

氏名	あか お さと し 赤 尾 聡 史
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2711 号
学位授与の日付	平 成 18 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 都 市 環 境 工 学 専 攻
学位論文題目	生ごみを原料とした高温 L-乳酸発酵に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 津 野 洋 教 授 武 田 信 生 教 授 酒 井 伸 一
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、循環型社会の構築が求められている社会的背景の下で、有機性廃棄物である生ごみから生分解性プラスチック原料として利用できる L-乳酸を、多糖の加水分解、乳酸菌の植種および滅菌操作を行わずに半連続式培養で長期間安定して生成しうる発酵法の開発研究を行い、その適用性と有用性を明らかとし、操作因子を提示した結果をまとめたものであって、7章からなっている。

第1章は序論であり、本研究の背景、位置づけおよび目的について言及し、廃棄物である生ごみから、生物分解性プラスチックの原料である高光学純度の L-乳酸を生成する技術の開発の意義を述べ、本論文の構成を示している。

第2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(55°C)および中温(37°C)酸発酵を実施した。その結果、高温酸発酵で pH5~6 および水理学的滞留時間(HRT)20~3日(COD負荷率5.2~34.4g-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-乳酸が生成できることを見出した。また、pH6の条件下では、乳酸濃度と乳酸収率がそれぞれ32g/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%以上が得られることを示した。また、L-乳酸発酵を担う菌種(L-乳酸菌)について菌種を検討した結果、16S rDNA を利用した微生物群集解析により L-乳酸菌は *Bacillus coagulans* と同定され、生ごみ自体にも存在するものであることが確認された。生ごみ負荷率との関係では、HRTが10日から3日へ減少する(負荷率が増大化する)に従い、光学純度が92.8%から94.5%へ向上し、乳酸収率が0.73から0.58へ減少し、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-乳酸発酵へ直接もたらす、反応時間の減少、洗い出し効果の増加から増殖速度の速い菌群の優占化、および希釈率の増加から阻害要因である乳酸(塩)による影響の減少などが関与して起こったと考えられた。

第3章では、高温 L-乳酸発酵の運転可能範囲を明らかにする目的で、非滅菌条件下で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 条件に関する考察を行った。まず、植種材料を用いず模擬生ごみのみを発酵に供する実験で高光学純度の L-乳酸発酵が行えた条件は55°Cで pH5.5のみとなった。微生物群集解析を実施すると L-乳酸菌は *Bacillus coagulans* であること、pH6.0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 D-, L-乳酸は、*Lactobacillus amylolyticus* によることが確認された。次に、高温 L-乳酸発酵の培養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実施した結果、pH6.5までの高 pH 化でも高光学純度の L-乳酸発酵が可能であることを明らかとした。

第4章では、簡便に乳酸発酵の進行を測定する方法として、生成された乳酸を中和する水酸化ナトリウムを供給する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秒ごとに中和剤消費量を記録した結果、乳酸と水酸化ナトリ

ウムの中和の際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確認された。また、中和剤供給ポンプの駆動記録から反応器容積当たりの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-乳酸発酵では 1.6 ± 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、本研究と同様に多糖の加水分解を伴う乳酸発酵事例と比べて同等以上であり、糖質の加水分解と乳酸発酵を同時に行う発酵として十分な速度を有することが確認された。

第 5 章では、L-乳酸菌である *Bacillus coagulans* に対する基質阻害、生成物（乳酸）による阻害および食塩による阻害を、多段階に対象物の濃度設定を行った回分式培養により検討した。基質阻害としては、単糖類グルコース 20g-glucose/L 以上において乳酸生成速度に対する阻害が、総糖質量 146g-glucose/L 以上において想定する培養期間（HRT が 5~10 日）での乳酸収率に対する阻害が確認された。乳酸阻害は乳酸塩濃度 41g-乳酸/L 以上において、食塩に対する阻害では塩化ナトリウム 20g/L 以上において、それぞれ乳酸生成速度および乳酸収率に対する阻害が確認された。これらより、生ごみを本研究と同様な培養により L-乳酸発酵を実施する場合は、基質中糖質濃度 70g-glucose /L（模擬生ごみ 1.5~2 倍希釈）程度とすることで乳酸収率に対する基質阻害および乳酸阻害を受けない発酵を行えることが示された。

