

令和 4 年 4 月 24 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04675

研究課題名(和文) 分子設計されたキトサン-L-乳酸塩を経由する新規のL-乳酸製造プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of a new L-lactate purification process via chitosan lactate

研究代表者

赤尾 聡史 (Akao, Satoshi)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：30448196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマスプラスチックであるポリ乳酸の製造コスト低減化には、発酵液からの乳酸精製法の改善が必要とされる。本研究では、乳酸カルシウム晶析法に代わりキトサンを用いた乳酸塩による乳酸精製方法を提案した。乳酸発酵過程でキトサンを中和剤として用いてキトサン乳酸塩を生成し、アセトンを用いた貧溶媒添加法によりキトサン乳酸塩を培養液から回収する方法を示した。また、キトサン乳酸塩をアンモニア水中に添加することで、乳酸アンモニウムとキトサンを分離回収できることを示した。発酵液からのキトサン乳酸塩の回収あるいはアンモニア水中におけるキトサンの回収において、キトサンは高分子であるほうが有利であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、バイオマスプラスチックであるポリ乳酸の製造コスト低減化に資するものとして実施した。カルシウムを用いた乳酸精製法の課題であった濃縮に伴う不純物混入や廃棄物(石膏)の生成を解決するため、カルシウムに代わってキトサンを用いたプロセスの検討、濃縮を必要としない塩沈殿法の検討、廃棄物を避けるべくキトサン再利用プロセスの検討を行った。結果として、乳酸生成菌によるキトサン乳酸塩の生成、アセトンを用いたキトサン乳酸塩の沈殿回収、アンモニア水を用いたキトサンと乳酸アンモニウムの分離回収を示し、キトサン乳酸塩を経由する新規の乳酸精製法が提案できた。

研究成果の概要(英文)：Optically pure lactate is a raw material for biodegradable polylactic resin. Such lactate is produced by fermentation, and lactate purification from cultivation broth remains a critical issue for reducing the production cost of polylactic resin. Crystallization of calcium lactate is a popular process for its purification; however, the process requires condensed calcium lactate solution, and calcium sulfate is produced as waste in the final step for liberation of lactic acid. This study investigated the purification process via chitosan lactate. Chitosan l-lactate was made using chitosan as a neutralizer in lactate fermentation. Anti-solvent crystallization was applied to recover chitosan lactate, and acetone was worked as an anti-solvent to precipitate lactate chitosan. Finally, ammonium lactate and chitosan were obtained separately by adding chitosan lactate into aqueous ammonia. The recovery ratio of lactate and chitosan was almost 100% when using high molecular chitosan.

研究分野：有機性廃棄物利用

キーワード：キトサン乳酸塩 ポリ乳酸 乳酸発酵 包括固定化法 貧溶媒添加法 乳酸アンモニウム キトサン再利用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脱化石資源、あるいは、地球規模でのプラスチック廃棄問題が、生分解性を有するバイオマスプラスチックへのニーズを再び喚起している。ただし、その製造コストの低廉化が課題である。主としてL-乳酸を原料とするポリ乳酸は、バイオマスプラスチックにおける主要樹脂であり¹⁾、物性的にも汎用樹脂に近いことから、安価なL-乳酸の調達が求められる。このL-乳酸は発酵により生産されることから、発酵・精製プロセスのより一層の効率化、特に製造プロセスにおいて50%以上のコストを占めるとされる精製プロセスの効率化が課題となる²⁾。また、持続性を考慮した再生可能な資源からの製造プロセス、あるいは、廃棄物を極力生み出さない製造プロセスの検討も重要である。

2. 研究の目的

本研究では、L-乳酸精製プロセスの効率化として、キトサンを利用した新規の精製プロセスの構築を目指した。従来、乳酸発酵において乳酸カルシウムを生成させ、これを晶析させるプロセスがある。ここでは、乳酸発酵において中和剤をカルシウムに代わりキトサンとし、キトサン乳酸塩の生成を行った。乳酸発酵の培養液からキトサン乳酸塩を回収する際は、乳酸塩の濃縮を必要とする従来の晶析法から濃縮を必ずしも必要としない貧溶媒添加法の適用を試みた。あるいは、高級アミンを用いて有機溶媒側に乳酸塩を抽出する Reactive extraction があるが、これと溶質-溶媒関係を逆転させ、有機溶媒に溶解しにくい乳酸塩の性質を利用して沈殿回収する方法とも言える。沈殿回収されたキトサン乳酸塩は、キトサンより強塩基の水溶液に展開することで、キトサンの沈殿回収と水溶液中の新たな乳酸塩の分離回収を検討した。以上の検討を通じて、従来石膏として廃棄物処分されていたカルシウムに代わり同プロセスで再利用可能なキトサンを回収する廃棄物生成量の少ないプロセス提案を目指した。また、キトサンは、地球上でセルロースに次ぐ賦存量を誇る多糖であるキチンから脱アセチル化で製造できる多糖であり、再生可能な資源である。

