

鳥取大学大学院工学研究科 学生会員 ○中谷真悟

鳥取大学大学院工学研究科 正会員 赤尾聡史, 増田貴則, 細井由彦

鳥取県生活環境部衛生環境研究所 正会員 門木秀幸

1. はじめに

高い光学純度を有する L-乳酸は、生分解性プラスチックであるポリ乳酸(PLA)の原料として利用できるものであるが、トウモロコシなどからのでんぷんから工業的な発酵によって製造されている。しかし、これらの原料は農作物可食部であり、PLA を増産させることは食料の安定供給に不安要因をもたらす。そこで、新たな原料の開拓が必要であり、農業活動における廃棄物が有力視されている。本研究では、稲わら・廃菌床の多糖利用を検討することとした。

農業廃棄物の多糖はセルロースとヘミセルロースから構成されるが、このうちヘミセルロースを構成する単糖(キシロース, アラビノースおよびマンノース)はエタノール発酵や L-乳酸発酵において資化困難な場合が多い。一方、我々は *Bacillus coagulans* による L-乳酸発酵を実施してきたが、同菌種は資化可能な単糖の範囲が広いことが指摘されている¹⁾。本研究では、上記単糖を資化できる *B. coagulans* 株を探索し、同株を用いて稲わら・廃菌床利用を行うこととした。

2. 実験方法

2.1 使用株

環境中からのヘミセルロース利用候補株(以下候補株)の探索では、鳥取市内のごみステーション中の生ごみ(2007 年 10 月 1 日採取)と鳥取大学湖山キャンパス内の土壌を使用した。生ごみおよび土壌を容積において 10 倍量の滅菌食塩水に懸濁させ、2 時間振とう後静置し、上澄みを順次希釈して Dextrose Tryptone 培地(Difco)に塗布した。55℃にて 48 時間培養後、黄色い変色を示したコロニーを釣菌し、L-乳酸発酵実験に使用した。

一方、*B. coagulans* 標準株として、(独)理化学研究所バイオリソースセンターより入手した JCM 2257, JCM 2258 および JCM 9076 株を L-乳酸発酵実験に使用した。

2.2 ヘミセルロース構成の単糖による L-乳酸発酵

滅菌済みの 15mL 遠沈管に各糖質(グルコース, キシロース, アラビノースおよびマンノース)溶液と栄養源となる濃縮培地(表 1)をそれぞれ 5mL 注ぎ、あらかじめ LB 培

地で 48 時間前培養した候補株および標準株を植菌させた。培養は、振とう恒温器(アズワン, PIC-100S)を用いて温度 55℃, pH7.0 付近の条件で 72 時間の振とう培養とした。培養後、糖質量と D-,L-乳酸量の測定を行った。

表 1. 濃縮培地の組成

(単位:g/100mL)			
yeast extract	bacto		1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	和光純薬 特級		0.1
MgSO ₄ ・7H ₂ O	和光純薬 特級		0.02
MnSO ₄ ・4H ₂ O	和光純薬 特級		0.004
FeSO ₄ ・7H ₂ O	和光純薬 特級		0.002
CaCO ₃	和光純薬 特級		1
滅菌済み			

2.3 稲わら・廃菌床の糖化

粉末状に加工した稲わらと廃菌床を希硫酸法²⁾(図 1)により糖化处理をした。なお、廃菌床はハタケシメジ栽培のものである。得られた糖化液は糖質濃度が薄いため、蒸発濃縮(約 10 倍)して L-乳酸発酵に用いた。



図 1. 糖化处理のフロー

2.4 稲わら・廃菌床糖化液の L-乳酸発酵

滅菌済みの 15mL 遠沈管に、稲わらと廃菌床の濃縮後の糖化液と栄養源となる濃縮培地(以下補材料)を 5mL ずつ注いだ。2.2 の実験で、キシロース, アラビノースおよびマンノースの資化が見られた株を植種し、振とう恒温器

で培養を行った。培養温度は 55℃とし、5 日間培養した。

2.5 分析方法

D-,L-乳酸はHPLC(日立, 液体クロマトグラフィシステム, SUMICHIRAL OA-5000), 糖質はフェノール硫酸法, 全有機炭素(TOC)および窒素(T-N)はTOC/T-N計(島津製作所, TOC-V_{CSN}), 全リン(T-P)はアスコルビン酸還元・モリブデン青吸光光度法にて求めた。

乳酸収率の計算では, 生成乳酸量を培養開始時の糖質量で除して算出した。光学純度は, D-,L-乳酸の絶対量を求め, その存在量から次式により算出した。

$$\left| \frac{(\text{L-乳酸}) - (\text{D-乳酸})}{(\text{L-乳酸}) + (\text{D-乳酸})} \right| \times 100(\%) \quad (1)$$

