

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18560530
 研究課題名（和文） 非滅菌環境下におけるバイオマス資源からの半連続式 L-乳酸発酵の実用化に関する研究
 研究課題名（英文） Study on practical application of semi-continuous L-lactate fermentation of biomass resources without sterile condition
 研究代表者
 津野 洋 (TSUNO HIROSHI)
 京都大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：40026315

研究成果の概要：生ごみを対象にした効率的な非滅菌条件下での L-乳酸発酵技術を開発した。55℃の高温酸発酵では pH 5～6 の条件により、長期間にわたり安定して高光学純度の L-乳酸が生成できた。pH 調整剤の検討を行い、55℃、pH 5.5 の培養条件下で、アンモニア、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウムのいずれを用いても乳酸発酵を行えた。菌叢解析により *Bacillus coagulans* が独占して同定された。グルコースや乳酸による阻害影響を表す定数を算出し数理モデルを構築したところ、実験結果がおおむね再現された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	600,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：環境技術、廃棄物再資源化、発酵、乳酸、生ごみ、数理モデル

1. 研究開始当初の背景

本研究は、著しい需要の増大が予想される生分解性プラスチックであるポリ乳酸の原料として使用可能な L-乳酸を、生ごみといった有機性廃棄物などのバイオマス資源から安価で容易に製造するプロセスの開発を意図している。L-乳酸は、現在有機性廃棄物から製造される製品（例えばコンポスト）と比較して商品価値が高い。従って、本研究で課題としているプロセスが完成すれば、経済的に自立できる有機性廃棄物の資源化プロセスとなる可能性が高く、国家的目標であるバ

イオマス資源の利活用を推進する上で社会全体に与える影響も非常に大きいと考えられる。

ポリ乳酸の合成で重要となる光学純度の高い L-乳酸の生成は、植物由来の有機物の発酵により主になされているが、一般には、*Lactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属の細菌や *Rhizopus oryzae* のような真菌の純粋培養で発酵が行われており、生成する乳酸異性体の純度を維持するためには、他の微生物の混入・汚染を厳格に防がなくてはならず、生産コストの上昇を招いていた。発酵の植物材料

としては、トウモロコシ、ジャガイモなどの多量の炭水化物含有作物が報告されているが、食糧問題の可能性や環境保全の観点から代替原料として、有機性廃棄物の可能性も報告されていた。このような観点から、より効率的で運転操作の容易な乳酸発酵技術の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、生ごみを対象とした効率的な非滅菌条件下での L-乳酸発酵技術を開発することを目的とした。そのために、まず生ごみを対象とした基礎的実験により、pH や温度などが乳酸発酵に及ぼす影響を実験的に検討するとともに、反応に関わる菌相解析を行った。発酵により得られた L-乳酸は、対となっている陽イオンの種によりナトリウム塩、カルシウム塩、アンモニア塩などで存在するので、発酵の際の pH 調整剤の検討も試みた。さらに、高温 L-乳酸発酵法の実用化を促すために、グルコースを主体とした単純基質培地も含めて様々な条件下での乳酸発酵の動力学解析を行い、数理モデルの構築および生ごみ培地での L-乳酸発酵への適用を試みた。分子生物学的手法により、関与する微生物群集の定量も同時に試みた。

3. 研究の方法

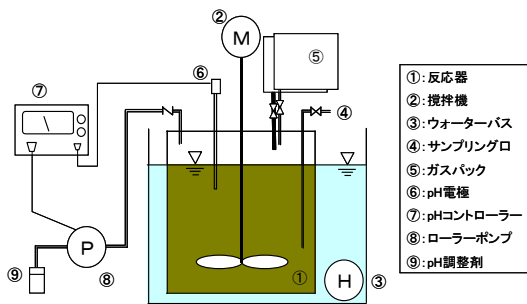


図-1 乳酸発酵装置の概略

(1) 実験装置

L-乳酸発酵実験で用いた、実験装置の概略を図1に示す。有効容積 1 L の反応器をウォーターバス中に設置し、反応温度の設定および維持を行った。所定 pH 値での制御は、pH コントローラーを用いて乳酸発酵の進捗に従い低下する pH に対処する目的で下限値 ON/OFF 制御を行い、コントローラーから起動・停止操作を受けるローラーポンプにより、各 pH 調整剤を供給する方法を採用した。培養を行うにあたって、予め反応器はオートクレーブにより 120°C で 30 分間の滅菌処理をした。また、反応器内の嫌気状態を保持するために、装置のセット完了後にヘッドスペース

