

## B-12 植物系バイオマスの糖と栄養素 を利用した高温L-乳酸発酵

○赤尾聡史<sup>1\*</sup>, 永禮英明<sup>2</sup>, 前田守弘<sup>2</sup>, 近藤圭介<sup>3</sup>, 藤原拓<sup>4</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生命科学研究科 (〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中3-1-1)

<sup>3</sup>愛媛大学大学院連合農学研究科 (〒783-8502 高知県南国市物部乙200)

<sup>4</sup>高知大学教育研究部自然科学系農学部 (〒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

植物体非可食部を糖化・発酵する場合における、発酵時の栄養素供給について検討した。窒素やリンを含む栄養素は、その要求性に大小はあるもののいずれの発酵においても必要であり、通常発酵では酵母エキスやコーンステープリカー (CSL) などが利用される。これらは、高価とは言えないまでも経費を必要とし、かつ、発酵場所までの輸送も要する。したがって、なるべく安価に、かつ、オンサイトで栄養素が供給されることが望ましい。

発酵の栄養素について、Thomsen<sup>1)</sup>は牧草搾汁液の利用を報告した。牧草搾汁液は飼料ペレットを製造する際に発生する副産物である。ここでは、L-乳酸発酵などにおけるCSL代替として牧草搾汁液の利用事例を紹介している。一方、筆者らは、トウモロコシ茎葉を破碎後水に浸漬することで窒素やリンなどが容易に溶出してくることを報告した<sup>2)</sup>。溶出したリンなどは結晶化し肥料利用することを検討しているが、先のThomsenの例を踏まえるとCSL代替としての利用も考えられる。

以上から、本研究ではトウモロコシ茎葉に含まれる栄養素 (特に主要となる窒素とリン) を利用した高温L-乳酸発酵を検討した。まず、高温L-乳酸発酵に必要な窒素、リン量を定めた。次に、トウモロコシ茎葉からの糖、窒素およびリンの回収量を求め、回収糖の発酵に必要な窒素・リン量が回収窒素、リンから賄えるかの検討を行った。最後に、トウモロコシ茎葉からの糖と栄養素を用いた高温L-乳酸発酵を実施した。

### 2. 実験方法

#### (1) トウモロコシ茎葉

高知大学で2009年晩秋に60日間栽培されたトウモロコ

シ (KD731) を使用した。70°Cで乾燥後、家庭用ミルあるいはワンダーブレンダー (大阪ケミカル) で破碎し、1 mmふるいを通過させた。

#### (2) 栄養塩水の回収

破碎された乾燥トウモロコシ300 gを3 Lの蒸留水に浸漬し、ガラス棒で攪拌した後1日静置した。上澄みをガラス繊維ろ紙GF/A (アドバンテック) を用いて回収した。さらに、固形物に対して1.2 Lの蒸留水を加えて洗浄し、その上澄みをGF/Aにより回収した。合計の上澄み回収量を3 Lとし、これを栄養塩水とした。

#### (3) 前処理および糖化

栄養塩抽出されたバイオマスを1%水酸化ナトリウム溶液で前処理した。処理期間は1日とし、固液割合はバイオマス乾重1 gに対してアルカリ溶液10 mLとした。前処理中の攪拌は振とう機 (タイテック, NR-2) を用いた。前処理後は、GF/Aにより固液分離し、0.1 M酢酸緩衝液を用いて3回洗浄・固液分離した。回収した固形物は105°Cで乾燥し、ワンダーブレンダーにて破碎した。

糖化は、pH4.5、45°Cおよび3日間の条件で行った。250 mL耐熱ビンに3 gの前処理済みバイオマスを添加し、オートクレーブした。また、0.01 M酢酸緩衝液を用意し、セルラーゼを加えたのち滅菌ろ過し、200 mLを耐熱ビンに加えた。セルラーゼ添加量は60 FPU/g-基質とした。糖化はインキュベータ内で行い、内容物はスターラー攪拌した。糖化終了後は5分間ボイルし、GF/Aにより固液分離した。これをグルコース濃度が25 g/Lとなるように遠心濃縮 (タイテック, VC-36R) した。

