

# 生ごみを原料とした高温 L-乳酸発酵に関する研究

2006 年

赤尾 聡史

第1章 序論	1
第1節 概説	1
第2節 文献考察	2
2.1 生ごみの資源化	2
2.1.1 資源化への課題	2
2.1.2 今後の展開	4
2.2 L-乳酸発酵	5
2.3 高温発酵	7
第3節 本論文の目的と構成	9
参考文献	10
第2章 半連続式培養による生ごみのL-乳酸発酵に関する検討	13
第1節 概説	13
第2節 実験方法	14
2.1 実験装置	14
2.2 基質	15
2.3 植種材料	15
2.4 実験条件	15
2.5 分析項目	16
2.5.1 水質分析	16
2.5.2 乳酸収率の算出方法	16
2.5.3 光学純度の算出方法	18
2.5.4 微生物群集解析	18
第3節 実験結果および考察	19
3.1 高温発酵と中温発酵の比較	19
3.1.1 生ごみ培地	19
3.1.2 高温発酵 -Run 1-	19
3.1.3 中温発酵 -Run 2-	27
3.2 高温L-乳酸菌の由来と同定	32
3.2.1 高温L-乳酸菌の由来 - Run 3-	32
3.2.2 高温L-乳酸菌の同定	37
3.3 高温L-乳酸発酵に関する利点の整理と補足事項	39
3.3.1 多糖の加水分解	39
3.3.2 <i>Bacillus coagulans</i> を用いたL-乳酸発酵	39
3.3.3 非滅菌環境下における有価物の発酵	40
3.3.4 高温L-乳酸発酵における補足事項 - Run 4-	40
第4節 結語	44
参考文献	45

第3章 回分式培養による生ごみ高温 L-乳酸発酵の運転条件に関する検討	49
第1節 概説	49
第2節 実験方法	49
2.1 実験装置	49
2.2 基質	49
2.3 植種材料	50
2.4 実験条件	51
2.5 分析項目	51
2.5.1 水質分析および微生物群集解析	51
2.5.2 L-乳酸生成可能量	52
2.5.3 平均乳酸生成速度	52
2.5.4 重回帰分析	52
第3節 実験結果および考察	53
3.1 植種を伴わない場合の L-乳酸発酵条件	53
3.1.1 概論	53
3.1.2 培養 pH の影響 -TEST 1-	53
3.1.3 培養温度の影響 -TEST 2-	56
3.1.4 L-乳酸菌の同定	58
3.1.5 L-乳酸発酵の再現性 -TEST 3-	59
3.1.6 更なる高温条件の L-乳酸発酵への影響 -TEST 4-	61
3.2 植種を伴う場合の L-乳酸発酵条件 -TEST 5, 6, 7-	63
3.2.1 概説	63
3.2.2 実験結果	63
3.2.3 効率的な L-乳酸発酵条件の探索	66
第4節 結語	71
参考文献	73
第4章 乳酸発酵過程の連続モニタリングに関する検討	75
第1節 概説	75
第2節 実験方法	75
2.1 中和剤供給ポンプ駆動のモニタリング手法	75
2.2 半連続式培養における実験条件	76
第3節 実験結果および考察	77
3.1 回分式培養への適用	77
3.1.1 中和剤消費量と生成乳酸量の比較	77
3.1.2 中和剤消費量と生成乳酸量の経時変化の比較	77
3.1.3 容積あたりの乳酸生成速度の算出	81
3.2 半連続式培養への適用 - Run 5, 6-	87
3.2.1 概論	87

3.2.2 適用結果	87
第4節 結語	89
参考文献	90
第5章 生ごみの高温 L-乳酸発酵に対する阻害に関する検討	92
第1節 概説	92
第2節 実験方法	92
2.1 基質、植種材料および添加材料	92
2.2 実験条件	93
2.3 阻害経験式	94
第3節 実験結果および考察	95
3.1 乳酸塩による阻害 -TEST 8-	95
3.2 グルコース基質による阻害	97
3.2.1 概論	97
3.2.2 生ごみ中の栄養素量の確認 -TEST 9-	98
3.2.3 グルコース添加による阻害濃度の検討 -TEST 10-	99
3.2.4 過剰なグルコース添加での長期 L-乳酸発酵 -TEST 11-	101
3.3 塩化ナトリウム添加による塩阻害 -TEST 12-	102
第4節 結語	103
参考文献	104
第6章 高温 L-乳酸発酵の原料に関する検討	106
第1節 概説	106
第2節 実験方法	106
2.1 概論	106
2.2 基質および植種材料	107
2.3 実験装置	107
2.4 分析項目	107
2.5 実験条件	108
第3節 実験結果および考察	110
3.1 冷蔵保管中における生ごみの質的变化	110
3.1.1 概論	110
3.1.2 実験結果	111
3.1.3 冷蔵保管された生ごみの回分式高温 L-乳酸発酵 -TEST 13-	117
3.2 単糖類分析による高温 L-乳酸発酵資化糖の同定	118
3.2.1 概論	118
3.2.2 実験結果	119
3.3 多糖添加による L-乳酸発酵 -TEST 14-	123
3.3.1 概論	123

3.3.2 実験結果	125
3.4 バナナ果皮の L-乳酸発酵 -TEST 15-	128
3.4.1 概論	128
3.4.2 実験結果	129
第4節 結語	130
参考文献	131
第7章 結論	134
謝辞	

## 第1章 序論

### 第1節 概説

2002年12月、さらには2006年3月にバイオマス・ニッポン総合戦略が閣議決定された（農林水産省ホームページ；<http://www.maff.go.jp/biomass/>）。その趣旨は、地球温暖化の防止、循環型社会の形成、競争力のある新たな戦略的産業の育成、農林漁業、農山漁村の活性化である。換言すると、再生不可能な化石燃料に依存する社会からの脱却を、カーボンニュートラルなバイオマスを利活用することで達成し、併せて、その過程で荒廃しつつある1次産業の立て直しを行おうとする計画である。カーボンニュートラルなバイオマスの利活用は、世界的な潮流であり、京都議定書で定められた温室効果ガス排出量削減目標の達成も併せて、必達の課題と言える。なお、バイオマスは、生物資源を意味する言葉であり、その意味では森林、生物体、農作物などを広く含む。例えば、ブラジルにおいてサトウキビからエタノール生産が盛んに行われているが、これもバイオマスの利活用に含まれる。しかし、日本においては、農作物を生産して石油代替製品を製造することは、食料自給率の点からほぼ考えられないことである。そこで、日本におけるバイオマスでは、社会活動の結果排出される有機性廃棄物とその利活用の中心的存在となると考えられる。

バイオマス・ニッポン総合戦略（2006年）に記載されている有機性廃棄物の賦存量の内訳を図1-1に示す。これによると、家畜糞尿や下水、し尿汚泥が高い発生量を示している。ただし、これら有機性廃棄物は、発生形態から化学的な組成に至るまで異なる特徴を有していることから、それらを評価した上でそれぞれの有効利用方を検討することが必要である。その中で生ごみは、賦存量としては有機性廃棄物全体の約7%程度であるが、他の有機性廃棄物と異なり、易分解性の糖質を多く含むという特徴を有している。バイオマスから製造される石油代替製品であるエタノールは、トウモロコシやサトウキビの糖質を利用し製造していることから、易分解性の糖質を多く含む生ごみは、これら石油代替製品を製造する原料と成り得る可能性を有している。この点は、賦存量の多い家畜糞尿や下水汚泥が、現実的に堆肥化およびメタン発酵に利用方法が限定されていることに対して、生ごみは多種類の利用可能性を有していることを意味しており、メタン発酵も含めてより付加価値の高いものを選択、製造できるバイオマスと考えられる。一方で、生ごみは、発生量の多い家畜糞尿や下水汚泥と比べて、再利用率が20%程度と依然として低い。これは、生ごみが都市ごみ処分に組み込まれている点や、分散的に発生するため利用し難い点に起因するとされる。そこで、生ごみ独自の性質を利用し、従来に無い高付加価値の製品を製造できれば、資源化を阻む要因を乗り越えて生ごみの利活用が推進される可能性も考えられる。

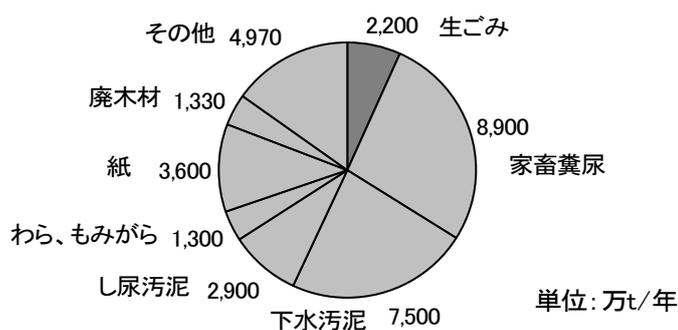


図1-1 有機性廃棄物の賦存量（バイオマス・ニッポン総合戦略より）

以上の事由から、バイオマスである生ごみの利活用推進に対しては、生ごみの特徴を生かせ、かつ、付加価値の高い利活用方策の探索が重要課題と考えられる。近年、その1つの方策として、生ごみからL-乳酸を製造する試みが報告されている(酒井と白井, 2005)。L-乳酸は、現在はその大半をトウモロコシなどの農作物から発酵により製造されているものであるが(Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000)、生分解性プラスチックであるポリ乳酸の原料となることから注目を集めている物質でもある。L-乳酸の製造は、最終的にはプラスチックの製造、利用を通じて石油消費量の低減化に反映させることができる。加えて、ポリ乳酸は生分解性を有するなど特異な性質を併せ持つことから、ポリ乳酸、同時にL-乳酸は石油程度の付加価値を帯びた独自の市場を形成することも可能と考えられる。生ごみ資源化施設からの製品の高い付加価値は、生ごみ利活用を推進させる意味で大変重要である。そこで本研究では、生ごみから効率的にL-乳酸の製造を行うことを目的とし、その技術開発を研究課題とする。

## 第2節 文献考察

### 2.1 生ごみの資源化

#### 2.1.1 資源化への課題

生ごみは、再生利用率が低い点からも示されるとおり、依然として焼却埋立て処分がなされる廃棄物である。武藤(2000)が整理した1996年厚生省資料によると(表1-1参照)、発生量の実に91%が焼却埋立て処分されている。しかし、焼却埋立てに関しては、①埋立て用地の確保が困難となりつつあることや、②生ごみは高い含水率のため燃焼効率を低下させることなどの問題点が指摘されてきた。加えて、バイオマスの有効利用の観点も相まって、生ごみの焼却に代わる処分方法、たとえばコンポスト化、飼料化など再生利用の模索が続けられてきた。このような再生利用に対する追い風として、2000年に食品循環資源再生利用促進法(食品リサイクル法)が制定された。これにより、事業系から排出される食品廃棄物に対しては、その再生利用を求められることとなった。ここで、食品廃棄物の定義を記すと、食品の製造、流通、消費の各段階で生じる動植物性の残渣類であり、具体的には、製造段階において生ずる加工残渣、流通段階で生ずる日切れの食品、消費段階で生ずる食べ残しなどがこれに該当する(武藤, 2000)。食品廃棄物の産業廃棄物と一般廃棄物の区分に関しては、食品の製造過程から排出される食品廃棄物は産業廃棄物、流通や消費過程で排出される食品廃棄物は一般廃棄物の枠組みで処理されてきた。したがって、事業系から排出される食品廃棄物は、産業廃棄物と一般廃棄物の一部を占めることとなる。以下、本文では「食品廃棄物=生ごみ」として議論を進める。

表1-1 食品廃棄物の発生および処理状況(武藤, 2000より抜粋)

	発生量	処分				計
		焼却埋立	再生利用 肥料化	飼料化	その他	
一般廃棄物	1,600					
うち事業系	600	1,595	5	-	-	5
うち家庭系	1,000	(99.7%)	(0.3%)			(0.3%)
産業廃棄物	340	177	47	104	12	163
		(52%)	(14%)	(31%)	(3%)	(48%)
事業系の合計	940	775	49	104	12	165
		(83%)	(5%)	(11%)	(1%)	(17%)
合計	1,940	1,772	52	104	12	168
		(91%)	(3%)	(5%)	(1%)	(9%)

(1996年厚生省資料等から推計)

生ごみの発生量は、表 1-1 によると家庭系から約 1,000 万 t、事業系から約 940 万 t とされる。このうち、食品製造段階で排出される産業廃棄物に属する生ごみは、集約的に発生することから従来高い再生利用が行われてきた。食品リサイクル法制定以前においても、産業廃棄物である生ごみ 340 万 t に対して、肥料化、飼料化などにより 48% が再生利用されている実績がある。しかし、流通や消費の段階で排出される一般廃棄物に分類される事業系生ごみ、あるいは家庭系生ごみに関しては、ほぼ再生利用されていない状況である。したがって、食品リサイクル法は、一般廃棄物に分類される事業系廃棄物を主にターゲットとしたものと考えられる。

ところで、一般廃棄物に属する事業系生ごみが、従来再生利用されてこなかった理由は、賦存量としては多いものの、少量分散型の排出形態により収集に対してコストがかかるためと考えられる。しかし、食品リサイクル法により再生利用が求められ、排出者が処理費を払ってでも再生利用する必要があること、および、再生利用するための社会資本の整備がなされつつあることから、少量分散型の生ごみも資源化に近い将来推進されるものと期待される。さらに、賦存量として事業系生ごみより多い家庭系生ごみも、その資源化の動きの中に巻き込むことがなされると、生ごみの再生利用は飛躍的に進展すると期待される。これは、原料の増加によって再生利用された製品の量が確保されることとなり、原料である生ごみに対してもその製品に対しても市場として認知が広まり、結果として安定した市場形成につながると考えられるからである。

少量分散型の生ごみを資源化するためには、克服すべき多くの課題が存在する。代表的なものとして生ごみの分別、選別方法に対する課題、あるいは回収方法に対する課題が挙げられる。生ごみの分別、選別方法に関しては、原則は排出者による生ごみの分別が望ましい。ただし、これを過度に要求した場合、不法投棄など可燃ごみ排出のモラルが乱れる危険性をはらんでいる。この生ごみの分別、選別課題に対して、例えば神奈川県横須賀市（浅野ら、2003）は、生ごみの資源化実証実験の中で、回収した可燃ごみから機械により生ごみを選別しバイオガス製造を行っている。当然、生ごみ分別装置という初期設備費が増大化する、あるいは、残りの可燃ごみを焼却する必要からごみ焼却施設に併設している必要があるなどの制約条件があるものの、分別手段として人の手に拠らない方法であることから、生ごみ資源化を現実的なものとする 1 つの案を提供しているものと考えられる。

生ごみの回収方法に関しては、可燃ごみと同様に個別回収することとなるが、回収コストは資源化施設の運営コストに占める割合が大きいことから、できるだけ回収コストのかからない方法が求められる。桑原（2006）は、原料発生箇所近傍によるオンサイトな資源化施設の設置を行うことで、原料運搬コストを低減化することの重要性を指摘している。また、少量分散型の生ごみは、賦存量と利用可能量に隔たりが大きいことも指摘され、例えば、輸送コストを中心に評価した千葉県での生ごみ利用可能量の報告（井内、2006）によると、全賦存量 835 万 t/年に対して利用可能量はその 12% に過ぎないとされている。このような利用可能量の不確実性を反映し、実際に生ごみの資源化に携わる NPO を中心とする提言（泊、2006）では、バイオガス製造など生ごみ資源化施設は簡易な設備による小規模で分散的に運営可能なものであることを推奨している。

一方、資源化施設から利益を生み出すことで運営コストを賄うことも必要である。生ごみを資源化することの経費的なメリットとしては、製品の販売による効果が第一であるが、可燃ごみから生ごみを分離することによる焼却の際のメリットも存在する。後者について具体的には、一般廃棄物として回収される可燃ごみの湿重量において 40～50% が生ごみで占められており（浅野ら、2003）、この生ごみを一般廃棄物から分離できたならば可燃ごみの大幅な減量および焼却の妨げと

なる水分の大幅な減少をもたらすことができる。その結果、生ごみ以外の可燃ごみについては収集、焼却、埋立てに関するコストの低減化が期待されるとともに熱エネルギー回収の向上にもつながると考えられる。

生ごみの焼却と資源化の間での運営コスト比較については、先の横須賀市の例では、全量焼却とバイオガス製造+焼却との間の発電量(余剰電力量)を比較している。そこでは、生ごみ約 54,000 t/年を含む可燃ごみ約 106,000t/年を対象に実証実験した結果、バイオガス製造+焼却が余剰電力量として約 1.2 倍(余剰電力量約 24,000MWh/年)に増大化したとされた。仮に 10 円/kWh とすると、約 6.6 万円/日の余剰電力がバイオガス製造+焼却に付加することと試算される。また、埼玉県小川町では、行政と NPO を中心にバイオガス製造およびその社会システム作りを実証検討しているが、100 世帯に生ごみ分別の協力を呼びかけ、それら生ごみを 5 m<sup>3</sup> 中温発酵器によりバイオガス製造を行った結果、小川町の可燃ごみ焼却コスト(32 円/kg)とバイオガス製造コスト(12 円/kg)の差を対価として生ごみ分別協力世帯に還元することが可能となっている(桑原, 2006)。

以上より、生ごみ資源化施設は運営コストの面で全量焼却施設と比べて十分競争力を備えている。ただし、これらの検討では資源化施設の建設費に関する検討は加わっていない。生ごみはもともと処分すべきものである以上、その処分において社会的コストが必要となることは当然としても、資源化を促すにはそれに関わる手間を補う経済的な成果も望まれる。そのためには、資源化により製造された製品が市場の流通に乗り、収益をあげることが必要である。そこで、生ごみの資源化を推進する意味で、生ごみから付加価値の高い製品を製造でき、施設の分散配置にも経費的に対応できる資源化方策の探索が求められる。

### 2.1.2 今後の展開

次に、生ごみの資源化の実施例を見る。生ごみは、微生物の働きにより比較的容易に資源化が行えることから、実施例から判断すると、木質バイオマスなどとは異なり物理・化学的処理は採用されない方向である(農業土木事業協会, 2003)。資源化実施例としては、以前から行われている肥料、飼料化以外に、実規模施設あるいは実証規模施設においてメタン発酵、水素発酵、L-乳酸発酵、固形燃料(RDF)化が行われている。また、製品によっては、家畜糞尿や下水汚泥などを混ぜ合わせて原料としている施設も多い。

資源化方策の採択は、地域の実情に応じてなされている。例えば、肥料、飼料化は、地域性に強く依存する。これらは、乾燥および高温殺菌を中心とする簡単な設備により実施可能であるため、施設の建設費や維持管理の面でメリットとなり、特に製品の販路が開拓可能な農村地域では実施可能性が高い。しかし、生ごみ賦存量の大部分を占める都市部においては販路の面から採択し難い方策である。したがって、生ごみ資源化の本命とは成り難い。また、固形燃料化は、本来は発電用のボイラーの燃料に利用することが目的であり一時注目も集めたが、製造した製品を廃棄物として廃棄物処分業者に引き取ってもらう現状もあり、付加価値を有した製品には至っていない(月刊廃棄物, 2000)。そこで、製品の市場性から、メタン発酵、水素発酵、L-乳酸発酵が有力な資源化方策と考えられる。なお、水素発酵は、資源化の効率から多くの場合後段にメタン発酵を備えると考えられ(谷生, 2003)、また、得られた水素ガスの用途は、燃料電池などメタン発酵により得られるバイオガスの用途と類似している。そこで、水素発酵はメタン発酵の派生型と捉えることができ、併せて考察を行う。

メタン発酵により得たメタンを中心とするバイオガスは、都市ガスとの混焼、ガスエンジンな

どの発電機を通じて電気と熱エネルギーへ変換、メタンを水素へ改質し、燃料電池を通じて電気と熱エネルギーへ変換などの利用方法がある。特にバイオガスの水素への改質は、通常二酸化炭素が発生するが、炭素と水素に直接改質する技術の報告がなされる（多田ら，2006）など、バイオガスの汎用性は非常に高まっている。ただし、施設の分散配置に関しては、例えば、発酵槽のみを分散化し、バイオガスの精製を集約化することも考えられるが、高压ポンベの取り扱い、あるいはバイオガスの引火の危険性などから、施設運営に関しては個々の施設で有資格者などの管理の下に厳重に行う必要があると考えられる。

一方、L-乳酸発酵は、生分解性プラスチックであるポリ乳酸の原料となる L-乳酸を生成するものであるが、例えば、発酵槽を分散配置し、得られた L-乳酸を含む粗発酵液を集約化した乳酸精製設備へ搬送することを想定できるなど、分散配置の可能性を有していると考えられる。粗発酵液は、液体のため重量は嵩むが、引火の危険性は全く無い。ただし、L-乳酸発酵は、特定の L-乳酸菌を使用するために一般的に滅菌操作が要求されるなど、メタン発酵以上に発酵管理が厳しい。そこで、発酵管理の課題を克服できれば、分散化できるメリットが強調されて生ごみの資源化方策として有力な案と成り得ると考えられる。なお、メタン発酵も L-乳酸発酵も、コンポスト化のように蒸発、減量化を目的とした処理ではないため、全固形物量（TS）成分の可溶化は見込めるものの、投入した量に限りなく等しい重量の廃棄物を再度処理する必要がある（松田，2000）。したがって、発酵後の廃棄物処理にかかるコストを捻出する目的からも、運営コストを極力低減化できるシステムと付加価値の高い製品の製造を兼ね備えた資源化方策が必要である。

以上を整理すると、実現性の面から現状ではメタン発酵が生ごみ資源化方策の一番手であると考えられる。ただし、L-乳酸発酵は、特に生ごみの特徴である糖質を利用した点、生分解性プラスチックであるポリ乳酸を通じて石油と同程度の価値創造が期待される点、および施設を分散化できる可能性を有する点などから、発酵管理の困難さを克服できれば実用化が可能となると考えられる。

## 2.2 L-乳酸発酵

乳酸は、図 1-2 に示す D-体と L-体の光学異性体を有する。このうち、96%以上の光学純度で D-体のみあるいは L-体のみへと光学活性を高めた D-乳酸あるいは L-乳酸は、結晶性が高く、物性的に用途の多い、かつ生分解性を有するプラスチックであるポリ乳酸（PLA）の原料となる（白石ら，2000）。PLA は、熱硬化性樹脂であり、汎用プラスチックであるポリスチレン（PS）やポリエチレンテレフタレート（PET）の中間的な性質を有し、透明性、ガスバリア性、印刷性に特に優れ、汎用プラスチックと成り得る可能性を有する（Lunt, 1998）。なお、射出成形物などの結晶性を必要としない場合には加工温度を低くできるため、光学純度 90~95%程度の融点の低い PLA も使用可能となる（小原，2000）。これらより、少なくとも光学純度 90%以上の乳酸であれば PLA の原料として市場性を有することが分かる。

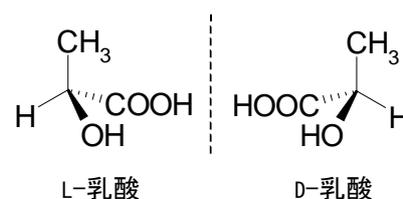


図 1-2 乳酸の光学異性体

PLA も含まれる生分解性プラスチックの市場規模については、2002 年の国内において 6,000 t/年程度である。しかし、生分解性プラスチックの普及を進める業界団体では、2010 年にはプラスチック国内消費量の 10%を生分解性プラスチックで置き換える目標を持っている（大島，2002，2003）。1997 年の国内におけるプラスチック消費量は 11,360 千 t/年であることから（奥，2001）、

1,000 千 t/年程度が目標流通量となる。なお、生分解性プラスチックにおける PLA の市場占有率は、2002 年時点において 30%程度である（大島, 2002）。加えて、米国の Cargill-Dow 社が 140 千 t/年の生産体制を整えるなど、PLA の汎用化は着実に進行している。これらより、PLA およびその原料となる光学純度の高い乳酸は大幅に需要の増加が予想されることが分かる。また、PLA は比較的容易に解重合が行えるプラスチックである（白井ら, 2003）。これは、PET から PET が再生できるように、PLA から PLA が再生できることを意味している。したがって、PLA は、用途に合わせて繰り返しケミカルリサイクルする使い方、生分解性を期待する使い方などが選択できる。この点も、PLA の汎用プラスチック化を後押しすると考えられる。

PLA は、発酵により生成された L-乳酸により製造されている（小原, 2000）。これは、光学純度の高い乳酸は、そのような乳酸を生成できる微生物により生産することが工業的に安価なためである。乳酸発酵は、一般的に乳酸菌や糸状菌 *Rhizopus oryzae* により成される。なお、乳酸菌とは、糖質を基質に良く繁殖し、発酵生成物として、50%以上の乳酸を生成する細菌類と定義される。このほか、グラム陽性で、運動性がなく、胞子を作らず、グルコースに対してホモ発酵式（式 (1-1)）あるいはヘテロ発酵式（式 (1-2)）に従うことが条件にあげられている（岡田ら, 1996）。



乳酸菌に該当する属は、*Lactobacillus* 属、*Streptococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Enterococcus* 属および *Pediococcus* 属であり、大部分を *Lactobacillus* 属が占める。乳酸菌や *Rhizopus oryzae* は、菌種に固有の D-体、L-体および D-, L-体の乳酸生成能があり、光学純度の高い乳酸を生成する場合は、L-乳酸菌として *Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei*、*Lactococcus lactis* などの乳酸菌や *Rhizopus oryzae* が、D-乳酸菌として *Lactobacillus delbrueckii*、*Bacillus laevolacticus* などが利用されている（Litchfield, 1996、小原, 2000）。工業的な乳酸発酵では、ホモ発酵とヘテロ発酵の選択も乳酸の収率上重要であり、したがって、ホモ発酵で一方の光学異性体を生成する乳酸菌が利用菌種となると考えられる。

工業的な乳酸発酵の原料としては、トウモロコシやビートといったでんぷん（糖質）を多く含む農作物が利用される（Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000、Vink *et al.*, 2003）。トウモロコシの場合、トウモロコシの実から湿重で 65%のでんぷんを精製し、さらに糖化酵素により加水分解されたデキストロース（無水グルコース）を乳酸菌の基質とする（Lunt, 1998）。しかし、トウモロコシから PLA の一貫生産を行う Cargill-Dow 社では、バイオマス資源の有効利用の観点から、トウモロコシからでんぷんを採取した残りの廃棄物、あるいはトウモロコシ栽培において集約的に排出される農業廃棄物からの L-乳酸発酵を検討している（Vink *et al.*, 2003）。また、農業廃棄物に限らず、古紙、製紙汚泥など都市廃棄物の中には糖質を多く含むものもあり、PLA への期待も相まってこれら有機性廃棄物を原料とする乳酸発酵事例が多数報告されている（表 1-2 参照）。ただし、有機性廃棄物の L-乳酸発酵は、トウモロコシなど農作物原料と比べると糖質密度が薄いため、一般的に効率が悪いとされ実施されてこなかった。加えて、石油から製造される汎用プラスチックの価格 150 円/kg（日本政策投資銀行調査部；<http://www.dbj.go.jp/japanese/download/pdf/indicate/no091.pdf>）と比べると、トウモロコシ由来の PLA でさえも价格的に 200 円/kg 程度と及ばないことから（白石ら, 2000）、有機性廃棄物から L-乳酸生成を本格化させるためには一層の L-乳酸製造コストの低廉化が求められる。既に述

べたように PLA および L-乳酸の需要は将来的に大幅な増加が見込まれ、一方、農作物に限定されない有機性廃棄物から L-乳酸製造を行う意義は世界的な食糧事情の面からも大きいと考えられることから、製造コストの低廉化を可能とする、さらには有機性廃棄物の利用を促せる L-乳酸発酵法の技術開発の必要性は高いと考えられる。

表 1-2 有機性廃棄物からの乳酸発酵研究事例

研究例	Bostos <i>et al.</i> (2005)	Patel <i>et al.</i> (2004)	Sakai <i>et al.</i> (2004)	Vink <i>et al.</i> (2003)	Schmidt and Padukone (1997)	Nakasaki <i>et al.</i> (1999)	McCaskey <i>et al.</i> (1994)
原料	農業廃棄物 (ぶどう)	農業廃棄物 (サトウキビ)	生ごみ	農業廃棄物 (トウモロコシ)	古紙, 農業廃棄物 (トウモロコシ)	製紙汚泥	古紙
加水分解の有無	酸および酵素による加水分解	酸による加水分解	酵素による加水分解	加水分解 (手順は不明)	酵素による加水分解	酵素による加水分解	酸による加水分解
乳酸菌	<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	不明	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	汚泥中から単離した L-乳酸菌	<i>Lactobacillus pentosus</i>
生成物	D-,L-乳酸	L-乳酸	L-乳酸	L-乳酸	D-,L-乳酸	L-乳酸	D-,L-乳酸

※農業廃棄物、都市廃棄物を例示。その他、廃糖蜜、チーズホエーなどの食品廃棄物からの研究事例も多数あり。

### 2.3 高温発酵

個々の微生物は、それぞれ増殖できる固有の温度域があり、この温度域を外れると増殖速度は急激に低下する。したがって、温度という環境条件により、増殖できる微生物は選別を受ける。また、この増殖可能な温度域を概観すると、微生物は増殖可能な温度域によって、表 1-3 のように大きく 3 群に分けられることが知られている (山根, 2002)。そこで、複雑な混合微生物培養系を利用する場合、例えば、日本酒の醸造 (低温発酵) や家畜糞尿のメタン発酵 (中温、高温発酵) などでは、3 つに分けられる温度域のいずれかを採択し環境条件としている。なお、有機性廃棄物の資源化に限れば、無加温発酵も存在するが、中心となる温度域は高温と中温である。

表 1-3 微生物増殖の温度依存性 (山根, 2002 より抜粋)

種類	最低温度	最適温度	最高温度	例
低温菌 (好冷菌) psychrophile	0~10	10~20	25~30	発光細菌, 海洋微生物
中温菌 (常温菌) mesophile	10~20	20~40	40~45	カビ, 酵母, 放線菌, 一般細菌
高温菌 (好熱菌) thermophilie	35~55	50~75	70~85	枯草菌, 温泉菌

高温発酵と中温発酵の適用事例をメタン発酵で見ると、下水やし尿処理の多くが中温発酵を採用していることから、メタン発酵の国内事例では中温発酵が圧倒的に槽数が多い (松田, 2000)。その理由としては、①加温熱量や熱放散が高温発酵より少ないこと、②温度の変動に対して緩衝性が高いこと、③毒物や発酵阻害物に対して耐性が強いことが挙げられる。一方、高温発酵のメリットは、①固形性有機物の分解速度を高める、②有機物の利用速度を高める、③発酵物の固液

分離性を高める、④病原性微生物を減退させるとされている (Buhr and Andrews, 1977)。また、高温菌は中温菌より高い基質消費速度、増殖速度、死滅速度を有するとされている (Batstone *et al.*, 2002)。

以上を踏まえると、高温発酵は、高収率なエネルギー回収、コンパクトな反応器を可能とし、また、発酵残渣の堆肥化などを検討する場合において殺菌効果のメリットを有することとなる。そのため、近年、断熱技術、熱交換技術や計装制御機器の進歩に併せて、高温発酵の採択が家畜糞尿、産業廃棄物などの処理用として普及し始めている (松田, 2000)。国内における高温発酵実施例を表 1-4 にまとめる。また、高温発酵の研究事例を調査すると、高温発酵は比較的新しい技術であり 1990 年代以降になり盛んに研究されるようになったことが分かる。参考に Water Research 誌における高温発酵 (“thermophilic and fermentation” or “thermophilic and digestion”) をタイトル、アブストラクトに含むもの) の研究報告事例 48 編の変化を図 1-3 に示す (Thomson Scientific の提供する文献情報データベース Web of Science によると、上記検索条件により 999 編 (Review 論文含む) の論文が存在するが、Water Research 誌は 1 誌のみでその内の約 5% を占め、また、発刊年 (1967 年) も古いことから、時系列で上記研究事例を調べるサンプルとしては妥当であると考えられる)。

表 1-4 国内における高温発酵実施例

発酵形式・名称	有機質資源	適用数(適用箇所)	備考
バイオガスプラント (高温発酵型)	畜産糞尿	3件(全て北海道)	耕作地、牧草地に還元
食品廃棄物資源化装置 PAMEDIS(パメディス)	汚泥、食品廃棄物、生ごみ	1件(神戸市)	廃水処理施設
メビウスシステム	汚泥、畜産糞尿、食品廃棄物、生ごみ	4件(北海道、宮城県、新潟県、長野県)	コンポスト、廃水処理施設
KANPOGASバイオガス回収システム	汚泥、畜産糞尿、食品廃棄物、生ごみ、剪定廃材	1件(京都府)	廃水処理施設
BIMA消化槽 <sup>※</sup>	食品廃棄物、生ごみ	1件(京都府)	コンポスト、廃水処理施設

(社)農業土木事業協会 (2003)より作成 (※ 京丹後市カタログにより追加)。

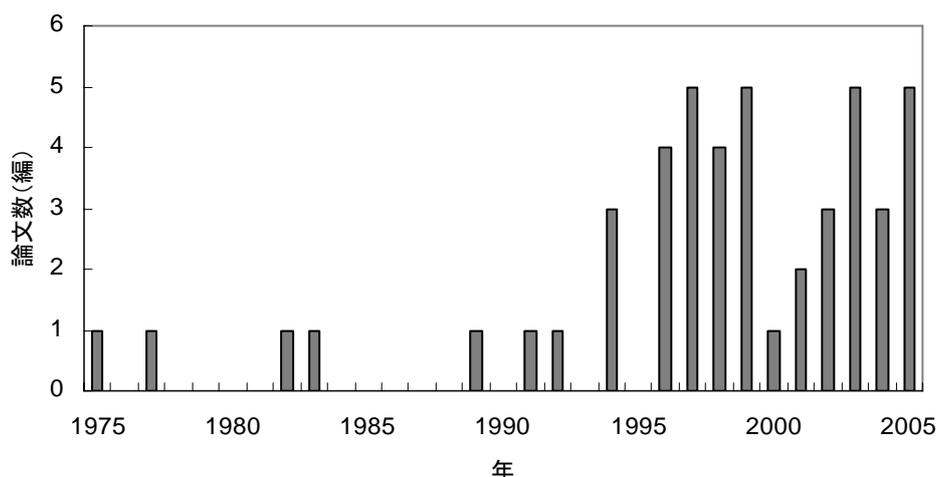


図 1-3 Water Research 誌における高温発酵に関する研究事例の経年変化

高温発酵と中温発酵を比較した研究事例では、ヘミセルロースの分解に関しては高温発酵が優れるものの (Dinsdale *et al.*, 1996)、脂質の分解は中温発酵が優れる (Dinsdale *et al.*, 1996,

Broughton *et al.*, 1998) とされる。乳酸発酵を目的とした場合、原料の中心は糖質であることから、ヘミセルロースの分解が優れることはメリットと考えられる。魚加工廃棄物の高負荷有機酸発酵の事例では、高温発酵が可溶化、酸生成、タンパク質分解において優れることが報告されている (Guerrero *et al.*, 1999)。一方、メタン発酵の事例では、同一の有機物負荷に対して高温発酵が中温発酵に対して優位性を示さない報告が見受けられる (Basu and Leclerc, 1975, Dinsdale *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 2002)。ただし、発酵を二相に分離した場合は、高温発酵が優位となる報告もある (Kim *et al.*, 2002)。これらメタン発酵に関する報告については、実験レベルでは高めの有機物負荷で試みられる傾向があり、負荷が高いほど高温発酵の酸生成能力が卓越し、その結果メタン生成能が抑えられる結果になっていると推察される。したがって、酸発酵のみを取り上げた場合、高温発酵の優位性は変わらないと考えられる。実際、2 相分離を実施したメタン発酵では卓越した酸発酵によるメタン発酵への阻害を避けることが可能となっている。また、メタン発酵を効率化するプロセスとして、二相分離の前段を高温発酵とし、後段を中温発酵とする例も見受けられる (Blumensaat and Keller, 2005)。

以上から、高温発酵は、特に有機物の分解および有機酸生成に優れ、乳酸の原料となる糖質の分解についても有利であることが分かる。つまり、混合微生物培養系において乳酸発酵を目的とする場合、高温発酵が有利となる可能性も指摘される。

なお、酸発酵について補足を行うと、廃水処理および廃棄物処理の分野では、固形性を含む分子量の大きな有機物を発酵の直接の基質となるまで低分子化する加水分解過程と低分子化された基質から有機酸、アルコール、二酸化炭素および水素などを生成する酸生成過程を併せて酸発酵と称されている (李, 1989)。発酵槽に持ち込まれる有機物は、分解を受けない成分を除くと一般的に糖質、タンパク質および脂質に分けられる。これらは、発酵槽内に存在する微生物が生成する生体外酵素の働きで加水分解を受け、それぞれ単糖類、アミノ酸および長鎖脂肪酸とグリセリンまで分解され、発酵の直接の基質となる。単糖類であるグルコースは、EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) 経路を経てピルビン酸に至る。このピルビン酸を基に各種有機酸およびアルコールへと代謝される。なお、乳酸は、電子受容体としてピルビン酸を還元したものである。アミノ酸は、脱アミノ反応を受け、 $C_1 \sim C_4$  の低級カルボン酸へと代謝される。長鎖脂肪酸は、 $\beta$ 酸化を受け、酢酸、プロピオン酸および水素へと代謝される。酸発酵の1つである乳酸発酵では、糖質から乳酸に至る経路がその中心となる。糖質は、でんぷんであればアミラーゼ、セルロースであればセルラーゼといった多糖分解酵素により単糖類まで加水分解を受ける。生成される単糖類は、ヘキソース、ペントースと様々であるが、多糖の構成から大勢はグルコースと考えられる。グルコースは、EMP 経路によりピルビン酸を経て乳酸に至る。

### 第3節 本論文の目的と構成

本研究では、バイオマスである生ごみの有力な資源化方策を開拓する目的で、効率的なL-乳酸発酵の開発研究を試みる。“効率的”の意図したところは以下の2点である。

- a) ポリ乳酸の原料とできる少なくとも光学純度90%以上を有するL-乳酸が、生ごみに対して収率良く生成できること。
- b) シンプルな工程、簡易な設備によって運営できること。

これらは、資源化により得られた製品が高い付加価値を持って流通すること、施設運営費が極力抑えられること、特に、現在のバイオマス資源化方策として一番手であるバイオガス製造に対

してメリットを出すため、生ごみの発生形態に沿った分散型施設配置に対応できることを意味している。現実には、投下される資本、つまり、複雑な工程や多種の設備によって、製品の品質、規格は定まる。したがって、目的とする製品を、どの程度簡易な工程、設備により製造できるかの技術開発が本研究の骨子である。さらに、目的物である L-乳酸が生成できるようになった場合は、L-乳酸に至る培養条件範囲の確認、妨害因子の整理、発酵過程の把握も実施上重要である。また、実際の生ごみにおいては、品質の揃ったものが供給されることは考えにくく、そこで、腐敗の進んだ生ごみや食塩などの阻害物が混入した生ごみが L-乳酸発酵へ与える影響の確認も必要である。以上の課題に対して、本研究では実験を通じて検討を行った。以下に本論文の構成を記す。

第 2 章では、模擬生ごみを原料とした半連続式培養により、高温発酵と中温発酵、あるいは有機物 (COD) 負荷率変化に対する比較検討を行う。また、高温発酵に対して微生物群集解析を行い、培養結果との比較を試みる。第 3 章では、第 2 章の結果を受けて、模擬生ごみを原料とした回分式培養により、温度、pH および L-乳酸菌の植種の有無に関する培養条件が発酵に及ぼす影響の検討を試みる。ここでも、典型的な培養事例に対して微生物群集解析を行い、培養結果との比較を試みる。第 4 章では、培養過程を記録する装置を試作し、その適用結果の評価を試みる。第 5 章では、発酵に対して一般的に阻害があるとされる基質と生成物による阻害の検討を試みる。併せて、生ごみであるため考えられる食塩による阻害の検討も試みる。第 6 章では、原料である生ごみに対する検討として、生ごみ腐敗の影響、生ごみ中に存在するの資化可能な糖質の確認を行う。これらに基づき、生ごみ以外の原料に対するアプローチとして、試薬多糖の資化性検討、および、バナナ果皮の資化性検討を試みる。以上をまとめて第 7 章では結論を述べる。

#### <参考文献>

- Basu, A. K., Leclerc, E., 1975. Comparative studies on treatment of beet molasses distillery waste by thermophilic and mesophilic digestion. *Wat. Res.*, 9, 103-109.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H., Vavilin, V. A., 2002. *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)*, 40-48, IWA Publishing, London.
- Blumensaat, F., Keller, J., 2005. Modelling of two-stage anaerobic digestion using the IWA Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1). *Wat. Res.*, 39, 171-183.
- Bostos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., Dominguez, J. M., 2005. Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method. *J. Science of Food and Agriculture*, 85, 466-472.
- Broughton, M. J., Thiele, J. H., Birch, E. J., Cohen, A., 1998. Anaerobic batch digestion of sheep tallow. *Wat. Res.*, 32, 5, 1423-1428.
- Buhr, H. O., Andrews, J. F., 1977, The thermophilic anaerobic digestion process, *Wat. Res.*, 11, 129-143
- Dinsdale, R. M., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., 1996. The mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of coffee waste containing coffee grounds. *Wat. Res.*, 30, 2, 371-377.

- Guerrero, L., Omil, F., Mendez, R., Lema, J.M., 1999. Anaerobic hydrolysis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. *Wat. Res.*, 33, 15, 3281-3290.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2-4), 87-107.
- Kim, M., Ahn, Y.H., Speece, R.E., 2002. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Wat. Res.*, 36, 4369-4385.
- Litchfield, J.H., 1996. Microbiological production of lactic acid. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 45-95.
- Lunt, J., 1998. Large-scale production, properties, and commercial applications of polylactic acid polymers. *Poly. Degrad. Stab.* 59 (1-3), 145-152.
- Mccaskey, T.A., Zhou, S.D., Britt, S.N., Strickland, R., 1994. Bioconversion of municipal solid waste to lactic acid by *Lactobacillus* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 45-46, 555-568.
- Nakasaki, K., Akakura, N., Adachi, T., Akiyama, T., 1999. Use of wastewater sludge as a raw material for production of L-lactic acid. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1, 198-200.
- Patel, M., Ou, M., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 2004. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L(+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.*, 26, 11, 865-868.
- Sakai, K., Taniguchi, M., Miura, S., Ohara, H., Matsumoto, T., Shirai, Y., 2004. Making plastics from garbage: A novel process for poly-L-lactate production from municipal food waste. *J. Industrial Ecology*, 7, 3-4, 63-74.
- Schmidt, S., Padukone, N., 1997. Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 18, 1, 10-14.
- Vink, E.T.H., Rabago, K.R., Glassner, D.A., Gruber, P.R., 2003. Applications of life cycle assessment to NatureWorks (TM) polylactide (PLA) production, *Poly. Degrad. Stab.* 80 (3), 403-419.
- 浅野悟, 野口真人, 三井昌文, 梁瀬克介, 2003. 横須賀市における生ごみの資源化に関する研究. 第14回廃棄物学会研究発表会講演論文集. 334-336.
- 井内正直, 失敗しないバイオマスエネルギー事業 -全国 86 事業の調査結果をもとに-. 資源環境対策. 42, 1, 64-68.
- 大島一史, 2002. 生分解性プラスチックの現状と今後. *JETI.* 50, 13, 158-160.
- 大島一史, 2003. 生分解性プラスチックの最新動向. *JETI.* 51, 4, 121-123.
- 岡田早苗, 柳田藤寿, 鈴木健一郎, 1996. 乳酸菌の定義と分類・同定, 乳酸菌の科学と技術, 乳酸菌研究集談会 編. 9-58, 学会出版センター.
- 奥彬, 2001. グリーン化学製品 循環型炭素資源としてのプラスチック, 御園生誠, 村橋俊一 (編), グリーンケミストリー 持続的社会的のための化学, 34-51, 講談社サイエンティフィク.
- 小原仁美, 2000. 生分解性ケミカルとプラスチックの開発, 富田耕右 監修. 91-99, シーエムシー出版.

- 桑原衛, 2006. 家庭の生ごみを地域の宝に -小川町における生ごみのバイオガス資源化-. 資源環境対策. 42, 1, 82-85.
- 月刊廃棄物, 2000. 脱・焼却へ 生ごみ含む可燃ごみの固形燃料化 -群馬県鬼石資源化センター-. 10, 99-101.
- 酒井謙二, 白井義人, 2005. ポリ乳酸生産を基軸とした都市生ごみのトータルリサイクルシステム. 廃棄物学会誌. 15, 2, 89-96.
- 白井義人, ハン ユコウ, 西田治男, 2003. ポリ乳酸のケミカルリサイクルと循環型社会システム. 工業材料. 51, 3, 27-29.
- 白石信夫, 谷吉樹, 工藤謙一, 福田和彦, 志村幸雄, 2000. 実用化の進む生分解性プラスチック. 70-76; 227-235, 工業調査会.
- 谷生重晴, 2003. バイオマス発酵で生ゴミから水素を. 化学装置. 4, 7-9.
- 多田旭男, 中村諭, 小野信市, 東郷芳孝, 平井淳一, 小関喜久夫, 生ごみの高付加価値処理技術 -バイオメタン直接改質による水素・ナノ炭素同時生成技術とその応用-. 資源環境対策. 42, 3, 86-91.
- 泊みゆき, 2006. バイオマスエネルギーの推進に向けた課題と展望. 資源環境対策. 42, 1, 60-63.
- (社)農業土木事業協会, 2003. バイオマス利活用施設ガイドブック 見学可能施設.
- 松田従三, 2000. 生ごみのバイオガス化について. 月刊廃棄物. 10, 20-25.
- 武藤誠, 2000. 食品リサイクル法とは-資源循環型社会に向けて-. 月刊廃棄物. 10, 8-11.
- 山根恒夫, 2002. 生物反応工学. 157-165. 産業図書.
- 李玉友, 1989. 嫌気性消化における下水汚泥の分解機構に関する研究. 東北大学博士学位論文. 7-51.

## 第2章 半連続式培養による生ごみのL-乳酸発酵に関する検討

### 第1節 概説

高温培養（55℃）および半連続式培養を採用し、酸発酵とメタン発酵を二相分離した生ごみのメタン発酵に関する研究において、その酸発酵槽では有機酸として乳酸が選択的に生成される報告がある（Park, 2005）。乳酸は、酸発酵過程の初期において非常に速い生成および分解作用を受けることが知られているが（Batstone *et al.*, 2002）、上記実験は、効率的なメタン発酵の実施を目的として高負荷条件で行われていたため、酸発酵槽では初期に過度に乳酸が生成され、その結果乳酸の分解が停滞したものと考えられる。いずれにしても、非滅菌環境下で実施された混合微生物培養系において乳酸が選択的に生成することは、乳酸の市場価値から判断して、高負荷で行う酸発酵をメタン発酵の前段工程だけに留めさせない新たな用途展開を可能とすると考えられる。

乳酸の市場性を考慮した場合、最大の需要先は生分解性プラスチックであるポリ乳酸（PLA）の原料化である。ただし、乳酸をPLAの原料とするためには、乳酸の持つ光学異性体（D-, L-乳酸）に留意する必要がある。PLAを製造する場合、結晶化を進行させ加工性を向上させる目的で、一般的に96%以上の高い光学純度の乳酸が要求される。また、光学純度が90%以上の乳酸であれば、加工時の耐熱性を有さないため用途は限られるもののPLAの原料と成り得る（小原, 2000）。そこで、PLAの原料化を目指す場合はD-, L-乳酸ともそれぞれ少なくとも90%以上の高い光学純度で安定して生産できることが求められる。

生ごみから光学純度の高い乳酸を生成する事例としては、白井によるL-乳酸生成が知られている。その成果は、Sakai *et al.* (2004)による生ごみからPLAを生成するまでの一連の工程に関する報告にまとめられており、また同時に実証実験も進行している（九州工業大学エコタウン実証研究施設 <http://www.kitaq-ecotown.com/about/jisshou/03.html>）。白井のL-乳酸生成法は、①ミンチ状とした生ごみに等重量の水を加え滅菌（121℃、20分）し、②*Propionibacterium freundenreichii*を植種し37℃培養にて生ごみ培地中のD-, L-乳酸を消費させ、③50℃に加温し*P. freundenreichii*を不活化させた中でグルコアミラーゼを添加し生ごみ培地の糖化を進行させ、④*Lactobacillus rhamnosus*を植種し37℃培養にてL-乳酸生成を実施するものである。この方法により、実生ごみから光学純度97.2%以上のL-乳酸を生成していると報告している。既存技術であるL-乳酸発酵と比較すると、白井の方法は、生ごみを原料としたこと、②の生ごみ中に存在するD-, L-乳酸を前もって処理したことは非常に興味深い。しかし、それ以外の技術は、例えば回分式培養を採用すること、滅菌処理を施すこと、中温域に活性を有するL-乳酸菌を植種利用することは既に確立された一般的な方法であり、集約的なL-乳酸発酵を前提とした工業技術であると考えられる。そのため、第1章でも指摘した生ごみの発生形態に応じた分散型の資源化施設を考慮した場合、滅菌や植種に関わる設備や工程が妨げとなり、生ごみの資源化方策としてL-乳酸発酵が広まらない懸念も持たれる。そこで、従来技術に捉われない光学純度の高い乳酸が得られるシンプルな発酵法の開発が重要となる。

一方、混合微生物培養系で乳酸発酵を行う場合、どのような菌種がどの程度存在するかの情報は非常に貴重である。この点に関しては、近年環境工学の分野でも著しく適用事例の増加している分子生物学的手法を用いることが有効である（岡部, 2005）。この手法は、単離が困難な微生物

に対して、その微生物が構成する混合系微生物群集を対象に適用できる。微生物の同定方法は、微生物の持つ 16S rDNA 遺伝子の塩基配列を解読し、既に構築されている塩基配列のデータベースと照合することで成される。16S rDNA は、約 1,500 塩基から構成されており、比較的保存性が高く基本的な構造が保持されている領域（保存領域）と長い進化の歴史の中で少しずつ変化した領域（可変領域）を有しており、したがって生物種の進化系統を比較、推定することに適していると言われている。環境工学分野での適用事例は非常に豊富にあるが、例えば Sekiguchi *et al.* (1998) は、人工基質を用いた 35°C と 55°C の UASB（上向流嫌気性汚泥床）法によるメタン発酵の微生物群集解析に用いている。ここでは、メタン発酵を担う古細菌については両系列とも同種の出現種であったが、酸発酵を担う細菌に関しては、出現種が異なること、55°C では菌種の多様性が低下することを指摘している。このように、微生物の単離を別とすると、従来生成物からのアプローチが中心であった反応器内の微生物構造の解析に対して、直接検出し、それらの種類や量を求めることが可能となった。さらに、微生物からの情報を生成物からの情報と併せることで、反応器の運転操作の改善に反映させることも可能となる。したがって、分子生物学的手法の有効性は非常に高いことが容易に推察される。

本章では、高温培養による乳酸発酵を実施しつつ、さらに、シンプルな方法による光学純度の高い乳酸生成の実現を検討することとする。まず、生ごみの半連続式培養による高温（55°C）乳酸発酵を再現し、長期間の培養により乳酸発酵の進行に関連する情報を集める。また、この乳酸発酵の進行が高温培養に固有の特質であるか否かを確認するため、高温発酵と並ぶ代表的な混合微生物培養温度域である中温（37°C）発酵でも酸発酵を試みることにする。併せて、COD 負荷率を段階的に変化させた培養を実施する。一連の培養を通じて乳酸発酵の進行が確認された場合は、乳酸の光学純度、生成有機酸のうち乳酸選択性、乳酸の基質に対する収率などの乳酸発酵の評価に加えて、酸発酵槽内の微生物の同定を行い、乳酸生成を担う微生物種の特定とその微生物の由来の検討を行う。

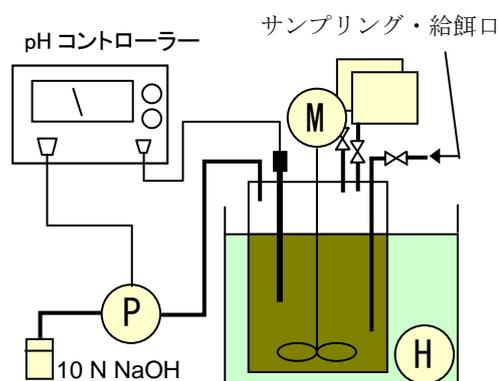


図 2-1 実験装置の概略図

## 第 2 節 実験方法

### 2.1 実験装置

実験装置の概略図および全景を図 2-1 および写真 1 にそれぞれ示す。乳酸発酵の反応器は有効容積 1 L のセパブルフラスコを用い、反応器内の混合には攪拌機（アズワン株、SM-104）を用いた。55°C と 37°C の温度設定は、反応器をウォーターバス（アズワン株、TM-1）中に設置することで行った。所定 pH 値での制御には、pH コントローラー（株日伸理化、NPH-660）を用い、乳酸発酵の進捗に従い低下する pH に対処する目的で下限値 ON/OFF 制御

を行った。pH 調整は、pH コントローラーから起動・

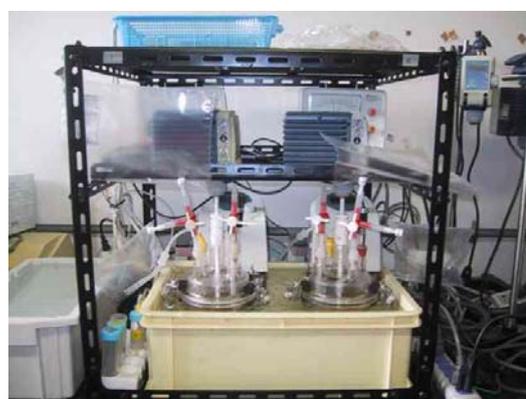


写真 1 実験装置の全景

停止操作を受けるローラーポンプ（東京理化機器、MP-1000、以下中和剤供給ポンプ）により 10 N 水酸化ナトリウムを供給する方法を取った。培養開始に先立ち、実験の再現性を確実にするため反応器はオートクレーブ（121℃、20 分）により滅菌した。また、培養実験をセットした際は、反応器内を嫌気状態に保つため反応器のヘッドスペース部を窒素ガスにて置換した。さらに、2 つのガスパック（発生ガスの捕集用と窒素ガスを充填した発酵液引抜き時の容積補完用）を反応器に取り付けた。

## 2.2 基質

本研究では模擬生ごみを使用した。模擬生ごみの材料は、谷川ら（1997）の実生ごみ組成に関する調査結果を参考に表 2-1 のように決定されたものを使用した。なお、この生ごみ組成は、本研究室において継続使用されているものである（洪ら、2004）。表 2-1 中の材料は、細断、混合、続いてスラリー状となるまでミキサー（FMI、R25B）破碎し、使用時まで冷凍庫および冷蔵庫にて保存した。培養実験に際しては、攪拌の都合から、作成した模擬生ごみを蒸留水で 2 倍希釈した生ごみ培地を、滅菌操作を行わずに利用した。

## 2.3 植種材料

植種を行った実験では、生ごみの高温二相式メタン発酵における有機酸発酵槽の培養液を植種材料として利用した。この発酵槽は、上記と同様の模擬生ごみを基質とし、本実験開始時に先立ち 1 年以上前から同研究室にて酸発酵を目的に継続培養されていたものである。なお、この有機酸発酵槽の植種材料は、下水処理場の高温消化槽を起源とする（Park, 2005）。

## 2.4 実験条件

本章で実施した実験条件を表 2-2 にまとめて示す。Run 1 および Run 2 の培養実験では、55℃ と 37℃ の 2 系列を用意し、pH を 5 と 6 とするとともに水理的滞留時間 (HRT) を 20 から 3 日 (COD-cr 負荷率 5.2~34.4 g-COD/L-Reactor/日、以下 COD 負荷率) に変化させた。実験の立ち上げは、始めに植種材料（表 2-2 中の Run 1-0 および Run 2-0）900 g（湿重）および生ごみ培地 100 g（湿重）を反応器に加え、Run 1-1 および Run 2-1 の実験条件で培養を開始した。実験条件を変化させる際は、新たに実験を立ち上げる操作は行わず、実験条件のみを変化させ、継続して前の Run の発酵液を培養し続けた。そこで、Run 1 および Run 2 では各実験条件での馴致期間として HRT の 3 倍時間を想定し、それ以降の培養結果から各実験条件の評価を行った。Run 3 では、55℃、pH 6 および HRT 10 日 (COD 負荷率 10.3 g-COD/L-Reactor/日) とした培養条件で、Run 4 では、55℃、pH 7 および HRT 10 日 (COD 負荷率 10.3 g-COD/L-Reactor/日) とした培養条件で、特定の植種材料を用いず生ごみ培地のみからの発酵を実施した。なお、Run 4 では、途中 HRT を 5 日 (COD 負荷率 20.6 g-COD/L-Reactor/日) に高める操作を行った。

表 2-1 模擬生ごみの材料

項目	% <sup>a</sup>	細目	% <sup>a</sup>
野菜類	50	キャベツ	10
		じゃがいも	10
		ニンジン	10
		大根	10
		白菜	10
		りんご	2.5
果物類	20	オレンジの皮	7.5
		バナナの皮	10
		米	10
穀物類	20	パン	2.5
		麺類	7.5
		挽肉	2.5
肉類	2.5	魚	3.5
魚介類	5	魚の骨	1.5
		卵	2.5

a: 湿重量基準

表 2-2 半連続式培養における運転条件

高温培養 (55 °C) Run 1	Run 1-0	Run 1-1	Run 1-2	Run 1-3	Run 1-4	Run 1-5
中温培養 (37 °C) Run 2	Run 2-0	Run 2-1	Run 2-2	Run 2-3	Run 2-4	Run 2-5
植種材料	-	Run 1-0 (2-0)	継続培養	継続培養	継続培養	継続培養
pH	6 (5 <sup>c</sup> )	5	5	6	6	6
HRT (日) <sup>a</sup>	4.5 (3.5 <sup>c</sup> )	20	10	10	5	3
COD負荷 (g-COD/reactor-L/日)	33.2 (42.6 <sup>c</sup> )	5.2	10.3	10.3	20.6	34.4
各Runの実施期間 (日)	-	1-99	100-159	171-222	223-280	292-324
各Runの評価期間 (日) <sup>b</sup>	-	61-99	130-159	201-222	239-280	302-324

高温培養 (55 °C)	Run 3	Run 4-1	Run 4-2
植種材料	なし	なし	なし
pH	6	7	7
HRT (日) <sup>a</sup>	10	10	5
COD負荷 (g-COD/reactor-L/日)	10.3	10.3	20.6
各Runの実施期間 (日)	1-76	1-42	43-58

Run 1-0 および 2-0 は、Run 1およびRun 2で用いた酸発酵槽からの植種材料の培養条件を示す(Park, 2005)。

a: HRTは生ごみ培地(2倍希釈された模擬生ごみ)を基準に設定。

b: 馴致期間を3HRT時間想定。

c: Run 2-0を示す。

培養方法は、半連続式培養を用いた。実験では、半連続操作として2日に1回の頻度にて発酵液の引抜き、生ごみ培地の添加を行った。なお、菌体量の保持を目的とする発酵液中の固形物返送は行っていない。そのため、HRTは固形物滞留時間(SRT)と同じ値となる。

## 2.5 分析項目

### 2.5.1 水質分析

生ごみ培地と培養実験 (Run 1~Run 4) により得られた試料 (発酵液) について、表 2-3 に示す水質項目の分析を基本的に週 1 回の頻度で実施した。溶存態成分の分析では、0.45 μm フィルターにてろ過した試料を対象とした。なお、以下の記述での「T-」、「P-」および「D-」はそれぞれ全、固形性および溶解性の意味である。

乳酸濃度の表記に関して、実際に発酵槽から回収されるものは、pH調整を行っているため乳酸塩(多くの場合乳酸ナトリウム)である。しかし、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により乳酸濃度を求める際は、分析方法の都合上乳酸、乳酸塩に拘らず乳酸イオンとして測定される。また、実際に発酵により生成されるものはあくまで乳酸であることから、本論文では生成物を乳酸と表記し、濃度単位としてg(-乳酸)/L(COD換算の際はg-COD/L)を用いる。

### 2.5.2 乳酸収率の算出方法

乳酸発酵は、一般的に糖質量あたりの乳酸生成量(収率)で評価される。また、この乳酸収率は、①消費した糖質量を基準とする、あるいは②初期(基質中)の糖質量を基準とするのいずれかで計算されている。乳酸発酵は、基本的に糖質が乳酸に変換すると考えるため、物質収率的には前者の考え方が妥当である。そこで、例えば、単糖類グルコースや二糖類スクロースなど組成のはっきりした糖質を基質とし、発酵の前後にそれらの濃度が測定可能である場合は前者の収率を用いる場合が多い。また、乳酸発酵性においてホモ発酵かヘテロ発酵かを論じる場合もこちらの収率でなければならない。しかし、農業廃棄物や生ごみのように組成のはっきりしない糖質を

表 2-3 分析水質項目と測定方法

測定項目	単位	分析方法
pH	-	ガラス電極法 <sup>1)</sup> (HORIBA, D-50)
蒸発残留物(TS)	g/L	下水試験法 <sup>1)</sup>
浮遊性物質(SS)		下水試験法 <sup>1)</sup> (遠心分離法)
強熱減量(VTS)	%	下水試験法 <sup>1)</sup>
浮遊性强熱減量(VSS)		
COD-cr(COD, D-COD)	g-COD/L	Standard Methods <sup>2)</sup> (Closed Reflux, Colorimetric Method)
全有機炭素(TOC)	g-C/L	燃焼赤外線分析法 <sup>1)</sup> (島津, TOC-Vc)
溶解性有機炭素(DOC)		
全窒素(T-N)	g-N/L	アルカリ性ペルオキシニ硫酸カリウムによる分解 <sup>1)</sup> 後、硝酸性窒素と同様。
溶解性全窒素(D-N)		
硝酸性窒素(NO <sub>x</sub> -N)	mg-N/L	Cu-Cd還元, N-1-ナフチルエチレンジアミンスルファニル酸法 <sup>1)</sup> (ブランルーベ, AA-II)
アンモニア性窒素(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	mg-N/L	インドフェノール青吸光光度法 <sup>1)</sup> (ブランルーベ, AA-III)
全リン(T-P)	g-P/L	ペルオキシニ硫酸カリウムによる分解 <sup>1)</sup> 後、リン酸態リンと同様。
溶解性全リン(D-P)		
リン酸態リン(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P)	mg-P/L	アスコルビン酸還元・モリブデン青吸光光度法 <sup>1)</sup> (島津, BioSpec1650)
糖質	g-glucose/L	フェノール・硫酸法 <sup>3)</sup> (島津, BioSpec1650)
タンパク質	g-Albumin/L	ローリー・フォーリン法 <sup>4)</sup> (島津, BioSpec1650)
有機酸	g/L, g-COD/L	HPLC(島津有機酸分析システム、別表1参照)
D-,L-乳酸	g/L, g-COD/L	HPLC(別表2参照)

1) 日本下水道協会編, 1997. 下水試験方法-1997年度版-

2) APHA ed, 1995. Standard Method for Examination of water and wastewater 19th Edition. 5.13-5.18.

3) 福井作蔵, 1990. 還元糖の定量法 第2版. 49-52, 学会出版センター.

4) 長谷川喜代三, 1993. 食物・栄養科学シリーズ19 食品分析. 83-86, 培風館.