を窒素ガスで充填し、また乳酸発酵に伴い発生するガスを捕集するガスバックとともに、サンプリング時に空気が混入しないように窒素ガスを充填したガスバックも取り付け、コックにより気体の流路を制御した。

(2) 実験条件

本研究では、グルコースを主体とした単純基質、および人工生ごみを使用した。人工生ごみの組成は、キャベツ 10%、ジャガイモ 10%、大根 10%、白菜 10%、ニンジン 10%、リンゴ 2.5%、オレンジ(皮)7.5%、バナナ(皮)10%、ご飯 10%、パン 2.5%、麺類 7.5%、挽肉 5%、魚 2.5%、卵 2.5% であり、実生ごみ組成に関する調査結果を参考にして決定したものである。TS は約 19%、COD は約 180g-COD/L および糖質は約 13% である。各食品は角切りにして構成比に従って秤量、混合し、ブレンダーによりスラリー状になるまで粉碎した後、使用時まで冷凍庫にて保存した。また、攪拌の都合により、作成した人工生ごみを蒸留水にて 2 倍に希釈したものを、生ごみ培地として滅菌操作を行わずに乳酸発酵実験に利用した。回分式実験の開始に当たっては発酵対象液 1 L に対して植種材料を 10 mL 植種し、L-乳酸発酵を行った。以下に示す 3 種類の発酵実験を行った

①半連続式培養

非滅菌条件において 2 倍希釈した模擬生ごみを基質に、半連続式培養により高温 (55°C) および中温 (37°C) 酸発酵を実施した。pH は 5~7 の範囲で、および水理学的滞留時間 (HRT) は 20~3 日 (COD 負荷率 5.2~34.4 g-COD/L-Reactor/日) の条件を設定した。

②pH 調整剤の検討

非滅菌条件において 2 倍希釈した模擬生ごみを基質に、55°C および pH 5.5 の条件下で回分式実験を行った。pH 調整剤の濃度はアンモニア水を基準に調整した。アンモニア水の濃度が高くなると、アンモニア水中からの揮発したアンモニアの発酵液中への溶け込みなどが起こり、pH が 5.5 より常に高い状態になると考えられるため、アンモニア水濃度が 7.5~12.5% の間のアンモニアを用いた回分式発酵の予備実験を行った。その結果、12.5% では常に pH が 7 以上となり乳酸発酵が行えなかったことと 10% 以下では pH 制御が可能で順調な L-乳酸発酵ができたことから、10% が適切であると判断した。そして、pH 調整剤添加による希釈の影響に差が出ないようにするために、各 pH 調整剤の 1 mL 中に含まれる水酸化物イオン濃度を、10% アンモニア水と等しくなるように調整して実験を行った。なお、この濃度であれば、水酸化カルシウム水溶液は白濁しており、添加する

際によく攪拌し毎回濃度が均一になるように心掛けた。

③阻害影響の検討

基質阻害や生成物の阻害影響を把握し、数値モデルの適用性を検証するために、グルコースを主体とした人工培地の回分式実験 (Test 1~3)、人工生ごみの回分式実験 (Test 4)、および人工生ごみとバナナ果皮を等量ずつ混合した基質の半連続式実験 (Test 5) の 5 つの実験を行った。人工培地には、栄養源としてポリペプトンと Yeast extract をそれぞれ 5 g/L となるよう添加した。pH は 5.5 で温度は 55°C とした。

