

# PCR-DGGE 法を用いた生ごみの高温 L-乳酸発酵における微生物群集の時系列解析

環境計画研究室 榮 祐介

## 1. はじめに

生ごみの資源化技術として我々は高温 L-乳酸発酵を提案し、同技術の実用化について検討してきた。しかし、高温 L-乳酸発酵において腐敗した生ごみを原料として用いた場合、培養温度や pH といった培養条件が揃わない過渡期に D-乳酸が生成される場合がある。これには L-乳酸生成菌以外の微生物群集が影響していると考えられるが、生ごみに由来する発酵槽内の微生物群集構造さらには D-乳酸生成に関与している菌種は明らかになっていない。本研究では、実際の生ごみを用いて高温 L-乳酸発酵を行い、PCR-DGGE 法により高温 L-乳酸発酵過程における微生物群集の時系列変化を確認し、D-乳酸生成に関与する菌種を推定した (n=3)。併せて、D-乳酸生成菌の排除方法を検討した。図-1 に本研究の構成を示す。なお、PCR-DGGE 法は微生物群集構造の変化を把握する手段として近年多用されている方法である。

### 1. 生ごみの採取および高温 L-乳酸発酵

① 生ごみを用いた高温 L-乳酸発酵の実施 (n=3)

### 2. 高温 L-乳酸発酵における微生物群集解析

- ② DNA抽出方法の検討
- ③ 生ごみ中の微生物群集構造の把握
- ④ 高温 L-乳酸発酵における微生物群集の時系列解析 (n=3)

### 3. 特異プライマーの開発

- ⑤ プライマー設計・特異性確認・合成
- ⑥ PCR反応条件(アニーリング温度)の最適化
- ⑦ PCRおよびDGGEによるD-乳酸生成菌の同定

### 4. D-乳酸生成菌の排除方法の検討

- ⑧ *Lactobacillus sakei* と *Bacillus coagulans* の競合
- ⑨ *Lactobacillus sakei* による高温乳酸発酵

図-1 本研究の構成

## 2. PCR-DGGE 法

PCR-DGGE 法は、PCR により増幅した 2 本鎖 DNA を、濃度勾配をつけた DNA 変性剤を含むポリアクリルアミドゲル中で電気泳動することで、同じ長さの複数種の 2 本鎖 DNA でさえも塩基配列の違いにより分離できる方法である。図-2 に DGGE 法の原理を示す。塩基配列の異なる 2 本鎖 DNA は異なる変性剤濃度で解離するため分離できることになる。本研究では、EUB341f-GC と UNI518r のプライマーセットで PCR を行った。DGGE では、変性剤の濃度勾配を 15-55% とし、60°C、130V、5 時間の電気泳動を行った。

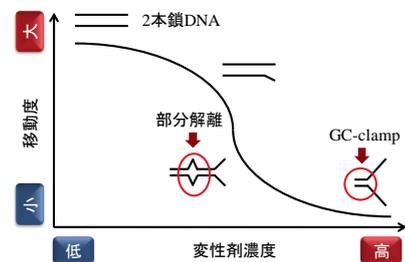


図-2 DGGE 法の原理(須賀ら 2005<sup>1)</sup>)

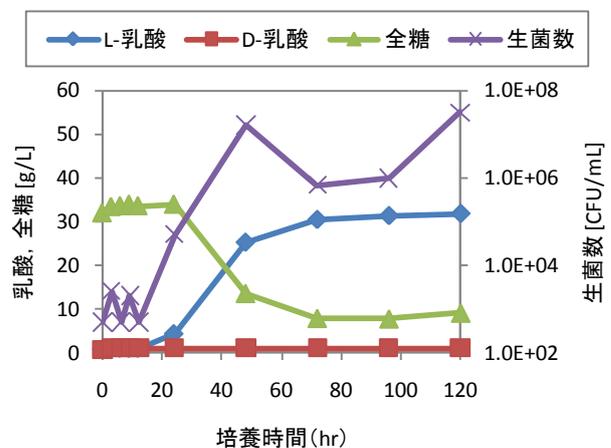


図-3 生ごみの高温 L-乳酸発酵の経時変化

## 3. 高温 L-乳酸発酵における微生物群集の時系列解析

生ごみの高温 L-乳酸発酵過程における微生物群集の時系列変化および D-乳酸生成に関与する菌種を確認した。図-3 に生ごみの高温 L-乳酸発酵の経時変化を示す。24 時間後から高温 L-乳酸発酵が安定し、120 時間後の終端 L-乳酸濃度は 31.7g/L であった。一方で、培養を開始してから 3 時間後に D-乳酸が 0.3g/L 生成され、発酵槽内に D-乳酸を生成する菌種が存在することが示唆された。なお、以後の D-乳酸生成は確認されなかった。

図-4 に高温 L-乳酸発酵における DGGE バンドプロファイルを示す。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。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。その中でも図-4 中の C3, C4, C5 のバンド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消えていることが伺える。一方、C1, C2 のバンドは培養期間中常に確認できた。