( )内は本文中での表記を示す。

別表 1

カラム	: Shim-pack SCR-102H
移動相(A液)	: 5mM p-トルエンスルホン酸
移動相流量	: 0.8 mL/min
反応試薬(B液)	: 5mM p-トルエンスルホン酸 20mM Bis-tris 0.1mM EDTA・2NA
反応試薬流量	: 0.8 mL/min
カラム温度	: 43°C
検出器	: 電気伝導度検出器 (CDD 10Avp)

別表 2

カラム	: SUMICHIRAL OA-5000
移動相	: 5% 2-propanol + 1 mM CuSO <sub>4</sub>
移動相流量	: 1.0 mL/min
カラム温度	: 43°C
検出器	: UV-VIS検出器 (SPD-10Avp, 254 nm)

基質として利用する場合は、基質中の糖質量をフェノール・硫酸法などにより基準グルコース量との相対量から求め、基質中の糖質量に対する乳酸生成量を評価することが多い (Cheng *et al.*, 1991, Xiaodong *et al.*, 1997, Yin *et al.*, 1997)。これは、物質収支を問題とするよりはむしろ、基質の資化性を問題とする目的で実験がなされるためと考える。そこで、本研究でも、②の方法により乳酸収率を算出した。収率の計算方法は、ホモ乳酸発酵において理論上グルコース 1 g から乳酸 1 g が生成されること (金子ら, 1996)、また、基質量と引抜き発酵液量が同量であることに基づいて次式により計算した。

$$\frac{(\text{発酵液中の乳酸濃度})}{(\text{基質中の糖質濃度})} \quad (-, (\text{g/L})/(\text{g/L})) \quad (2-1)$$

### 2.5.3 光学純度の算出方法

乳酸の光学純度は、従来は旋光度計により求めていた。しかし、現在は D-, L-乳酸の絶対量を求め、その存在量から算出することが主流である。本研究でも、HPLC により D-, L-乳酸の絶対量を求めたことから、計算により光学純度を求めた。算出式を次式に示す。

$$\frac{|(\text{L-乳酸}) - (\text{D-乳酸})|}{|(\text{L-乳酸}) + (\text{D-乳酸})|} \times 100 \quad (\%) \quad (2-2)$$

さらに本研究では、発酵液中に存在する乳酸の光学純度に加えて、生成した乳酸に対する光学純度も求めた。これは、実験開始以前から生ごみ培地中に既にある程度 D-, L-乳酸が存在し、この D-, L-乳酸により発酵液中の光学純度が低下するためである。生ごみ培地中の D-, L-乳酸、発酵液中の D-, L-乳酸をそれぞれ求め、生成した乳酸の D-, L-乳酸を算出し、生成乳酸の光学純度とした。

### 2.5.4 微生物群集解析

発酵液中に存在する微生物群集の解析は、TA クローニング法により 16S rDNA のクローンライブラリーを作成し、各クローンを相同性検索にかけることで菌種の同定を行った。同法による解析は、サンプル中に存在する個々の菌群の絶対的な量を提供するものではなく、優占して存在する菌群の同定と各菌群の存在比を提供するものである。なお、一連の実験手順は、Cheon (2006) により発酵槽培養液に対して最適化された方法を用いた。以下にその手順を記す。

① DNA 抽出 ; Dneasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った。手順は付属マニュアルによる。

② PCR 増幅 ; ポリメラーゼ (TaKaRa, Ex taq ポリメラーゼ) を使用し、サーマルサイクラー (MJ research、PTC-200 peltier thermal cyler) により実施した。プライマーペアは Univ519F (5' -CAGCMGCCGCGTAATWC-3' ) および Univ1406R (5' -ACGGGCGGTGTGTRC-3' ) (Lane, 1991) を使用した。PCR 反応条件を表 2-4 に記す。

③ DNA 精製 ; QIAquick gel extraction (QIAGEN) を用いて行った。手順は付属マニュアルによる。

表 2-4 PCR 反応条件

反応段階	反応温度 (°C)	反応時間 (分)
初期変性	94	5
変性	95	1
アニーリング	68	1
伸長	72	1
変性~伸長を合計30サイクル繰り返す		
最終伸長	72	5
合成停止	4	∞

- ④ クローニング ; TOPO TA クローニングキット (Invitrogen) を用いて行った。手順は付属マニュアルによる。
- ⑤ シークエンス ; シークエンス作業はタカラバイオ(株) (<http://www.takara-bio.co.jp/>) へ外注委託した。そこで得られた塩基配列は、Ribosomal Database Project (Maidak *et al.*, 1997) の Chimera Check プログラムにより Chimera Check を行った後、Similarity Matrix プログラムにより 97%以上の相同性に基づく OUTs (operational taxonomic units) にグルーピングした。また、それら塩基配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の BLASTn プログラム (Altschul *et al.*, 1990) によりデータベース中に存在する 16S rDNA 配列と比較し、選び出された微生物候補の中から相同性スコアを基に微生物を同定した。

表 2-5 模擬生ごみの性状

	Total	Soluble
TS (g/L)	186±18	-
SS (g/L)	88±11	-
VTS (%)	96.1±1.0	-
COD-cr (g/L)	208±22	111±16
T-N (g/L)	4.3±0.4	1.3±0.3
T-P (g/L)	0.45±0.03	0.37±0.06
糖質 (g-glucose/L)	117±17	81±22
タンパク質 (g-albumin/L)	30.4±5.7	4.2±1.2
有機酸 (g-COD/L)	-	5.0±3.4
乳酸 (g-COD/L)	-	2.7±2.2
pH (-)	4.6±0.5	-

試験期間の平均値±σ(n=52)

### 第3節 実験結果および考察

#### 3.1 高温発酵と中温発酵の比較

##### 3.1.1 生ごみ培地

模擬生ごみの全実験期間 (Run 1~Run 4) にわたる分析値 (平均値) を表 2-5 に示す。分析値は、TS は約 19%、COD は約 210 g-COD/L および糖質は約 12% であり、TS と糖質については白井 (2005) の報告する生ごみ成分とほぼ等しい内容であった。また、図 2-2 に、実験条件の負荷率設定の根拠となる TS や COD の分析値の推移を示す。図 2-2 によると、少なくとも 324 日目まで実施した Run 1 および Run 2 について模擬生ごみは実験期間を通じてほぼ同負荷率で提供できていたことが分かる。

##### 3.1.2 高温発酵 -Run 1-

###### 1) 光学純度

光学純度の経日変化を図 2-3 に記す。光学純度は、培養温度 55°C、pH 5 およ

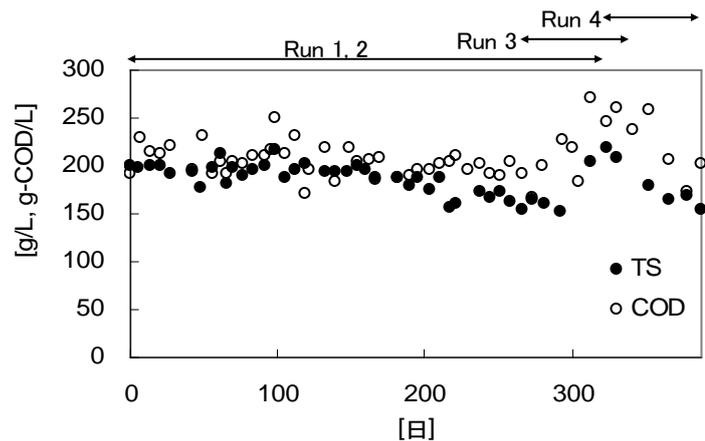


図 2-2 実験期間 (Run 1~Run 4) 中の模擬生ごみ TS および COD の推移

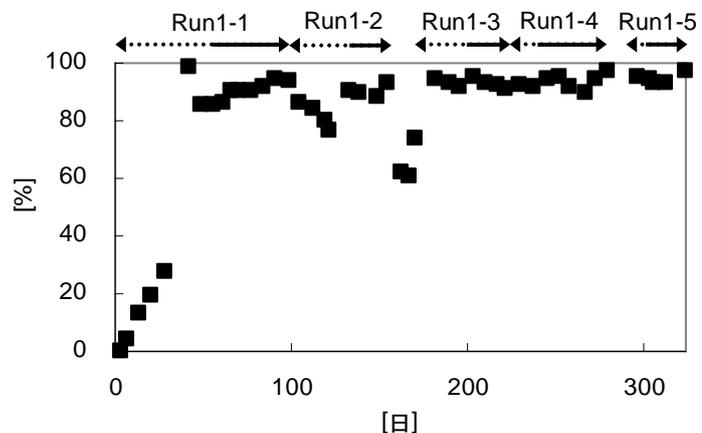


図 2-3 高温培養 (Run 1) における光学純度の推移

び HRT 20 日 (COD 負荷率 5.2 g-COD/L-Reactor/日) の条件で実験を開始した後、実験開始時の 0% から速やかに 90%以上まで上昇し、以後は pH を 5 から 6 へ、また、HRT を 20 から 3 日 (COD 負荷率 5.2~34.4 g-COD/L-Reactor/日) までと運転条件 (Run 1-1~Run 1-5) の変更を行ったが、各変更直後の馴致期間を除いて高い値で維持された。馴致期間 (HRT の 3 倍時間を想定) を除く各評価期間の光学純度の平均値を表 2-6 にまとめて示す。表 2-6 によると、実験を通じて光学純度 90%以上の L-乳酸が生成されたことが分かる。また、Run 1-1 の運転条件である 55°C、pH 5 および HRT 20 日 (COD 負荷率 5.2 g-COD/L-Reactor/日) の半連続培養により、L-乳酸を生成する微生物 (L-乳酸菌) が集積したと考えられる。さらに、pH 6 とした条件 (Run1-3~Run1-5) において、基質中に元から存在する D-乳酸を除いて考慮した生成乳酸に対する光学純度では、光学純度 96%以上の L-乳酸を得ることができた。したがって、生成乳酸の大部分は L-乳酸であり、また、光学純度を低下させる原因となる基質中の D-乳酸は、発酵液中の光学純度に対して 3~4%程度の影響を及ぼしていた。光学純度 96%以上の L-乳酸は、高い汎用性を有するポリ乳酸の原料とすることができることから、発酵により得た乳酸の付加価値向上を意図する場合は、原料中に含まれる光学純度の低い乳酸の除去を行うことが有効であると考えられる (Sakai *et al.*, 2004)。

表 2-6 高温培養 (Run 1) における乳酸発酵結果

	Run 1-1 (n=7)	Run 1-2 (n=4)	Run 1-3 (n=4)	Run 1-4 (n=6)	Run 1-5 (n=4)
乳酸濃度 (g/L)	19.5±3.6	17.9±2.2	39.6±4.6	31.7±3.1	36.5±3.4
乳酸収率 (-) <sup>a</sup>	0.29±0.06	0.26±0.04	0.73±0.13	0.62±0.05	0.58±0.04
D-CODIに対する乳酸の割合 (%) <sup>b</sup>	29.5±5.4	33.5±4.6	71.1±6.5	57.4±6.8	61.3±9.8
有機酸に対する乳酸の割合 (%) <sup>b</sup>	89.3±4.1	94.5±1.4	97.0±0.6	95.3±1.1	93.5±4.9
発酵液中のL-乳酸の光学純度 (%)	91.0±2.6	90.4±0.8	92.8±1.4	93.8±2.6	94.5±1.8
生成L-乳酸の光学純度 (%)	92.2±3.2	91.7±2.3	96.7±1.3	97.4±1.5	97.6±1.6

評価期間の平均値±σ  
a; 基質中の糖質量基準  
b; COD基準

表 2-6 中の pH 6 (Run 1-3~Run 1-5) における光学純度と HRT の関係について、HRT が減少するに従い光学純度が向上する傾向を確認できた。この結果は、HRT の減少に伴い L-乳酸菌がより優占化した、あるいは、反応時間の減少により乳酸の光学異性体を入れ替える反応、例えば酵素 (乳酸ラセマーゼ) による作用が減少したとも考えられる。いずれにしても、光学純度を高める観点からは、検討した pH 6 条件下 10~3 日の HRT では短い期間が望ましい結果となった。

## 2) 乳酸発酵

図 2-4 に基質中の糖質濃度と高温発酵液中の乳酸濃度の経日変化を示す。pH 5 で培養を行った Run 1-1 および Run 1-2 では、乳酸濃度は 20 g/L を下回り概ね

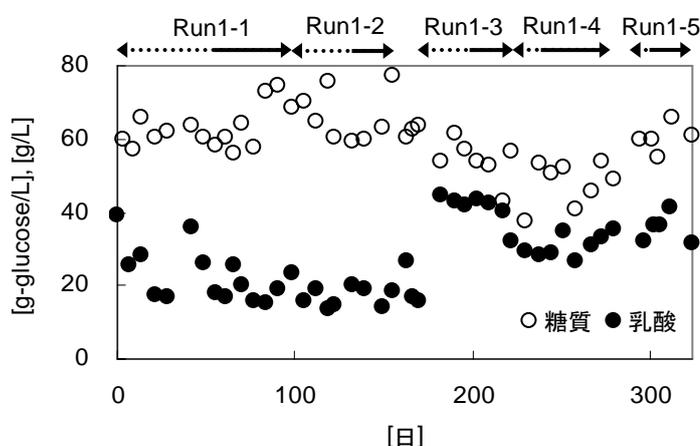


図 2-4 生ごみ培地中の糖質濃度および高温培養における乳酸濃度の推移

低い値であった。しかし、pH 6 とした Run 1-3 以降では、乳酸濃度が 30 g/L 以上と高まった。各評価期間の平均乳酸濃度および基質中の糖質濃度に対する乳酸の収率を表 2-6 にまとめて示す。収率は、pH 5 (Run 1-1 と Run 1-2) では 0.3 以下と低いが、pH 6 (Run 1-3~Run 1-5) では 0.58 以上と高くなっている。収率の高まった pH 6 における各 Run の収率を比べると、HRT の減少とともに収率が低下している。反応時間の短縮により、分解に時間を要する糖質の資化率が低下したものと推察される。以上より乳酸の収率を高める観点からは、検討した 10~3 日の HRT では長い期間ほど有利となった。

各 Run の発酵前後における糖質量の変化について、固形性と溶解性に分けて表示した結果を図 2-5 に示す。なお、消費された糖質は主に乳酸へと変化すると考えられることから、乳酸の変化も併せて示す。乳酸の収率が高まった pH 6 の条件で評価すると、糖質全体の消費率は 51~64% であり、乳酸収率の増加に併せて糖質の消費率が増加した。固形性糖質と溶解性糖質の内訳では、固形性糖質が一貫して 22% の消費率であるのに対して、溶解性糖質は 66~89% と幅広く、乳酸収率の増加に併せて増加した。固形性糖質の消費率がほぼ一定であったことから、乳酸収率の変化は見かけ上溶解性糖質の資化率の差となった。なお、消費した糖質量に対する生成した乳酸量は、Run 1-2 (74%) を除くと 101~124% であり、糖質以外の乳酸生成の可能性が示唆された。

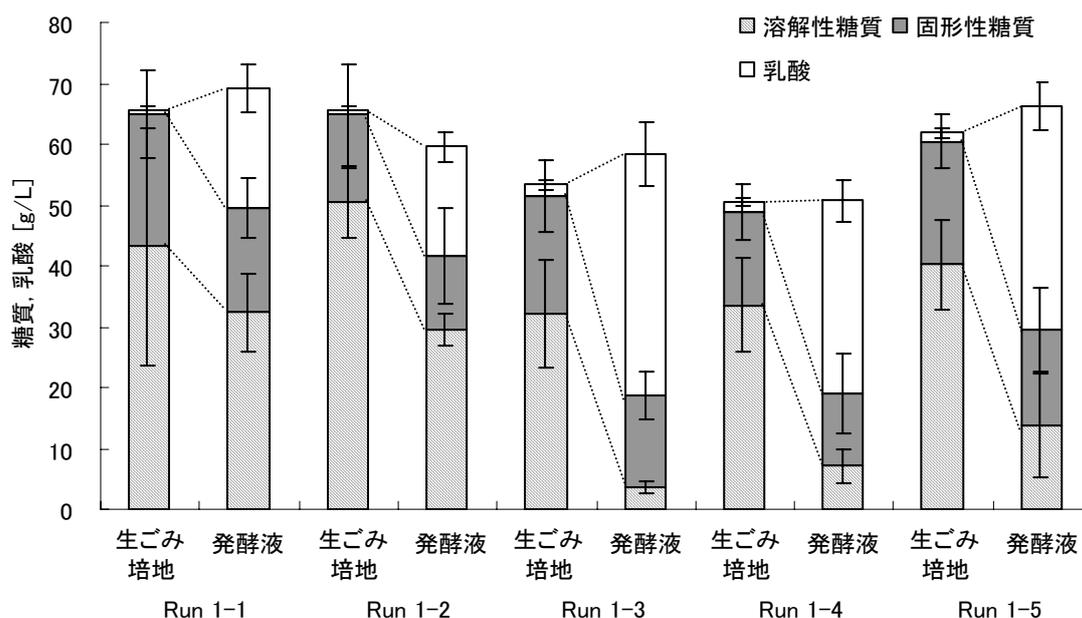


図 2-5 高温培養 (Run 1-1~Run 1-5) における糖質および乳酸の変化

高温培養で pH 6 の乳酸発酵において、乳酸資化の中心と考えられる溶解性糖質の各培養条件の残存率を図 2-6 に示す。図 2-6 中には、同様の生ごみ培地を用いた半連続式培養である第 4 章の Run 6 (pH 6、HRT 2 日、COD 負荷率 45.2 g-COD/L-Reactor/日、1 日 1 回の半連続操作) の結果も加えた。併せて、Run 6 (HRT 2 日) の点を通る溶解性糖質の残存率が 1 次反応で表現される場合の残存率推移も示す。図 2-6 によると、Run 1-4 (HRT 5 日) の条件より溶解性糖質の残存率が 1 次反応仮定の場合から乖離する様子が伺える。換言すると、HRT 5 日までに分解する溶解性糖質は分解速度の面から比較的分解しやすい糖質であり、この糖質を十分に乳酸資化するため半連続式培養の HRT は 5 日以上とすることが望ましい。

図 2-6 の縦軸を溶解性糖質の消費率とし、乳酸の収率も加えた結果を図 2-7 に示す。図 2-7 によると、溶解性糖質の消費率の変化に拘らず乳酸収率は培養時間変化に比例して (0 次反応) 増加を示すことが分かる。ところで、溶解性糖質の消費率の変化と乳酸収率の変化について、両者が乖離する場合 (例えば、HRT 2 日あるいは 10 日の場合) は、糖質の消費率に対して効率の良い乳酸生成が行えていることを示していると考えられる。しかし、HRT 2 日である Run 6 では培養の長期安定性に懸念が指摘されたように (第 4 章参照)、短い HRT は乳酸菌の増殖あるいは菌体維持に対して充分でない恐れがある。一方、HRT 10 日である Run 1-3 では、その長い培養時間から糖質以外の有機物の乳酸資化の可能性も期待される。乳酸収率が HRT 10 日までの範囲において 0 次反応的に増加することから、乳酸収率の面から HRT は長いほど有利と判断される。しかし、溶解性糖質の消費率は HRT 5 日でほぼ定常となることから、糖質の有効利用の観点からは少なくとも HRT 5 日以上で充分となった。

### 3) ろ過発酵液中の乳酸の割合

生成した乳酸を対象物として精製、回収する場合は、乳酸エステルの蒸留、乳酸の限外ろ過あるいは電気透析による膜分離などを行うこととなる。この点を考慮すると、蒸留器へのスケールや焦げ付きあるいは膜への目詰まりを避ける目的で、共存する乳酸以外の不純物 (発酵残渣や副生成物) をできる限り少なくしておくことが望ましい。そこで、発酵液に溶存する成分について COD での評価を行った。発酵液中の D-COD および主要な溶存成分 (乳酸、糖質、タンパク質) の COD 換算値の経日変化を図 2-8 に示す。図 2-8 によると、pH 5 とした期間 (Run 1-1 および 1-2) では、乳酸よりむしろ発酵に未利用の糖質が多く存在する状況であった。しかし、乳酸発酵が進行した pH 6 とした期間 (Run 1-3 ~ 1-5) では、発酵液中の D-COD 値と乳酸 COD 換算値が接近し、一方、溶解性の糖質やタンパク質は低い値で安定していることから、ろ過後に共存するその他の有機物が少なく、その後の乳酸精製に適した状態となっていると判断できる。表 2-6 において、各評価期間平均の乳酸 COD 換算値の D-COD に対する割合、乳酸 COD 換算値の有機酸全体 COD 換算値に対する割合をまとめて示す。pH 6 の条件下では、D-COD 成分のうち 60% 以上が乳酸であること、生成する有機酸の 93% 以上は乳酸であることが示された。また、pH 5 の条件下でも乳酸が選択的に生成されることも確認された。なお、これら乳酸 COD 換算値も HRT との関係が見られ、HRT の減少とともに D-COD に対する割合および有機酸全体 COD 換算値に対する割合の減少が確認された。乳酸 COD 換算値の D-COD に対する割合低下は前出の HRT と溶解性糖質の資化性の関係の一部でもある。しかし、有機酸全体 COD 換算値に対する割合低下は、乳酸以外の有機酸生成を意味し、L-乳酸の光学純度の検討では HRT を短くするほど L-乳酸選択性が向上したも

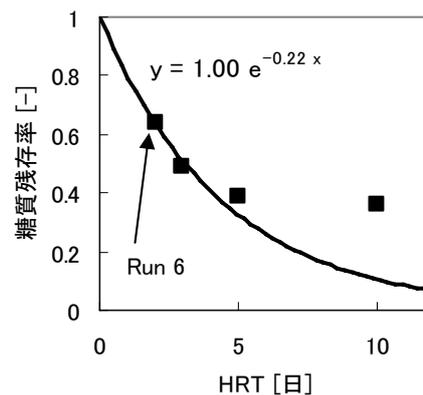


図 2-6 高温培養 (Run 1-1~Run 1-5 および Run 6) における溶解性糖質の残存率変化

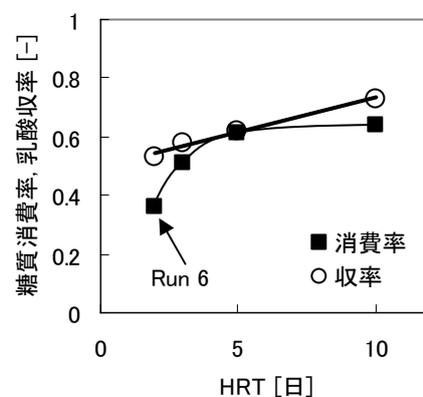


図 2-7 高温培養 (Run 1-1~Run 1-5 および Run 6) における溶解性糖質の消費率と乳酸収率の変化

この、乳酸選択性は低下する結果となった。これは、乳酸菌に限定されない全細菌に関して、HRTの短縮に伴い乳酸以外の有機酸を生成する菌種の割合の増加を示唆していると考えられる。乳酸COD換算値のD-CODに対する割合および有機酸全体COD換算値に対する割合に対しては、検討したpH 6条件下10~3日のうち長いHRTが有利となると考えられる。

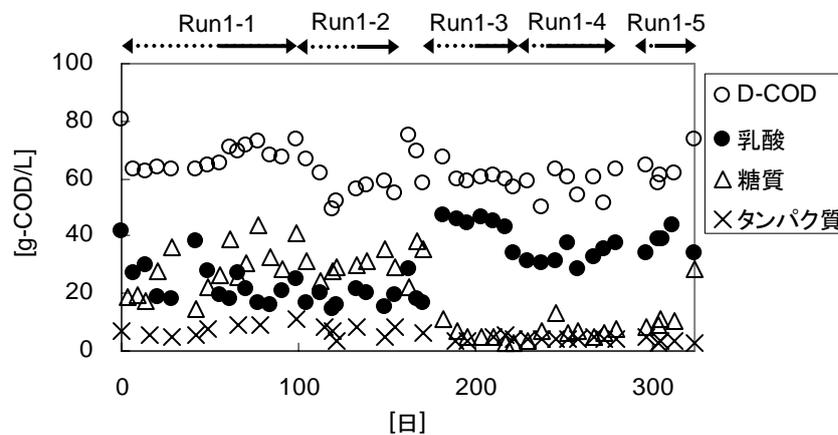


図 2-8 高温培養における D-COD、乳酸、糖質およびタンパク質濃度の推移

#### 4) 固形物の可溶化

高温発酵の前後における固形物の可溶化を考察するため、各 Run での評価期間における生ごみ培地と発酵液の TS と VTS、SS と VSS、COD と D-COD、T-N と D-N および T-P と D-P の平均値の変化を図 2-9 に示す。

乳酸発酵が進行した pH 6 の条件 (Run 1-3~Run 1-5) で比較すると、TS と VTS については、TS で 0~24%の増加と VTS で 6~18%の減少が観察された。TS が増加した理由は、乳酸生成に伴う中和を目的に水酸化ナトリウムを添加したためである。一方、VTS の減少は、有機物の無機化が起こったことを示すと考えられる。SS と VSS については、両者とも 20~30%程度の減少が観察された。SS の大部分が VSS であることから、固形性有機物の可溶化が示された。ガス形態を有さない保存性成分である T-P は、4%程度の変動であり、その保存が確認された。

固形物の可溶化のみが起こった場合に保存すると考えられる COD および T-N については、VTS の減少が大きかった Run 1-5 では COD について 6%程度の減少が見られたものの、それ以外の Run 1-3 と Run 1-4、および T-N については概ね保存が確認された。理論上ホモ乳酸発酵では 1 g のグルコースから 1 g の乳酸が生成するのみであり、二酸化炭素の生成 (ガス化) は起こらない。したがって、Run 1-3 と Run 1-4 ではホモ乳酸発酵に近い発酵が主として起こり COD は保存されたと考えられる。一方、Run 1-5 では乳酸発酵が起こったものの、VTS の結果と併せて COD 成分のガス化が進行したと考えられる。T-N については、乳酸発酵は主に EMP 経路により代謝されるのみであることから硝酸呼吸による脱窒も関与せず、また、pH は酸性側 (5~6) のためアンモニア性窒素の揮散も起こり難い。したがって、乳酸発酵を中心とする発酵が起こったことにより T-N は保存されたと考えられる。溶存態の成分に関しては、D-COD および D-N について、それらの増加より可溶化の進行が確認された。

次に、上記の検討で変動のあったものについて、発酵前後の変動率と HRT の関係を図 2-10 に示す。中和剤との関連がある TS 以外について、HRT の減少に伴い、VTS、SS および VSS の減少率の

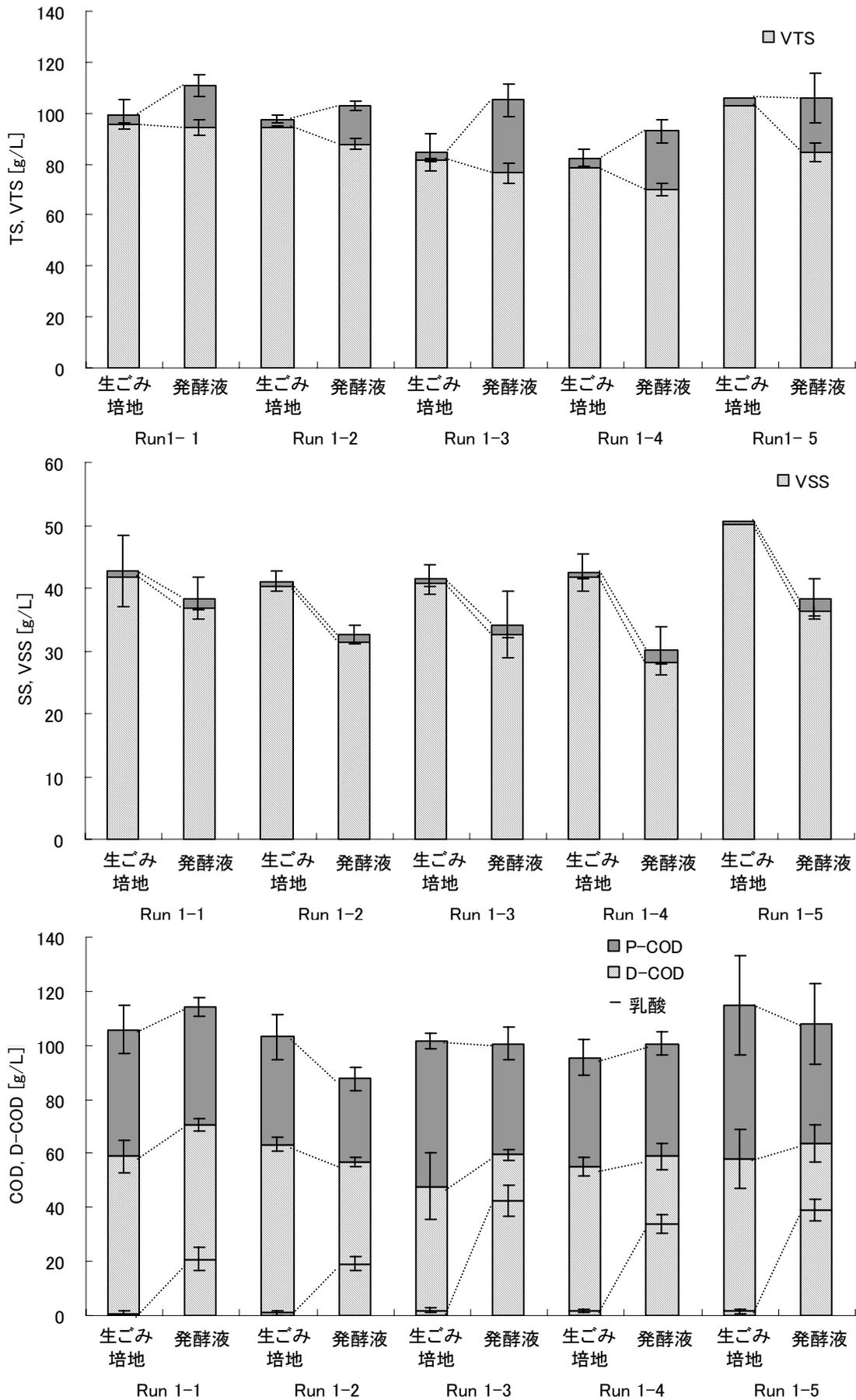


図 2-9 高温培養 (Run 1-1~Run 1-5) 前後の各項目の変化

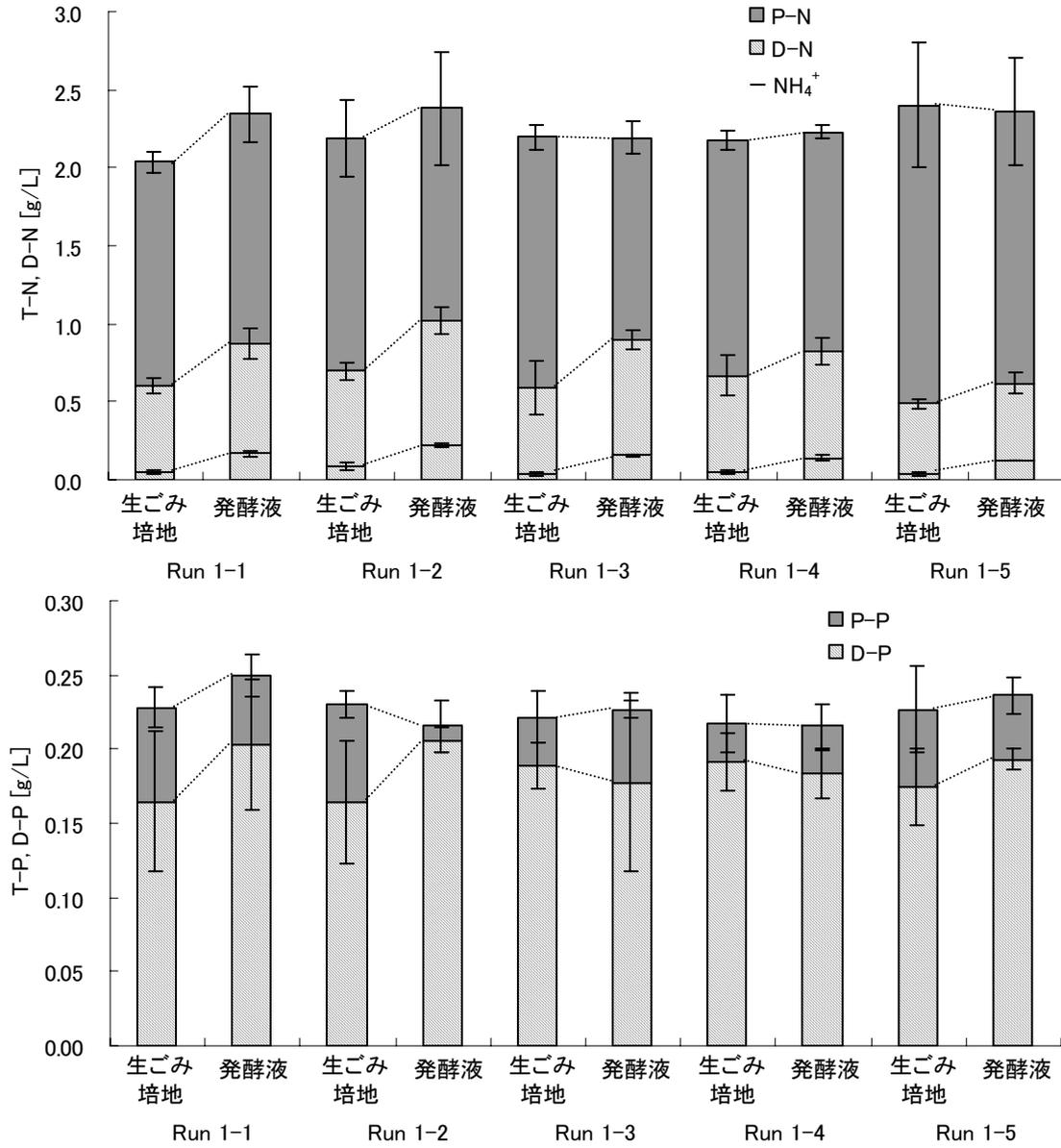


図 2-9 (継続) 高温培養 (Run 1-1~Run 1-5) 前後の各項目の変化

増加(変化率の低下)傾向、D-CODおよびD-Nの増加率の減少(変化率の低下)傾向が確認された。また、SSとVSS、D-CODおよびD-Nは、HRT 5日に変化のピークが存在することも確認された。TSの変動を評価するため、中和剤消費量とHRTの関係を図2-11に示す。中和剤の添加量が、いずれのRunも生ごみ培地1kg(湿重)あたり25g-NaOH程度とほぼ一定であることから、TSの増加率の減少(変化率の低下)傾向もVTSと同じく有機物の無機化の促進によるものと考えられる。TS、VTSの減少率の増加(変化率の低下)傾向は、COD変化からは明確に観察されないものの有機物の無機化の促進を意味することから、表2-6の乳酸収率の低下と関連する結果と考えられる。

SSとVSSの減少率の増加(変化率の低下)傾向は固形物の可溶化の進行を意味するが、D-CODおよびD-Nの増加率が逆に減少することから、無機化の進行に加えてSSと溶解性成分(0.45 $\mu$ mろ過)の間となる粒子径の固形物が増大化していることも考えられる。仮にこの固形物が増加したとすると、この固形物はSS分析をろ過径1 $\mu$ mに近似した遠心分離法により測定したため、0.45~1 $\mu$ m付近の粒子径であると考えられる。そこで、この固形物をさらに微生物菌体と仮定すると、HRTが5日の条件時に変化率のピークとしてSS減少の最大化およびD-CODとD-N増加の最小化が表れることから、微生物活性や菌体量のピークがHRT 5日条件に存在する可能性が指摘される。図2-11の中和剤消費量によると、HRTが5日の条件が26g-NaOH/kg-生ごみ培地と単位基質量あたり最も中和剤を消費したことを示しているが、乳酸生成活性の高さを示す結果として上記仮定を支持すると考えられる。

以上をまとめると、高温発酵では固形物の可溶化が進行することが示された。HRTを10、5および3日の3段階に変化させた実験では、可溶化の進行はHRT 5日の条件が最も高く、29%の可溶化率を示した。一方で、同条件時には、可溶化に伴う溶存態の有機物濃度や窒素濃度の上昇率が最も低く、したがって、溶存体有機物や窒素の利用によりHRTが5日の条件時に発酵槽内に存在する微生物の活性や菌体量が最大となる可能性も指摘された。なお、HRTの減少に伴い、有機物の無機化が進行することも確認された。特に、HRTを3日まで減少すると、HRT 5日条件と比較して可溶化率は向上しないものの無機化は継続して増加した。ホモ乳酸発酵では有機物の無機

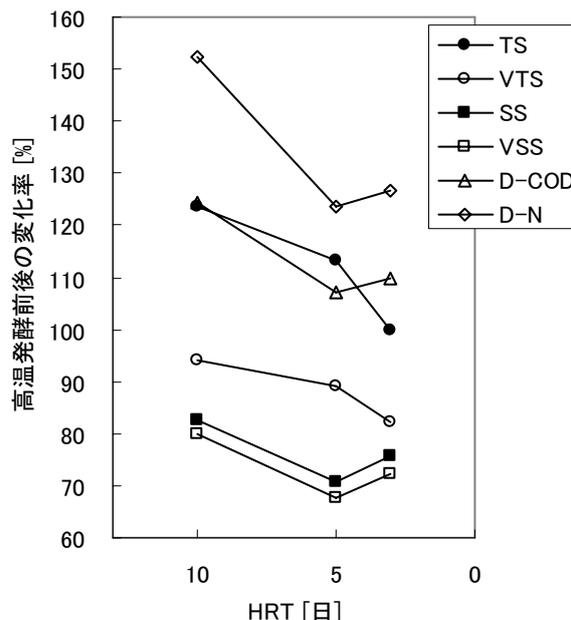


図2-10 高温培養 (Run 1-3~Run 1-5) 前後の各項目の変化率推移

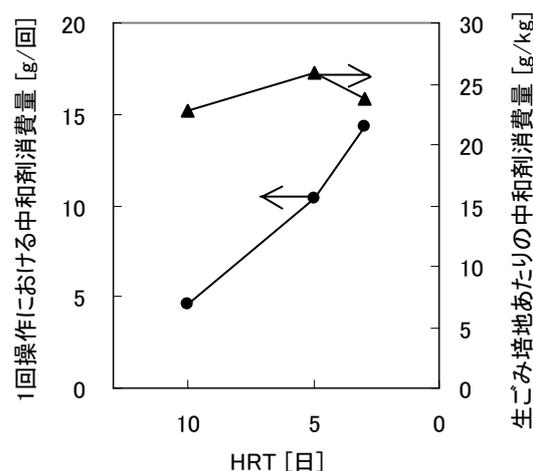


図2-11 高温培養 (Run 1-3~Run 1-5) における中和剤(水酸化ナトリウム)消費量の推移

化が起こらないことから、無機化の進行は全体として乳酸発酵形態のヘテロ化を意味し、乳酸資化率の低下と乳酸以外の有機酸生成の増加と関与すると考えられる。

### 5) HRT による影響

乳酸発酵が進行した pH6 における高温培養において HRT が及ぼす影響を整理すると、HRT が 10 から 3 日に減少するに従い、a) 光学純度が向上、b) 乳酸の収率が減少、c) 乳酸以外の有機酸割合が増加および d) 有機物の無機化が進行した。半連続式培養において重要な運転操作因子である HRT の減少による L-乳酸発酵への直接の影響については以下のことが考えられる。すなわち、反応器内では、①反応時間の減少、②洗い出し効果の増加から増殖速度の速い微生物の優占化、③希釈率の増加から阻害要因である乳酸（塩）影響の減少が起こると考えられる。一方、固形物の可溶化は HRT 5 日の条件が最も進行し、固形性糖質の可溶化は HRT と関与せず一定であった。

### 3.1.3 中温発酵 -Run 2-

#### 1) 光学純度

一般的に、乳酸菌は中温付近を至適温度とするものが多く、純菌を利用する乳酸発酵事では中温付近が培養温度として採用されている。また、中温培養は、メタン発酵などの混合微生物培養でも中心となる温度域であることから、中温環境（37℃）での乳酸発酵性について検討した。図 2-12 に、中温発酵における光学純度の経日変化を示す。また、評価期間における平均値を表 2-7 にまとめる。

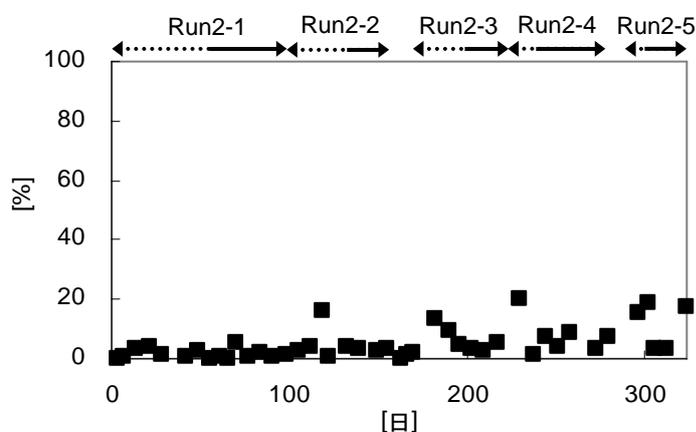


図 2-12 中温培養 (Run 2) における光学純度の推移

表 2-7 中温培養 (Run 2) における乳酸発酵結果

	Run 2-1 (n=7)	Run 2-2 (n=4)	Run 2-3 (n=4)	Run 2-4 (n=6)	Run 2-5 (n=4)
乳酸濃度 (g/L)	15.3±2.5	19.7±0.4	3.5±2.4	10.0±5.4	21.6±1.7
乳酸収率 (-) <sup>a</sup>	0.22±0.04	0.29±0.03	0.03±0.05	0.17±0.12	0.33±0.03
有機酸に対する乳酸の割合 (%) <sup>b</sup>	33.6±5.6	45.6±2.0	7.8±5.4	25.1±11.7	43.5±4.6
発酵液中のL-乳酸の光学純度 (%)	1.3±1.7	3.5±0.4	3.8±1.1	1.9±2.2	10.7±7.5

評価期間の平均値±σ

a; 基質中の糖質量基準

b; COD基準

図 2-12 および表 2-7 より、pH 5~6 および HRT 20~3 日 (COD 負荷率 5.2 ~ 34.4 g-COD/L-Reactor/日) の条件下の中温発酵で得られる乳酸は D-体および L-体が拮抗したラセミ状態の乳酸であり、かつその割合も不安定である。したがって、非滅菌環境における生ごみの中温発酵では、乳酸の最大需要先であるポリ乳酸への用途は困難であると考えられる。

## 2) 乳酸濃度および収率

図 2-13 に基質中の糖質濃度と中温発酵液中の乳酸濃度の経日変化を示す。また、各評価期間における乳酸の収率および COD を基準とした生成有機酸に対する乳酸の割合を表 2-7 に示す。これらによると、各評価期間において乳酸の収率は 0.03 ~ 0.33 と低く、生成有機酸に対する乳酸の選択性も 50%未満であり、効率的な乳酸発酵には至らなかった。しかし、図 2-13 によると、運転条件が変更された直後の馴致期間において乳酸濃度の上昇と下降が観察される。一時的ではあるが乳酸濃度が 40 g/L まで上昇したことも観察された。この結果は、条件さえ整えれば光学純度は期待されないものの中温条件下でも乳酸発酵が実施できる可能性を示している。そこで、中温培養での乳酸発酵条件を検討する。

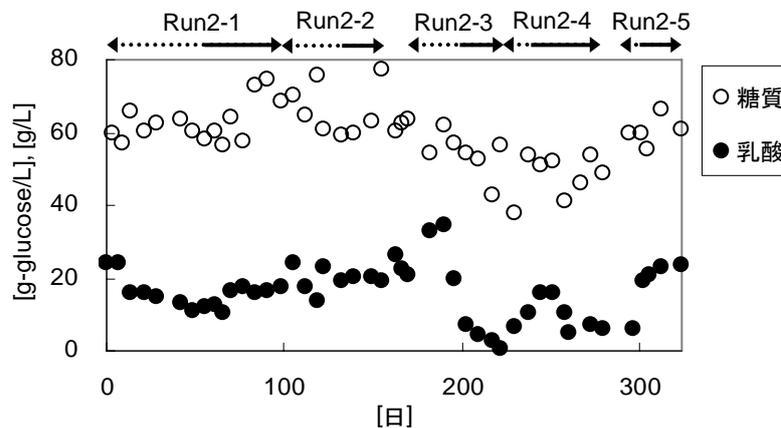


図 2-13 生ごみ培地中の糖質濃度および中温培養における乳酸濃度の推移

培養条件のうち pH に関しては、結果的に pH 5 (Run 2-1 および Run 2-2) の条件が低収率ながらも安定的に乳酸発酵を行えた。一方、pH 6 の条件下 (Run 2-3 ~ Run 2-5) では、運転条件の変更により一時的に乳酸濃度が高まる点、HRT の短縮に伴い乳酸濃度が高まる点が確認された。これらの結果を、系内には大きく 2 つの菌群、①乳酸菌および②乳酸を消費するあるいは乳酸菌と競合する菌群が存在すると仮定して考察を試みる。pH 5 の条件下で安定的に乳酸が生成できた理由は、乳酸菌も至適とは限らないが、②の菌群の生長に対して pH 条件が不適であったためと考えられる。なお、一般的に乳酸菌は低 pH 耐性を有することが知られている。pH 6 への運転条件の変更に伴い一時的に乳酸濃度が高まる点に関しては、乳酸菌が②の菌群より環境の変化にいち早く対応できる、つまり増殖が早いことに起因すると考えられる。このことは、HRT の短縮に伴って上昇する乳酸濃度からも説明できる。一方、pH 6 の条件下で運転を継続すると乳酸濃度が低下する点に関しては、②の菌群が遅いながらも増殖してきたためと考えられる。また、pH 6 の条件下で HRT の短縮に伴い乳酸濃度が高まった結果は、HRT の短縮に伴い系内に存在できる②の菌群が減少したためと考えられる。

以上から、非滅菌条件下の中温発酵でも、低 pH あるいは高有機物負荷培養の実施により乳酸を

生成できる可能性があると考えられる。実際、Sakai *et al.* (2000) は 2 倍希釈した模擬生ごみを回分式培養により 37°C で生ごみ常在菌による乳酸発酵を試み、低 pH (pH 7 へ間欠的に設定するものの培養時間の 78% は pH 5.5 以下) と高負荷培養での選別を行うことで乳酸が選択的に生成できることを示している。ただし、この実施例でも乳酸の光学純度は 34% と低く、図 2-12 の結果と併せて非滅菌環境下の中温培養による乳酸発酵では光学純度は低い値に留まるものと考えられる。

### 3) 有機酸発酵

図 2-14 に基質中、高温発酵液中および中温発酵液中の糖質濃度を示す。図 2-14 によると、中温発酵は pH や HRT の条件に拘らず、常に 10 g/L 程度の残存糖質濃度である。つまり、中温発酵は高温発酵に比べて、特に pH 5 の条件下において糖質の消費率の高いことが分かる。そこで、高温発酵と同様に、各 Run の発酵前後における糖質の変化について、固形性と溶解性に分けて表示した結果を図 2-15 に示す。これによると、一貫して中温発酵では溶解性糖質を 95% 程度消費し、固形性糖質も 40% 以上消費した。生ごみに由来する糖質に関しては、中温発酵がその資化性において高温発酵より格段に優れることが明らかとなった。そこで、中温発酵において糖質から生成される物質に関して考察を試みる。

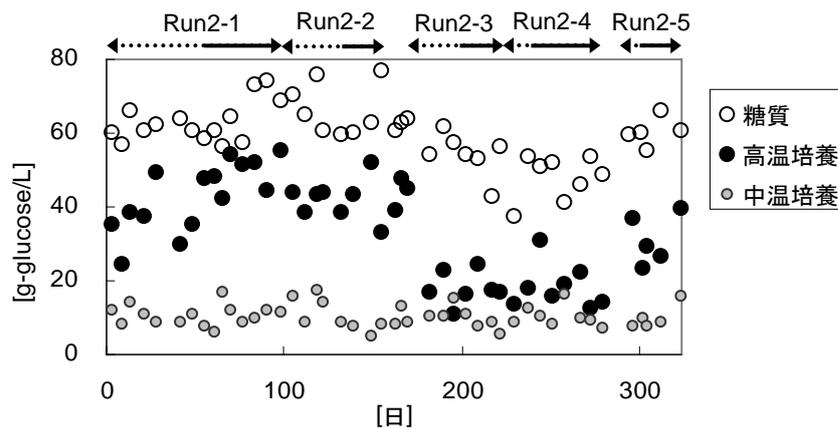


図 2-14 基質中の糖質濃度および高温発酵液と中温発酵液中の糖質濃度の推移

中温発酵において仮に糖質が有機酸に変換されたと考えると、中温発酵は、乳酸の生成量は高温発酵に劣るものの、有機酸全体では高温発酵を上回ることも期待できる。そこで、両発酵における有機酸量を COD 換算にて比較した結果を図 2-16 に示す。これによると、有機酸生成量に関しては中温発酵が高温発酵を上回ることが示された。また、中温発酵では、実験期間全体を通じて安定して高い有機酸濃度であった。このことは、生ごみを原料に有機酸を目的産物とする場合、特に pH 5 程度の低 pH 条件下や COD 負荷率 35 g-COD/L-Reactor/日程度の高有機物負荷率条件下など培養条件の厳しい環境下では、中温発酵が高温発酵より効率的に有機酸を生成できることを示している。

中温発酵では有機酸が効率よく生成できることが示されたので、次にその成分について考察を試みる。図 2-17 に主に検出された有機酸 (乳酸、酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*n*-吉草酸) の経日変化を示す。運転条件を pH 6 とした以降 (Run 2-3 ~ Run 2-5) において、各有機酸の動向に

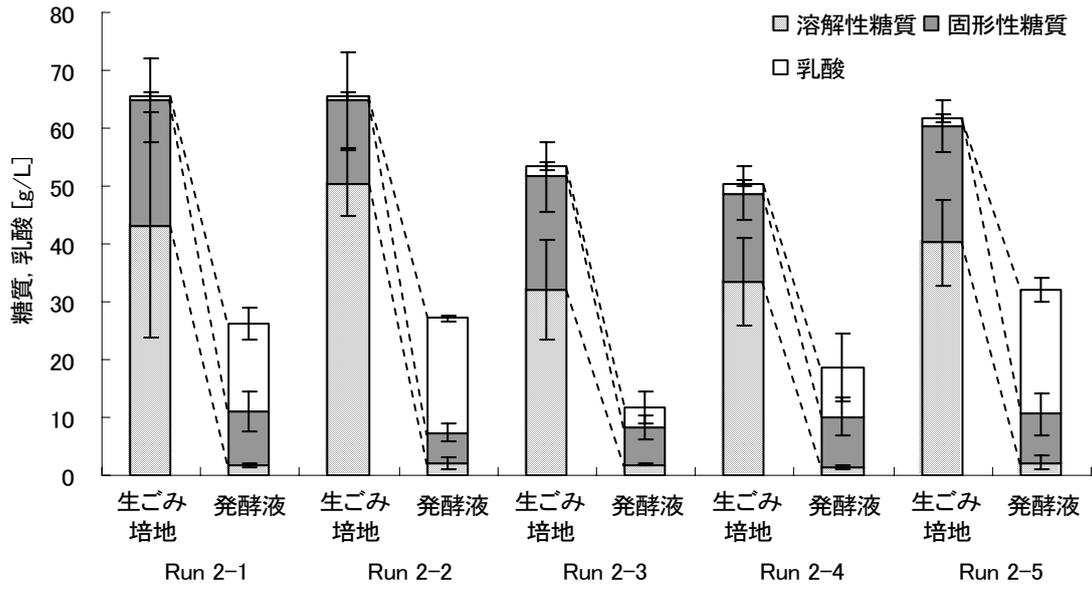


図 2-15 中温培養 (Run 2-1~Run 2-5) における糖質の変化

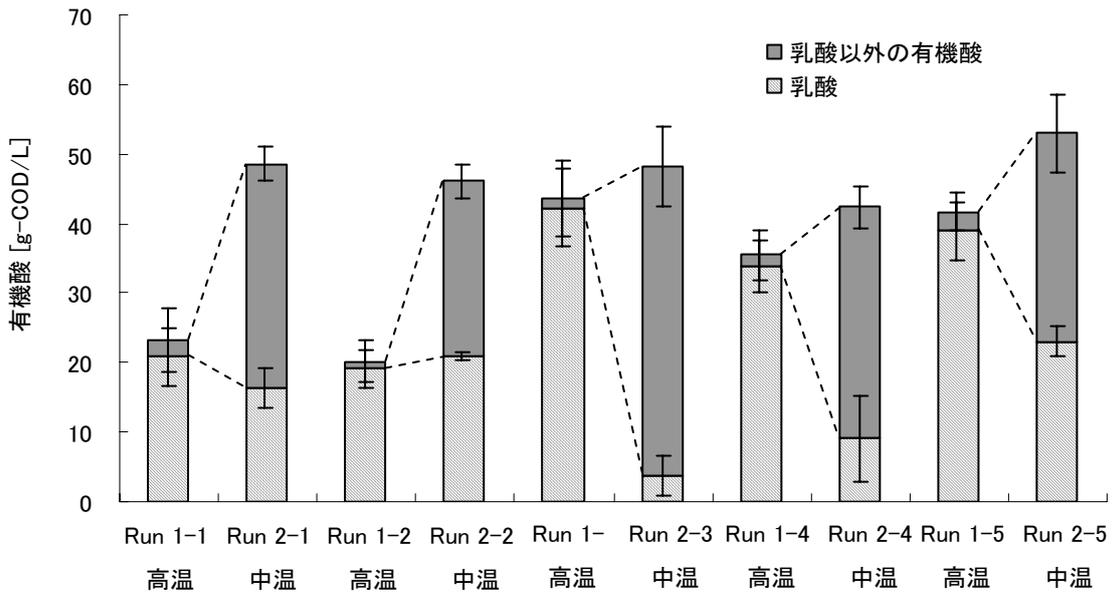


図 2-16 高温培養と中温培養の有機酸生成量 (COD 基準) の比較

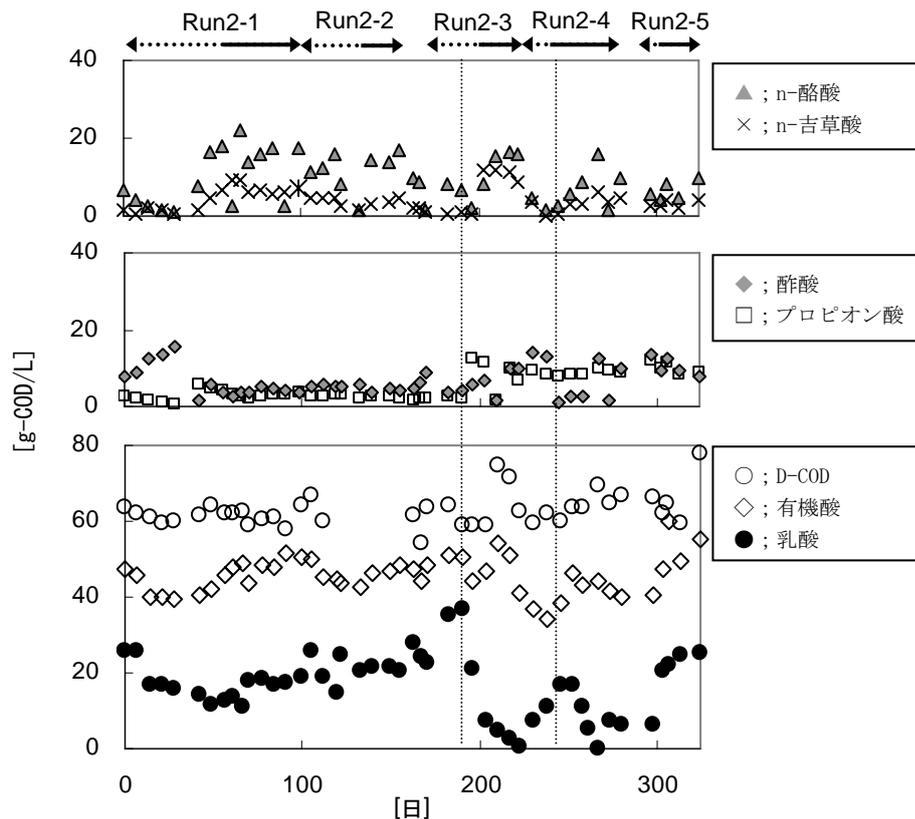


図 2-17 中温発酵における各有機酸の推移

は特徴があり、プロピオン酸は安定して増加しているのに対して、酢酸、*n*-酪酸および *n*-吉草酸は乳酸の変動に追従する変化を示している。プロピオン酸濃度の高まりと安定は、pH 6 条件下 HRT の短縮にも拘らずその濃度は減少することなく安定したことから、プロピオン酸を生成するプロピオン酸菌（高藤，2001）が pH 6 条件に対して速やかな増殖速度を有していることによると考えられる。一方、酢酸、*n*-酪酸および *n*-吉草酸は、乳酸濃度の増加時に減少し、減少時に増加することから、これら有機酸を生成する菌群は乳酸菌と競合関係にある、あるいは乳酸菌の生成した乳酸を資化するとも考えられる。また、HRT の短縮に伴い乳酸濃度が高まり *n*-酪酸と *n*-吉草酸濃度が低下することから、*n*-酪酸や *n*-吉草酸といった有機酸を生成する菌群の増殖速度は乳酸菌と比較して遅いと考えられる。なお、乳酸の資化について、プロピオン酸菌および酪酸を主に生成する酪酸菌（森地と大山，1982、Sneath，1986、吉野と石崎，2001）は、糖質の資化が中心であるが、乳酸から酢酸などの低級脂肪酸を生成することも報告されている。

以上の乳酸のみが生成する高温発酵と対照的な有機酸生成の結果は、中温発酵が微生物の多様性に富む結果と、pH 条件の 5 から 6 への緩和により生長可能な有機酸生成菌が増加した結果であると考えられる。微生物の多様性に富む点は、原料の資化性にも反映され、したがって中温発酵は糖質を高温発酵より効率よく利用したと考えられる。

中温発酵により生成した有機酸の用途については、様々な有機酸が混在する発酵液であることから、高い付加価値を期待することは困難である。しかし、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、低 pH 域でも発酵が進行し、糖質に関しても高い資化率を有し、高負荷率にも対応可能であり、かつ、低温であるため投入エネルギーも少ないなどの利点が多くある。そ

ここで、発酵物を特定の有機酸にこだわる必要のない二相式メタン発酵の基質や脱窒における水素供与体としての利用を目的とする場合、pH 5~6 および COD 負荷率 5~35 g-COD/L-Reactor/日の培養条件下において中温発酵が有利となる可能性も考えられる。

#### 4) 固形物の可溶化

中温発酵での固形物の可溶化を評価するため、高温発酵と同様に各 Run 評価期間における生ごみ培地と発酵液の TS と VTS、SS と VSS、COD と D-COD、T-N と D-N、T-P と D-P の平均値を図 2-18 に示す。また、TS を評価するため中和剤消費量と培養条件との関係を図 2-19 に示す。

図 2-18 の TS の変化は、図 2-19 によると中温発酵は高温発酵 (25 g/kg 程度) を上回る生ごみ培地あたりの中和剤消費量による無機 TS の増加にも拘らず、各 Run とも減少が確認された。VTS についても、全期間を通じて 29~37%の減少率であった。このことから、中温発酵では、有機物の無機化およびガス化の進行が高温発酵より卓越していたことが示された。図 2-19 の中和剤消費量について、pH 6 の条件下では HRT の短縮に伴い生ごみ培地 1 kg あたりの中和剤消費量が大幅に増加している。中和剤消費量は、有機酸の生成量と関係すると考えられるが、図 2-16 の有機酸生成量を考慮すると、増加する生ごみ培地あたりの中和剤消費量は有機酸生成量を反映していない。この原因は生成した有機酸の消費によると考えられるが、中和剤消費量と TS あるいは VTS の減少率を考慮すると、pH 6 の条件下では HRT の短縮に伴い有機物の無機化およびガス化の進行が著しく増大化したと推察される。

可溶化に関する SS および VSS についても、高温発酵と比較すると大きく減少し、固形性有機物の可溶化の進行が示された。各 Run の発酵前後の変動率を図 2-20 に示すと、SS および VTS は Run 2-3 (pH 6 および HRT 10 日) において約 50%の最大減少率を示した。可溶化が進行した場合、D-COD や D-N の増加が予想されるが、D-COD および D-N とも SS の可溶化率が最大となるときに増加率が最大となることから、可溶化の進行を反映した結果となっている。なお、図 2-18 より保存量である T-P に関しては、Run 2-2 で増減率が 9%あるものの、それ以外は 4%未満の変化であり保存性は確認されたと考えられる。

以上より、中温発酵は高温発酵と比較して固形物の可溶化がより進行することが明らかとなった。また、いずれの培養条件においても高い可溶化率となった。この点は、生ごみから有機酸への資化率について、特に pH 5 の低 pH 条件において中温発酵が優れる点と一致する。ただし、無機化の進行も大きく、有機酸生成を目的とする場合は投入有機物量あたりの資源化率が低下することにも注意が必要である。

### 3.2 高温 L-乳酸菌の由来と同定

#### 3.2.1 高温 L-乳酸菌の由来 -Run 3-

##### 1) 概論

3.1.2 において、培養温度を 55°C、pH 5 および HRT 20 日 (COD 負荷率 5.2 g-COD/L-Reactor/日) の高温条件とすることで、特に滅菌などの処理を施さなくても L-乳酸菌が優占化し、高い光学純度の L-乳酸が得られることを示した。そこで本項では、この L-乳酸菌の由来について検討を行った。

本研究での L-乳酸菌の由来としては、①自然環境を含む基質 (模擬生ごみ) 由来と②植種材料

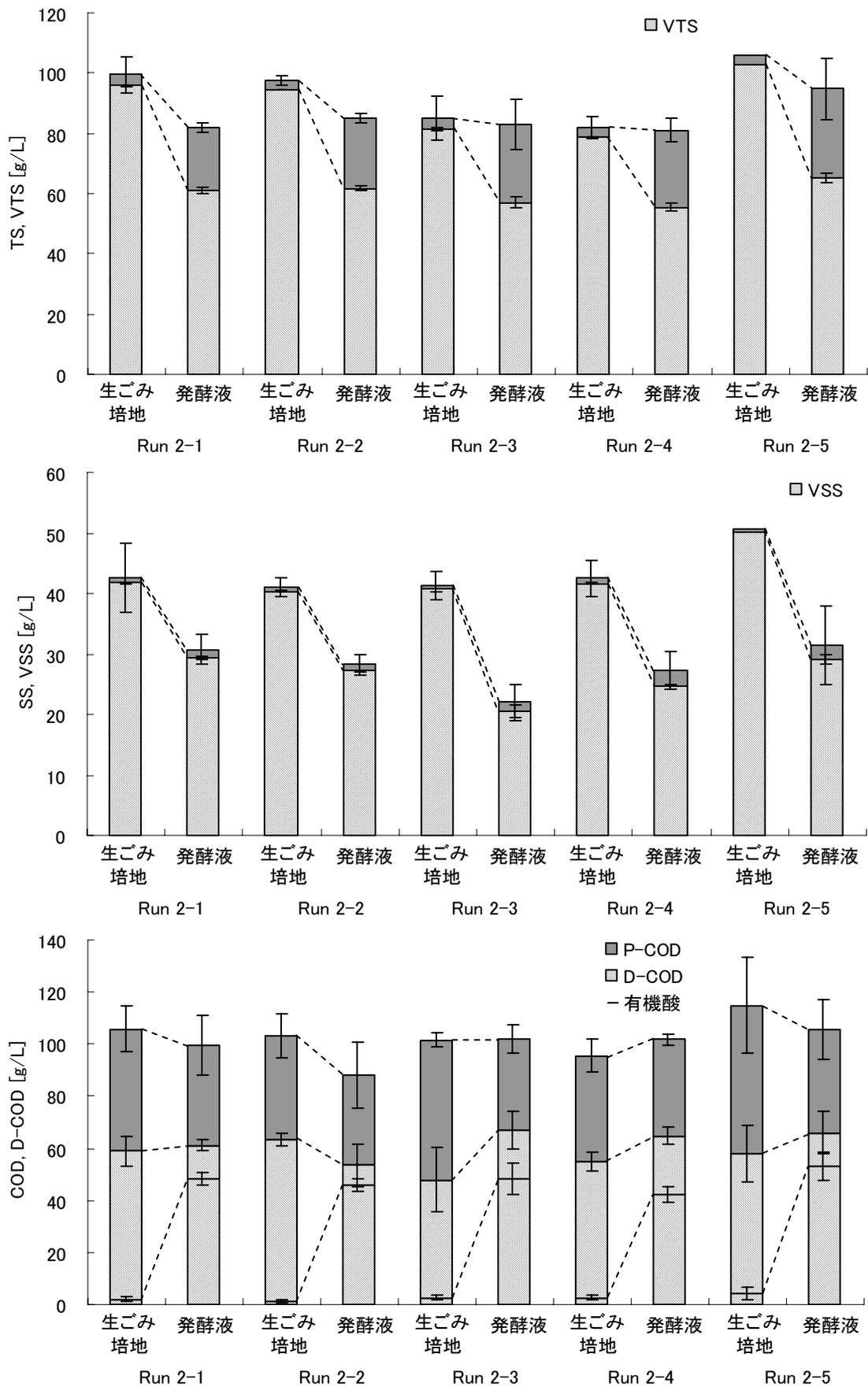


図 2-18 中温培養 (Run 2-1~Run 2-5) 前後の各項目の変化

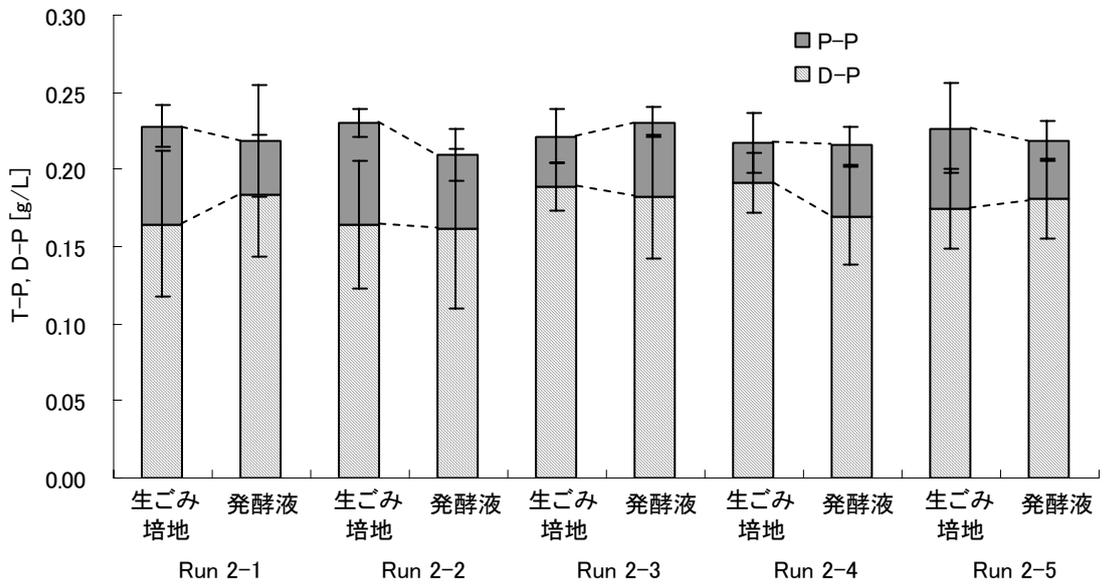
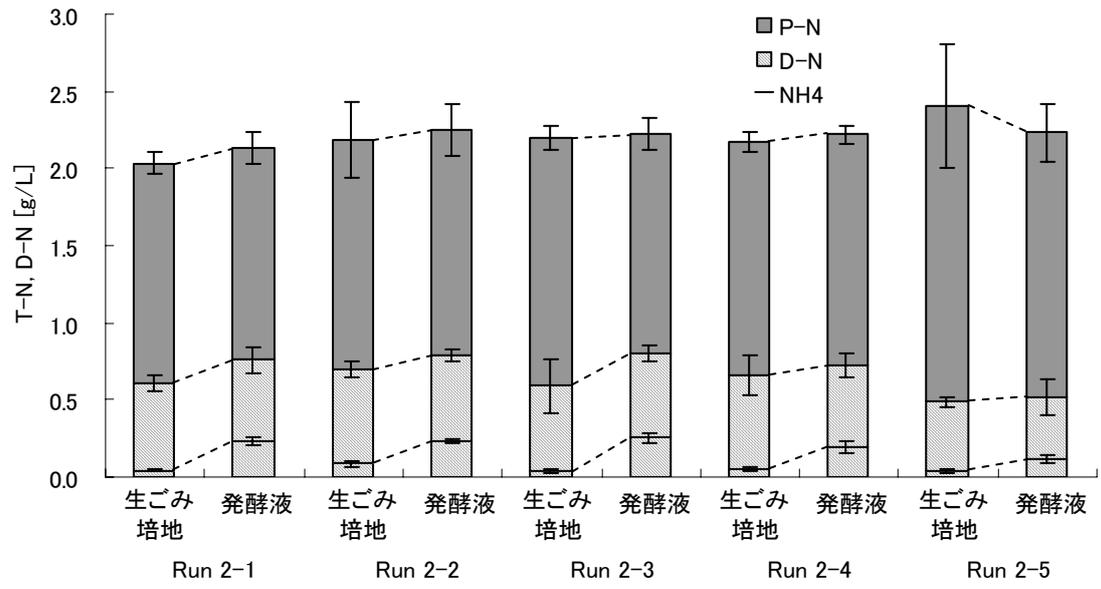