3.結果および考察

3.1 資化実験

ヘミセルロース構成の単糖であるグルコース, キシロース, アラビノースおよびマンノースを炭素源とする L-乳酸発酵を行った。結果を図 2 に示す。候補株では, どの株もグルコースから L-乳酸生成を行ったが, キシロースとアラビノースは資化しなかった。なお, マンノースについては,L-乳酸発酵を試みていない。 *B. coagulans* 標準株では, JCM 2257 は, キシロースとアラビノースとも資化しなかったが, マンノースからは L-乳酸を生成した。JCM 2258 と JCM 9076 は, キシロースとアラビノースから L-乳酸生成を行った。両株のうちマンノースに関しては, JCM 2258 は L-乳酸生成を行ったが, JCM 9076 は L-乳酸生成を行わなかった。以上より, *B. coagulans* JCM 2258 株がヘミセルロース構成の単糖として試みたもの全てを資化することが分かり, 同株を稲わら・廃菌床の L-乳酸発酵に用いることとした。

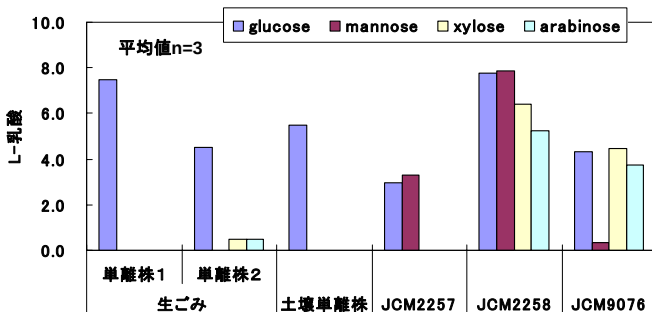


図 2. 資化実験結果

3.2 稲わら・廃菌床糖化液の L-乳酸発酵

本研究で作成した稲わら・廃菌床糖化液の組成を表 2 に示す。

表 2.稲わら・廃菌床糖化液の組成

	稲わら		廃菌床	
	濃縮前	濃縮後	濃縮前	濃縮後
TOC (g-C/L)	0.4	8.7	0.6	8.2
T-N (g-N/L)	0.01	0.13	0.04	0.35
T-P (g-P/L)	0.00	0.00	0.01	0.02
糖質 (g-glucose/L)	3.5	8.4	1.0	6.8
pH (—)	8.1	6.7	6.3	6.0

稲わら・廃菌床糖化液の補材料添加による L-乳酸発酵の結果を表 3 に示す。稲わらの乳酸生成量は 2.2g/L であり,廃菌床は 1.5g/L であった。乳酸収率では, 稲わらは 0.52, 廃菌床は 0.36 であった。光学純度に関しては, 稲わら・廃菌床とも, 99%以上となり, どちらも光学純度の高い L-乳酸が生成された。

表 3. 資化実験結果

	稲わら	廃菌床
L-乳酸(g/L)	2.2	1.5
光学純度(%)	99%以上	99%以上
乳酸収率(-) ^a	0.52	0.36

a: 基質中の糖質量基準
平均値(n=3)

4. 結論

草本・木質系廃棄物である稲わら・廃菌床を原料とする L-乳酸発酵を目的とし, ヘミセルロース構成単糖の資化が行える *B. coagulans* 株の探索, その株を用いた稲わら・廃菌床糖化液からの L-乳酸発酵を実施した。本研究で得られた結果を以下にまとめる。

- 1) *B. coagulans* JCM 2258 株は, ヘミセルロースを構成し資化が困難とされるキシロース, アラビノースおよびマンノースを資化することを確認した。
- 2) 希硫酸処理による稲わらと廃菌床糖化液を原料とし, *B. coagulans* JCM 2258 株を用いた L-乳酸発酵を実施した結果, 光学純度 99%以上の L-乳酸を培養開始時糖質量基準の収率で各々0.52と0.36 生成した。

今後は, 稲わら・廃菌床糖化液を原料とした場合の乳酸収率を改善するために, 希硫酸処理以外の糖化方法との組合せ(収率)を比較するとともに, 稲わら・廃菌床糖化液中の単糖ごとの資化性確認(単糖類定量)や発酵阻害物の定量および除去について検討する。

参考文献

- 1) Sneath , P . H . A . : Endospore-forming gram-positive rods and cocci. Holt J. G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol . 2 , 1104-1200 , Baltimore , Williams & Wilkins. 1986
- 2) 吉田隆: バイオマスエネルギーの特性とエネルギー変換・利用技術, pp259, (株)NTN, 2002