

B-14 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

赤尾 聡史¹・〇宮井 公太郎¹・堀江 匠^{*1}・津野 洋¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8530京都市西京区京都大学桂)

* E-mail: taku.horie@kougakubu2002.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

バナナは、代表的なプランテーション作物であり、近年においても生産量が增大（1990年代で生産量が約13倍）している作物である。また、バナナは一部の国では主食として食されており、生産国においては、日常生活に欠かせない食物であり、輸出に出回る量は、生産量の10%強程度とされる。そのため、バナナ生産地ではバナナ果皮が廃棄物として集約的に排出される可能性がある。実際、これらの国々では、バナナ果皮をメタン発酵に供するなど、資源として利用する試みが報告されている。

一方、赤尾ら¹⁾は、非滅菌環境での模擬生ごみのL-乳酸発酵を報告している。この資化方法（以下、高温L-乳酸発酵法）は、高温耐性を有する*B.coagulans*を自然に優占化するものであり、既存のL-乳酸発酵方法と比較して容易な運転操作方法、また安価な製造費を提供する可能性を示している。バナナ生産国は、一般的に発展途上国が多いため、廃棄物の利用に大規模な資本の投下は期待し難い。しかし、有機性廃棄物の資源化は地球温暖化防止の観点から意義深い。そこで、集約的に排出される可能性のあるバナナ果皮と容易かつ安価な高温L-乳酸発酵法を結びつけることを検討した。なお、L-乳酸は、生分解性プラスチックであるポリ乳酸の原料として利用されることから、近年、生産量の急増している物質である。

ところで、発酵に際して、限られた材料のみの発酵では、栄養素的な不足が生じる可能性があるため、本研究では、バナナ果皮の高温L-乳酸発酵法における発酵性、およびバナナ果皮のみを使用した場合における栄養素的な不足の有無など、バナナ果皮の使用に対する基礎的な検討を行うこととした。

2. 実験内容

(1) 基質、実験装置および分析項目

本研究では、東京都の実調査結果を基に選定した材料²⁾

から模擬生ごみを作成し実験に使用した。模擬生ごみの材料およびバナナ果皮の両方ともスラリー状まで破碎し、使用時まで冷凍庫に保存した。実験に際しては、攪拌の都合から、作成した模擬生ごみおよびバナナ果皮を蒸留水で、それぞれ2倍希釈（以下、生ごみ培地）、3倍希釈（以下、バナナ培地）し、滅菌操作を行わずに利用した。実験装置および分析項目は、既報¹⁾と同様とした。乳酸収率は、生成乳酸量を基質中の糖質量で除して求めた。

(2) *B.coagulans*の定量²⁾

本実験におけるL-乳酸菌と考えられている*B.coagulans*の16SrDNA量を、real-time PCR法で定量した。DNAの抽出は、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、BACO186F (gcattggaggaaagaa) とBACO447R (ccggcaacagattta) を用い、PCR条件は、初期変性を95℃、10分、サイクリングは、変性を95℃、10秒、アニーリングを56℃、10秒、伸長反応を72℃、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。

(3) 植種材料

植種材料は、2種類（種汚泥と種培地）用意した。種汚泥は、生ごみ培地を55℃でpH5.5の条件下で約140時間培養した発酵液（乳酸濃度；28.9 g/L、糖質濃度；25.8 g/L）を使用した。なお、生ごみ培地を同条件で発酵した場合、乳酸濃度が約35 g/Lで発酵は停止することから¹⁾、種汚泥は乳酸発酵余地の少ない発酵液である。種培地は、種汚泥10 mLを、以後は植え継ぎ前の培地10 mLを、表1に示す培地200

表1. 種培地の組成

グルコース	和光純薬 1級	20g/L
Yeast extract	日本製薬 D-3	2.5g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	和光純薬 1級	0.25g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	和光純薬 1級	0.05g/L
MnSO ₄ ・4H ₂ O	和光純薬 1級	0.01g/L
FeSO ₄ ・7H ₂ O	和光純薬 1級	0.01g/L
L-乳酸	和光純薬 特級	10g/L