図 2-18 (継続) 中温培養 (Run 2-1~Run 2-5) 前後の各項目の変化

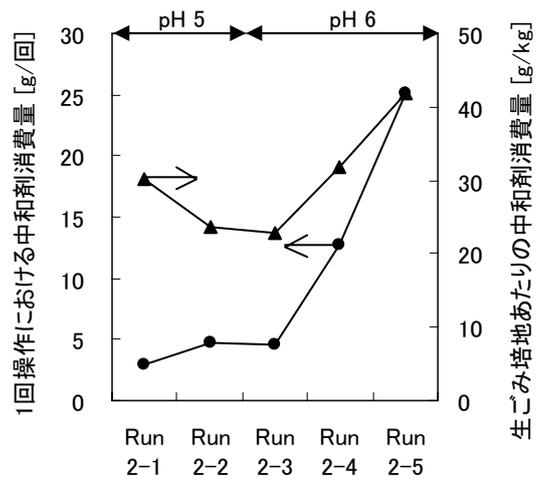


図 2-19 中温培養 (Run 2-1~Run 2-5) における中和剤 (水酸化ナトリウム) 消費量の推移

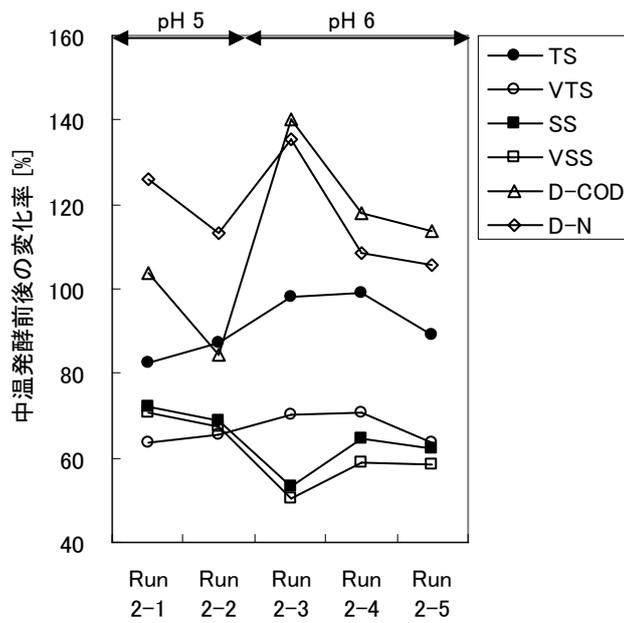


図 2-20 中温培養 (Run 2-1~Run 2-5) 前後の各項目の変化率推移

(Run 1-0) 由来とが考えられる。この植種材料は、詳細を第 2 節に記したが下水処理場の高温消化槽までその由来を遡ることができるものである。ただし、この植種材料は、消化槽に投入される余剰汚泥などの基質とは性状の大きく異なる模擬生ごみを基質として長期間にわたり培養されたものであり、かつ、生ごみ中にも様々な微生物の存在が予想されることから、下水処理場由来の微生物が優占種として有機酸発酵に寄与したとは考え難い。そこで、本研究での L-乳酸菌は模擬生ごみ由来であると仮定し、植種を伴わない模擬生ごみのみを発酵に供して L-乳酸の生成状況の把握を試みた。

実験 (Run 3) は、3.1.2 と同様の半連続式培養にて行った。実験条件は表 2-2 に示したとおりである。基質、実験装置とも 3.1.2 と同様であるが、実験開始に際して植種を伴わない点のみが異なる。1 L の反応器に蒸留水にて 2 倍希釈された生ごみ培地を 1,000 g (湿重) 投入し、培養条件を温度 55°C で pH 6 とし実験を開始した。発酵液の引抜きおよび生ごみ培地の添加の半連続操作は、各々 200 g (湿重) を 2 日に 1 度の頻度で行い、HRT は 10 日 (COD 負荷率 10.3 g-COD/L-Reactor/日) とした。水質分析項目は 3.1.2 と同様である。

## 2) 実験結果

模擬生ごみのみを利用した L-乳酸発酵を 76 日間にわたって実施した。生ごみ培地中の糖質濃度、得られた乳酸濃度と光学純度の結果を図 2-21 に示す。本実験により、植種を伴わない培養でも 1HRT 以後において高い光学純度の L-乳酸が効率よく得られることが示された。これらより、本研究における L-乳酸菌は自然環境を含めた生ごみ由来であること、55°C で pH 6 の条件でも L-乳酸菌が優占化すること、および 3.1.2 で示した高温 L-乳酸発酵が再現性を有することが確認された。

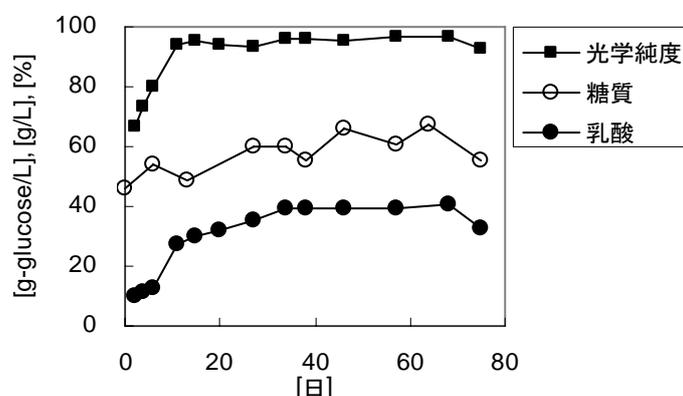


図 2-21 基質糖質濃度と高温培養 (Run 3) による乳酸濃度および光学純度の推移

半連続式培養の立ち上がりを評価するため、L-乳酸発酵状況に関して Run 1 と同じく HRT の 3 倍時間経過後の平均値 (A) と HRT 1 倍時間後の平均値 (B) を、植種を伴うものの培養条件を同じくする Run 1-3 の結果とともに表 2-8 に示す。これによると、(B) は (A) と比べてわずかに乳酸の収率面で劣るものの、あるいは表 2-8 中の各項目について分散がわずかに大きいものの、同程度の L-乳酸発酵状況を示している。つまり、植種を伴わない生ごみのみからの半連続式 L-乳酸発酵を実施しても、立ち上げに要する時間は高々 1 HRT 時間で十分であると考えられる。なお、有機酸発酵槽由来の植種材料を利用している Run 1-3 の結果と比較すると、乳酸の収率面で劣る

ものの光学純度の面で優れる結果となった。これは、混合培養系の発酵液などの植種を伴わず生ごみのみから立ち上げた方がL-乳酸菌の優占化に優れること、他方で多様性の低下から多糖の加水分解能の低下による糖質資化率が低下することを示していると考えられる。

表 2-8 植種を伴わない高温 L-乳酸発酵の立上げ期間比較

	A (n=6)	B (n=10)	Run 1-3 (n=4)
乳酸濃度 (g/L)	38.6±2.7	35.6±4.5	39.6±4.6
乳酸収率 (-)	0.61±0.05	0.58±0.05	0.73±0.13
D-CODに対する乳酸の割合 (%) <sup>a</sup>	64.9±7.9	61.3±8.1	71.1±6.5
有機酸に対する乳酸の割合 (%) <sup>a</sup>	92.3±1.9	92.2±1.9	97.0±0.6
発酵液中のL-乳酸の光学純度 (%)	95.6±1.3	95.0±1.4	92.8±1.4
生成L-乳酸の光学純度 (%)	99.4±1.0	98.4±1.9	96.7±1.3

評価期間の平均値±σ

A: 馴致期間としてHRTの3倍時間を考慮したもの。

B: 馴致期間としてHRTの1倍時間を考慮したもの。

a: COD基準

### 3.2.2 高温 L-乳酸菌の同定

L-乳酸発酵が実施できた培養系における発酵液中に存在する微生物群集の解析を行った。群集解析に供したサンプルは、A) 3.1.2 の高温培養サンプル (RUN 1-3; pH 6, HRT 10 日) および B) 3.2.1 の植種を伴わない高温培養サンプル (Run 3; pH 6, HRT 10 日) である。これらのサンプルは、同条件による培養が安定していると考えられる時期において採取した。

A および B サンプルに対して 16S rDNA のクローンライブラリーを作成し、92 コロニーの塩基配列を調べた結果を表 2-9 に記す。これによると、両サンプルから優占種として、*Bacillus coagulans* が検出された。*B. coagulans* は、胞子を形成する *Bacillus* 属のため、いわゆる乳酸菌には属さない菌種である。しかし、有孢子乳酸菌と称されるなど古くから乳酸生成が確認されている菌種である。また、この菌種は高温耐性を有し、L-乳酸のみを生成することでも知られている (中山, 1983, Litchfield, 1996)。そこで、本研究における L-乳酸発酵は、主としてこの *B. coagulans* によってなされていると考えられる。*B. coagulans* は、他の *Bacillus* 属と同様に土中など自然環境においてどこでも検出される可能性を有しているが (Priest, 1989)、特にこの菌を特徴付ける検出箇所として加熱食品の腐敗時に検出されることが挙げられる。例えば、米国などでは家庭で作成するホールトマトの缶詰において” flat sour” と称される腐敗がこの菌によるものとして知られている (Anderson, 1984)。また、野菜加工食品の腐敗時にも検出されることが知られている (Doyle *et al.* 2001)。これら特徴から、野菜類や加熱を一度受けた食品などから構成される生ごみ中には、既に *B. coagulans* が存在している可能性が高いと考えられる。

表 2-9 半連続式高温 L-乳酸発酵の微生物群集解析結果

	Identities (%)	No. of clones	Ratio of clones
<b>サンプルA</b>			
<i>Bacillus coagulans</i>	99.6	76	82.6
<i>Lactobacillus sakei</i>	99.4	15	16.3
unknown	-	1	1.1
<b>サンプルB</b>			
<i>Bacillus coagulans</i>	99.3	72	78.3
<i>Bacillus circulans</i>	99.4	9	9.8
<i>Lactobacillus sakei</i>	98.6	5	5.4
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	99.7	2	2.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.2	2	2.2
<i>Bacillus</i> sp.	96.8	1	1.1
<i>Leuconostoc gelidum</i>	97.3	1	1.1

また、*B. coagulans* の優占化は、生ごみ中には *B. coagulans* も含めて雑多な菌群が存在するものの、高温培養条件により選別されたと考えられる。

*B. coagulans* 以外に両サンプルから検出された菌として、*Lactobacillus sakei* がある。*L. sakei* は、*Lactobacillus* 属に属することから乳酸菌に分類されるが、低温性の D-, L-乳酸菌である (Kandler and Weiss, 1986)。この菌種は、比較的大きな割合で検出されたものの、低温性という性質から高温発酵過程における乳酸生成にあまり関与していないと考えられる。

サンプル A に関しては、以上の菌で大勢であると判断できるが、一方、生ごみのみから開始したサンプル B ではさらに多岐にわたる検出があった。*B. coagulans* に次ぐ確率で検出された *Bacillus circulans* は 40°C 程度までを至適生存環境とする中温菌である (Sneath, 1986)。したがって、高温培養における同菌種の活性は明確ではない。しかし、*B. circulans* に関しては、加水分解に対する貢献は大きいものの酸生成に関する貢献は小さいという報告 (Coulin *et al.*, 2006) や野菜類の腐敗に関与するといった報告 (Priest, 1989) から、L-乳酸の光学純度維持に対して悪影響となる活動は行わないと考えられる。その他、わずかに検出された菌群については、*Bacillus thermoamylovorans* は高温 L-乳酸菌であった (Combet-Blanc *et al.*, 1995)。*Leuconostoc mesenteroides* に代表される *Leuconostoc* 属は、30°C 付近までを生存域とする中温菌であった (Holt *et al.*, 1994, Shaw and Harding, 1989)。*Leuconostoc* 属は D-乳酸と酢酸を生成するヘテロ乳酸菌として知られているが、*L. sakei* と同様に、D-乳酸の生成状況から高温発酵過程における乳酸生成には関与していないと考えられる。

*L. sakei* や *Leuconostoc* 属など低温から中温菌が検出された件について、これらの菌群はその性質から積極的に発酵槽内で生育するとは考え難い。しかし、ある程度の割合 (サンプル A ; 15/92 clone、サンプル B ; 8/92 clone) で検出されたことからその由来を検討すると、これらの菌群は生ごみを保管していた冷蔵中に増殖した菌群と推察される。実際、生ごみ中には平均 0.2% 程度の乳酸が存在し、かつ、その光学純度 (平均 34%) は低いものであった。この結果は、D-乳酸を生成するこれら菌群の生息を裏付けるものと考えられる。しかし、高温発酵に供された以降は D-乳酸の生成がほとんど起こっていないことから、発酵温度によりこれら D-乳酸生成菌の影響も排除できたと考えられる。

一方、サンプル A と B の検出された菌群の多様性に関しては、3.2.1 の予測に反して有機酸発酵槽の発酵液の植種を伴わないサンプル B が多様性に富む結果となった。ただし、模擬生ごみの冷蔵保管中に生長したと考えられる菌種の検出が検出種のほとんどを占めることから、高温発酵により生長した菌種に関しては両者ともほぼ同様であったと考えられる。したがって、Run 3 と Run 1-3 の間の光学純度や乳酸収率の差異の原因に対して、微生物群集解析の結果からは説明を加えることができない。そこで、両者の差異の原因は、Run 3 と Run 1-3 が同時期でないことによる模擬生ごみの性状のわずかな差、出現した *B. coagulans* の株間の差、操作可能精度を超える培養温度や pH の運転条件の差など不確定な原因によるものと考えられる。

以上をまとめると、検出された菌群とその性質は、高温発酵槽において L-乳酸が優制的に生成された事実を説明するものであった。また、本研究における L-乳酸菌は *B. coagulans* であると判断された。しかし、発酵槽内は *B. coagulans* 以外の菌群も検出され、したがって、培養条件のわずかな変化が L-乳酸発酵に悪影響を及ぼす可能性も指摘される。常に基質と一緒に様々な菌群が供給されることを考慮すると、検出された菌群に関しては培養温度による選別が行えたことから、

L-乳酸発酵を実施する場合は少なくとも高温条件（55℃）を維持することが重要であると考えられる。

### 3.3 高温 L-乳酸発酵に関する利点の整理と補足事項

#### 3.3.1 多糖の加水分解

高温 L-乳酸発酵の L-乳酸菌とされる *B. coagulans* は、 $\alpha$ -アミラーゼを誘導できる (Babu and Satyanarayana, 1993)。そのため、3.1.2 あるいは 3.2.1 の実験において、模擬生ごみ中の多糖に対して加水分解を加えなくても L-乳酸発酵が実施できたと考えられる。多糖を加水分解できる性質を有する乳酸菌は、*Lactobacillus amylovorus* (D-, L-乳酸菌)、*Lactobacillus amylophilus* (L-乳酸菌) や *Streptococcus bovis* (L-乳酸菌) など少数の菌種に限られ、これらの菌種は多糖の加水分解の工程を省略できる、つまり製造コストを削減できる乳酸発酵法に利用できるとして研究事例が報告されている (表 2-10 参照)。したがって、多糖の加水分解能を有する高温 L-乳酸発酵は、同様の利点を有する L-乳酸発酵法と指摘される。

表 2-10 多糖の加水分解を乳酸菌に担わせる乳酸発酵の研究事例

	Ghofar <i>et al.</i> (2005)	Narita <i>et al.</i> (2004)	Xiaodong <i>et al.</i> (1997)	Cheng <i>et al.</i> (1991)
菌種	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
糖質	L-乳酸菌 fresh cassava root tapioca	L-乳酸菌 raw corn starch	D-, L-乳酸菌 starch (raw corn, rice, wheat, cassava, potato)	D-, L-乳酸菌 enzyme-thinned starch
培養条件	300 mL-Reactor batch 37°C pH 5.5±0.5	1 L-Reactor batch 37°C pH 6.0	500 mL-Reactor batch 40°C pH 5.5±0.5	1.2 L-Reactor batch 45°C pH 6.0
最大乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.26 ~ 1.06	約0.6	約0.1 ~ 1.1	7.36
乳酸収率 (-)	0.60 ~ 0.88 <sup>b</sup>	0.88 <sup>a</sup> (0.74 <sup>b</sup> )	0.38 ~ 0.92 <sup>b</sup>	0.94 <sup>b</sup>
備考	基質中の糖質濃度は 10%が最も効率的。 それより多くなると基 質阻害(速度および収 率)が発生。	光学純度95.6%	cassavaとpotatoの starchはpeptoneの添 加で収率向上。	基質中の糖質濃度は 15%が最も効率的。 それより多くなると基 質阻害(収率)が発 生。

a: 消費糖量基準の計算

b: 基質中の糖量基準の計算

#### 3.3.2 *Bacillus coagulans* を用いた L-乳酸発酵

*B. coagulans* を用いた乳酸発酵事例を表 2-11 にまとめる。なお、*B. coagulans* による乳酸発酵事例は、乳酸発酵全体から見ればごく僅かであった。表 2-11 によると、*B. coagulans* は温度 45~55℃で pH 6.5 付近の条件で培養されている。培養条件を網羅的に検討した Payot *et al.* (1999) によると、*B. coagulans* の増殖至適範囲は 52℃で pH 6.5 とされている。また、*B. coagulans* の乳酸発酵性に関しては、消費糖質量を基準とする乳酸収率が 0.9 以上となることからホモ乳酸発酵であることが分かる。ところで、既存の乳酸発酵事例の中で、*B. coagulans* の特徴である多糖を加水分解できる性質を利用した事例は無く、高温環境によるその他の菌種の排除効果を期待

した非滅菌環境でのL-乳酸発酵を実践した例も Sakai and Ezaki (2006)程度であり、また、光学純度が測定されない例も多い。そこで、結果的に多糖の加水分解能を利用し、非滅菌環境下でその特徴を生かせる半連続式培養を実践し、安定して高い光学純度を維持した Run 1 あるいは Run 3 の実験結果は新規性に富むものと考えられる。

表 2-11 *B. coagulans* を用いた乳酸発酵研究事例

	Sakai and Ezaki (2006)	Rosenberg <i>et al.</i> (2005)	Payot <i>et al.</i> (1999)	Heriban <i>et al.</i> (1993)	中山 (1983)
糖質	大学カフェテリアの生ごみ糖化处理済み (glucoamylase)	glucose	molasses (sucrose)	sucrose	glucose
培養条件	2 L-Reactor batch 50°C pH 6.5	2.6 L-Reactor semi-continuous batch 50°C pH 6.5	1 L-Reactor batch 52°C pH 6.5	2 L-Reactor batch 55°C pH 6.5	250 L-Reactor continuous 45°C pH -
滅菌の有無	非滅菌	-	-	-	-
乳酸濃度 (g/L)	86	78	55	65	89
光学純度 (%)	97	-	-	-	94
最大乳酸生成速度 (g/L/hr)	1.4	7.4 (Semi-con.) 3.1 (batch)	約2.6	約5.0	-
乳酸収率 (-)	0.98 <sup>a</sup> (0.72 <sup>b</sup> )	0.97 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.89 <sup>b</sup>
備考	pH値を間欠調整した実験による温度影響検討も実施。	包括固定化担体に <i>B. coagulans</i> を担持させる。	窒素源、温度、pHなどを網羅的に評価。	-	包括固定化担体に <i>B. coagulans</i> を担持させる。pHは培地に含まれる5%CaCO <sub>3</sub> により維持される。

a: 消費糖量基準の計算

b: 基質中の糖量基準の計算

### 3.3.3 非滅菌環境下における有価物の発酵

高温L-乳酸発酵は、非滅菌環境下において付加価値の高いL-乳酸を選択的に生成することができた。一般的に、非滅菌環境下の培養により特定目的物を高純度で生成することは困難であると考えられるが、そのような条件における有価物の生成事例を表2-12にまとめて示す。これによると、包括固定化担体による目的菌種の担持と食品保存料による目的菌種以外の殺菌、あるいは低pH化による目的菌種の選別などを採用していることが分かる。表2-12の各事例が検討されている理由は、滅菌を必要としないことが運営コストに対して利点をもたらすためであり、高温L-乳酸発酵も培養温度とpH条件により *B. coagulans* の優占化を図れ、非滅菌環境下で実施できることから運営コスト上大きな利点を有する発酵法と指摘される。

### 3.3.4 高温L-乳酸発酵における補足事項

#### 1) pH 7での培養 -Run 4-

3.2までの実験では、pHに関する検討は5および6のみであった。その結果、高温L-乳酸発酵

表 2-12 非滅菌環境下での有価物発酵事例

	Taniguchi et al. (2005)	Sakai et al. (2000)	Pranamuda et al. (1994)	Ohta et al. (1994)	Lee et al. (1993)	Borzani (1986)
生成物	L-乳酸	乳酸	エタノール	エタノール L-乳酸	エタノール	エタノール
目的菌種 など	低pH(4.5)化による選別。 pHの間欠設定と低pH(5.5 以下78%)時間の確保。	糖化 amylose, cellulase 共生する他の細菌群	糖化 <i>Aspergillus niger</i> L-乳酸発酵 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	糖化 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L-乳酸発酵 <i>Streptococcus lactis</i>	糖化 <i>Aspergillus awamori</i> <i>Rhizopus japonicus</i> エタノール発酵 <i>Zymomonas mobilis</i>	半連続式培養における定期的な殺菌(Penicillin V, 0.3 mg/L)。
基質	defatted rice bran starchとdextrin celluloseとchemicellulose	糖化 <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> 模擬生ごみ ※実験では2倍希釈	raw sago starch	glucose	raw rice starch	reducing sugar
培養条件	1L-Reactor batch 37°C pH 4.5	batch 37°C pH4-7(間欠7調整)	500mL-Reactor fed-batch 30°C pH3.5 controled aeration	3L-Reactor continuous, batch	500 mL-Reactor fed-batch, batch 30°C pH 4.8	semi-continuous 30°C pH 4.5
備考	窒素源を defatted rice bran とすると、意図した乳酸菌の増殖が鈍化し、雑菌の繁殖を招いている。この環境で対応できたものが、 <i>rhammosus</i> であった。初期植種量を増加させることにより光学純度90%を達成した。	模擬生ごみ在中の常在菌を利用した非滅菌環境下の乳酸発酵。ただし、光学純度は34%。	糖化の困難な raw sago starch を <i>A. niger</i> の糖化酵素により糖化を行い、同時に <i>S. cerevisiae</i> によりエタノール発酵を行う。	糖化の困難な raw sago starch を <i>A. niger</i> の糖化酵素により糖化を行い、同時に <i>S. cerevisiae</i> によりエタノール発酵を行う。	糖化の困難な raw rice starch を <i>A. awamori</i> の糖化酵素により糖化を行い、同時に <i>Z. mobilis</i> の発酵を行う。	半連続式培養時において、原材料 (sugar-cane mollasses mash) 中に存在するグラム陽性菌(ある一定量以上)があると影響を発生させる。殺菌するタイミングを検討。

ではpH 5でも光学純度は保たれるものの乳酸収率の面からpH 6の条件が望ましいとされた。しかし、半連続式培養で長期間にわたる高温L-乳酸発酵を実施した場合、突発的な事故などにより一時的にpHが上昇することも想定できる。このような事態が生じた場合の影響を前もって考察しておくことは重要である。そこで、pHを7することの影響を半連続式培養により確認した (Run 4-1 と 4-2)。実験条件は表 2-2 に示したが、3.2.1 の実験条件からはpH条件 (pH 7) とHRT (10日と5日) の設定が異なる。Run 4-1 では、HRT 10日 (COD 負荷率 10.3 g-COD/L-Reactor/日)、引き続きRun 4-2ではHRT 5日 (COD 負荷率 20.6 g-COD/L-Reactor/日) でそれぞれ42日間および16日間培養を行った。なお、ここでの実験も、植種を伴わず模擬生ごみのみの状態から培養を開始した。植種を伴わない理由は、特定の優占種を与えないことであり、実験を行う条件 (pH 7) 下で出現する可能性のある菌種の影響をより明確化するためである。分析項目は、水質項目は3.2.1と同様であるが、新たに赤外線式ガス濃度測定装置 (島津製作所、CGT-7000) によるガス濃度分析 (メタンガスおよび二酸化炭素) を追加した。

乳酸濃度および光学純度の経日変化を図2-22に、生成した有機酸の経日変化を図2-23に示す。図2-22によると、発酵液中の乳酸は培養開始後20日過ぎまで概ね25 g/Lで存在したが、その後減少した。また、HRTの変更 (10日 → 5日) により、乳酸濃度の再上昇が確認された。一方、光学純度に関しては、培養開始後7日目に約90%程度まで高まったが、その後低下した。生成された有機酸について図2-23によると、発酵の初期において乳酸が生成されていたものの、培養開始後22日目においてn-酪酸が検出され、以後は乳酸濃度が減少し、n-酪酸が生成有機酸のうちの約70% (COD基準) を占める主な発酵物となった。また、3.2.1のpH 6の実験 (Run 3) と比べて、ギ酸や酢酸が高い濃度で検出された。なお、HRTの変更により、乳酸の高まりとn-酪酸の減少が確認できた。ガス生成については、実験開始後26日目においてガス生成が確認され、以後、継続してガスが発生した。なお、生成されたガスの成分は、40~60% (vol/vol) が二酸化炭素であり、メタンは検出されなかった。

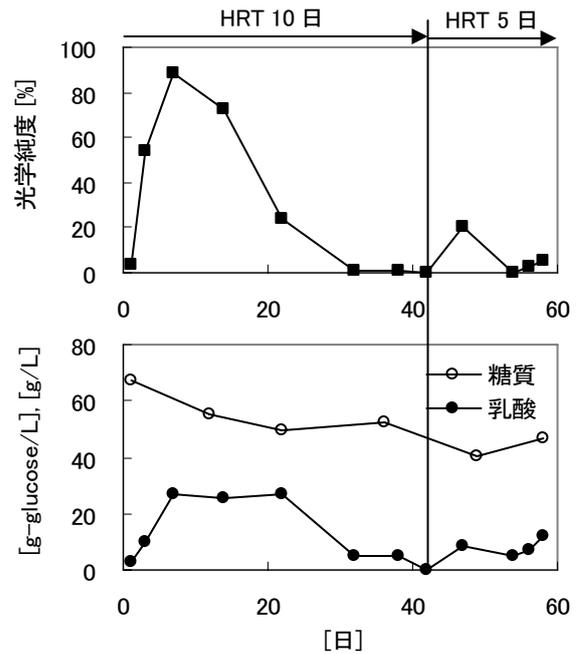


図 2-22 基質糖質濃度と高温培養 (Run 4, pH 7) による乳酸濃度および光学純度の推移

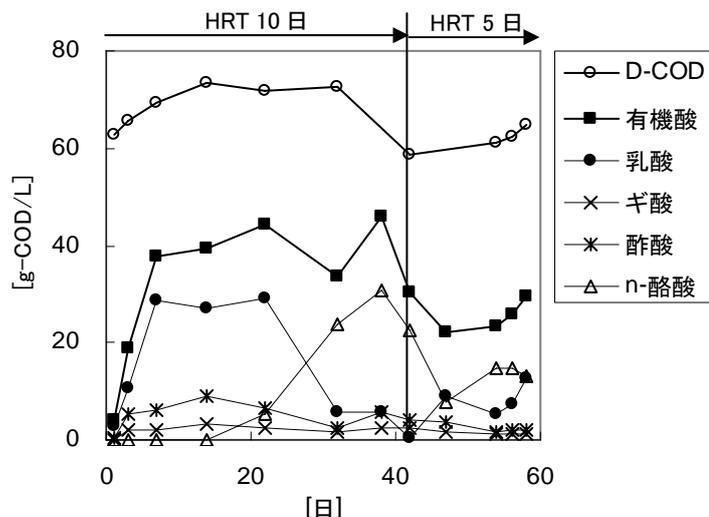


図 2-23 高温培養 (Run 4, pH 7) における有機酸濃度の推移

以上の結果から、pH 7 の条件でも、当初は L-乳酸菌が優占化したものと考えられる。これは、実験開始後 7 日目の光学純度から伺える。その後、20 日程度まで乳酸収率 50%程度で乳酸発酵は継続するものの、光学純度の低下から乳酸発酵を担う主たる菌種の遷移、もしくは乳酸資化を通じて乳酸のラセミ化を行える菌種の存在が考えられる。実験開始 20 日後から、乳酸の減少とともに *n*-酪酸の生成やガス生成が現れたが、これは *n*-酪酸や二酸化炭素を主に生成する *Clostridium* 属などの酪酸菌が生長してきたためと推測される。牧草を飼料用に発酵させるサイレージ発酵においても、発酵初期の乳酸発酵の停滞により pH 低下が十分でない場合、酪酸菌が出現するとされている（森地と大山，1982）。また、多くの乳酸菌が至適温度とする 37°C の条件下で 2 倍希釈の非滅菌模擬生ごみを回分式培養により発酵した事例（Sakai *et al.*, 2000）でも、pH 7 一定で 144 時間の培養により D-, L-乳酸が 32 g/L と優占して生成されるものの、酪酸 4.2 g/L と酢酸 3.5 g/L の生成、および *Clostridium* 属の生長を報告している。これら事例を併せて、55°C あるいは 37°C のいずれの培養温度においても pH を 7 付近に設定することで *Clostridium* 属の増加と酪酸生成がもたらされると考えられる。一方、HRT を短縮した 43 日目以降において乳酸濃度が上昇し *n*-酪酸が減少することから、培養温度 55°C で pH 7 の条件でも乳酸菌は酪酸菌より増殖速度が速いと考えられる。なお、乳酸の生成が先行し後に *n*-酪酸が生成する点、HRT の短縮により乳酸濃度が増加する点は中温発酵でも観察された乳酸と *n*-酪酸の関係に類似した結果であった。

以上をまとめると、高温 L-乳酸発酵の半連続式培養に対して培養 pH 値を 7 とする影響としては、乳酸の減少、光学純度の低下および *n*-酪酸や二酸化炭素の生成が挙げられる。しかし、このような状態に至るには、ある程度の培養時間を要することがこの実験で示された（例えば *n*-酪酸生成まで 20 日程度を要した）。その原因は、L-乳酸発酵を妨害する酪酸菌の所定条件における増殖速度が遅いためと考えられるが、このことは実際の半連続式培養を想定した場合に有利な情報である。実際の培養における pH 上昇の場合には L-乳酸菌が優占の環境からの遷移が予想され、その場合、酪酸菌の出現にはさらに多くの時間を要することが予想される。したがって、本章で行った半連続式培養における高温 L-乳酸発酵は、仮に pH が上昇しても数日（例えば、光学純度が維持された 7 日程度）の時間的な緩衝性は有するものと考えられる。なお、pH の低下に関しては、pH 5 程度であれば乳酸の収率は低下するものの光学純度は維持されることを既に述べた。

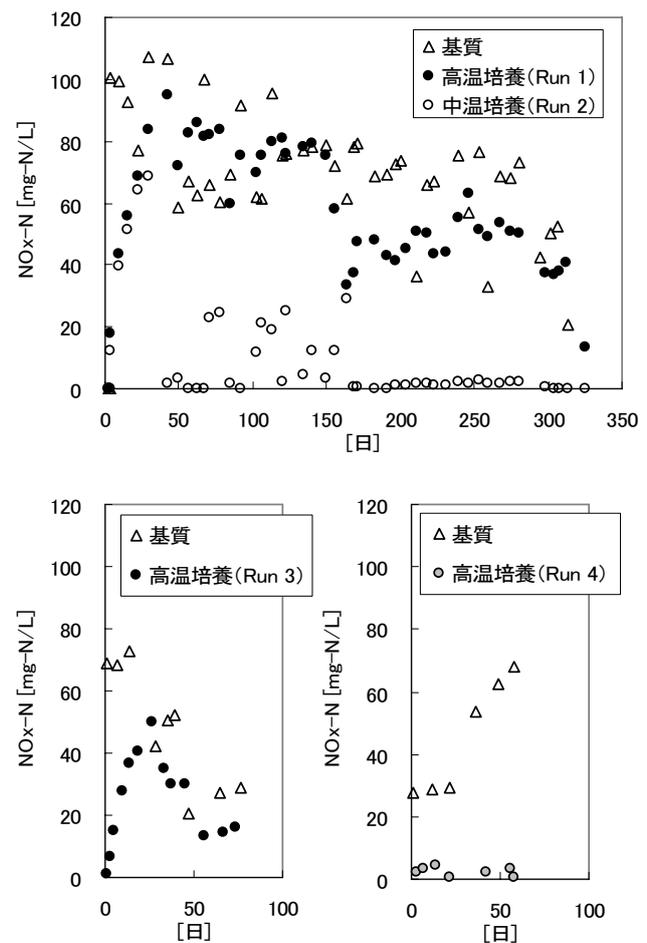


図 2-24 各培養条件 (Run 1~Run 4) における発酵液中の NO<sub>x</sub>-N の推移

## 2) NO<sub>x</sub>-N の残存

半連続式培養を行った高温培養 (Run 1-1 ~ Run 1-5, Run 3, Run 4-1 と Run 4-2) と中温培養 (Run 2-1 ~ Run 2-5) における発酵液中の NO<sub>x</sub>-N 濃度の経日変化を図 2-24 に示す。これによると、高温培養において L-乳酸発酵が進行した場合は NO<sub>x</sub>-N が残存することが分かる。無酸素条件下で実施しているにも拘らず NO<sub>x</sub>-N が残存することは、本研究の高温 L-乳酸菌を含む乳酸菌が硝酸呼吸を行わず、また、硝酸呼吸を行う菌群も活性を有しなかったためと考えられる。一方、有機酸発酵となった中温発酵や pH 7 の高温発酵では NO<sub>x</sub>-N は残存していない。したがって、NO<sub>x</sub>-N が残存する環境は、乳酸菌が優占化された環境を包括している可能性が高いと考えられる。NO<sub>x</sub>-N あるいはその代替となる ORP は電極により常時監視可能な水質項目であり、乳酸発酵の監視項目と成り得る可能性が指摘される。

## 第 4 節 結語

本章では、非滅菌条件において、2 倍希釈した模擬生ごみを基質に、半連続式培養により高温 L-乳酸発酵を実施した。一連の発酵実験において、培養条件である pH および HRT (COD 負荷率) の影響を評価した。中温培養も同時に実施し、培養温度に関する評価も行った。また、植種を伴わない生ごみ基質のみの立ち上げによる半連続式培養を実施し、L-乳酸菌の由来、高温 L-乳酸発酵の再現性に関して検討を加えた。さらに、16S rDNA を用いた微生物同定を行い、高温 L-乳酸発酵における L-乳酸菌および出現菌の同定を行った。以下に本章で得られた主な結果をまとめる。

- (1) 模擬生ごみを基質とし、半連続式培養のもと、高温 (55°C)、pH 5~6 および HRT 20~3 日 (COD 負荷率 5.2~34.4 g-COD/L-Reactor/日) の条件により、長期間にわたり安定して 90%以上の光学純度を有する L-乳酸が得られた。また、pH 6 条件下では、乳酸濃度と乳酸の収率がそれぞれ 32 g/L 以上と 0.58 以上 (生成乳酸量/基質糖質量 [-]) となること、光学純度 93%以上の L-乳酸が安定して得られること、および基質中にあらかじめ存在する乳酸を考慮 (排除) して求めた生成乳酸に対する光学純度では 96%以上の L-乳酸が得られることが示された。
- (2) 高温培養および pH 6 における L-乳酸発酵では、HRT が 10 日から 3 日へ減少するに従い、a) 光学純度が 92.8%から 94.5%へ向上し、b) 乳酸の収率が 0.73 から 0.58 へ減少し、c) 乳酸以外の有機酸に対する乳酸の選択性 (COD 基準) が 97.0%から 93.5%へ低下する傾向が見られた。これらは、HRT の減少が L-乳酸発酵へ直接影響をもたらす、①反応時間の減少、②洗い出し効果の増加から増殖速度の速い菌群の優占化、および③希釈率の増加から阻害要因である乳酸 (塩) 影響の減少などが関与して起こったと考えられる。
- (3) pH 6 の条件下で、特定の植種を伴わない生ごみのみからの半連続式高温 L-乳酸発酵の実施により、光学純度 95%以上、乳酸濃度 36 g/L 以上および乳酸収率 0.6 程度の L-乳酸が得られた。この実験により、本研究での L-乳酸菌は自然環境を含む生ごみ由来であることが示された。また、同培養により、半連続式の高温 L-乳酸発酵の再現性も併せて示された。一方、pH 7 の条件下で同様の立ち上げによる半連続式高温培養を実施したが、*n*-酪酸と二酸化炭素の生成を招いた。pH 7 の条件では、L-乳酸発酵を妨げる菌種が優占化されることが確認できた。
- (4) 16S rDNA を用いた微生物群集解析により、本研究での高温 L-乳酸菌が *Bacillus coagulans* であることが明らかとなった。なお、発酵槽には *B. coagulans* 以外にも *Lactobacillus sakei*

や *Bacillus circulans* などの菌種も検出されたが、低温から中温域を至適温度とするため L-乳酸発酵には悪影響を及ぼさなかったと推察された。

- (5) 高温培養と同条件の実験を中温条件でも実施したが、乳酸濃度、乳酸収率および光学純度とも各々 4~22 g/L、0.03~0.33 および 1.3~10.7% と極めて低調であった。ただし、光学純度を求めない乳酸発酵に限れば、有機物の高負荷培養により選択的に乳酸を生成できる可能性が示された。
- (6) 中温発酵では、安定した有機酸発酵が確認された。生成された有機酸濃度は、pH 5~6 および HRT 20~3 日 (COD 負荷率 5.2~34.4 g-COD/L-Reactor/日) 条件の範囲において 42~53 g-COD/L であり、同培養条件の高温発酵 20.2~43.6 g-COD/L を常に上回った。また、特に pH 5 の低 pH 条件において有機酸発酵性が顕著であった。この理由は、中温発酵の高い糖質の資化率と固形物の可溶化率にあると考えられる。上記の実験条件を通じて、中温発酵は溶解性糖質は 95% 以上、固形性糖質も 50% 前後の消費率であり、また、固形物の可溶化率も 28~47% であった。

#### <参考文献>

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3), 403-410.
- Anderson R.E., 1984, Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans*, *J. Food Sci.*, 49, 2, 647-649
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)*, 40-48, IWA Publishing, London.
- Babu, K.R., Satyanarayana, T., 1993 A, Parametric optimization of extracellular  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans*, *Folia Microbiol.* 38, 1, 77-80.
- Borzani, W., 1986. Control of contamination level in repeated batch ethanol fermentations of unsterilized molasses media. *Biotechnol. Lett.* 8, 3, 187-190.
- Cheng, P., Mueller, R.E., Jaeger, S., Bajpai, R., Iannotti, E.L., 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *J. Industrial Microbiol.* 7, 27-34.
- Cheon, J., 2006. Characterization and monitoring of microbial diversity in anaerobic bioreactor based on 16S rDNA. PhD thesis, Dep. of Urban and Env. Eng. Kyoto University, Kyoto, Japan.
- Combet-Blanc, Y., Ollivier, B., Streicher, C., Patel, B.K., Dwivedi, P.P., Pot, B., Prensier, G., Garcia, J.L., 1995. *Bacillus thermoamylovorus* sp. nov., a moderately thermophilic and amylolytic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1), 9-16.
- Coulin, P., Farah, Z., Assanvo, J., Spillmann, H., Puhan, Z., 2006. Characterisation of the microflora of attieke, a fermented cassava product, during traditional small-scale

- preparation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 131-136.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., 2001. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* 2<sup>nd</sup>. 127-138, Washington D.C., Amer Society for Microbiology.
- Ghofar, A., Ogawa, S., Kokugan, T., 2005. Production of L-lactic acid from fresh cassava roots slurried with tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. *J. Bioscience and Bioeng.* 100, 6, 606-612.
- Heriban, V., Sturdik, E., Zalibera, L., Matus, P., 1993. Process and metabolic characteristics of *Bacillus coagulans* as a lactic acid producer. *Lett. Applied Microbiol.*, 16, 243-246.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A, Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology.* 527-558, Baltimore, Williams and Wilkins.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. Holt J.G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2* (pp. 1208-1234). Baltimore, Williams & Wilkins.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* 115-175, Chichester, New York, Wiley.
- Lee, S., Ebata, T., Liu, Y, Tanaka, H., 1993. Co-immobilization of three strains of microorganisms and its application in ethanol production from raw starch under unsterile condition. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 1, 36-42.
- Litchfield, J.H., 1996. Microbiological production of lactic acid. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 45-95.
- Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J., Woese, C.R., 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25 (1), 109-111.
- Narita, J., Nakahara, S., Fukuda, H., Kondo, A., 2004. Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 6, 423-425.
- Ohta, T., Ogbonna, J.C., Tanaka, H., Yajima, M., 1994. Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. 2. Ethanol and L-lactic acid production without heat and filter sterilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 246-250.
- Park, Y., 2005. Effect of design and operational parameters on performance of thermophilic two-phase anaerobic digestion. PhD thesis, Dep. of Env. Eng. Kyoto University, Kyoto, Japan.
- Payot, T., Chemaly, Z., Fick, M., 1999. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 191-199.
- Pranamuda, H., Lee, S., Ozawa, T., Tanaka, H., 1994. Ethanol production from raw sago starch under unsterile condition. *starch/starke.* 46, 277-280.
- Priest, F.G., 1989. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. *Bacillus*, Harwood, C.R. ed. 27-56, Plenum Press, New York and London.

- Rosenberg, M., Rebros, M., Kristofikova, L., Malatova, K., 2005. High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats. *Biotechnol. Lett.*, 27, 23-24, 1943-1947.
- Sakai K., Murata Y., Yamazumi H., Tau Y., Mori M., Moriguchi M., Shirai Y., 2000. Selective proliferation of lactic acid bacteria and accumulation of lactic acid during open fermentation of kitchen refuse with intermittent pH adjustment. *Food. Sci. Technol. Res.* 6, 2, 140-145.
- Sakai, K., Taniguchi, M., Miura, S., Ohara, H., Matsumoto, T., Shirai, Y., 2004. Making plastics from garbage; A novel process for poly- L-lactate production from municipal food waste. *J. Industrial Ecology.* 7 (3-4), 63-74.
- Sakai, K., Ezaki, Y., 2006. Open L-Lactic acid fermentation of food refuse using thermophilic *Bacillus coagulans* and fluorescence in situ hybridization analysis of microflora. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 6, 457-463.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Sytsubo, K., Ohashi, A., Harada, H., Nakamura, K., 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 144, 2655-2665.
- Shaw, B. G. and Harding C. D., 1989. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (3), 217-223.
- Sneath, P. H. A., 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. Holt J. G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2*, 1104-1200. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Taniguchi, M., Hoshina, M., Tanabe, S., Higuchi, Y., Sakai, K., Ohtsubo, S., Hoshino, K., Tanaka, T., 2005. Production of L-lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation using unsterilized defatted rice bran as a carbon source and nutrient components. *Food. Sci. Technol. Res.* 11, 4, 400-406.
- Xiaodong, W., Xuan, G., Rakshit, S. K., 1997. Direct fermentation production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotechnol. Lett.* 19, 9, 841-843.
- Yin, P. M., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Park, Y. S., Okabe, M., 1997. Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 3, 249-253.
- 小原仁美, 2000. 生分解性ケミカルとプラスチックの開発, 富田耕右 監修. 91-99, シーエムシー出版.
- 高藤慎一, 2001. プロピオン酸発酵, 発酵ハンドブック, (財)バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会編. 361-362, 共立出版.
- 岡部聡, 2005. 微生物群集構造解析技術の現状と今後の展開・課題. *水環境学会誌.* 28, 8, 2-7.
- 金子勉, 森田英利, 阿部敬悦, 内田金治, 山本直之, 森下隆, 1996. 乳酸菌の栄養・代謝, 乳酸菌の科学と技術, 乳酸菌研究集談会 編. 89-132, 学会出版センター.
- 洪鋒, 津野洋, 日高平, 千智勲, 2004. 1日1回給餌操作での生ごみの高温メタン発酵特性に関する研究. *廃棄物学会論文誌.* 15, 5, 381-388.

- 白井義人, 2005. 都市のゼロエミッションによる生ゴミからポリ乳酸の生産. 生物工学会誌. 83, 5, 238-241.
- 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, 116-119.
- 中山大樹, 1983. 有孢子細菌による右旋性乳酸の製造方法. 特開昭 58-40093.
- 森地敏樹, 大山嘉信, 1982. サイレージにおける微生物の動態. 土と微生物, 24, 7-15.
- 吉野貞蔵, 石崎文彬, 2001. アセトン。ブタノール発酵(含む酪酸発酵), 発酵ハンドブック, (財)バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会編. 361-362, 共立出版.

## 第3章 回分式培養による生ごみ高温 L-乳酸発酵の運転条件に関する検討

### 第1節 概説

第2章において、非滅菌の模擬生ごみを原料に、培養温度および pH 条件を各々 55℃ および 5～6 に設定することで、半連続式培養により光学純度 90% 以上の L-乳酸が生成できることを示した。また、半連続式培養では重要な運転操作因子である HRT (COD 負荷率) に関する考察を行った。本章では、高温 L-乳酸発酵の運転可能な条件範囲を探求する目的で、培養温度および pH に関する検討を行うこととする。ここでは、複数系列用意した回分式培養による実験を行い、目的の評価を試みる。なお、回分式と半連続式培養との間には、以下のような異なる点が存在する。

- a) 回分式は洗い出し効果がないため、増殖速度の点で全ての菌種に増殖の機会がある。
- b) 回分式は、その植種量、植種方法にもよるが、一般的に実験開始時に発酵生成物 (例えば、エタノール、乳酸など) が系内に少ない。このため、生成物により阻害を受けると考える菌種にも増殖の機会がある。

これらの点は、いずれも L-乳酸発酵を妨害する意図しない菌種の増殖が回分式培養に出現する可能性の高いことを示している。つまり、回分式培養では、半連続式培養の特徴である菌種の集積や優占化が現れにくく、妨害菌種に関する潜在的に起こり得る発酵法固有の問題を浮き上がらせる効果があると考えられる。なお、回分式培養では、定常的な状態を評価した半連続式培養と異なり、1 回 1 回の培養によりその評価を下すこととなる。そこで、各試験において極力初期条件を揃える必要が生じる。初期条件は、上記検討課題以外に基質や植種条件を含むが、基質や植種材料が均質と仮定すると、培養温度および pH に加えて植種量に関する実験条件が回分式培養の検討課題となる。植種材料に関しては、前章において特定の植種材料を利用せず、模擬生ごみのみを発酵に供することで L-乳酸発酵が行えることを示した (Run 3)。そこで、本章では植種量の条件として、①発酵の初期において意図する L-乳酸菌が極力少ない環境からの L-乳酸発酵 (模擬生ごみのみの発酵) と②半連続式培養に近い植種量条件からの L-乳酸発酵との 2 点の検討を行う。以上の実験的検討を通じて、高温 L-乳酸発酵の培養温度および pH に関する培養条件範囲および効率的な培養条件の提示を試みる。

### 第2節 実験方法

#### 2.1 実験装置

実験装置は第2章と同様のものを用いた (図 2-1、写真 1 参照)。ただし、pH 計から出力される pH 値 (電流値) および中和剤供給ポンプの駆動履歴 (第4章参照) を記録する設備を新たに追加した。pH 値あるいは駆動履歴の記録はデータロガー (キーエンス、NR-1000) を用い、データのサンプリングは 1 秒ごとに行った。

培養実験を実施する際は、その都度反応器をオートクレーブ (121℃、20 分) により滅菌した。また、培養実験をセットした際は、反応器内を嫌気状態に保つため反応器のヘッドスペース部を窒素ガスにて置換した。さらに、2 つのガスパック (発生ガスの捕集用と窒素ガスを充填した発酵液引抜き時の容積補充用) を反応器に取り付けた。

#### 2.2 基質

基質である模擬生ごみは、第2章と同様の組成のものを使用した (表 2-1 参照)。培養実験に際

しては、第2章と同様に作成した模擬生ごみを蒸留水で2倍希釈した生ごみ培地を、滅菌操作を行わずに利用した。実験に使用した模擬生ごみの性状を表3-1に示す。なお、この模擬生ごみは、実験に必要な分量ずつ個別冷凍し、各回分式培養を実施する際は、それぞれを前々日より冷蔵庫で解凍し実験に供した。これは、各回分式実験間における模擬生ごみの状態を均質化する目的で行った。

本章では、植種を伴わない高温L-乳酸発酵の再現性を、模擬生ごみ以外の市販弁当（写真2）を基質とする回分式培養でも確認した。この実験では、賞味期限が切れた市販弁当を家庭用ミキサー（松下電器産業、MK-K78）で破碎し、蒸留水で2倍希釈し発酵用の培地とした。市販弁当培地の性状を表3-2に示す。生ごみ培地との比較では、CODを基準とした場合、TS、SS、糖質の割合が大きい一方、T-Nやタンパク質の割合が少ない傾向が見られた。また、破碎時に使用したミキサーの違いにも拠ると考えられるが、市販弁当培地は糖質を基準に評価すると固形性割合が高い培地であった。

### 2.3 植種材料

植種を行う回分式実験では、半連続式培養を模擬することを前提に、植種材料としてL-乳酸発酵液を利用した。発酵液は、生ごみ培地を55℃、pH 5.5の条件で長期間培養し作成した。各回分式実験における植種材料の培養条件およびその性状を表3-3に記す。いずれの植種材料も、実質100時間以上の培養を行ったものであり、乳酸濃度18g/L以上およびL-乳酸の光学純度99%以上の状態から判断されたとおり、L-乳酸菌が優占化した発酵液である。なお、表3-3では各試験の植種材料をそれぞれ2系列示しているが、実験に際しては等量ずつを混ぜ合わせて使用した。

表 3-1 模擬生ごみの性状

	Total	Soluble
TS (g/L)	189±7	-
SS (g/L)	80±4	-
VTS (%)	96.3±0.2	-
COD-cr (g/L)	213±21	115±15
T-N (g/L)	3.8±0.3	1.0±0.2
T-P (g/L)	0.42±0.01	0.34±0.03
糖質 (g-glucose/L)	120±13	98±9
タンパク質 (g-albumin/L)	23.1±2.7	4.0±0.6
有機酸 (g-COD/L)	-	1.3±0.3
乳酸 (g-COD/L)	-	0.6±0.3
pH (-)	5.2±0.2	-

各回分式培養の平均値±σ (n=15、ただしT-P;n=3)



写真2 L-乳酸発酵に使用した市販弁当

表 3-2 L-乳酸発酵に使用した市販弁当の性状

	Total	Soluble
TS (g/L)	495	-
SS (g/L)	337	-
VTS (%)	97.1	-
COD-cr (g/L)	380	204
T-N (g/L)	5.9	1.1
糖質 (g-glucose/L)	265	161
タンパク質 (g-albumin/L)	37.7	4.2
有機酸 (g-COD/L)	-	3.6
乳酸 (g-COD/L)	-	0.2
pH (-)	5.7	-

表 3-3 回分式培養に用いた植種材料の培養条件およびその性状

	TEST 5		TEST 6		TEST 7	
	Seed 1	Seed 2	Seed 1	Seed 2	Seed 1	Seed 2
培養温度 (°C)	55	55	55	55	55	55
pH (-)	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
培養時間 (hr)	95 <sup>1)</sup>	95 <sup>1)</sup>	234	234	161	161
乳酸濃度 (g/L)	22.5	27.1	32.3	31.6	28.9	17.6
光学純度 (%)	99.0	99.4	99.4	99.1	99.6	99.7
糖質濃度 (g-glucose/L)	37.1	32.5	23.4	28.3	27.9	40.0

1) この培養も植種材料(231hr)を用いている(湿重量比 種汚泥:基質=4:6)。

## 2.4 実験条件

本章では、7回（TEST 1～7）の回分式実験を実施した。各回分式実験の実験条件を表 3-4 にまとめて示す。TEST 1 および TEST 2 では、植種を伴わない場合の回分式培養による温度と pH の影響を検討した。それぞれ、TEST 1 では培養温度一定（55℃）による pH（5.5、6.0 および 6.5）の影響を、TEST 2 では pH 一定（pH 5.5）による培養温度（45、50 および 55℃）の影響を検討した。なお、TEST 2 の pH 条件は、TEST 1 の結果を反映して L-乳酸発酵に至った条件を採用した。TEST 3 では、模擬生ごみ以外からの高温 L-乳酸発酵性を確認するため、植種を伴わない条件で市販弁当からの高温 L-乳酸発酵を試みた。培養条件は TEST 1 および TEST 2 の結果を反映して、55℃で pH 5.5 とした。TEST 4 では、高温 L-乳酸発酵条件の拡大を目的として 55℃より高温側の培養温度による L-乳酸発酵性を検討した。ここでも各条件における優占種を明確とするため、植種を伴わない回分式培養を行った。TEST 5～TEST 7 では、植種を伴う回分式培養により、温度および pH に関する培養条件の検討を行った。用いた植種量 400 g/L は、1日1回の発酵液引抜きおよび基質投入を行う HRT 2 日の半連続式培養を行った場合の引継ぎ発酵液量 500 g/L に迫る量、つまり半連続式培養を模擬する量として決定した。

## 2.5 分析項目

### 2.5.1 水質分析および微生物群集解析

水質分析項目は表 2-3 の項目にエタノールを追加した。エタノールは酵素法分析（F-キット、176290、J.K. インターナショナル；[http://www.jki.co.jp/product/f\\_kit/f-kit\\_index1.htm](http://www.jki.co.jp/product/f_kit/f-kit_index1.htm)）を用いた。乳酸の収率および L-乳酸の光学純度の算出方法は第 2 章に記した通りである。ガス分析に関しては、赤外線式ガス濃度測定装置（島津製作所、CGT-7000、メタンガスおよび二酸化炭素の濃度）に加え、ガスクロマトグラフィー（島津製作所、GC-14B）による水素の濃度分析を追加した。GC の測定条件を表 3-5 に示す。

微生物群集解析は、第 2 章 第 2 節と同様の 16S rDNA クローンライブラリーを作成する手法により、サンプル中に存在する微生物群集解析を行った。

表 3-4 回分式培養の実験条件

	1	2	3	4
<b>TEST 1</b>				
培養温度 (°C)	55	55	55	-
pH (-)	5.5	6.0	6.5	-
培養時間 (hr)	307	307	307	-
<b>TEST 2</b>				
培養温度 (°C)	45	50	55	-
pH (-) <sup>a</sup>	5.5	5.5	5.5	-
培養時間 (hr)	305	305	305	-
<b>TEST 3<sup>b</sup></b>				
培養温度 (°C)	55	-	-	-
pH (-) <sup>c</sup>	4~6	-	-	-
培養時間 (hr)	234	-	-	-
<b>TEST 4</b>				
培養温度 (°C)	55	60	65	60
pH (-)	5.5	5.5	5.5	6.0
培養時間 (hr)	303	303	303	303
<b>TEST 5</b>				
培養温度 (°C)	50	55	55	-
pH (-)	5.5	6.0	6.0	-
培養時間 (hr)	65 <sup>d</sup>	161	161	-
植種材料 (g)	400	400	400	-
<b>TEST 6</b>				
培養温度 (°C)	50	55	-	-
pH (-)	5.5	6.5	-	-
培養時間 (hr)	155	155	-	-
植種材料 (g)	400	400	-	-
<b>TEST 7</b>				
培養温度 (°C)	45	50	50	50
pH (-)	5.5	5.5	6.0	6.5
培養時間 (hr)	162	162	162	162
植種材料 (g)	400	400	400	400

a; TEST 1により決定。

b; 市販弁当を基質に使用。

c; サンプルング時にpHを6に調整。

d; 実験途中のトラブルにより標記時間で培養停止。

表 3-5 GC の分析条件（水素）

カラム	Shincarbon T, 40°C
検出器	TCD, 200°C, 60mA
キャリアーガス	Ar, 50mL/min
試料量	0.5mL

### 2.5.2 L-乳酸生成可能量

L-乳酸生成可能量は、培養条件が有する潜在的な生ごみ培地からのL-乳酸生成能を評価するため定義し、第3節 3.2の培養条件間の評価に用いた。算出方法は、もともと生ごみ培地中にわずかに含まれる乳酸量は排除するものの、植種材料中に含まれる乳酸量は加味したL-乳酸生成量とした(図3-1参照)。これは、植種材料が生ごみ培地由来であることから、生ごみ培地を起源に評価することが適切であると考えたためである。

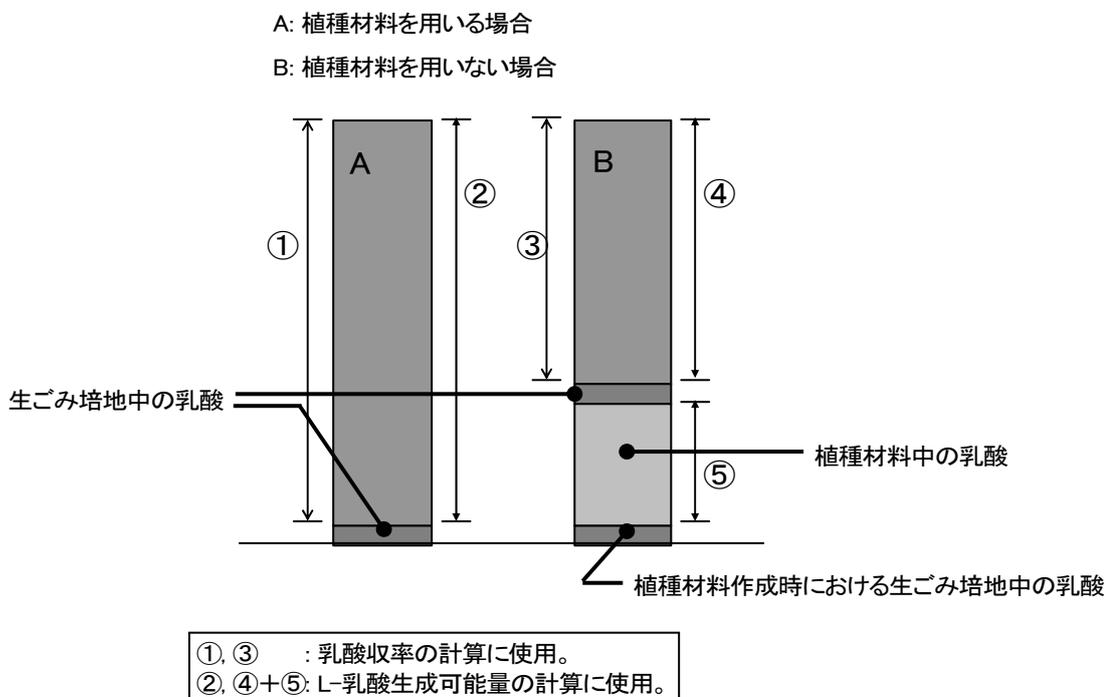


図 3-1 L-乳酸生成可能量と乳酸収率の算出方法概念図

### 2.5.3 平均乳酸生成速度

平均乳酸生成速度は、多糖の加水分解や乳酸生成など多段階と考えられる生ごみからの乳酸発酵過程を大きく時間にのみ依存する速度(0次反応)と捉えて算出したものである。算出方法は、各培養の終端において生成される乳酸量のうち、75%以上の生成を確認できるサンプリング時点までに要した時間とその時の生成乳酸量から求めた(図3-2参照)。本速度も、第3節 3.2の培養条件間の評価に用いた。

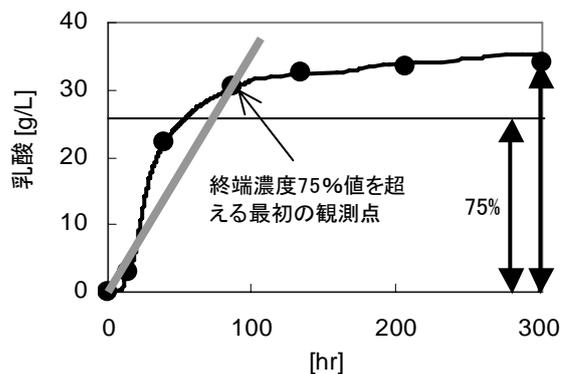


図 3-2 平均乳酸生成速度の算出方法概念図

### 2.5.4 重回帰分析

重回帰分析は、目的変数と説明変数が線形関係であることを仮定し、式(3-1)により目的変数の予測値を求めるものである(有馬と石村, 1987)。

$$Y_{\text{rate / product}} = a_0 + a_1 \cdot x_{\text{temp}} + a_2 \cdot x_{\text{pH}} \quad (3-1)$$

ただし、 $Y_{\text{rate} / \text{product}}$ ; 乳酸生成に関する目的変数の予測値、

$x_{\text{temp}}, x_{\text{pH}}$ ; 温度, pH に関する説明変数

$a_1, a_2$  および  $a_0$ ; 回帰係数および定数

第3節 3.2 では、L-乳酸生成可能量と平均乳酸生成速度を目的変数に、培養温度と pH を説明変数として重回帰分析を行った。なお、説明変数に関しては、実験操作幅を基準化することで、説明変数間の影響の大きさを評価できるものとした。温度は、55°C を 0 とし、+5°C 刻みを変量 1 とした。pH は、6.0 を 0 とし、+0.5 刻みを変量 1 とした。また、式(3-1)は、決定係数  $R^2$  (重回帰係数  $R$ ) 以外に、重回帰式の検定により説明変数により目的変数を説明することが可能であることを確認した。これは、回帰による変動と残差の変動の不偏分散の比 (分散比)  $F_0$  が自由度 ( $p, n-p-1$ ) の  $F$  分布に従うことを利用したものである。ただし、 $p$ ; 説明変数の数,  $n$ ; 解析に用いた実験回数である。危険率 0.05 の場合において、 $F_0 > F(p, n-p-1, 0.05)$  となる場合、求めた予測式は上記説明変数により目的変数を説明できると判断した。

### 第3節 実験結果および考察

#### 3.1 植種を伴わない場合の L-乳酸発酵条件

##### 3.1.1 概論

植種を伴わず、模擬生ごみのみの条件から回分式培養により、温度および pH に関する培養条件ごとの高温 L-乳酸発酵の実施可能性検討およびその範囲検討を行った。ここでは 2 回の回分式実験 (TEST 1 および TEST 2) を行い、TEST 1 では培養温度一定 (55°C) による pH (5.5、6.0 および 6.5) の影響を、TEST 2 では pH 一定 (pH 5.5) における培養温度 (45、50 および 55°C) の影響を検討した。なお、TEST 2 の pH 条件は、TEST 1 の結果を反映して L-乳酸発酵に至った条件を採用した。

##### 3.1.2 培養 pH の影響 —TEST 1—

TEST 1 において、培養温度一定 (55°C) の条件における pH の影響を検討した。結果を図 3-3 および表 3-6 に示す。表 3-6 中の平均乳酸生成速度は前節に算出方法を示した乳酸生成速度である。最大推定乳酸生成速度は、容積あたりの最大乳酸生成速度を求めたものであるが、第 4 章にて説明を行う。

図 3-3 よると、L-乳酸発酵が継続的に行えた条件は TEST 1-1 の条件である 55°C で pH 5.5 のみとなった。TEST 1-1 では、培養時間の増加とともに乳酸濃度が上昇し、307 時間経過後において乳酸濃度 29.5 g/L、乳酸の収率 0.49、および L-乳酸の光学純度 98.9% が得られた。一方、pH 条件が異なる TEST 1-2 (pH 6.0) および TEST 1-3 (pH 6.5) では、培養の継続により L-乳酸の光学純度が著しく低下した。TEST 1-2 では、培養開始後 67 時間

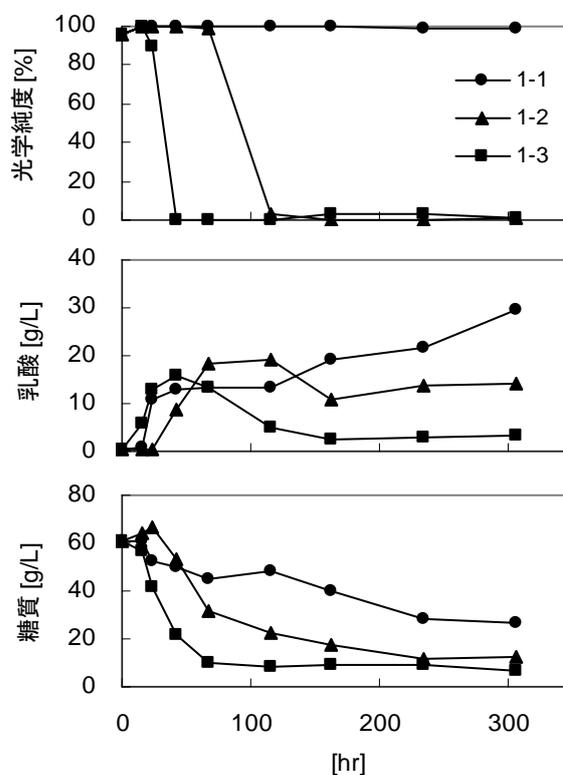


図 3-3 TEST 1 の培養結果

まで光学純度が維持されたものの、その後著しく低下し、ラセミ体の乳酸となった。なお、67 時間後においては乳酸濃度 18.3 g/L および光学純度 99.1% であった。乳酸濃度に関しても、115 時間後に 20.0 g/L まで上昇したものの、その後低下し、307 時間後に 14.1 g/L となった。TEST 1-3 では、培養開始後 16 時間まで光学純度が維持されたものの、24 時間後に 90.2% となり、その後著しく低下した。乳酸濃度に関しても、42 時間後に 15.8 g/L まで上昇したものの、その後低下し、307 時間後に 3 g/L 程度となった。以上の結果は、半連続式培養を行った第 2 章での培養条件 (55°C、pH 6.0) と pH 条件について異なるものであった。なお、この両者の差異に関する検討は次項 3.2 にて行う。

表 3-6 TEST 1 および TEST 2 の培養結果

	TEST 1			TEST 2		
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3
培養温度 (°C)	55	55	55	45	50	55
pH (-)	5.5	6.0	6.5	5.5	5.5	5.5
培養時間 (hr)	307	307	307	305	305	305
糖質濃度 (g-glucose/L)	初期濃度	60.7	60.7	60.1	60.1	60.1
	最終濃度	26.5	12.4	6.3	3.3	3.0
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2
	最終濃度	29.5	14.1	3.2	42.8	43.6
乳酸生成量 (g/L-Reactor/回)	29.2	13.8	2.9	42.6	43.4	34.7
収率 (%)	0.49	0.23	0.05	0.71	0.73	0.58
光学純度 (%)	98.9	0.8	1.0	1.6	7.3	99.5
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.10	0.27	0.37	0.58	0.28	0.13
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	3.54	-	-	-	-	-
L-乳酸発酵性	○	×	×	×	×	○

減少した乳酸に代わる生成物を確認するため、TEST 1 における有機酸およびエタノール生成の経時変化を図 3-4 に示す。L-乳酸発酵が行えなかった TEST 1-2 および TEST 1-3 についてそれらの生成状況を見ると、乳酸の減少に伴い、*n*-酪酸、エタノール、およびギ酸の生成が見られた。また、TEST 1-3 では、TEST 1-2 と比べてより早い時期から *n*-酪酸の生成が確認された。これらの系列では、ガス生成も確認された。TEST 1-2 では、ガス発生量は約 2,700 cc、その内二酸化炭素は約 52% vol/vol で、水素は約 36% vol/vol であり、メタンは検出されなかった。TEST 1-3 では、ガス発生量は約 2,400 cc、その内二酸化炭素は約 52% vol/vol で、水素は約 41% vol/vol であり、メタンは検出されなかった。なお、*n*-酪酸の生成、二酸化炭素および水素の発生は酪酸菌と呼ばれる *Clostridium* 属の特徴であり (Sneath, 1986、吉野と石崎, 2001)、したがって TEST 1-2 および TEST 1-3 では、酪酸菌の優占化が進んでいるものと推察される。また、サイレージ発酵では *Clostridium* 属の一部 (例えば *Clostridium*

