

(56) 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

津野 洋^{1*}・赤尾聡史²・宮井公太郎¹・日高 平¹・堀江 匠¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540京都市西京区京都大学桂)

²鳥取大学工学部社会開発システム工学科 (〒680-8552鳥取市湖山町南4-101)

* E-mail: hs-tsuno@water.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

生ごみを原料とした、非滅菌ならびに55℃およびpH5.5の条件下での乳酸発酵で、pH調整剤としてアンモニア、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムを用いることで、高光学純度の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作り分ける技術を開発した。アンモニアおよび水酸化カルシウムをpH調整剤に用いる方が、培養開始からより短い時間でより多くのL-乳酸を生成することが可能であった。乳酸の精製過程でブチルエステル化し乳酸ブチルとして蒸留精製する方法では、アンモニウムでpH調整した発酵液のみで、乳酸エステルを回収できた。そしてL-乳酸濃度36.7g/Lの発酵液1.2Lから約24gの精製L-乳酸を回収でき、そのうちの23gから約8gのラクチドを回収でき、ポリ乳酸3gを合成できた。

Key Words : L-lactate, pH adjustment, polylactate, kitchen waste

1. はじめに

地球温暖化防止や持続的発展の観点から、カーボンニュートラルの原料からの生分解性プラスチックの合成が希求されており、ポリ乳酸の合成が注目されている。このために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¹⁾が、一般には、*Lactobacillus*属や*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²⁾、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る。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る³⁾。非滅菌条件下で生ごみからL-乳酸塩を得る方法として、白井ほか⁴⁾は、回分式中温発酵で濃縮L-乳酸発酵細菌を接種する方法を実証している。Akao・Tsunoiほか⁵⁾は、接種材料の培養や接種の工程を省くために、半回分式の培養を提示し、pHおよび反応器滞留時間の条件を適切な条件に設定することにより、非滅菌条件下で高温L-乳酸発酵を連続して行いうることを実証している。そして、そのL-乳酸発酵細菌は生ごみに土着の

もので、pH5.5および温度55℃であれば自然に増殖させることや、さらに接種の影響、pHや温度の影響の詳細な検討を行い、またそれらの結果を微生物相の解析とも組み合わせて、非滅菌条件下での生ごみからの高温L-乳酸の発酵法を確立している^{4,5,6,7)}。しかしながら、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でナトリウム塩、カルシウム塩、アンモニア塩などで存在するが、これらの研究では、発酵の際のpH調整剤として、水酸化ナトリウムを使った実験のみであり、各形態については、考慮されていない。

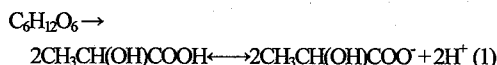
得られたL-乳酸からのポリ乳酸合成においては、まずL-乳酸の精製の工程が重要となる。乳酸の分離精製法としては、電気透析法による乳酸の粗分離濃縮法を併用した粗L-乳酸オリゴマー経由L-ラクチド精製法⁸⁾、ブチルエステル化し乳酸ブチルとして蒸留精製する方法^{9,10)}、乳酸カルシウム経由精製法、イオン交換樹脂法¹¹⁾、逆浸透膜法¹²⁾、電気透析法¹³⁾などがある。L-乳酸の精製においては、その方法により適したL-乳酸塩の形態が存在し、発酵L-乳酸を種々の方法で適した形態に変質した後に精製を行っている。この変質工程は手間とエネルギーを要し、またロスを生じる原因となる。

本研究では、各種別L-乳酸塩を、直接生成しうるL-乳酸発酵法を開発するとともに、その得られたL-乳酸塩か

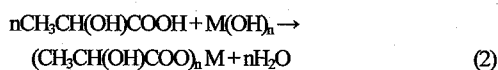
らポリ乳酸の生成を試みた。

2. 各種別の乳酸塩発酵

乳酸発酵においては、以下のような反応で乳酸ができ、pHが低下する。



したがって、pHを制御するためにpH調整剤を添加することとなるが、それを $\text{M}(\text{OH})_n$ とすると以下の反応が生ずることが期待され、pH調整剤を変えることにより、所定の種別の乳酸塩を得ることができると考えられる。



3. 実験方法

(1) 各種別のL-乳酸塩発酵法

L-乳酸塩の発酵法はAkao・Tsunoiほか^{45,67)}の方法に従い、またpH調整剤としてアンモニア、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムを用いて、各々、アンモニア塩、ナトリウム塩およびカルシウム塩のものを生成する目的で、生ごみからのL-乳酸の生成特性について検討を試みた。

L-乳酸発酵実験で用いた、実験装置の概略図を図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℃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。