表2.実験条件

		Test1		Test2			Test3	
		Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Run7
温度(℃)		55						
pH(-)		5.5						
基質	バナナ(mL)	900	450	1000	500	0	1000	500
	人工生ごみ(mL)	0	450	0	500	1000	0	500
	種培地(mL)	—		10				
	種汚泥(mL)	100		—				
運転方式		回分式					半連続式(操作量400mL)	

mLに非滅菌条件下で継代培養(250 mLねじ口瓶使用, 55°C, pH調整無し)した培地とした。使用した種培地の性状(乳酸濃度, *B. coagulans*のDNA量)は,それぞれTest2では29.3 g/Lおよび 2.1×10^{11} copies/L-DNA溶液, Test3では23.6 g/Lおよび 2.4×10^{11} copies/L-DNA溶液である。なお,表1の培地中のL-乳酸は,乳酸の抗菌作用を利用し,乳酸菌以外の細菌の繁殖を防ぐ目的で添加した。

(4) 実験条件

実験条件を表2にまとめる。本研究では,大きく3つのTestを実施した。Test1では,種汚泥を利用し,バナナ果皮のL-乳酸酸化性について検討した。Test2では,種汚泥を利用する際に持ち込まれる,生ごみ由来の栄養素の影響を排除するため,種培地を用いた。Test3では,バナナ果皮を利用する高温L-乳酸発酵の長期安定性を確認する目的で半連続式培養を行った。培養は,植種に種培地を利用し, HRT 5日(COD負荷はRun 6; 53 g/L/日, Run 7; 3.8 g/L/日)の条件で2日に一度の頻度で,400 mLの発酵液の引抜きおよび同量の基質の添加(以下,半連続操作)を行った。

3. 実験結果

(1) 回分式実験

本研究で用いた基質の組成を表3に示す。糖質量を基準に模擬生ごみとバナナ果皮を比較した場合,バナナ果皮はアミノ酸,タンパク質の割合が小さいことが分かる。したがって,バナナ果皮単独のL-乳酸発酵を実施した場合,

表3.基質の組成

	生ごみ		バナナ果皮	
	Total	Soluble	Total	Soluble
TS(g/L)	190	-	121	-
SS(g/L)	86	-	65	-
VTS(%)	96	-	88	-
COD _{Cr} (g-COD/L)	201	114	79	42
Carbohydrate(g/L)	115	96	44	33
Protein(g/L)	20.3	3.7	4.5	1.6
T-N(g/L)	3.4	1.2	1.4	1.0
pH(-)	5.1	-	5.5	-

これら栄養素の不足が懸念される。一方,TSおよびVTSの比較から,バナナ果皮は無機成分の割合が高いことも伺える。

回分式実験の結果を表4に示す。また,種汚泥を利用したTest 1の乳酸濃度および光学純度の経時変化を図1に示す。これらによると,バナナ果皮の利用にも拘らず,既報⁹⁾と比べても充分な収率(0.6程度)でL-乳酸発酵が行えることが示された。また,図1の乳酸濃度変化の比較から,バナナ培地のみ系の系(Run 1)はバナナ培地と生ごみ培地の混合系(Run 2)と同程度の平均乳酸生成速度⁹⁾(約0.18 g/L/hr)を有すること,つまり,バナナ培地は生ごみ培地と同程度の資化しやすさを示すことが推測される。

次に,種培地を利用したTest 2の乳酸濃度および光学純度の経時変化を図2に示す。これらによると,バナナ培地のみの系(Run 3)では,L-乳酸発酵が進行するものの収率の劣ることが示された。Run 1とRun 3の比較より,植種材料を通じて供給された栄養素量の差が両者の差を導いたものと考えられる。つまり,バナナ果皮をL-乳酸発酵する

表4.回分式実験の結果

	Test1		Test2		
	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5
乳酸濃度(g/L)	14.6	24.9	5.9	22.4	33.6
光学純度(%)	99.7	99.8	98.6	99.6	99.6
収率(-)	0.64	0.62	0.35	0.60	0.59