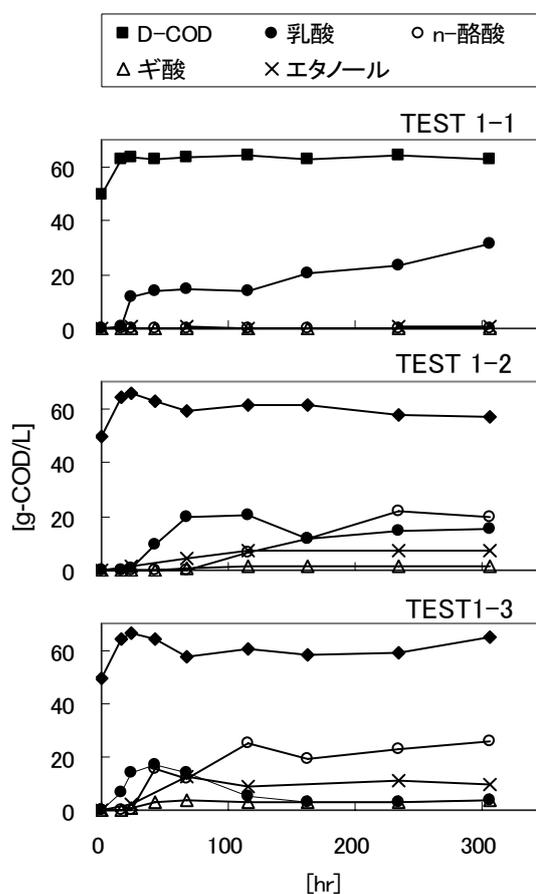


図 3-4 TEST 1 における有機酸およびエタノールの推移

*tyrobutyricum*など)が乳酸を資化できることも報告されており(森地と大山, 1982)、乳酸濃度の低下も酪酸菌によるものと推察される。ただし、いずれの条件でも、発酵の序盤ではL-乳酸の生成が起こっており、また、TEST 1-2 および TEST 1-3 において *n*-酪酸が検出される時期は、培養開始後それぞれ 115 hr (TEST 1-2) および 42 hr (TEST 1-3) のサンプリングである。これらのことから、本研究でのL-乳酸菌 (*Bacillus coagulans* と推定) は他の競合する菌群、例えば酪酸菌などと比べて、所定の条件下において先行して増殖できる速い増殖速度を有すると考えられる。

TEST 1 ではガス生成が起きたことから、表 3-7 に培養実験前後の炭素量の差異と発生ガス中に含まれる炭素量を比較した結果を示す。この検討では、培養前後の COD および TOC の差異に対して発生ガス中のそれらの割合は 25~39% および 20~30% と計算された。ガス生成以外に COD および TOC が減少することは考え難いため、計算された発生ガス中のそれらの割合は概ね低い値である。この原因は、

表 3-7 TEST 1 における生成ガス中の有機物量 (307 時間後まで)

	TEST 1-1	TEST 1-2	TEST 1-3
<b>COD</b>			
Δ COD (g-COD)	2.5	6.9	9.9
Δ COD/初期COD (%)	2.4	6.6	9.4
生成ガスのCOD (g-COD)	-	2.7	2.5
gas-COD/Δ COD (%)	-	39	25
<b>TOC</b>			
Δ TOC (g-C)	-0.3	2.5	3.4
Δ TOC/初期TOC (%)	1.0	7.4	10
生成ガスのTOC (g-C)	-	0.8	0.7
gas-TOC/Δ TOC (%)	-	30	20

反応器ヘッドスペース部や、サンプリング時に使用する反応器内の容積補充用ガスパック中の窒素ガスと一部置換したことも考えられる。いずれにしても、ガス生成を目的として作成した実験装置および実験条件でないため(例えば、培養量が 1L と少ないため)、生成ガス量そのものが少なく、ガス移行分まで考慮した結果の誤差が大きくなることは否めない。そこで、生成ガスの物質収支も考慮する場合は、培養量および発生ガス量を大きくする工夫が必要である。ただし、本研究で実施する高温 L-乳酸発酵では、TEST 1-1 の結果で確認できるとおり、有機物のガス化による減少はほぼ起こらない。これは、*B. coagulans* による高温 L-乳酸発酵がホモ乳酸発酵で進行し、二酸化炭素の生成が起こらないためである (Payot *et al.*, 1999)。したがって、高温 L-乳酸発酵を実施する場合は、発生ガスへの有機物の移行は考慮せずとも充分であると考えられる。

TEST 1 での pH 値の変化を図 3-5 に示す。これによると、L-乳酸発酵が行えた TEST 1-1 では、培養開始後 20 hr 前後および 120~180 hr の間に pH 指示値が上下に密に変動している様子が確認される。この pH 指示値の変動は、乳酸生成による pH の低下とそれに対応する中和剤添加を示しており、したがって、上下に密に変動する様子は、この時期に乳酸生成が活発に起こっていることを示していると考えられる。一方、L-乳酸発酵が行えなかった

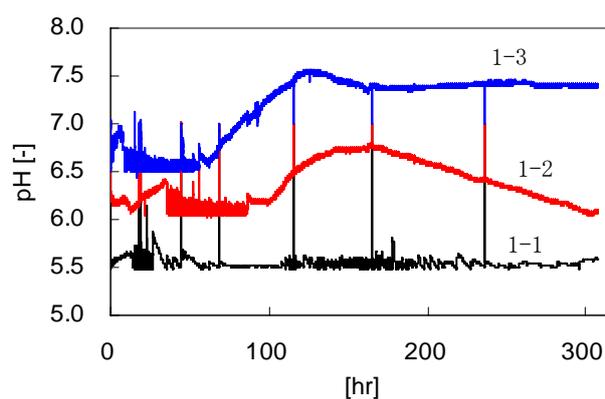


図 3-5 TEST 1 における pH の推移

TEST 1-2、TEST 1-3 についても培養初期において L-乳酸が生成されたが、培養初期において中和剤を消費し有機酸を生成している様子は図 3-5 から確認される。しかし、これら系列は、培養の中盤において pH の上昇が観察された。この pH の上昇は、上昇の履歴から突発的な事故(例えば中和剤の過剰投入)などによって引き起こされたものではなく、生成された乳酸の消費、アン

モニア性窒素の生成、脱窒によるアルカリ度の上昇など発酵の相遷移によりもたらされたものと考えられる。したがって、本研究の実験では pH 下限値制御を採用したため考慮されなかったが、pH 上限値設定を加えることで意図しない方向への発酵の相遷移を防ぐことも可能と考えられる。pH の上限設定値に関しては、TEST 1-2 の *n*-酪酸生成時期（115 時間）と pH 値の履歴より pH 6.5 では *n*-酪酸の生成が確認されることから、少なくとも pH 6.5 未満で上限値を設けること望ましいと考えられる。

第 2 章において、高温 L-乳酸発酵が起こった場合は NO<sub>x</sub>-N が保存されることを指摘した。そこで、TEST 1 における NO<sub>x</sub>-N の経時変化を図 3-6 に示す。併せて NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の変化も図 3-6 に示す。これによると、L-乳酸発酵が行えた TEST 1-1 では NO<sub>x</sub>-N が保存されるものの、TEST 1-2 および TEST 1-3 では培養開始後もなく NO<sub>x</sub>-N が消費されている様子が確認された。したがって、第 2 章の指摘と同様に、NO<sub>x</sub>-N の存在確認をもって乳酸発酵の間接的な確認が行える可能性の高いことが示された。

以上をまとめると、非滅菌の模擬生ごみを用いた本研究での高温 L-乳酸発酵では、pH 6 を超える条件において、潜在的に酪酸菌の出現とそれに伴う乳酸の減少、*n*-酪酸、エタノール、ギ酸の生成、ガス発生（H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>）、および NO<sub>x</sub>-N の消費の起こり得ることが示された。また、これらの発酵が起こった場合、更なる pH 値の上昇を招き、この潜在的な危険性を助長する傾向も確認された。ただし、これら意図しない発酵は、L-乳酸発酵に先行して起こることは無く、したがって、これら現象をもたらす酪酸菌は、所定の培養条件において本研究での L-乳酸菌より遅い増殖速度を有していると考えられる。これらは、半連続式培養による L-乳酸発酵を念頭においた場合、半連続操作による洗い出し効果から有利な情報と考えられる。

### 3.1.3 培養温度の影響 —TEST 2—

TEST 2 では、培養 pH 一定（5.5）の条件における培養温度の影響を 45、50 および 55℃にて検討

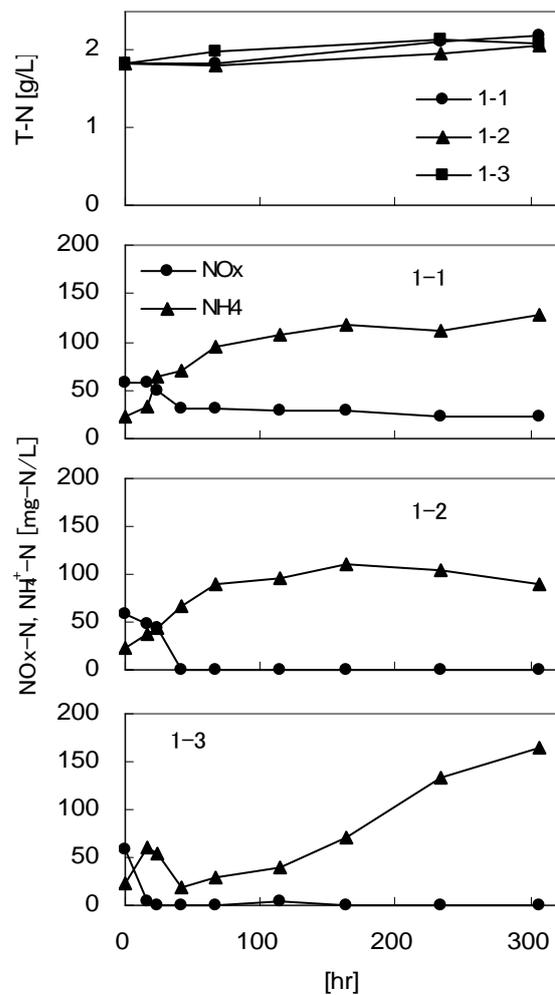


図 3-6 TEST 1 における NO<sub>x</sub>-N と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の推移

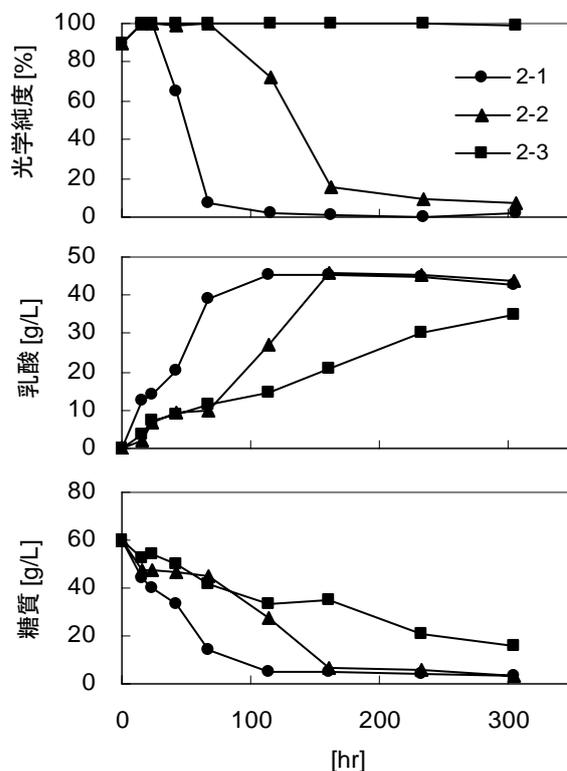


図 3-7 TEST 2 における培養結果

した。pH 条件は、TEST 1 において L-乳酸が生成した pH 5.5 を用いた。TEST 2 の結果を図 3-7 および表 3-6 に示す。

図 3-7 よると、L-乳酸を持続的に発酵できた条件は TEST 2-3 の条件である 55°C で pH 5.5 のみであり、培養時間の増加とともに乳酸濃度が上昇し、305 時間経過後において乳酸濃度 34.9 g/L、乳酸の収率 0.58、および L-乳酸の光学純度 99% 以上が得られた。ただし、L-乳酸発酵を実施できた条件は TEST 1 の条件と同様であり、したがって、植種材料を用いない場合の L-乳酸発酵条件は非常に狭い範囲に限定された。

一方、光学純度が保てなかった TEST 2-1 (45°C) および TEST 2-2 (50°C) では、乳酸発酵が進行したものの培養の継続に伴い D-乳酸が生成されラセミ体の D-, L-乳酸となった。このことから、いずれの系列においても D-乳酸菌あるいは D-, L-乳酸菌の出現が示唆された。これは、培養 pH を 5.5 と低めに設定したこと、一般的に低 pH 域に耐性を有するとされる乳酸菌が増殖において有利とされたためと考えられる。ただし、いずれの条件も、発酵の序盤では L-乳酸の生成が確認される。TEST 2-1 および TEST 2-2 において高い光学純度が保たれている時期の乳酸濃度は、それぞれ 24 時間後の 14.8 g/L と 68 時間後の 9.8 g/L である。このことから、高温 L-乳酸発酵における L-乳酸菌は他の競合する乳酸菌と比べて、所定の条件下において先行して増殖できる速い増殖速度を有すると考えられる。

TEST 2-1 から TEST 2-3 について乳酸発酵の効率を比べると (図 3-7 参照)、L-乳酸を生成できた TEST 2-3 (55°C、pH 5.5) は他の系列と比べて乳酸の収率、乳酸生成速度の面で劣っている。同じ基質から実験を開始したにも拘わらずこのような差が生まれた原因については、①本研究での L-乳酸菌の増殖至適温度は 55°C より低い域にある (Payot *et al.*, 1999) ことが大きいと考えられるが、それ以外の原因として出現菌種の違いによる②誘導できる多糖分解酵素種の違いあるいは③糖資化性の違いも原因として考えられる。現在のところ、*B. coagulans* が多糖分解酵素の  $\alpha$ -アミラーゼを誘導できることもあり (Babu and Satyanarayana, 1993 A)、乳酸発酵では一般的な多糖分解酵素の添加を高温 L-乳酸発酵では実施せず、そのことを本法のメリットとして考えている。しかし、仮にここで懸念されたような多糖分解性や糖資化性に欠点があるならば、今後の展開として酵素添加による資化率向上も考慮する必要があると考えられる。一方、ラセミ体の乳酸発酵を目的とする場合、TEST 2-1 (45°C、pH 5.5) の条件は非常に優れた条件に成り得る可能性も指摘できる。なお、上記①培養温度に関する検討は次項 3.2 にて行い、③糖資化性に関する検討は第 5 章にて試みる。

3.2.1 において、高温 L-乳酸発酵が起こった場合

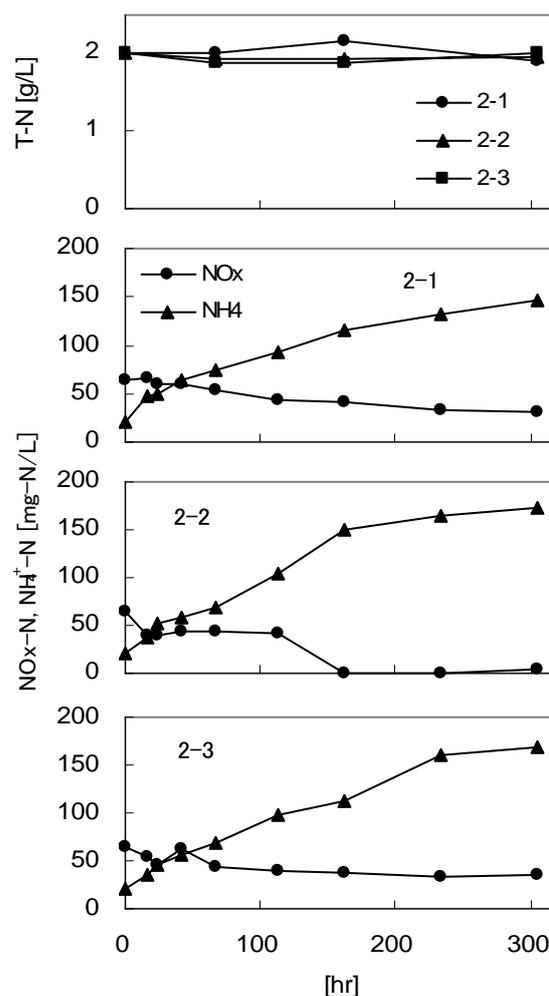


図 3-8 TEST 2 における NO<sub>x</sub>-N と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の推移

はNO<sub>x</sub>-Nが保存されることを確認した。そこで、TEST 2についてもNO<sub>x</sub>-NおよびNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Nの変化を図3-8に示す。これによると、L-乳酸発酵が行えたTEST 2-3ではNO<sub>x</sub>-Nが保存されたものの、ラセミ体の乳酸発酵となったTEST 2-1でもNO<sub>x</sub>-Nが残存した。したがって、少なくともNO<sub>x</sub>-Nの存在確認がされる場合は、L-乳酸発酵に限定されないものの乳酸発酵は起こっている可能性の高いことが確認された。

以上をまとめると、非滅菌の生ごみを用いた本研究での高温L-乳酸発酵は、培養温度50℃以下の条件において、潜在的に乳酸の光学純度の低下が起こり得ることが示された。ただし、D-乳酸の生成はL-乳酸発酵に先行して起こることは無く、したがって、これらD-乳酸の生成をもたらす乳酸菌は、所定の培養条件において本研究でのL-乳酸菌より遅い増殖速度を有していると考えられる。これらは、半連続式培養によるL-乳酸発酵を念頭においた場合、洗い出し効果により有利な情報と考えられる。一方で、本研究でのL-乳酸菌は、乳酸発酵の効率の面から他の乳酸菌より多糖分解性や糖資化性の面で劣る可能性のあることが指摘された。また、2つの回分式培養試験（TEST 1とTEST 2）を通じて、植種を伴わず、非滅菌生ごみのみよりL-乳酸を生成できた条件は、55℃でpH 5.5のみとなった。この結果は、第2章の半連続式培養での培養条件である55℃でpH 6.0とはpH条件が異なる。この点は、本章概説でも記したが、回分式培養と半連続式培養の差異による考えられる。そこで、この点の検討も次項3.2で試みる。

### 3.1.4 L-乳酸菌の同定

第2章3.2の半連続式培養におけるL-乳酸菌の同定より、高温L-乳酸発酵におけるL-乳酸菌は*B. coagulans*であると推定された。先の2つの回分式培養試験でも55℃でpH 5.5の条件においてL-乳酸が生成されたことから、再度このL-乳酸菌を同定するとともに、L-乳酸発酵に至らない近隣の運転条件において出現する菌種についても同定を行った。対象としたサンプルは、A) TEST 1-2 (55℃, pH 6, 234 hr 培養、*n*-酪酸の生成)、B) TEST 2-2 (50℃, pH 5.5, 233 hr 培養、D-, L-乳酸の生成)、C) TEST 2-3 (55℃, pH 5.5, 233 hr 培養、L-乳酸の生成)である。

微生物群集解析の結果を表3-8に示す。これによると、L-乳酸が生成されたサンプルC)では*B. coagulans*のみが検出された。第2章の結果と併せて、本研究によるL-乳酸菌は*B. coagulans*であると判断される。乳酸の消費および*n*-酪酸とガスの生成が見られたサンプルA)では、*B. coagulans*と*Clostridium*属が主に検出された。検出された菌種の性質を表3-9にまとめる。これによると、TEST 1において*n*-酪酸やガス生成を行ったのは*Clostridium*属であると判断される。最後に、D-, L-乳酸が生成されたサンプルB)では、*Lactobacillus amylolyticus*と*B. coagulans*が検出された。表3-9にあるように、D-乳酸を生成したのは*L. amylolyticus*と判断される。

表 3-8 微生物群集解析結果

		Identities (%)	No. of clones	Ratio of clones
A	<i>Bacillus coagulans</i>	99.7	68	72.3
	<i>Clostridium thermopalmarium</i>	99.6	23	24.5
	<i>Clostridium cellulosi</i>	98.9	1	1.1
	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.7	1	1.1
	other	-	1	1.1
B	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	99.7	63	66.3
	<i>Bacillus coagulans</i>	99.6	31	32.6
	other	-	1	1.1
C	<i>Bacillus coagulans</i>	99.8	96	100

表 3-9 や TEST 1 と TEST 2 の回分式実験の結果を比較すると、TEST 1 において *n*-酪酸やガス生成を行った *Clostridium* 属の繁殖を避けるには pH を 5.5 に低く保つことが有効であったことが裏付けられた。また TEST 2 において D-乳酸を生成した *L. amylolyticus* に関しては、培養温度を 55°C と高く保つことが有効であったことが裏付けられた。一般的に、乳酸菌は中温域に至適温度を持つものが多いとされるので (Holt *et al.*, 1994)、培養温度を高く保つことは *B. coagulans* を優占化する上で有効であると考えられる。

表 3-9 検出菌の生育条件および発酵生成物

検出菌	検出箇所	生育条件 温度 (°C)	pH (-)	発酵生成物 (有機酸、ガス)	参考文献
<i>Bacillus coagulans</i>	B, S	op 52 test 58 ○	op 6.5	L-LA	Payot <i>et al.</i> (1999) Litchfield (1996)
<i>Bacillus circulans</i>	S	10 - 40	test 6 ○	なし	Sneath (1986) Coulin <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	S	op 50 < 58	op 7.0 5.4 - 8.5	L-LA	Combet-Blanc <i>et al.</i> (1995)
<i>Clostridium cellulosi</i>	B	op 55 - 60 40 - 65	op 7.3 - 7.5 6.2 - 8.5	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , Et-OH , AA	He <i>et al.</i> (1991)
<i>Clostridium thermopalmarium</i>	B	op 50 - 55 < 60	op 6.6 6.0 - 8.2	BA, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , AA , Et-OH, LA	Soh <i>et al.</i> (1991)
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	B	op 45 - 48 < 52	op 5.0 - 5.5 < 6.0	DL-LA	Bohak <i>et al.</i> (1993)
<i>Lactobacillus brevis</i>	B	test 15 ○ test 45 ×	-	DL-LA	Kandler and Weiss (1986)
<i>Lactobacillus sakei</i>	S	test 2 - 4 ○ test 45 ×	-	DL-LA	Kandler and Weiss (1986)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	S	op 20 - 30 10 - 37	test 4.8 × test 6.5 ○	D-LA, CO <sub>2</sub> , AA , Et-OH	Schleifer (1986)
<i>Leuconostoc gelidum</i>	S	test 1 ○ test 37 ×	-	D-LA, gas	Shaw and Harding (1989)

B; 回分式、S; 半連続式

op; 最適値

test; 表示条件で実施, ○; 生育, ×; 生育せず

LA; 乳酸, AA; 酢酸, BA; 酪酸, Et-OH; エタノール

### 3.1.5 L-乳酸発酵の再現性 - TEST 3 -

後述する回分式培養の準備も含めて、第 2 節で記した模擬生ごみを原料に、植種を伴わない 55°C で pH 5.5 の条件による回分式 L-乳酸発酵をのべ 10 回実施した。表 3-10 および図 3-9 に、10 回の L-乳酸発酵状況をまとめる。これらによると、培養時間の違いはあるものの、光学純度 98% 以上の L-乳酸が安定して得られた。なお、光学純度が最も低かった表 3-10 中の 9) については、生ごみ培地中の D-乳酸の影響を排除した生成 L-乳酸の光

表 3-10 回分式培養 (55°C、pH 5.5、植種なし) における L-乳酸発酵の再現性

	培養時間 (hr)	乳酸濃度 (g/L)	光学純度 (%)
1	307	29.5	98.9
2	305	34.9	99.5
3	51	13.9	99.1
4	234	32.3	99.4
5	234	31.6	99.1
6	139	28.9	99.4
7 <sup>a</sup>	166	24.2	98.2
8 <sup>a</sup>	166	33.8	98.3
9 <sup>a</sup>	166	20.3	97.6
10	303	34.3	99.2

a; 生ごみ中に既に D-乳酸が 0.1 g/L 存在した。

学純度において 99%となる。つまり、生成乳酸に関しては、いずれの場合も 99%以上の高い光学純度の L-乳酸を生成できた。そこで、55°Cで pH 5.5 の培養条件は、生ごみ培地から高い確率で L-乳酸を生成できる培養条件であると考えられる。

図 3-9 によると、L-乳酸生成過程には幅があるものの比較的 0 次反応的な増加を示すとともに、乳酸濃度は 35 g/L 付近を上限とする様子が伺える。参考までに 35 g/L の 75%値に到達するまでに要した時間から平均乳酸生成速度を求めたところ、約 0.1~0.4 g/L/hr の速度が算出された。これらの速度を 0 次反応における速度と仮定して比較を試みると、加水分解を伴う乳酸発酵のため *B. coagulans* の乳酸生成速度（表 2-11 参照）と比較すると圧倒的に劣るものの、同様に加水分解を伴う乳酸発酵（表 2-10 参照）との比較ではほぼ同等の速度が示された。

次に、第 2 節の模擬生ごみとは異なる生ごみを原料として、高温 L-乳酸発酵による L-乳酸発酵性の一般性を確認した（TEST 3）。使用した生ごみは、賞味期限の切れた市販弁当を破砕したものであり、その性状は表 3-2 に記した。実験条件に関しては、TEST 3 では植種を伴わず、55°Cの条件とした（表 3-4）。ただし、pH 条件は、対象物の TS が非常に高かったため攪拌の都合上自動制御が行えず、ここではサンプリング時に pH を 6.0 付近まで高める方法で間欠的に調整した。実験装置および分析項目は TEST 1 および TEST 2 と同様である。

TEST 3 の結果について、乳酸濃度、糖質濃度および pH の経時変化を図 3-10 および図 3-11 に示す。これによると、pH は 4.5~5.7 の範囲で推移し、234 時間の培養により 12.3 g/L まで乳酸が生成した。また、このときの L-乳酸の光学純度は 99%以上であった。一方で、糖質濃度は 110 g/L 残存した。

乳酸濃度の上昇が停滞し、残糖質濃度が高い値に留まった理由に関しては、低 pH 条件の暴露による L-乳酸菌の活性低下、過剰基質濃度による阻

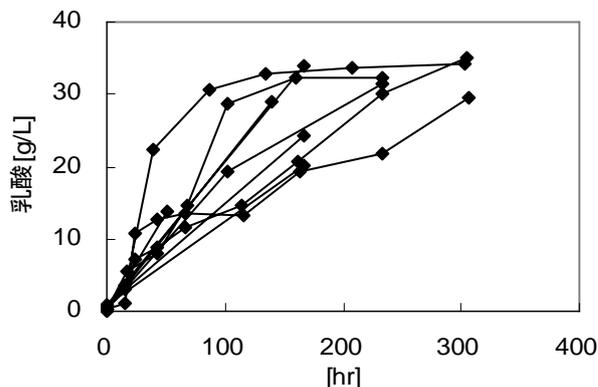


図 3-9 回分式培養（55°C、pH 5.5、植種なし）における乳酸濃度の推移

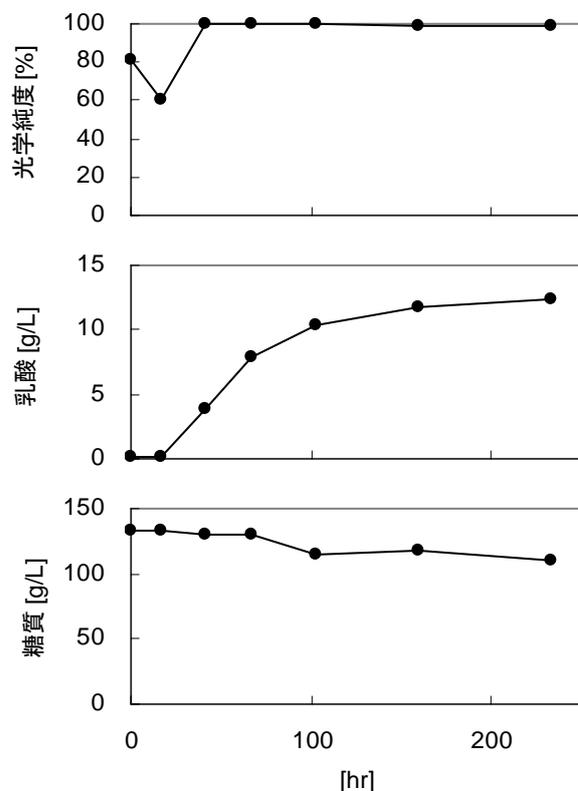


図 3-10 TEST 3 における培養結果

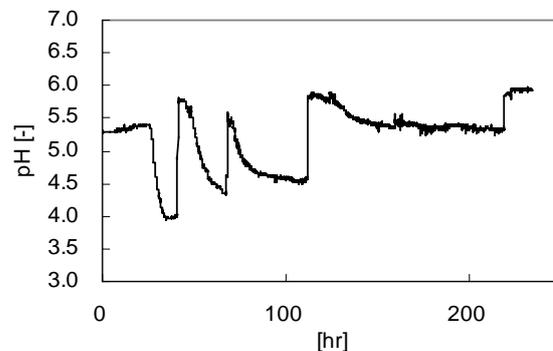


図 3-11 TEST 3 における pH の推移

害、およびでんぷんを中心とすると考えられる多糖の加水分解性に関する問題などが考えられるが、現時点では判断する知見が不足している。ただし、でんぷんの加水分解については、前述のとおり *B. coagulans* はでんぷん分解酵素  $\alpha$ -アミラーゼを誘導できるが、*B. coagulans* の  $\alpha$ -アミラーゼ誘導条件 (50°C、pH 7) および  $\alpha$ -アミラーゼ自身の作用至適条件 (50~70°C、pH 6~7) が存在し (Babu and Satyanarayana, 1993 B)、これら条件が本項の低 pH 培養とかけ離れていることは事実である。そこで、この培養条件と乳酸の収率に関する考察も次項 3.2 で試みる。いずれにしても、高温 L-乳酸発酵により、調整法の異なる食品廃棄物からも高い光学純度を有する L-乳酸が生成できることは示された。

### 3.1.6 更なる高温条件の L-乳酸発酵への影響 -TEST 4-

*B. coagulans* は、生育至適温度を 50°C 付近とするものの、より高温側でも生育可能な菌である (Payot *et al.*, 1999)。仮に、より高温側で L-乳酸発酵が行えるとすると、L-乳酸発酵を妨害する菌種に対するふるい分けの可能性が高まることを期待できることから、55°C 以上の高温条件での L-乳酸発酵実験を試みる (TEST 4)。ここでの実験条件は表 3-4 に示した。TEST 4 は、植種を伴わず、したがって、その環境条件で増殖できる菌種を明確化できる実験とした。また、培養温度の高温化によるふるい分け効果を期待し、pH 条件を 6.0 とする系の実施も試みる。これは、*B. coagulans* の増殖至適 pH 域が pH 6.0~7.0 にあることを考慮し設定した。実験装置、基質および分析項目は TEST 1 などと同様であり、第 2 節に記した。

TEST 4 の結果を、図 3-12 および表 3-11 に示す。これによると、光学純度に関しては、いずれの条件 (TEST 4-1; 55°C で pH 5.5、TEST 4-2; 60°C で pH 5.5、TEST 4-3; 65°C で pH 5.5、TEST 4-4; 60°C で pH 6.0) も高い光学純度の L-乳酸が生成された。乳酸濃度に関しては、303 時間培養後において、TEST 4-2 で 29.3 g/L および TEST 4-4 で 31.5 g/L が得られ、比較系である TEST 4-1 での 34.3 g/L に匹敵するまで高まった。ただし、TEST 4-3 での 6.4 g/L は、乳酸生成が停滞する結果を示している。以上から、生ごみを原料として L-乳酸を生成する場合、乳酸収率の面から温度的な上限は 60°C 付近にあると考えられる。

しかし、培養温度の上限 60°C に対して、65°C で行った TEST 4-3 でもわずかながら乳酸は生成しており、かつ、培養の序盤 (39 hr、2.9 g/L) では TEST 4-2 (39 hr、5.8 g/L) の半分程度の速度で発酵が進行している。このことから、乳酸を生成する反応自体は速度の差こそあれ進行すると考えられる。そこで、最終的な乳酸濃度の差を大きくする 60°C と 65°C の差の原因について考察を試みる。

TEST 4-2 と TEST 4-3 を比べると、培養の序盤に低い濃度で乳酸発酵が停滞している時期を有している。その後、TEST 4-2 では 87 時間以降に乳酸濃度が上昇しているが、TEST 4-3 では大き

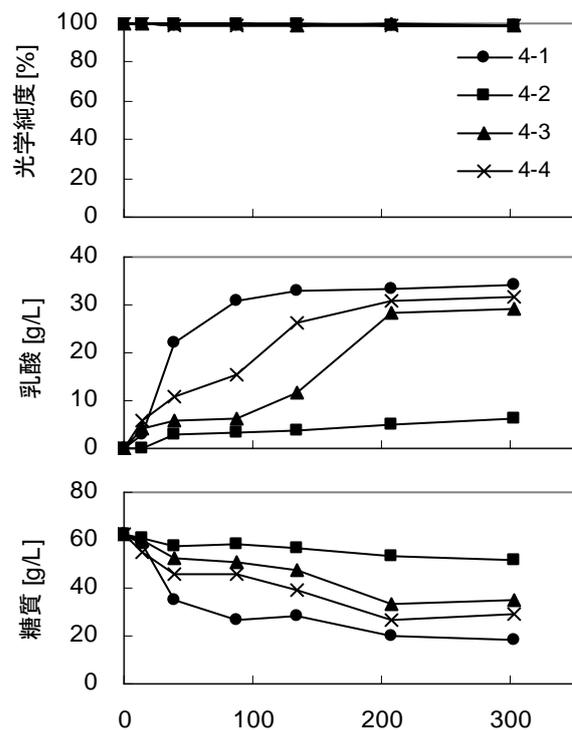


図 3-12 TEST 4 の培養結果

表 3-11 TEST 4 の培養結果

TEST 4	1	2	3	4
培養温度 (°C)	55	60	65	60
pH (—)	5.5	5.5	5.5	6.0
培養時間 (hr)	303	303	303	303
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	62.4	62.4	62.4
	最終濃度	18.7	34.8	51.9
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	0.1	0.1	0.1
	最終濃度	34.3	29.3	6.4
生成乳酸量 (g/L-Reactor/回)	34.2	29.2	6.2	31.4
収率 (%)	0.55	0.47	0.10	0.51
光学純度 (%)	99.2	99.2	98.7	99.2
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.35	0.14	0.02	0.19
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	1.50	0.95	0.26	-

く上昇することなく引き続いて停滞している。つまり、TEST 4-2 において 87 時間後に起こった反応が、最終的な乳酸発酵量においてこの両者を大きく分けたと考えられる。この反応は、乳酸生成に大きく関わるものの、TEST 4-3 でも培養の初期に乳酸発酵が起こったことから乳酸生成自体の反応ではないと考えられる。そこで、多糖から乳酸生成を行う反応を概観すると、ここでの律速反応は多糖の分解反応と推定される。ただし、TEST 4-2 において培養開始 87 時間後に起こった反応は、その後の乳酸濃度の上昇から考慮するとさほど律速されているとは考え難い。そこで、この反応を誘導する酵素を生成する培養開始 87 時間後までに起こった反応が律速要因であったと推定される。この仮定により検討を進めると、仮定した反応は、TEST 4-1 では律速要因として表れておらず、一方で、TEST 4-4 においては若干見受けられるものの TEST 4-2 ほどは律速要因となっていないことから、温度上昇 (55°C ○ → 60°C △ → 65°C ×) に対してネガティブの、pH 上昇 (5.5 ○ → 6.0 ◎) に対してポジティブの傾向を示す酵素反応であると考えられる。

Babu and Satyanarayana (1993 B) によると、*B. coagulans* のアミラーゼ誘導に関する研究では、その至適条件は 50°C で pH 7 とされている。一方、*B. coagulans* によって誘導されたアミラーゼの活性は、dextrinizing 活性について 60~70°C で pH 6~7 に至適域が、saccharolytic 活性について 50~60°C で pH 6~7 に至適域があった。これらの報告と乳酸発酵が停滞した TEST 4-3 (65°C で pH 5.5) を比較すると、酵素活性については至適域に近いが、酵素誘導に関しては至適域から離れていることが分かる。したがって、先ほどの多糖分解酵素の誘導が律速となっているとする仮定は妥当性を有しているとも考えられる。なお、ここでは仮定で議論を進めたが、酵素活性は測定することが可能であることから (白兼ら, 1996、今井ら, 1997)、培養時系列に酵素活性を測定することで上記仮定を確認することは可能である。その結果次第では、律速反応を補う補材料の添加によって、さらに効率的な、あるいはさらに安全な操作条件がより高温側で見つかることも推察される。

以上をまとめると、シンプルな発酵法を目指す生ごみの高温 L-乳酸発酵では、上限温度を 60°C とすることが妥当であると考えられる。ただし、①55°C より高温側で運転するにはさらにエネルギーが必要であること、②60°C 条件で pH を高く設定できる可能性を有するが、わずかでも中和剤を多く必要とすること、③競合する *Clostridium* 属も耐熱性を有することから pH を高く設定する条件では意図しない菌群の優占化を招く危険性が高いことを考慮すると、55°C 以上の高温側での運転条件に対しては比較系である TEST 4-1 (55°C で pH 5.5) の条件が現在までの実績において最適と考えられる。

### 3.2 植種を伴う場合の L-乳酸発酵条件 -TEST 5, 6, 7-

#### 3.2.1 概説

前節によると、植種を伴わない回分式での L-乳酸発酵条件は、55°C より高い培養温度条件を除くと 55°C で pH 5.5 のみとなった。この条件は、第 2 章で行った半連続式の L-乳酸発酵条件と pH 値 (pH 6) において異なる。そこで、両条件間の違いを検討すると、次の 4 点が想定できる。

- a) 半連続式培養による増殖速度の遅い菌体の洗い出し効果
  - b) L-乳酸菌 (*B. coagulans*) の優占効果 (抗菌物質の生成など)
  - c) 常時高濃度の塩 (主に乳酸塩) に暴露されている効果
  - d) 生ごみの冷蔵保管効果 (L-乳酸発酵を妨害する菌種の滅菌効果)
- d) については第 5 章で検討するが、仮に b) あるいは c) の効果が大きい場合、回分式培養においても植種を行うことで、つまり L-乳酸菌の優占環境を前もって作っておくことで、pH に関する運転条件の差異を埋められる可能性が考えられる。さらに、L-乳酸菌を優占化しておくことで、L-乳酸発酵条件の範囲拡大も期待できる。例えば、*B. coagulans* の至適 pH 条件は 6.5 付近であることから、生ごみの高温 L-乳酸発酵でも pH 6~6.5 の間に L-乳酸発酵において効率的な条件が存在する可能性も考えられる。また、省エネルギーの観点から低温培養化も望ましい方向であり、あらかじめの L-乳酸菌の優占化により、55°C より低温域において競合が予想される高温性乳酸菌の繁殖を抑えられる可能性も考えられる。そこで、本節では、生ごみ培地から十分に L-乳酸が発酵された発酵液を植種材料として利用することで半連続式培養を模擬した回分式培養を試み、①半連続式培養との pH 条件の差異の確認 (TEST 5)、②L-乳酸発酵条件範囲の拡大 (TEST 6 および TEST 7)、③効率的な L-乳酸発酵条件の探索について検討を試みる。

植種を伴う回分式実験は合計 3 試験 9 系列実施する (TEST 5、TEST 6 および TEST 7)。植種材料の培養条件は表 3-3 に、また、各試験の培養温度および pH 条件は表 3-4 に示した。なお、植種材料は、半連続式培養を模擬できることを前提条件に作成した。したがって、植種材料自体の培養期間を半連続式培養で考えている HRT 5 日~10 日程度の時間に設定した。また、植種量であるが、各系列とも、植種材料 : 生ごみ培地 = 4 : 6 (湿重量比) とした。これは、1 日 1 回の発酵液引抜きおよび基質投入を行う HRT 2 日の半連続式培養を行った場合の引継ぎ発酵液量に迫る量として決定した。

#### 3.2.2 実験結果

TEST 5 から TEST 7 までの光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図 3-13~図 3-15 に、それらをまとめた結果を表 3-12 に示す。

##### 1) 半連続式培養との比較および高 pH 化

植種を伴う半連続式培養を模擬した回分式培養により、第 2 章における半連続式培養の発酵条

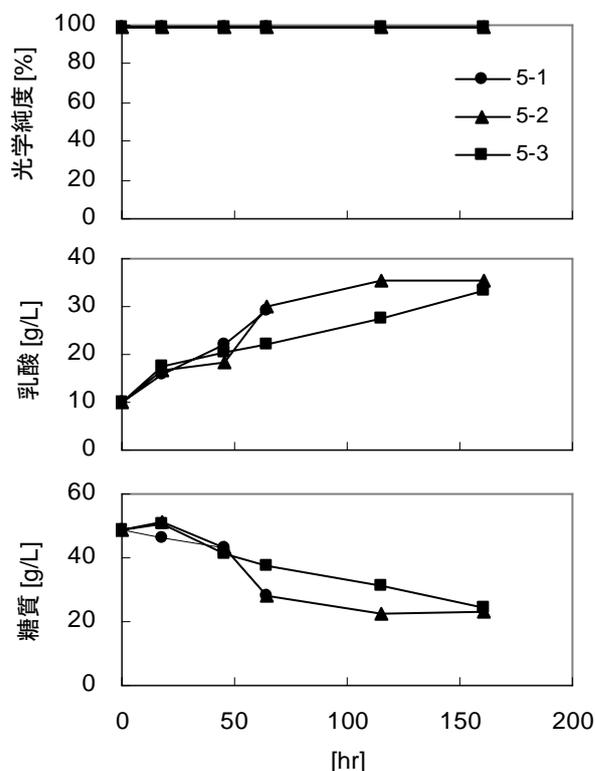


図 3-13 TEST 5 の培養結果

件 (55°Cで pH 6.0) での L-乳酸発酵の再現を試みた (TEST 5-2 および TEST 5-3)。また、運転条件の拡大を念頭に、pH をより *B. coagulans* の至適側 (pH 6.5) へ設定した試験 (TEST 6-2) を実施した。その結果、いずれの系列においても高い光学純度の L-乳酸が得られた。前節の植種を伴わない回分式培養の場合、半連続式培養の発酵条件である 55°Cで pH 6.0 では継続的な L-乳酸発酵に至らなかった。しかし、植種を伴った回分式培養では継続した L-乳酸発酵に至ったことから、あらかじめ L-乳酸菌 (*B. coagulans*) を優先化しておくこと、およびその生成物 (主として乳酸塩) の濃度を高めておくことが、第 2 章の半連続式培養での高温 L-乳酸発酵において、その L-乳酸発酵要因の 1 つであると確認された。また、同様の効果の結果、さらに pH を上昇させた L-乳酸発酵の妨害菌が増殖する恐れの高い条件 (TEST 6-2) でも L-乳酸の生成が確認された。

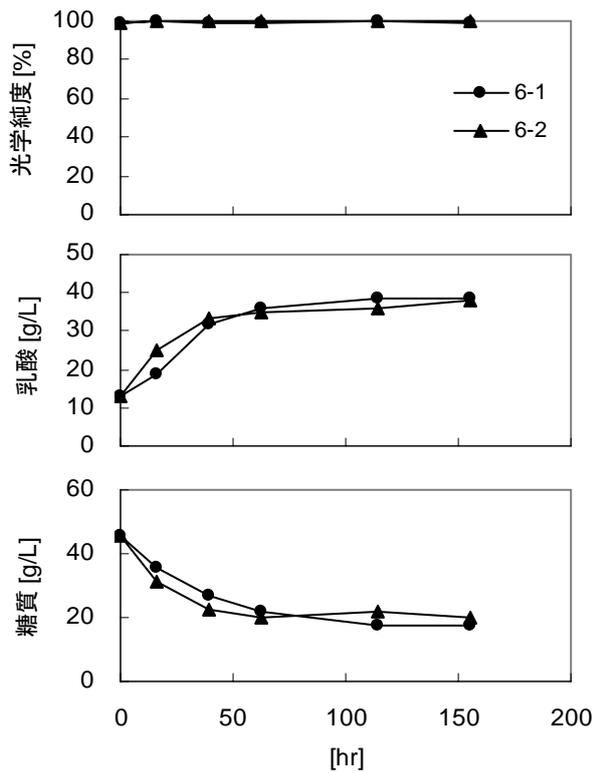


図 3-14 TEST 6 の培養結果

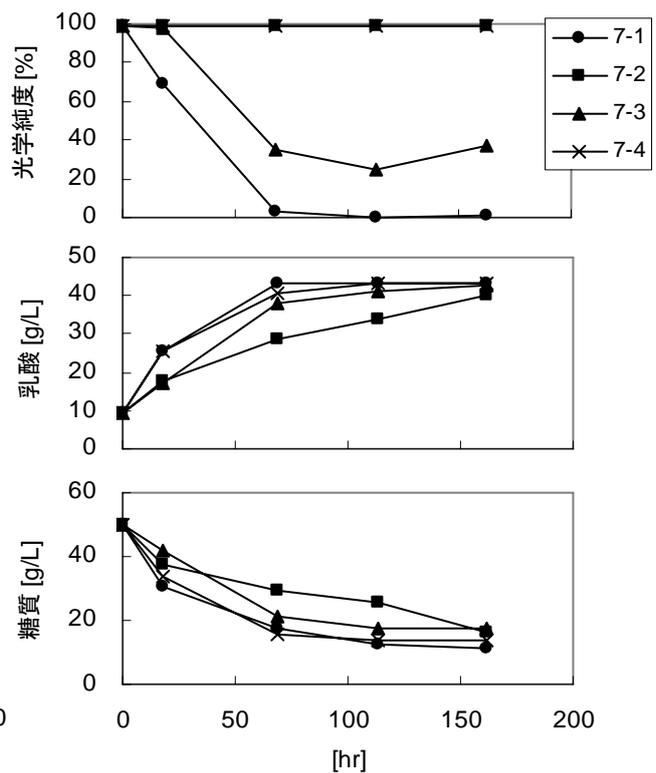


図 3-15 TEST 7 の培養結果

表 3-12 植種を伴う回分式培養の培養結果

	TEST 5			TEST 6		TEST 7			
	5-1	5-2	5-3	6-1	6-2	7-1	7-2	7-3	7-4
培養温度 (°C)	50	55	55	50	55	45	50	50	50
pH (-)	5.5	6.0	6.0	5.5	6.5	5.5	5.5	6.0	6.5
培養時間 (hr)	65	161	161	155	155	162	162	162	162
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	48.8	48.8	48.8	45.6	45.6	49.7	49.7	49.7
	最終濃度	28.4	23.3	24.5	17.3	20.3	11.0	17.3	16.0
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	10.1	10.1	10.1	12.9	12.9	9.5	9.5	9.5
	最終濃度	29.2	35.4	33.3	38.7	38.2	43.3	42.5	40.0
乳酸生成量 (g/L-Reactor/回)	19.1	25.3	23.3	25.8	25.3	33.8	32.9	30.5	33.9
収率 (%)	0.39	0.52	0.48	0.57	0.56	0.68	0.66	0.61	0.68
光学純度 (%)	99.3	99.1	98.9	99.4	99.7	0.4	99.2	37.4	99.3
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.30	0.31	0.14	0.37	0.52	0.49	0.42	0.21	0.46
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.98	1.26	0.46	1.45	2.00	-	2.37	-	1.48
L-乳酸発酵性	○	○	○	○	○	×	○	×	○

## 2) 培養温度の低温化

植種を伴わない回分式培養によって確認された半連続式培養との培養条件の差異が、植種を伴うことで説明されたことから、続いてL-乳酸発酵条件範囲に関する検討を試みる。ここでは、培養温度 50℃で pH 5.5 とした条件 (TEST 5-1 と TEST 6-1) で酸発酵を実施した。結果としては、いずれの系列も L-乳酸を生成し、安定性を有することが示唆された。以上より、植種材料を用いることで高温 L-乳酸発酵の温度条件を少なくとも 50℃まで低下できることが示された。次に、この 50℃において、pH 条件の至適化を検討する。

TEST 7 において、培養温度 45℃で pH 6.0 の系列 (TEST 7-1)、および培養温度 50℃で pH 5.5、6.0 および 6.5 の 3 系列 (TEST 7-2、TEST 7-3 および TEST 7-4) を用意した。いずれの pH 条件も、植種を伴う培養温度 55℃の実験では L-乳酸発酵が行えた条件である。しかし、TEST 7 の結果、pH 6.0 の 2 系列 (TEST 7-1 と TEST 7-3) において L-乳酸発酵に至らなかった。この場合も両系列とも乳酸自体は生成したことから、L-乳酸菌に競合して D-, L-乳酸を生成する高温性乳酸菌の繁殖が起こったものと考えられる。ただし、45℃の系列 (TEST 7-1) では、発酵初期より光学純度が低下し、培養開始時に L-乳酸菌を優占化した効果が全く見られず、増殖速度の面において競合菌 (乳酸菌) に対して L-乳酸菌が圧倒的に不利であったと考えられる。一方、L-乳酸発酵の行えた pH 5.5 (TEST 7-2) と 6.5 (TEST 7-4) の比較では、図 3-15 より両者の間で乳酸生成速度や乳酸収率に大きな差異は観察されなかった。

以上をまとめると、45 および 50℃の環境においても初期に L-乳酸菌を優占化しておくことで、pH を 6 以上と設定することで出現が予想された乳酸を消費する *Clostridium* 属の繁殖は防ぐことができた。一方で、45℃で pH 6 や 50℃で pH 6 の条件では、初期に L-乳酸菌を優占化していても D-, L-乳酸が生成される結果となった。*Clostridium* 属の生長を防いだ原因に関しては、乳酸塩濃度の上昇がこれら菌種の増殖を妨げる報告が存在する。Miller *et al.* (1993) は、*Clostridium botulinum* を植種した七面鳥の胸肉ミンチに、乳酸ナトリウム添加系と無添加系を用意し、28℃の環境で *C. botulinum* の生長を観察した。その結果、乳酸ナトリウムの無添加系においては 2 日後に *C. botulinum* の生成する神経毒を検出したが、2%乳酸ナトリウム添加系では 4 日後まで検出されなかった。さらに、6%乳酸ナトリウム添加系では 18 日経過後も神経毒は検出されなかったと報告している。Juneja and Thippareddi (2004) は、調理後の七面鳥胸肉の冷蔵過程における *Clostridium perfringens* の生長を、乳酸ナトリウム添加によって抑える実験を行っている。それによると、1%乳酸ナトリウム添加により、その抑制効果を確認している。また、乳酸ナトリウムの添加濃度が高まるにつれて、抑制効果が高まることを示している。本節での実験では、L-乳酸発酵に至った培養系の初期において、約 1.2~1.6%の乳酸ナトリウムが存在した。これらの報告を踏まえると、この乳酸ナトリウムが、*Clostridium* 属の生長抑制に大きく貢献していると考えられる。

D-, L-乳酸が生成される原因である D-, L-乳酸菌に対しては、乳酸菌故に低 pH 条件や乳酸塩に対しても耐性を有することから、培養温度を高め設定することでその増殖を防ぐ必要がある。ただし、高温性の乳酸菌も存在し、TEST 2-2 で検出された *L. amylolyticus* 以外にも、例えば、チーズ製造のスターター菌として利用される *Lactobacillus helveticus* (D-, L-乳酸菌、増殖至適温度 45℃) やサイレージ発酵や乳製品中でも見受けられる *Lactobacillus delbrueckii* (D-乳酸菌、増殖至適温度 45℃) が出現の可能性のある菌種として挙げられる (Kandler and Weiss, 1986、小崎ら, 1992)。これら高温性の乳酸菌は 50℃を越える環境でも生長が可能であることから、安

全性の上では 55°C の培養温度を保つことが望ましいと考えられる。一方で、50°C の培養温度でも複数回 L-乳酸発酵が行えた条件 (pH 5.5) が存在することも事実であり、*B. coagulans* の至適条件周辺も含めて今後も培養を繰り返し、L-乳酸発酵の実績と出現菌の確認が必要と考えられる。

### 3.2.3 効率的な L-乳酸発酵条件の探索

#### 1) 重回帰分析

同じ生ごみ培地を原料とし、植種を伴わない回分式培養実験 (TEST 1、TEST 2 および TEST 4) および伴う回分式培養実験 (TEST 5、TEST 6 および TEST 7) において、L-乳酸発酵の実施が確認された。一連の培養では、培養条件による乳酸の収率や乳酸生成速度などの L-乳酸発酵性において差異が観察されたことから、本項では温度と pH の培養条件による L-乳酸発酵性の評価を試みる。なお、本評価では、上記実験に加えて、植種材料を作成するために行った培養や後述する第 5 章以降の実験など、培養条件的に様に評価できる培養結果は全て用いた。ここで用いた培養結果を表 3-13 に記す。評価方法は、第 2 節で定義した L-乳酸生成可能量と平均乳酸生成速度を目的変数に、培養温度と pH を説明変数とする重回帰分析である。

表 3-13 重回帰分析に使用した培養系列

	TEST1		TEST2			TEST4			TEST5			TEST6	
系列	1	3	1	2	4	1	2	3	1	2	1	2	
培養温度(°C)	55	55	55	60	60	50	55	55	50	55	50	55	
pH (-)	5.5	5.5	5.5	5.5	6.0	5.5	6.5	6.5	5.5	6.5	5.5	6.5	
植種材料量 (g)	0	0	0	0	0	400	400	400	400	400	400	400	
培養時間 (hr)	307	305	303	303	303	65	161	161	155	155	155	155	
L-乳酸生成可能量 (g/L)	<b>29.1</b>	<b>34.6</b>	<b>34</b>	<b>29</b>	<b>31.2</b>	- <sup>a</sup>	<b>34.9</b>	<b>32.9</b>	<b>38.3</b>	<b>37.9</b>			
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	<i>0.1</i>	<i>0.13</i>	<i>0.35</i>	<i>0.14</i>	<i>0.19</i>	<b>0.3</b>	<b>0.31</b>	<b>0.14</b>	<b>0.37</b>	<b>0.52</b>			

	TEST7		TEST9		TEST10		Seed1		Seed2	
系列	2	4	1	1	1	2	1	2	1	2
培養温度(°C)	50	50	55	55	55	55	55	55	55	55
pH (-)	5.5	6.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
植種材料量 (g)	400	400	200	400	400	400	0	0		
培養時間 (hr)	162	162	180	161	95	95	234	234		
L-乳酸生成可能量 (g/L)	<b>42.1</b>	<b>43</b>	<b>33.6</b>	<b>34.8</b>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	<b>31.9</b>	<b>31.2</b>		
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	<b>0.42</b>	<b>0.46</b>	<i>0.28</i>	<b>0.32</b>	<b>0.13</b>	<b>0.18</b>	<i>0.28</i>	- <sup>a</sup>		

TEST 9; 第5章

TEST 10; 第5章

Seed1; TEST 5の植種材料の作成培養

Seed2; TEST 6の植種材料の作成培養

a; 培養期間が短いあるいはデータ欠損のため算出できず。

太字は使用データ。

重回帰分析を行うためには、各説明変数と各目的変数の間に相関関係を有することが必要である。そこで、各々の相関関係を図 3-16 に示す。なお、評価に用いた培養系は、平均乳酸生成速度に対しては植種材料 400 g/L を用いた培養系、L-乳酸生成可能量に対しては表 3-13 中における 155 時間以上培養した系である。平均乳酸生成速度に関しては、培養開始時の基質量および初期菌量が及ぼす影響が大きいと考えられることから、植種量の等しい培養系を評価した。一方、L-乳酸生成可能量に関しては、植種の有無に拘わらず同種の生ごみ培地を原料とした場合、長時間の培養により培養条件固有の L-乳酸終端濃度に至ることが実験結果により推察されたため、長時間の

培養系を評価対象とした。

図 3-16 によると、培養温度と各目的変数間には負の相関が、pH と各目的変数間には正の相関が存在することが示された。説明変数と目的変数の間に相関関係が見られることから、各目的変数について重回帰分析を行った。平均乳酸生成速度に対する重回帰分析結果を式(3-2)および表 3-14 に示す。

$$Y_{\text{rate}} = 0.297 - 0.133 \cdot x_{\text{temp}} + 0.089 \cdot x_{\text{pH}} \quad (3-2)$$

ただし、植種を伴う L-乳酸発酵を確認した範囲 (50~55°C, pH 5.0~6.5) において有効とする。また、D-, L-乳酸となった 50°C で pH 6.0 の条件は除くものとする。

重回帰式の検定結果より、式(3-2)の結果は、危険率 0.05 において予測式が棄却された。ただし、危険率 0.07 であることから、説明変数である培養温度あるいは pH 条件の変化に対して、目的変数である平均乳酸生成速度が受ける傾向に関してある程度言及できると考えられる。

図 3-17 に、式(3-2)による予測値と実測値を示す。なお、図中では、回分式培養により L-乳酸発酵が行えた条件のみ予測値と実測値を示している。傾向として、温度低下および pH 上昇に伴い平均乳酸生成速度が増加すること、式(3-2)の回帰係数より、温度変化 (操作単位: 5°C) が pH 変化 (操作単位: 0.5) より平均乳酸生成速度に対して大きな影響を与えることが示された。

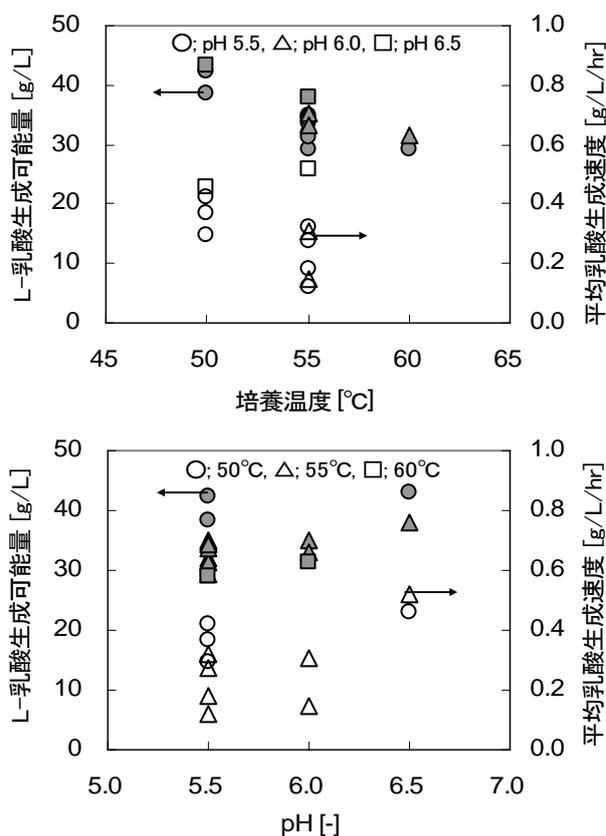


図 3-16 L-乳酸生成可能量と平均乳酸生成速度の培養温度と pH に対する影響

表 3-14 平均乳酸生成速度の予測式に対する F-検定結果

	平方和	df	平均平方和	F	p-値
回帰	0.084	2	0.042	4.004	0.069
残差	0.073	7	0.010		
合計	0.157				

推定値の標準誤差 = 0.102;  $R^2 = 0.534$ ;  $R = 0.730$

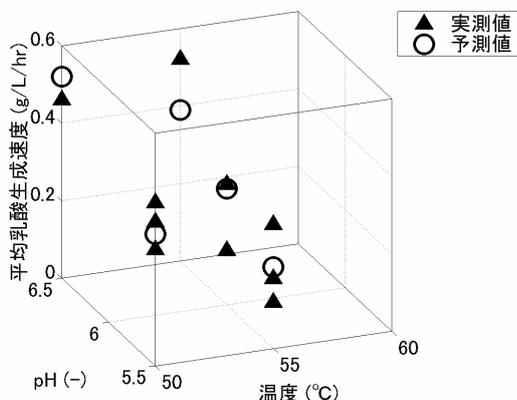


図 3-17 平均乳酸生成速度の予測値と実測値の比較

次に、L-乳酸生成可能量に対する重回帰分析結果を式(3-3)および表 3-15 に示す。

$$Y_{\text{product}} = 35.29 - 5.58 \cdot x_{\text{temp}} + 2.06 \cdot x_{\text{pH}} \quad (3-3)$$

ただし、回分式培養により L-乳酸発酵を確認した範囲 (50~55°C, pH 5.0~6.5) において有効とする。また、D-, L-乳酸となった 50°C で pH 6.0 の条件は除くものとする。

重回帰式の検定結果より、式(3-3)は、危険率 0.05 において予測式が L-乳酸生成可能量を説明できることが示された。式(3-3)による予測値と実測値を図 3-18 に示す。これによると、*B. coagulans* の増殖至適域 (50°C で pH 6.5) に接近するにつれて、L-乳酸生成可能量が高まっている様子が示された。また、式(3-3)の回帰係数より、平均乳酸生成速度と同様に、温度変化 (操作単位; 5°C) が pH 変化 (操作単位; 0.5) より L-乳酸生成可能量に対して大きな影響を持つことも示された。さらに、式(3-2)および式(3-3)の回帰係数の比を取ると、式(3-2)は 0.134/0.090=1.5 および式(3-3)は 5.583/2.058=2.7 より、式(3-3)は式(3-2)以上に温度の変量に対する影響を受けることが分かった。この結果は、乳酸生成速度と乳酸収率のそれぞれの向上目的に応じて、優先とする培養温度もしくは pH の条件変更を選択させるものである。いずれにしても、培養温度の影響が大きいことから、生ごみの高温 L-乳酸発酵において重要な反応である多糖加水分解反応について、*B. coagulans* の  $\alpha$ -アミラーゼ誘導条件 (至適条件; 50°C で pH 7.0) と誘導された  $\alpha$ -アミラーゼ活性条件 (至適条件; 60°C で pH 7.0) のうち、酵素誘導条件がより高温 L-乳酸発酵にとって重要であることが示された。また、TEST 2 における D-, L-乳酸発酵 (TEST 2-1; 45°C で pH 5.5、TEST 2-2; 50°C で pH 5.5) に対して L-乳酸発酵 (TEST 2-3; 55°C で pH 5.5) が非効率であった点は、TEST 2-3 が *B. coagulans* の至適条件から離れていたことが影響の大きい原因の 1 つであったことも推察された。

表 3-15 L-乳酸生成可能量の予測式に対する F-検定結果

	平方和	df	平均平方和	F	p-値
回帰	198.8	2	99.39	24.44	0.000
残差	48.80	12	4.067		
合計	247.6				

推定値の標準誤差 = 2.017;  $R^2 = 0.8029$ ;  $R = 0.8960$

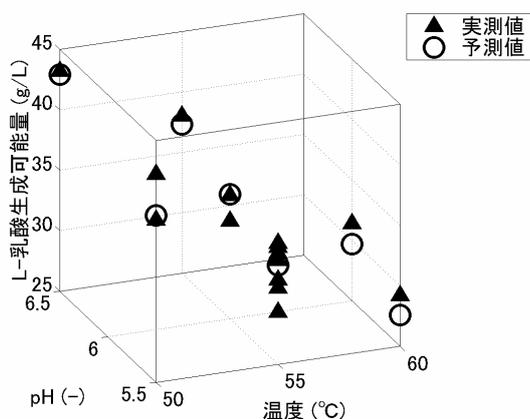


図 3-18 L-乳酸生成可能量の予測値と実測値の比較

以上の結果から、回分式培養により L-乳酸発酵が実施できた条件を L-乳酸発酵性の観点から順序付けると、①50°C で pH6.5、②50°C で pH5.5 さらに③55°C で pH6.5 となる。これらは、植種を

伴うことが前提の培養条件であるため、半連続式培養の際には適用可能条件であると考えられる。今後は、さらに周辺部の培養条件の検討を進めるとともに、本項で効率的とされた培養条件に対して、培養実績の付加および半連続式培養の実施を行うことが望ましいと考えられる。

## 2) 糖質の消費率

前項の検討により、培養条件を *B. coagulans* の至適条件へ接近させることで L-乳酸生成可能量が増大化することが示された。一方で、第 2 章で指摘されたとおり、高温 L-乳酸発酵は固形性糖質の消費に課題がある。そこで、培養条件を変化させた場合における固形性糖質の消費率を評価することとした。

表 3-16 に L-乳酸発酵に至った培養条件における糖質の消費率を示す。ただし、表 3-16 中には、培養条件を同じくする系（植種材料：基質＝4：6（湿重量比）の培養系と植種を伴わない培養系）のみをまとめている。植種を伴う実験について全糖質の消費率を比較すると、L-乳酸生成可能量の増加に併せて消費率が増加している様子が確認できる（図 3-19 参照）。また、全糖質の消費率の増加は、溶解性糖質の消費率の増加により成されていることも確認される（表 3-16 参照）。一方、固形性糖質については、消費率では明確でないものの消費量では培養条件を至適化することにより増加傾向が観察できた（表 3-16 参照）。ただし、いずれの系も固形性糖質の消費量はわずかであり、また、初期濃度が必ずしも同一でないため、引き続き固形性糖質の消費に関しては検討が必要とされる。

表 3-16 回分式培養における糖質の消費比較

	植種材料あり						植種材料なし				
	TEST5		TEST6		TEST7		TEST9	TEST1	TEST2	TEST4	Seed <sup>b</sup>
	2	3	1	2	2	4	1	1	3	1	1
<b>糖質の消費率</b>											
全糖質 (-)	0.52	0.50	0.62	0.55	0.65	0.73	0.44	0.56	0.74	0.70	0.61
溶解性糖質 (-)	0.62	0.58	0.67	0.58	0.81	0.86	0.62	0.55	0.64	0.79	0.59
固形性糖質 (-)	-0.04 <sup>c</sup>	0.01	0.35	0.39	0.17	0.32	-0.40 <sup>c</sup>	0.62	1.00	0.45	0.69
<b>糖質の消費量</b>											
全糖質 (g/L)	25.5	24.3	28.2	25.3	32.4	36.2	20.2	34.2	44.4	43.7	36.4
溶解性糖質 (g/L)	25.8	24.2	25.9	22.6	30.3	32.3	23.4	26.7	29.1	36.1	28.1
固形性糖質 (g/L)	-0.3 <sup>c</sup>	0.1	2.4	2.7	2.1	3.9	-3.2 <sup>c</sup>	7.5	14.7	7.5	8.3
<b>乳酸への転換率<sup>a</sup></b>	<b>0.88</b>	<b>0.72</b>	<b>0.91</b>	<b>1.00</b>	<b>1.02</b>	<b>0.93</b>	<b>1.16</b>	<b>0.86</b>	<b>0.78</b>	<b>0.78</b>	<b>0.88</b>

培養条件は表3-13を参照。

a: (生成した乳酸量) ÷ (消費した糖質量)

b: TEST 6の植種材料作成のための培養(培養条件: 55°C、pH5.5)

c: マイナスは増加を示す。

固形性糖質の消費率に関して植種を伴わない系の結果と比較すると、植種を伴わない系では概ね植種を伴う系より消費率が高い。これは、生ごみから生成された植種材料中には消費され難い固形性糖質が残存し、これが植種を伴う系の固形性糖質の消費率を押し下げる原因となっていると考えられる。一方で、両者は培養時間も大きく異なる。発酵液の平均的な培養時間 (HRT) は両者とも 240 時間以上であるが、植種を伴う系の培養開始時に添加された生ごみ培地自体の

