

(59) 半連続培養による未滅菌生ごみからの高光学純度 L-乳酸の生成

Production of L-Lactic Acid from Unsterilized Garbage in Semicontinuous Culture

赤尾聡史*、津野洋*

Satosi AKAO* and Hiroshi TSUNO*

ABSTRACT; In order to obtain L-lactic acid in high optical purity efficiently, acidogenic fermentation is investigated in semicontinuous culture with using unsterilized artificial garbage as a substrate. Reactors are kept under anaerobic conditions and fed with the garbage approximately every 2 days. The effects of fermentation temperature (thermophilic and mesophilic), pH (5 and 6) and hydraulic retention time (HRT of 20 and 10 days at pH 5, HRT of 10 and 5 days at pH 6) on composition of fermentation products are experimentally discussed in a series of operational conditions. Obtained lactic acid concentrations in the thermophilic culture broth are around 20 g/L at pH 5 and over 40 g/L at pH 6. Especially, at 10 days HRT and pH 6, the yield of the lactic acid (based on initial sugar concentrations) is nearly 100 %. Furthermore, the optical purity of L-lactic acid is maintained at more than 90 % under these operational conditions. In contrast the lactic acid concentrations in the mesophilic culture broth are around 20 g/L at pH 5 and below 10 g/L at pH 6. The optical purity of L-lactic acid is not constant but maintained below 20 % in this operation.

KEYWORDS; L-lactic acid, thermophilic acidogenesis, semicontinuous culture, garbage

1. はじめに

乳酸は、食品、医薬品などの工業用材料として需要が大きい。加えて近年、生分解性プラスチックであるポリ乳酸の原料としても注目を集めている。ポリ乳酸は、その物性から、将来汎用プラスチックの一角を占めるとの予測¹⁾もあり、そのため乳酸の需要量は大幅な増加が見込まれている。また、主に乳酸は、トウモロコシをはじめとする農作物より発酵によって生産されている²⁾³⁾。このことは、石油資源に依存する現在の汎用プラスチック原料とは一線を画するものであり、再生可能資源を原料とするという観点からもポリ乳酸および乳酸の需要は高まるものと予想される。

工業用材料として乳酸を見た場合、乳酸の持つ光学異性体組成はできる限り高純度であることが望ましい。例えば、ポリ乳酸は、原料である D-乳酸および L-乳酸の混合割合によって物性の調整 (生分解性の設計など) が可能であることが示されている⁴⁾。現在、広く発酵法により乳酸が生産されている理由は、発酵に関わる微生物を特定のものとしておくことで一方の光学異性体のみを産出させることができるからである⁵⁾。しかし、この点については、特定微生物により発酵を行う都合上、製造工程において雑菌などの混入によるコンタミネーションに格別の注意を払う必要がある。このことは、滅菌のための付帯設備やその工程を必要とすることから、乳酸の製造コストの上昇につながり、ひいてはポリ乳酸の汎用化の妨げとなることも懸念される。一方、滅菌工程を設けない発酵を試みる事例も存在する⁶⁾が、短期間の回分培養であり、光学純度も低いものであった。

* 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (Department of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University)

そこで本研究では、製造工程において滅菌を行わず、かつ長期間に渡る半連続培養によって光学純度の高いL-乳酸を得る方法について検討を行った。原料は、循環型社会の構築という観点も加味し、生ごみを選択した。生ごみは、現在都市ごみとして焼却処分されているものであるが、その高い含水率が焼却には非効率であり、むしろ豊富な栄養素を有効利用しようと、その利活用が活発に検討されている廃棄物である⁶⁾⁷⁾。

2. 実験方法

2. 1 実験装置

乳酸発酵の反応器として有効容積 1 L のセパラブルフラスコを用いた。反応器内の混合には攪拌機 (アズワン㈱、SM-104)、温度設定にはウォーターバス (アズワン㈱、TM-1)、pH 制御には pH コントローラー (㈱日伸理化、NPH-660) を用いた。なお、pH 調整は 10 N NaOH を用いて行った。また、反応器内を嫌気状態に保つため、実験に先立ちヘッドスペース部を窒素ガスにて置換した。さらに、2 つのガスパック (発生ガスの捕集用と窒素ガスを充填した発酵液引き抜き時の容積補充用) を反応器に取り付けた。