本研究では、表1に示す組成の人工生ごみを使用した。またその性状を表2に示す。これは、谷川ほか¹⁹⁾の実生ごみ組成に関する調査結果を参考にして決定されたもの

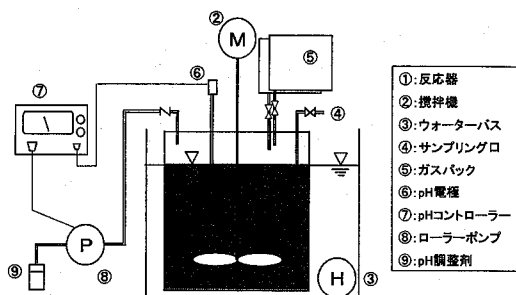


図-1 乳酸発酵装置の概略図

表-1 人工生ごみの組成

分類	湿重量%	食品類	湿重量%
野菜類	50	キャベツ	10
		ジャガイモ	10
		人参	10
		大根	10
		白菜	10
果物	20	りんご	2.5
		オレンジ(皮)	7.5
		バナナ(皮)	10
残飯類	20	ご飯	10
		パン	2.5
		麺類	7.5
肉類	2.5	挽肉	2.5
魚介類	5	魚	3.5
		骨	1.5
卵類	2.5	卵	2.5

表-2 人工生ごみの性状

項目	全	溶解性
TS g/L	194	-
SS g/L	86	-
VTS g/L	98.0	-
COD _{cr} g/L	177	103
T-N g/L	3.9	-
T-P g/L	0.41	-
糖質 g _{乾燥} /g _湿	133	88
蛋白質 g _N /g _湿	27.1	-
有機酸 g/L	-	1.03
乳酸 g/L	-	0.67
光学純度 %	-	44.0
pH	4.8	-

で、筆者らの研究室にて継続使用されているものである¹⁹⁾。TSは約19%、CODは約180g-COD/Lおよび糖質は約13%であり、白井⁹⁾やAkao・Tsunoiほか⁴⁾の報告する生ごみ成分とほぼ等しい内容である。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。

実験は、開始に当たって発酵対象液1 Lに対して接種

材料を10 mL植種し、回分式でL-乳酸発酵を行った。植種材料は、人工生ごみの55℃およびpH5.5の条件下でのL-乳酸発酵液⁹⁾を表3に示す培地で、55℃およびpH5.5の条件下で約2日間培養し作成した。この植種材料の培養条件および性状も表3に示す。

各pH調整剤を用いての回分式実験の条件を表4に示す。赤尾・津野ほか⁵⁹⁾によると、pH調整剤に10N水酸化ナトリウムを用いて植種を伴わず、非滅菌人工生ごみよりL-乳酸を生成するには、温度は55℃でpH5.5が最適であるとされているので、本研究では植種を行ってはいが非滅菌条件であるので、全ての実験操作では55℃およびpH5.5に設定した。また、培養時間は、この条件下では培養開始から180時間後までにL-乳酸の生成はほぼ完結する⁵⁹⁾ことから、Test 1では186時間、Test 2ではTest 1の結果を考慮して166時間とした。Test 1とTest 2は再現性の確認のために2回にわたって行ったものである。

また、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。

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 Method¹⁶⁾、炭水化物(フェノール硫酸法¹⁷⁾、タンパク質(ローリー・フォーリン法¹⁸⁾、有機酸(液体クロマトグラフィー法⁴⁾)、D,L-乳酸(液体クロマトグラフィー法⁴⁾)、およびATP(ルミカウンター法¹⁹⁾)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。

乳酸収率の算出では、初期(基質中)の糖質量を基準に乳酸収率を次式により算出した。ホモ乳酸発酵においては理論上グルコース1 gから乳酸1 gが生成される(式(1)参照)ことと、基質量と引き抜き発酵液量が同量であることに基づいている。

$$\text{収率(=)} = (\text{発酵液の乳酸濃度}) / (\text{基質の糖質濃度}) \quad (3)$$

表-3 植種材料の培地組成と性状

組成	g/L	性状
グレース	20	温度 55℃
YEAST EXTRACT	2.5	pH 5.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.25	時間 50h
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	乳酸濃度 22.9 g/L
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01	光学純度 99.0%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	糖質濃度 21.8 g グレース/L
L-乳酸	10	

表-4 乳酸発酵の条件

条件	Test I*		
	Run I-1	Run I-2	Run I-3
温度℃	55	55	55
pH	5.5	5.5	5.5
pH調整剤	NH ₄ OH	NaOH	Ca(OH) ₂
運転時間 h	186 (I=1), 166 (I=2)		
運転方式	回分式		