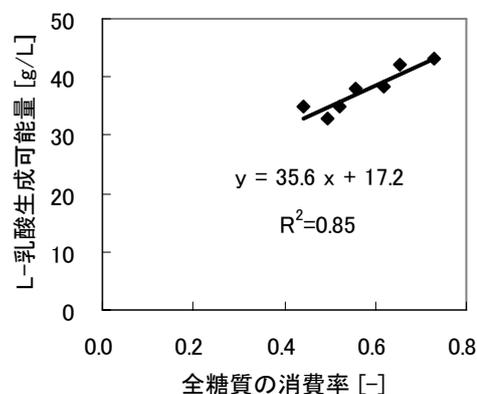


図 3-19 L-乳酸生成可能量と全糖質の消費率の関係

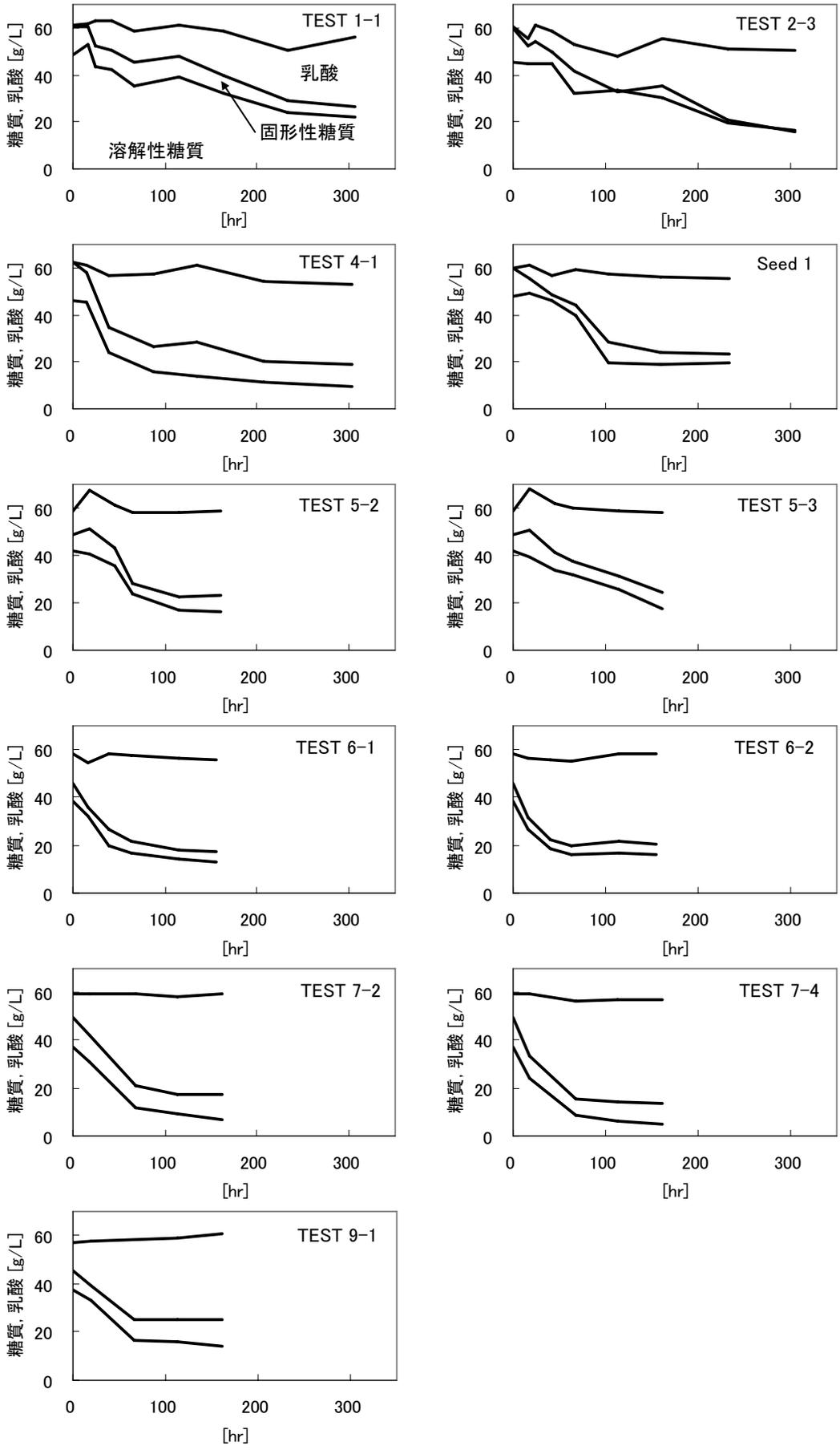


図 3-20 溶解性糖質、固形性糖質および乳酸の推移

培養時間は 160 時間程度である。そこで、表 3-16 中の系の固形性糖質量の経時変化を図 3-20 に示すとともに植種を伴わない系の培養後 160 時間程度の固形性糖質消費率を見ると、TEST 1-1 ; 0.37 (163 時間)、TEST 2-3 ; 0.67 (162 時間)、TEST 4-1 ; 0.13 (134 時間)、および表 3-16 中の Seed 1 ; 0.59 (159 時間) と固形性糖質の消費率の低下が確認される。したがって、固形性糖質の消費には実際の長時間の培養が有効であることが伺える。ただし、固形性糖質の資化を目的とした培養時間に関しては、第 2 章の場合、HRT 10 日 (240 時間) でも消費率に向上が見られなかったことから、TEST 1-1 や TEST 4-1 の結果と併せてより長時間の培養時間が必要となる。長時間の培養は L-乳酸の生産性を低下させることから、固形性糖質が高い割合で存在する原料を高温 L-乳酸発酵に用いる場合には、長時間の培養以外に糖化酵素の添加により固形性糖質の可溶化を進める工夫が必要と考えられる。

ところで、図 3-20 によると糖質量の減少分を乳酸の生成量で補完されていることが示されている。消費された糖質量に対する生成した乳酸の転換率を表 3-16 に示したが、0.7 以上の高い値を示した。これは、*B. coagulans* がホモ発酵により乳酸発酵を進めたためと考えられる。つまり、*B. coagulans* による L-乳酸発酵は原料に対して炭素収支的に効率的な発酵であると確認された。なお、表 3-16 中の乳酸転換率を比較すると、植種を伴う系が高い乳酸転換率を示しているようである。しかし、検討可能な全ての実験結果 (ただし、図 3-20 のような途中経過を観察していない、あるいは培養条件が異なるため表 3-16 中には記載していないもの) を加えて図 3-21 に比較すると、そのような傾向は確認されなかった。

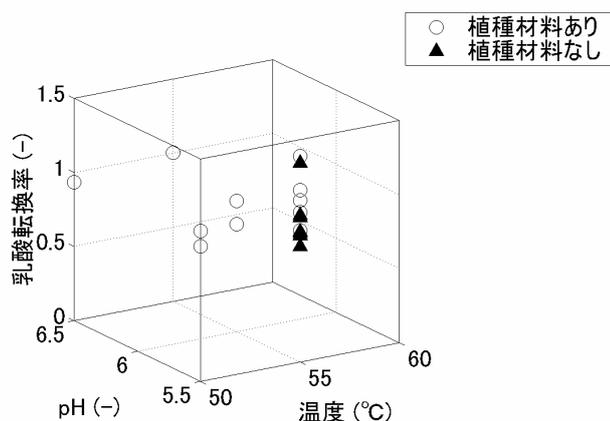


図 3-21 回分式実験における培養条件ごとの乳酸転換率の比較

#### 第 4 節 結語

本章では、第 2 章で示した高温 L-乳酸発酵の運転可能範囲を明らかにする目的で、非滅菌条件下、2 倍希釈した模擬生ごみを基質とし、回分式培養により培養温度および pH 条件に関する実験的考察を行った。まず、植種を伴わない実験により、高温 L-乳酸発酵が内在する L-乳酸発酵の妨害因子の検討を行った。得られた主な結果を以下に記す。

- (1) 培養温度 55°C の条件で、pH 条件を 5.5、6.0 および 6.5 と変化させた結果、L-乳酸発酵が継続して行えた条件は 55°C で pH 5.5 のみであった。次に、pH 5.5 の条件で、培養温度を 45、50 および 55°C と変化させた結果、L-乳酸発酵が継続して行えた条件は再度 55°C で pH 5.5 のみで

あった。なお、両実験により得られた L-乳酸は光学純度 99%であり、乳酸濃度 30~35 g/L で乳酸収率 0.5 程度（生成乳酸量/基質糖質量 [-]）であった。

- (2) 55°Cで pH 6.0 および 6.5 の条件では、培養の初期に L-乳酸が生成されるものの、培養の継続とともに *n*-酪酸や二酸化炭素といった *Clostridium* 属に特徴付けられる発酵産物が主な生成物となった。一方、45°Cおよび 50°Cで pH 5.5 の条件では、ここでも培養の初期に L-乳酸が生成されるものの、その後はラセミ体の乳酸が生成された。なお、培養の初期に L-乳酸が生成される事実から、L-乳酸発酵が実施できる培養条件およびその周辺の培養条件では、本研究での L-乳酸菌の増殖速度が L-乳酸発酵を妨害する菌種の増殖速度を上回ることが指摘された。
- (3) 16S rDNA を利用した微生物群集解析により、L-乳酸菌は *Bacillus coagulans* であること、pH 6.0 以上の高い pH 条件で出現する *n*-酪酸などの生成は *Clostridium* 属（主に *Clostridium thermopalmarium*）によること、培養温度 50°C以下の低い温度条件で出現するラセミ体の乳酸は、*Lactobacillus amylolyticus* によることが示された。また、検出された菌種の性質を整理すると、55°Cで pH 5.5 でのみ L-乳酸生成が可能であったことが裏付けられた。
- (4) より広い培養条件を求めて、55°C以上の高温側の条件による回分式培養を実施した。これによると、60°C以下であれば光学純度 99%の L-乳酸発酵が行えることが示された。L-乳酸発酵が行えた培養結果における乳酸濃度および乳酸収率はそれぞれ、55°Cで pH 5.5 では 34 g/L と 0.55、60°Cで pH 5.5 では 29 g/L と 0.47、および 60°Cで pH 6.0 では 32 g/L と 0.51 となった。本実験より、乳酸生成速度や乳酸の収率など発酵効率の面から、植種を伴わない場合培養実績の多い 55°Cで pH 5.5 が効率的な培養条件と示された。

一連の植種を伴わない回分式培養では、第 2 章の L-乳酸発酵条件（55°Cで pH 6.0）と pH 条件が異なる結果となった。この差異に対して、培養初期 L-乳酸菌量あるいは L-乳酸塩の影響が大きいと考える理由から、高温 L-乳酸発酵の発酵液を植種材料として利用する半連続式培養を模擬した回分式培養を実施した。ここでは、植種を行うことにより、L-乳酸発酵可能範囲の検討、発酵可能範囲が広がった理由の検討、および効率的な運転条件の検討を行った。以下に主な結果を記す。

- (5) 湿重量比を植種材料：基質=4：6 の割合で回分式培養を実施したところ、半連続式培養での L-乳酸発酵条件（55°Cで pH 6.0）でも L-乳酸発酵が実施できた。したがって、あらかじめ系内を L-乳酸菌あるいはその生成物（乳酸塩）にて優占状態にしておくことが、半連続式培養において pH 6.0 の条件でも L-乳酸発酵が行えた原因の 1 つであると指摘できた。
- (6) 運転条件範囲の拡大を意図して植種を伴う回分式培養を実施したところ、培養温度は 50°Cまで、pH は 6.5 まで L-乳酸発酵条件を拡大できた。ただし、50°Cで pH 6.0 の条件は L-乳酸発酵に至らなかった。
- (7) 一連の培養結果から、低温化（50°Cまで）および高 pH 化（pH 6.5 まで）に対して、L-乳酸生成量の増加および L-乳酸生成速度の増加が示された。そこで、L-乳酸生成量および L-乳酸生成速度を目的変数に、培養温度と pH を説明変数に重回帰分析を行ったところ、危険率 0.05 未満および同 0.07 での重回帰式が求まった。これによると、低温化および高 pH 化により L-乳酸生成量および L-乳酸生成速度が向上すること、および培養温度と pH が L-乳酸発酵へ与える影響の度合いが示された。植種を伴うことで L-乳酸発酵が実施できた培養条件を、ここで

提示した式によりL-乳酸生成量が向上される順番に示すと、①50℃でpH 6.5、②50℃でpH 5.5、③55℃でpH 6.5となった。この結果は、L-乳酸菌 *B. coagulans* の増殖至適条件(50℃でpH 6.5) や *B. coagulans* の $\alpha$ -アミラーゼ誘導至適条件(50℃でpH 7)へ接近するほどL-乳酸発酵効率が高まることを示していると考えられる。

<参考文献>

- Babu, K.R., Satyanarayana, T., 1993 A, Parametric optimization of extracellular  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans*, Folia Microbiol. 38, 1, 77-80.
- Babu, K.R., Satyanarayana, T., 1993 B. Extracellular calcium-inhibited  $\alpha$ -amylase of *Bacillus coagulans* B-49. Enzyme Microb. Technol., 15, 12, 1066-1069.
- Bohak, I., Back, W., Richter, L., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1998. *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. Syst. Appl. Microbiol. 21, 3, 360-364.
- He, Y.L., Ding, Y.F., Long, Y.Q., 1991. Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 2, 306-309.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A, Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 527-558, Baltimore, Williams and Wilkins.
- Juneja, V.K., Thippareddi, H., 2004. Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast, Int. J. Food Microbiol., Vol. 93, No. 2, pp. 155-163.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. Holt J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2 (pp. 1208-1234). Baltimore, Williams & Wilkins.
- Miller, A.J., Call, J.E., Whiting, R.C., 1993. Comparison of organic-acid salts for *Clostridium botulinum* control in an uncured turkey product, J. Food Protection, Vol. 56, No. 11, pp. 958-962.
- Payot, T., Chemaly, Z., Fick, M., 1999. Lactic acid production by *Bacillus coagulans*: Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. Enzyme Microb. Technol., 24, 191-199.
- Schleifer, K.H., 1986. Gram-positive cocci. Holt J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2 (pp. 999-1103). Baltimore, Williams & Wilkins.
- Shaw, B.G., Harding, C.D., 1989. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 3, 217-223.
- Sneath, P.H.A, 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. Holt J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2, 1104-1200. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Soh, A.L.A., Ralambotiana, H., Ollivier, B., Prensier, G., Tine, E., Garcia, J., 1991.

- Clostridium thermopalmarium* sp. Nov., a moderately thermophilic butyrate-producing bacterium isolated from palm wine in Senegal. System. Appl. Microbiol. 14, 135-139.
- 有馬哲, 石村貞夫, 1987. 多変量解析のはなし. 37-61, 東京図書.
- 今井泰彦, 徳武昌一, 山次信幸, 鈴木勝, 1997, 米麴中の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の測定法, 醸協, J. Brew. Soc. Japan, , 92, 4, 296-302
- 小崎道雄, 内村泰, 岡田早苗, 1992. 乳酸菌実験マニュアル-分離から同定まで-. 126-135, 朝倉書店.
- 白兼孝雄, 徳武昌一, 戸辺光一朗, 鈴木勝, 1996, 米麴中の  $\alpha$ -アミラーゼの簡易測定法, 醸協, J. Brew. Soc. Japan, , 91, 12, 889-894
- 森地敏樹, 大山嘉信, 1982. サイレージにおける微生物の動態. 土と微生物, 24, 7-15.
- 吉野貞蔵, 石崎文彬, 2001. アセトン-ブタノール発酵 (含む酪酸発酵), 発酵ハンドブック, (財) バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会編. 361-362, 共立出版.

## 第4章 乳酸発酵過程の連続モニタリングに関する検討

### 第1節 概説

生ごみの高温 L-乳酸発酵を行った場合、その発酵過程は多糖の加水分解から始まる多段の反応から構成されるため、同じ培養条件の回分式培養を比較しても発酵の進行にはばらつきが大きい。そのため、研究段階では連続的で詳細なサンプリングと乳酸濃度の分析を実施するが、実用化に際しては簡便な方法による乳酸濃度の推定を行えることが望ましい。そこで、本章では、サンプリングおよび分析による直接測定を補完できる間接的な乳酸発酵過程と乳酸濃度を連続的にモニタリングする方法について検討を試みる。

乳酸濃度に限らず、間接的に反応器の状態に関する情報を得る方法としては、例えばサンプリングを要しない pH 計や ORP 計に代表される電極によるデータ採取が一般的である。これらのデータと実測値の照合は、反応器の状態に対して有意義な情報を与えることから、pH 計や ORP 計といった計装設備は反応器の標準設備となっている。また、反応器の付帯設備、例えば攪拌機などに供給される電源電流値を常時監視することによっても、反応器内の状態を推察することは可能である。実用では、付帯設備への過電流検知による非常停止として利用される例が多い。さらに、乳酸発酵に限る場合、第2章でも示したように乳酸発酵中は  $\text{NO}_x\text{-N}$  の残存が確認されることから、例えば  $\text{NO}_x\text{-N}$  電極あるいは ORP 計を用いることで間接的に乳酸発酵の進行を確認することも可能である。以上のような選択肢の中で、本章では、乳酸発酵の進行に伴い供給される中和剤量を監視することを検討した。本研究では中和剤として水酸化ナトリウムを用いたが、水酸化ナトリウムと乳酸の間には乳酸の簡易濃度測定法として中和滴定法が存在することから（小崎ら，1992）、中和剤量の経時消費量が正確に記録されたならば乳酸濃度の経時変化を求めることが可能となる。中和剤量の経時消費量の記録に関しては、例えば指示値を出力できる秤を利用することも可能であるが、中和剤は中和剤供給ポンプにより供給されることから、この中和剤供給ポンプ駆動の記録を行うこととした。実験で用いた中和剤供給ポンプは、多くの実施設における薬注ポンプがそうであるように、定容量ポンプである。そのため、中和剤の供給量（消費量）と駆動時間は比例関係となる。そこで、中和剤供給ポンプの駆動時間から中和剤消費量の経時変化を求め、乳酸濃度の変化を推定する方法の検討を試みる。

本章では、中和剤供給ポンプの駆動を記録する装置を作成し、累積中和剤供給ポンプ駆動時間と実測した中和剤消費量から、中和剤供給ポンプ駆動を記録することの有効性を検証する。まず、中和剤消費量と乳酸生成量の比較を行い、中和剤消費量で乳酸生成量が推定できることを確認する。次に、中和剤供給ポンプ駆動記録から中和剤消費量の経時変化を求め、実測の乳酸濃度の変化と比較を試みる。さらに、中和剤消費量の経時変化は短い時間間隔で記録されることから、瞬間的な乳酸生成速度の算出を試みる。最後に、高 COD 負荷率で行う半連続式培養に本装置を装備し、高負荷率での高温 L-乳酸発酵に対する培養継続性の検証を試みる。以上より、乳酸発酵過程の連続モニタリング手法の提案とその利用効果を明らかにする。

### 第2節 実験方法

#### 2.1 中和剤供給ポンプ駆動のモニタリング手法

本研究の L-乳酸発酵実験では、電源出力の行える pH 計（日伸理化、NPH-660）を用いて pH 値の

制御を行った。その仕組みは、pH 設定値 (pH 下限値) を pH 指示値が下回った際に、出力される電源を用いて中和剤供給ポンプ (東京理化器械、MP-1000) を駆動するというものである (ON/OFF 制御)。そこで、この出力される電源により励磁される直流回路を図 4-1 に示されるように別途設け、この回路を流れる電圧値を常時記録することで中和剤供給ポンプの駆動状況を把握することとした。直流回路の電圧値の記録は、データロガー (キーエンス、NR-1000) により 1 秒ごとのサンプリングとし記録した。

直流回路の起電力には 1.5 V アルカリ乾電池を用いた。したがって、データロガーには図 4-2(A) に示されるように 1 秒ごとに 0 ~ 約 1.5 V の電圧値が記録される。この記録された電圧値について、便宜上仕切り値を 0.75 V に設け、0.75V 以上を中和剤供給ポンプ駆動 ON、以外を OFF とすると、時系列として交互に繰り返される中和剤供給ポンプの駆動記録が図 4-2(B) により得られる。なお、中和剤供給ポンプが OFF の際も ON の際に供給された中和剤により生成された乳酸が中和されることから、図 4-2(B) では供給された中和剤が 1 回の OFF と ON に要する時間で平均的に消費されるように取り扱っている。実験で用いた中和剤供給ポンプは定容量ポンプであるので、中和剤供給ポンプの累積駆動時間および実際に消費した中和剤量から、中和剤供給ポンプ駆動 1 秒あたりの中和剤供給量が求められる。そこで、以下の節では、中和剤供給ポンプ駆動記録を累積中和剤供給量に置き換えて表示する。

## 2.2 半連続式培養における実験条件

第 2 章と同条件の模擬生ごみを、蒸留水にて 2 倍希釈し、生ごみ培地として実験に供した。実験期間中の生ごみは、5 L プラスチック製容器に入れて冷蔵庫に保管した。用いた生ごみの性状は、実験期間中に同生ごみを 3 回分析し、その平均値を解析に使用した。この生ごみ分析値を表 4-1 に記す。分析値は、TS で約 20%、COD で約 18 g-COD/L および糖質で約 9% であり、第 2 章の模擬生ごみの分析値の TS で約 19%、COD で約 21

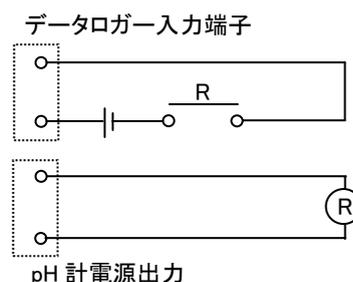


図 4-1 中和剤供給ポンプ駆動記録の仕組み

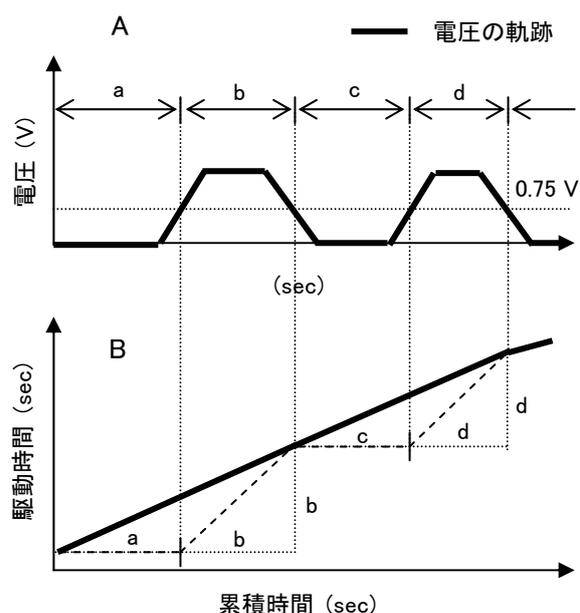


図 4-2 中和剤供給ポンプ駆動記録のデータ処理方法

表 4-1 模擬生ごみの性状

	Total	Soluble
TS (g/L)	198±12	-
SS (g/L)	102±1	-
VTS (%)	96.3±0.1	-
COD-cr (g/L)	179±7	94±8
T-N (g/L)	3.5±0.1	1.2±0.1
T-P (g/L)	-	-
糖質 (g-glucose/L)	91.8±1.7	58.5±1.8
タンパク質 (g-albumin/L)	24.9±1.0	4.8±0.3
有機酸 (g-COD/L) <sup>a</sup>	-	6.6±1.6
乳酸 (g-COD/L) <sup>a</sup>	-	4.9±1.2
pH (-)	4.2±0.1	-

試験期間の平均値 ± σ (n=3)

a; COD基準

g-COD/L および糖質で約 12% と比べると TS 濃度は高いものの、COD および糖質濃度は低い生ごみであった。

本実験では、培養の立上げを早めるために植種を行った。使用した植種材料は後述する第 6 章 3.2 の回分式培養で得た発酵液である。植種材料の性状は、乳酸濃度 36.7 g/L、糖質濃度 28.8 g/L および L-乳酸の光学純度 93.8% である。光学純度が若干低い、これは生ごみ培地中に既に D-, L-乳酸が存在したためである。なお、実験装置は、第 3 章と同様である。

半連続式培養の実験条件を表 4-2 に示す。ここでは、1 日 1 回の発酵液の引抜きおよび生ごみ培地の添加操作（以下、半連続操作）および HRT 2 日（COD 負荷率 45.2 g-COD/L-Reactor/日）の高負荷率培養を 2 系列実施した（Run 5 および Run 6）。半連続式培養の実験期間は 10 日間としたが、最終回の半連続操作の後、発酵液のサンプリングのみを行う回分式培養を継続して 7 日間行った。この回分式培養は、実施した半連続式培養における発酵性（乳酸濃度、収率）を評価する目的で行った。なお、半連続式培養における発酵液の分析は、表 2-3 と同様の項目を 2 日に 1 度の頻度で行った。

表 4-2 半連続培養の培養条件

	Run 5, 6
培養温度 (°C)	55
pH (-)	6
植種材料 (g)	400
給餌間隔 (日)	1
HRT (日)	2
COD 負荷 (g-COD/L-Reactor/日)	45.2
実施期間 (日)	10
評価期間 (日)	8

### 第 3 節 実験結果および考察

#### 3.1 回分式培養への適用

##### 3.1.1 中和剤消費量と生成乳酸量の比較

乳酸濃度の簡易測定法として中和滴定法が存在することは概説で記した。同様の原理が発酵の進行する反応器内でも適用できることを確認する。図 4-3 に、消費した中和剤量（水酸化ナトリウム量）と乳酸生成量（g）の関係を示す。消費した中和剤量は、秤により培養の前後に実測したものである。なお、図 4-3 では、乳酸発酵に至らなかった系（*n*-酪酸発酵など）、トラブルにより破綻した系、および乳酸塩を培養開始時に多量に添加した系（第 5 章 TEST 8）以外の全ての回分式培養結果（41 プロット）を図示している。これによると、消費した中和剤量と生成乳酸量の関係は、乳酸と水酸化ナトリウムの中和の際の化学量論値である 1 mol : 1 mol に非常に接近した結果であることが分かる。したがって、中和剤消費量で生成乳酸量を推測することが可能であることが確認された。

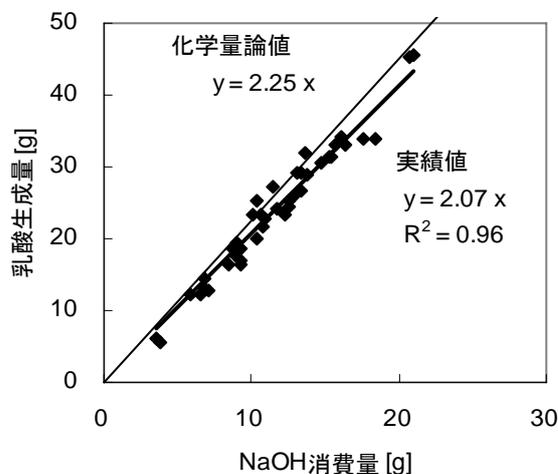


図 4-3 中和剤消費量と生成乳酸量の関係

##### 3.1.2 中和剤消費量と生成乳酸量の経時変化の比較

後述する回分式培養結果も含め、前節で記したモニタリング手法により中和剤消費量の記録が行えた全ての系について、中和剤消費量と乳酸生成量（実測値）の経時変化の比較を図 4-4 に示す。両縦軸は、中和の際の化学量論値に対応させている。

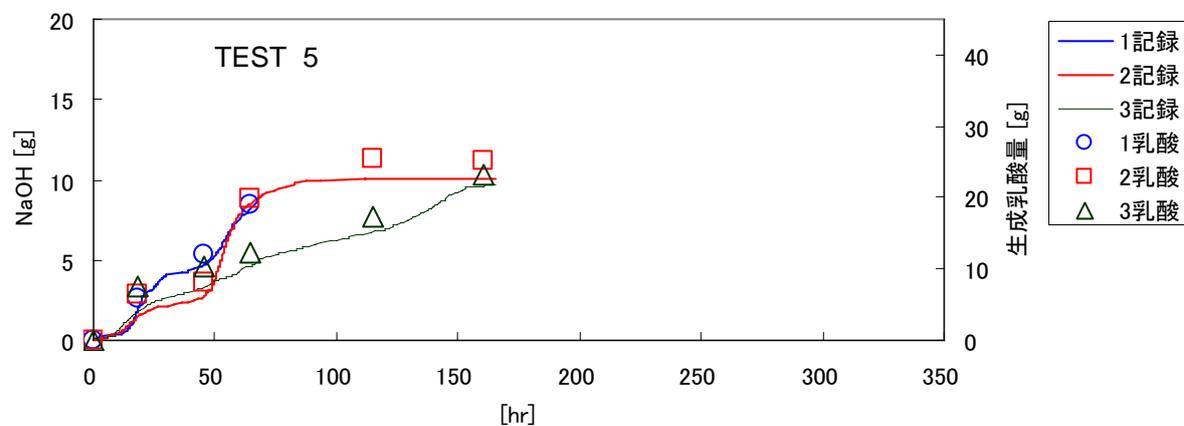
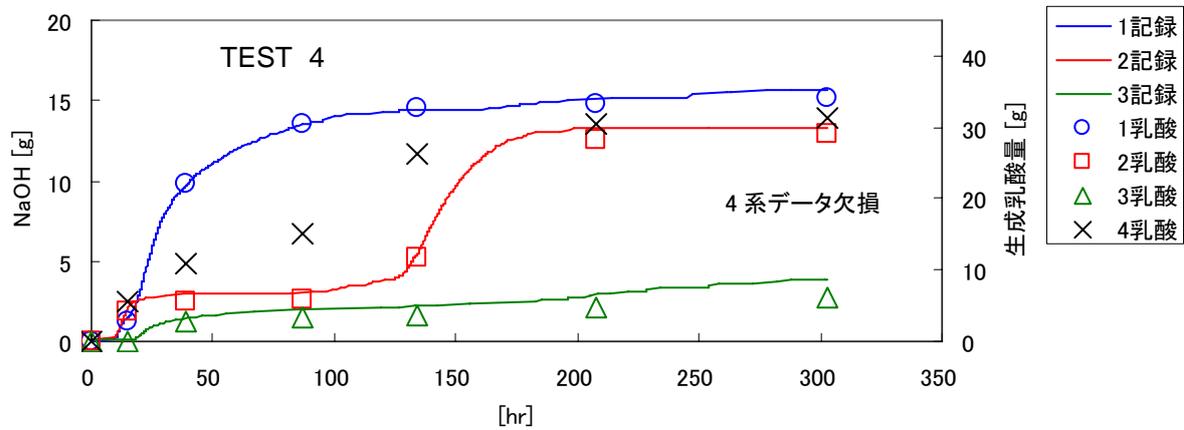
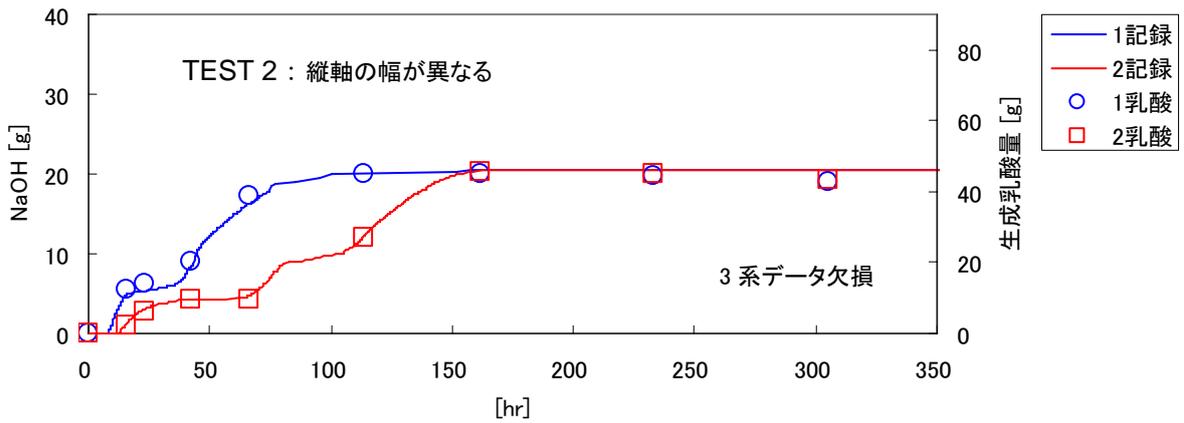
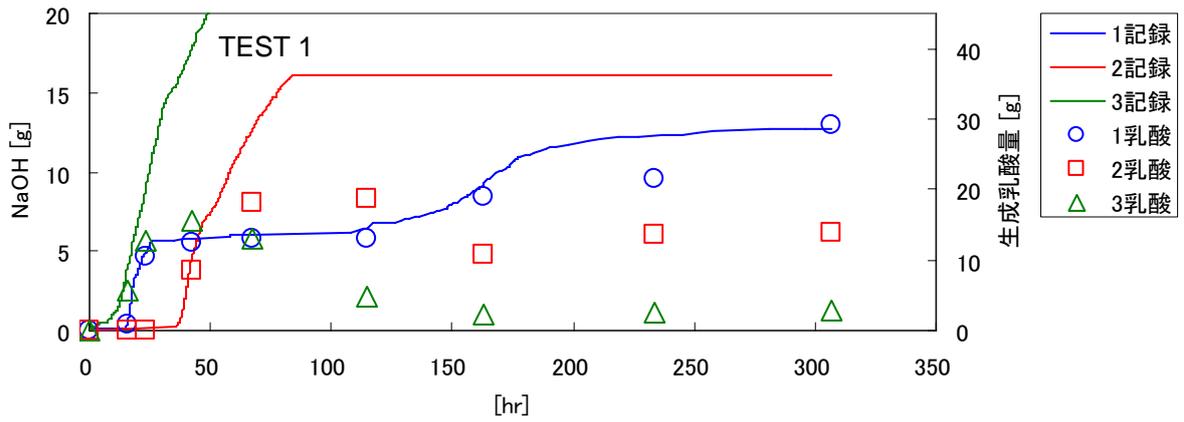


図 4-4 中和剤消費量と乳酸生成量の経時変化比較

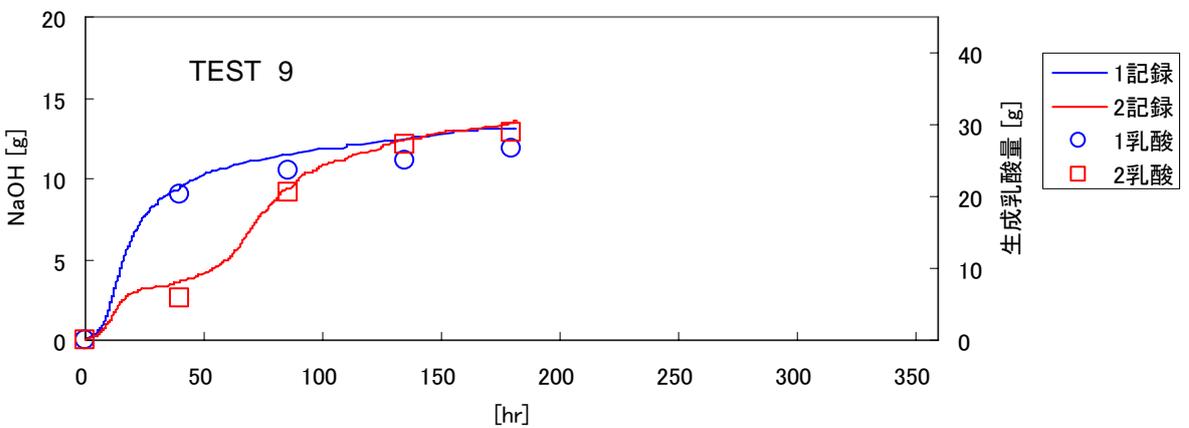
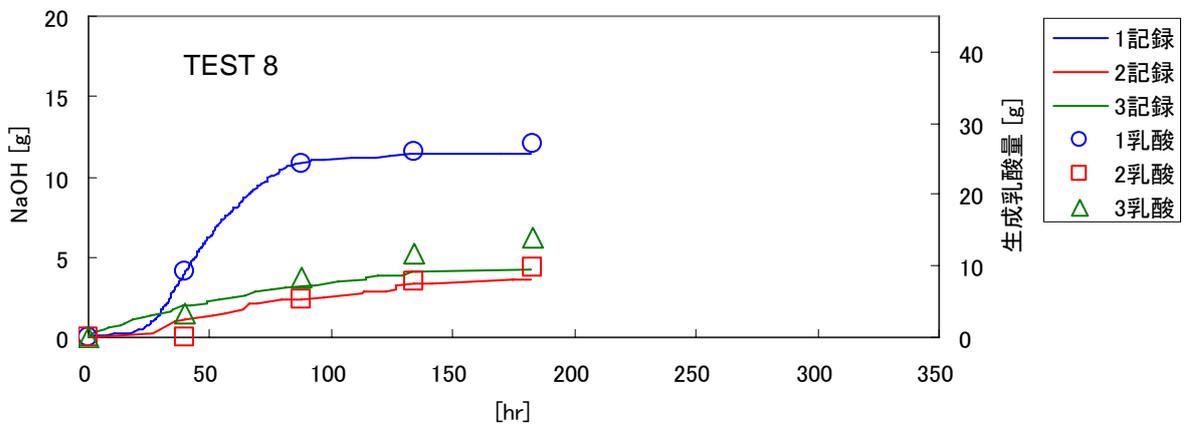
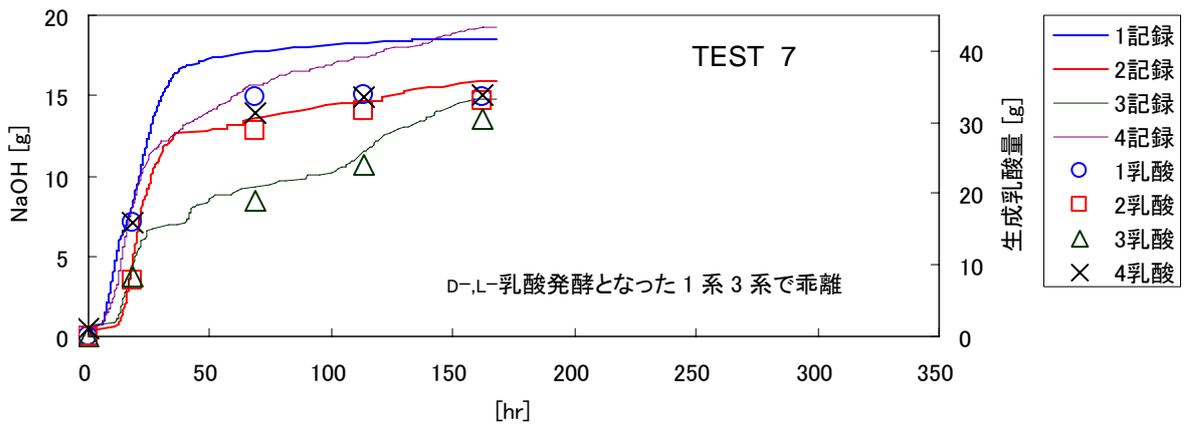
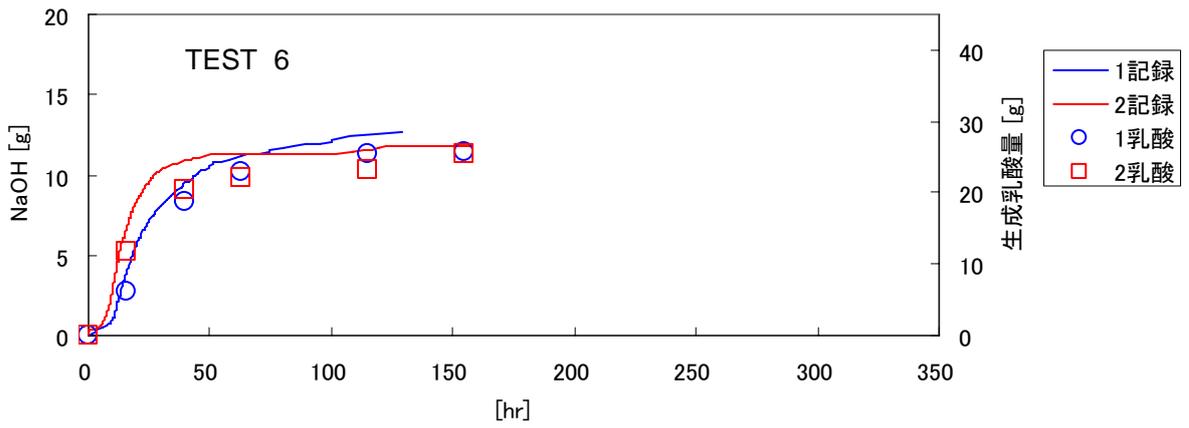


図 4-4 (継続) 中和剤消費量と乳酸生成量の経時変化比較

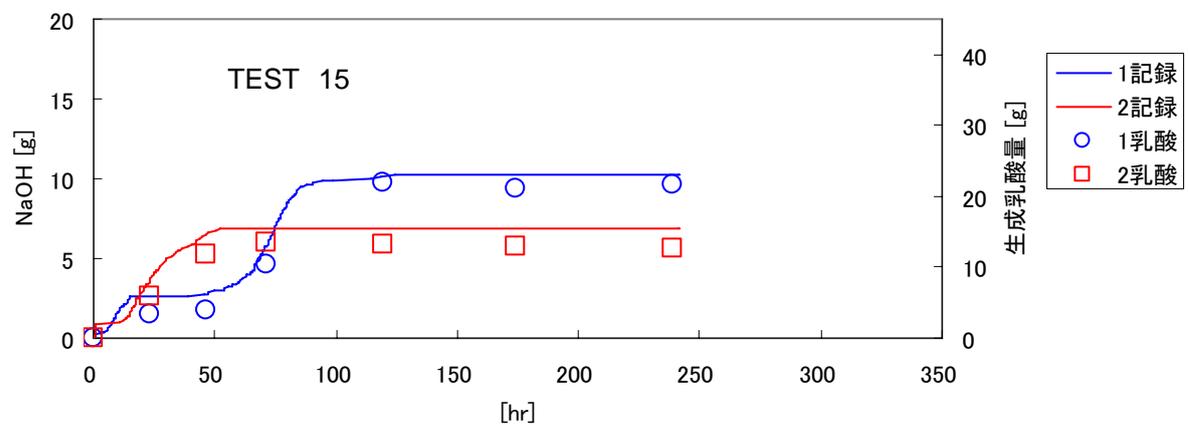
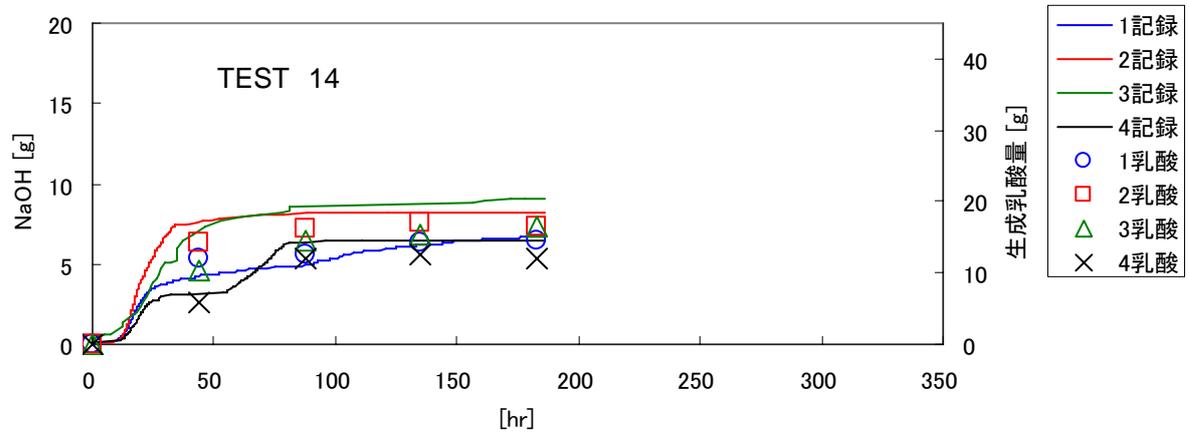
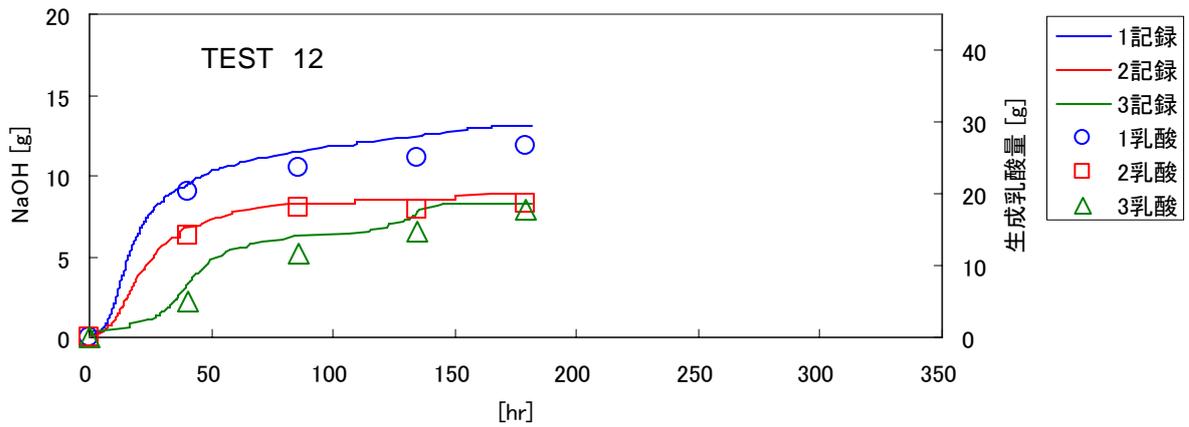
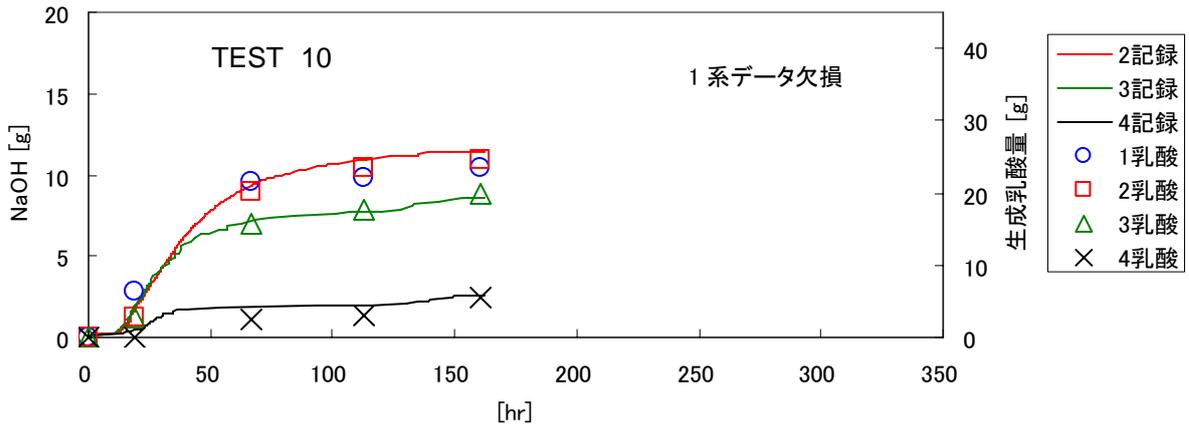


図 4-4 (継続) 中和剤消費量と乳酸生成量の経時変化比較

図 4-4 によると、乳酸発酵のみが起こった場合、本装置により乳酸発酵過程が精度良く記録できていることが分かる。中和剤消費量と乳酸生成量の関係も中和の際の化学量論値により表記できることから、本装置による乳酸生成量の推定も妥当であることが示された。一方、生成した乳酸の消費と *n*-酪酸の生成が起こった TEST 1-2 および TEST 1-3 では、中和剤消費量と乳酸生成量が大きく異なる。これは、乳酸が生成したため中和剤が供給されたものの、生成した乳酸を消費したため、あるいは乳酸以外の有機酸生成においても中和剤が消費されたためである。したがって、本章では、中和剤消費量記録による解析は、乳酸発酵が起こった系についてのみ実施する。

中和剤消費量記録を一般化する場合の課題であるが、TEST 1 にあるように、乳酸発酵以外が起こった場合を検知できる工夫が必要である。乳酸発酵以外が起こった場合の検知に関しては、例えば、第 3 章から酪酸菌の増殖が起こった場合、二酸化炭素などのガス生成が観察され、NO<sub>x</sub>-N の減少も確認されたが、これらを利用して反応器気相部の圧力管理、NO<sub>x</sub>-N 管理あるいは ORP 管理により対応することが可能であると考えられる。さらに、本研究の目的からは、L-乳酸発酵以外が起こった場合の検知も重要となる。この点は、TEST 2 において観察された D-, L-乳酸菌も本研究の L-乳酸菌と同様にガス生成を伴わず、また、乳酸菌であることから NO<sub>x</sub>-N も保存されるため、上記と同様の方法で対処することはできない。したがって、本研究の L-乳酸菌特有の性質を見つけ出し、その項目を計装監視項目とすることが今後必要である。

### 3.1.3 容積あたりの乳酸生成速度の算出

例えば、図 4-4 中の TEST 1-1 の事例を見ると、中和剤消費量の記録は多段階の乳酸発酵の進行を示している。これは、単一組成でなく、加水分解が必要な原料を乳酸発酵に供したためであり、本研究の L-乳酸発酵が多段階の反応の関与により成り立っていることが関与していると考えられる。さらに、同一の培養条件による実験を実施した場合、各試験間で発酵進行のばらつきが大きく、例えば図 4-4 中の TEST 1-1 と TEST 4-1 に示されるとおり培養ごとに乳酸生成の過程は異なる。これは、L-乳酸菌量、活性など微生物側の初期条件に加えて、生ごみ側の複雑性も相まって起こる結果と考えられる。これら複雑性のため、現状では反応速度論を基準とした L-乳酸発酵過程の記述には至っていない。また、一般的に嫌気性での有機物の分解過程の記述に用いられる 1 次式近似に対しても、発酵過程のばらつきが適用を困難とさせる。以上から、本研究では乳酸生成速度において一般化できる速度表記が行えず、第 3 章では便宜的に反応が時間にのみ依存する 0 次反応と仮定し、平均的な乳酸生成速度を示してきた。ただし、第 3 章で求めた平均乳酸生成速度も、実測値を基準に算出した速度であるためサンプリングのタイミングに依存する欠点を有していた (図 3-2 参照)。しかし、図 4-4 で示されている中和剤消費量の軌跡を微分することを考えれば、瞬間ごとの乳酸生成速度が求められる。この瞬間値は、L-乳酸菌量や基質などの実験条件に大きく依存する数値であるが、実際に計測できた数値でもありサンプリングのタイミングに依存せず、この点において客観性を兼ね備える。そこで、瞬間値の中でも最大乳酸生成速度を求め、この速度を他の乳酸発酵研究事例で示される速度と比較し、高温 L-乳酸発酵の評価を試みる。

瞬間的な乳酸生成速度としては、中和剤消費量記録にある中和剤供給ポンプの 1 回の ON/OFF 時間 (1 駆動単位) とその際の中和剤供給量から 1 駆動単位ごとの乳酸生成速度を求めることができる (瞬間値)。ただし、1 駆動単位では中和剤供給量にばらつきが生じるため、平準化した 1 駆動時間と供給中和剤量から乳酸生成速度 (以下、推定乳酸生成速度) を求めることとした (式 4-1)。

$$(\text{推定乳酸生成速度}) = 2.25 \cdot \frac{(\text{平準化した1駆動単位あたりの中和剤消費量})}{(\text{平準化した1駆動単位あたりの要した時間})} \quad (\text{g/L/hr}) \quad (4-1)$$

1 駆動単位ごとに移動する 10 駆動単位の移動平均に対して、中和剤供給量の移動平均差を駆動に要した時間の移動平均差で除することで求めた推定乳酸生成速度を図 4-5 に示す。なお、10 回駆動単位に要する時間は、頻繁に中和剤供給ポンプが駆動する時期において概ね 30~40 分程度の時間に相当する。図 4-5 によると、ここで示した計算方法による推定乳酸生成速度は、瞬間値の突発的な値の影響を排除しつつ変動を追随している様子が示されている。1 時間あたりの速度を算出する時間間隔として 30~40 分程度の時間を考慮している点も加味すると、移動平均による推定乳酸生成速度は短い時間間隔での乳酸生成速度として適当であると考えられる。また、図 4-5 からは、多段で進行する乳酸発酵の時間間隔や乳酸生成速度の変化する時点も求めることができる。これらは、乳酸発酵の実績を積み上げた際に、複雑な発酵過程を読み解く重要な情報を提供するものと考えられる。

本研究にて実施した主な回分式培養の推定乳酸生成速度の最大値（以下、最大推定乳酸生成速度）を表 4-3 にまとめる。これによると、生ごみ培地を原料に高温 L-乳酸発酵を行った場合、 $1.6 \pm 0.9$  g/L/hr 程度の最大乳酸生成速度が得られることが確認された。次に、求めた最大推定乳酸生成速度により高温 L-乳酸発酵を評価するため、他の乳酸発酵研究事例で報告されている容積あたり最大乳酸生成速度と比較を試みる。本研究と同様に多糖の加水分解を伴った乳酸発酵事例である表 2-10 との比較では、 $0.3 \sim 1.1$  g/L/hr（ただし Cheng *et al.* (1991) は除く）の範囲に容積あたり最大乳酸生成速度があることから、本研究は同等以上の速度を有することが分かる。一方、単糖類を基質とし乳酸発酵を行った事例（表 4-4）との比較では、これらの容積あたり最大乳酸生成速度は  $3 \sim 14$  g/L/hr の範囲にあり、本研究の速度は  $1/2$  以下と大きく劣る。ただし、表 2-11 の *B. coagulans* による結果を引用すると、本研究の最大乳酸生成速度が劣る原因は菌種に固有なものでなく、多糖の加水分解の必要性など基質にあると判断される。一般的に、乳酸生成速度は培養条件、例えば、温度、pH、基質量、基質の状態、乳酸菌種および菌量に大きく依存する。一方で、本研究の最大推定乳酸生成速度は、基質の状態や培養条件により速度的には更なる上積みも期待できることから、高温 L-乳酸発酵は他の研究事例と比較して遜色ない発酵速度を有すると考えられる。

サンプリングのタイミングに依存せず求められる最大推定乳酸生成速度と第 3 章で求めた平均乳酸生成速度の比較を行い、0 次反応を仮定することで求めた平均乳酸生成速度の妥当性検討を行う。本研究で行った回分式培養のうち、両速度が算出できる培養系全て（37 点）についてまとめた結果を図 4-6 に示す。図 4-6 によると、1 点を除いて両速度は概ね相関関係を有することが確認された。換言すると、サンプリングのタイミングに依存するものの長期にわたる平均的な速度を示している平均乳酸生成速度は、一意的に求まる推定乳酸生成速度と相関を有することから、両速度とも発酵の進捗に関する特徴を表現する速度と考えられる。なお、ほかと異なる関係を示した 1 点（TEST 1-1）は、瞬間的に速い速度を記録したものの、発酵そのものは緩やかに進行した培養系であった。したがって、この 1 点の発酵を反映する速度としては、緩やかな進行を示している平均乳酸生成速度が相応しいと考えられる。以上から、第 3 章で求めた平均乳酸生成速度は発酵の進行を評価する場合において適当な速度であったと考えられる。

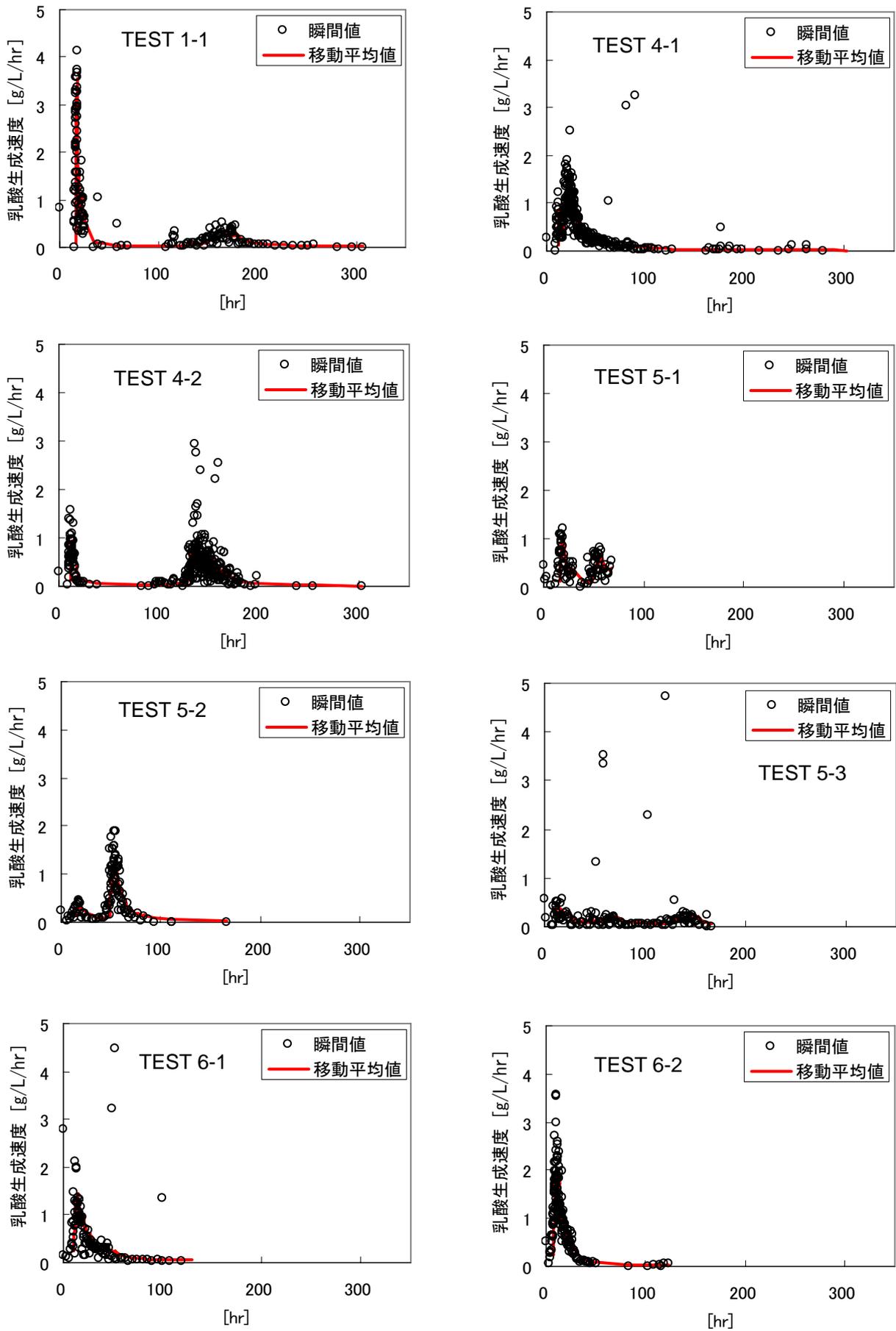


図 4-5 中和剤供給ポンプ駆動記録から求めた乳酸生成速度

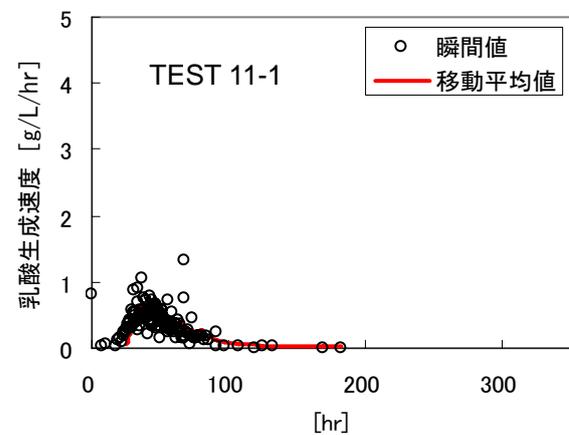
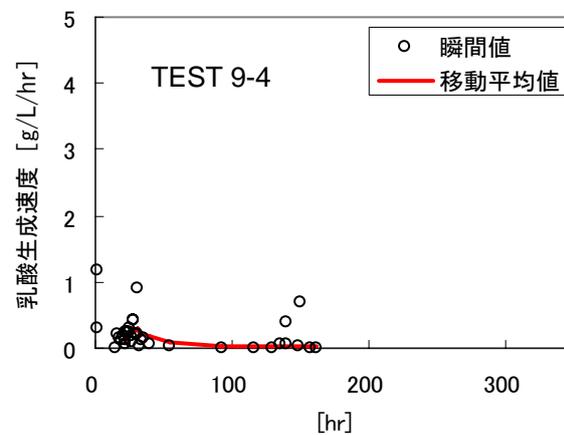
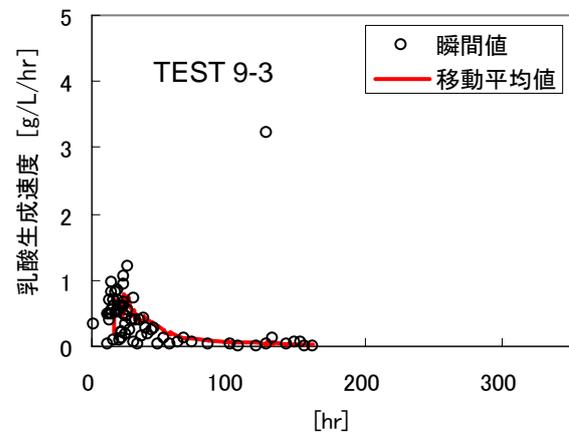
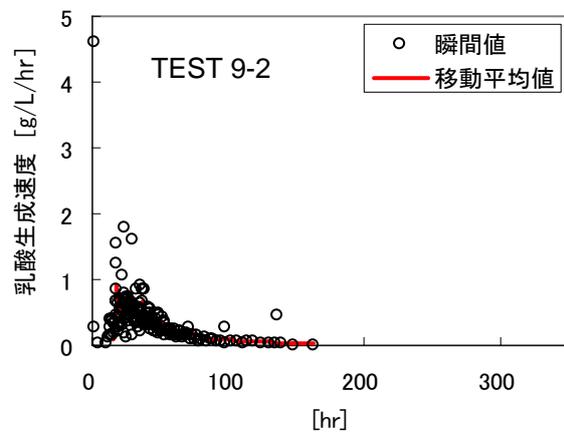
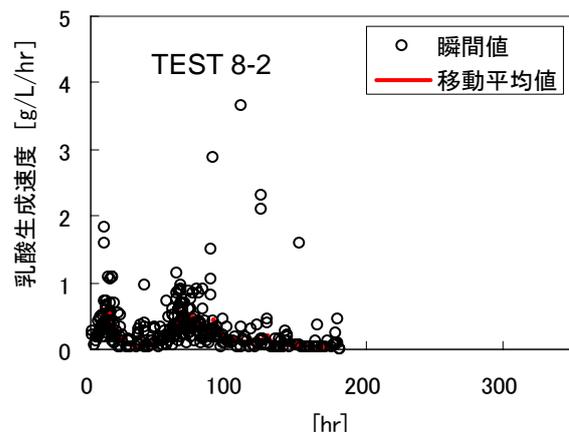
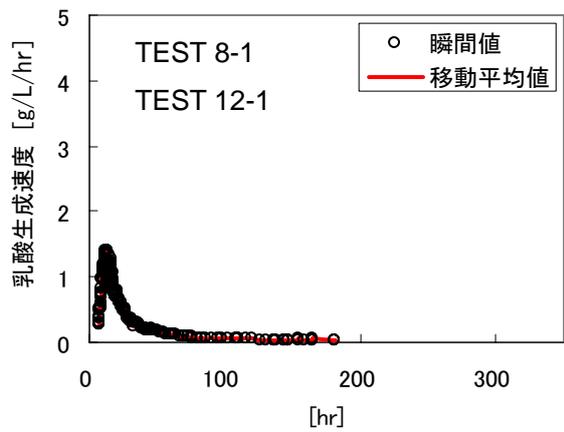
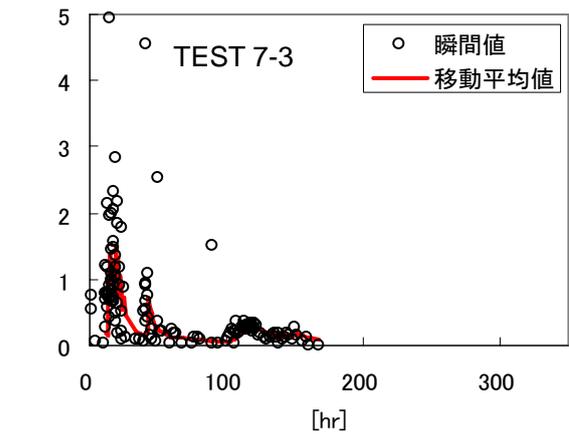
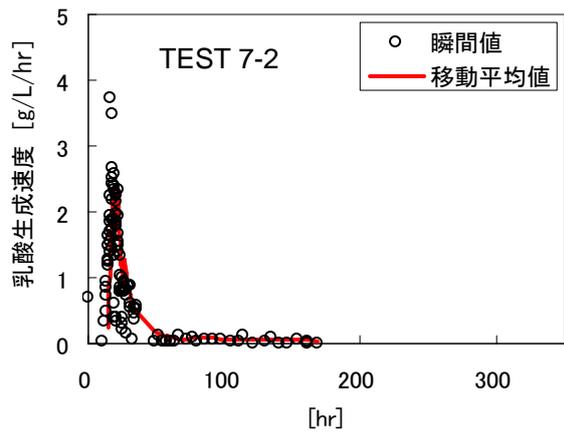