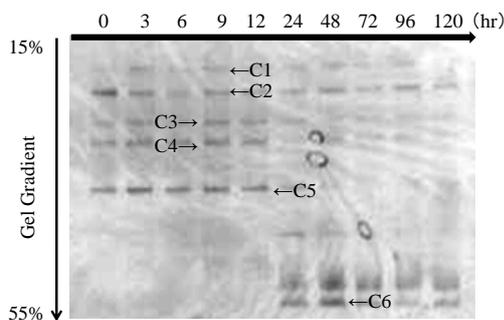


図4 高温 L-乳酸発酵における DGGE バンドプロファイル  
各バンドについて塩基配列を解読し、相同性検索プログラム BLASTn により相同性検索を行った結果、培養期間中常にバンドが確認できた C1 は D-L-乳酸菌である *Weissella* sp. PSMS4-4 (99%), C2 は D-乳酸菌である *Leuconostoc* sp. F12 (99%) に近縁であった。培養途中でバンドの消えた C4 は D-L-乳酸菌である *Lactobacillus sakei* (92%), C5 は L-乳酸菌である *Lactococcus lactis* (97%) に近縁であった。なお、C3, C6 については、DGGE を繰返してもバンドの分離ができず、塩基配列が解読できなかつた。ただし、C6 は植菌した *Bacillus coagulans* を泳動した位置と重なることから、24 時間後から確認できた同バンドは *B. coagulans* によるものと推察している。以上より、本研究では D-乳酸を生成する可能性がある菌種として C1, C2, C4 の近縁種を候補と考えた。さらに D-乳酸生成と消えるバンドの関係に着目し、C4 のバンドで確認された *Lb. sakei* の排除を試みた。

#### 4. 特異プライマーの開発

Primer3Plus により *Lb. sakei* に特異的と考えられるプライマーである LS168f および LS641r を開発し、菌種同定を試みた。表-1 に設計した特異プライマーを示す。同プライマーセットを用いて高温 L-乳酸発酵の発酵液から抽出した DNA (C<sub>0</sub> とする) を PCR に供した。図-5 にアガロースゲル電気泳動の結果を示す。PCR により目的とする長さ (500bp 程度) に増幅でき、PCR 産物の塩基配列を解読した結果、*Lb. sakei* に 100% と高い相同性を得た。本研究では、先の DGGE で確認できた C4 のバンドを *Lb. sakei* と推定した。

#### 5. D-乳酸生成菌の排除

*Lb. sakei* の DGGE バンドが消えた原因として、55°C という高温条件を考えた。そこで、55°C, pH5.5 の培養条件での *Lb. sakei* の挙動を把握するため高温乳酸発酵を行った。併せて、比較系として *Lb. sakei* の至適温度である 37°C でも行った。図-6 に *Lb. sakei* を用いた高温乳酸発酵の結果を示す。37°C においては、生菌数の上昇にともなって 72 時間の培養で L-乳

表-1 設計した特異プライマー

	シーケンス (5'→3')	PCR増幅長さ(bp)
LS168f	AAAACCTAACACCGCATGGT	474
LS641r	CAGTTTCCGATGCACTTCTTC	

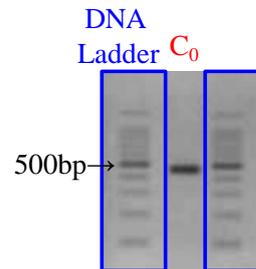


図-5 アガロースゲル電気泳動の結果

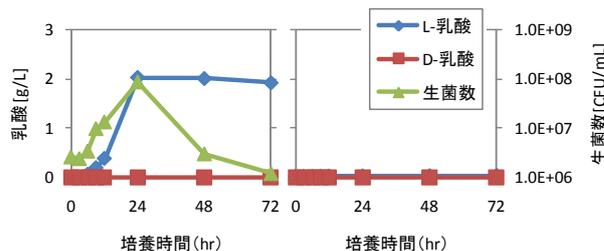


図-6 *Lb. sakei* による高温乳酸発酵(左:37°C, 右:55°C)  
酸が 1.9g/L 生成された。一方、55°C では乳酸濃度、生菌数の結果から *Lb. sakei* は生育しないことがわかった。以上より、*Lb. sakei* の排除方法として培養温度を 55°C にすることが有効であることがわかった。しかし、生ごみの高温 L-乳酸発酵で用いた 1L の反応器が 55°C に達するのに約 1 時間を要したことから、今後同技術の実用化に向けて反応器をスケールアップする際には、この培養条件が揃わない過渡期をいかに短縮できるかの検討が必要であると考えられる。一つの提案として、現状の実験設備では恒温水槽による反応器外部からの加温を行っているが、より効率的な加温方法として反応器内部から直接加温することも考えられる。また、この過渡期を短縮するための運転方法として、連続的な培養が求められる。連続的な培養では、途中で発酵液の一部を引抜き、新たに生ごみを供給するため回分培養のような急激な温度低下は避けられる。

#### 6. まとめ

本研究では、PCR-DGGE 法を用いて生ごみの高温 L-乳酸発酵過程における微生物群集の時系列変化を確認した。併せて、特異プライマーを開発することにより、D-乳酸生成菌を推定し、その排除を確認した。

#### 参考文献

1) 須賀ら, 日本土壤肥料学雑誌, Vol. 76, No. 5, pp. 649-655, 2005