#### (4) L-乳酸発酵

発酵は滅菌された15 mLチューブで行った。4 mLの糖液 (グルコース溶液あるいは糖化液、混合後の濃度をグルコースとして10 g/Lと設定)、5 mLの栄養液 (酵母エキス・粉末 (Difco Laboratories)、塩化アンモニウム

(和光純薬, 特級), リン酸二水素カリウム (和光純薬, 特級) あるいは回収した栄養塩水) および1 mLの炭酸カルシウム含液 (和光純薬, 特級; 混合後の濃度を炭酸カルシウムとして0.56 g/L; 栄養液に塩酸添加した場合はそれらを中和できる量を別途追加) を混合し, 100  $\mu$ Lの *Bacillus coagulans*培養液を添加して発酵を開始した。インキュベータ内 (55°C) で振とう培養を5日間した。

糖液, 栄養液および炭酸カルシウム含液は別々にオートクレーブ (121°C, 20分) した後, 発酵に用いた。 *B. coagulans*培養液はLB培地を用いており, CN比, CP比を計算する際は, この培養液の持ち込み窒素, リンの影響も加味した。L-乳酸発酵は繰り返し数を5回とし, 多重比較はGames-Howell's multiple range test (IBM, SPSS version 19.0.0) により行った。

### (5) 化学分析

全窒素 (TN) はTOC・TN計 (島津製作所, TOC-V CSN, TMM-1), 全リン (TP) はICP-AES (SII, Vista-pro), L-乳酸はHPLC (カラム; 住化分析センター, OA-5000L), グルコースはグルコースCII-テストワコー (和光純薬) および還元糖はDNS法<sup>3)</sup>により求めた。

## 3. 結果および考察

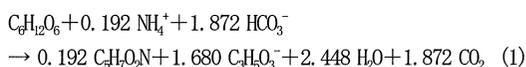
### (1) 高温L-乳酸発酵に必要なCN比, CP比

一定量のグルコースに対して酵母エキスの添加量を段階的に削減した培養結果をFig. 1 Aに示す。グルコースの炭素に対するCN比とCP比がそれぞれ30.3と318のとき, L-乳酸濃度が8 g/L (収率0.80) を下回った。

Fig. 1 AにおいてCN比とCP比がそれぞれ30.3と318である状態をベースに, これに塩化アンモニウム (CN比: 22.5), リン酸二水素カリウム (CP比: 234) および双方添加した系を用意し比較した (Fig. 1 B)。その結果, リン酸二水素カリウムを添加した場合に限りL-乳酸収率が0.8程度まで上昇した。以上から, Fig. 1 Aの場合にL-乳酸収率が低下した原因としてリン不足が示された。

酵母エキスをFig. 1 Aよりもさらに削減し, 不足するリンをリン酸二水素カリウムで補うことでCP比を234に維持した培養結果をFig. 1 Cに示す。これによると, CN比が70を下回る場合, L-乳酸収率が0.8以上となった。ただし, 窒素飢餓時において細菌は, 必要窒素量を半分程度まで削減できる<sup>4)</sup>とのことから, 窒素飢餓とならない窒素の最小添加量としてCN35を定めた。

一方, 乳酸発酵, 細胞合成および電子ドナーの半反応式から必要となる窒素量を求めた結果<sup>4)</sup>, 乳酸収率を平均値0.84 (n=80, CN $\leq$ 35かつCP $\leq$ 234を満たすすべての培養結果の平均値) とした場合, CN比27が求めた (式1)。また, 必要リン量を窒素の1/7<sup>4)</sup>とすると, CP比は189となった。実験で求めたCN比とCP比は, 理論的なそれらと比べて大きく違わず, 概ね妥当な値であると考えられた。以上から, 高温L-乳酸発酵に必要なCN比, CP比はそれぞれ35と234とした。