I=1 or 2

乳酸の異性体の光学純度は、HPLCによりD,L-乳酸それぞれ絶対量を求め、次式により光学純度を求めた。

$$\begin{aligned} \text{光学純度(\%)} = \\ | \{ (\text{L-乳酸}) - (\text{D-乳酸}) \} / \{ (\text{L-乳酸}) + (\text{D-乳酸}) \} | \times 100 \quad (4) \end{aligned}$$

(2) ポリ乳酸の合成

本研究では、生ごみの酸発酵液からブチルエステル化により乳酸を精製し、精製した乳酸からラクチドを経てポリ乳酸を生成することを試みた。まず、乳酸および乳酸塩のエステル化における標準的な反応および挙動を知ることが目的として、市販の乳酸ナトリウム水溶液(和光特級, 60%)および乳酸アンモニウム水溶液(和光特級, 40%)を対象に行った。そして、pH調整剤としてアンモニア、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウムを用いて酸発酵を行った上述の各発酵液からのポリ乳酸の生成を試みた。なお、発酵液については、5000rpmで5分間遠心分離したのち、孔径0.45 μmのガラスファイバーろ紙でろ過しSSを除去した(以下、これを発酵ろ液と表記する)。

発酵ろ液からの乳酸の濃縮・精製はブチルエステル化し乳酸ブチルとして蒸留精製する方法を用いた。手順は文献^{10,20,21)}を参考に設計した。手順は以下のとおりである。

発酵ろ液を80℃、40 kPaに昇温減圧し、攪拌しながら8~10時間程度脱水し、体積でおよそ10分の1程度まで濃縮された濃縮発酵液を得る。次に、その濃縮発酵液に、含有乳酸量に対してモル比で5倍の量のn-ブチルアルコールを随時継ぎ足す形で加えていくと共に、含有乳酸量に対してモル比で6分の1の量の硫酸を加え、110℃で12時間攪拌しながらエステル化を行う。続いて、110℃、90 kPaで乳酸ブチルより沸点の低い有機酸ブチルを分留

し、次に、受け器を変え170℃、90 kPaにて蒸留し乳酸ブチルを回収する。最後に、乳酸ブチルに対してモル比で5倍の量の水と、6分の1の量の硫酸を加え、密栓をした状態で100℃で12時間攪拌しながら反応させる。その後、90℃、35 kPaで、水とn-ブチルアルコールを除去し、濃縮・精製された乳酸を得る。

この得られた、精製乳酸からのポリ乳酸生成は、文献²²⁾を参考に以下の手順で行った。精製乳酸をフラスコに入れ、4 kPaに減圧し、油浴で120℃に保ちながら6時間重合させ、低分子ポリ乳酸である乳酸オリゴマーを生成する。乳酸オリゴマーに触媒FeOを約1重量%加え再び2 kPaに減圧後、200℃まで升温し、そこから300℃まで20分ほどかけてゆっくりと升温し300℃に保ちながら10分程熱解重合を行い、ラクチドを生成し分留する。次に、全ラクチドと等量の水を加え、攪拌しながら、90℃にしてラクチドを溶解させ、冷却し再結晶させてろ過し、濾紙上にD-またはL-ラクチドを捕捉する。これを別の容器にとり等量のイソプロピルアルコールを加え70℃に升温して溶解させ、30℃以下に冷却し再結晶させて濾過しラクチド中の水分を除去する。そして、これを別の容器に

とり、等量のトルエンを加え70℃に升温して溶解させ、30℃以下に冷却し再結晶させて濾過し、ラクチド中のイソプロピルアルコールを除去する。最後に、この結晶を減圧下にて乾燥しトルエンを除去してラクチドの精製が完了する。ポリ乳酸の生成は、ラクチドに対して、触媒のオクチル酸錫を、モノマー：触媒=200：1になるように加え、50 kPa、120℃で24時間攪拌させながら反応させ、ポリ乳酸を生成する。

ポリ乳酸の原料である乳酸およびラクチドには、L-乳酸およびD-乳酸、ならびにL,L-ラクチド、D,D-ラクチドおよびMeso-ラクチドの光学異性体がある。ポリ乳酸の製造工程では、ラクチドの精製工程にてラクチドの光学純度を調整することが可能ではあるが、本研究ではラクチドにおいて光学異性体割合を把握するための分析をキラルカラムCHIRAL PAK AD-H(ダイセル社製)を用いてHPLC(島津製作所製)による分析(移動相(A液)：ヘキサン・0.04mL/min；移動相(B液)：2-propanol・0.76mL/min；カラム温度：40℃；UV-VIS検出器)で行った。