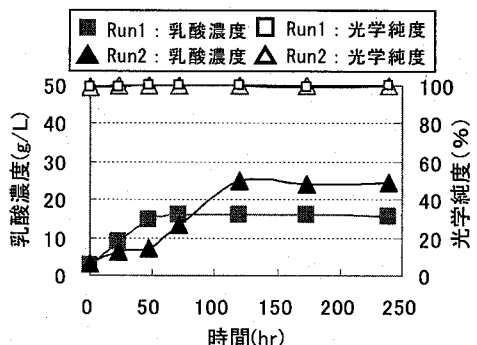


図1.Test1における乳酸濃度と光学純度の経時変化

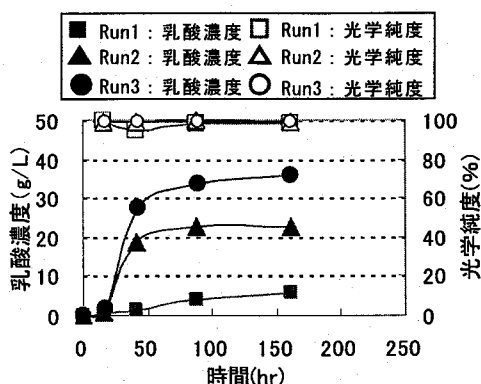


図2. Test2における乳酸濃度と光学純度の経時変化

際は、添加材料の必要性が示唆される。バナナ培地と生ごみ培地の混合系 (Run 4) では、平均乳酸生成速度は0.26 g/L/hrであり、既報の同条件¹⁾と比較して遜色のない値が出ていることから、ここからも、バナナ果皮が容易に資化できることが伺える。また、生ごみ培地のみの系 (Run 5) では、乳酸生成量および収率について既報¹⁾と同程度の結果が得られたことを確認した。なお、Test 2では、培養開始後16時間までpH制御を行わなかったため、16時間のpH値はRun 4, Run 5について低下し(Run 3; 6.3, Run 4; 4.4, Run 5; 4.4)、これらのRunでは乳酸発酵が停滞することとなった。これは、Run 3の撹拌が著しく困難であり、Run 3の流動性が向上するまでpH制御の実施を見送ったためである。

(2) 半連続式実験

Test 3における光学純度と収率の経時変化を図3に示す。バナナ培地と生ごみ培地の混合系 (Run 7) では、2回目の半連続操作時 (培養開始約87時間後) より乳酸生成が安定化し、これ以後の平均乳酸濃度は 21.5 ± 0.4 g/L (収率0.59) となった。Run 7について、図4に*B. coagulans*のDNA量変化を示す。これによると、*B. coagulans*菌量の経時的な安定が確認される。以上より、高温L-乳酸発酵の半連続式培養における安定性が示された。

一方、バナナ培地のみの系 (Run 6) では、半連続操作の度に乳酸濃度が減少する結果となった。培養開始約40時間後の乳酸濃度は5.2 g/Lであり、この値はTest 2のRun 3の最終値と同程度であったものの、以後の乳酸濃度は半連続操作に伴う希釈をわずかに上回る程度の乳酸濃度となった。したがって、バナナ培地のみの供給を続けた高温L-乳酸発酵は継続困難と考えられる。そこで、種培地の培養で補材料として添加したYeast Extractを3回目の半連続操作時より添加 (添加バナナ培地100 gあたりYeast Extract 1 g) することとした。その結果、乳酸生成が改善し、以後、平均で乳酸濃度 8.6 ± 0.1 g/L (収率0.53) が得られた。バナナ果皮のL-乳酸資化を考慮する際は、Yeast Extractの成分より、窒

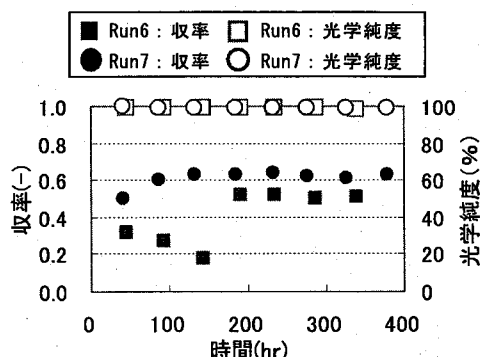


図3. Test3における収率と光学純度の経時変化

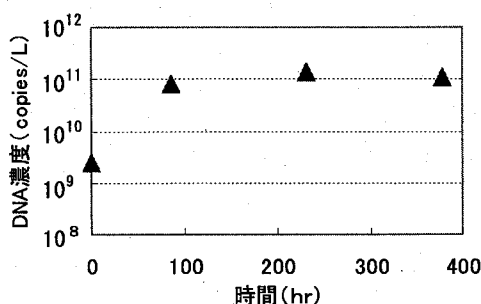


図4. Run7における*B.coagulans*のDNA濃度の経時変化

素源、特にアミノ酸を供給できる補材料 (有機性廃棄物) の混合が必要と考えられる。

4. まとめ

バナナ果皮は、単独ではL-乳酸菌の増殖に栄養素が不足しているため、窒素源や、特にアミノ酸を供給できる補材料を混合することで、容易に資化することができることがわかった。また、長期的にも安定してL-乳酸発酵が行える廃棄物であると考えられる。

最後に本研究は、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) 赤尾ほか、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、環境工学研究論文集43号、印刷中。
- 2) 朝平晃章、16SrDNAに基づく高温メタン発酵槽の同定微生物の定量に関する研究、京都大学修士論文、2006。