

B-11 食物由来有機性廃棄物を原料とした高温L-乳酸発酵における多糖利用の効率化に関する研究

○楠田 育成^{1*}・西村 文武¹・篠本 知沙¹・小林 裕典¹・水野 忠雄¹・
日高 平²・津野 洋³

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

²独立行政法人土木研究所（〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6）

³大阪産業大学人間環境学部（〒574-8530 大阪府大東市中垣内3-1-1）

* E-mail: kusuda.yasunari.2s@kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

食物由来有機性廃棄物(生ごみ)は、発生量が年間 1800 万トンにも達するが、その約 80%が未利用であり¹⁾、バイオマスの有効利用の観点からもその利用率の向上が希求されている。バイオマスの利用方法には、エネルギー源として利活用する方法や、堆肥や飼料等製品として利活用する方法がある。また、近年、生分解性素材としての活用についても強い関心が寄せられている。生ごみは生分解性素材のひとつであるポリ乳酸の原材料である乳酸に変換できるとして、その発酵による乳酸生成技術の開発がなされてきた。赤尾らは、非滅菌生ごみから一段式発酵法で比較的容易に高光学純度の L-乳酸を製造する技術開発を行い、高温 L-乳酸発酵の有効性と操作条件を明らかにしたが、糖質の消費率は 51~64%に留まり、糖質化性の面で改善の余地があることも同時に示している²⁾。一方、糖質を多く含む米もバイオマス資源として注目されている。休耕田等を利用し、食用には適さないものの多収穫が可能な品種の米栽培を行うことで、水田の有効活用と効率的なバイオマス生産の両方が達成できるものとして、活用が期待されている。しかしながら、米を主基質とした一段式乳酸発酵の研究例は少ない。既往の知見では、米単独基質よりも米を含む生ごみを基質とする場合に多糖分解率が向上する結果が得られていることから³⁾、多糖と共存する物質の乳酸発酵への効果を調査することで、糖質化性向上の操作上の要諦を解明できることが期待される。

本研究では、生ごみの乳酸発酵法の更なる高収率化を目指し、非滅菌条件下での高温L-乳酸発酵における優占種*Bacillus coagulans*を利用した乳酸発酵において、生ごみや多収穫米を原料としたときの、多糖からの乳酸発酵の効率化について調査・検討することを目的とした。具体

的には、生ごみ中成分の糖質化性への影響を調査し、共存物質の添加による多糖糖化効果について考察した。

2. 実験方法

(1) 基質および植種材料

本研究では模擬生ごみおよび多収穫米を基質として使用した。模擬生ごみの材料は、過去の文献⁴⁾を参考に表1のように決定した⁵⁾。また模擬生ごみの特性を表2に示す。培養実験において、生ごみ培地は滅菌操作を行わずに利用した。多収穫米は、京都府農林水産技術センター農林センター作物部から提供して頂いた品種「モミロマン」

表1 模擬生ごみの材料

分類	湿重量%	食品類	湿重量%
野菜類	50	キャベツ	10
		じゃがいも	10
		人参	10
		大根	10
		白菜	10
果物類	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 模擬生ごみの特性

測定項目	単位	測定値
糖質	g-glucose/L	83.8
TS	g/L	204
SS	g/L	93.7
pH	-	5.4
T-N (Soluble)	mgN/L	971
COD-cr (Total)	g-COD/L	160
COD-cr (Soluble)	g-COD/L	101

を使用した。その特性を表3に併せて示す。米は精米および炊飯したものを使用した。植種材料としてL-乳酸発酵液を2種類作成した。すなわち、発酵液として模擬生ごみのL-乳酸発酵液を植種し、pH 5.5で培養温度55℃の条件下で約2日間培養して作成したものと、米のみでL-乳酸発酵を達成した時の発酵液を植種してpH 5.5、培養温度55℃の条件下で約5日間培養して作成したものを用いた。なお、前者では16S rRNA遺伝子を標的とした微生物群集解析により、この植種材料はほぼ*B.coagulans*で優占化されていると判断できている。

表3 「モミロマン」の特性

測定項目	単位	測定値
糖質	g-glucose/g	0.75
密度	g/cm ³	1.42
T-N (Soluble)	mgN/L	0.13
COD-cr (Total)	g-COD/g	0.82
COD-cr (Soluble)	g-COD/g	0.22

(2) 実験装置および分析項目

容積1 Lのガラス製の嫌気性反応器を用い、ウォーターバスを用いて反応槽内温度を調整した。発酵液は機械攪拌し、10%アンモニア水溶液を中和剤として用いた。本研究では、pH、全糖、有機酸、D、L-乳酸、TNおよび16S rRNA遺伝子濃度の測定を行った。乳酸の光学純度は、精製したL-乳酸とD-乳酸の濃度差をL-乳酸とD-乳酸の濃度和で除することで算出した。また、乳酸収率は最終乳酸濃度と初期乳酸濃度の差を初期全糖濃度で除することで、全糖分解率は最終全糖濃度を初期全糖濃度で除したものを1から引くことでそれぞれ算出した。