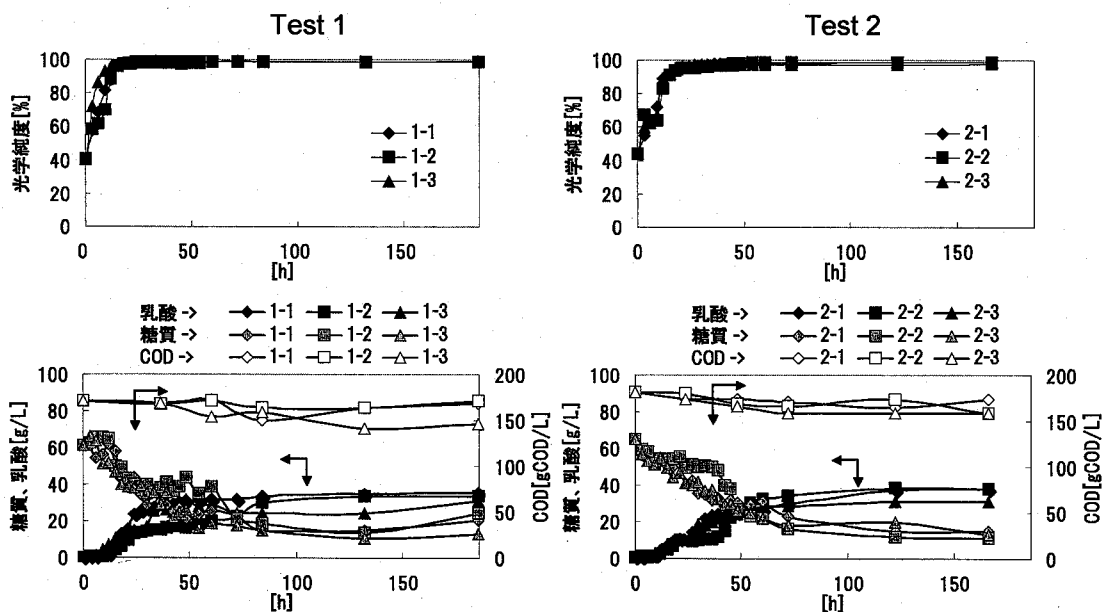


図2 乳酸発酵実験結果

表5 乳酸発酵結果

項目	Test 1			Test 2		
	Run 1-1	Run 1-2	Run 1-3	Run 2-1	Run 2-2	Run 2-3
乳酸濃度 g/L	35.6	33.9	31.4	37.9	38.3	31.1
乳酸収率*	0.58	0.56	0.52	0.59	0.59	0.48
有機酸に対する乳酸の割合 %	97.4	97.4	96.1	97.8	98.7	96.9
生成L-乳酸の光学純度 %	98.5	98.6	99.1	99.5	99.6	98.9

* 基質中の糖質量基準

4. 結果および考察

(1) 各種別のL-乳酸発酵法

一定の培養温度(55℃)およびpH(5.5)の条件におけるpH調整剤の高温L-乳酸発酵への影響を検討した結果を図2および表5に示す。いずれのpH調整剤を用いてもL-乳酸発酵が行えていることがわかる。また、Test1および2の培養結果から、pH調整剤ごとに同様の終端乳酸収率やいずれの場合も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。アンモニアおよび水酸化カルシウムでpHを調整したRun1-1と2-1ならびに1-3と2-3では、糖質の消費および乳酸の生成が一段階で進行しているのに対し、水酸化ナトリウムでpHを調整したRun1-2と2-2では、運転開始から36時間後までとそれ以降で糖質の消費および乳酸の生成状況に差が見られ、発酵が二段階で行われたことがわかる。これに着目して、運転開始から36時間後までに消費した糖質量および生成した乳酸量を比較すると、アンモニアでpHを調整したRun1-1と2-1では平均で31.6 g/Lの糖質を消費し26.8 g/Lの乳酸を生成した。水酸化カルシウムでpHを調整したRun1-3と2-3では、平均で29.7 g/Lの糖質を消費し25.7 g/Lの乳酸を生成した。一方、水酸化ナトリウムでpHを調整したRun1-2と2-2では平均で18.9 g/Lの糖質を消費し12.9 g/Lの乳酸を生成した。最終的な乳酸量および光学純度はいずれのケースでもほぼ同じとなり(表5参照)、98.5%以上の光学純度のL-乳酸が31~38 g/Lの濃度で得られた。収率は0.5~0.6程度であった。最終的に残存した糖質濃度は、Run1-1では20.5 g/L、Run1-2では24.2 g/L、Run1-3では13.1 g/L、Run2-1では14.7 g/L、Run2-2では11.0 g/L、およびRun2-3では13.3 g/Lであった。また、有機酸に対する乳酸の割合を見ると、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る。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Run1-3とRun2-3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Runに比べて少し劣っている。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

