

## B-66 クリーニング作物および水生植物からの L-乳酸生産に関する研究

○赤尾 聡史<sup>1\*</sup>・前田 光太郎<sup>1</sup>・細井 由彦<sup>1</sup>・永禮 英明<sup>2</sup>・前田 守弘<sup>2</sup>・藤原 拓<sup>3</sup>

<sup>1</sup>鳥取大学大学院工学研究科（〒680-8552 鳥取県鳥取市湖山町南4-101）

<sup>2</sup>岡山大学大学院環境学研究科（〒700-8530 岡山市北区津島中3-1-1）

<sup>3</sup>高知大学教育研究部自然科学系農学部門（〒783-8502 高知県南国市物部乙200）

\* E-mail: akao@sse.tottori-u.ac.jp

### 1. はじめに

集約的な農業が実施される地域においては、過剰施肥と除塩を目的に実施される湛水により地下水汚染や温暖化ガスである亜酸化窒素の生成を招いている<sup>1)</sup>。筆者らは、面的に汚染源が広がるこれら農地に対して、面的に対処できる処理技術としてクリーニング作物の適用を検討している。ここでクリーニング作物とは、農地に過剰に存在する窒素やリンなどを吸収することを目的に適用される植物である。既に、クリーニング作物を農閑期に相当する期間適用することで栄養塩の浸透や亜酸化窒素の生成を防げることを示した<sup>2)</sup>。また、吸収した栄養塩の回収・利用に関する検討も実施している<sup>3,4)</sup>。

本研究では、過剰施肥にともない残存した肥料を休耕期に吸収したクリーニング作物中の炭素、具体的にはセルロースやヘミセルロースといった多糖の利用を検討した。ここでは、クリーニング作物をトウモロコシとギニアグラスとし、これらの中の多糖を単糖化およびL-乳酸化した。L-乳酸は、生分解性樹脂であるポリ乳酸の原料として用いられる化石資源代替物質である。なお、植物体多糖の利用ではスケールが必要であることから、地域にある余剰バイオマスの利用も併せて検討した。ここでは、水域で異常繁茂する水生植物、ヒシとホテイアオイのL-乳酸化も実施した。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用したバイオマス

本研究で用いたバイオマスを表1にまとめる。いずれのバイオマスも、70℃で24時間の乾燥の後家庭用ミルで5分間破碎した。破碎後、再度乾燥（70℃）を行いデシケータで保存した。

#### (2) 酵素糖化のための前処理

植物体多糖の発酵利用では加水分解された単糖（グルコースなど）を用意する必要がある。加水分解では、主に硫酸あるいは糖化酵素が用いられる。本研究では糖化酵素を用いた。ただし、酵素による糖化では、酵素の基質へのアクセシビリティを高める必要があり、前処理が実施される。植物体の乾燥・破碎後に実施される前処理としては、アルカリ処理、A/O処理、希硫酸処理および加熱処理を行った。各処理条件を表2にまとめる。

表1 本研究で用いたバイオマス

| 慣用名    | 品種    | 備考                              |
|--------|-------|---------------------------------|
| トウモロコシ | KD730 | 高知大学にて夏季60日間ポット栽培 <sup>2)</sup> |
| ギニアグラス | ナツカゼ  | 高知大学にて夏季60日間ポット栽培 <sup>2)</sup> |
| ヒシ     | —     | 鳥取県湖山池にて採取（2009年8月）             |
| ホテイアオイ | —     | 高知県石土池にて採取（2009年7月）             |

表2 本研究での前処理方法およびその条件

| 前処理方法  | 条件（固液比:10% (W/V)）                                 |
|--------|---------------------------------------------------|
| アルカリ処理 | 1%NaOH溶液を使用。24時間室温で反応。時々攪拌。                       |
| A/O処理  | 1%NaOH溶液を使用。12時間後に過酸化水素水を1%量添加。さらに12時間室温で反応。時々攪拌。 |
| 希硫酸処理  | 1%HClを使用。オートクレーブ（121℃、30分）で反応。                    |
| 加熱処理   | 蒸留水を使用。オートクレーブ（121℃、30分）で反応。                      |

前処理後のバイオマスは遠心分離（3500 rpm, 10分）で回収し、回収したバイオマスを酢酸緩衝液（pH4.5）で3回洗浄した。3回洗浄後、pHがほぼ4.5となることを確認した。蒸留水を用いて回収したバイオマスを蒸発皿に受け、乾燥後（105℃, 2時間）その重量（固形物回収率）を求めた。固形物回収率は各バイオマスに対して2回求めた。

### (3) セルラーゼによる糖化

滅菌済み15 mLチューブに前処理済みバイオマス0.2 g（乾重）を入れ、メイセラゼ（明治製菓）が2 g/Lとなる酢酸緩衝液（pH4.5）を4 mL添加した。これらをインキュベーターで加温、振とうした（45℃, 48時間）。各バイオマスについて3回糖化を実施した。糖化率は、前処理済みバイオマス重量あたりのグルコース生成率を実測により求め、固形物回収率を掛けることで前処理前バイオマス（乾燥バイオマス）重量に対するグルコース生成率を求め、評価した。