3. 結果および考察

(1) 生ごみを基質とした乳酸発酵

まず、生ごみ中の素材を各々ひとつずつ除き、生ごみ中の素材のうち多糖の分解を促進させている成分について調査した。Test Iで基質を生ごみ330 g/Lとして基本条件とし、Test IIでは生ごみ中の各素材を各々除外したもの

を基質として実験を行った。いずれの実験も、pH 5.5、温度55℃とし、発酵は96時間行った。

各系での結果を表4に示す。いずれの系も乳酸が生成され光学純度も99%以上となり、乳酸発酵が生じたと判断できる。全糖分解率は、基本条件であるTest I-1で0.79となり最も高い値となった。低い値を示したのはTest II-6のバナナの皮、Test II-11の魚介類を除いた場合であり、各々0.23および0.47となった。乳酸収率は、Test II-6で0.51とTest I-1の0.57より低い値となった。*B. coagulans*は非常に緩やかではあるがペクチンを資化する可能性があるため⁹⁾、ペクチンを含むバナナ果皮は資化性の良い基質であるとされている。この報告と本研究の結果は一致しており、バナナ果皮を除いたことにより全糖分解率および乳酸収率が下がったと考えられる。また、全糖分解率の差よりバナナの皮が他の糖の分解を促進させていると判断された。

(2) 米を基質とした乳酸発酵

米を基質とした時の最適な有機窒素源(イーストエキストラクト、ポリペプトン)濃度、ミネラルの影響、pHおよび温度を調べることを目的として、実験を行った。全ての実験において、基質は米60 g/Lとした。まず、Test IIIで有機窒素源の最適添加濃度を調べた。表5に各実験条件および結果を示す。Test III-1では、酢酸がわずかに生成されたのに対して、Test III-2では酢酸が1 g/L、その他の系では酢酸が1.4 g/L、蟻酸が0.7 g/L以上生成された。また、16S rRNA遺伝子濃度は、実験開始とともに各系で上昇し、初期濃度が 4.5×10^8 copies/Lから 3.5×10^9 copies/Lであったのに対して、実験終了時では、 1.5×10^{10} copies/Lから 8.0×10^{11} copies/Lであった。有機窒素源添加濃度が上昇するにつれ全糖分解率および乳酸収率は、それぞれ0.26から0.82および0.14から0.78へと上昇した。一方で、最終光学純度はTest III-2およびTest III-3で97%であったのに対して、Test III-4およびTest III-5ではそれぞれ95%および82%と減少した。有機窒素源添加濃度が上昇するにつれ全糖分解率および乳酸収率は向上したものの、Test III-4

表4 生ごみ中の素材が乳酸発酵に与える影響

Test No.	基質	除いたもの	初期糖濃度 (g/L)	最終糖濃度 (g/L)	生成乳酸濃度 (g/L)	生成酢酸濃度 (g/L)	光学純度 (%)	全糖分解率(-)	乳酸収率(-)
I-1		無し	37.77	7.93	21.70	0.00	100	0.79	0.57
II-1		キャベツ	48.06	14.40	34.14	1.29	100	0.70	0.71
II-2		根菜類 (じゃがいも、ニンジン、大根)	48.19	9.89	34.17	3.83	99	0.79	0.70
II-3		白菜	34.66	12.55	23.16	1.23	99	0.64	0.66
II-4		りんご	38.53	10.31	30.40	1.82	100	0.73	0.79
II-5		オレンジの皮	34.29	12.45	28.02	1.03	99	0.64	0.82
II-6	生ごみ 330g/L	バナナの皮	30.51	23.45	15.84	2.25	100	0.23	0.51
II-7		米	24.49	9.86	19.09	1.75	99	0.60	0.77
II-8		パン	33.06	16.13	25.64	1.05	99	0.51	0.77
II-9		麺類	29.66	12.26	20.01	1.25	99	0.59	0.67
II-10		挽肉	51.73	14.70	35.70	1.50	100	0.72	0.69
II-11		魚・魚の骨	35.80	18.98	21.47	1.62	100	0.47	0.53
II-12		卵	54.22	27.01	35.48	0.00	99	0.50	0.65

以降では、光学純度が95%以下となった。従って有機窒素源の適切な添加濃度は、Test III-3の0.5 g/Lであると考えられた。

次に、Test IVにおいて、Test III-1およびTest III-3の系にミネラルを添加し、その影響を調べた。表6に各実験条件および結果を示す。Test IV-1 (Test III-1にミネラルを添加) では開始直後から全糖濃度が緩やかに減少し始め、それと同時に乳酸濃度が増加し始めた。Test IV-2 (Test III-3にミネラルを添加) では発酵開始約37時間後から急激に減少し始め、それと同時に乳酸濃度が増加し始めた。それぞれの系で酢酸および蟻酸が約2.2 g/Lおよび約1 g/L、ならびに酢酸が約1.7 g/Lとなった。有機窒素源およびミネラルの両方を添加しなかったTest III-1とTest IV-1を比較すると、Test IV-1が全糖分解率および乳酸収率がわずかではあるが高くなり、ミネラル添加の影響が観察された。一方、有機窒素源のみ添加したTest III-3とTest IV-2を比較すると、Test IV-2がTest III-3よりも高い全糖分解率を得られたものの乳酸収率はほとんど差が無く、また光学純度が92%と低い値となった。従って、ミネラルの添加により乳酸発酵は促進されるものの、その影響はわずかであり有機窒素源を添加することによる乳酸発酵促進効果の方が大きいと考えられた。