2. 2 基質

本研究では模擬生ごみを使用した。模擬生ごみの組成は実生ごみ組成に関する文献⁸⁾を参考に Table 1 のように決定し、これら材料をスラリー状となるまでミキサーにて破碎し、使用時まで冷凍庫および冷蔵庫にて保存した。この模擬生ごみの性状を Table 2 に示す。なお、本研究の基質としては模擬生ごみを蒸留水にて 2 倍希釈したものを使用した。

2. 3 実験条件

本研究での実験条件を Table 3 にまとめて示す。実験は、始めに種汚泥 900 mL および基質 100 mL を反応器に加えスタートした (Run 1-1 および Run 2-1)。以後の Run (Run 1-2、2-2 以降) では、新たに汚泥を入れ替えることなく継続して前の Run の汚泥を培養し続けた。そこで、本研究では馴致期間として HRT の 3 倍時間を想定し、それ以降の培養結果から各 Run の評価を下した。なお、種汚泥は、実験開始時に先立ち 1 年以上前から同研究室にて酸発酵目的に Run 1-0 および Run 2-0 の条件下で継続培養されていたものを用いた。

反応器の運転は、2 日に 1 回のペースにて発酵液の引き抜き、給餌を行った。なお、菌体量の保持を目的とする汚泥返送は行わず、従って HRT と Solids Retention Time (SRT) が等しい条件にて培養を行った。

Table 1. Components of artificial garbage

class	% ^a	foodstuff	% ^a
vegetables	50	cabbages	10
		potatoes	10
		carrots	10
		radishes	10
		celery cabbages	10
		apples	2.5
fruits	20	coats of oranges	7.5
		coats of banana	10
		rice	10
grain	20	bread	2.5
		noodles	7.5
		ground meats	2.5
meat	2.5	fishes	3.5
sea food	5	fish bone	1.5
eggs	2.5	eggs	2.5

a: wet weight basis

Table 2. Characters of artificial garbage

	Total	Soluble
TS (g/L)	192	-
SS (g/L)	86	-
VTS (g/L)	184	-
TOC (g-C/L)	70.2	43.6
T-N (mg-N/L)	3940	1310
T-P (mg-P/L)	424	364
Sugar (g-glucose/L)	124	86
Protein (g-albumin/L)	33	5
pH	4.85	-

Mean values in this work.

Table 3. Operational conditions

Thermophilic culture (55 °C)	Run 1-0	Run 1-1	Run 1-2	Run 1-3	Run 1-4
Mesophilic culture (37 °C)	Run 2-0	Run 2-1	Run 2-2	Run 2-3	Run 2-4
HRT (days)	4.5 (3.5 ^a)	20	10	10	5
COD loading (g-COD/reactor-L/day)	33.2 (42.6 ^a)	5	10	10	20
pH	6 (5 ^a)	5	5	6	6
Period (day)	-	1-99	100-159	171-222	223-288
Start-up Period (day)	-	1-60	100-129	171-200	223-238

a: Each value is for Run 2-0

Run 1-0 and 2-0 were seed stock cultures. SRT were operated at twice as long as HRT in Run 1-0 and 3 times in Run 2-0.

2. 4 分析方法

基質および発酵液を対象に、COD-cr⁹⁾、糖質（グルコース換算濃度；フェノールー硫酸法¹⁰⁾）、タンパク質（アルブミン換算濃度；ローリー・フォーリン法¹¹⁾）、揮発性有機酸（VFA s；（株）島津製作所、HPLC 有機酸分析システム、カラム；Shim-pack SCR-102H、電気伝導度検出器 CDD-10Avp）、D-, L-乳酸（（株）島津製作所、HPLC、カラム；SUMICHIRAL OA-5000、移動相；5% 2-propanol・1 mM CuSO₄、流量；0.8 mL/min、UV-VIS 検出器 SPD-10Avp；254 nm）について分析を行った。なお、溶存態成分は、0.45 μm フィルターにてろ過した試料を対象とした。