図 4-5 (継続) 中和剤供給ポンプ駆動記録から求めた乳酸生成速度

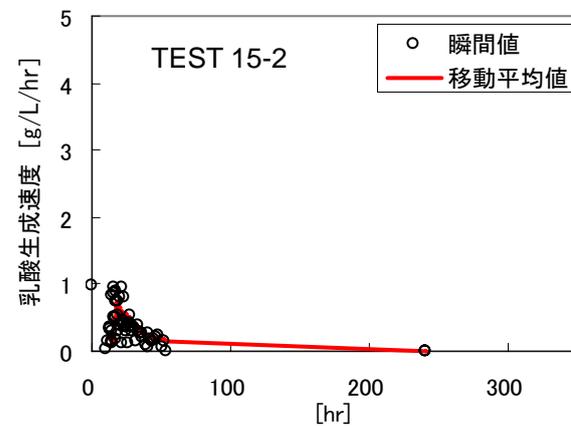
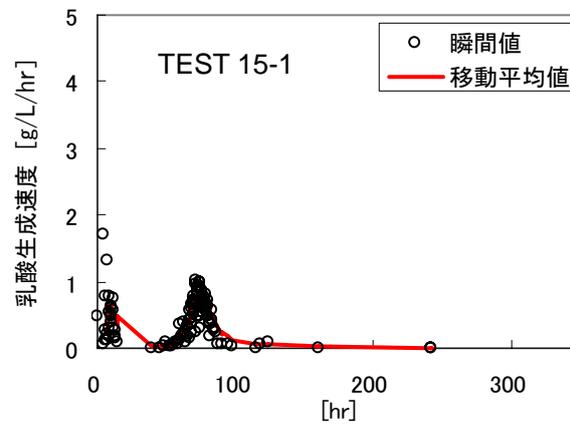
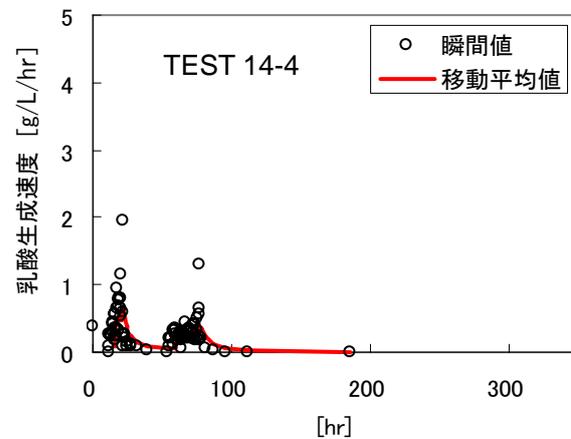
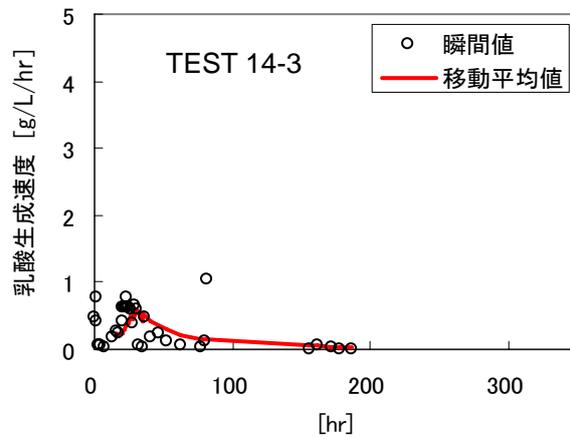
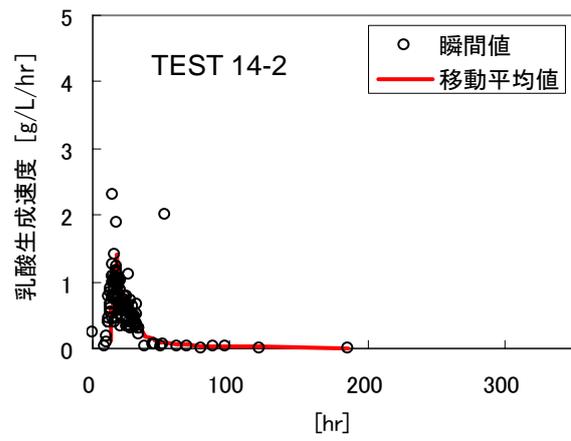
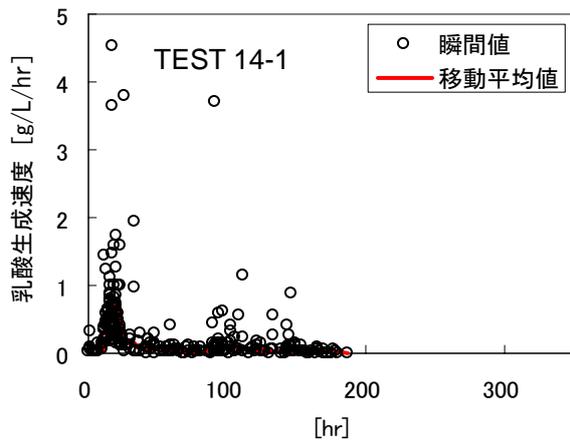
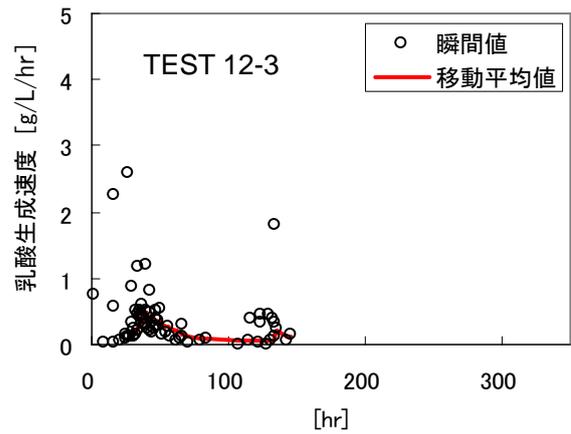
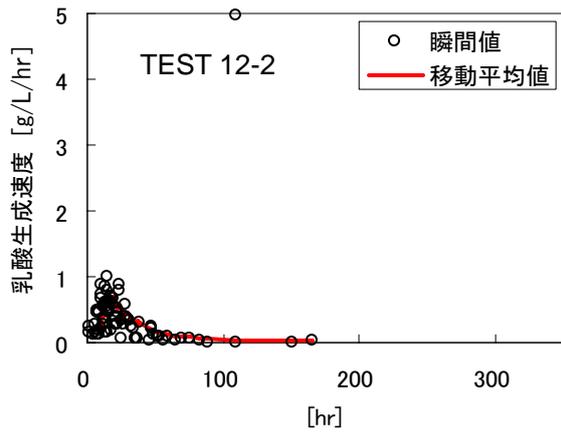


図 4-5 (継続) 中和剤供給ポンプ駆動記録から求めた乳酸生成速度

表 4-3 主な回分式培養における最大推定乳酸生成速度

TEST	乳酸生成速度		培養条件		
	A	B	温度 (°C)	pH (-)	植種材料
1-1	3.54	0.10	55	5.5	-
4-1	1.50	0.35	55	5.5	-
4-2	0.95	0.14	60	5.5	-
5-1	0.98	0.30	50	5.5	400 g
5-2	1.26	0.31	55	6.0	400 g
5-3	0.46	0.15	55	6.0	400 g
6-1	1.45	0.37	50	5.5	400 g
6-2	2.05	0.52	55	6.5	400 g
7-2	2.37	0.42	50	5.5	400 g
7-4	1.48	0.21	50	6.5	400 g
8-1	1.42	0.28	55	5.5	200 g

A; 最大推定乳酸生成速度 [g/L/hr]

B; 平均乳酸生成速度 [g/L/hr]

表 4-4 報告されている乳酸生成速度事例

	Hofvendahl and Hahn-Hagerdal (1997)	Yin <i>et al.</i> (1997)	Gonzalez-Varayr <i>et al.</i> (1996)	Jeantet <i>et al.</i> (1996)	Stein <i>et al.</i> (1991)		
菌種	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
糖質	L-乳酸菌 wheat flour hydrolysate	D-乳酸菌 wheat flour hydrolysate	L-乳酸菌 glucose	L-乳酸菌 glucose	D-乳酸菌 glucose	D-,L-乳酸菌 Sweet cheese whey + lactose	D-乳酸菌 Dehydrated whey
補材料	yeast extract	yeast extract	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MRS broth	MRS broth	yeast extract	hydrolyzed milk + vitamins
培養条件	1 L-Reactor batch 30°C pH 6.0	1 L-Reactor batch 37°C pH 6.0	3 L-Reactor air-lift reactor batch 30°C around pH 6	2 L-Reactor chemostat 36°C pH 6.4	2 L-Reactor chemostat 36°C pH 6.4	2.9 L-Reactor semi-continuous 42°C pH 5.4	6 L-Reactor batch 45°C pH 5.6
最大乳酸生成速度 (g/L/hr)	3.3	3.6	約3	14.4	6.2	7.1	5.0
乳酸収率 (-) <sup>a</sup>	0.88	0.91	0.82	0.96	0.94	-	0.85

a; 消費糖量基準の計算

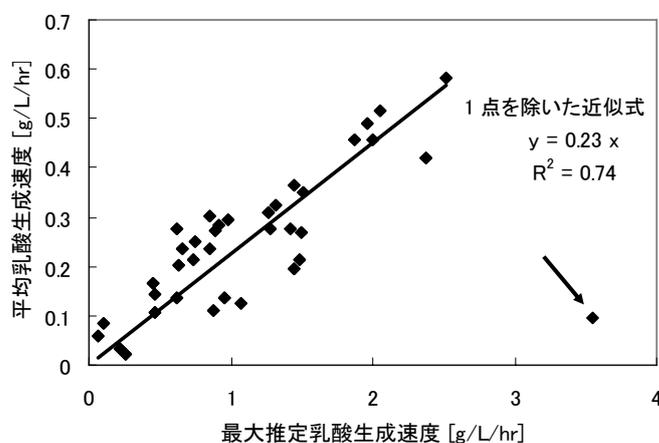


図 4-6 平均乳酸生成速度と最大推定乳酸生成速度の関係

### 3.2 半連続式培養への適用 -Run 5, 6-

#### 3.2.1 概論

前節において、中和剤消費量記録による乳酸発酵過程記録の妥当性および適用可能性を示した。そこで、本節では、この記録を用いて半連続式培養における発酵過程の進行の検討を試みる。その目的は、将来構築するであろう乳酸発酵過程の動力学的表現法への検証データ獲得、あるいは、ここでは高有機物負荷率の半連続式培養を行うことから、半連続操作間隔や発酵進捗に関する知見の収集である。以下では、半連続式培養の実測結果と発酵過程の記録を用いた考察を試みる。

#### 3.2.2 適用結果

半連続式培養 Run 5 および Run 6 の乳酸濃度および L-乳酸の光学純度の経日変化を図 4-7 に示す。植種を行ったこともあり、L-乳酸発酵は培養を開始して 2 日後（最初のサンプリング）には定常に達していたことが分かる。Run 5 および Run 6 の実験結果を表 4-5 にまとめる。これによると、乳酸濃度は両系列とも 25~26 g/L、乳酸の収率は 0.51~0.53 および光学純度は約 93% となった。光学純度に関しては、生ごみ培地中に既に D-, L-乳酸が存在したこともあり第 3 章の結果と比較すると低いものの、第 2 章とは同程度の値となった。なお、生成乳酸に対する L-乳酸の光学純度は 99% 以上であったことから、L-乳酸発酵が進行したことは確認された。また、培養途中において *n*-酪酸やガスの生成も確認されなかった。

図 4-8 にろ過発酵液中の COD 値および主要な COD 成分の経日変化を示す。これによると、糖質の COD 換算値は D-COD 中の約 31% を占めており、これは第 2 章の半連続式培養 (Run 1 および Run 3) と大きく異なり非常に高い結果であった。ただし、発酵液中の糖質濃度は半連続式培養 Run 1-5 (HRT 3 日、COD 負荷率 34.4 g-COD/L-Reactor/日) が 29.6 g-glucose/L (評価期間平均) に対して、Run 5 および Run 6 は約 30 g-glucose/L であったことから、残糖量としては同程度であった。また、乳酸の収率を比較すると、Run 1-5 が 0.58 に対して Run 5 および Run 6 は 0.5 程度であることから、HRT (COD 負

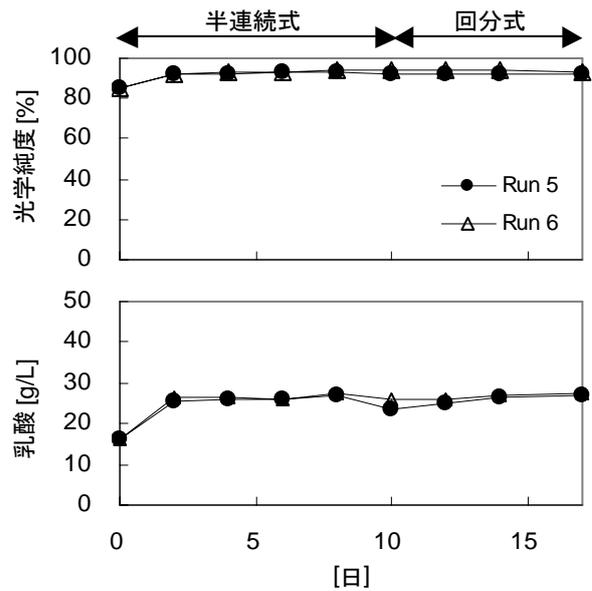


図 4-7 半連続式培養における光学純度と乳酸濃度の推移

表 4-5 半連続式培養の培養結果

	Run 5	Run 6
乳酸濃度 (g/L)	25.4±1.1	26.4±0.5
乳酸収率 (-)	0.51±0.02	0.53±0.01
乳酸のD-CODに対する割合 (%) <sup>a</sup>	43.3±1.2	44.9±0.08
乳酸の有機酸に対する割合 (%) <sup>a</sup>	96.3±1.2	96.3±0.7
乳酸の光学純度 (%)	92.5±0.5	93.3±0.6
生成乳酸の光学純度 (%)	99.0±0.5	99.5±0.7

試験期間の平均値±σ (n=5)

a: COD基準

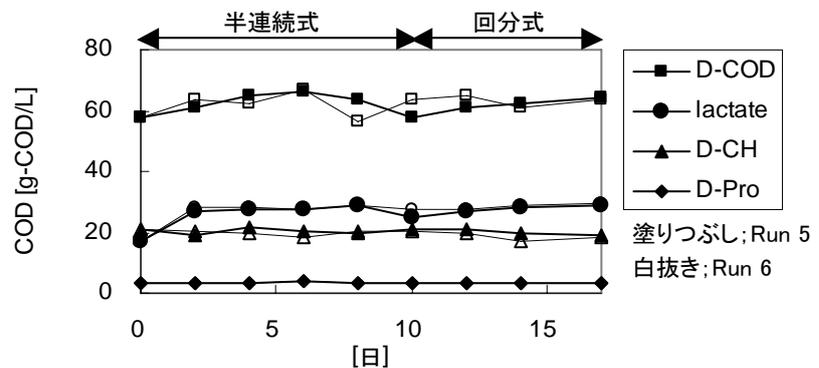


図 4-8 ろ過発酵液中の COD および主要な COD 成分の推移

荷率)を考慮すると適当な収率と考えられる(図 2-7 参照)。以上より、Run5 および Run 6 では、糖質の可溶化は進行しているものの発酵性は第 2 章の半連続式培養の延長上にあったことが確認された。

高負荷率での半連続式培養とその後継続して行った回分式培養の発酵性の比較を行うと、図 4-7 から回分式培養時において乳酸濃度の増加は確認されなかった。つまり、半連続式培養の培養時間である 24 時間以内に乳酸発酵はほぼ完了していると考えられる。1 日 1 回の半連続操作、HRT 2 日 (COD 負荷率 45.2 g-COD/L-Reactor/日) の培養条件は、実測値を基準に評価した場合、L-乳酸発酵に十分な条件であったと考えられる。

Run 5 および Run 6 の乳酸発酵過程を記録した結果を図 4-9 に示す。図中の破線は、乳酸生成量の平均値を中和に要する中和剤量へ化学量論値を基に換算した量を示している。図 4-9 によると、ここでも乳酸発酵過程の記録(中和剤消費量 (g)、RUN 5; 平均: 5.5 分散: 0.8、RUN 6; 平均: 5.9 分散: 0.9) が平均生成乳酸量 (中和剤換算量 (g)、RUN 5; 平均: 5.5 分散: 0.9、RUN 6; 平均: 5.7 分散: 0.8) と概ね一致することが示された。したがって、中和剤消費量により実際の乳酸発酵を再現できることが確認された。

図 4-9 中の両系列の乳酸発酵過程、特に培養の中盤までに着目すると、発酵過程は大きく 3 つに分けられることが分かる。すなわち、生ごみ培地の添加を行った直後から乳酸生成が本格化するまでの遅滞期、それに続く乳酸生成が活発に起こる発酵期、その後緩やかに乳酸生成が継続する後発酵期である。それぞれの期間の定義は、縦軸に対数軸の中和剤供給ポンプの累積駆動時間を取り(図 4-10 参照)、直線となる区間を発酵期、半連続操作時から発酵期までを遅滞期、発酵期以降で次の半連続操作までを後発酵期とした。半連続操作ご

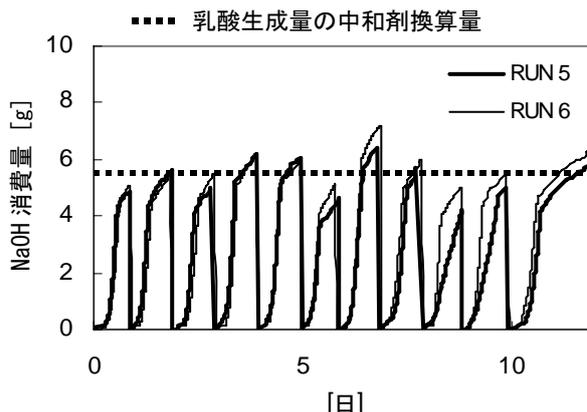


図 4-9 半連続式培養における中和剤消費量記録

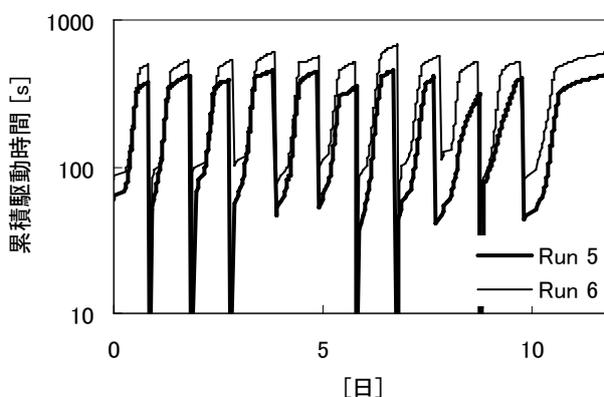


図 4-10 発酵過程の区分例 (遅滞期、発酵期および後発酵期)

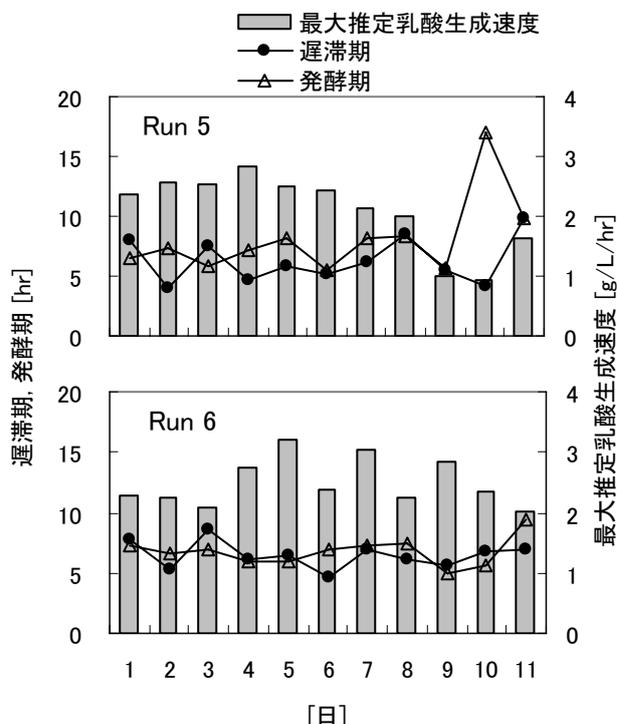


図 4-11 半連続操作ごとの発酵過程期間および最大推定乳酸生成速度の変化

との両系列における発酵過程期間の変化を図 4-11 に示す。また、図中には、半連続操作ごとの発酵期における最大乳酸生成速度を、前節に算出法を記した推定乳酸生成速度の最大値として求めた値も示す。これによると、遅滞期および発酵期に要する時間が安定していること（Run 5 の後半を除く）より、RUN 5 および RUN 6 とも半連続式培養の開始 1 日目から定常的な L-乳酸発酵が進行していたことが示された。半連続式培養を模擬した植種条件としたため、培養初日より安定的な L-乳酸発酵が起こったものと考えられる。

半連続式培養の長期安定性に関しては、RUN 5 の後半において、発酵期の延長（最大推定乳酸生成速度の低下）が確認された。一方、RUN 6 では安定して乳酸生成が行えた。ただし、RUN 6 も最終の半連続操作における発酵期が系列内で最長時間となっている。発酵期に要する時間に関するこれらの結果は、高有機物負荷であるここでの培養条件において長期間にわたる運転継続が困難となる可能性を示していると考えられる。

乳酸発酵過程の記録より得られた結果をまとめると、半連続式培養の立上げについては植種を行うことの有効性が示された。長期間にわたる培養の安定性については、培養の継続に伴い最大推定乳酸生成速度の低下とそれに付随する発酵期に要する時間の延長が確認された。このことは、ここで行った半連続式培養の運転条件に対して、有機物負荷率が過度であったことを示している。そこで、同培養の長期間にわたる安定的な継続のためには、COD 負荷率を緩和した培養条件へと変更することが望ましい。COD 負荷率に対するこの指摘は、1 日 1 回程度のサンプリングと分析からでは導けない結果であり、発酵過程を記録することの有効性を示したものと考えられる。一方、遅滞期に関しては、培養の継続に拘わらず RUN 5（平均；6.3 hr，分散；3.6）および RUN 6（平均；6.5 hr，分散；1.3）ともほぼ安定した時間を要していた。ここでの遅滞期を微生物増殖曲線の遅滞相に置き換えて考えると（宗宮と津野，1997）、増殖に備えて必要酵素の誘導などを行う期間と考えられることから、培養条件の有機物負荷率に拘わらず一定の時間を要するものと考えられる。そこで、極端に半連続操作間隔を短くした、つまり、連続式培養のような培養を行わない限り、半連続操作ごとに遅滞期として 8 時間程度（ $\bar{x} + \sigma$ ）の時間が必要となると考えられる。遅滞期時間が 8 時間程度と長いことから、半連続操作間隔は長めに取りの方が有利となる可能性が指摘される。ただし、COD 負荷率から HRT や発酵液の引継ぎ量が定まること、特に、第 3 章に記したとおり、50℃付近あるいは pH 6.5 付近など効率的な温度および pH 条件での L-乳酸発酵では半連続操作直後に L-乳酸菌や乳酸塩濃度が高まっている必要があることも考慮し半連続操作間隔を設定する必要がある。第 2 章の結果も踏まえると、本研究のような半連続式培養を、生ごみを 2 倍希釈した生ごみ培地を基質として実施する場合、HRT 5 日程度（COD 負荷率 20 g-COD/L-Reactor/日）および半連続操作間隔は 1~2 日程度が望ましいと考えられる。

#### 第 4 節 結語

本章では、乳酸発酵の進行を間接的にモニタリングする方法として、中和剤供給ポンプの駆動記録による乳酸発酵過程の記録を提案し検証した。また、乳酸発酵過程の記録を、高有機物負荷率で設定した半連続式培養にも適用し、高負荷率条件に対する乳酸発酵の培養継続性の検討にも利用した。以下に本章で得られた主な結果をまとめる。

- (1) 回分式培養において、秤により実測した中和剤消費量と生成した乳酸量の間には非常に高い相関関係（ $R^2=0.959$ 、 $n=41$ ）があることが確認された。また、両者の関係（ $y=2.07x$ 、 $y$ ；乳

酸量 (g)、x; 水酸化ナトリウム量 (g) は中和の際の化学量論値 ( $y=2.25x$ ) に接近した結果であった。これにより、乳酸発酵の進行する発酵槽において中和剤消費量から乳酸生成量を推定できることが示された。

- (2) 中和剤供給ポンプの駆動記録より求めた中和剤消費量の経時変化と発酵槽内の乳酸濃度の経時変化を比較すると、中和の際の化学量論値による換算により双方の経時変化が一致することが確認された。ただし、乳酸発酵以外の発酵、例えば有機酸発酵が起こった場合も中和剤は消費されることから、そのような場合に観察されるガス生成や発酵液中の  $\text{NO}_x\text{-N}$  消費 (第3章に記載) を利用し、反応器気相部のガス圧検知、電極による発酵液中の  $\text{NO}_x\text{-N}$  測定あるいは ORP 測定を実際の培養では併用することが望ましいことも指摘された。
- (3) 中和剤消費量の経時変化を利用することで、短い時間間隔における乳酸生成速度 (推定乳酸生成速度) の算出方法を提示した。ここでは、中和剤供給ポンプの1回の ON および OFF 時間が最小の時間間隔として求まるが、ばらつきを避けるため10回にわたる中和剤供給量の移動平均の次の移動平均との差を、要した時間の移動平均の差で除する方法により推定乳酸生成速度を求めた。2倍希釈した模擬生ごみを基質とし、培養温度  $55^\circ\text{C}$  で pH 5.5 の条件による高温 L-乳酸発酵の最大推定乳酸生成速度の実績値としては、 $1.6 \pm 0.9 \text{ g/L/hr}$  が提示された。
- (4) 1日1回の発酵液引抜きおよび基質の添加操作、HRT 2日 (COD 負荷率  $45.2 \text{ g-COD/L-Reactor/日}$ ) および培養温度  $55^\circ\text{C}$  で pH 6.0 における高有機物負荷の半連続式培養を実施した結果、乳酸濃度約  $25 \text{ g/L}$ 、乳酸の収率約 0.5 および生成乳酸の L-乳酸光学純度 99%以上が10日間の培養にわたって得られた。
- (5) 上記半連続式培養の中和剤供給ポンプの駆動記録を利用した乳酸発酵過程の記録によると、同培養は培養の後半において乳酸生成速度の著しい低下が観察された。したがって、生ごみ培地を(4)で示した培養条件に供するのみの高温 L-乳酸発酵では COD 負荷率  $45.2 \text{ g-COD/L-Reactor/日}$  による長期間の半連続式培養は継続困難であることが示された。

#### <参考文献>

- Gonzalez-VaraYR, G., Pinelli, S., Rossi, M., Fajner, D., Magelli, F., Matteuzzi, D., 1996. Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens* DSM 20004 in continuous fermentation. J. Ferment. Bioeng. 81, 6, 548-552.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B., 1997. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci. Enzyme Microb. Technol. 20, 4, 301-307.
- Jeanet, R., Maubois, J.L., Boyaval, P., 1996. Semicontinuous production of lactic acid in a bioreactor coupled with nanofiltration membranes. Enzyme Microb. Technol. 19, 614-619.
- Stein, M.A.C.F., Kulay, L.A., Borzani, W., 1991. Semi-continuous lactic fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaricus*, World J. Microbiol. Biotechnol., 7, 470-474.

Yin, P.M., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Park, Y.S., Okabe, M., 1997. Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. J. ferment. bioeng., 84, 3, 249-253.

小崎道雄（監修），1992. 乳酸菌実験マニュアルー分離から同定までー. 115-120, 朝倉書店.  
宗宮功, 津野洋, 1997. 水環境基礎科学, 121-125, コロナ社.

## 第5章 生ごみの高温 L-乳酸発酵に対する阻害に関する検討

### 第1節 概説

前章までにおいて、模擬生ごみを原料に、非滅菌環境における高温 L-乳酸発酵の運転条件に関する検討を実施してきた。一連の検討により、模擬生ごみを原料とした場合の高温 L-乳酸発酵の培養方法および効率は提示された。そこで、本章以降では、高温 L-乳酸発酵の対象となる原料の拡大化に対する基礎的な検討を試みる。原料の拡大化に関しては、原料そのものの資化性に加えて、L-乳酸発酵に対する阻害についても考慮する必要がある。

一般的に酵素反応における阻害については、基質阻害や生成物阻害が考慮される。特に嫌気性発酵では、必ず電子受容体として代謝生成物の蓄積を伴い、これにより生成物阻害を引き起こすことが指摘されている（石崎, 2000）。そこで、本章では、まず①生成物である乳酸阻害を検討する。乳酸は、中性付近においてそれ自体が乳酸菌以外の細菌に対して抗菌作用を示す物質であるが（松田, 1999）、高濃度となれば乳酸菌自体にも影響を及ぼす。なお、正確には生成された乳酸は pH 値維持のため中和剤により乳酸塩とされるため、ここでは乳酸塩による阻害を検討する。次に、乳酸発酵の停止しない範囲における生成乳酸の高濃度化による反応器の小型化を目的に、②基質濃度を高めた場合に起こると考えられる基質阻害について検討する。ここでは、加水分解を要しないグルコースを基質として検討を試みる。また、事業系の生ごみを原料として考慮した場合、食塩に代表される塩の混入による影響も把握しておく必要があると考えられる。耐塩性については、乳酸菌同定法の 1 つとされていることから分かるとおり、乳酸菌に対しては整理された情報が存在する（小崎ら, 1992）。例えば、漬物の製造時においても、食塩濃度を高め（5～10%）に保つことで意図した乳酸菌の繁殖を促し、間接的に特定種の乳酸菌の耐塩性を利用している（橋場ら, 1996）。ただし、高温 L-乳酸発酵での L-乳酸菌である *Bacillus coagulans* は、一般的な乳酸菌の範疇に含まれないため耐塩性に関する情報が乏しいと考えられる。そこで、③塩濃度による阻害（耐塩性）についても検討を試みる。

### 第2節 実験方法

#### 2.1 基質、植種材料および添加材料

基質である模擬生ごみは、第3章と同様のものを用いた（表 3-1 参照）。また、模擬生ごみの希釈は蒸留水を用いて行った。

植種材料は、同様の模擬生ごみから培養温度 55°C で pH 5.5 の条件により、十分に L-乳酸発酵を行った発酵液を使用した。本章で使用した植種材料の性状を表 5-1 にまとめる。

表 5-1 植種材料の性状

	TEST 8	TEST 9	TEST 10	TEST 12
	Seed 1	Seed 1	Seed 1	Seed 2
培養温度 (°C)	55	55	55	55
培養pH (-)	5.5	5.5	5.5	5.5
培養時間 (hr)	303	161	166	166
乳酸濃度 (g/L)	34.3	35.2	24.2	33.8
糖質濃度 (g-glucose/L)	18.7	25.5	34.6	24.4
光学純度 (%)	99.2	99.0	98.2	98.3

TEST 10では、2つの植種材料を混合して実験に使用した。

添加材料としては、本章では、グルコース（和光純薬工業製、D(+)-グルコース、和光一級）、L-乳酸（和光純薬工業、L(+)-乳酸、和光特級）および塩化ナトリウム（和光純薬、試薬特級）を使用した。

## 2.2 実験条件

本章では、5回の回分式培養（TEST 8～TEST 12）を実施した。実験条件を表 5-2 にまとめて示す。各実験の培養時間は、半連続式培養における培養時間を参考に生ごみ培地の HRT が 5～10 日程度となる時間とした。

表 5-2 回分式培養の実験条件

TEST 8	1	2	3	
培養温度 (°C)	55	55	55	
pH (—)	5.5	5.5	5.5	
培地	生ごみ 400 g L-乳酸 23 g/L 中和剤 所定pHまで 蒸留水 800 gまで	生ごみ 400 g L-乳酸 56 g/L 中和剤 所定pHまで 蒸留水 800 gまで	生ごみ 400 g L-乳酸 82 g/L 中和剤 所定pHまで 蒸留水 800 gまで	
植種材料	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g	
・乳酸塩影響の確認				
TEST 9	1	2		
培養温度 (°C)	55	55		
pH (—)	5.5	5.5		
培地	2倍希釈生ごみ 800 g	4倍希釈生ごみ 800 g グルコース 20 g		
植種材料	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g		
・模擬生ごみ中の栄養素量の確認				
TEST 10	1	2	3	4
培養温度 (°C)	55	55	55	55
pH (—)	5.5	5.5	5.5	5.5
培地	2倍希釈生ごみ 600 g	2倍希釈生ごみ 600 g グルコース 50 g	2倍希釈生ごみ 600 g グルコース 100 g	2倍希釈生ごみ 600 g グルコース 150 g
植種材料	L-乳酸発酵液 400 g	L-乳酸発酵液 400 g	L-乳酸発酵液 400 g	L-乳酸発酵液 400 g
・基質グルコース影響の確認				
TEST 11	1			
培養温度 (°C)	55			
pH (—)	5.5			
培地	2倍希釈生ごみ 1,000 g グルコース 200 g			
植種材料	—			
・基質グルコース影響(長期)の確認				
TEST 12	1	2	3	
培養温度 (°C)	55	55	55	
pH (—)	5.5	5.5	5.5	
培地	2倍希釈生ごみ 800 g	2倍希釈生ごみ 800 g NaCl 20 g	2倍希釈生ごみ 800 g NaCl 50 g	
植種材料	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g	
・塩化ナトリウム影響の確認				

TEST 8 は、生ごみに段階的に乳酸塩を添加し、各系列の乳酸塩による影響を比較する。無希釈の模擬生ごみに対して、TEST 8-1 では L-乳酸 23 g/L、TEST 8-2 では L-乳酸 56 g/L、および TEST

8-3 では L-乳酸 82 g/L を添加し、次に培養中使用する中和剤（10 N 水酸化ナトリウム溶液）を用いて pH 5.5 に調整し、最後に各系列とも 800 g（湿重）となるように蒸留水にてメスアップを行い実験培地を作成した。ここでは、植種材料を 200 g/L とした。

TEST 9 は、生ごみにグルコースを添加した場合に、培地中に存在する糖質以外の栄養素量が添加したグルコースの発酵に対して充分存在することの確認を目的とする。培養系列は、TEST 9-1 の模擬生ごみ 2 倍希釈の系と TEST 9-2 の模擬生ごみ 4 倍希釈 + グルコース 20 g の系である。TEST 9-2 において添加したグルコース量の根拠は、希釈により減少した培地中の糖質量の補完である。なお、植種材料は 200 g/L とした。

TEST 10 は、2 倍希釈の模擬生ごみに段階的にグルコースを添加し、各系列の L-乳酸発酵性を比較する。培養系列は、TEST 10-1 の無添加、TEST 10-2 のグルコース 50 g/L 添加、TEST 10-3 のグルコース 100 g/L 添加、および TEST 10-4 のグルコース 150 g/L 添加である。TEST 10 では実際の半連続式培養への適用を考慮し、植種材料を 400 g/L とした。

TEST 11 は、2 倍希釈の模擬生ごみに 200 g/L のグルコースを添加し、植種材料を利用せず L-乳酸発酵を行う。植種材料を用いないことから過剰なグルコース存在下における L-乳酸発酵の進行性を確認するとともに、長期間の培養による L-乳酸の終端濃度を求めることを目的とする。

TEST 12 は、2 倍希釈の模擬生ごみに塩化ナトリウムを段階的に添加し、各系列の塩化ナトリウムに対する影響を比較する。培養系列は、TEST 12-1 の無添加、TEST 12-2 の塩化ナトリウム 20 g/L 添加、および TEST 12-3 の塩化ナトリウム 50 g/L 添加である。ここでは、植種材料を 200 g/L とした。

実験装置は第 3 章と、水質分析項目は第 2 章と同様である。

## 2.3 阻害経験式

阻害の影響を評価するため、一般的な“基質－生成物”間の生成速度式（式 5-1、海野ら、1992）への実験結果の適合を試みる。

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot \nu \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (5-1)$$

ただし、 $P$ ；乳酸（g/L）、 $S$ ；糖質（g-glucose/L）、 $k$ ；糖質－乳酸の転換率（g/g-glucose）、 $\nu$ ；最大比乳酸生成速度（1/hr）、 $K_s$ ；基質に対する飽和定数（g-glucose/L）

なお、本研究では、培養初期の糖質量に対する乳酸生成量を収率； $Y$ （0.5～0.6）として  $k$  を包括し評価しているため、 $k=1$ 、 $S' = Y \cdot S$  とする。また、グルコースからの乳酸発酵の場合、理論上グルコース 1 g から乳酸 1 g 生成されるため、 $k$  あるいは  $Y$  の単位は無次元とできる。

$$\frac{dP}{dt} = \nu \cdot \frac{S'}{K_s + S'} \quad (5-1')$$

ただし、 $S'$ ；消費糖質（g-glucose/L）

式 5-1' への乳酸阻害項の付加については、Ohara *et al.*（1992）によると、乳酸阻害の阻害形式が *Streptococcus faecalis* の場合非拮抗型を示すとされることから、非拮抗型の付加とする（式 5-2）。

$$\frac{dP}{dt} = \nu \cdot \frac{S'}{K_s + S'} \cdot \frac{K_p}{K_p + P} \quad (5-2)$$

ただし、 $K_p$ ；乳酸に対する飽和定数（g/L）

基質阻害については、一般的な基質阻害式（式 5-3、海野ら，1992）を用いる。

$$\frac{dP}{dt} = \nu \cdot \frac{S'}{Ks + S'(1 + S'/Kes)} \cdot \frac{Kp}{Kp + P} \quad (5-3)$$

ただし、 $Kes$ ；基質に対する阻害定数（g-glucose/L）

塩化ナトリウムに対する塩阻害については、活性汚泥の硝化に対して塩化ナトリウムの影響を非拮抗型で評価している例（Kargi and Dinçer, 1999）を参考に、非拮抗型の付加とする（式 5-4）。

$$\frac{dP}{dt} = \nu \cdot \frac{S'}{Ks + S'} \cdot \frac{Kp}{Kp + P} \cdot \frac{Kn}{Kn + N} \quad (5-4)$$

ただし、 $N$ ；塩化ナトリウム（g/L）および  $Kn$ ；塩化ナトリウムに対する飽和定数（g/L）

常微分方程式の解法は Runge-Kutta 法（洲之内ら，1979）による数値解法とする。

### 第3節 実験結果および考察

#### 3.1 乳酸塩による阻害 -TEST 8-

乳酸発酵においては、生成乳酸塩による阻害が存在する。しかし、その阻害濃度や程度は乳酸菌個々によって異なる。そこで、高温 L-乳酸発酵における乳酸阻害濃度について、初期に乳酸塩を添加する方法により阻害および阻害濃度の検討を試みる（TEST 8）。なお、本項のみ発酵生成物を乳酸塩と表記するが、濃度表記は本論文中の他と同様に乳酸濃度表記（g-乳酸/L）で記す（第2章参照）。

TEST 8 における L-乳酸の光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図 5-1 に示す。また、その結果を表 5-3 にまとめて示す。なお、表中の平均乳酸生成速度および最大推定乳酸生成速度は第3章および第4章で算出法を示した乳酸生成速度である。また、表 5-3 には、実験条件（基質量、植種量）を同じくする TEST 9-1 の結果も比

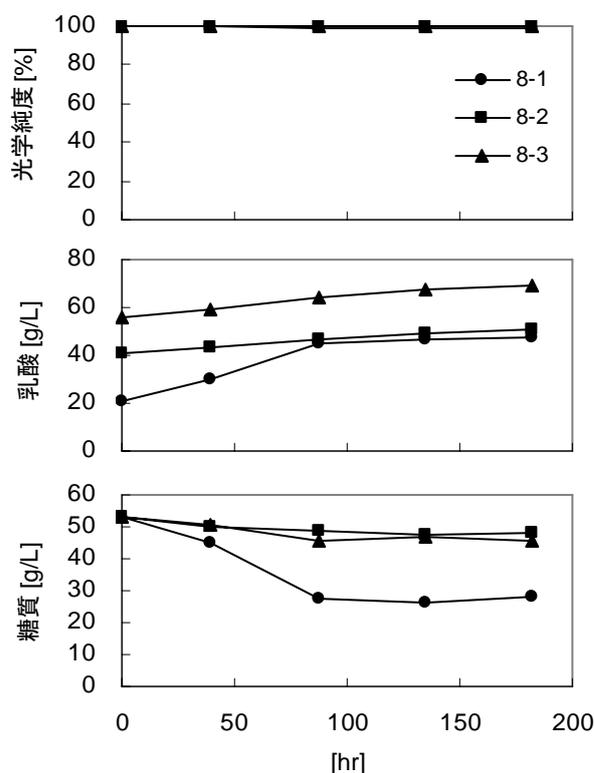


図 5-1 TEST 8 における培養結果

表 5-3 TEST 8 の培養結果

TEST 8	1	2	3	比較 (TEST 9-1)	
培養時間 (hr)	183	183	183	180	
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	53.1	53.1	53.1	51.6
	最終濃度	21.7	13.2	13.2	21.7
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	20.6	41.0	55.6	7.2
	最終濃度	47.8	50.8	69.5	33.8
乳酸生成量 (g)	27.2	9.8	13.9	26.6	
乳酸収率 (%)	0.51	0.18	0.26	0.52	
光学純度 (%)	99.3	99.9	99.9	99.4	
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.28	0.06	0.09	0.28	
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.62	0.05	0.07	1.42	

較のために掲載する。図 5-1 によると、TEST 8-1 および TEST 8-2 では乳酸塩濃度約 50 g/L 程度において発酵の停滞が観察されたものの、TEST 8-3 では約 70 g/L まで乳酸塩濃度が上昇した。乳酸発酵が停止となる乳酸塩濃度に関しては、*B. coagulans* を用いた乳酸発酵事例（表 2-11 参照）より、Payot *et al.* (1999) は 55 g/L、Heriban *et al.* (1993) は 65 g/L、Rosenberg *et al.* (2005) は 78 g/L、および中山 (1983) は約 89 g/L を得ている。菌株間の違いあるいは担体利用 (*B. coagulans* の担持) の効果 (中山, 1983、Rosenberg *et al.*, 2005) により発酵停止濃度が異なる可能性は存在するが、TEST 8 の結果も踏まえて少なくとも乳酸塩濃度約 70 g/L までは乳酸発酵が持続すると判断される。

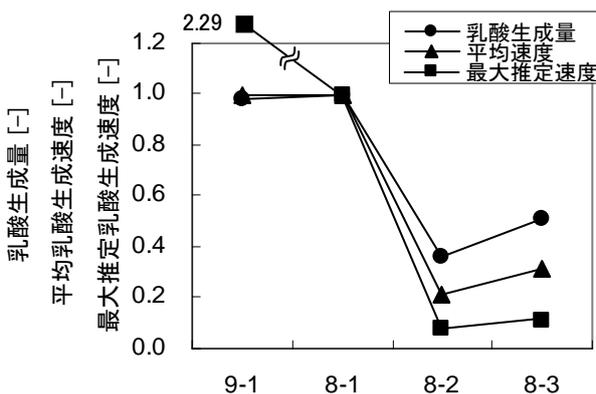


図 5-2 TEST 8 における各条件の生成乳酸量および平均乳酸生成速度の比較

TEST 8 の各系列における生成乳酸量、平均乳酸生成速度および最大推定乳酸生成速度の比較を図 5-2 に示す。なお、図 5-2 は比較系である TEST 8-1 の値により基準化を行っている。また、表 5-3 と同様に TEST 9-1 の結果も示す。生成乳酸量と平均乳酸生成速度については、TEST 8-1 (初期乳酸塩濃度 20.6 g/L) と TEST 9-1 (同 7.2 g/L) は異なる実施試験にも拘わらずほぼ等しい値であるものの、TEST 8-1 と TEST 8-2 (同 41.0 g/L) の間には大きな差があることが示された。一方、最大推定乳酸生成速度については、TEST 8-1 と TEST 9-1 の間に倍以上の差が示された。乳酸塩阻害に関するこれらの結果は、乳酸塩濃度の増加とともに瞬間的な乳酸生成速度の低下が見られるものの、想定している培養時間 (HRT 5~10 日) における乳酸生成量の低下については乳酸塩濃度 40 g/L 程度以上において顕著となることを示している。

次に、乳酸塩阻害の影響を評価するため、式 5-2 中の  $\nu$ 、 $K_s$  および  $K_p$  について、植種を伴った 55°C で pH 5.5 の培養条件による実験結果 (表 5-4 および図 5-3 参照) より推定を試みる。表 5-4 中の TEST 12-1 と TEST 14-1 について、縦軸に最大推定乳酸生成速度の逆数を、横軸に消費糖質量の逆数を取ると (図 5-4)、2 点を結ぶ直線から横軸切片が得られる。Lineweaver-Burk プロットにおいて、非拮抗型の阻害形式であれば横軸切片は固定であることから、 $K_s$  を 32 (g/L) と求めた。 $\nu$  および  $K_p$  については、式 5-2 の解と図 5-3 の間の誤差を最小とする値を試行錯誤により求めた ( $\nu=6$ 、 $K_p=9$ 、式 5-2')。

表 5-4  $\nu$ 、 $K_s$  および  $K_p$  の推定に使用した培養結果

	TEST 9-1	TEST 10-1	TEST 14-1
初期糖質量 (g)	51.6	45.6	27.0
消費糖質量 (g)	29.9	20.1	13.9
初期乳酸濃度 (g)	7.2	11.8	6.9
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	1.42	-	0.89
<参考>			
植種材料量 (g)	200	400	200
生ごみ培地量 (g)	800	600	800
模擬生ごみの希釈倍率 (倍)	2	2	4

$$\frac{dP}{dt} = 6 \cdot \frac{S'}{32 + S'} \cdot \frac{9}{9 + P} \quad (5-2')$$

図 5-5 に、式 5-2' と図 5-3 の比較を示す。なお、図 5-5 中の式 5-2' は、中和剤供給ポンプの駆動記録により記録された遅滞時間を考慮して図示している。

式 5-2' を TEST 8 へ適用した結果を図 5-6 に示す。ここでは、 $S'$  を式 5-5 により求めた。これは、収率を一意的に与えることで経験式を予測式として使用するためである。

$$S' = (\text{生ごみ培地中の糖質濃度}) \times (\text{生ごみ培地割合}) \times (\text{収率}) \quad (5-5)$$

ただし、生ごみ培地割合；(生ごみ培地量) / {(生ごみ培地量) + (植種材料量)}

、収率；0.58 (第 3 章 TEST 2-3 より)

これによると、初期乳酸塩濃度が 20.6 g/L である TEST 8-1 では経験式への適合が示されたものの、初期乳酸塩濃度が 40 g/L 以上と高い場合には適合が示されなかった。乳酸塩濃度が 40 g/L 以上となる場合には、著しく遅滞する乳酸生成速度を反映する機構を式 5-2 に付加することが必要であると考えられる。なお、乳酸生成速度を 50% とする初期乳酸塩濃度は、式 5-2' によると 9 g/L と求まった。

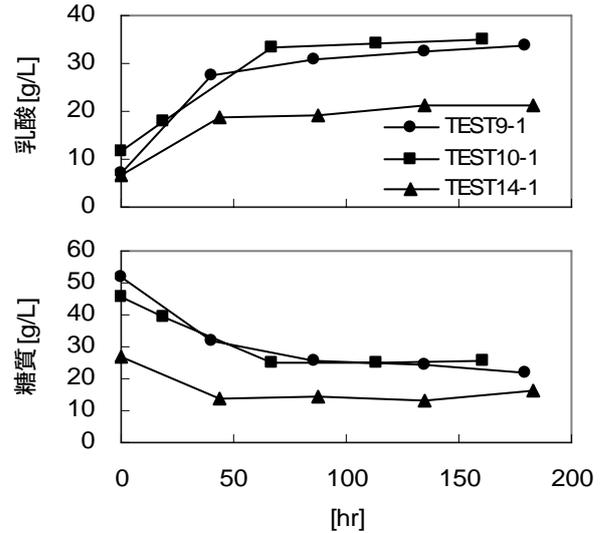


図 5-3  $\nu$ 、 $K_S$  および  $K_P$  の推定に使用した培養結果

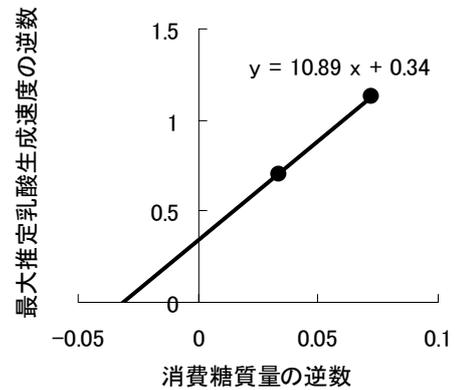


図 5-4  $K_S$  の推定

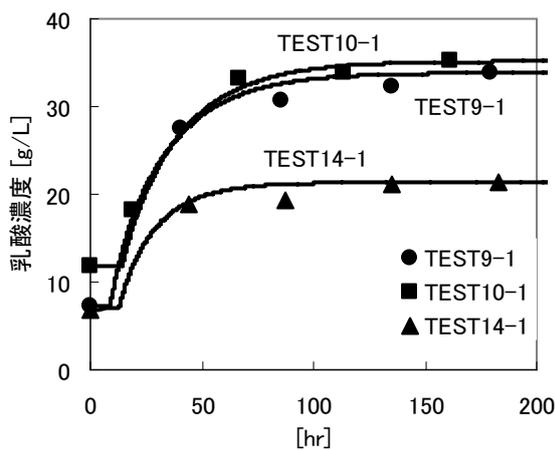


図 5-5 乳酸阻害式と実測値の比較

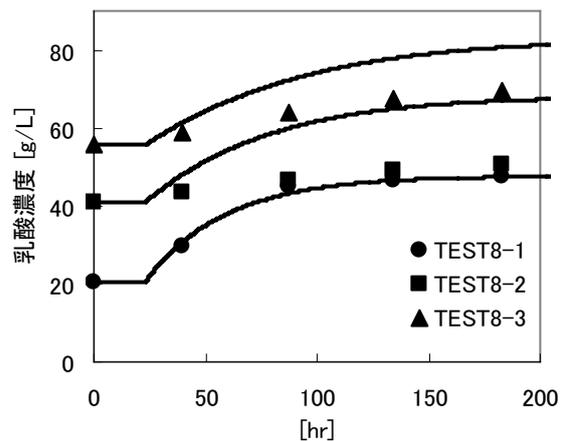


図 5-6 TEST 8 への乳酸阻害式の適用結果

### 3.2 グルコース基質による阻害

#### 3.2.1 概論

過度な基質の存在は、乳酸発酵に限らず発酵全般において少なからず阻害要因となるとされて

いる（海野ら，1992）。一方で、高い基質濃度に対応でき、かつ、高い生成物濃度を産出できる発酵法が存在するならば、発酵槽の省スペース化や生成物の濃縮工程の省略化などが実現でき、その発酵法は工業的利用価値が高いと考えられる。そこで、高温 L-乳酸発酵の上限の基質濃度を探求する目的で、基質の阻害濃度を検討した。なお、実施方法は、多糖の加水分解による律速を避けるため生ごみ培地にグルコースを添加することでグルコース阻害の影響を検討した。生ごみを基本培地とした理由であるが、①食品由来であるため L-乳酸菌の生長に不可欠なビタミン、ミネラルなどの栄養素を豊富に含む、②乳酸菌は一般的に栄養要求性が複雑であり（小崎ら，1992）、生ごみ以外の培地を考慮する際は新たに培地成分に対する検討が必要となる、③将来的には生ごみをベースとした有機性廃棄物のブレンド材料を L-乳酸発酵に供すると考えているためである。しかし、生ごみにグルコースを添加する試験を実施するためには、前提として添加したグルコースを含む総糖質量に応じた、糖質以外の必要栄養素が生ごみ培地内に存在する必要がある。そこで、生ごみ中に存在するこれら栄養素が、グルコース添加分についても充足できることの確認をまず行う（TEST 9）。続いて、段階的なグルコース添加系を用意し、回分式培養によりそれぞれの乳酸発酵状況を検討する（TEST 10）。

### 3.2.2 生ごみ中の栄養素量の確認 —TEST 9—

原料である模擬生ごみに対して、希釈率の異なる 2 系列（TEST 9-1；2 倍、TEST 9-2；4 倍）を準備し、高希釈率側の系について低希釈率側の系（比較系）より減少した糖質量をグルコース添加により代替することで、糖質以外の栄養素が比較系に対して半分となる実験を用意し、回分式培養により両者の比較を試みた。

TEST 9 における L-乳酸の光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図 5-7 に示す。また、その結果を表 5-5 にまとめる。180 時間培養により、TEST 9-1 では生成乳酸量 26.6 g/L、乳酸の収率 0.52 および光学純度 99%以上、また、TEST 9-2 では生成乳酸量 29.0 g/L、乳酸の収率 0.60 および光学純度 99%以上が得られた。両系列の結果を比較すると、生ごみ希釈倍率を上げた、つまり糖質以外の栄養素濃度を半分とした TEST 9-2 が、比較系 TEST 9-1 を上回る L-乳酸生成を行った。したがって、生ごみ中には、糖質以外の栄養素について少なくともも存在する糖質量の 2 倍程度の量まで乳酸発酵できる栄養素量が存在すると判断される。TEST 9-2 の高い乳酸収率に関しては、この実験では、生ごみの希釈倍率の上昇に伴う糖質の減少量をグルコースにより代替したが、希釈により減少

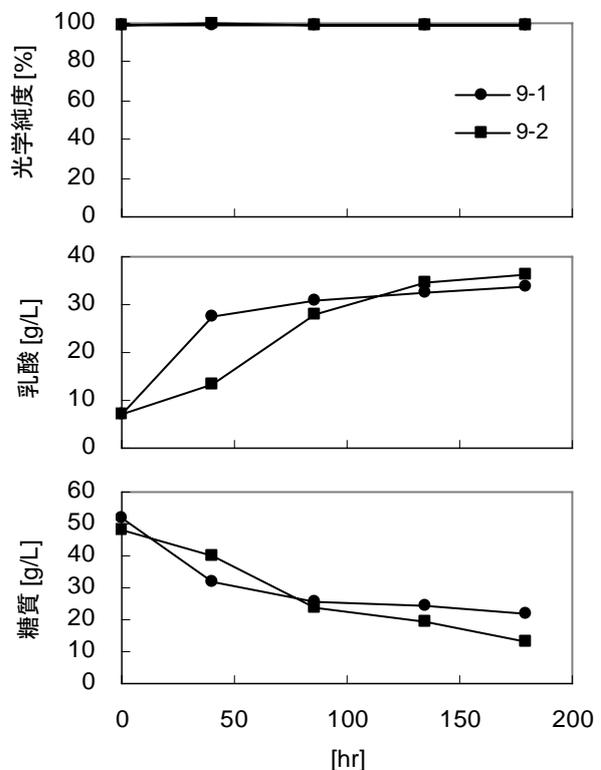


図 5-7 TEST 9 における培養結果

表 5-5 TEST 9 の培養結果

TEST 9	1	2	
培養時間 (hr)	180	180	
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	51.6	48.4
	最終濃度	21.7	13.2
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	7.2	7.1
	最終濃度	33.8	36.1
乳酸生成量 (g)	26.6	29.0	
乳酸収率 (-)	0.52	0.60	
光学純度 (%)	99.4	99.4	
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.28	0.20	
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	1.42	0.64	

した糖質と比べてグルコースのほうが乳酸資化しやすい糖質であったためと考えられる。つまり、生ごみ中の糖質には、発酵に利用しきれない（資化しきれない）成分が存在することを示している。

図 5-7 によると、TEST 9-2 では発酵の初期に TEST 9-1 と比べて発酵の遅滞が見られた。グルコース資化は乳酸菌にとって一般的なことであり、また、植種材料中に存在する L-乳酸菌は、グルコースを構成要素とする多糖により組成される模擬生ごみを基質としてきた（第 6 章参照）。そこで、図 5-7 に見られた発酵遅滞は、グルコースに対する馴化が律速要因とは考え難い。ところで、基質阻害と呼ばれる基質が酵素に対して阻害剤として作用する場合、生成物の増加曲線はシグモイド形を示すとされる（海野ら，1992）。最終的に乳酸収率で上回った TEST 9-2 においてシグモイド様の生成物増加曲線が観察されたことから、グルコースに対する基質阻害の存在が示唆される。グルコース阻害に関しては、*B. coagulans* による  $\alpha$ -アミラーゼ生成を目的に行った培養でも初期グルコース 20 g/L により基質阻害が生じる報告がなされており（Babu and Satyanarayana, 1995）、TEST 9 の結果と併せて 20 g/L 以上で存在するグルコースは高温 L-乳酸菌である *B. coagulans* の増殖速度阻害あるいは乳酸生成速度阻害をもたらすことが推測される。なお、ほぼ等しい糖質量を有する TEST 9-1 でグルコース阻害が起こらなかった理由であるが、模擬生ごみ中の糖質は培養初期段階では二糖以上の複糖として存在し、グルコースとしてはそれほど多く存在せず（第 6 章参照）、乳酸発酵中においても加水分解されたグルコースを直後に基質として利用することにより発酵液中ではグルコースがほとんど存在しない（Narita *et al.*, 2004）ため阻害が生じないと考えられる。

### 3.2.3 グルコース添加による阻害濃度の検討 —TEST 10—

前項の実験から、模擬生ごみ中には存在する糖質量の 2 倍以上の糖質を乳酸発酵できる栄養素が含まれていることが示された。そこで、段階的にグルコースを 2 倍希釈の模擬生ごみに添加し、グルコースに対する阻害濃度の検討を行った（TEST 10）。

TEST 10 における L-乳酸の光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図 5-8 に示す。また、その結果を表 5-6 にまとめる。培養の前半に着目すると、培養開始 19 時間後あるいは 67 時間後において、各系列はグルコース添加量の序列に応じた比較系に対する発酵遅滞を示している。この点は、TEST 9 と同様にグルコースの阻害と考えられる。一方、培養の終端に着目すると、161 時間の培養によりいずれの系列も光学純度は 98% 以上の L-乳酸が得られたが、乳酸の収率で各系列間に差異が生じた。乳酸の最終到達濃度での比較では、比較系である TEST 10-1 での 35.2 g/L に対して、TEST 10-2（グルコース 50 g 添加）で 36.2 g/L および TEST 10-3（グ

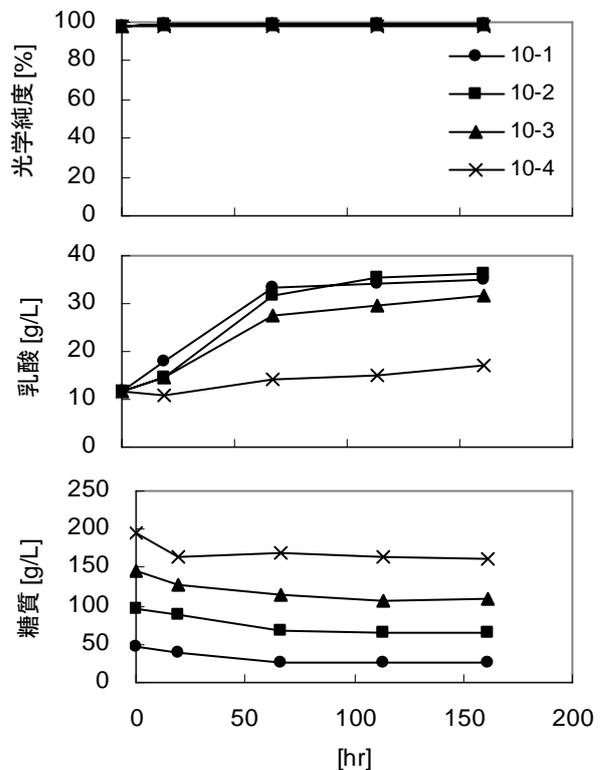


図 5-8 TEST 10 における培養結果

ルコース 100 g 添加) で 31.7 g/L と接近したものの、基質の糖質が比較系よりも多いにも拘らず比較系を大きく上回る結果は得られなかった。また、TEST 10-4 (グルコース 150 g 添加) では 17.3 g/L と生成乳酸量が明らかに少なく、グルコース阻害を培養期間中継続して受けたことが示された。なお、TEST 10-4 では、乳酸に代わる有機酸の生成やガス生成も起こらなかったことから、乳酸発酵以外の発酵は起こっていないと判断された。

表 5-6 TEST 10 における培養結果

TEST 10	1	2	3	4	
培養時間 (hr)	161	161	161	161	
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	45.6	95.6	145.6	195.6
	最終濃度	25.5	66.3	108.1	160.8
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	11.8	11.8	11.8	11.8
	最終濃度	35.2	36.2	31.7	17.3
乳酸生成量 (g)	23.4	24.4	19.9	5.5	
乳酸収率 (-)	0.51	0.26	0.14	0.03	
光学純度 (%)	99.0	98.7	99.1	98.2	
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.32	0.30	0.23	0.03	
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	-	0.91	0.78	0.30	

TEST 10 各系列の乳酸生成量と平均乳酸生成速度の比較を図 5-9 に示す。なお、図 5-9 は比較系である TEST 10-1 の値により基準化を行っている。図 5-9 によると、総糖質濃度 146 g/L 以上 (TEST 10-3; 添加グルコース濃度 100 g/L) においてグルコース阻害と考えられる平均乳酸生成速度および生成乳酸量の低下が確認された。一方で、TEST 10-1 と TEST 10-2 の比較より、糖質あるいはその他の栄養素が十分に存在する環境においても、乳酸の終端濃度が約 35 g/L 程度で留まることが確認された。

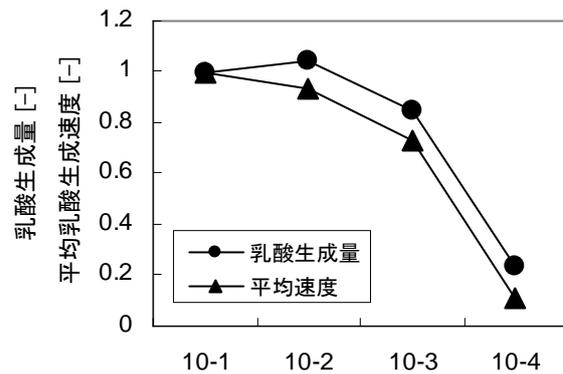


図 5-9 TEST 10 における各条件の乳酸生成量および平均乳酸生成速度の比較

グルコース阻害の影響を評価するため、式 5-3 中の  $Kes$  について推定を試みる。ただし、基質量が変化する本項の実験では一意的に収率を与えることが困難であるので、式 5-1 に立ち返り  $k$  を設定する式 5-3' への適用を試みる。

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot v \cdot \frac{S}{Ks + S(1 + S/Kes)} \cdot \frac{Kp}{Kp + P} \quad (5-3')$$

ただし、 $S$ ; 添加グルコース量 (g-glucose/L)、 $Kes$ ; 基質に対する阻害定数 (g-glucose/L) なお、 $k$  は文献値 (Payot *et al.*, 1999) より 0.8 とする。また、グルコースが過剰に存在するため、生ごみ培地中の多糖を加水分解する反応が進行し難いことから、 $S$  は添加グルコース量とする。 $Kes$  については、TEST 10-2 に対して誤差が最小となるよう試行錯誤により求めた ( $Kes=20$ 、式 5-6)。

$$\frac{dP}{dt} = 0.8 \times 6 \cdot \frac{S}{32 + S(1 + S/20)} \cdot \frac{9}{9 + P} \quad (5-6)$$

図 5-10 に、式 5-6 と TEST 10-2 から TEST 10-4 の比較を示す。なお、図 5-10 中の式 5-6 は、

中和剤供給ポンプの駆動記録により記録された遅滞時間を考慮して図示している。これによると、乳酸発酵の立ち上がりの速度については式 5-6 により再現できるものの、発酵の進行に伴い乳酸濃度について大きな差異が生じていることから、前節と同様に乳酸濃度 40 g/L 付近において発酵の進行を止める機構の付加の必要性が指摘された。なお、乳酸生成速度を 50% とする初期グルコース濃度は、式 5-6 によると 37 g/L と求まった。

### 3.2.4 過剰なグルコース添加での長期 L-乳酸発酵 -TEST 11-

TEST 10-4 では、生ごみ培地に 150 g/L のグルコースを添加したが、161 時間の培養でもわずかに L-乳酸が生成するに留まった。TEST 10-4 では、植種の実施もあり L-乳酸に代わる有機酸などの発酵が確認されなかったが、L-乳酸生成が過度に阻害されることから培養条件次第では L-乳酸発酵を妨害する菌種の優占化を招く恐れもある。そこで、同様に過度にグルコースを添加した系を、植種は行わない長期間にわたる培養を実施し、L-乳酸発酵の進行を確認することとした (TEST 11)。2 倍希釈の模擬生ごみに 200 g/L のグルコースを添加し、培養温度 55°C で pH 5.5 にて長期間培養した結果を図 5-11 および表 5-7 に示す。TEST 11 では、640 時間の培養により、光学純度 99% 以上の L-乳酸が約 39 g/L 生成した。乳酸の収率に関しては 0.15 に留まったが、高い光学純度が保たれ、乳酸以外の有機酸も酢酸がわずかに 1.7 g/L 生成した程度であり、大部分の糖質は未利用のまま発酵液中に残存した。以上から、過度のグルコースが存在する環境でも、培養条件を高温 L-乳酸発酵条件とすることで高温 L-乳酸菌の優占化の起こることが確認された。また、TEST 11 では、乳酸濃度の上昇に非常に多くの時間を要したが、結果的に L-乳酸が生成されたことから、TEST 10-4 も培養の継続により乳酸濃度が上昇するものと考えられる。ただし、TEST 11 および TEST 10-4 とも想定している半連続式培養の培養時間 (HRT 5~10 日程度) では L-乳酸生成量および乳酸生成速度ともグルコース阻害による影響が顕著

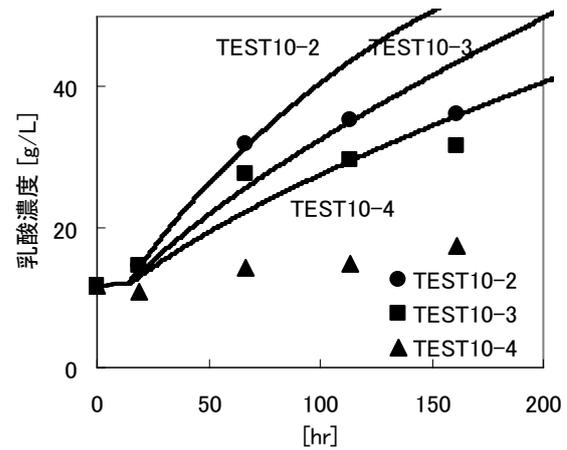


図 5-10 TEST10 への基質阻害式の適用結果

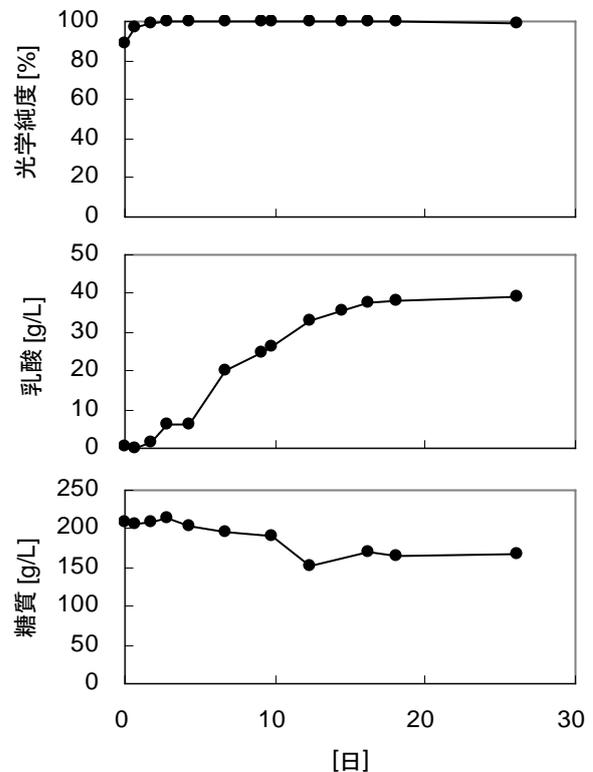


図 5-11 TEST 11 の培養結果

表 5-7 TEST 11 の培養結果

TEST 11	
培養時間 (hr)	640
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度
	最終濃度
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度
	最終濃度
乳酸生成量 (g)	
乳酸収率 (-)	
光学純度 (%)	
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	

である。なお、TEST 11 も TEST 10-2 と同様に、基質や他の栄養素的には乳酸発酵の余地を有しながらも乳酸発酵は停止した。乳酸塩阻害の検討では、乳酸濃度が 40 g/L 以上の場合乳酸生成速度の減少は顕著であるものの、乳酸発酵の停止濃度は 70 g/L 程度と推測された。そこで、乳酸発酵が 35~39 g/L で停止する主要な原因は乳酸塩阻害以外にもあると考えられる。高温 L-乳酸発酵における乳酸生成量の上限に関しては、第 3 章において培養条件と L-乳酸生成量に関係があることを示したが、L-乳酸生成量を規定する原因は今のところ明らかとなっておらず、今後の課題である。

### 3.3 塩化ナトリウム添加による塩阻害

—TEST 12—

食品あるいは食品製造過程からの廃棄物の種類によっては、高塩含有の生ごみが L-乳酸発酵の原料として提供される可能性も考えられる。そこで、高温 L-乳酸発酵の L-乳酸菌である *B. coagulans* の耐塩性を、現実に想定される濃度範囲において把握することとした。濃度範囲の設定は、高温 L-乳酸発酵が生ごみに代表される食品廃棄物をその対象とする点から、塩分濃度の高い食品を基準に行った。高塩分濃度の食品としては先に述べた漬物が考えられ、そこで、塩分濃度は現在の漬物製造時の塩分濃度（5%）程度を上限に、3 段階で評価した（TEST 12）。

TEST 12 における L-乳酸の光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図 5-12 に示す。また、その結果を表 5-8 にまとめて示す。図 5-12 によると、培養の前半において塩化ナトリウム添加量の序列に応じた発酵阻害が観察された。180 時間培養後においても、生成乳酸量において塩化ナトリウム無添加系と添加系では明らかな差異があり、乳酸の収率では TEST 12-1（無添加系）が 0.52 であるのに対して、TEST 12-2（塩化ナトリウム 20 g/L 添加）では 0.36、および TEST 12-3（塩化ナトリウム 50 g/L 添加）では 0.35 となった。なお、L-乳酸の光学純度に関しては、いずれの系列でも 99% 以上となった。TEST 12 各系列の乳酸生成量、平均乳酸生成速度および最大推

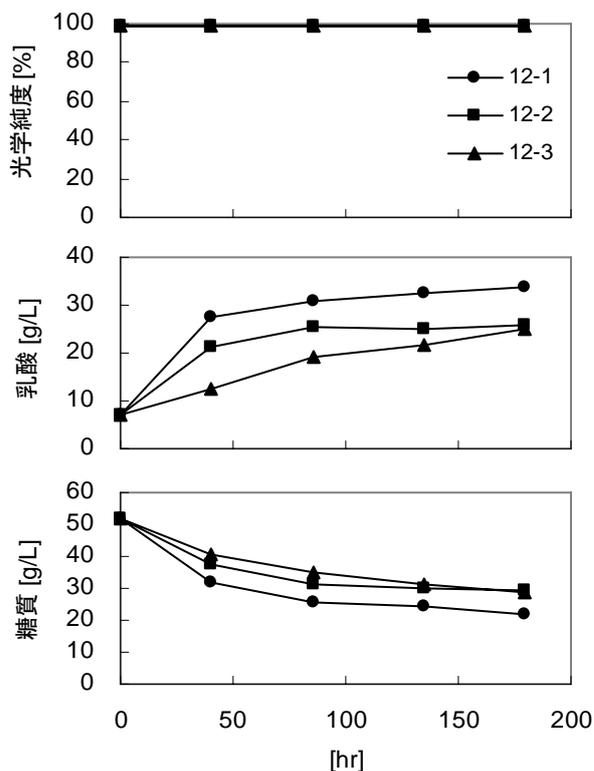


図 5-12 TEST 12 の培養結果

表 5-8 TEST 12 の培養結果

TEST 12	1	2	3	
培養時間 (hr)	180	180	180	
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	51.6	51.6	51.6
	最終濃度	21.7	29.3	28.6
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	7.2	7.2	7.2
	最終濃度	33.8	25.8	25.1
乳酸生成量 (g)	26.6	18.6	17.9	
乳酸収率 (%)	0.52	0.36	0.35	
光学純度 (%)	99.4	99.2	99.1	
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.28	0.21	0.11	
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	1.42	0.74	0.47	

定乳酸生成速度の比較を図 5-13 に示す。なお、図 5-13 は比較系である TEST 12-1 の値により基準化を行っている。これによると、塩化ナトリウムに対する乳酸生成速度阻害および乳酸生成量阻害は 20 g/L (TEST 12-2) から観察された。

以上の結果から、高温 L-乳酸発酵が特に耐塩性を有することは示されなかった。塩分濃度の高い食品廃棄物を対象とする際は、長時間培養により乳酸収率は多少改善されるものの、その適用性を再度検討する必要があると考えられる。一方で、高い光学純度が保たれた点から、耐塩性に優れた別の菌種の優占化も起こらなかったと考えられる。この点は、乳酸以外の有機酸が生成されなかった点やガス生成が確認されなかった点からも支持される。また、第 3 章 第 3 節において L-乳酸発酵の妨害菌と指摘された *Clostridium* 属についても、例えばアセトナーブタノール発酵に利用される *Clostridium acetobutylicum* では塩化ナトリウム 30 g/L で生長停止が、15 g/L で増殖速度が半減することが示され (Maddox *et al.*, 1995)、*Clostridium* 属にとっても耐塩性が一般的な性質でないことから補足される。

塩化ナトリウム阻害の影響を評価するため、式 5-4 中の  $K_n$  について TEST 12-2 に対し誤差が最小となるよう試行錯誤により求めた ( $K_n=10$ 、式 5-7)。

$$\frac{dP}{dt} = 6 \cdot \frac{S'}{32 + S'} \cdot \frac{9}{9 + P} \cdot \frac{10}{10 + N} \quad (5-7)$$

図 5-14 に、式 5-7 と TEST 12 の比較を示す。なお、図 5-14 中の式 5-7 は、中和剤供給ポンプの駆動記録により記録された遅滞時間を考慮して図示している。これによると、TEST 12-2 における培養後半の乳酸濃度に差異が見られるが、概ね適合した結果が得られた。なお、乳酸生成速度を 50% とする初期塩化ナトリウム濃度は、式 5-7 によると 10 g/L と求めた。

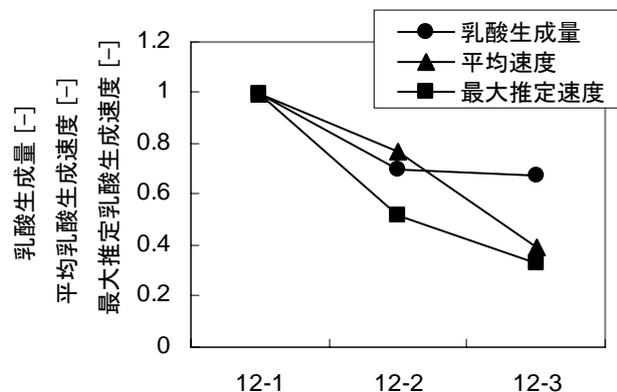


図 5-13 TEST 12 における各条件の生成乳酸量および平均乳酸生成速度の比較

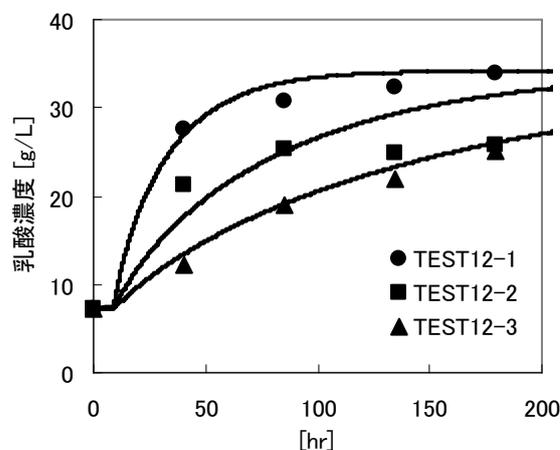


図 5-14 TEST12 への塩化ナトリウム阻害式の適用結果

#### 第 4 節 結語

本章では、高温 L-乳酸発酵の生成物である乳酸阻害、基質であるグルコース阻害および塩化ナトリウムによる阻害を検討した。模擬生ごみを蒸留水にて 2 倍希釈した生ごみ培地に対して HRT 5 ~ 10 日程度の培養期間 (植種材料量を考慮) を設定し、回分式培養により上記阻害を評価した。以下に得られた主な結果をまとめる。

(1) 生ごみ培地に 3 段階の乳酸塩量を添加した試験 (合計 4 段階) により、生成物である乳酸の

阻害を検討した。その結果、初期乳酸濃度 41 g/L 以上において生成乳酸量の減少が確認された。ただし、乳酸濃度が 41 g/L 以上であっても乳酸発酵自体が停止することはなく、約 70g/L まで乳酸濃度が上昇することも確認された。乳酸阻害を非拮抗型阻害で表記した乳酸生成速度式に実験結果を適合させた結果、乳酸生成速度を 50%とする乳酸濃度（飽和定数）は 9 g/L と求まった。

- (2) 生ごみ培地に対して、高温 L-乳酸発酵に必要な糖質以外のその他の栄養素の含有量を調査した。模擬生ごみの希釈列（2 倍希釈と 4 倍希釈）を作成し、糖質量をグルコース添加により揃えて L-乳酸発酵を実施した結果、模擬生ごみ中には存在する糖質の 2 倍以上の糖質を L-乳酸発酵できるその他の栄養素が含まれていることが示された。なお、グルコース添加系では培養の序盤に乳酸生成速度の遅滞が観察され、グルコース 20 g-glucose /L において乳酸生成速度阻害が観察された。
- (3) 生ごみ培地に 3 段階のグルコース量を添加した試験（合計 4 段階）により、グルコース阻害を検討した。その結果、グルコース 100 g-glucose/L 以上において乳酸生成量の減少が確認された。一方、糖質量あるいはその他の栄養素量から判断して L-乳酸発酵余地が充分あると考えられる系においても、乳酸生成量が 35~39 g/L で発酵停止となることが観察された。なお、過度なグルコース存在下においても、55℃で pH 5.5 の高温 L-乳酸発酵の培養条件を実施することにより、L-乳酸菌の優占化が生成物により確認された。一般的な基質阻害式へ実験結果を適合させた結果、乳酸生成速度を 50%とするグルコース濃度は 37 g/L と求まった。
- (4) 生ごみ培地に 2 段階の塩化ナトリウム量を添加した試験（合計 3 段階）により、食塩による阻害を検討した。その結果、初期塩化ナトリウム濃度 20 g/L 以上において乳酸生成量の減少が確認された。塩化ナトリウム阻害を非拮抗型阻害で表記した乳酸生成速度式に実験結果を適合させた結果、乳酸生成速度を 50%とする塩化ナトリウム濃度（飽和定数）は 10 g/L と求まった。

#### <参考文献>

- Babu, K.R. , Satyanarayana, T., 1995.  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 30 (4), 305-309.
- Kargi, P., Dinçer, A.R., 1999. Salt inhibition effects in biological treatment of saline wastewater in RBC. *J. Environ. Eng.* 125, 10, 966-971.
- Maddox, I.S., Qureshi, N., Robertsthomson, k., 1995. Production of acetone-butanol ethanol from concentrated substrates using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry*. 30, 3, 209-215.
- Narita, J., Nakahara, S., Fukuda, H., Kondo, A., 2004. Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 6, 423-425.
- Ohara, H., Hiyama, K., Yoshida, T., 1992. Non-competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 6, 773-776.
- Payot, T., Chemaly, Z., Fick, M., 1999. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations.