### (4) 複数酵素による糖化

主としてヘミセルロースの加水分解を意識し、メイセラゼにもう1種類市販酵素を添加し糖化を試みた。添加した酵素はセルラーゼであるアマノ4とヘミセルラーゼであるアマノ90（いずれも天野エンザイム）である。3つの系を用意し、メイセラゼ（2 g/L）のみ、メイセラゼとアマノ4（それぞれ2 g/L）およびメイセラゼとアマノ90（それぞれ2 g/L）とした。糖化方法は2. (3)と同様とした。各系とも3回糖化を実施した。なお、セルラーゼであるアマノ4の単独での糖化（2 g/L）は実施しており、メイセラゼより大幅にグルコース生成率が劣ることを確認している（データ示さず）。

### (5) 高温L-乳酸発酵

LB培地で培養後ストックした*Bacillus coagulans* JCM2258を発酵に用いた。リアクターに前処理済みバイオマス5 g（乾重）とYeast Extract (Bacto) 2 gを加えて100 mLまでメスアップし、オートクレープした。冷却後、メイセラゼとアマノ4をそれぞれ0.2 gずつ添加し、pH4.5を維持しつつ湯浴（45℃）とスターラー攪拌により糖化を進めた。糖化後、上記*B. coagulans*を1%量植菌し、55℃でpH5.5としてL-乳酸発酵を実施した。

### (6) 分析方法

グルコースの測定はグルコースキット-CIIテストワコー（和光純薬）を用いた。キシロースを含む単糖の測定はHPLC（カラム, Shodex SUGAR SP0810；検出器, RI）を、L-乳酸の測定はHPLC（カラム, SUMICHIRAL OA-5000；検出器, UV）を用いた。

## 3. 結果と考察

### (1) 固形物回収率

表2で示した前処理を実施後の固形物回収率を図1に示す。主にリグニンの可溶化とヘミセルロースの加水分解を進める希硫酸処理<sup>9)</sup>では、いずれのバイオマスでも60%程度の固形物回収率となった。クリーニング作物のアルカリ系処理（アルカリ処理とA/O処理）では希硫酸処理と同程度の固形物回収率となったが、水生植物でのそれでは希硫酸処理より高い固形物回収率となった。アルカリ系処理はリグニンのけん化（膨化）および可溶化を進めるが<sup>9)</sup>、水生植物ではこの反応が進行しにくい可能性も考えられる。

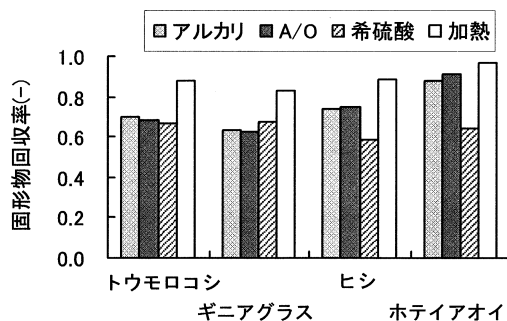


図1 各バイオマス前処理後の固形物回収率

### (2) グルコース回収率

メイセラゼによる糖化結果（前処理済みバイオマス重量に対するグルコース生成率）に固形物回収率を掛けた前処理前バイオマス（乾燥バイオマス）重量に対するグルコース生成率を図2に示す。前処理としては、A/O処理が比較した中でもっとも効率的である、水生植物の糖化効率が全体的に低いとの結果を得た。水生植物のグルコース生成率が低調に終わった結果については、先行事例<sup>7), 8)</sup>でも概ね0.1程度未満であったことから、植物体構造に起因すると考えられる。

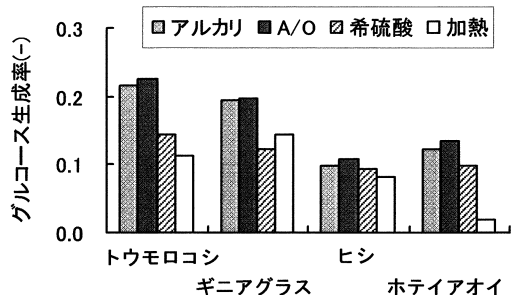


図2 前処理前重量あたりのグルコース生成率

### (3) トウモロコシの複数酵素による糖化

前処理済みバイオマスについて組成分析<sup>9)</sup>を試みた結果、A/O処理済みのバイオマスは希硫酸処理済みのものと異なりヘミセルロースを成分として有していた（データ示さず）。そこで、これらの加水分解を目的にヘミセルラーゼの併用を検討した。ヘミセルラーゼとしてアマノ90を用いたが、セルラーゼであるアマノ4のブレンドも併せて試みた。A/O処理済みトウモロコシにおける糖化結果を図3に示す。その結果、アマノ90やアマノ4を併用することで、グルコース生成量は変わらないもののキシロース生成量が増加した。さらに、セルラーゼであるアマノ4を用いたほうがアマノ90より多くのキシロースを生成できた。なお、いずれの酵素についても、もともと酵素が抱えている単糖濃度は差し引いて評価している。