(3) 分析方法

生ごみ培地および各培養実験によって得られた発酵試料を発酵期間中に経時的に採取し、それらについて、pH (ガラス電極法)、COD_{Cr} (Standard Method)、炭水化物 (フェノール硫酸法)、タンパク質 (ローリー・フォーリン法)、有機酸 (液体クロマトグラフィー法)、D-・L-乳酸 (液体クロマトグラフィー法)、および ATP (ルミカウンター法) を測定した。溶解性物質の分析では、0.45 μm フィルターにてシリンジろ過した試料を用いた。次式により光学純度を求めた。

$$\text{光学純度 (\%)} = \left| \frac{\text{L 乳酸} - \text{D 乳酸}}{\text{L 乳酸} + \text{D 乳酸}} \right| \times 100 \quad (1)$$

菌叢解析は、ランダムクローニング法により行った。そして、菌叢解析により判明した L-乳酸発酵で主要な微生物種である *Bacillus coagulans* の 16S rDNA を特異的に測定できるプライマーを製作し、発酵過程における菌数をリアルタイム PCR 法により測定した。リアルタイム PCR 法による *B. coagulans* の定量は、DNA の抽出を、発酵液から DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った。PCR は Light Cycler (Roche) にて、反応試薬 Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I (Roche) を用いて行った。定量プライマーは、BAC 0186F および BAC0447R を使い、PCR 条件は、初期変性を 95°C、10 分、サイクリングは、変性を 95°C、10 秒、アニーリングを 56°C、10 秒、伸長反応を 72°C、30 秒で、32 サイクルとした。検量線は、DNA 濃度既知サンプルの希釈列より作成した。

4. 研究成果

(1) 人工生ごみを対象とした半連続式培養

非滅菌条件において 2 倍希釈した模擬生ごみを基質に、半連続式培養により高温 (55°C) および中温 (37°C) 酸発酵を実施した。その結果、高温酸発酵でのみ pH 5~6 および水理

学的滞留時間 (HRT) 20~3 日 (COD 負荷率 5.2~34.4 g-COD/L-Reactor/日) の条件により、長期間にわたり安定して 90% 以上の光学純度を有する L-乳酸が生成できることを見出した。また、pH 6 の条件下では、乳酸濃度と乳酸収率がそれぞれ 32 g/L と 0.58 以上 (生成乳酸量/基質糖質量 [-]) となること、光学純度 93% 以上が安定して得られること、および基質中にあらかじめ存在する乳酸を考慮 (排除) して求めた生成乳酸に対する光学純度では 96% 以上が得られることを示した。生ごみ負荷率との関係では、HRT が 10 日から 3 日へ減少する (負荷率が增大する) に従い、光学純度が 92.8% から 94.5% へ向上し、乳酸収率が 0.73 から 0.58 へ減少し、乳酸以外の有機酸に対する乳酸の選択性 (COD 基準) が 97.0% から 93.5% へ低下する傾向が見られた。

(2) 人工生ごみを対象とした pH 調整剤の検討

ポリ乳酸合成過程を考慮すると、L-乳酸発酵過程での pH 調整剤として水酸化ナトリウムより、アンモニアがアルカリ剤として望ましいことが考えられた。pH 調整剤の高温 L-乳酸発酵への影響を検討した結果、pH 調整剤ごとに同様の終端乳酸収率や 98% 以上の光学純度が、純菌培養でないにも拘わらず得られることが示された。有機酸に対する乳酸の割合により、いずれの pH 調整剤を用いた場合もほとんど乳酸以外の有機酸の生成が起こっていないことがわかった。これは、糖質が乳酸以外の有機酸にならず、高効率で乳酸の生成が行えていることを表す。今回いずれの Run においてもガスの発生は見られなかった。これは、COD の値がほぼ変化していないことも一致する内容である。これらのことから、いずれの Run においても CO₂ の発生がなく、1 mol のグルコースから 2 mol の乳酸が生成するホモ乳酸発酵が起こっていたと考えられる。

