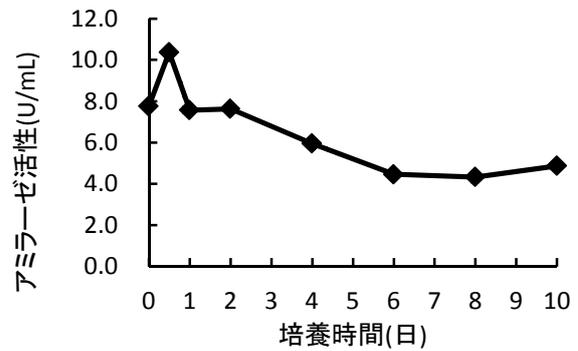


図 2 アミラーゼ活性の経日変化

### 3.3 菌叢の変化

PCR-DGGE の結果を図 3 に示す。培養開始 1 日目以降優占化するバンド (図 3, 1) は *B. coagulans* と推定された。0.5 日目に一旦現れ、6 日目以降に再び明確となるバンド (図 3, 2) は *Aneurinibacillus sp.* と推定された。また、シークエンス解読は行えていないが、植菌 (*Geobacillus sp.*) で用いたバンド位置から 4 日目と 6 日目に現れたバンド (図 3, 3)

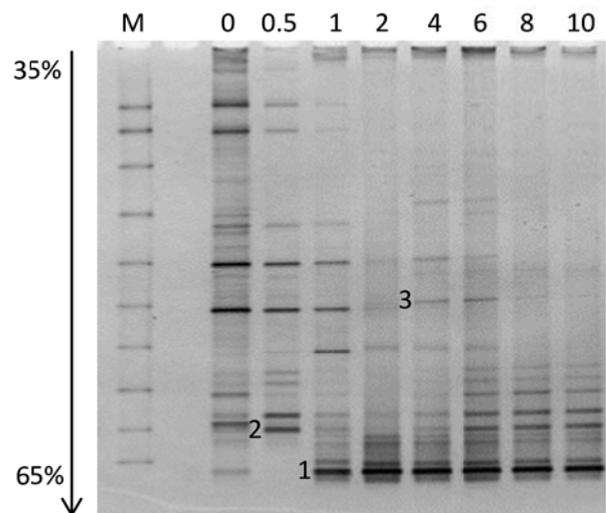


図 3 菌叢の経日変化

(M, マーカー; 数字, 経過日数; 1, *B. coagulans*; 2, *A. thermoaerophilus*. 3 はバンド位置から *Geobacillus sp.*)

は *Geobacillus sp.* と考えている。これは、6 日目に単離したコロニーが *Geobacillus sp.* と推定されたことにもよる。

推定された *Aneurinibacillus sp.* と *Geobacillus sp.* は、でんぷん分解を目的に添加した s2 株と s3 株に由来すると思われる。これらが培養 0.5 日目あるいは後半に現れることから、これら菌種は高温 L-乳酸発酵で共存し、少なくとも L-乳酸発酵を妨害しない可能性が考えられる。また、s2 株と s3 株はアミラーゼ活性が非常に高いことから、でんぷん糖化にも貢献していると期待している。

### 3.4 でんぷん分解酵素の変化

Substrate-SDS-PAGE の結果を図 4 に示す。図 4 で白抜けしている部位は、でんぷん糖化酵素を示している。これによると、培養開始時および 0.5 日目は 50 kDa 前後で大きく白抜けしていることから、分子量 50 kDa 程度の でんぷん糖化酵素が高い活性で存在したと伺える。これは、図 1 の でんぷん経日変化、図 2 の アミラーゼ経日変化とも対応する。ただし、この分子量の酵素は 2 日目以降明瞭でなくなっており、代わって 2 日目以降は 150 kDa 付近に白抜けを観察できる。2 日目以降は、でんぷん糖化酵素、ひいては糖化の担い手が変わった可能性が考えられる。

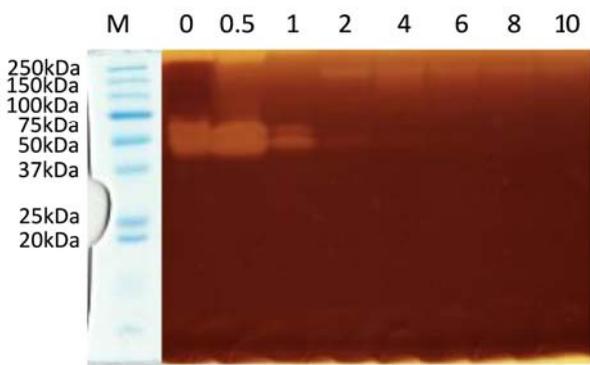


図 4 でんぷん糖化酵素分子量の経日変化

(M, マーカー; 数字, 経過日数; マーカーはヨウ素染色後脱色し, CBB G-250 で再染色したものを合成)

## 4. まとめ

本研究では、人工生ごみにでんぷんを添加した培地を用いて、滅菌を施さない条件で高温 L-乳酸発酵

(回分培養) を行った。でんぷん糖化能の強化とコンタミネーションへの同発酵の耐性を見るために、植種に *B. coagulans* のほか土壌より単離したでんぷん糖化酵素誘導株 2 種と畑土壌培養液を用いた。その結果、光学純度 99% 以上の L-乳酸が得られ、L-乳酸発酵が実施できた。でんぷん糖化については、培養開始直後 (0.5 日以内) に起こること、同期間はアミラーゼ活性が比較的高いことを確認した。ただし、以後培養期間を通じてでんぷん糖化は緩やかに継続し、アミラーゼ活性も維持された。また、糖化を担う酵素が培養中に代わったことも示唆された。発酵槽に持ち込まれた糖化酵素以外に、発酵中ででんぷん糖化能を示す菌種が活動したと考えられる。最後に、でんぷん糖化能の強化を目的に導入した 2 種は培養を通じて系内に存在した。これらは、少なくとも L-乳酸発酵を妨害せずに存在した。

謝辞: 本研究は、環境研究総合推進費補助金 K112005 (代表: 日高平) の助成を受けた。ここに記して謝意を表する。

### 参考文献

- 1) 榮裕介ほか: 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, 環境工学研究論集, 47, 585-593, 2010.
- 2) S. Akao et al: Comparison of simultaneous and separate processes: saccharification and thermophilic fermentation of catch crop and aquatic plant biomass, Environ. Technol., 33, 1523-1529, 2012.
- 3) S. Akao et al: Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure, Water Res., 41, 1774-1780, 2007.
- 4) L. Fitter et al: Activity and stability of a thermostable  $\alpha$ -amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation. Biochemistry. 40, 10723-10731, 2001.
- 5) T.F. Martinez et al: Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch, Electrophoresis, 21, 2940-2943, 2000.