Enzyme Microb. Technol., 24, 191-199.

- 石崎文彬, 2000. 嫌気性微生物による有用物質生産に関する生物工学的研究. 生物工学会誌, 78, 1, 2-12.
- 海野肇, 中西一弘, 白神直弘, 1992. 生物化学工学. 79-93, 講談社サイエンティフィク.
- 小崎道雄, 内村泰, 岡田早苗, 1992. 乳酸菌実験マニュアル-分離から同定まで-. 1-5; 72-73, 朝倉書店.
- 洲之内治男, 寺田文行, 四条忠雄, 1979. FORTRANによる演習数値計算. 54-56, サイエンス社.
- 橋場炎, 加藤丈雄, 藤井建夫, 岡田早苗, 柳田藤寿, 大桃定洋, 鈴木一郎, 伊藤敏敏, 1996. 乳酸菌の挙動と利用, 乳酸菌の科学と技術, 乳酸菌研究集談会 編. 229-286, 学会出版センター, 1996.
- 松田敏生, 1999. 食品微生物制御の化学, 104-132, 幸書房.

## 第6章 高温 L-乳酸発酵の原料に関する検討

### 第1節 概説

前章までにおいて、模擬生ごみを原料とする高温 L-乳酸発酵の運転条件あるいは阻害の影響を検討してきた。これらの考察およびその発酵の成績より、L-乳酸発酵法として高温 L-乳酸発酵は非常に実現性の高い方法であることが示された。しかし、前章までの検討では、調整された模擬生ごみを用いての検討であった。そのため、既に腐敗が進行していると考えられる現実の生ごみへの適用に関しては、腐敗が及ぼす影響やその対策を考慮しておく必要がある。そこで、生ごみの腐敗過程を観察することで、また、腐敗させた模擬生ごみを原料に高温 L-乳酸発酵を実施することで、腐敗した生ごみが高温 L-乳酸発酵へ及ぼす影響の考察を試みる。加えて、高温 L-乳酸発酵のより現実的な実用化に向けて、生ごみに限定された原料ではなく、生ごみに代わる原料の開拓検討を試みる。

代替原料案としては、工業的に利用されるグルコース、その加水分解前であるでんぷんなど現在の L-乳酸の工業生産工程で使用されている原料から、利用が進まないバイオマスである有機性廃棄物まで考えられる。ところで、高温 L-乳酸発酵は、原料の前もっての加水分解を要しない点、あるいは滅菌操作や純粋培養された菌種の植種を要しない点から、簡易な設備による容易な維持管理を実現し、製造コストを低廉化できる可能性を有した方法である。この点を考慮すると、現状採算の取れないバイオマス、特に有機性廃棄物に対して適用を試みるのが有効である。一方で、製造コスト以外の原料適用性を判断する重要な因子として、糖質の資化性がある。糖質の資化性は、乳酸菌固有の糖質資化性に関与し、高温 L-乳酸発酵が資化できる糖質の種類によっては利用可能となるバイオマスも限定されることとなる。さらに、高温 L-乳酸発酵では、多糖の加水分解を発酵槽内に存在する L-乳酸菌 *Bacillus coagulans* による加水分解に依存しているため、原料適用性の検討は *B. coagulans* による多糖の加水分解性も含まれることとなる。そこで、高温 L-乳酸発酵で資化できる糖質の同定を行い、次にその資化できる糖質を生ごみに添加することで、その多糖の加水分解性を含んだ資化性の検討を試みる。一連の検討を通じて、生ごみに代わる原料の適用化に関する検討を試みる。

以上を整理すると、本章では、①現実の生ごみを指向した検討と②生ごみに代わる原料の適用性を課題として検討を試みる。

### 第2節 実験方法

#### 2.1 概論

本章では、以下の実験を試みる。

- a) 模擬生ごみの腐敗過程の把握（生ごみ腐敗実験）
- b) 腐敗した模擬生ごみの回分式高温 L-乳酸発酵（TEST 13）
- c) 多糖の加水分解および単糖類の分析による資化糖の同定（資化糖の同定実験）
- d) 多糖添加による模擬生ごみの回分式高温 L-乳酸発酵（TEST 14）
- e) バナナ果皮の回分式高温 L-乳酸発酵（TEST 15）

各実験は、①現実の生ごみを指向した検討として a) 生ごみ腐敗実験、b) TEST 13 および c) 資化糖の同定実験を行う。また、②生ごみに代わる原料の探索として、c) 資化糖の同定実験、d) TEST 14 および e) TEST 15 を行う。

## 2.2 基質および植種材料

模擬生ごみについて、生ごみ腐敗実験、TEST 14 および TEST 15 では、第 3 章と同様の模擬生ごみを使用した（表 3-1 参照）。TEST 13 では、第 2 章に記された模擬生ごみを冷蔵庫で 1 ヶ月程度保存した（腐敗させた）ものを使用した。TEST 13 で使用した模擬生ごみの性状を表 6-1 に示す。表 6-1 の生ごみ分析値では、TS で約 21%、COD で約 21 g-COD/L および糖質で約 14% であり、第 2 章の模擬生ごみの分析値の TS で約 19%、COD で約 21 g-COD/L および糖質で約 12% と比べると TS および糖質濃度が高い特徴があった。また、pH 4.3 と低い pH 値であることから、有機酸生成の進んだ生ごみと考えられる。資化糖の同定実験では、培養実験中に発酵液のサンプル採取に併せて採取した生ごみサンプルを実験対象とした。

多糖添加実験では、模擬生ごみに試薬多糖を添加して回分式培養を行った。添加多糖は、でんぷん（和光純薬工業、和光一級、ばれいしょ由来）、ペクチン（和光純薬工業、化学用、かんきつ類由来）、セルロース（Alfa Aesar、Cellulose, microcrystalline）を使用した。

TEST 15 では、基質としてバナナ果皮も用いた。バナナ果皮の性状を表 6-2 に示す。バナナ果皮の分析値は、TS で約 11%、COD で約 8 g-COD/L および糖質で約 5% であり、第 3 章の模擬生ごみの分析値の TS で約 19%、COD で約 21 g-COD/L および糖質で約 12% と比べると TS 比に対して COD および糖質の割合が低い特徴があった。実験には、バナナ果皮をミキサー（松下電器産業、MK-K78）にて破碎し、蒸留水で 3 倍希釈したものをを用いた。

植種材料は、TEST 14 および TEST 15 では使用するが、その性状を表 6-3 に示す。植種材料は、第 3 章の模擬生ごみを原料とし、150 時間以上の L-乳酸発酵を行った乳酸濃度 29 g/L 以上で L-乳酸の光学純度 99% 以上の発酵液である。

## 2.3 実験装置

回分式培養実験である TEST 13、TEST 14 および TEST 15 では、第 3 章と同様の実験装置を使用した。

## 2.4 分析項目

生ごみ腐敗実験では、水質項目分析と微生物群集解析を行った。水質項目は、TS、SS、VTS、VSS

表 6-1 TEST 13 で使用した模擬生ごみの性状

	Total	Soluble
TS (g/L)	210	-
SS (g/L)	101	-
VTS (%)	96.4	-
COD-cr (g/L)	214	126
T-N (g/L)	4.54	1.88
T-P (g/L)	0.49	0.48
糖質 (g-glucose/L)	138	94.8
タンパク質 (g-albumin/L)	43.4	4.6
有機酸 (g-COD/L)	-	9.0
乳酸 (g-COD/L)	-	7.5
pH (-)	4.33	-

表 6-2 バナナ果皮の性状

	Total	Soluble
TS (g/L)	112	-
SS (g/L)	55.7	-
VTS (%)	88.6	-
COD-cr (g/L)	77	57
T-N (g/L)	1.40	1.02
T-P (g/L)	-	-
糖質 (g-glucose/L)	53	41.3
タンパク質 (g-albumin/L)	5.7	1.6
有機酸 (g-COD/L)	-	1.3
乳酸 (g-COD/L)	-	0.0
pH (-)	5.51	-

表 6-3 植種材料の性状

	TEST 14	TEST 15
培養温度 (°C)	55	55
培養pH (-)	5.5	5.5
培養時間 (hr)	180	153
乳酸濃度 (g/L)	33.8	28.9
糖質濃度 (g-glucose/L)	21.7	25.8
光学純度 (%)	99.4	99.4

(実験開始時と終了時のみ)、TOC (T-, S-)、COD (T-, S-)、糖質 (T-, S-)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (ただし 2 回の実験のみ)、有機酸、D-, L-乳酸、ならびに pH である。分析方法は、第 2 章と同様である。なお、実験は密閉系で行っていないためガス分析は実施していない。微生物群集解析も、第 2 章と同様である。

回分式培養実験である TEST 13、TEST 14 および TEST 15 では、第 2 章と同様の水質項目を測定した。ガスの生成が観察されなかったため、ガス分析は行っていない。

資化糖の同定実験では、複数の糖質分析を行った。分析方法は、全糖量についてフェノール・硫酸法を用いた。単糖類の分析は、単糖類を中心に 12 成分を一斉分析できる HPLC によるポストカラム蛍光検出法による糖類分析システム (島津アプリケーションニュース No. L284A: 醸造食品中の糖類分析; <https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/n/pdf/a-news/1/1/1284a.pdf>。以下、島津法)、およびグルコースとフルクトースを対象に酵素法分析 (F-キット、139106、J.K. インターナショナル; [http://www.jki.co.jp/product/f\\_kit/f-kit\\_index1.htm](http://www.jki.co.jp/product/f_kit/f-kit_index1.htm)) を用いた。なお、糖類分析システムによる単糖類の分析は、(株)島津テクノロジー (<http://www.shimadzu-techno.co.jp/>) に分析委託した。

## 2.5 実験条件

生ごみ腐敗実験では、長期間にわたり冷蔵保管された生ごみの質的変化を観察した。実験は 2 回実施 (1 回目; 40 日間、2 回目; 39 日間) した。実験手順は、実験 1 日目に約 250 g の模擬生ごみ (作成後直ちに冷凍保存し、実験直前に解凍したもの) を 500 mL ビーカーに取り、ラップで上部を覆って冷蔵庫 (4°C) に保管した。次回以降のサンプリングは、時間経過ごとに適宜行い、冷蔵庫より取り出した生ごみをよく攪拌の上、約 10 g 採取し、分析に供した。サンプリング後は、再びラップで上部を覆い、冷蔵庫に保管した。この操作は、生ごみ腐敗過程を報告している Wang *et al.* (2001, 2002, 2003) と同様である。微生物群集解析のサンプルは、①模擬生ごみを調整後すぐに冷凍したサンプルと②19 日間冷蔵庫で腐敗を進めたサンプル (2 回目サンプル) の 2 つである。

回分式培養実験である TEST 13、TEST 14 および TEST 15 の実験条件を表 6-4 にまとめる。培養条件は、TEST 13 では 55°C で pH 6.0、TEST 14 および TEST 15 では 55°C で pH 5.5 とした。TEST 13 の培養条件は、植種を伴わない回分式培養では L-乳酸発酵に至らない培養条件であるが、ここでは生ごみ腐敗がもたらす L-乳酸発酵への影響を評価するためこの培養条件で実験を行った。模擬生ごみの希釈率は、TEST 13 および TEST 15 では第 3 章と同様に 2 倍希釈とした。試薬多糖を添加した TEST 14 では、第 5 章の乳酸生成量に上限が存在する可能性の指摘から糖質濃度を 40 g/L 程度に抑えるため、模擬生ごみの希釈率を 4 倍とした。また、試薬多糖の添加量は各 20 g とした。なお、この培養条件は第 5 章 (TEST 9) と同様である。バナナ果皮の資化実験である TEST 15 では、バナナ果皮と生ごみの混合物およびバナナ果皮のみの 2 系列を培養した。

資化糖の同定実験では、対象サンプル中に存在する多糖を加水分解し、その構成単糖類を測定した。単糖類への分解は、図 6-1 に示す実験フローに従い、12 N 塩酸の添加および 100°C で 4 時間の加熱により行った (福井, 1990)。なお、多糖の単糖類への分解について、酵素処理あるいは酸添加および加熱を中心とする種々の方法が存在するが (中村と貝沼, 1986)、多糖の加水分解は容易でなく、そのため対象に合わせた分解法を選択する必要がある。そこで、用いた加水分解法の生ごみに対する適用性評価も併せて行うこととする。

表 6-4 回分式培養の実験条件

TEST 13	1	2
培養温度 (°C)	55	55
pH (-)	6.0	6.0
基質	2倍希釈生ごみ 1,000 g	2倍希釈生ごみ 1,000 g
植種材料	-	-

・腐敗した模擬生ごみの影響確認。

TEST 14	1	2	3	4
培養温度 (°C)	55	55	55	55
pH (-)	5.5	5.5	5.5	5.5
基質	4倍希釈生ごみ 800 g	4倍希釈生ごみ 800 g でんぷん 20 g	4倍希釈生ごみ 800 g ペクチン 20 g	4倍希釈生ごみ 800 g セルロース 20 g
植種材料	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g	L-乳酸発酵液 200 g

・試薬多糖の資化性確認

TEST 15	1	2
培養温度 (°C)	55	55
pH (-)	5.5	5.5
基質	2倍希釈生ごみ 450 g 3倍希釈バナナ果皮 450 g	3倍希釈バナナ果皮 900 g
植種材料	L-乳酸発酵液 100 g	L-乳酸発酵液 100 g

・バナナ果皮の資化性確認

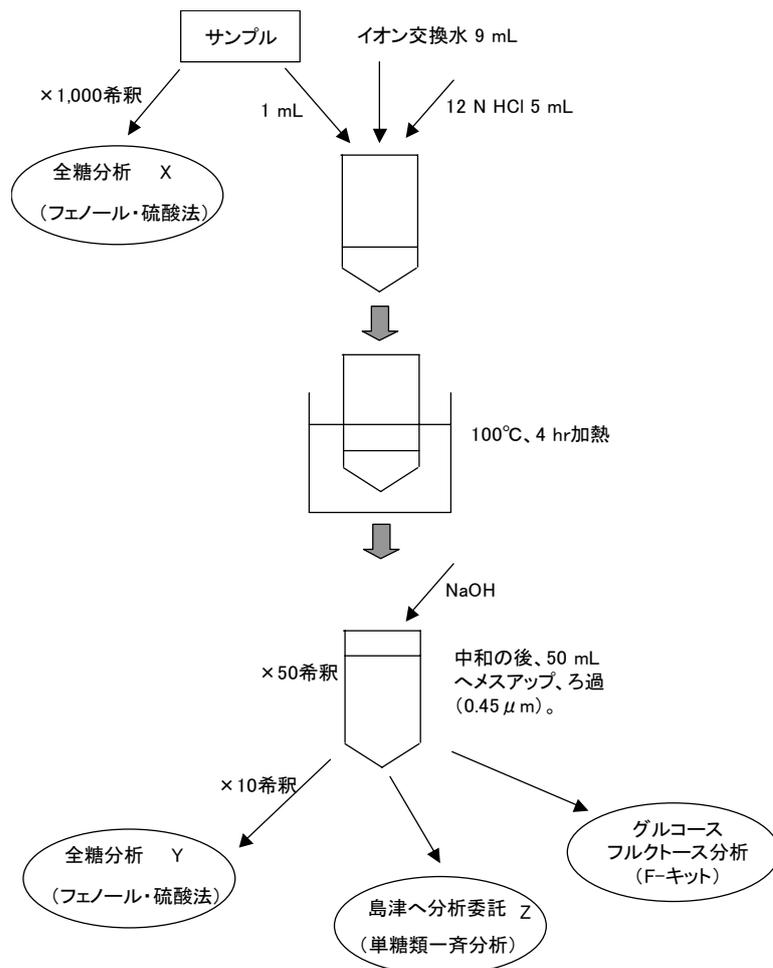


図 6-1 糖加水分解とサンプル準備のフローシート

### 第3節 実験結果および考察

#### 3.1 冷蔵保管中における生ごみの質的变化

##### 3.1.1 概論

自然環境に放置された生ごみは、coliforms や *Clostridium* 属による臭気生成とともに直ちに腐敗が始まる (Wang *et al.*, 2002)。この様な腐敗が L-乳酸発酵に及ぼす悪影響をまとめると、① L-乳酸へ資化できる糖質が消費される、②光学純度を低下させる D-乳酸が生成する、および③病原性を有する菌群の温床となるなどが挙げられる。このような課題に対して、L-乳酸発酵へ供するための生ごみの保管方法に関する検討を Wang *et al.* は行っている。この成果を整理すると以下のとおりである。

- a) 実生ごみを 25℃の環境下で嫌氣的に放置 (4日間) することにより、乳酸発酵 (5~20 g/L) の進行とともに乳酸菌が優占化し、異臭原因菌や病原菌が駆逐される (Wang *et al.*, 2001)。
- b) 実生ごみを 5、25、37 および 50℃条件下で嫌氣的に放置 (14日間) すると、5℃と 50℃において乳酸生成 (約 10 g/L と約 15 g/L) と糖消費が抑制され、かつ、異臭原因菌や病原菌が駆逐される (Wang *et al.*, 2002)。
- c) 実生ごみを 25℃の環境下で嫌氣的に放置 (8日間) する際に、酸添加により pH を低くすることで乳酸生成 (約 10 g/L) や異臭原因菌と病原菌の育成が抑制され、さらに酢酸により pH を調整すると D-乳酸生成 (≒0 g/L) が抑制される (Wang *et al.*, 2003)。

以上の結果から、仮に生ごみを保管することができるのであれば、5℃の環境で、pH を酢酸あるいは発酵で得た乳酸により低めに設定することが望ましいと判断される。現実には、家庭にて存在する時間も含めて、家庭から排出される生ごみが低温保管されることは期待し難い。しかし、常温下で数日放置された生ごみも、Wang *et al.* によれば乳酸発酵および乳酸菌の優占化に至るとされている。つまり、自然発生した乳酸菌の優占状態となった生ごみが高温 L-乳酸発酵へ与える影響を検討すれば、一般的に排出される生ごみの本法に対する影響把握につながると考えられる。

生ごみの冷蔵保管の可能性に関しては、次のようにも考えられる。ごみ収集に関しては、生ごみの腐敗性のために収集頻度が週 2 回と多くなっている事実がある。また、生ごみは焼却処理に対してエネルギー的なロスが大きいとされる。一方で、一般廃棄物に属する事業系の生ごみについては、食品リサイクル法により回収および資源化の必要性が生じてきた。これら事業系の生ごみは分散的に発生することから、その回収には新たな回収システムを構築する必要がある。そこで、このような回収システムと同じく分散的に発生する家庭からの生ごみ回収を加え、さらに資源としての価値により冷蔵管理がなされること、もしくは直ちに資源化されることが期待される。仮にそのようなシステムが構築されれば、一般廃棄物から腐敗しやすい生ごみを分別でき、ごみ収集を担う市町村においてはごみ収集頻度を減らすことによる経費削減が実施できる。削減された経費、事業系生ごみの処分負担金および生ごみが持つ資源としての価値により、生ごみ回収システムの実現可能性も検討に値すると考えられる。なお、産業廃棄物に属する食品廃棄物に関しては、集約的に排出されること、性状が均質であることなどより資源としての価値が高く、その品質の保存に経費をかけることは一般廃棄物である生ごみ以上に現実的であると考えられる。

以上から、生ごみが冷蔵保存された場合の腐敗進行具合および高温 L-乳酸発酵へ与える影響に関して考察を試みる。なお、この考察でも自然発生する乳酸菌が優占化すると予期されることから、同様に乳酸菌の優占化が予想される常温下で数日放置される実生ごみが与える本法への影響も併せて推察できるものと考えられる。

### 3.1.2 実験結果

冷蔵庫で模擬生ごみを保管し、その腐敗過程を追跡した。実験は2回実施（40日間と39日間）した。実験開始時と終了時におけるTS、SS、VTSおよびVSSの変化を図6-2に示す。

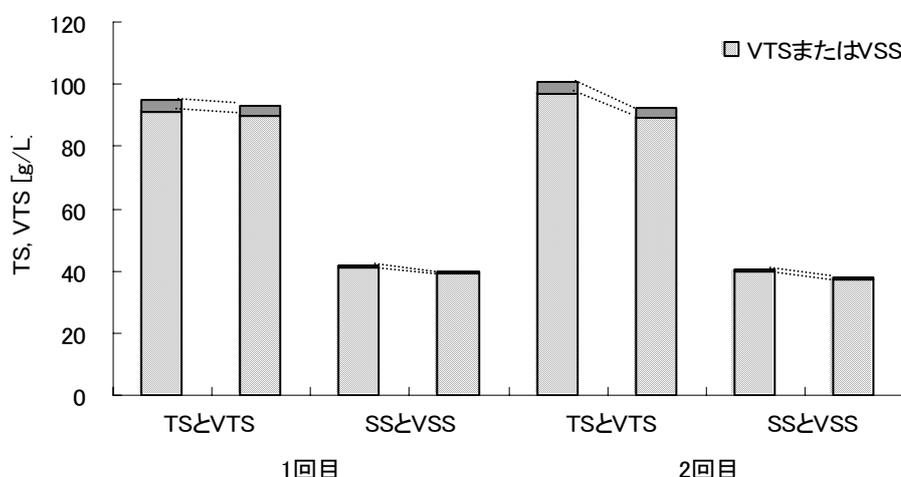


図6-2 生ごみ腐敗実験におけるTS、SSの変化

図6-2によると、TSおよびSSとも9%未満の減少が確認された。したがって、生ごみの冷蔵庫保管において、無機化および可溶化がわずかに進行したと推察される。TOC(T-, S-)、COD(T-, S-)、糖質(T-, S-)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (2回目のみ)、酢酸と乳酸、L-乳酸の光学純度およびpHの時間変化を1回目は図6-3に、2回目は図6-4に示す。有機物量に関しては、TOCとCODおよびDOCとS-CODとも明確な減少は確認できず、TS、SSの結果と異なり無機化を確認できなかった。ただし、TOCとCODの分析値にはばらつきが存在したことを考慮すると、非常にわずかな量の有機物が無機化したものと推察される。糖質に関しては、実験開始後20日前後に減少が確認され、最終的に20% (1回目) および16% (2回目) の糖質が減少した。pHに関しては、1, 2回目とも20日前後 (1回目; 22日目, 2回目; 19日目) で著しい減少を観察した。培養の終了時には、1, 2回目ともpH値は4.0前後まで低下した。有機酸に関しては、乳酸と酢酸の増加を確認した。これらの有機酸は、実験開始20日後以降で増加が顕著となり、乳酸は、1回目において0.2から2.5 g/Lまで、2回目において0.3から3.0 g/Lまで増加し、酢酸は、1回目においてN.D. (検出できず) から1.3 g/Lまで、2回目においてN.D. から1.0 g/Lまで増加した。非常に緩やかであるが乳酸発酵が進行したことが示された。また、酢酸も同時に生成していることから、乳酸以外の副生成物を生成するヘテロ乳酸発酵の進行も考えられる (Schleifer, 1986)。一方で、嫌気状態においてよく生成する酪酸などの生成は確認されなかった。乳酸および酢酸は糖質から生成されるため物質収支を考慮すると、減少した糖質の1回目では約17%、2回目では約41%が乳酸および酢酸に変換したこととなった。いずれの場合も過半数以上の糖質が有機酸以外に変化したことが示唆された。分析により確認を行っていないが、第2章の実験の際に検出されたエタノール生成が起こったものと推察される。なお、pHの減少と乳酸および酢酸の増加の時期が一致することから、pHの低下はこれら有機酸生成によるものであると判断された。光学純度に関しては、乳酸生成に併せて低下することから、生成された乳酸はD-, L-乳酸であると考えられる。本節の実験は、全く異なる時期に2度実施し、ほぼ同様な結果を得たことから再現性も有すると考えられる。

以上の結果をWang *et al.* (2002) の5°Cにおける実験と比較すると、乳酸の生成速度に著しい

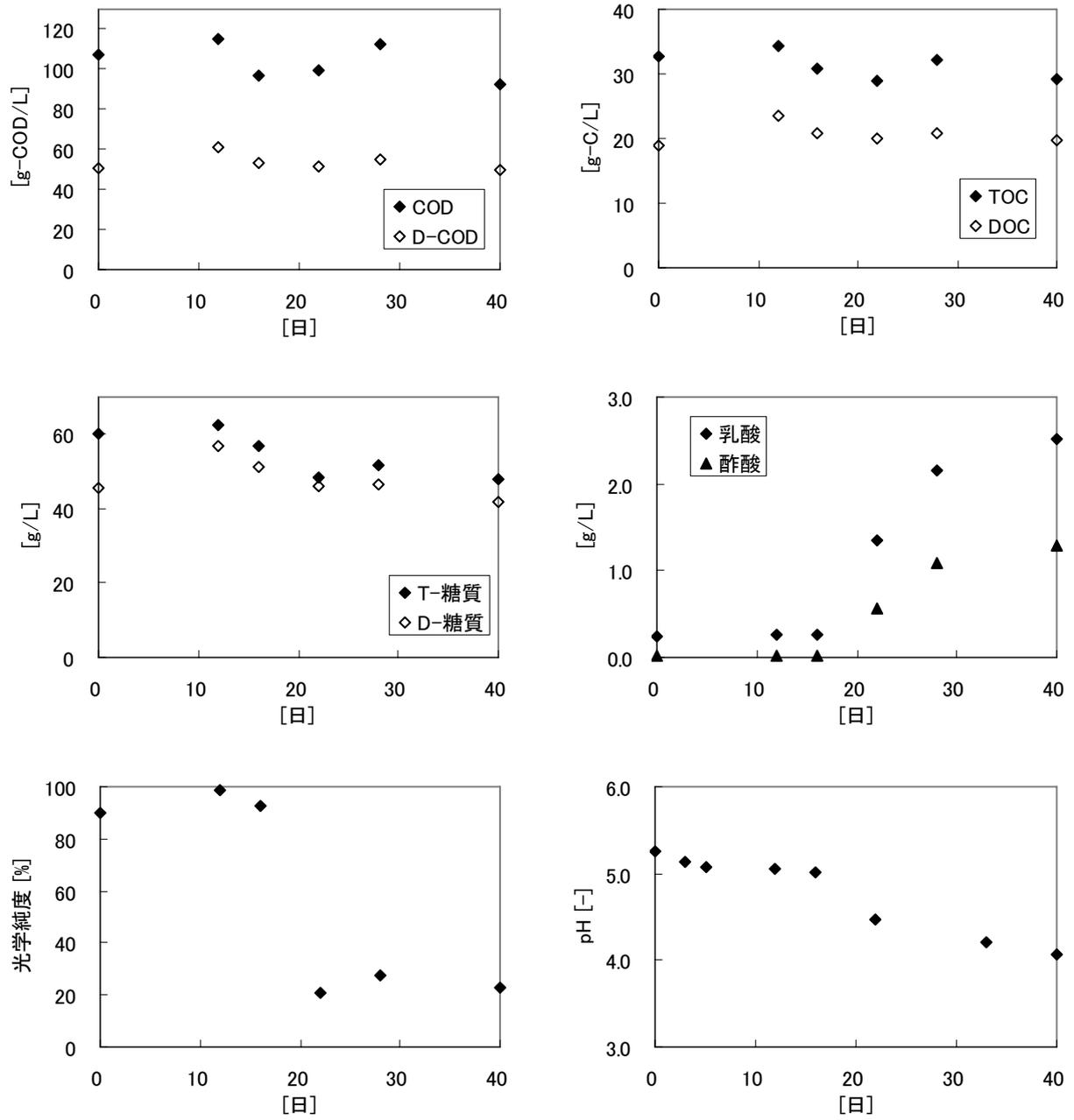


図 6-3 生ごみ腐敗実験における各項目の推移 (1回目)

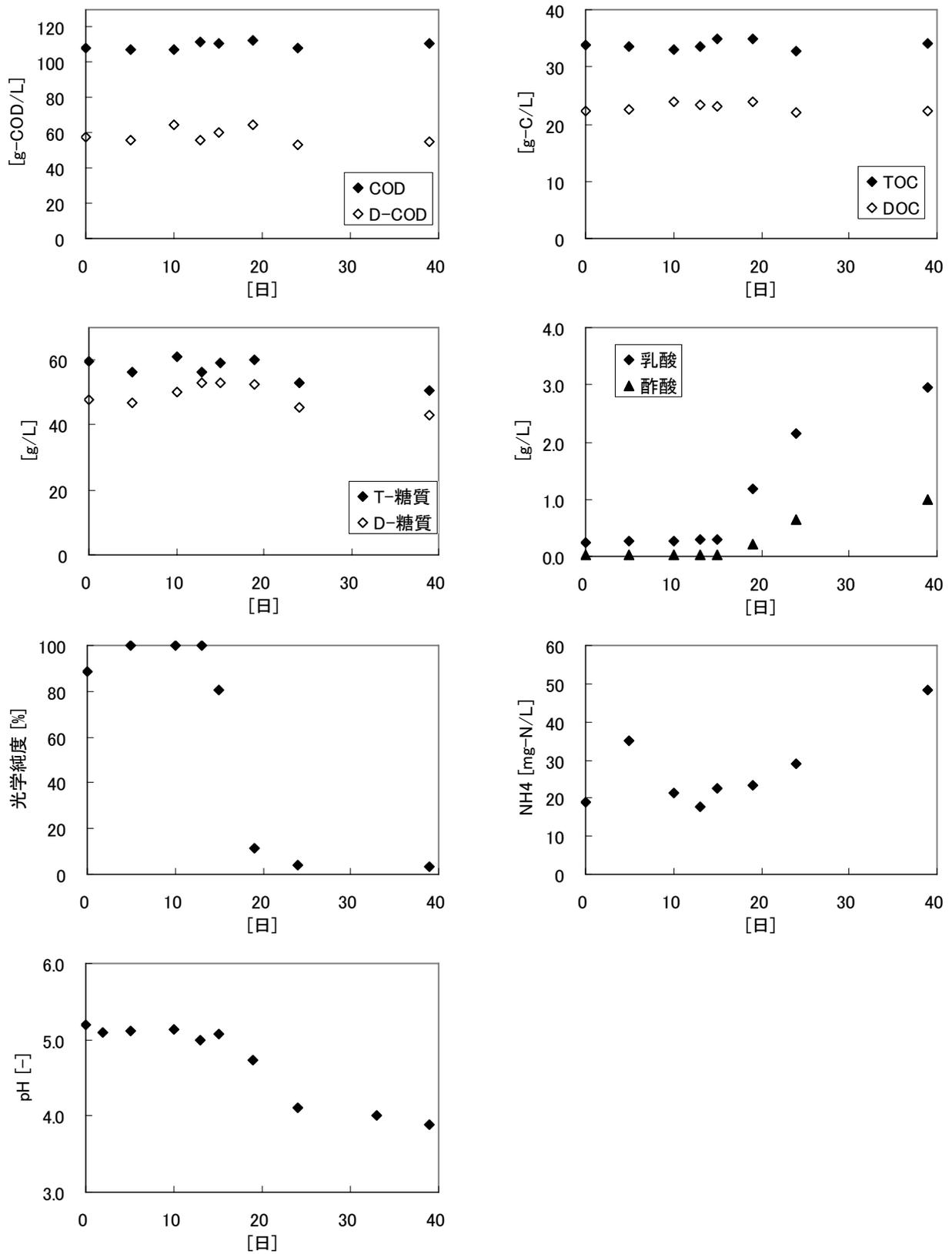


図 6-4 生ごみ腐敗実験における各項目の推移 (2 回目)

差が見られた。pHが低下する時間に関しては、Wang *et al.*は3日後にはpH低下がほぼ低止し終えたのに対して、ここでは20日程度も要した。また、生成した乳酸量を比較すると、概ねここでの40日間程度の時間経過はWang *et al.* (2002)の6日程度に相当すると考えられる。このような状態変化に要する大きな時間の差の原因は、まず実験開始時のpH値が挙げられる。Wang *et al.*はpH 6.1であったのに対して、本節の実験ではpH 5.2であった。これは柑橘類の果皮が原料に含まれている点(表2-1参照)が大きいと考えられるが、ここでの実験は当初からpHが抑制された条件での実験に相当したと考えられる。次に、Wang *et al.*は実生ごみ(大学カフェテリア)を使用したことから、生ごみの発生から実験開始時点までに菌群の増殖が相当量起こっていたと考えられる。一方、本節の実験は、微生物群集解析の結果を後述するが、極めて微生物量の少ない環境から実験を開始している。これらの差が上述した時間の差として表れたと考えられる。pH低下タイミングや乳酸濃度などを基に双方の培養状況の比較を行うと、本節の実験では20日間程度の時間経過によりpH低下が収斂したが、この時の模擬生ごみ内は自然発生した乳酸菌がほぼ優占化した状態であったと推察される。なお、反応時間への影響は少ないと考えられるが、両者間の生ごみ中成分の違いも大きく、Wang *et al.*の実生ごみではTSが16%、糖質が50%およびタンパク質が13%と本実験の模擬生ごみとTSを基準に比較すると糖質とタンパク質が3~4倍程度高い生ごみであった。

2回目の実験における①実験開始時および②19日経過後のサンプルについて、微生物群集解析を行った。結果を表6-5に示す。これによると、サンプル①からは微生物の検出はなく、原料由

表6-5 生ごみ腐敗実験における菌叢解析結果(アンダーラインが細菌)

	Identities (%)	No. of clones	Ratio of clones	
	<u><i>Oncorhynchus tshawytscha mitochondrion. complete genome</i></u>	98.4	30	31.6
	<u><i>Bos taurus isolate 32026 mitochondrion. complete genome</i></u>	100	25	26.3
①	<u><i>Bos indicus breed Nellore mitochondrion. complete genome</i></u>	100	22	23.2
スタート	<u><i>Bos indicus mitochondrion. complete genome</i></u>	100	10	10.5
	<u><i>Sus scrofa breed Jeju native black mitochondrion. complete genome</i></u>	100	4	4.2
	<u><i>Sus scrofa complete mitochondrial DNA</i></u>	100	4	4.2
	<u><i>Lactobacillus sakei</i></u>	99.8	31	32.3
	<u><i>Bos taurus isolate 32026 mitochondrion. complete genome</i></u>	99.8	16	16.7
	<u><i>Oncorhynchus tshawytscha mitochondrion. complete genome</i></u>	98.3	16	16.7
②	<u><i>Bos indicus breed Nellore mitochondrion. complete genome</i></u>	99.7	12	12.5
19日間経過	<u><i>Leuconostoc mesenteroides</i></u>	99.9	11	11.5
	<u><i>Leuconostoc sp.</i></u>	99.0	5	5.2
	<u><i>Bos indicus mitochondrion. complete genome</i></u>	99.8	4	4.2
	<u><i>Sus scrofa breed Chinese Qingping mitochondrion. complete genome</i></u>	99.8	1	1.0

来(鮭など)のミトコンドリア(95/95 clone)を検出する結果となった。購入して間もない食材を模擬生ごみに加工し、直ちに冷凍保存したため、微生物の増殖が起こっていない状態であったと考えられる。一方、サンプル②からは、原材料ミトコンドリア(49/95)も高い確率で検出したが、*Lactobacillus sakei*(31/95 clone)、*Leuconostoc mesenteroides*(11/95)、*Leuconostoc sp.*(5/95)を検出した。*L. sakei*は、第2章の高温発酵液サンプル中にも高い確率で検出された菌であるが、低温性のホモ発酵D-,L-乳酸菌である。*L. mesenteroides*も、第2章の高温発酵液サンプル中で検出された菌である。高温発酵液で検出されたこれらの菌群は、第2章の考察では生ごみの冷蔵庫保管中に増殖したものであるとした。ここでの実験結果は、これら菌群が生ごみの冷蔵庫保管中に優占化していることを示し、第2章の考察を支持する結果である。また、*Leuconostoc*

属は、低温～中温域で生育するヘテロ発酵 D-乳酸菌として知られている。生成した有機酸の解析の際に、酢酸の生成からヘテロ乳酸発酵を推察したが、*Leuconostoc* 属の検出はこの生成有機酸の結果とも一致する。乳酸の光学異性体に関しては、D-乳酸が過剰となる状況も観察されたが、これも検出された菌群の性質と一致する結果である。

冷蔵庫で保管した生ごみからは、結局乳酸菌のみが検出された。これは、Wang *et al.* (2001, 2002, 2003) と一致する結果である。そこで、以下に乳酸菌が優占化した生ごみが高温 L-乳酸発酵に与える影響について考察する。本法に影響を与えると考えられる主体は、①乳酸菌自体と②乳酸菌の生成物である。まず、乳酸菌が与える影響を検討する。生ごみから検出された乳酸菌は、*L. sakei* など低温から中温に生息域を持つ乳酸菌であった。これは保管方法に依存する結果であるが、これら菌群が優占化した場合は第 2 章の微生物群集解析結果と発酵結果から判断されるとおり高温 L-乳酸発酵自体に影響は無いと考えられる。一般的に、乳酸菌は中温菌が多いとされる点も高温培養による選別を有利とする。なお、第 3 章で検出されたとおり、*Lactobacillus amylolyticus* などのように 50℃ の環境で生育可能な乳酸菌も存在する。しかし、このような高温乳酸菌も、第 2 章および第 3 章で 55℃ の培養温度により選別を行ってきた。以上より、自然発生し優占化した乳酸菌は高温 L-乳酸発酵に悪影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

次に、乳酸菌の生成物に関して、主な生成物としては、a) 乳酸、b) 過酸化水素、c) バクテリオシンが挙げられる (橋場ら, 1996)。これらは、乳酸菌の優占化と深い関連があり、乳酸の生成は pH の低下や乳酸自体の抗菌作用の増加による滅菌を、過酸化水素の生成は嫌気性菌の死滅を、バクテリオシンの生成は類縁菌の死滅をもたらす。これらの性質を応用し、古くからチーズ、ヨーグルト、漬物など発酵保存食品が製造されてきた。乳酸菌の生成物は、発酵後も残存し影響を及ぼすと考えられることから、これらの高温 L-乳酸発酵に与える影響を以下に考察する。

#### a) 乳酸について

高温 L-乳酸菌 *Bacillus coagulans* も乳酸生成菌であることから、生長に関しては第 5 章で検討したとおり 40 g/L 以上とならない限り顕著な影響はない。ただし、L-乳酸発酵後の生成物の光学純度に対して予め存在する D-乳酸の影響がある。第 2 章で検討したとおり、L-乳酸発酵以前に生成された D-乳酸により、L-乳酸発酵後の乳酸の光学純度は大きく影響を受ける。そこで、D-乳酸を生成させないことが重要であり、このためには極力生ごみを保存しないことが必要である。なお、Wang *et al.* (2003) は酢酸を添加することで D-乳酸の抑制を報告している。*L. sakei* に関しては、酢酸塩を添加することにより D-乳酸生成を抑制できる報告 (Iino *et al.*, 2003) もあるが、生ごみ中に存在する可能性のある乳酸菌の菌種数を考慮すると、D-乳酸抑制に関してはその機構も含めて知見が充分でない。また、排出源で酢酸添加を期待することも困難である。一方、生成してしまった D-, L-乳酸をプロピオン酸発酵により消費する方法も提案されている (Sakai *et al.*, 2004) が、別途培養した菌種を植種する必要性、滅菌工程が加わる煩雑性、糖質をプロピオン酸菌により消費される危険性などを考慮すると、この手法は L-乳酸発酵の製造コスト低廉化および維持管理の簡便化の観点で相容れない。したがって、現状では生成した D-乳酸を除去しないで得られる光学純度 90～95% の乳酸の用途を探ることが適当であると考えられる。光学純度 90% 以上であるならば用途に制約があるもののポリ乳酸として利用できること、また、Tsuji (2002) によると D-, L-乳酸を混合することによりポリ乳酸の生分解性を調整できることが報告されていることから、光学純度の多少劣る L-乳酸の利用も促進する可能性が期待される。将来的には、生ごみに資源としての価値を付帯させ、発生源での放置が極力起こらない社会システムの構築に期待する。

b) 過酸化水素について

*Bacillus* 属が一般にカタラーゼを有すること (Holt *et al.*, 1994)、*B. coagulans* は好気性条件下でも培養できること (Sen and Babu, 2005) から影響はないと考えられる。

c) バクテリオシンについて

抗菌作用を示すタンパク質性の成分であり、通常はその類縁菌に対して作用する物質と定義されている (Klaenhammer, 1993)。実際、バクテリオシンの多くは類縁菌にのみ有効な、比較的作用範囲の狭いものが多い。しかし中には、グラム陽性菌全般に対しても働く、作用範囲の広いバクテリオシンも存在する (藤田, 1996)。作用範囲の広いバクテリオシンは、Klaenhammer (1993) により 4 つの Class に区分されたバクテリオシンのうちの Class I (ランチビオティック) に分類されるものであるが、食品保存料として利用されるなど注目を集めている。このランチビオティックに分類される代表的なバクテリオシンとしてナイシンが挙げられる (石崎, 2000)。このナイシンは、米国、EU など 50 カ国以上 (日本を除く) において食品保存剤としての使用が認められており、近年日本においてもその適用性が検討されている。その検討資料 (内閣府 食品安全委員会 添加物専門調査会; <http://www.fsc.go.jp/senmon/tenkabutu/>) およびその適用性検討資料 (<http://www.fsc.go.jp/senmon/tenkabutu/t-dai17/>) によれば、ナイシンは *B. coagulans* の生菌に限らず孢子に対しても作用する結果が示されている。つまり、ナイシンを生成する乳酸菌が生ごみ中で優占化する状態は避けることが必要である。このナイシンを含む複数のランチビオティックを生成する乳酸菌は *Lactococcus lactis* である (石崎, 2000)。そこで、*L. lactis* が増殖しない環境で生ごみを保管することが望ましい。*L. lactis* の増殖条件は 10°C 以上の中温であり、主に乳製品で検出される (Schleifer, 1986)。したがって、冷蔵条件にて生ごみを保管すれば、ナイシンを含むランチビオティックの高温 L-乳酸発酵への影響を回避できると考えられる。なお、石崎 (2000) によると、*L. sakei* が生成するラクトシンがランチビオティックとして紹介されている。しかし、このラクトシンに関しては、作用範囲が主に *Lactobacillus* 属であり、*Bacillus* 属には影響がないことが報告されている (Mørtvedt and Nes, 1990)。これらより、実績面も踏まえて、生ごみは冷蔵保存されることが望ましいと判断される。

生ごみを保管することによる懸念事項を記してきたが、利点も存在する。それは、Wang *et al.* (2001, 2002, 2003) の実験でも示されていたとおり、乳酸菌優占化による *Clostridium* 属の排除である。*Clostridium* 属は、第 3 章でも検出された高温環境下でも生育が可能な *B. coagulans* との競合菌であり、乳酸の消費とラセミ化の影響を与える。この *Clostridium* 属の増殖を避けるため、第 3 章では 55°C で pH 5.5 という高温 L-乳酸菌にとっても増殖至適域から離れた培養条件を提案した。しかし、予め *Clostridium* 属が生存しない生ごみが供給されれば、pH 条件を *B. coagulans* の至適域である pH 6.0 あるいは 6.5 とした場合でも、安定して L-乳酸発酵が実施されることも期待される。家庭から排出される生ごみを想定した場合も、週 2 回の回収のため平均 2 日程度生ごみは保管されることとなり、この期間において生ごみ内では乳酸菌の増殖と競合菌の排除が起こっていると考えられる。そこで、*Clostridium* 属などの競合菌が排除されたと考えられる生ごみを用いて、第 3 章において植種を伴わない条件では L-乳酸発酵に至らなかった培養条件における回分式培養を実施し、避けられない排出源での腐敗がもたらす利点を生かす実験を次に実施する。

### 3.1.3 冷蔵保管された生ごみの回分式高温 L-乳酸発酵 —TEST 13—

前項において、排出源において避けられない腐敗が、プラスの効果として *B. coagulans* の競合菌である *Clostridium* 属を排除し、pH に関する L-乳酸発酵条件を至適側にスライドできる可能性を指摘した。そこで、この可能性について確認実験を行った。実験は、植種を伴わない回分式培養を、第 3 章の実験において L-乳酸発酵に至らなかった条件 (55°C、pH 6.0) について 2 系列実施した (TEST 13)。

TEST 13 における L-乳酸の光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図 6-5 に示す。また、その結果を表 6-6 にまとめて示す。なお、表中の平均乳酸生成濃度は、第 3 章で算出法を示した平均乳酸生成速度である。また、最大推定乳酸生成速度は第 4 章で示した方法により求めた速度である。242 時間培養により、TEST 13-1 では生成乳酸量 33.2 g/L、乳酸の収率 0.48 および光学純度 93.8%、また、TEST 13-2 では生成乳酸量 33.9 g/L、乳酸の収率 0.49 および光学純度 94.8% が得られた。これらから、第 3 章では L-乳酸発酵に至らなかった 55°C で pH 6.0 の条件でも L-乳酸発酵が行えることが示された。なお、光学純度が低い値となったが、これは培養開始前に D-, L-乳酸が存在したためである。生成乳酸の光学純度に関しては、培養開始直後に両系列とも乳酸の消費が起こったこともあり最終の D-乳酸量が培養開始時のそれより少なくなったため算出できなかったが、L-乳酸発酵が主として進行したことは確認された。

図 6-6 に、平均乳酸生成速度を、第 3 章において植種を伴わなかった実験 (TEST 1、TEST 2 および TEST 4) および伴った実験 (TEST 5、TEST 6 および TEST 7) と比較した結果を示す。また、中和剤消費量記録による乳酸発酵過程および第 4 章で提示した最大推定乳酸生成速度をそれぞれ図 6-7 および図 6-8 に示す。第 4 章で行った各回分式培養実験での速度と比較すると (表 4-3 参照)、TEST 13 では非常に速やかに L-乳酸発酵が進行したことが示された。一方、生成乳酸量

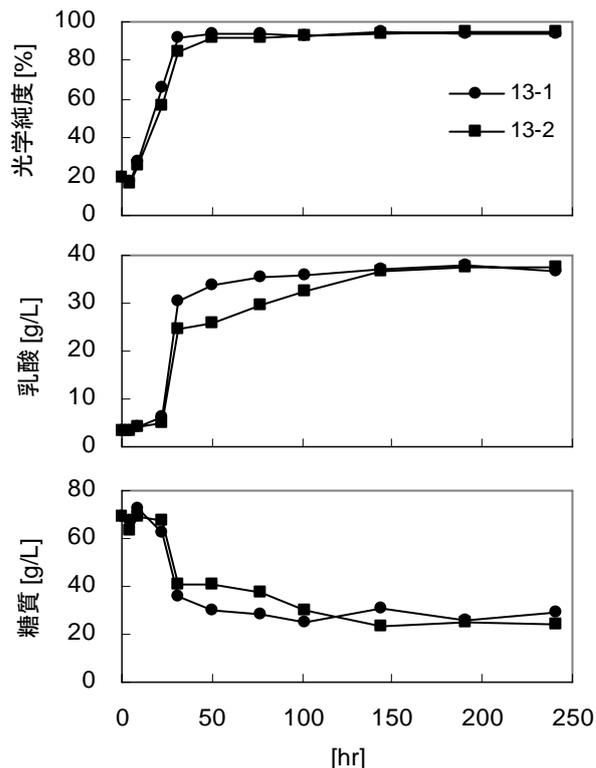


図 6-5 TEST 13 の培養結果

表 6-6 TEST 13 の培養結果

TEST 13		1	2
培養時間 (hr)		242	242
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	69.2	69.2
	最終濃度	28.8	24.1
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	3.5	3.5
	最終濃度	36.7	37.5
乳酸生成量 (g)		33.2	33.9
乳酸収率 (-)		0.48	0.49
光学純度 (%)	初期純度	19.1	19.1
	最終純度	93.8	94.8
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)		0.84	0.34
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)		6.59	13.0

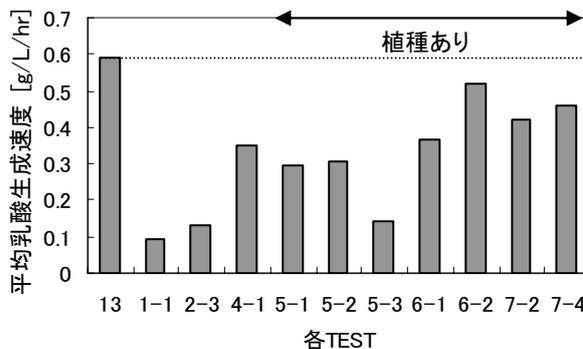


図 6-6 平均乳酸生成速度の比較

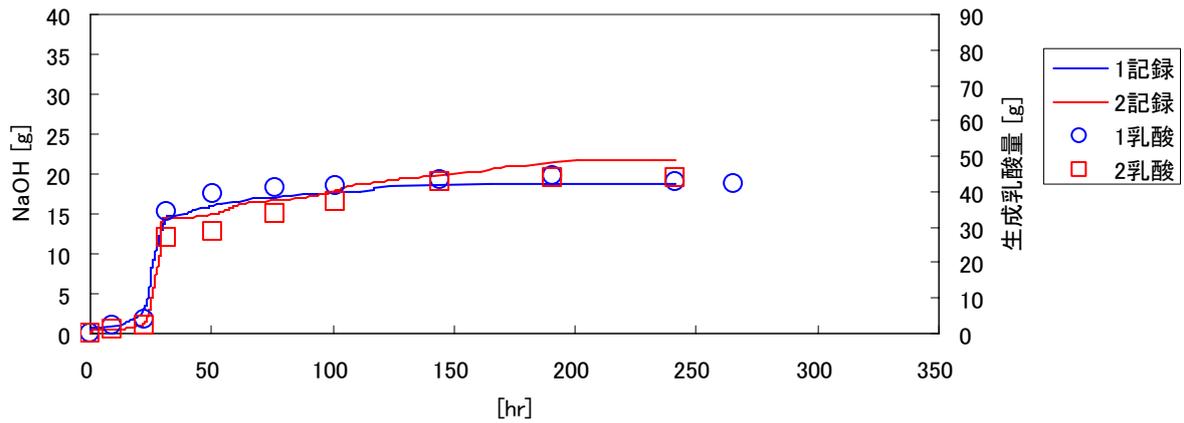


図 6-7 中和剤消費量と乳酸生成量の経時変化比較

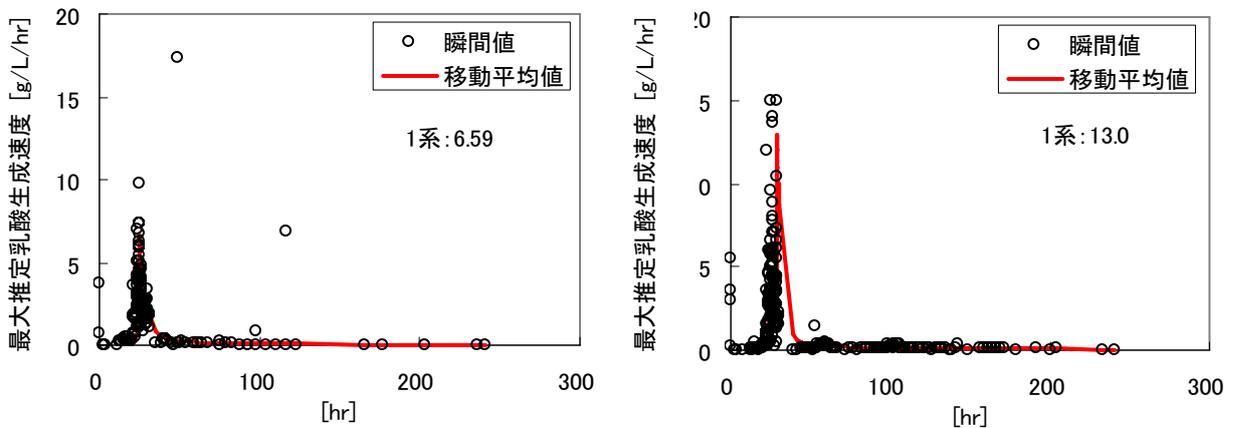


図 6-8 中和剤供給ポンプ駆動記録から求めた乳酸生成速度

や乳酸の収率は、第 3 章の回分式培養実験（表 3-6 参照）と同程度であった。以上の結果は、腐敗の進んだ生ごみが *Clostridium* 属と考えられる競合菌を排除し、L-乳酸発酵が可能となる培養範囲を拡大させたことを示す。また、容積あたりの最大乳酸生成速度が高まった結果は、冷蔵庫保管中に多糖の加水分解が進んだ結果と考えられる。この点も、生ごみを保管することの副次的な効果と考えられる。

以上より、生ごみの排出から回収過程で避けられない腐敗が、プラスの側面を持つことも実際に示すことができた。ただし、ポリ乳酸の物性および加工性を考慮すると、乳酸の光学純度は 96% 以上が望ましいとされる。この点を考慮すると、生ごみの腐敗は D-乳酸の生成を招き、生成された L-乳酸の市場価値低下に及ぼす影響が大きい。そこで、なるべく保管の必要ない、あるいは、排出源において冷蔵保存されるような生ごみ回収システムの構築が必要と考えられる。

### 3.2 単糖類分析による高温 L-乳酸発酵資化糖の同定

#### 3.2.1 概論

第 3 章の実験では、十分に高温 L-乳酸発酵を実施した場合でも発酵液中に初期糖量に対して 20～50%の糖質が残留した（図 3-6 参照）。また、第 2 章の実験では、高温発酵は中温発酵と比べて発酵液中に残存する糖質が常に高い傾向を示していた（図 2-9 参照）。これらにあるように、現状の高温 L-乳酸発酵は、糖資化性の面で課題があると考えられる。一方で、前章までの検討では、

糖質は全てフェノール・硫酸法を用いて分析している。そのため、求まる糖質量はグルコース量換算された相対値であり、例えば残存する糖質の糖組成といった構成単糖類ごとの情報を得ることはできない。また、フェノール・硫酸法は、例えばペントースなど、ヘキソース以外の糖質が多く混在するサンプルを分析する際は、全てヘキソース量換算で求めることから感度が低くなる欠点もある。そこで、本節では構成単糖類ごとの糖分析を行い、フェノール・硫酸法による分析の妥当性評価、および模擬生ごみと発酵液中に存在する糖質の糖組成から、高温 L-乳酸発酵により資化されている単糖類の同定を試みる。

実験内容は、模擬生ごみと発酵液に存在する糖質に対して、酸および熱により加水分解を実施し、得られた単糖類を定量することにより発酵の前後で変化する各単糖類の動向から資化されている単糖類の同定を試みる。実験方法は第 2 節に記した。

実験に用いたサンプルを表 6-7 にまとめて示す。前項 3.1 の回分式培養ならびに第 2 章の半連続式高温培養および中温培養からサンプルを得た。なお、模擬生ごみと発酵液のサンプルには対応する時期的な組合せがあり、その関係も表 6-7 に示している。

表 6-7 多糖加水分解試験におけるサンプル

サンプル名	備考
生ごみ	
1 生ごみA	高温Aのスタート生ごみ
2 生ごみA-ろ過	同上
3 生ごみB	高温Bと同一日サンプル
4 生ごみC	高温C、中温Cと同一日サンプル
高温発酵液	
5 高温A	回分式培養 (242時間培養)
6 高温A-ろ過	同上
7 高温B	半連続式培養 (HRT 10日)
8 高温C	半連続式培養 (HRT 3日)
中温発酵液	
9 中温C	半連続式培養 (HRT 10日)

### 3.2.2 実験結果

各糖質の分析結果の一覧を表 6-8 にまとめて示す。まず、糖質の加水分解 (図 6-1 参照) の操作による全糖量の変化について、フェノール・硫酸法を用いて検討した (図 6-1 中の X と Y の比較)。その結果を図 6-9 に示す。これによると、加水分解およびろ過操作を受けたサンプル (Y) は加水分解前 (X) と比べて約 85%の糖質量であった。しかし、両者の間で高い相関 ( $R^2=0.94$ ) を有することから、糖質量の大小や資化された糖質の有無に関わらず、図 6-1 の操作により分解される糖質割合自体は一定であると考えられる。そこで、図 6-1 の操作でも単糖類組成の比そのものは保存されると考え、加水分解後のサンプルの島津法による単糖類分析を行った。

図 6-10 に、島津法で検出された単糖類の重量和とフェノール・硫酸法による分析値の比較を示す (図 6-1 中の Y と Z の比較)。これによると、島津法 (Z) はフェノール・硫酸法 (Y) に対して約 10%程度低い値を示すものの、両者の間で高い相関関係 ( $R^2=0.9927$ ) が示された。フェノール・硫酸法は、模擬生ごみや発酵液のサンプル種を問わず単糖類の重量和と高い相関関係を有することから、糖質構成上本研究での使用は妥当であったことが確認された。これは、模擬生ごみ中にペントースが少なかったことに起因すると考えられる (表 6-8 参照)。なお、島津法が若干低めの値を示す点については、フェノール・硫酸法がペントースをヘキソース換算で過大に算出し

たこともあるが、島津法側にも LC 分析過程において、ピークは有するものの定量限界以下でカウントされていない成分が存在したためと考えられる。島津法で得た加水分解サンプルの単糖類組成を見ると(表 6-8 参照)、分析したサンプルにおいて、検出された単糖類のうち大部分(重量比)がグルコースであることが分かる。また、島津法による単糖類の重量和に対するグルコースの割合は、生ごみで 83~90%、高温発酵液で 50~81%、中温発酵液で 37%となった。つまり、発酵を経てグルコース割合が低下していることから、グルコースが主に消費されていることが分かる。そこで、表 6-9 において発酵前後でのグルコース量の変化を算出した。これによると、各発酵の前後において、単糖類の重量和の差とグルコース量の差がほぼ等しい。したがって、高温発酵および中温発酵とも、加水分解後グルコースとなる成分を消費していることが示された。