終端 L-乳酸濃度、L-乳酸の光学純度および収率に関しては、pH 調整剤による差異を明確に断定できる傾向は見られなかった。ただし、水酸化カルシウムで pH を調整した場合の終端 L-乳酸濃度に関しては、アンモニアおよび水酸化ナトリウムで pH を調整した場合に比べて少し劣っていた。これは、本研究では溶解性の乳酸の濃度を HPLC で測定したため、生成した乳酸塩の溶解度の影響であると考えられる。いずれの pH 調整剤でも、基本的に糖質から一定の割合で乳酸の生成が行われ、その割合は収率により表示しうることが示されている。これより L-乳酸のアンモニア塩、ナトリウム塩およびカルシウム塩を pH 調整剤の選択により作り分けられることが示された。

乳酸生成に関与する微生物の活性の指標として ATP 活性を測定した結果例を図 2 に示す。運転開始から約 20~50 時間の間で、アンモニアおよび水酸化カルシウムで pH 調整した場合は急激に高くなり、一方、水酸化ナトリウムで pH 調整した場合は、あまり高くなり、低い状態で活性が維持されていることが示されている。これは前述の乳酸生成状況と一致する。また、両者は明らかなに対応した変化を示しており、ATP 活性を乳酸生成活性の指標として用いることが有用であることが分かる。また、これらの結果から、基質に生ごみを用いて非滅菌かつ 55℃ および pH5.5 で乳酸発酵を行う場合、水酸化ナトリウムよりも水酸化カルシウムおよびアンモニアの方が、乳酸生成菌の活性が高く、より速くより多くの乳酸が生成できるという点で pH 調整剤として優れていると考えられた。

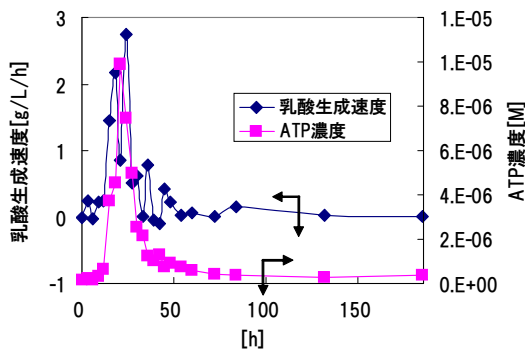


図 2 乳酸生成速度と ATP 濃度の比較例 (アンモニアによる pH 調整)

(3) 菌叢解析および定量

16S rDNA を利用した微生物群集解析により乳酸発酵に関与しているのは *Bacillus coagulans* と同定され、自然環境を含む生ごみ由来であることが確認された。微生物の活動状況を把握するために、分子生物学的手法を用いた微生物量の把握も試みた。*B. coagulans* の DNA 濃度の増減傾向と処理特性の傾向は一致しており、リアルタイム PCR 法により、*B. coagulans* の定量が可能であることが示された。処理特性の分析だけでは、実際面で必要な情報は入手可能であるものの、直接的な反応機構の担い手である微生物群の情報は間接的にしか得られない。本手法は、特に混合基質を対象とした発酵過程において、特定の微生物群の定量可能である点で有用となる。*B. coagulans* の DNA 濃度と菌体重量との相関関係を検討した結果、DNA 濃度を COD 値で除した値 (1 g-COD/L あたりの DNA 濃度) の平均値である 6.47×10^{10} (copies/g-COD) を換算係数とした。