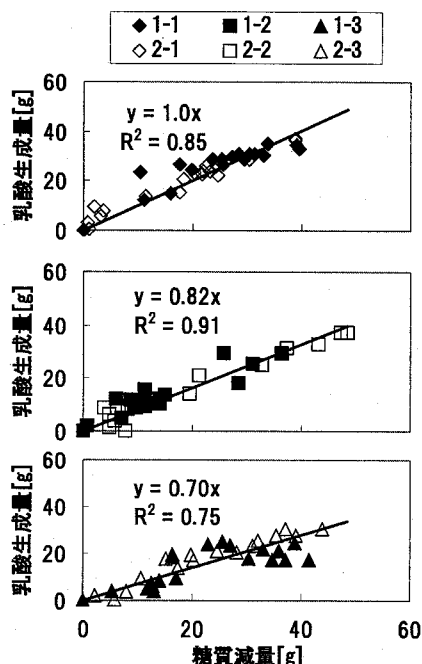


図3 糖質減量と乳酸生成量の関係

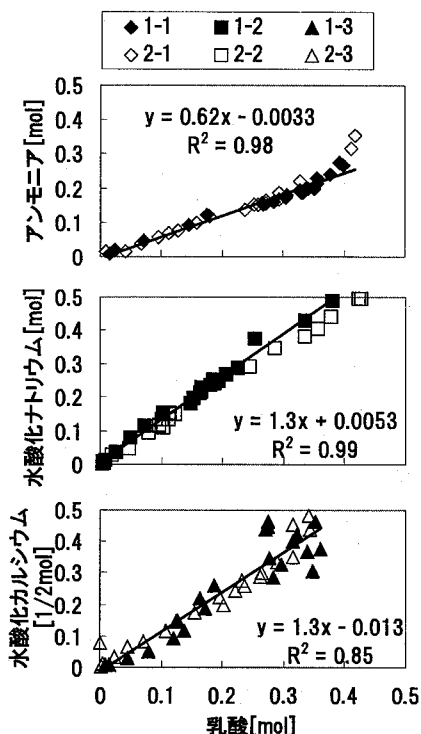


図4 乳酸生成量と中和剤消費量の相関図

解度の影響であると考えられる。なお仮に、乳酸カルシウムが生成したと考えると、乳酸カルシウム五水和物(分子量308.30)の溶解度は50 g/L(水・25℃・pH6~8)である(http://www.fusokk.co.jp/product/life/food_01/020/index.html)。

糖質の減少量と乳酸の生成量の関係を図3に示す。両者の間には間には一次的な相関があると判断できる。ホモ乳酸発酵においては、理論上グルコース1 gから乳酸1 gが生成され(式(1)参照)、アンモニアをpH調整剤として用いた場合はそのようになった。しかしナトリウムおよびカルシウムを用いた場合は、1.0より低くなり、各々0.82および0.70になった。これは、生成した乳酸塩の溶解度や固形物への付着の影響が考えられる。しかしながら、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。

生成乳酸量とpH調整剤の添加量との関係を図4に示す。両者には比例関係があることが示され、生成乳酸量に応じてpHが低下し、その制御のために当量のpH調整剤が添加されたことが示されている。このことから、生成したL-乳酸塩はpH調整剤の陽イオンに対応した形態であると考えられる(式(2)参照)。すなわち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ている。

アンモニアでpHを調整したRun1-1とRun2-1では、生成した乳酸のモル数が投入したアンモニアによって供給された水酸化イオンのモル数より上回っている。これは、チューブ内のアンモニア水からアンモニアが揮発して発酵槽内のヘッドスペースに混入し、ヘッドスペース内の気相から発酵液へアンモニアが溶け込んだために、ポンプで送液するアンモニア水の必要体積が減少したためと考えられる。事実、実験方法で述べたように、12.5%のアンモニア水を用いたときには、これが過大に生じ、発酵槽内のpHは7以上となり5.5での制御が不可能であった。また、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムをpH調整剤に用いたときには、生成乳酸当量以上のpH調整剤が添加されているが、これは、HPLCで測定できないような酸性成分が生成していたことも考えられる。