3. 結果および考察

3. 1 高温培養

Fig. 1 に基質中の糖質濃度と高温発酵液中の乳酸濃度の経日変化を示す。これによると、pH 5 で培養を行った Run1-1 および 1-2 では、乳酸濃度は 20 g/L 程度と概ね低い値であった。しかし、pH 6 とした Run 1-3 および 1-4 では、乳酸濃度が 40 g/L 以上となり基質中の糖質濃度に匹敵するまでに高まった。馴致期間（HRT の 3 倍時間を想定）を除く各試験期間の平均乳酸濃度および基質中の糖質濃度に対する乳酸の収率を Table 4 にまとめて示す。なお収率は、ホモ乳酸発酵において理論上グルコース 1 g から乳酸 1 g が生成される¹²⁾に基づいて計算した。

ところで、乳酸を対象物として精製、回収する場合、乳酸エステルの蒸留¹³⁾、乳酸の限外ろ過あるいは電気透析などによる膜分離¹⁴⁾などを行うことから、蒸留器へのスケールや焦げ付きあるいは膜への目詰まりを避ける目的で共存する乳酸以外の不純物（発酵残渣や副生成物）をできる限り少なくしておくことが望ましい。そこで、発酵液に溶存する成分について COD での評価を行った。発酵液中の溶存態 COD 値（D-COD 値）および主要な溶存成分（乳酸、糖質、タンパク質）の COD 換算値の経日変化を Fig. 2 に示す。これによると、pH 6 とした期間（Run 1-3 および 1-4）は、発酵液中の D-COD 値と乳酸の COD 換算値が漸近していることから、ろ過後に共存するその他の有機物が少なく、その後の乳酸精製に適した状態となっていると判断できる（Table 4 参照）。

3. 2 中温培養

Fig. 3 に基質中の糖質濃度と中温発酵液中の乳酸濃度の経日変化を示す。これによると、pH 5 とした Run2-1 および 2-2 では、乳酸濃度が約 20 g/L と低い値にて安定した。次に、pH 6 とした場合であるが、培養条件の変更に端を発した一時的な乳酸濃度の上昇が観察されたものの、その後乳酸濃度は 10 g/L 以下と著しく低い

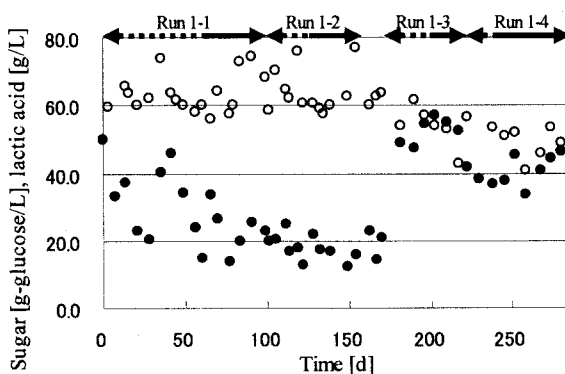


Fig. 1. Time courses of sugar conc. in the substrate and lactic acid conc. in the thermophilic cultural broth (○; sugar, ●; lactic acid).

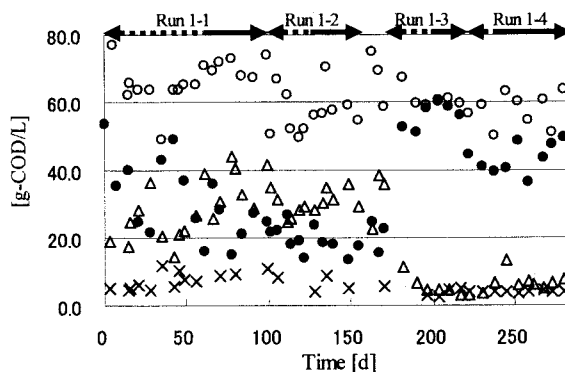


Fig. 2. Time courses of D-COD conc. and COD equivalent values of lactic acid conc., sugar conc. and protein conc. in the thermophilic cultural broth (○; D-COD, ●; lactic acid, △; sugar, ×; protein).