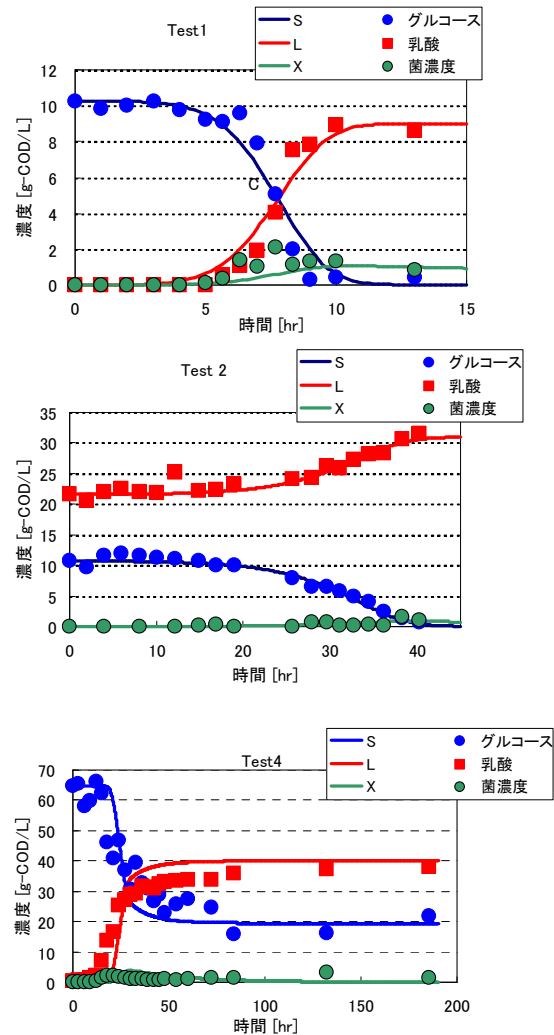


図 3 実験結果および計算結果例；曲線で表された S は全糖質濃度 (g-グルコース-COD/L)、L は乳酸濃度 (g-乳酸-COD/L)、X は菌体濃度 (g-*B. coagulans*-COD/L) の計算結果を、点は実験結果を示す

(4) 数理モデルの構築

主要な構成要素のモデルにおける経路の概略は、でんぷんが加水分解されてマルトースになりマルトースがさらに加水分解されてグルコースになる経路、スクロースが加水分解されてその半量がグルコースになる経路、グルコースが消費され一部が菌体の増殖に用いられ L-乳酸を生成する経路、および菌体が死滅・分解する経路である。各反応速度式は、速度定数や基質濃度を考慮した Michaelis-Menten の式などを組み合わせて表現した。実験結果により、基礎的なパラメータ値を求め、グルコースや乳酸による阻害影響を表す定数を算出した。本発酵法における生成物である乳酸の阻害形式は、Lineweaver-Burk プロットより非拮抗型と定めた。

得られたL-乳酸の光学純度は、Test1 および Test 2 では 100%を実現でき、Test 3 で 98.3%、Test 4 で 98.5%、Test 5 で 99.5%であった。そして、得られた値を組み込んだ数理モデルを構築した。モデルでの計算結果例を、実験結果と合わせて図3に示す。グルコースを主体とした人工培地の回分式実験 (Test1~3) および人工生ごみの回分式実験 (Test4) いずれの実験結果もおおむね再現されている。また、生ごみおよびバナナ果皮の混合培地を基質とした半連続式実験 (Test5) でモデル式を検証した結果、適用性が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

津野 洋, 赤尾聡史, 宮井公太郎, 日高平, 堀江 匠: 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, Vol. 44, pp. 471-480, 2007. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

赤尾聡史, 宮井公太郎, 堀江 匠, 津野洋: 高温L-乳酸発酵におけるバナナ果皮の基質化とその特性, 第43回環境工学フォーラム講演集, pp. 74-76, 2006年11月17日~19日, 函館.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津野 洋 (TSUNO HIROSHI)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 40026315

(2) 研究分担者

山田 春美 (YAMADA HARUMI)
京都大学・大学院工学研究科・助教授
研究者番号: 40089123<2006年度のみ>

西村 文武 (NISHIMURA FUMITAKE)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 60283636<2007~8年度のみ>

永禮 英明 (NAGARE HIDEAKI)
京都大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号: 60359776<2006年度のみ>

日高 平 (HIDAKA TAIRA)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 30346093