グルコース以外の単糖類の資化性について検討を試みる。島津法によると、模擬生ごみおよび発酵液中とも表 6-8 中の単糖類が主に検出された。このうち、島津法による分析では、アラビノースとフルクトースのピークが同一時に検出され分離が行えない。一方で、両者の重量和はグルコースに次ぐ存在量であることから本節の解析に与える情報量が多い。また、フルクトースはヘキソースで、アラビノースはペントースであり、構成炭素数は乳酸発酵への資化性が異なり、両者を分離してその存在量を把握することはペントースの資化性を判断する観点からも重要である。そこで、個々量の把握の必要性から F-キットを用いたフルクトース量の測定を行うこととした。なお、F-キットは、測定法の構成上、グルコースとフルクトースの両者を測定するものである。そこで、F-キットにより測定されたグルコース量を島津法と比較し、両分析値の相互比較の可能性を検討した後、F-キットのフルクトース量を用いてアラビノース量とフルクトース量の分離を行った。

図 6-11 に F-キットのグルコース量と島津法のグルコース量の比較を示す。これによると、両法の分析値はほぼ同一の値を示していることが分かる。フルクトースはグルコースと同じくヘキソースであり、また F-キットの測定原理上フルクトースはグルコースに転換後測定されることから、F-キットによるフルクトース量はグル

表 6-8 糖質分析結果

No.	サンプル名	全糖 X (g-glucose/L)	分解後の全糖 Y (g-glucose/L)	島津法		F-キット							
				重量和 (g/L)	Z (g/L)	アラビノース (g/L)	マンノース (g/L)	ガラクトース (g/L)	イソマルトース (g/L)	キシロース (g/L)	グルコース (g/L)	フルクトース (g/L)	
1	生ごみA	57.7	47.5	43.9	0.5	0.6	4.3	1.3	0.3	0.3	36.6	38.8	2.7
2	生ごみA-ろ過	43.4	33.0	29.3	-	0.2	0.7	0.6	0.1	0.1	27.5	30.3	0.0
3	生ごみB	50.8	43.1	36.3	0.4	0.4	1.5	1.1	-	0.2	32.7	36.1	0.0
4	生ごみC	39.7	41.6	38.9	0.4	0.4	1.6	1.1	-	0.3	35.1	35.9	0.1
5	高温A	26.5	21.0	19.2	0.4	0.4	1.6	0.9	-	0.3	15.6	15.9	0.2
6	高温A-ろ過	17.5	10.9	10.5	0.1	0.2	0.7	0.4	-	-	9.2	9.2	0.0
7	高温B	13.4	15.5	13.4	0.5	0.4	1.5	0.8	-	0.2	10.0	10.5	0.0
8	高温C	15.5	16.0	14.0	0.5	0.7	4.4	0.7	0.4	0.2	7.1	7.3	3.7
9	中温C	7.1	5.9	4.8	0.5	0.4	1.3	0.9	-	-	1.8	1.7	0.8

コース量と同様島津法と比較が可能であると判断された。島津法およびF-キットにより求めた単糖類量を表 6-10 にまとめる。表 6-10 の結果から、それぞれを発酵前と発酵後の対応に整理し、表 6-11 に単糖類ごとの発酵による変化を示す。

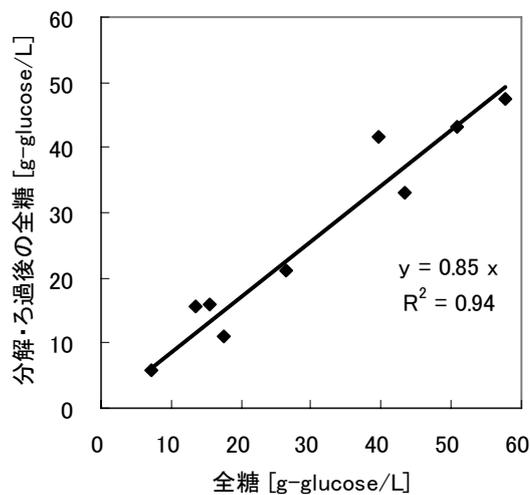


図 6-9 多糖加水分解前後における全糖分析値比較

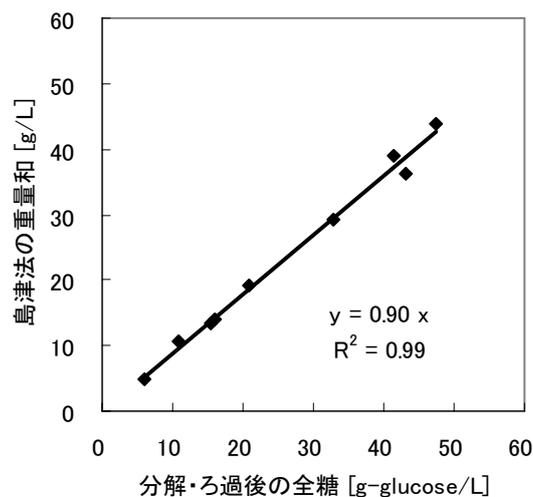


図 6-10 多糖加水分解後における全糖と島津法（重量和）の分析値比較

表 6-9 発酵前後における総和糖量（島津法 重量和）とグルコース量の差の比較

	生ごみ		発酵液		差 (Δ)	
	重量和 (g/L)	グルコース (g/L)	重量和 (g/L)	グルコース (g/L)	重量和 (g/L)	グルコース (g/L)
高温A	43.9	36.6	19.2	15.6	24.7	21.0
高温B	36.3	32.7	13.4	10.0	22.9	22.7
高温C	38.9	35.1	14.0	7.1	25.0	28.0
中温C	36.3	32.7	4.8	1.8	31.4	30.9

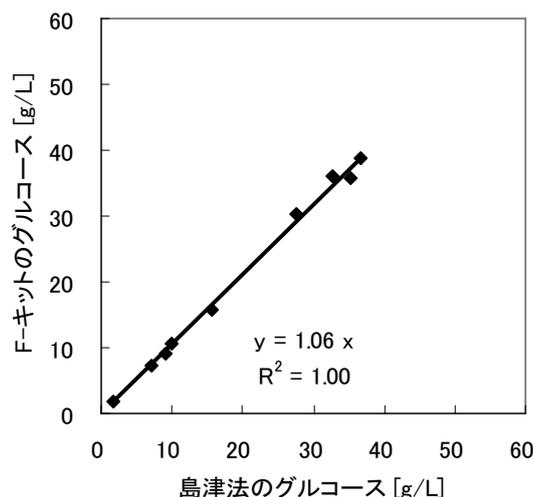


図 6-11 糖加水分解後におけるグルコース量の分析値比較（島津法と F-キット）

表 6-10 糖加水分解により検出された単糖類濃度

No.	サンプル名	ヘキソース					ペントース	
		グルコース (g/L)	ガラクトース (g/L)	ラムノース (g/L)	マンノース (g/L)	フルクトース <sup>a</sup> (g/L)	キシロース (g/L)	アラビノース <sup>b</sup> (g/L)
1	生ごみA	36.6	1.3	0.5	0.6	2.7	0.3	1.6
2	生ごみA-ろ過	27.5	0.6	-	0.2	0.0	0.1	0.7
3	生ごみB	32.7	1.1	0.4	0.4	0.0	0.2	1.5
4	生ごみC	35.1	1.1	0.4	0.4	0.1	0.3	1.5
5	高温A	15.6	0.9	0.4	0.4	0.2	0.3	1.5
6	高温A-ろ過	9.2	0.4	0.1	0.2	0.0	-	0.7
7	高温B	10.0	0.8	0.5	0.4	0.0	0.2	1.5
8	高温C	7.1	0.7	0.5	0.7	3.7	0.2	0.7
9	中温C	1.8	0.9	0.5	0.4	0.8	-	0.6

a; F-キットの分析値

b; 島津法値とF-キット値から算出

表 6-11 発酵前後のサンプル加水分解による各単糖類量の変化

	グルコース				ガラクトース				ラムノース				マンノース			
	高温		中温		高温		中温		高温		中温		高温		中温	
	A	B	C	C	A	B	C	C	A	B	C	C	A	B	C	C
生ごみ濃度 (g/L)	37	33	35	33	1.3	1.1	1.1	1.1	0.54	0.37	0.40	0.37	0.59	0.39	0.40	0.39
発酵液濃度 (g/L)	16	10	7.1	1.8	0.86	0.81	0.71	0.91	0.43	0.46	0.49	0.46	0.40	0.35	0.67	0.37
Δ (g/L)	21	23	28	31	0.5	0.3	0.4	0.2	0.10	-	-	-	0.18	0.04	-	0.03
消費率 (%)	57	69	80	95	34	24	37	14	19	-	-	-	31	10	-	7

	フルクトース				キシロース				アラビノース			
	高温		中温		高温		中温		高温		中温	
	A	B	C	C	A	B	C	C	A	B	C	C
生ごみ濃度 (g/L)	2.7	-	0.10	-	0.26	0.24	0.25	0.24	1.6	1.5	1.5	1.5
発酵液濃度 (g/L)	0.19	-	3.7	0.78	0.26	0.25	0.23	0 <sup>a</sup>	1.5	1.5	0.67	0.55
Δ (g/L)	2.5	-	-	-	0.01	-	0.03	0.24	0.2	-	0.8	1.0
消費率 (%)	93	-	-	-	3	-	11	100	11	-	55	64

キシロース、アラビノースはペントース。以外はヘキソース。

a; 定量下限値以下のため、便宜上濃度0 g/Lとした。

高温培養について考察すると、ヘキソースではグルコース、フルクトースが高い消費率を示した。また、ガラクトースも消費率は若干低いものの安定して消費を確認された。一方、ペントースの資化に関しては、アラビノースの一部の結果を除いて消費が確認されなかった。ペントースは、セルロースとともに植物細胞壁を構成するヘミセルロース中に多く含まれることから、ペントースの資化は農業廃棄物の資源化に結びつくと考えられている (Bostos *et al.*, 2005)。 *B. coagulans* によるペントースの消費に関しては、Sneath (1986)によると、11~89 %の確率で起こる分類とされている。菌株により左右される結果であるが、ここでの検討ではペントースの資化の実績は得られなかった。

中温培養に関しては、検体が1つのため断定はできないが、グルコースの消費率が非常に高い。半連続式培養の実験において、中温培養の発酵液の糖質量は常に高温培養のそれより低い値であった (図 2-14 参照) が、その理由はこのグルコースの消費率にあると推察される。ところで、中温発酵は特に固形性の糖質の資化率が優れていた (図 2-15 参照)。そこで、高温培養と中温培養のグルコース消費率の差は、グルコース自体は高温培養でも資化の中心であることから、グルコースを多く含む多糖の加水分解の差として現れていると考えられる。つまり、グルコースを構成要素とする多糖分解の差を埋める努力、例えば糖分解酵素を添加するなどにより、高温発酵において更なる糖質の資化率向上、すなわち乳酸の収率向上が期待できると考えられる。グルコースは最も存在量の多い糖質だけに、これを構成要素とする多糖をどのように分解するかが将来的な高温 L-乳酸発酵の効率化の鍵と考えられる。なお、高温 L-乳酸発酵の L-乳酸菌である *B. coagulans* 自身は、多糖であるでんぷん分解酵素  $\alpha$ -アミラーゼを誘導できる。この性質は、乳酸菌においては稀有な性質であり (表 2-10 参照)、これにより本研究のような生ごみから直接 L-乳酸を生成する発酵が可能となっている。ただし、でんぷん分解酵素アミラーゼは大きく分類分けしても 6 種類存在 (岡田ほか、1999) し、各々はでんぷんに対して作用できる部位が異なる。したがって、でんぷん分解の観点からは多くの種類の酵素を誘導できる環境が有利であり、その点で様々な菌群の構成により成り立っていると考えられる中温発酵は多糖消費において優れていたと推察される。

フルクトースに関する補足であるが、表 6-11 中の項目 C についてグルコースとフルクトースを比較すると、グルコースは高い消費率を示したものの、フルクトースは増加している。そのため、グルコースのみでは項目 C の消費率は非常に高いものの、グルコースとフルクトースを合算した消費率を考えた場合、項目 C は他の高温培養の結果と同程度 (69%) の消費率となる。グルコースとフルクトースは同じヘキソースであり、先の F-キットの分析でも利用されている通り、両者間を酵素により転換することが可能である。このような酵素に関して、一部の *B. coagulans* は酵素ホスホグルコイソメラーゼを産出するとして知られている (Sharp *et al.*, 1989)。そこで、項目 C における *B. coagulans* はこの能力を備えた株であったことも考えられる。また、このときのみアラビノースの消費も伺えることから、一連の半連続式培養において、必ずしも同一株の *B. coagulans* が常に出現していたわけではないとも推察される。

### 3.3 多糖添加による L-乳酸発酵 —TEST 14—

#### 3.3.1 概論

前節では、高温 L-乳酸発酵において実際に資化している多糖構成単糖類に関する考察を行った。その結果、生ごみ中にも自然界においても存在量の多いグルコースおよびフルクトースを資化し

ている事実を確認した。ただし、非滅菌環境における模擬生ごみの中温発酵と比較した場合、加水分解後にグルコースとなる成分の消費率は必ずしも高い値ではなかった。換言すると、グルコースを構成要素とする多糖でも資化できない割合が高温発酵の場合相対的に高いことが示された。このことは加水分解に原因があり、したがって誘導される、あるいは系内に存在する多糖加水分解酵素に原因があると推察される。そこで、多糖分解過程において進行を妨げられる反応を特定し、量的不足あるいは活性の有無など関与の予想される酵素の特定を実施し、不足する酵素の新たな添加あるいは活性を有する条件へのスライドなどを実施することは非常に有効な検討課題である。

しかしながら、本研究の高温 L-乳酸発酵は、現状において例えば生ごみなど、有機性廃棄物全般に対して適用することを目指している。これは、本法の特徴である滅菌や特定の菌種の植種を要しないこと、加えて *B. coagulans* の  $\alpha$ -アミラーゼ誘導により酵素添加を行わないことによる低コスト化により、従来では糖質の性状（密度、構成多糖）的に採算の取れない糖質源に対しても資源化への道が見出せると期待しているためである。このような糖質源は、例えば乳酸発酵工業の原料として利用されるコーンスターチと比べて、糖質の密度もさることながら構成多糖のばらつきが非常に大きい。したがって、多糖分解過程の反応は、その分だけ複雑に多岐にわたるものと考えられる。そこで、多糖分解過程や関連酵素の特定のような検討の前段として、まず本法により資化する多糖と資化しない多糖を整理することが重要であると考えられる。仮に、このような整理が付けば、資化する多糖に関してはより早い加水分解方法を、資化しない多糖に関しては補助原料（酵素）により加水分解を考慮するなどの選択が可能となる。一方、構成多糖は有機性廃棄物個々により異なる。例えば、農業廃棄物の資化を念頭におく場合は、その特徴であるペントースを構成要素とする多糖の資化性について検討を試みるのが望ましい。つまり、順番に多糖の資化性を論じるのではなく、資化を目指す原料の構成多糖の資化性を検討することが早道である。

以上のような検討の結果、本節では生ごみをベースとする培地に試薬多糖を添加し、それぞれの多糖の資化性を確認することから原料拡大に関する検討を開始することとした。

生ごみを培地のベースとした理由は、糖質以外の栄養素供給のためである。乳酸菌は一般に栄養要求性が複雑であり、これらを有償の材料で調達することは、廃棄物という資源として密度の薄い原料を利用する場合には採算の点で折り合わない。一方、第 5 章でも示したとおり、乳酸資化において生ごみは存在糖質量に比べて過剰の栄養素を含有している。したがって、有機性廃棄物同士をブレンドすることにより、そこに存在する栄養素を有効活用することが賢明であると考えられる。

添加する多糖は、でんぷん、セルロース、ペクチンとした。多糖を選定した理由は以下のとおりである。前節の検討から、グルコースを構成要素とする多糖に関してその資化性が高いことが指摘された。そこで、これに該当する多糖として、自然界に存在する割合も考慮してでんぷんおよびセルロースを選択した。また、多糖成分として、食品廃棄物に含まれる割合が高いと考えられるペクチンについても検討した。ペクチンは、前項の検討で安定して資化したガラクトースのウロン酸であるガラクトツロン酸を主成分とする。

でんぷんは、これをアミラーゼにより加水分解したものがグルコースである。このグルコースが工業用乳酸発酵の原料である。ここでは、加水分解前のでんぷんを L-乳酸発酵に供することにより、高温 L-乳酸発酵のアミラーゼ誘導、加水分解そして乳酸発酵の実施可能性を試すこととし

た。なお、乳酸菌では、アミラーゼを誘導できる菌種は非常に少なく、そこで工業生産における乳酸発酵では前もって酵素処理を施し、多糖を加水分解した段階から乳酸菌を植種する。一方、*B. coagulans* は、高温耐性のあるアミラーゼ誘導が可能な菌であり、この点はアミラーゼ誘導からL-乳酸発酵までを高温L-乳酸発酵単独で実施できる可能性を指摘する。

セルロースは、植物細胞壁の主成分をなす多糖であり、自然界に産出される有機物の中で最も多量に生産される有機物である。農業廃棄物にも多く含まれ、加えて、古紙など紙類廃棄物もその成分のほとんどがセルロースである。これら廃棄物は集約化が可能であり、その点で原料としての価値は高い。一方、セルロースの分解に関しては、カビや一部の細菌にセルロース分解酵素セルラーゼを誘導できることが知られている。*B. coagulans* との関連は、調べる範囲において指摘されないが、仮に資化できるとなると本法の乳酸発酵分野に与える影響は非常に大きいと考えセルロースを検討項目とした。

ペクチンは、セルロースとともに植物体の非木質化組織および細胞壁を構成する主要糖質である。また、ペクチンは、特に柑橘類果実の皮、リンゴの果実、液汁に富む根など多くの植物の細胞壁および細胞間物質を形成する。これらは、一般的な農業廃棄物と比べて、食品に近い箇所に多く含まれることを示していることから、生ごみ中にも多く含まれる多糖であると考えられる。果皮について言えば、加工食品残渣として集約的に発生する可能性も考えられる。これらの点から、ペクチン資化は食品廃棄物の資源化に対して備えたい特徴であると考えられる。なお、ペクチンの分解に関しては、野菜や果物の表面に生息する菌群がペクチンを分解する酵素ペクチナーゼを誘導できることが知られている。*B. coagulans* も野菜の分解に関与 (Priest, 1989) することから、本菌が酵素ペクチナーゼを誘導できる可能性は高いと期待しペクチンを検討項目とした。以上の理由により、ここではこの3種類の多糖の資化性実験を行った。

培養実験 (TEST 14) は、4倍希釈した模擬生ごみに3種類の試薬多糖を添加した系 (TEST 14-2~4) と比較系である無添加の系 (TEST 14-1) を用意して行った。

### 3.3.2 実験結果

TEST 14におけるL-乳酸の光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図6-12に示す。また、その結果を表6-12にまとめて示す。183時間培養により、比較系であるTEST 14-1では生成乳酸量14.5 g/L、乳酸の収率0.54および光学純度99.3%が得られた。一方、多糖を添加したTEST 14-2~TEST 14-4では、光学純度は99%以上であったものの、生成乳酸量において大幅に比較系を上回る結果は得られなかった。でんぷんあるいはペクチンを添加したTEST 14-2およびTEST 14-3では、各々16.4 g/Lおよび16.5 g/Lの乳酸生成量がわずかに比較系を上回ったものの、添加糖量に対する収率を算出すると、わずかに各々0.13および0.17であった。

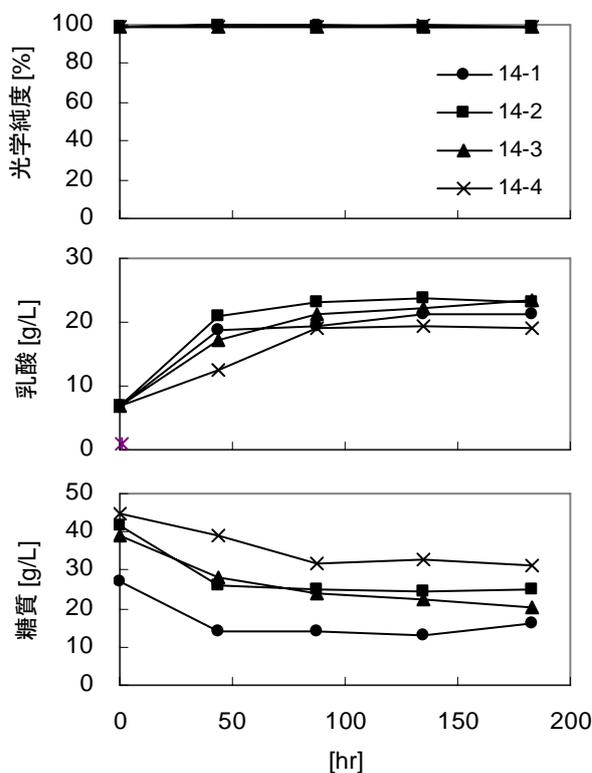


図6-12 TEST 14 の培養結果

さらに、セルロースを添加した TEST 14-4 に至っては、比較系より乳酸生成量が少なくなった。以上の結果からでは、加水分解を受けていない多糖の資化は、本法でも発酵困難であると指摘される。しかし、本当に多糖資化が困難であるならば、模擬生ごみが資化される理由が不明である。後述するが、生ごみ中に単糖として存在するグルコースおよびフルクトースは約18%程度であり、したがって二糖以上の複糖がその構成の中心であるからである。そこで、以下において、模擬生ごみが資化した理由の考察を通じて各多糖の資化性を再度検討する。

表 6-12 TEST 14 の培養結果

TEST 14	1	2	3	4
培養時間 (hr)	183	183	183	183
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	27.0	41.5	39.0
	最終濃度	16.2	25.1	20.5
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	6.9	6.9	6.9
	最終濃度	21.3	23.3	23.3
生成乳酸量 (g)	14.5	16.4	16.5	12.1
乳酸収率 (-)	0.54	0.39	0.42	0.27
添加糖あたりの収率 (-)	-	0.39	0.42	-
光学純度 (%)	99.3	99.2	99.1	99.4
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.27	0.32	0.16	0.14
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	-	0.91	0.78	0.30

模擬生ごみの糖質の特徴を挙げると、その溶解性成分の割合の高さが上げられる。本研究では、固形性と溶解性の境界を  $0.45 \mu\text{m}$  フィルターにより設けているが、実に模擬生ごみ中の糖質の82%が溶解性となっている（表 3-1 参照）。一方、個々に多糖の溶解性を観察したが、でんぷんおよびセルロースは蒸留水に対して速やかな分散性を示すものの溶解性は全く示さなかった。ペクチンに至っては蒸留水に対して分散性を示さなかった（ただし溶解性に関しては後述する）。このような結果から、模擬生ごみの溶解性は際立った結果である。多糖から単糖までの加水分解を考慮すると、溶媒による加水分解にしても酵素による加水分解にしても結合部位に作用する化学反応に変わらないことから、その接触機会が反応の進行を支配すると考えられる。接触機会として不利となる粒子サイズの大きな多糖はその加水分解において不利であり、生ごみは粒子サイズが小さいため資化されたとも考えられる。なお、別途模擬生ごみが当初から持つ単糖類グルコースおよびフルクトースの量を F-キットにより 2 度測定した（TEST 1 および TEST 4 実施日）。これによると、両糖ともフェノール・硫酸法による全糖分析値に対して約 9%程度であった。このことから、模擬生ごみ中の糖質は溶解性に分類されるものの、80%以上が複糖（二糖類から多糖類）であった。

次に、生ごみの高い溶解性に関して検討する。生ごみは、その組成（表 2-1 参照）見ると、穀物類がその糖質の中心であると考えられる。これらは米や小麦のでんぷんが原料の食品であるが、一度加熱を受けた食品でもある。でんぷんは、浸漬加熱により吸水、膨化する。その結果、結晶構造が崩れ、でんぷん粒子も崩壊する（ $\alpha$ 化と称される）。したがって、同じでんぷんでも精製、結晶化された試薬でんぷんとは粒子サイズが大きく異なると予想される。粒子サイズが小さいため生ごみ中のでんぷんが資化されたと考える場合、*B. coagulans* がアミラーゼを誘導できる点から、粒子サイズを予め細かくしておくことがでんぷんの乳酸資化に対して重要な要素である。そこで、試薬でんぷんに関しても、熱水中の加熱によりその粒子サイズを崩壊させておくことで資

化する可能性が高まることが予想される。

多糖の溶解性に関して、ペクチンは溶解性を示した。先に記したとおり、ペクチンの蒸留水に対する分散性は非常に悪い。そこで、55℃の湯浴中で10分程度攪拌を行うと、ペクチンは溶液の膨化を伴いながら分散した。この溶液を0.45 μm フィルターにてろ過分析を行うと、全量が溶解性であった。ペクチンは、製菓用のゲル化剤として利用されることから分かる通り、水に分散した後は水と良く馴染む親水性コロイドとなる。この様な性質を考慮すると、粒子サイズが小さいことから、ペクチン分解酵素が存在すればペクチンの資化が進んでも良いはずである。そこで、図6-13にTEST 14の培養経過中における溶解性の糖質の濃度変化を示す。

これによると、ペクチン添加の系統である TEST 12-3のみ高い溶解性糖質濃度を示していることが分かる。さらに、全体の糖質濃度と併せて評価すると、培養の中盤以降においてペクチンのみ糖質濃度の緩やかな減少が確認できる。これは乳酸濃度の緩やかな上昇とも重なる。したがって、非常に緩やかであるがペクチンは資化している可能性が高いと判断される。一方、でんぷん添加系 (TEST 14-2) やセルロース添加系 (TEST 14-4) の溶解性糖濃度は、比較系 (TEST 14-1) と同程度であり、乳酸生成量と併せて考察すると、添加多糖のうち可溶化、資化した量はわずかであることが分かる。化学的性質について記すと、でんぷんは冷水に不溶で、熱水中でようやくミセルが崩れて分子間隔が広がり、ついには溶けて青みがかったゾルとなる (長倉ら, 1998) とある。つまり、生化学的な反応を除くと、反応器内においてでんぷんがその粒子サイズを小さくしていく反応は、起こっても緩やかであることが想像される。一方、セルロースについては、冷水にも熱水にも不溶 (長倉ら, 1998) とある。つまり、生化学的な反応を除くと、セルロースのその粒子サイズを小さくする反応は、限りなく起こりにくいと考えられる。大きな粒子である多糖から直接乳酸に至る経路は存在せず、必ず加水分解される工程が必要である。その点では、親水性コロイドとして存在できるペクチンは、加水分解を受けやすく有利である。実際に、緩やかではあるが乳酸資化も確認できたことから、ペクチン分解酵素を早い段階から誘導できる環境 (馴化) としておくなどによりさらに効率的な資化が行えることも期待できる。

以上から、本節において実験に供した多糖について、その資化性をまとめる。

- a) でんぷんは、生ごみ糖質がでんぷんを中心とする多糖により構成されている点から、資化は可能であると考えられる。ただし、熱水による加熱など、でんぷん結晶を崩壊させて粒子サイズを小さくしておくことが必要と考えられる。
- b) セルロースは、実験結果および化学的性質から、粒子サイズを小さくする過程に著しい律速要因がある。したがって、その資化性に関して検討できていない。資化性検討には、粒子サイズを小さくすることが必要であり、このためには希酸、加熱による加水分解や酵素による分解が必要となる。
- c) ペクチンは、溶解性を有することや実際に緩やかではあるが資化したことにより資化可能多

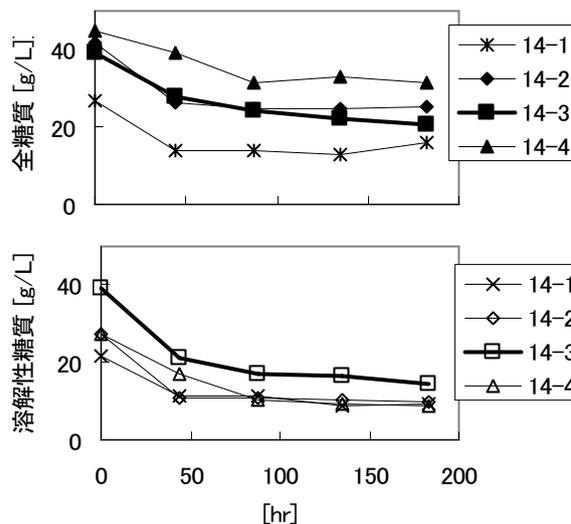


図6-13 TEST 14における全糖および溶解性全糖の経時変化

糖と考える。このことは、高温 L-乳酸発酵が果皮などの食品廃棄物に高い適用性を有する可能性を示す。今後は、ペクチン分解酵素を早期から誘導できる培養について検討する必要がある。

図 6-14 に、TEST 14 の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度の経時変化について示す。また、同条件で実験を行った TEST 8 の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の経時変化も併せて示す。これによると、生ごみ希釈倍率が異なる TEST 8-1 を除くと、ペクチン添加系 (TEST 14-3) のみ  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度が増加していることが示されている。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度の増加はタンパク質の分解により生じていると考えられるが、他の系では起こらずペクチン添加の系にのみ起こっており、この系に何らかの生化学反応が進行していることが示唆される。また、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の増加は、グルコースを添加した系統 (TEST 8-2) でも見られない。つまり、グルコースから乳酸を生成する反応には関与しないと考えられる。したがって、多糖の加水分解に関与している可能性が非常に高いことを示す実験結果である。ペクチン質が資化できる発酵法は、野菜くずや果皮を多く含む生ごみの資源化に有利であると考えられる。食品加工場などで果皮などが集約的に発生する場合、それらを資化することが可能となる。次項では、バナナ原産国において食品廃棄物として増大の著しいバナナ果皮の高温 L-乳酸発酵への適用性について検討を試みる。

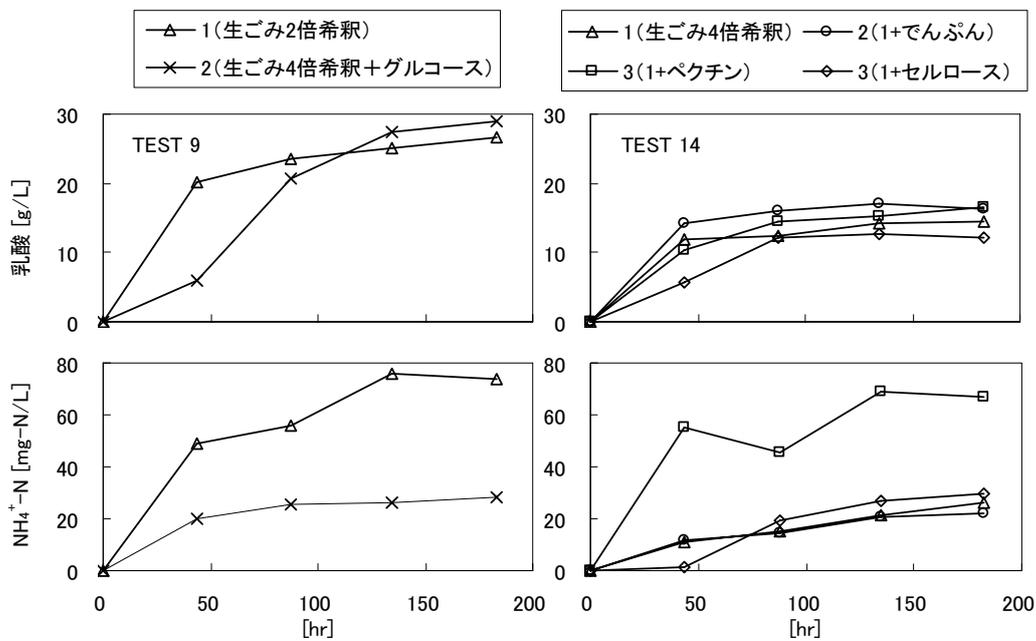


図 6-14 TEST 9 および TEST 14 の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度の経時変化

### 3.4 バナナ果皮の L-乳酸発酵 —TEST 15—

#### 3.4.1 概論

前項の検討により、本研究における L-乳酸発酵では、でんぷん分解酵素に限らずペクチン分解酵素も誘導されている可能性を指摘した。仮にペクチン分解酵素の誘導が事実であるならば、前もっての酵素処理を行わないことを特徴としている高温 L-乳酸発酵にとって、適用可能な原料の拡大も期待されることとなる。前節でも記したとおり、ペクチンは植物体の構造を担う多糖であり、また柑橘類果皮などにも多く含まれることから、食品廃棄物、さらには農業廃棄物の資化も検討対象と成り得る。そこで、農業廃棄物への適用検討の第一歩として、バナナ果皮を L-乳酸へ資化することを試みた。本節では、バナナ果皮を回分式培養に供することで、その L-乳酸発酵性

を評価した。

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増大（1990年代で生産量が約1.3倍）している作物である（森島、2005）。しかし、プランテーション作物であるにもかかわらず、生産国内で消費される量も多く、輸出に出回る量は生産量の10%強程度とされる。バナナは、主に発展途上国において生産されているが、一部の国では主食として食される、あるいはバナナ加工食品（バナナチップなど）が生産されるなど、生産国において日常生活に欠かせない食物である。そのため、バナナ果皮は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、バナナ果皮を資源として利用する試みについて報告がなされている。インドの例では、Bardiya *et al.* (1996) は、有機性廃棄物として処理の必要があるバナナ果皮をメタン発酵（37°C、半連続式培養）に供する研究を報告している。また、ナイジェリアの例では、Essien *et al.* (2005) は、バナナ果皮の高い糖質含量およびミネラル含量に着目し、糸状菌類の培地として利用する研究を報告している。これらにあるように、バナナ果皮は処理すべき有機性廃棄物として存在している。そこで、本節では、高温 L-乳酸発酵によるバナナ果皮の L-乳酸資化性を検討した（TEST 15）。

### 3.4.2 実験結果

TEST 15 における L-乳酸の光学純度、乳酸濃度および糖質濃度の経時変化を図 6-15 に示す。また、その結果を表 6-13 にまとめて示す。211 時間培養により、基質として模擬生ごみとバナナ果皮を利用した TEST 15-1 では生成乳酸量 21.7 g/L、乳酸の収率 0.61 および光学純度 99% 以上が得られた。また、基質をバナナ果皮のみとした TEST 15-2 でも生成乳酸量 12.7 g/L、乳酸の収率 0.69 および光学純度 99% 以上が得られた。これらより、バナナ果皮を原料とした高温 L-乳酸発酵により L-乳酸を生成できることが示された。バナナ果皮の L-乳酸資化に関する考察を以下に試みる。

バナナ果皮の糖質については、今回の試験においてバナナ基質のみ（TEST 15-2）が模擬生ごみをブレンドしたもの（TEST 15-1）より高い収率を示したことから、生ごみと比較して資化しやすい糖質で構成されていると考えられる。この点は、平均乳酸生成速度、あるいは図 6-15（図 4-4 参照）の L-乳酸が速やかに生成している発酵過程からも推察される。

乳酸の収率に関して TEST 15-2 では約 0.7 と

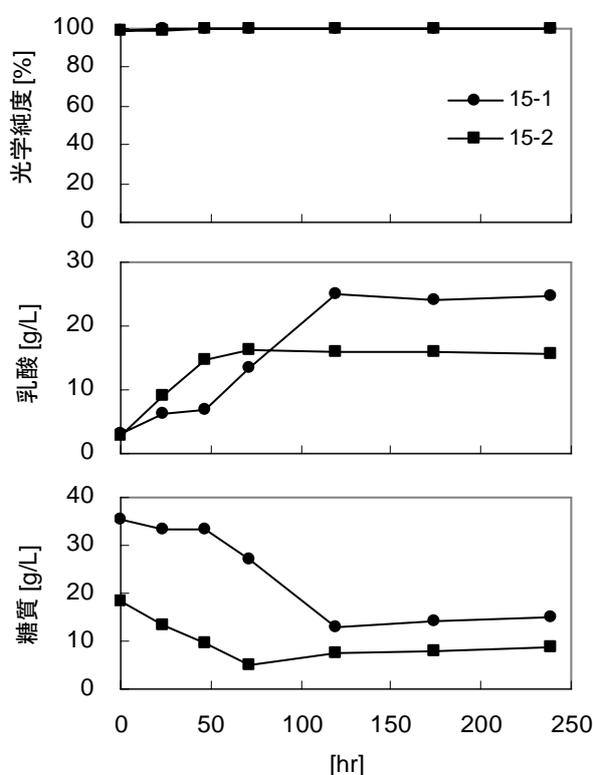


図 6-15 TEST 15 の培養結果

表 6-13 TEST 15 の培養結果

TEST 15	1	2	
培養時間 (hr)	211	211	
糖質量 (g-glucose/L)	初期濃度	35.6	18.4
	最終濃度	14.8	8.6
乳酸濃度 (g/L)	初期濃度	3.0	2.9
	最終濃度	24.7	15.6
生成乳酸量 (g)	21.7	12.7	
乳酸収率 (-)	0.61	0.69	
光学純度 (%)	99.6	99.8	
平均乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.24	0.25	
最大推定乳酸生成速度 (g/L/hr)	0.85	0.75	

なったが、バナナ果皮は5.3%の糖質量が測定されたことから、バナナ果皮 100 g (湿重) あたり約 3.7 g の L-乳酸が得られることとなる。この数値は、生ごみ 100 g (湿重) あたり約 8 g 程度の実績と比べると低い値である。しかし、第 5 章で指摘したように、高温 L-乳酸発酵は生成乳酸量に対して 40 g/L 程度の上限が存在する可能性がある。また、乳酸濃度が 40 g/L を超えると著しく発酵速度が遅くなる生成物阻害も観察された。これらの点に対して、バナナ果皮は無希釈で発酵に供しても L-乳酸濃度は 40 g/L 以下に留まるため、無希釈のバナナ果皮を発酵する発酵槽や糖質以外の栄養素といった課題は存在するものの、上記のような発酵阻害を受けない程良い糖質量と考えられる。一方、生ごみの場合は、そのまま発酵した場合、発酵阻害を受ける乳酸濃度に到達するため、発酵の前にあらかじめ希釈をしておく必要がある。嫌気性発酵では多かれ少なかれ生成物による阻害を受ける。乳酸発酵の場合には、生成した乳酸を電気透析などにより連続的に引抜かない限り、高濃度の糖質原料を用意しても発酵法が持つ発酵限界濃度以下まで原料を希釈して使わざるを得ない。これらから、バナナ果皮は高温 L-乳酸発酵を行う際に糖質量の点で希釈を要しない利点があると考えられる。

以上より、高温 L-乳酸発酵に対してバナナ果皮は、①希釈を要しない程良い糖含有量であることと②糖の資化性が高いことから適用性の高い原料であると判断される。

#### 第 4 節 結語

本章では、高温 L-乳酸発酵の原料に関する検討として、実際の生ごみを指向した検討と、生ごみに代わる原料の探索を指向した検討を進めた。実生ごみを指向した検討では、実生ごみの腐敗に関する研究事例を参考に模擬生ごみを腐敗させ、その腐敗が L-乳酸発酵に与える影響を考察した。なお、生ごみの腐敗は、理想的な保管がなされた場合を想定して冷蔵保管により行った。以下に得られた主な結果を記す。

- (1) 冷蔵庫で保管される生ごみの腐敗過程を追跡した実験 (1 回目; 40 日間、2 回目; 39 日間) では、TS、SS、TOC、DOC、COD および D-COD については 10%未満の不明瞭な減少が確認されるに留まった。ただし、糖質については、約 18% (11 g/L) の減少を確認した。一方、有機酸の生成物を確認したところ、2 回の実験で乳酸および酢酸がそれぞれ 2.5 と 3.0 g/L および 1.0 と 1.3 g/L 生成された。乳酸と酢酸は、実験開始後 15 日目以降になり生成されるようになったが、併せて pH の急激な低下を確認した。生成された乳酸の光学異性体を調べた結果、それぞれ 50%ずつ存在する D-, L-乳酸であった。
- (2) 上記実験において、乳酸の生成が確認された以降のサンプル (実験開始後 19 日目) に対して、微生物群集解析を行った。その結果、乳酸菌の優占化を確認した。なお、出現菌は *Lactobacillus sakei*、*Leuconostoc mesenteroides* および *Leuconostoc* sp. であった。これらは低温～中温性の D-, L-および D-乳酸菌であり、また、*Leuconostoc* 属はヘテロ乳酸菌として酢酸と二酸化炭素を生成することから、生成物とも一致した結果を示していた。
- (3) 腐敗の進行した生ごみは、乳酸菌の優占化により *Clostridium* 属などを排除する報告がある。なお、*Clostridium* 属は、第 3 章の結果から高温 L-乳酸発酵を妨害する菌種であった。そこで、腐敗した生ごみの *Clostridium* 属の排除効果を確認するため、2 倍希釈した同生ごみの回分式培養による L-乳酸発酵を試みた。植種を伴わず、55°C で pH 6.0 の培養条件の下 242 時間培養の結果、生成乳酸量 33 g/L、乳酸の収率 0.49 (生成乳酸量/基質糖質量 [-]) および光学純

度 94%が得られた。これらから、第 3 章では *Clostridium* 属により妨害された培養条件においても、腐敗した生ごみを基質とすることで L-乳酸発酵に至ることが確認された。なお、光学純度に関しては、腐敗した生ごみ由来の D-乳酸により若干低い値に留まった。

次に、生ごみ代替原料の探索を指向した検討では、①高温 L-乳酸発酵を実施した際に実際に消費している資化単糖類の確認、②資化が予想される多糖の資化性確認、③バナナ果皮を原料とした L-乳酸発酵を実施した。以下に得られた主な結果を記す。

- (4) 高温 L-乳酸発酵の前後において存在する糖質に対して、加水分解を施し、得られる単糖類の分析を行った。その結果、主としてグルコースが構成要素となっている複糖を消費していることが確認された。消費率は 60~70%であった。一方、グルコース以外の単糖類に関しては、ガラクトースの消費率が 20~40%と低いながらも安定した消費を確認した。なお、中温発酵により得られたサンプルについても同様の分析を実施したが、高温 L-乳酸発酵は中温発酵と比べて、グルコースが構成要素となっている複糖の消費率が低いことが示され、この複糖の加水分解に課題が存在することが指摘された。
- (5) 模擬生ごみにでんぷん、セルロースおよびペクチンを添加した培地を用意し、高温 L-乳酸発酵を実施して上記多糖の資化性を検討した。55°Cで pH 5.5 の培養条件の下 183 時間培養の結果、でんぷんおよびペクチンに関しては添加糖量に対してそれぞれ乳酸収率 0.13 および 0.17 とわずかに資化を確認できたものの、セルロースについては阻害を受ける結果となった。ただし、ペクチンに関しては、溶解性糖質の継続した減少や  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度の上昇など他と異なる様子を示し、培養の継続により収率が向上する可能性が示唆された。
- (6) バナナ果皮を基質として高温 L-乳酸発酵を行った。基質を 2 種類、バナナ果皮のみの系と模擬生ごみと混合の系を用意し、55°Cで pH 5.5 の培養条件の下 211 時間培養の結果、それぞれ乳酸の収率 0.69 と 0.61 および光学純度 99%以上が得られた。2 種類の基質を比較した結果、バナナ果皮のみの系の乳酸収率が高く、発酵もいち早く終了した。これらから、バナナ果皮は模擬生ごみと比べて資化性の良い基質であると判断された。

#### <参考文献>

- Bardiya N, Somayaji D, Khanna S, 1996, Biomethanation of banana peel and pineapple waste, *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 58 (1), 73-76
- Bostos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., Dominguez, J. M., 2005. Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method. *J. Science of Food and Agriculture*, 85, 466-472.
- Essien JP, Akpan EJ, Essien EP, 2005, Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel, *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 96 (13), 1451-1456
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H., Staley J. T., Williams S. T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Iino T, Uchimura T, Komagata K., 2003. The effect of sodium acetate on the activity of L-

- and D-lactate dehydrogenases in *Lactobacillus sakei* NRIC 1071 (T) and other lactic acid bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 49, 51-58.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12, 1-3, 39-85.
- MØrtvedt C. I., Nes I.F., 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. J. Gen. Microbiol. 136, 1601-1607.
- Priest, F.G., 1989. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. *Bacillus*, Harwood, C.R. ed. 27-56, Plenum Press, New York and London.
- Sakai, K., Taniguchi, M., Miura, S., Ohara, H., Matsumoto, T., Shirai, Y., 2004. Making plastics from garbage; A novel process for poly-L-lactate production from municipal food waste. J. Industrial Ecology. 7 (3-4), 63-74.
- Schleifer, K.H., 1986. Gram-positive cocci. Holt J.G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2 (pp. 999-1103). Baltimore, Williams & Wilkins.
- Sen, R., Babu, K.S., 2005. Modeling and optimization of the process conditions for biomass production and sporulation of a probiotic culture. PROCESS BIOCHEMISTRY. 40, 7, 2531-2538.
- Sharp, R.J., Scawen, M.D., Atkinson, T., 1989. Fermentation and downstream processing of *Bacillus*. Harwood C.R. (ed), *Bacillus*. 255-292. Plenum Press, New York and London.
- Sneath, P.H.A, 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. Holt J.G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. pp. 1104-1139. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Tsuji, H., 2002. Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made polylactides: effects of L-lactide content, tacticity, and enantiomeric polymer blending. Polymer. 43, 6, 1789-1796.
- Wang Q., Yamabe K., Narita J., Morishita M., Ohsumi Y., Kusano K., Shirai Y., Ogawa H., 2001. Suppression of growth of putrefactive and food poisoning bacteria by lactic acid fermentation of kitchen waste. Process Biochemistry. 37, 351-357.
- Wang Q., Narita J., Xie W., Ohsumi Y., Kusano K., Shirai Y., Ogawa H., 2002. Effects of anaerobic/aerobic incubation and storage temperature on preservation and deodorization of kitchen garbage. Bioresource Technology. 84, 213-220.
- Wang Q., Narita J., Ren N., Fukushima T., Ohsumi Y., Kusano K., Shirai Y., Ogawa H., 2003. Effect of pH adjustment on preservation of kitchen waste used for producing lactic acid. Water, Air, and Soil Pollution. 144, 405-418.
- 石崎文彬, 2000. 嫌気性微生物による有用物質生産に関する生物工学的研究. 生物工学会誌. 78 (1), 2-12.
- 岡田茂孝, 北畑寿美雄, 1999. 工業用糖質酵素ハンドブック. pp19-35, 講談社サイエンティフィック, 東京
- 小崎道雄, 内村泰, 岡田早苗, 1992. 乳酸菌実験マニュアル -分離から同定まで-. 58-59, 朝倉書店.

- 長倉三郎, 井口洋夫, 江沢洋, 岩村秀, 佐藤文隆, 久保亮五, 1998. 理化学辞典 第5版, 岩波書店.
- 中村道徳, 貝沼圭二, 1986. 澱粉・関連糖質実験法. 211-223, 学会出版センター.
- 橋場炎, 加藤丈雄, 藤井建夫, 岡田早苗, 柳田藤寿, 大桃定洋, 鈴木一郎, 伊藤敏敏, 1996. 乳酸菌の挙動と利用, 乳酸菌の科学と技術, 乳酸菌研究集談会 編. 229-286, 学会出版センター, 1996.
- 福井作蔵, 1990. 還元糖の定量法 第2版. 119-141, 学会出版センター.
- 藤田泰仁, 乳酸菌の科学と技術, 乳酸菌研究集談会 編, pp205-215, 学会出版センター, 東京.
- 森島紘史, 2005. バナナ・ペーパー—持続する地球環境への提案. 鹿島出版会, 東京.

## 第7章 結論

本研究は、有機性廃棄物のうち再利用が進まない生ごみを対象に、その資源化方策の検討を行った。生ごみは、他の有機性廃棄物と比較して資源化の容易な糖質を多く含むにも拘らず、分散的に発生するため、つまり移送にコストがかかる理由により再利用が進まない背景を有している。そこで、資源化方策として①付加価値が高いと考えられる L-乳酸の生成を、また、移送コスト低減化のため②分散配置できる設備費や維持管理費のかからないプロセスの開発を目的に本研究を実施した。以下に本研究で得られた主な結果を記す。

第2章では、2倍希釈した非滅菌の模擬生ごみを基質とし、半連続式培養により高温（55℃）および中温（37℃）酸発酵を実施した。一連の発酵実験では、培養条件である pH および HRT（COD 負荷率）の影響を評価した。ここで得られた結果を以下に記す。

- (1) 高温酸発酵において、pH 5～6 および HRT 20～3 日（COD 負荷率 5.2～34.4 g-COD/L-Reactor/日）の条件により、長期間にわたり安定して 90%以上の光学純度を有する L-乳酸が得られることを見出した。また、pH 6 および HRT 10～3 日（COD 負荷率 10.3～34.4 g-COD/L-Reactor/日）条件下では、乳酸濃度と乳酸の収率がそれぞれ 32 g/L と 0.58 以上（生成乳酸量/基質糖質量 [-]）となること、光学純度 93%以上の L-乳酸が安定して得られること、および基質中にあらかじめ存在する乳酸を考慮（排除）して求めた生成乳酸に対する光学純度では 96%以上の L-乳酸が得られることが示された。
- (2) 高温培養および pH 6 における L-乳酸発酵では、HRT が 10 日から 3 日へ減少するに従い、a) 光学純度が 92.8%から 94.5%へ向上し、b) 乳酸の収率が 0.73 から 0.58 へ減少し、c) 乳酸以外の有機酸に対する乳酸の選択性（COD 基準）が 97.0%から 93.5%へ低下する傾向が見られた。これらは、HRT の減少が L-乳酸発酵へ直接影響をもたらす、①反応時間の減少、②洗い出し効果の増加による増殖速度の速い菌群の優占化、および③希釈率の増加による阻害要因である乳酸（塩）影響の減少などが関与して起こったと考えられた。
- (3) 中温酸発酵では、実施した培養条件において乳酸発酵自体が実施困難であったものの、光学純度を求めない乳酸発酵に対しては有機物の高負荷培養により選択的に乳酸を生成できる可能性が示された。なお、有機酸発酵に限れば中温発酵は良好な酸発酵成績を示した。生成された有機酸濃度（COD 基準）は、pH 5～6 および HRT 20～3 日（COD 負荷率 5.2～34.4 g-COD/L-Reactor/日）の条件において 42～53 g-COD/L となり、高温発酵の有機酸濃度（主に乳酸濃度）を常に上回った。また、高温発酵と比べて特に pH 5 の低 pH 条件における有機酸発酵性が顕著であった。この理由は、中温発酵の多様な菌群構成による環境条件に対する幅の広い適用性、特に高い糖質の消費率と固形物の可溶化率にあると考えられる。上記の実験条件を通じて中温発酵は溶解性糖質の 95%以上、固形性糖質の 50%前後の消費率を示し、また、固形物全体の可溶化率も 28～47%を示した。

以上の実験より、55℃と pH 5～6 の培養条件により、L-乳酸菌を植種せず、滅菌操作も加えず、また乳酸発酵では一般的な多糖の加水分解を施さなくても 90%以上の L-乳酸が得られることが示

された。この点は、設備費や維持管理費を低減化する効果をもたらすと考えられる。次に、高温 L-乳酸発酵の再現性と L-乳酸菌の由来を確認する実験、および L-乳酸菌の同定を行った。ここで得られた結果を以下に記す。

- (4) pH 6 の条件下で、特定の植種を伴わない生ごみのみからの半連続式高温 L-乳酸発酵の実施により、光学純度 95%以上、および乳酸収率 0.6 程度の L-乳酸が得られた。この実験により、本研究での L-乳酸菌は自然環境を含む生ごみ由来であることが示された。また、同培養により、半連続式の高温 L-乳酸発酵の再現性も併せて示された。なお、pH 7 の条件下で同様の立ち上げによる半連続式高温培養を実施したが、*n*-酪酸と二酸化炭素の生成を招いた。pH 7 の条件では、L-乳酸発酵を妨げる菌種が優占化されることを確認できた。
- (5) 16S rDNA を用いた微生物群集解析により、本研究での高温 L-乳酸菌が *Bacillus coagulans* であることが明らかとなった。なお、発酵槽には *B. coagulans* 以外にも *Lactobacillus sakei* や *Bacillus circulans* などの菌種も検出されたが、低温から中温域を至適温度とするため L-乳酸発酵には悪影響を及ぼさない結果となったと推察された。

第 3 章では、第 2 章で示した高温 L-乳酸発酵の運転可能範囲を明らかにする目的で、2 倍希釈した非滅菌の模擬生ごみを基質とし、回分式培養により培養温度および pH 条件に関する実験的考察を行った。まず、植種を伴わない実験により、高温 L-乳酸発酵が内在する L-乳酸発酵の妨害因子の検討を行った。ここで得られた結果を以下に記す。

- (1) 培養温度 45、50 および 55°C、また、pH 5.5、6.0 および 6.5 の条件範囲において、L-乳酸発酵が継続して行えた条件は 55°C で pH 5.5 のみであった。なお、実験により得られた L-乳酸は光学純度 99% であり、乳酸濃度 30~35 g/L、乳酸の収率 0.5 程度 (生成乳酸量/基質糖質量 [-]) であった。
- (2) 55°C で pH 6.0 および 6.5 の条件では、培養の初期に L-乳酸が生成されるものの、培養の継続とともに *n*-酪酸や二酸化炭素といった *Clostridium* 属に特徴付けられる発酵産物が主な生成物となった。一方、45°C および 50°C で pH 5.5 の条件では、ここでも培養の初期に L-乳酸が生成されるものの、その後は D-, L-乳酸が生成された。なお、培養の初期に L-乳酸が生成される事実から、L-乳酸発酵が実施できる培養条件およびその周辺の培養条件では、本研究での L-乳酸菌の増殖速度が L-乳酸発酵を妨害する菌種に対して先行して増殖できることが指摘された。
- (3) 16S rDNA を利用した微生物群集解析により、L-乳酸菌は *Bacillus coagulans* であること、pH 6.0 以上の高い pH 条件で出現する *n*-酪酸などの生成を担う菌種は *Clostridium* 属 (主に *Clostridium thermopalmarium*) であること、培養温度 50°C 以下の低い温度条件で生成する D-, L-乳酸は *Lactobacillus amylolyticus* によることが確認された。また、検出された菌種の性質を整理すると、55°C で pH 5.5 でのみ L-乳酸生成が可能であったことが裏付けられた。したがって、潜在的な L-乳酸発酵妨害の危険性を考慮した培養条件として、55°C で pH 5.5 が提示された。
- (4) より広い培養条件を求めて、55°C 以上の高温側の条件による回分式培養を実施した。これに

よると、60℃以下であれば乳酸の収率 0.5 程度で光学純度 99%の L-乳酸発酵が行えることが示された。ただし、乳酸生成速度や乳酸の収率など発酵効率の面から、培養実績の多い 55℃で pH 5.5 が効率的な培養条件と示された。

一連の植種を伴わない回分式培養では、第 2 章の L-乳酸発酵条件（55℃で pH 6.0）と pH 条件が異なる結果となった。そこで、この差異の検討として、高温 L-乳酸発酵の発酵液を植種材料として利用する半連続式培養を模擬した回分式培養を実施した。ここで得られた結果を以下に記す。

- (5) 湿重量比を植種材料：基質=4：6 の割合で回分式培養を実施したところ、半連続式培養での L-乳酸発酵条件（55℃で pH 6.0）でも L-乳酸発酵が実施できた。したがって、予め系内を L-乳酸菌あるいはその生成物（乳酸塩）にて優占状態にしておくことが、半連続式培養において pH 6.0 の条件でも L-乳酸発酵が行えた原因の 1 つであると指摘できた。
- (6) 運転条件範囲の拡大を目的に半連続式培養を模擬した回分式培養の実施により、低温化（50℃まで）および高 pH 化（pH 6.5 まで）に対して、L-乳酸生成量の増加および L-乳酸生成速度の増加が示された。そこで、L-乳酸生成量および L-乳酸生成速度を目的変数に、培養温度と pH を説明変数に重回帰分析を行ったところ、低温化および高 pH 化により L-乳酸生成量および L-乳酸生成速度の向上する傾向が確認された。この結果は、L-乳酸菌 *B. coagulans* の増殖至適条件（50℃で pH 6.5）や *B. coagulans* の  $\alpha$ -アミラーゼ誘導至適条件（50℃で pH 7）へ接近するほど L-乳酸発酵効率が高まることを示していると考えられる。なお、ここで L-乳酸発酵が実施できた培養条件を、重回帰式により L-乳酸生成量が向上するとされる順番に示すと、①50℃で pH 6.5、②50℃で pH 5.5、③55℃で pH 6.5 となった。

第 4 章では、乳酸発酵の進行を間接的にモニタリングする方法として、pH 条件維持のため生成した乳酸を中和する水酸化ナトリウムを供給する中和剤供給ポンプの駆動記録による乳酸発酵過程の記録を提案し検証した。1 秒ごとの中和剤消費量を記録した結果、乳酸と水酸化ナトリウムの中和の化学量論値による換算により乳酸生成量の経時変化を再現できることが示された。また、中和剤供給ポンプの記録から容積あたりの最大乳酸生成速度を求めた結果、模擬生ごみを基質とする高温 L-乳酸発酵は  $1.6 \pm 0.9$  g/L/hr の乳酸生成速度であることが示された。この速度は、加水分解された糖質を原料に実施される他の乳酸発酵事例と比べて同等以上の範囲にあり、糖質の加水分解と乳酸発酵を同時に行う点を考慮すると十分な速度を有した発酵法であることが確認された。この記録装置を高負荷（COD 負荷率 45.2 g-COD/L-Reactor/日）で実施した半連続式培養に適用したところ、実施した培養条件では長期的な発酵の継続が困難となることが示された。第 2 章での結果も踏まえて、高温 L-乳酸発酵では COD 負荷率 20 g-COD/L-Reactor/日程度（2 倍希釈の模擬生ごみの場合 HRT 5 日）が適当であると判断された。

第 5 章では、高温 L-乳酸発酵の生成物である乳酸阻害、基質であるグルコース阻害および塩化ナトリウムによる阻害を検討した。模擬生ごみを蒸留水にて 2 倍希釈した生ごみ培地に対して HRT 5~10 日程度の培養期間（植種材料量を考慮）を設定し、回分式培養により上記阻害を評価した。以下に得られた主な結果をまとめる。

- (1) 生ごみ培地に 3 段階の乳酸塩量を添加した試験（合計 4 段階）により、生成物である乳酸の阻害を検討した。その結果、初期乳酸濃度 41 g/L 以上において乳酸生成量の減少が確認された。ただし、乳酸濃度が 41 g/L 以上であっても乳酸発酵自体が停止することはなく、約 70g/L まで乳酸濃度が上昇することも確認された。乳酸阻害を非拮抗型阻害で表記した乳酸生成速度式に実験結果を適合させた結果、乳酸生成速度を 50%とする乳酸濃度（飽和定数）は 9 g/L と求まった。
- (2) 生ごみ培地に 3 段階のグルコース量を添加した試験（合計 4 段階）により、グルコース阻害を検討した。その結果、グルコース 100 g-glucose/L 以上において生成乳酸量の減少が確認された。一方、糖質量あるいはその他の栄養素量から判断して L-乳酸発酵余地が充分あると考えられる系においても、生成乳酸量が 35~39 g/L で発酵停止となることが観察された。一般的な基質阻害式へ実験結果を適合させた結果、乳酸生成速度を 50%とするグルコース濃度は 37 g/L と求まった。
- (3) 生ごみ培地に 2 段階の塩化ナトリウム量を添加した試験（合計 3 段階）により、食塩による阻害を検討した。その結果、初期塩化ナトリウム濃度 20 g/L 以上において生成乳酸量の減少が確認された。塩化ナトリウム阻害を非拮抗型阻害で表記した乳酸生成速度式に実験結果を適合させた結果、乳酸生成速度を 50%とする塩化ナトリウム濃度（飽和定数）は 10 g/L と求まった。

第 6 章では、高温 L-乳酸発酵の原料に関する検討として、実際の生ごみを指向した検討と、生ごみに代わる原料の探索を指向した検討を進めた。実生ごみを指向した検討では、実生ごみの腐敗に関する研究事例を参考に模擬生ごみを腐敗させ、その腐敗が L-乳酸発酵に与える影響を考察した。ここで得られた結果を以下に記す。

- (1) 冷蔵庫で保管される生ごみの腐敗過程を追跡した結果、D-, L-乳酸および酢酸の生成とこれら有機酸の生成時期に併せた pH の低下が確認された。pH が低下した後の生ごみに対して 16S rDNA を用いた微生物群集解析を行った結果、*Lactobacillus sakei*、*Leuconostoc mesenteroides* および *Leuconostoc* sp. などの乳酸菌の優占化を確認した。これらは低温~中温性の D-, L-および D-乳酸菌であり、また、*Leuconostoc* 属はヘテロ乳酸菌として酢酸と二酸化炭素を生成することから、生成物とも一致した結果を示していた。
- (2) 腐敗の進行した生ごみは、乳酸菌の優占化により高温 L-乳酸発酵を妨害する *Clostridium* 属を排除する報告がある。そこで、腐敗した生ごみの *Clostridium* 属の排除効果を確認するため、同生ごみの植種材料を用いない回分式培養による L-乳酸発酵を試みた。その結果、未腐敗の生ごみでは L-乳酸発酵に至らなかった培養条件（55℃で pH 6.0、第 3 章）でも L-乳酸発酵を実施でき、生ごみ腐敗がもたらす利点を確認できた。以上より、腐敗が進行していると考えられる実生ごみに対しても高温 L-乳酸発酵が適用される可能性の高いことを確認した。

次に、生ごみ代替原料の探索を指向した検討では、高温 L-乳酸発酵の多糖加水分解能に焦点を当て、①高温 L-乳酸発酵を実施した際に実際に消費している資化単糖類の確認、②資化が予想される多糖の資化性確認、および③バナナ果皮を原料とした L-乳酸発酵を実施した。以下に得られ

た主な結果を記す。

- (3) 高温 L-乳酸発酵の前後において存在する糖質に対して、加水分解を施し、得られる単糖類の分析を行った。その結果、高温 L-乳酸発酵では主としてグルコースが構成要素となっている複糖を消費していることが確認され、消費率は 60~70%であった。一方、グルコース以外の単糖類に関しては、ガラクトースの消費率が 24~37%と低いながらも安定していた。ただし、中温発酵との比較では、高温 L-乳酸発酵はグルコースの複糖の消費率が低いことが示され、この複糖の加水分解に課題が存在することが指摘された。
- (4) 模擬生ごみにグルコースの多糖であるでんぷんとセルロース、ガラクトースのウロン酸であるガラクトツロン酸の多糖であるペクチンを添加した培地を用意し、植種を伴った高温 L-乳酸発酵 (55°C、pH 5.5) による多糖資化性を検討した。その結果、でんぷんおよびペクチンに関しては添加糖量に対してそれぞれ乳酸収率 0.13 および 0.17 とわずかに資化を確認できたものの、セルロースについては阻害を受ける結果となった。わずかに資化された多糖のうち、でんぷんに対しては、第 2 章と同様に固形性糖質の資化性の課題が改めて示された。一方、ペクチンは、馴化あるいは培養の継続により資化率の向上が推察された。
- (5) バナナ果皮を基質として植種を伴った高温 L-乳酸発酵 (55°C、pH5.5) を行った。基質を 2 種類、バナナ果皮のみの系と模擬生ごみとの混合の系を培養した結果、それぞれ乳酸の収率 0.69 と 0.61 および光学純度はいずれも 99%以上が得られた。2 種類の基質を比較した結果、バナナ果皮のみの系は乳酸収率と乳酸生成速度が高い値を示し、発酵も速やかに終了した。これらから、バナナ果皮は模擬生ごみと比べて資化性の良い基質であると判断された。

本研究で検討した高温 L-乳酸発酵は、工業技術として用いられている純菌培養の L-乳酸発酵とは全く異なり、滅菌操作を必要とせず、したがって容易に半連続式培養を採用でき、多糖の加水分解も L-乳酸菌の誘導する酵素により乳酸発酵槽と同一槽で実施され、設備費や維持管理費を大幅に低減化できる可能性を有した発酵法である。また、生ごみの資源化に対しても、その発生形態に即した分散配置が可能な発酵法であり、極論すれば、生コンクリートのミキサー車を加温できるように改造した移動発酵槽にも対応できると考えられる。高温 L-乳酸発酵の培養条件に関しては、55°C で pH 5.5 を最も妨害の受けにくい安定な培養条件とするものの、高温 L-乳酸菌である *B. coagulans* の優占化、乳酸塩の存在および *Clostridium* 属の排除により培養条件を *B. coagulans* の至適条件である 50°C で pH 6.5 に接近できることも確認した。以上の事由から、高温 L-乳酸発酵は生ごみの資源化方策として非常に現実性の高い要素技術であると考えられる。ただし、課題として糖質の資化率向上、特に、固形性の糖質の資化率向上が求められる。また、生ごみ以外の有機性廃棄物の原料化検討も実施し、より広範囲のバイオマスを受け入れられる資源化方法へと汎用性を高めていくことも重要である。一方で、高温 L-乳酸発酵に対する社会、経済的評価も必要であり、高温 L-乳酸発酵を組み込んだバイオマスからポリ乳酸までの工程に対して、規模あるいは施設箇所などの実行可能性調査を行うことも必要であると考えられる。

## 謝辞

本論文は、筆者が京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻の博士後期課程在学中に行った研究成果をとりまとめたものです。

京都大学大学院工学研究科教授 津野 洋博士には、本研究を遂行するにあたり終始熱心にご指導賜りました。深甚の謝意を表します。先生の幅広い知識、柔軟な発想、そして暖かいご配慮は、研究だけに止まらない大きな人生の糧となりました。重ねて感謝の意を表します。

京都大学大学院工学研究科教授 武田 信生博士には、本論文のとりまとめにあたりまして適切にご示唆、ご助言を頂きました。ここに深い感謝の意を表します。

京都大学大学院工学研究科教授 酒井 伸一博士には、本論文の作成、とりまとめにあたり適切にご助言、ご教授を頂きました。深く感謝致します。

京都大学大学院工学研究科助教授 山田 春美博士には、実験に関するご助言を数多く頂きました。深く感謝致します。

京都大学大学院工学研究科講師 永禮 英明博士には、異なる角度から洞察した研究に対するご助言を頂きました。ここに深く感謝致します。

京都大学大学院工学研究科助手 日高 平博士には、筆者の研究遂行のために数多くのご配慮を頂きました。深く感謝致します。

京都大学大学院工学研究科水環境工学分野の関係者、卒業生および在学生の多くの方々にも本研究遂行にあたり多くのご助力ならびに励ましを頂きました。ここに深い感謝の意を表します。特に、修士課程の宮井 公太郎氏、堀江 匠氏には同じ研究グループとして本研究の遂行に並々ならぬご尽力を頂きました。また、京都大学国際融合創造センター研究員 千 智勲博士、修士課程の森 修一氏には微生物同定実験を通じてご協力、ご助言を頂きました。培養実験を行いました京都大学大学院工学研究科環境質制御研究センターの関係者皆様にも、実験の円滑な遂行のために数多くのご配慮を頂きました。改めて感謝申し上げます。

最後に、経済的にも精神的にも本研究を下支えして頂きました妻子、両親に感謝の意を表しまして謝辞とさせていただきます。

2006年9月