3. 研究の方法

(1)キトサンオリゴ糖を用いた乳酸発酵

キトサン乳酸塩の生成を目的に、キトサンを乳酸発酵における中和剤とした。ここでは、キトサンオリゴ糖(東京化成工業)を乳酸発酵における中和剤とする検討を行った。また、乳酸発酵における乳酸生成菌として、*Bacillus coagulans* JCM2258 株を用いた。

キトサンオリゴ糖の抗菌試験

キトサンは、一般的に抗菌性を有することが知られている³⁾。そこで、中和剤として用いるキトサンオリゴ糖の *B. coagulans* に対する抗菌性を確認した。抗菌性は、経時的なATP測定と試験前後の生菌数(CFU)カウントにより確認した。抗菌試験では、2%キトサンオリゴ糖水溶液5 mL、2.5倍濃縮のLB培地4 mLおよび *B. coagulans* 培養液(LB培地)1 mLを混ぜ合わせ、55の振とう培養を行った。繰り返し数は3回とした。ATP測定では、ATP発光キット(東洋ビーネット, LL100-1-2)とルミテスター(キッコーマン, C-110)を用いた。ATPの抽出および発光は、キットマニュアルおよび下水試験方法に基づいて行った。CFU測定では、Dextrose Tryptone Agar (BD Difco)を用いて作成した平板培地を用いた。

キトサンオリゴ糖の脱塩素化

本研究で用いたキトサンオリゴ糖は、HPLC(カラム:TSKgel SuperIC-A/C, 検出器:電気伝導度計)の測定より塩酸塩であることを確認した。塩酸塩のままでは乳酸発酵の中和剤として利用できないため、脱塩素化を行った。0.3 mol L⁻¹水酸化ナトリウム水溶液(富士フィルム和光, 特級)15 mLにキトサンオリゴ糖0.5 gを添加し、攪拌した。その後、アセトン(富士フィルム和光, 特級)30 mLを添加し、遠心分離(8,000×g, 2分)を行った。上澄み液を除去し、沈殿に対して蒸留水とアセトンを用いて洗浄を行った。沈殿物は遠心濃縮機(タイテック, VD-300R)を用いて、減圧下30で乾燥させた。

包括固定化による乳酸発酵

包括固定化を行った *B. coagulans* を用いてL-乳酸発酵を行った。発酵槽は55のホットバスに浸漬させ、pHコントローラ(日伸理化, NPH-690D)とチューブポンプによる中和剤供給によりpH6.0を維持した。中和剤は2.5%キトサンオリゴ糖水溶液とし、繰り返し数は2回とした。包括固定化について、まず、濃縮した *B. coagulans* 培養液を3%アルギン酸ナトリウム水溶液と混合し、4%塩化カルシウム水溶液に滴下した後1晩冷蔵庫で保存した。乳酸発酵について、20 g L⁻¹グルコース水溶液と2.5倍濃縮のLB培地を作成した。次に、グルコース水溶液25 mL、

LB 培地 25 mL を 100 mL ビンに加え、ここに固定化した *B. coagulans* を添加した。L-乳酸濃度は HPLC (カラム: SUMICHIRAL OA-5000L, 検出器: UV-VIS 計) にて測定した。

(2)キトサン乳酸塩に対する貧溶媒の検討

キトサン乳酸塩の作成

高分子キトサン乳酸塩とキトサンオリゴ糖乳酸塩を作成した。高分子キトサン乳酸塩について、L-乳酸(富士フィルム和光, 特級) 5 mL を溶解させた L-乳酸水溶液 1 L に、キトサン 100 (富士フィルム和光純薬) を 20 g 添加し、分散させた。水溶液をろ過し、ろ過後の水溶液を遠心濃縮機で乾燥させ、高分子キトサン乳酸塩を回収した。キトサンオリゴ糖乳酸塩は、1% L-乳酸水溶液 8 mL にキトサンオリゴ糖 0.2 g を添加し、十分攪拌することで作成した。その後、アセトン 40 mL を添加し、攪拌した後、遠心分離し、キトサンオリゴ糖乳酸塩を回収した。