第 6 章では、生ごみの腐敗による高温 L-乳酸発酵への影響を考察した。冷蔵庫で約 40 日間腐敗を進行させた模擬生ごみに対して微生物群集解析を行った結果、乳酸菌である *Lactobacillus sakei* および *Leuconostoc* 属の優占化を確認した。乳酸菌の優占化した生ごみは L-乳酸発酵を妨害する *Clostridium* 属を排除する効果があることから、腐敗を進行させた模擬生ごみを高温 L-乳酸発酵に供した結果、*Clostridium* 属の排除効果が確認された。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-乳酸発酵を適用しうる可能性の高いことを確認した。

次に、模擬生ごみにおいて資化している単糖類の同定を実施した結果、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、消費率は 60~70% であった。一方、グルコース以外の単糖類では、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であった。でんぷん、セルロースおよびペクチンの資化性検討を行った結果、でんぷんおよびペクチンに関しては添加糖質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したものの、これらの資化率向上には課題が指摘された。更に、バナナ果皮を原料とした高温 L-乳酸発酵を実施した結果、乳酸収率 0.69 が得られ、バナナ果皮の良好な資化性が確認された。

第 7 章は結論であり、本論文で得られた成果を要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、社会の持続的発展への貢献を目的に、有機性廃棄物である生ごみから生分解性プラスチック原料として利用できる L-乳酸を、多糖の加水分解、乳酸菌の植種および滅菌操作を行わずに半連続式培養で長期間安定して生成しうる発酵法の開発研究を行った結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 55°C での高温発酵で、pH 5~6 および水理的滞留時間（HRT）20~3 日（COD 負荷率 5.2~34.4g-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-乳酸が生成できることを見出した。また、pH6 の条件下では、乳酸濃度と乳酸収率がそれぞれ 32g/L と 0.58 以上（生成乳酸量/基質糖質量 [-]）となることも明らかにした。

2. L-乳酸発酵を担う菌種（L-乳酸菌）を 16S rDNA を利用した微生物群集解析により同定した結果、L-乳酸菌は *Bacillus coagulans* と同定され、また同菌は生ごみ自体にも存在するものであることが確認された。

3. 植種を行わず非滅菌条件下で、回分式培養により培養温度および pH 条件に関する実験を行った結果、L-乳酸発酵が行えた条件は 55°C で pH5.5 であった。しかし、半連続式培養がもたらす植種効果および乳酸塩の阻害効果により、55°C での L-乳酸発酵は pH 6.5 まで可能であり、高い pH 条件で L-乳酸生成量および L-乳酸生成速度を上昇させうることを明らかとした。

4. 生物相の解析では、L-乳酸菌は *Bacillus coagulans* であること、pH6.0 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 D-, L-乳酸は、*Lactobacillus amylolyticus* によることが確認され、半連続式培養で *Bacillus coagulans* およびその生成物を優占化しておくことで非滅菌条件下でも効率的な L-乳酸発酵が行えることを明らかにした。

5. *Bacillus coagulans* に対する基質阻害、生成物である乳酸の阻害および食塩による阻害を検討し、基質阻害としては総糖質量 146g-glucose/L 以上において、乳酸阻害としては乳酸塩濃度 41g-乳酸/L 以上において、食塩阻害では塩化ナトリウム 20g/L 以上において阻害が確認された。

6. バナナ果皮を原料とした高温 L-乳酸発酵を実施した結果、乳酸収率0.69が得られ、バナナ果皮の良好な資化性が確認された。果物果皮は、食品廃棄物として集約的に排出されるため、この資源化方法としての高温 L-乳酸発酵技術は有用であることを明らかとした。

以上要するに、本論文は、循環型社会の構築が求められている社会的背景の下、有機性廃棄物である生ごみから生分解性プラスチック原料として利用できる L-乳酸を生成する発酵法の開発研究を行い、その適用性と有用性を明らかとし、操作因子を提示したものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は、博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成18年8月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認められた。