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を図5に示す。ATP活性は、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Run1-1および1-3では急激に高くなり、一方、水酸化ナトリウムでpH調整したRun1-2では、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。これは上述の乳酸生成状況と一致する。また、例として、最も変動の大きかったアンモニアでpH調整した発酵でのATP活性と乳酸の生成速度(Δ 乳酸塩濃度/ Δ 測定時間間隔)を図6に示す。両者は明らかな

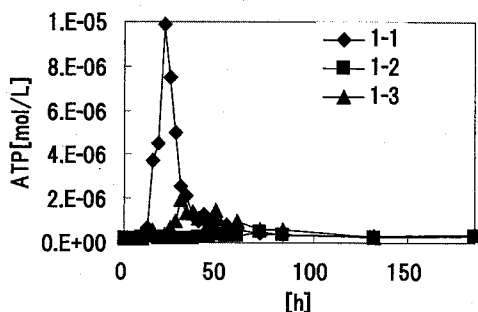


図-5 Test1におけるATP濃度の変化

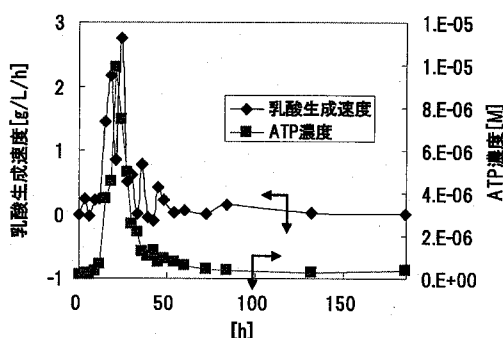


図-6 Run1-1における乳酸生成速度とATP濃度の比較

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、より早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る。

(2) ポリ乳酸の合成

乳酸塩の種類によってエステル化の進行に差があると考えられる。それを確認するために、まず市販の乳酸アンモニウムおよび乳酸ナトリウムを用いて、乳酸の濃縮・精製を試みた。この際にはpHを下げるなどの特別な操作は加えなかった。乳酸アンモニウムからは乳酸エステルを回収できたが、乳酸ナトリウムからは回収できなかった。乳酸アンモニウムを用いた実験では、乳酸アンモニウム1 mol(107 g、うち乳酸約89 g)に5 molのn-ブチルアルコールと0.15 molの硫酸を加えてエステル化および加水分解を行ったところ、60.1 gの精製乳酸を回収できた。収率は0.67であった。一方、乳酸ナトリウムを用いた実験では、精製乳酸の回収は0 gであった。これは、乳酸ナトリウムがn-ブタノールとエステルを形成しな

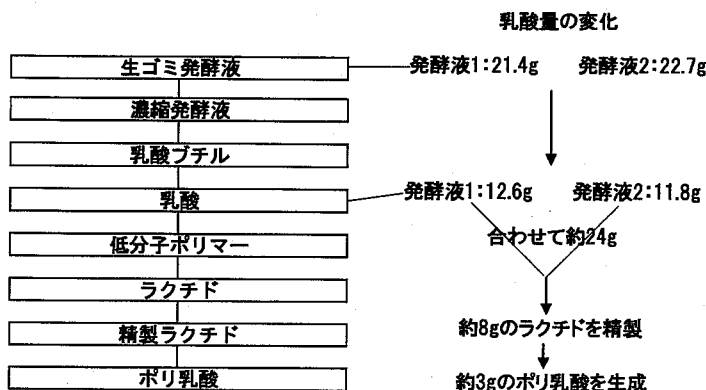


図-7 生ごみ発酵液からポリ乳酸生成までの乳酸回収量

ったことに起因するものと考えられる。

この結果を参考にしてアンモニア塩のろ過発酵液から乳酸の精製を試み、回収が可能であった。再度、同様の手順によるナトリウム塩およびカルシウム塩のろ過発酵液から乳酸の精製を試みたが、ここでも乳酸エステルの回収が行えなかった。これは、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムでpHを調整した発酵液中の乳酸塩が、*n*-ブタノールとエステルを形成しなかったことに起因する。これは、市販の乳酸アンモニウムおよび乳酸ナトリウムを用いた実験結果とも一致する。触媒として加えた硫酸が、乳酸が揮発するのに伴って残留したナトリウムやカルシウムによって中和されるのに対して、アンモニアの場合は揮発するので硫酸が酸として触媒の機能を果たせることも原因の一つと考えられる。