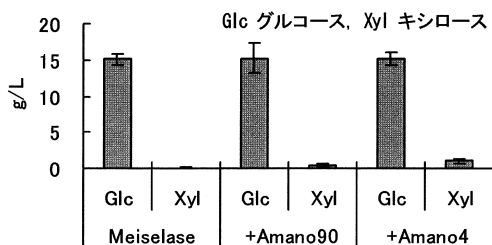


図3 酵素併用によるA/O処理済みトウモロコシの糖化

### (4) トウモロコシの高温L-乳酸発酵

高温L-乳酸発酵は、ヘミセルロース由来の単糖をL-乳酸化できる<sup>10)</sup>。そこで、メイセラゼとアマノ4により糖化したトウモロコシ糖化物を高温L-乳酸発酵に供した。トウモロコシの糖化・発酵に先立ち、糖化のみの反応経時変化を2系列で観察した（この実験ではpH4.5の酢酸緩衝液を使用した）。その結果、3日後のグルコース、キシロース濃度に対して1日経過後ではグルコース；88%，キシロース；84%が生成した。高温L-乳酸発酵は、温度について酵素の至適条件と近いことから、糖化と発酵を同一槽で起こさせる並行発酵も可能である<sup>11)</sup>。そこで、当該条件での糖化時間を1日とし、糖化物のL-乳酸発酵を実施することとした。

上記と同条件（ただし、緩衝液ではなく希釈HClとNaOH溶液でpHを調整）で糖化を進め、糖化開始から1日後に*B. coagulans* JCM2258を植菌した。植菌後の経時変化を図4に示す。植菌から1日経過後では、L-乳酸の生成が見られなかったが、2日後以降L-乳酸の生成およびグルコースとキシロースの消費が確認された。1日経過後にL-乳酸発酵が立ち上がらない現象については、別途トウモロコシやソルガムでも確認している。一方、水生植物の発酵では1日後には発酵が終了していた（データ示さず）。クリーニング作物の糖化に際しては何らかの発

酵阻害物が生成している可能性も考えられるが、この時間を糖化時間に充当することも可能と考えられる。

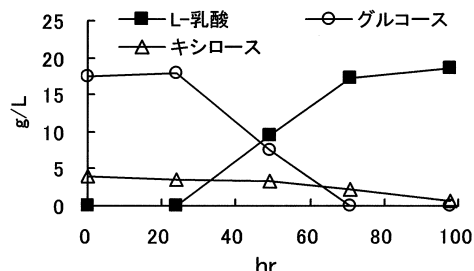


図4 酵素併用トウモロコシ糖化液の高温L-乳酸発酵

## 4. まとめ

農地の過剰栄養塩吸収を目的とするクリーニング作物候補と水環境で異常繁茂する水生植物の酵素糖化およびL-乳酸発酵を試みた。酵素糖化のための前処理については、比較した中ではA/O処理が後段の糖化を効率的とした。酵素糖化に関しては、メイセラゼにアマノ4（いずれも工業用セルラーゼ）を併用することでヘミセルロース由来のキシロースが生成できることを確認した。ヘミセルロースを含む糖化液を高温L-乳酸発酵に供し、グルコースおよびキシロースを消費し、L-乳酸を生成した。

## 謝辞

本研究は、JST,CRESTおよび平成21年度地域の産学官連携による環境技術開発基盤整備モデル事業の補助により実施された。また、明治製菓株式会社よりメイセラゼの提供を受けた。

## 参考文献

- 1) 貞松篤志ほか, 環境工学研究論文集, 45, 459-466, 2008.
- 2) 近藤圭介ほか, 環境工学研究論文集, 46, 313-319, 2009.
- 3) 井上賢大ほか, 第13回日本水環境学会シンポジウム講演集, 67-68, 2010.
- 4) 永禮英明ほか, 環境工学研究論文集, 47, 印刷中.
- 5) たとえば, 山本哲史ほか, 大成建設技術センター報, 40(44), 1-6, 2007.
- 6) Feist, W.C. et al, J. Anim. Sci., 30(5), 832-835, 1970.
- 7) 三嶋大介ほか, 第39回下水道研究発表会, 419-421, 2002.
- 8) 磯部靖夫ほか, 第43回日本水環境学会年会講演集, 99, 2009.
- 9) Shuter, A. et al, [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html), 2008.
- 10) Patel, A. et al, Appl. Environ. Microbiol., 72(5), 3228-3235, 2006.
- 11) Akao, S. et al, Proceedings of World Water Congress & Exhibition in Montreal, CD-ROM, 2010.