貧溶媒の選定

貧溶媒候補として、メタノール、エタノールおよびアセトン(いずれも富士フィルム和光, 特級)を対象とした。約 2% の高分子キトサン乳酸塩水溶液に対して、各溶媒を段階的に添加した。十分に攪拌後、遠心分離 (8,000 g × 5 分) し、沈殿生成の有無を観察した。

キトサン乳酸塩の回収率変化

高分子キトサン乳酸塩水溶液 (1%) とキトサンオリゴ糖乳酸塩水溶液 (1%, 5%) を対象に、貧溶媒効果が観察されたアセトンを段階的に添加することでキトサン乳酸塩の回収率を求めた。各水溶液にアセトンを添加し、十分に攪拌した。その後、遠心分離 (8,000 g × 5 分) し、上澄み液を除去した。得られた沈殿物は遠心濃縮機を用いて乾燥させ、乾燥重量から回収率を求めた。繰り返し数は 3 回とした。

(3)キトサン乳酸塩からの乳酸とキトサンの分離回収

水溶液と沈殿の回収

キトサン乳酸塩を 28~30% のアンモニア水 (富士フィルム和光純薬, 特級) に添加することで、キトサンと L-乳酸 (L-乳酸アンモニウム) への分離を試みた。アンモニア水 10 mL に高分子キトサン乳酸塩およびキトサンオリゴ糖乳酸塩をそれぞれ 0.1 g 添加し、攪拌した。遠心分離 (8,000 g × 5 分) の後、沈殿物と L-乳酸を含むと考えられる上澄み液を分離した。繰り返し数は 3 回とした。

沈殿物の定性分析と操作前後の L-乳酸収支

沈殿物がキトサンであるかを判断するため、キトサン呈色反応を行った⁴⁾。1% 酢酸水溶液 (富士フィルム和光, 特級) 10 mL にアンモニア水中の沈殿物 (高分子キトサン乳酸塩およびキトサンオリゴ糖乳酸塩からの沈殿物) 20 mg を溶解させた。比較対象として、1% 酢酸水溶液 (ブランク)、キトサン 100 を含む 1% 酢酸水溶液、キトサンオリゴ糖を含む 1% 酢酸水溶液を用意した。L-乳酸の収支を算出するため、作成したキトサン乳酸塩、アンモニア水中にキトサン乳酸塩を添加した際の上澄み液および沈殿物中の L-乳酸量を測定した。L-乳酸濃度は HPLC にて測定した。

4. 研究成果

(1)キトサンオリゴ糖を中和剤とする乳酸発酵

キトサンオリゴ糖の抗菌試験結果

キトサンオリゴ糖が 1% 含まれる培地条件における *B. coagulans* JCM2258 に対する抗菌試験を実施した。3 日間の培養における ATP 濃度の変化について、コントロールが順調に ATP 濃度の上昇を示したことに對して、キトサンオリゴ糖添加系では培養開始時より ATP 濃度が減少した。計測値が定量下限以下であり、用いた分析法では生菌が確認されないレベルにあった。培養開始時と終了時の CFU 変化について、培養開始時は 1.8×10^7 CFU mL⁻¹ であったが、キトサンオリゴ糖添加系では培養終了時に生菌が確認されない ($< 10^5$ CFU mL⁻¹) 結果となった。一方、コントロールは 5.1×10^8 CFU mL⁻¹ まで増加した。以上の結果から、キトサンオリゴ糖が少なくとも 1% 含まれる環境において *B. coagulans* JCM2258 は抗菌作用を受けることが確認された。従って、後述するキトサンオリゴ糖を中和剤とする乳酸発酵では、菌株を保護する目的から包括固定化を行うこととした。

包括固定化による乳酸発酵結果

包括固定化された *B. coagulans* を用い、2.5% キトサンオリゴ糖水溶液により pH を 6.0 に維持しながら L-乳酸発酵を行った。図-1 に、培養期間における生成した L-乳酸量の変化を示す。

キトサンオリゴ糖を中和剤として用いた発酵において、継続してL-乳酸の生成が行えることを確認した。一方で、脱塩素化したキトサンオリゴ糖の供給量の課題から、濃度の高いグルコース水溶液を用いた乳酸発酵が実施できなかった。また、キトサンオリゴ糖が乳酸発酵に必要な栄養分を凝集させる懸念についても、ここではグルコース濃度に対して非常に高濃度の栄養分を用意することで問題を回避した。今後は、生成するL-乳酸の高濃度化、高収率化、そして栄養量の最適化を図っていく必要がある。