発酵液中の乳酸アンモニウムについては、目標とした生ごみを原料とした発酵乳酸から高光学純度のL-乳酸を精製することは達成できた。Run1-1およびRun2-1で得られた発酵液(各々発酵液1および発酵液2と記す)、各々0.6 Lから、各々別々に乳酸精製を行い、これらをあわせて、ポリ乳酸の合成を行った。その結果を図7に示すとともに、得られたポリ乳酸の写真を図8に示す。濃縮・精製過程において、発酵液1から回収された乳酸水溶液は、100.8 g/Lの濃度のL-乳酸で0.125 L(含有乳酸12.6 g; 収率0.59)であった。このようにして、35.6 g/LのL-乳酸発酵液0.6 Lから12.6 gの精製L-乳酸を回収した。同様にして発酵液2からは11.8 g(収率0.52)の精製L-乳酸を回収した。両者を合わせると、44.1 gの発酵L-乳酸から24.2 gの精製L-乳酸を回収できた(収率0.55)。

また、ポリ乳酸合成過程では、このアンモニアでpH調整した発酵液より精製したL-乳酸を用いて合成を試みた。ラクチドの留出を終えた後、常圧に戻すとオリゴマーの方のフラスコに黒いタール状の物体が11.3 gも残った。今回のここでの回収率の悪さはこれによるものであり、軽減策の模索も今後の課題となった。ラクチドの精

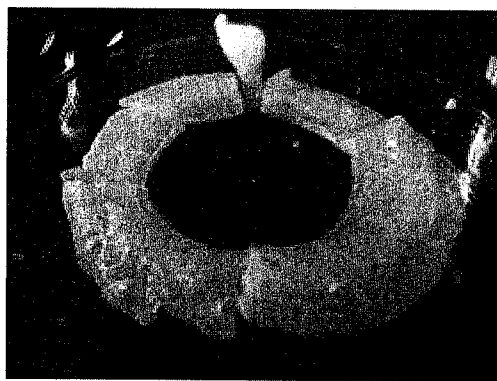


図-8 生ごみから生成したポリ乳酸

製では、イソプロピルアルコールで精製すると黄色の着色がとれ白くなった。十分にトルエンを除去したところでラクチドの重量を測定したところ、8.1 gであった。ラクチドを0.1 g採取しHPLCによる分析を行った結果、L,L-ラクチドの光学純度は94.4%であった。およそ8 gのラクチドに対して触媒としてオクチル酸錫を0.01 g加え、ポリ乳酸の重合を行った。結果的に、ラクチドからの重合反応において、50 kPa以下の減圧操作を行ったために反応中のラクチドが飛散し、フラスコの底に生成物であるポリ乳酸として残っていたのはわずか3.3 gであった。このラクチドの飛散を軽減する手法の開発も今後の大きな課題である。

5. 結論

本研究では、生ごみを原料として、非滅菌条件下で高光学純度のL-乳酸について、アンモニア塩、ナトリウム塩およびカルシウム塩の作り分けを行う技術を開発するとともに、それら各種別のL-乳酸塩から、ポリ乳酸の合成を試みた。得られた主な結果は以下のとおりである。

- 1) 生ごみを基質として、55℃およびpH5.5の培養条件下で乳酸発酵を行う場合、pH調整剤としてアンモニア、水酸化ナトリウムあるいは水酸化カルシウムのいずれを用いても収率0.5~0.6で98.5%以上の高光学純度のL-乳酸発酵を行うことができる。
- 2) 同条件にて乳酸発酵を行った場合、糖質減量と乳酸生成量の間には、一次相関関係があり、変換率はアンモニアをpH調整剤として用いた場合は1程度であった。水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムの場合は各々0.8および0.7であった。
- 3) 得られたL-乳酸はpH調整剤として用いたアンモニア、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムに応じてそれぞれアンモニア塩、ナトリウム塩およびカルシウム塩とすることが可能であった。
- 4) ATP活性は乳酸発酵の速度を把握するのに良い指標である。
- 5) 同条件にて乳酸発酵を行った場合、水酸化ナトリウムに比べアンモニアおよび水酸化カルシウムをpH調整剤に用いる方が、培養開始からより短い時間でより多くの乳酸を生成することが可能である。
- 6) 乳酸の濃縮・精製過程では、ブチルエステル化し乳酸ブチルとして蒸留精製する方法を用いた。乳酸発酵液のエステル化を行う場合、アンモニアでpH調整した発酵液では、n-ブタノールと乳酸エステルを生成するが、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムでpHを調整した発酵液は乳酸エステルを生成しない。
- 7) アンモニアでpHを調整した発酵から乳酸を精製した結果、平均36.7g/Lの濃度のL-乳酸発酵液126Lから約24gの乳酸を回収できた。
- 8) 精製したL-乳酸約23gからL,L-ラクチド約8gを回収でき、ポリ乳酸を3gを合成できた。
これらのことから、生ごみの非滅菌条件下での発酵により得た乳酸をn-ブタノールによるエステル化によって精製する場合、水酸化ナトリウムおよび水酸化カルシウムでpHを調整した場合はエステル化が容易には進まないという理由から、アンモニアをpH調整剤に用いることが最も適していると判断できる。