値となった。なお、培養条件変更による一時的な乳酸濃度上昇は Run 2-4 でも見られた。この場合も、培養の継続と共に徐々に乳酸濃度が低下し 10 g/L 以下となった。

発酵液中の D-COD 値に占める乳酸の COD 換算値割合は、他の有機酸（例えば、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、n-吉草酸）が多く出現したことから、試験期間を通じて低調に推移した（Table 4 参照）。

以上の結果より、中温かつ既述の培養条件（HRT、COD 負荷）における半連続培養では、高濃度の乳酸を安定して得ることが困難であると判断できる。なお、培養操作の変更による一時的な乳酸の蓄積（例えば、運転開始後 190 日目）では、生成有機酸の COD 換算値および発酵液中の D-COD 値に占める乳酸 COD 換算値の割合がどちらも 70 % を超える状況となった。このことは、短い HRT あるいは高い COD 負荷条件での半連続培養や回分培養を行えば、中温条件下でも効率的な乳酸生成が行える可能性を示唆していると考えられる。

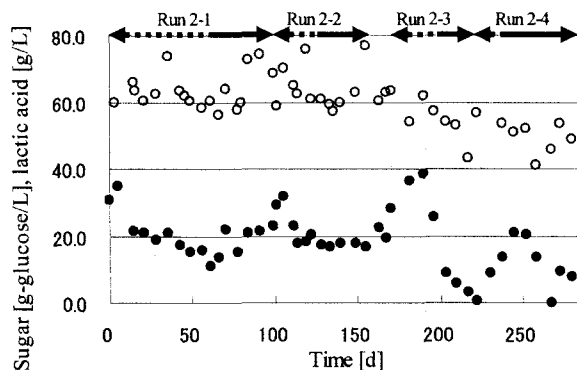


Fig. 3. Time courses of sugar conc. in the substrate and lactic acid conc. in the mesophilic cultural broth (○; sugar, ●; lactic acid).

Table 4. Summaries of a series of operational conditions

	Thermophilic culture				Mesophilic culture			
	Run 1-1	Run 1-2	Run 1-3	Run 1-4	Run 2-1	Run 2-2	Run 2-3	Run 2-4
LA conc. (g/L)	22.4	15.6	51.6	40.8	18.1	20.4	4.6	12.1
Yields of LA production (%) ^a	34.6	24.1	100	82.3	27.1	32.0	8.9	24.5
Ratio of LA to total VFAs in culture broth (%) ^b	92.5	95.3	98.0	96.7	37.4	44.5	9.6	29.2
Ratio of LA to D-COD in culture broth	34.0	29.3	92.2	75.9	31.7	44.1	7.5	20.5

Averages in test periods

LA : lactic acid

a ; Product yield was calculated as a percentage of the theoretical yield assuming 1 g lactic acid per 1 g glucose.

b ; COD basis

3. 3 光学純度

L-乳酸の光学純度は、HPLC にて測定した D-乳酸および L-乳酸の存在量から以下の式により求めた。

$$\frac{(L - \text{乳酸}) - (D - \text{乳酸})}{(L - \text{乳酸}) + (D - \text{乳酸})} \times 100 \quad (\%)$$

Fig. 4 に高温培養および中温培養における乳酸の光学純度の経日変化を示す。高温培養においては、Run 1-1 の条件により徐々に L-乳酸の全乳酸に対する割合が高まり、以後の Run では安定して 90 % 以上の高い光学純度（95 % 以上の L-乳酸割合）が得られた。一

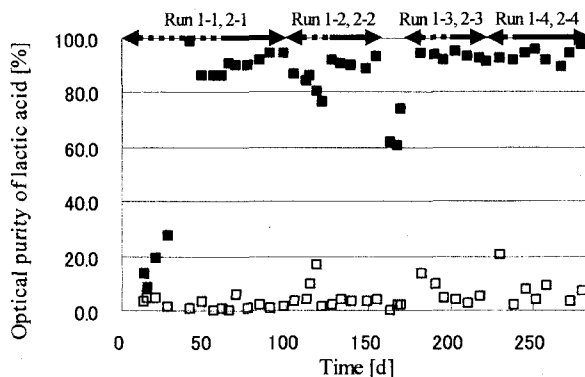


Fig. 4. Time courses of optical purities of lactic acid in the thermophilic and mesophilic cultural broth (■; thermophilic, □; mesophilic).