### (2) 栄養塩水を用いた高温L-乳酸発酵

乾燥トウモロコシ1 gあたりの回収窒素, リン量はそれぞれ9.6, 1.6 mg/gとなった。また, 栄養塩水回収後のトウモロコシを前処理・糖化し, オートクレーブした後のグルコース収率が乾燥トウモロコシ1 gあたり0.20 g/gであったことから, 回収グルコース1 gあたりの回収窒素, リン量はそれぞれ48, 8.1 mg/gとなった。これらをCN比, CP比で示すとそれぞれ8.4と49となることから, 回収される窒素とリン量は同じく回収されるグルコースの発酵に対して充分であると言える。

次に, 栄養塩水を用いて高温L-乳酸発酵を実施した。ただし, 回収される栄養塩水を全量発酵に用いることは過剰であるため, 一部を発酵に用いることとした。先のグルコース1 gあたりの回収窒素, リン量をそのままの比率で発酵に供する状態を100%添加量とし, その20%,

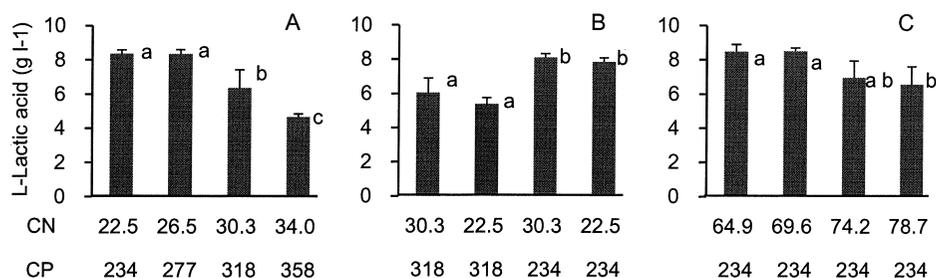


Fig. 1. L-Lactic acid concentration in each batch incubation (n=5). Bars indicate standard deviations. A: additive amount of yeast extract was set at a C/N ratio of 22.5 to 34.0. B: yeast extract addition was set at a C/N ratio of 30.3. C/N and/or C/P were adjusted to 22.5 and/or 234. C: yeast extract addition was set at a C/N ratio of 64.9 to 78.7, and the C/P ratio was adjusted to 234. Different lowercase letters indicate significant

40%および60%添加量を高温L-乳酸発酵に供した。具体的には、10 mLの培養における5 mLの栄養液について、栄養塩水をそれぞれ1, 2, 3 mL添加した。また、栄養塩水の加水分解を目的に、塩酸を5 mLの栄養液に対して0, 2.5および5%添加する系をそれぞれ用意した。栄養塩水と塩酸を添加した後蒸留水で5 mLまでメスアップし、オートクレーブしたものを栄養液とした。合計9種類の栄養液によりグルコースを発酵した結果、栄養塩水2 mL以上添加した系において概ねL-乳酸収率0.8を達成した (Fig. 2)。栄養塩水2 mL添加時の発酵開始時におけるCN比, CP比は19と118であり、酵母エキスで求めたCN比, CP比より低いことから、栄養塩水は酵母エキスと比べて利用し難い栄養であった。また、栄養塩水の酸加水分解によりL-乳酸収率が向上するケースから、栄養塩水中の窒素やリンは細菌が利用するのに分解が必要となる成分が含まれていると考えられた。

### (3) トウモロコシからの糖と栄養塩水を用いた高温L-乳酸発酵

トウモロコシから作成した糖液は、オートクレーブ後の発酵前においてグルコース濃度23.3 g/Lであった。これと栄養液 (5 mL中に栄養塩水2 mLを含む, バイオマスから回収されるグルコースに対して供給できる回収栄養塩の40%量に相当, オートクレーブ済み) および炭酸カルシウム含量を用いて高温L-乳酸発酵を実施した。別途、栄養液を蒸留水で置き換えた系も設けた。培養の結果、栄養塩水を添加した系はグルコース基準のL-乳酸収率が $1.04 \pm 0.05$  (標準偏差), 他方は $0.53 \pm 0.05$ となった。栄養塩水を添加した系は有意にL-乳酸収率が向上した ( $p < 0.05$ )。なお、L-乳酸収率が1を超える値となった理由は、糖液中にはグルコース以外の糖が含まれていることによると考えられる。発酵前の糖液中には還元糖が36.7 g/L存在していた。