謝辞：最後に本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(18560530)の補助を受けて行ったものであることを付記する。

参考文献

- 1) Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B. : Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2-4), 87-107, 2000.
- 2) Litchfield, J. H. : Microbiological production of lactic acid. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 45-95, 1996.
- 3) 白井義人ほか：高純度L-乳酸の製造方法, 特開 2000-245491, 2000.
- 4) Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J. : Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure, *Water Research*, 41, 1774-1780, 2007.
- 5) 赤尾聡史, 津野洋, 堀江匠：植種を伴う非滅菌高温L-乳酸発酵における培養温度とpHの影響, 環境工学論文集, 43, 39-46, 2006.
- 6) Akao, S., Tsuno, H., Horie, T., Mori, S. : Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, *Water Research*, 41, 2636-2642, 2007.
- 7) 赤尾聡史, 津野洋, 堀江匠：非滅菌生ごみを原料とする高温L-乳酸発酵の半連続培養への拡張と適用, 土木学会論文集 G, 63 (1), 68-76, 2007.
- 8) 森田幹雄：“じゃがいも”からL-乳酸(ラクチド)の製造, 特集乳酸菌の新しい機能と用途開発, 食品工業, 12 (39), 47-50, 1999.
- 9) 白井義人：食品ごみからポリ乳酸をつくる, 地球環境, 10, 84-87, 2002.
- 10) 熊谷 晃ほか：乳酸および乳酸エステルの製造法, 特開平 6-311886, 1994.
- 11) 金井康矩：環境調和型高分子材料ポリ乳酸開発の新展開, *ECO INDUSTRY*, 10, 6 (10), 24-30, 2001.
- 12) Liew, M. K. H., Tanaka, S., Morita, M. : Separation and purification of lactic acid: Fundamental studies on the reverse osmosis down-stream process, *Desalination*, 101, 269-277, 1995.
- 13) Wang, Q., Cheng, G., Sun, X., Jin, B. : Recovery of lactic acid from kitchen garbage fermentation broth by four-compartment configuration electrodialyzer, *Process Biochemistry*, 41, 152-158, 2006.
- 14) 谷川昇, 武本敏男, 大木秀男, 川崎照男：生ごみの組成分析, 都市清掃, 50, 116-119, 1997.
- 15) 洪鋒, 津野洋, 日高平, 千智勲：1日1回収餌操作での高温メタン発酵特性に関する研究, 廃棄物学会論文誌, 15(5), 381-388, 2004.
- 16) APHA ed. : Standard Method for Examination of Water and Wastewater, 19th Edition, 5.13-5.18, 1995.
- 17) 福井作蔵：還元糖の定量法, 第2版, 49-52, 学会出版センター, 1990.
- 18) 長谷川喜代三, 食物・栄養科学シリーズ19食品分析, 83-86, 培風館, 1993.
- 19) 日本下水道協会：下水試験方法—1997年度版—, 1997.
- 20) 畑一夫, 渡辺健一：基礎有機化学実験, 丸善, 1974.
- 21) George, D., Clayton, Florence, E., Clayton 編：化学毒性ハンドブック, 丸善, 1999-2000.
- 22) 森田幹雄ほか：ラクチドの製造方法, 特開平 8-119961, 1996.
- 23) 大垣内誠：ラクチドの精製法および重合法, 特開平 10-25288,

Fermentation for different type of L-lactate and synthesis of polylactate

Hiroshi TSUNO¹, Satoshi AKAO², Kotaro MIYAI¹, Taira HIDAKA¹ and Taku HORIE¹

¹Dept. of Urban and Environmental Engineering, Kyoto University

²Dept. of Social Systems Engineering, Tottori University

A fermentation technology to produce ammonium, sodium and calcium L-lactate with high optical purity from unsterilized garbage under 55°C and pH 5.5 was developed by using ammonia, NaOH and Ca(OH)₂ solutions, respectively, for pH adjustment in pH control. L-lactate fermentation speed with ammonia and Ca(OH)₂ solutions was higher than that with NaOH. Lactate-ester was obtained from only lactate fermentation product with ammonia solution in the refinery process of L-lactate through butyl lactate. And about 24 g of refined L-lactate was collected from 1.2 L of fermented liquid containing 36.7 g of L-lactate. From 23 g of the refined L-lactate, 3 g of poly lactic acid could be synthesized through 8 g of refined L, L-lactide.