Test Vにおいて、Test III-3の系での温度を変化させることにより、その影響を調査した。Test V-1 (37℃)およびTest V-2 (45℃)において、全糖濃度の減少および乳酸生成が確認された一方で、Test V-3 (70℃)では、確認されなかった。Test V-1では全糖分解率が89%と高い値を示した。生ごみを原料とした場合、中温発酵は高温発酵と比較して糖質に関して高い資化性を有することが知られており、これは、多様な微生物が中温環境では生存可能であり、糖を消費したためであると考えられる。しかし乳酸収率は0.40と低い値となった。よって、適切な温度は55℃であると考えられる。

同様に、pHを4.5, 6.5, 7.0と変化させ、その影響を調べた。pH 4.5では、全糖分解率および乳酸発酵ともに最も

低い値となり、ほとんど乳酸発酵が生じなかった。一方、pH 6.5および7.0では高い全糖分解率が得られたが、酢酸および蟻酸が多く生成していることから、*B. coagulans*以外の菌による糖質の資化も生じたと考えられ、米を基質としたL-乳酸発酵において、温度55℃の条件下での適切なpHは5.5であると考えられた。

4. まとめ

本研究では、非滅菌条件下での高温乳酸発酵における優占種である有胞子乳酸菌*Bacillus coagulans*を利用した乳酸発酵における多糖利用の効率化について検討し、以下に本研究で得られた成果を記す。

- 1) 生ごみ成分の「バナナの果皮」または「魚介類」を除くと、全糖分解率および乳酸収率が大きく低下した。特に、多糖であるペクチンを含むバナナの果皮を除いた場合では全糖分解率が0.23、乳酸収率が0.51となり、大幅な低下が見られた。バナナの皮が他の糖の分解を促進させている可能性が示された。
- 2) 米を基質としたとき、有機窒素源を添加すると乳酸発酵が生じた。添加濃度は0.5 g/Lが適切で、それ以上の添加では、光学純度が下がりがかつ酢酸および蟻酸も多く生成された。一方、ミネラルを添加した場合、全糖分解率および乳酸収率は向上したが、有機窒素源の添加と比べその影響はわずかであった。
- 3) 米を基質としたときの適切な高温L-乳酸発酵条件は、有機窒素源添加が0.5 g/L、温度が55℃、pHが5.5であった。このときの全糖分解率および乳酸収率は、各々約0.70および約0.50であった。

謝辞：本研究の一部は平成24年度環境研究総合推進費補助金「有機性廃棄物からの高効率有機酸発酵技術の開発および反応機構解析」(K112005：代表 日高平)の補助を受けました。ここに記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 農林水産省ホームページ、「バイオマス種類別の利用率等の推移」,2013/09/23, http://www.maff.go.jp/j/shokusan/biomass/b_kihonho/pdf/riyou.pdf
- 2) 赤尾聡史(2006): 生ごみを原料とした高温L-乳酸発酵に関する研究, 京都大学博士学位論文
- 3) 向阪悠佑(2012): 生ごみおよび多収米を原料とした高温L-乳酸発酵における多糖分解の高効率化, 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻修士学位論文
- 4) 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, pp.116-119.
- 5) 洪鋒, 津野洋, 日高平, 千智勲(2003): 1日1回給餌操作での高濃度高温メタン発酵の生ごみ処理への適用性と操作因子に関する研究, 第40回下水道研究発表会講演集, pp.1036-1038.
- 6) 赤尾聡史, 宮井公太郎, 堀江匠, 津野洋(2006): 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, 環境工学研究フォーラム講演集, 43, pp.74-76.

表5 有機窒素源の影響

Test No.	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5
有機窒素源(g/L)					
Yeast Extract	0	0.1	0.25	0.5	1
ポリペプトン	0	0.1	0.25	0.5	1
ミネラル			無し		
pH(-)			5.5		
温度(℃)			55		
全糖分解率(-)	0.26	0.61	0.70	0.79	0.82
乳酸収率(-)	0.14	0.48	0.50	0.66	0.78
最終光学純度 (%)	94	97	97	95	82

表6 ミネラルの影響

Test No.	III-1	IV-1	III-3	IV-2
有機窒素源(g/L)				
Yeast Extract	0	0	0.25	0.25
ポリペプトン	0	0	0.25	0.25
ミネラル	無し	有り	無し	有り
pH(-)			5.5	
温度(℃)			55	
全糖分解率(-)	0.26	0.31	0.70	0.82
乳酸収率(-)	0.14	0.23	0.50	0.49
最終光学純度 (%)	94	95	97	92