方、中温培養では、僅かにL-乳酸が多いものの、D-,L-乳酸がほぼ均等に存在する光学純度0%のラセミ体にて推移した。

次に、高温条件における光学純度（L-乳酸割合）の高まり、つまりL-乳酸を生成する菌群の優占化がRun 1-1の条件（pH 5、HRT 20日）だけに拠るものかどうかを確認するため、別途Run 1-3の条件（pH 6、HRT 10日）からの培養開始を試みた。なお、ここでは種汚泥を用いず、直接基質（模擬生ごみ）を培養条件に供することで光学純度（L-乳酸割合）の高まりを確認した。用いた実験装置はあらかじめオートクレーブ（120℃、30分）にて滅菌し、L-乳酸を生成する菌群の接触を極力排した。Fig. 5に基質中の糖質濃度、発酵液中の乳酸濃度および光学純度の経日変化を示す。L-乳酸は、徐々にその割合を高め、1 HRT 時間（10日間）の経過後、光学純度90%以上（L-乳酸割合95%以上）となった。これより、L-乳酸を生成する菌群の優占化はRun 1-3の条件（pH 6、HRT 10日）から始めても起こり得ることが確認された。また、高温培養がこれら菌群の優占化に必要な条件である可能性の高いこと、加えて、種汚泥を用いなかったことから、優占化すると考えられるL-乳酸を生成する菌群の起源は、模擬生ごみ中である可能性の高いことが推察される。Sakaiら⁹⁾は、特別な植種を行わず滅菌を施さない環境下にて中温、回分培養により模擬生ごみからの乳酸発酵を行ったが、その際に同定された乳酸菌が模擬生ごみ中にも存在したことを確認している。なお、Sakaiらは、最大45 g/Lの乳酸濃度と94%の生成有機酸に対する乳酸割合（重量比）を得ている。本研究の高温培養であるRun 1-3および1-4と比較すると、糖質濃度など模擬生ごみの性状が同程度であったことから、得られた乳酸濃度や生成有機酸に対する乳酸割合も同程度であった。しかし、光学純度について、SakaiらはL-乳酸を優勢とする光学純度が67%に留まっており、一方、本研究では90%以上を長期にわたり維持することができた。

4. 結論

本研究では、高い光学純度のL-乳酸を効率的に得ることを目的とし、未滅菌の模擬生ごみを基質とした長期間にわたる半連続培養を通じて培養条件の検討を行った。検討を行った条件は、培養温度、pHそしてHRTである。以下に本研究で得られた主な結果を示す。

（1）高温条件（55℃）にて行った培養（pH; 5および6、HRT; 5~20日）では、未滅菌の模擬生ごみを基質としたにもかかわらず、光学純度90%以上のL-乳酸が安定して長期間にわたり生成した。高温、HRT 5~20日（COD 負荷; 5~20 g-COD/reactor-L/日）の半連続培養により、L-乳酸を生成する菌群の優占化および維持が行えると推察される。

（2）高温かつpH 6の条件にて行った培養（HRT; 10日および5日）では、基質中の糖質をベースとした収率において80%を超える高収率にて乳酸が生成した。なお、HRT 10日の条件では、HRT 5日の場合と比べて、収率が向上するとともに、発酵液中のD-COD値に占める乳酸のCOD換算値割合が90%を超え、共存する有機物も少なく、その後の乳酸精製工程に対してより適した状態となった。

（3）中温条件（37℃）にて行った培養（pH; 5および6、HRT; 5~20日）では、生成したD-乳酸とL-乳酸の割合がほぼ等しい（光学純度0%）ラセミ体にて推移した。