一方、栄養塩水を添加しない系においてL-乳酸が生じた理由であるが、糖液中にバイオマスおよびセルラーゼ由来の窒素やリンなどが存在したためと考えられる。もともとトウモロコシ乾重1 gに対して含まれるTNおよびTPがどの程度発酵の場まで至ったかを計算すると、栄養塩水を添加しなかった系ではTN: 5.9%, TP: 5.4%であった。発酵に必要なCN比, CP比をもとに回収グルコースの発酵に必要な窒素, リン量を求め、それぞれがもともとトウモロコシに含まれるTNとTPのどの程度に相当するかを計算すると、それぞれ6.7%と12.2%となった。栄養塩水を添加しない系において上流から至った窒素, リンは、量的には無視できない量であった。このことが、栄養塩水を添加しなくてもL-乳酸収率0.53に至った理由と考えられる。言い換えると、栄養塩を添加した系について、糖液から持ち込まれる成分を考慮すると、栄養塩水添加量はさらに低減化できると言える。

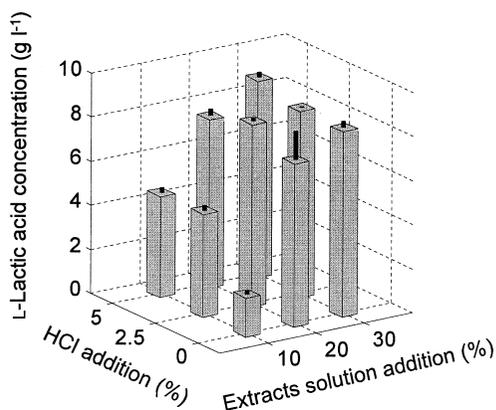


Fig. 2. L-Lactic acid concentrations in batch incubations using corn stover extracts and its hydrolysate as nutrients ( $n = 5$ ). Bars indicate standard deviations. Percentage of extract addition was consistent for the total culture media volume (10 mL) and that of HCl addition was consistent for the extracts solution volume (5 mL).

## 4. まとめ

本研究ではトウモロコシ茎葉に含まれる栄養素を利用した高温L-乳酸発酵を実施した。主な結果を以下に記す。

1. 高温L-乳酸発酵に必要な窒素, リン量を定めた。グルコースの炭素に対するCN比, CP比として35と234とした。
2. トウモロコシ茎葉から回収される窒素およびリン量は、その後の前処理・糖化を経て回収されるグルコースあたりでそれぞれ48, 8.1 mg/gとなった。
3. 回収される栄養素の40%以上を用いた発酵, すなわちグルコースあたりの窒素, リン量をそれぞれ19, 3.3 mg/g以上とする回収された栄養素を用いた高温L-乳酸発酵の結果、充分な収率 (収率0.8程度) を得た。また、トウモロコシ茎葉から回収された糖と栄養素を用いた高温L-乳酸発酵を実施した (グルコース基準で収率 $1.04 \pm 0.05$ )。

## 謝辞

本研究は、JST, CRESTの補助により実施された。

## 参考文献

- 1) Thomsen MH, Appl. Microbiol. Biotechnol. 68, 598-606, 2005.
- 2) Nagare H et al, Water Sci. Technol. 66, 1110-1116, 2012.
- 3) Adney B and Baker J, <http://www.nrel.gov/docs/gen/fj/08/42628.pdf>, 1996.
- 4) Rittmann B and McCarty P, Environmental Biotechnology: Principles and Applications, McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2000.