(2)キトサン乳酸塩に対する貧溶媒の検討結果 貧溶媒の選定

2%高分子キトサン乳酸塩水溶液の1倍量に対してメタノール、エタノールおよびアセトンを用いて段階的に追加添加した結果、アセトンのみ沈殿が生じた(2倍量添加以降)。メタノールとエタノールは5倍量添加時点においても沈殿が認められなかった。キトサン乳酸塩を回収する貧溶媒として、アセトンが機能することを確認した。

キトサン乳酸塩の回収率変化

高分子キトサン乳酸塩水溶液(1%)とキトサンオリゴ糖乳酸塩水溶液(1%,5%)に対し、段階的にアセトンを追加添加することで回収したキトサン乳酸塩の回収率の変化を図-2に示す。3種類の水溶液すべてにおいて、アセトン添加量が増加するとキトサン乳酸塩の回収率が増加した。1%高分子キトサン乳酸塩水溶液と1%キトサンオリゴ糖乳酸塩水溶液を比べると、高分子キトサン乳酸塩水溶液のほうが少ないアセトン添加量で高いキトサン回収率を示した。また、1%と5%のキトサンオリゴ糖乳酸塩水溶液を比べると、5%水溶液の方が少ないアセトン添加量で高いキトサン回収率を示した。以上のことから、より高分子のキトサンあるいはより高濃度のキトサン乳酸塩であるほど貧溶媒効果の影響を受けやすく、沈殿物を形成しやすいと考えられる。

(3)乳酸とキトサンの分離回収

キトサンの定性分析結果

アンモニア水に高分子キトサン乳酸塩およびキトサンオリゴ糖乳酸塩を加えた結果、いずれのキトサン乳酸塩からも沈殿が生じた。アンモニア水中にキトサン乳酸塩を添加して生じた沈殿物および試薬のキトサン(キトサン100,キトサンオリゴ糖)に対して、キトサン呈色反応を実施した。各キトサン水溶液(濃度800~1,300 mg L⁻¹)に対する発色後の吸光度を図-3に示す。図-3から、アンモニア水中に沈殿させたキトサン乳酸塩のプロットは、概ね原点とキトサン100のプロットを結ぶ直線近傍に分布していることが確認できた。呈色反応の原理⁴⁾から、同法で糖全般は発色すると考えられるが、アンモニア水中へはキトサン乳酸塩以外の糖成分を添加していない。以上から、沈殿物の大部分はキトサンと想定された。

キトサンの回収率

アンモニア水中で生じた沈殿がキトサンあるいはキトサンオリゴ糖と考え、式(1)によってキトサンの回収率を求めた。ここで、260と170はそれぞれキトサン乳酸塩のモノマー単位分子量とキトサンのモノマー単位分子量を示す。これらは、グルコサミンとN-アセチルグルコサミンの分子量からグリコシド結合による水分子の分子量を差し引いた値と、キトサン中の両モノマ

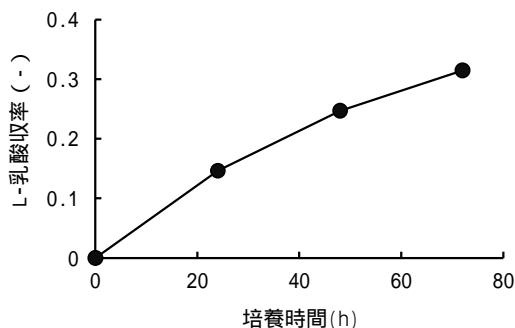


図-1 キトサンオリゴ糖を中和剤とするL-乳酸発酵結果(繰り返し数2回)。

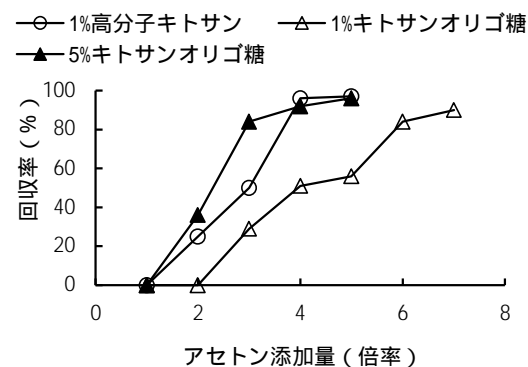


図-2 キトサン分子量および濃度の違いによるキトサン乳酸塩回収率の変化。

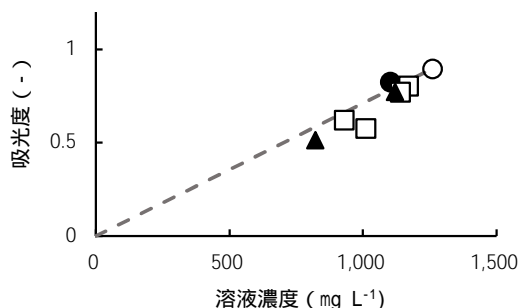


図-3 キトサンの呈色結果。破線は、比較対象としたキトサン100水溶液の吸光度プロット(○)と原点を結んでいる。

○:キトサンオリゴ糖, □:高分子キ

トサン(アンモニア水中の沈殿物),

△:キトサンオリゴ糖(同沈殿物)。

一の存在比（8：2と仮定，試薬仕様における脱アセチル化度80%以上より）から求めた．

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{沈殿物重量} \times 260}{\text{キトサン乳酸塩添加量} \times 170} \times 100 \quad (1)$$