（4）中温かつpH 6の条件で行った培養（HRT; 10日および5日）では、培養期間中に乳酸濃度が著しく

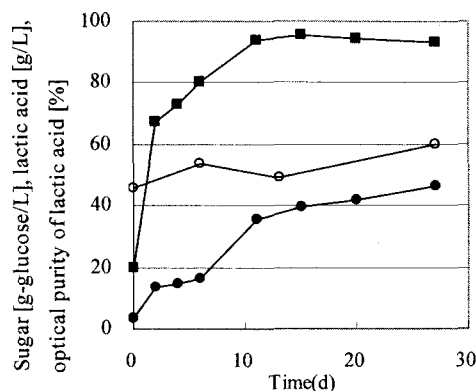


Fig. 5. Time courses of sugar conc. in the substrate, lactic acid conc. and optical purities of lactic acid in the thermophilic cultural broth without seed culture (○; sugar, ●; lactic acid, ■; optical purity).

低下した。ただし、pH、HRT (COD 負荷) 条件など培養環境の急激な変化が加えられると、一時的に乳酸濃度が上昇する特徴を有することも分かった。このことは、短いHRTあるいは高いCOD 負荷条件での半連続培養や回分培養を行えば、中温条件下でも効率的な乳酸生成が行える可能性を示唆していると考えられる。

(5) 高温、pH 6 かつ HRT 10 日の条件にて種汚泥を用いない模擬生ごみからの培養より、高い光学純度のL-乳酸生成が確認できた。このことは、高温培養がL-乳酸を生成する菌群の優占化に必要な条件である可能性の高いこと、また、これら菌群の起源が模擬生ごみである可能性の高いことを意味すると考えられる。

一連の結果より、高温、pH 6 かつ HRT 10 日に設定した培養条件が、収率、光学純度および共存有機物の面からより望ましいL-乳酸の発酵条件であると考えられる。これらの結果は、滅菌などの付帯設備や工程を要しない安価で容易な高光学純度L-乳酸製造法へと繋がるものと考えられる。

参考文献

- 1) 大島一史 (2003) 生分解性プラスチックの最新動向, JETI, 51, 4, 121-123
- 2) E. T. H. Vink, K. R. Rábago., D. A. Glassner and P. R. Gruber (2003) Application of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production, Poly. Degrad. Stab., 80, 403-419
- 3) K. Hofvendahl and B. Hahn-Hägerdal (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, Emzyme Microb. Technol., 26, 87-107
- 4) H. Tsuji (2002) Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made poly-lactides: effects of L-lactide content, tacticity, and enantiomeric polymer blending, Polymer, 43, 1789-1796
- 5) J. H. Litchfield (1996) Microbiological production of lactic acid, Adv. Appl. Microbiol., 42, 45-96
- 6) K. Sakai, Y. Murata, H. Yamazumi, Y. Yau, M. Mori, M. Moriguchi and Y. Shirai (2000) Selective proliferation of lactic acid bacteria and accumulation of lactic acid during open fermentation of kitchen refuse with intermittent pH adjustment, Food Sci. Technol. Res., 6, 140-145
- 7) H. S. Shin, J. H. Youn and S. H. Kim (2004) Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis, Int. J. Hydrogen Energy, 29, 1355-1363
- 8) 谷川昇、武本敏男、大木秀男、川崎照夫 (1997) 生ごみの細組成, 都市清掃, 50, 116-119
- 9) Standard methods for the examination of water and wastewater (1995). 19th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- 10) 福井作蔵 (1990) 還元糖の定量法 第2版, 学会出版センター
- 11) 片岡栄子、古庄律、安原義 (2003) 食品化学実験 第二版, 地人書館,
- 12) 金子 勉、森田英利、阿部敬悦、内田金治、山本直之、森下 隆 (1996) 乳酸菌の栄養・代謝, 乳酸菌研究集談会 編, 乳酸菌の科学と技術, 学会出版センター
- 13) 白井義人 (2002) 食品ごみからポリ乳酸をつくる, 地球環境, 10, 84-87
- 14) P. Yin, N. Nshina, Y. Kosakai, K. Yahiro, Y. S. Park and M. Okabe (1997) Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor, J. Ferment. Bioeng., 84, 3, 249-253