高分子キトサン乳酸塩およびキトサンオリゴ糖乳酸塩を添加した場合の回収率を求めた結果，それぞれ $98.6 \pm 0.9\%$ と $91.5 \pm 3.7\%$ と求めた（平均 \pm S.E.）．高分子キトサンを用いたほうが，回収率が高まる傾向が伺えた．

乳酸の回収率

アンモニア水に添加する前のキトサン乳酸塩，アンモニア水に添加後の沈殿およびアンモニア水溶液にある乳酸量を測定し，L-乳酸の回収率，すなわち，キトサン乳酸塩からアンモニア水中に移行したL-乳酸の割合を求めた．その結果，高分子キトサン乳酸塩を用いた場合は99%，キトサンオリゴ糖乳酸塩を用いた場合は92%のL-乳酸がアンモニア水溶液中へ移行したと求めた．キトサンの回収率と同様に，キトサン乳酸塩中のキトサン分子量が大きいほど乳酸の移行率が高まった．

キトサンと乳酸回収におけるキトサン分子量の影響

キトサンおよびグルコサミンのアミノ基の共役酸 pKa はそれぞれ $6.4^{(5)}$ と $12.3^{(6)}$ とされる．両者の関係から，グルコサミンの重合度が高まると pKa が低下すると考えると，キトサンオリゴ糖の pKa はキトサンよりも大きいと予想される．このことから，アンモニア水中において，キトサンオリゴ糖はわずかながらカチオンとして存在したと考えられる．この点が，キトサン回収においてキトサンオリゴ糖を用いた場合の回収率の低下につながったのであろう．また，水溶液中への乳酸移行率が低下する点は，沈殿したキトサンオリゴ糖も，分子内の一部でアンモニウムカチオンが残り，これと乳酸により塩を形成したため沈殿に乳酸が含まれていたからと考えられる．

キトサン乳酸塩から乳酸とキトサンを分離回収する際には，高分子キトサン乳酸塩を用いることが有利であると考えられる．また，キトサン乳酸塩を貧溶媒効果で沈殿回収する際も，高分子キトサンを用いることが有利であった．以上から，キトサン乳酸塩を経由して乳酸生成並びにキトサン回収を行う場合は，高分子のキトサンを用いることが有利と言える．一方で，約3%の高分子キトサン乳酸塩水溶液（約1%乳酸）は，試しに作成したところ水溶液としての流動性が完全に失われた．乳酸発酵において乳酸濃度1%は非常に低濃度であることから，3%を上回るキトサン乳酸塩水溶液でも流動性が保てるようにキトサンを加工すること，例えば，提案したプロセスにおいて乳酸とキトサンの回収率を低下させない程度にキトサンを低分子化しておくことも重要と考えられる．

<参考文献>

- 1) 環境省，経済産業省，農林水産省，文部科学省：バイオプラスチック導入口ードマップ，2022年4月24日確認．
- 2) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K., Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnology Advances*, 31, 6, 877-902, 2013.
- 3) Goy Rejane C., Britto Douglas, Assis Odilio B. G., A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, *Ciência e tecnologia*, 19, 3, 241-247, 2009.
- 4) Mojumdar, A., Upadhyay, A. K., Raina, V., Ray, L., A simple and rapid colorimetric method for the estimation of chitosan produced by microbial degradation of chitin waste, *Journal of Microbiological Methods*, 158, 66-70, 2019.
- 5) 田村裕，再生資源としてのキチン・キトサン，*繊維と工業*，65，11，404-406，2009．
- 6) 大石雄基，ピリジン - アセチレン - フェノール骨格からなるオリゴマーの分子認識能とその応用に関する研究，富山大学学位論文論文要旨，2022年4月8日確認．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口竜世, 赤尾聡史, 高田雅史
2. 発表標題 キトサンを中和剤とする乳酸発酵法の検討
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤尾聡史, 竹内健人, 佐々木航介
2. 発表標題 キトサンを用いた乳酸精製方法の検討
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------