

水生植物およびクリーニングクロップの 酵素糖化・高温 L-乳酸発酵

環境計画研究室 中谷 真悟

1. はじめに

ホテイアオイなどの水生植物を水質浄化に用いることや、過剰肥料をトウモロコシなどに吸収させ農業地域の地下水汚染を防ぐクリーニングクロップの施用が提案されている。しかし、これら植物は浄化に伴い発生する余剰植物体の処理が問題となり、有効利用法の検討が必要である。本研究では、これらの有効利用法として石油代替原料である L-乳酸への転換を試みた。余剰植物体を L-乳酸へと変換するには多糖の糖化と L-乳酸菌による L-乳酸発酵が必要である。

糖化は一般的に酸糖化と酵素糖化があるが、本研究では、反応条件が比較的穏やかな酵素糖化を用いる。余剰植物体を酵素糖化する場合、多糖(セルロース、ヘミセルロース)が強固な構造であることから、直接糖化を行うことができない。そのため、前処理が必要であり、前処理によって得られる糖収率に差が生じる。そこで、効率的な糖回収には、前処理方法の検討が必要である。また、酵素糖化では、糖化に時間を要するため、糖化・発酵全体にも時間がかかることが課題としてあり、改善が必要とされる。

L-乳酸発酵では、温度、pH を管理することによって、非滅菌下で L-乳酸発酵が行える高温 L-乳酸発酵を実施する。高温 L-乳酸発酵の培養条件は温度 55°C、pH5.5 あり、この発酵条件が酵素の反応条件と似ていることから、糖化と発酵を同時に行う同時糖化発酵が可能であると考えられる。

本研究では、水生植物およびクリーニングクロップの資源化を目的に、酵素糖化法を用い、効率的な糖回収のために酵素糖化における前処理方法や酵素の最適反応条件の検討を行った。L-乳酸発酵では、高温 L-乳酸発酵を用いて糖化と発酵を 1 つの反応槽で同時に行う同時糖化発酵(SSF)を検討した。

2. 実験方法

(1) 使用材料

本研究では、水生植物のヒシおよびホテイアオイ、クリーニングクロップとしてトウモロコシ(トマト土壌栽培)およびソルガムを用いた。

(2) 使用酵素

本研究では、工業用酵素のメイセラゼ(明治製菓(株))とアマノ 4(天野エンザイム)を用いた。

(3) 前処理比較糖化実験

前処理方法としては、アルカリ処理、A/O 処理、希硫酸処理、酢酸-エタノール処理および H₂O₂ 処理を用いた。

(4) 酵素糖化・高温 L-乳酸発酵

糖化と発酵を別々に行う従来法と同時に行う同時糖化 L-乳酸発酵を実施し、比較を行った。酵素糖化では、反応時間 72 時間で糖化を行った。サンプル濃度は、50g/L(前処理済みサンプル 12.5g/酵素溶液 250mL)で行った。高温 L-乳酸発酵では、培養温度 55°C、pH5.5 に設定し発酵を行った。培養時間は 72 時間とし、約 24 時間ごとにサンプリングを行い D-、L-乳酸生成量、グルコース濃度を分析した。同時糖化 L-乳酸発酵でも、同様の操作で行った。

(5) グルコース変換率および L-乳酸変換率

グルコースおよび乳酸の変換率は、生成グルコース量(g/L)または生成 L-乳酸量(g/L)を培養開始時のバイオマス量(g/L)で除して算出した。

$$\text{変換率(-)} = \frac{(\text{生成グルコース量または L-乳酸量})}{(\text{培養開始時のバイオマス量})}$$

3. 実験結果

3.1 セルロースによる酵素糖化条件の探索

本節では、セルロースを用いて酵素糖化における使用酵素の選定やその至適反応条件の探索、段階的な酵素濃度におけるグルコース変換率および糖化時間の関係を確認した。この結果、使用酵素の選定では、メイセラゼを使用酵素と決定した。また、メイセラゼの至適反応条件は、温度 45°C、pH4.5 であった。メイセラゼ量と糖化時間については、2g/L、72 時間が最適となった。

3.2 前処理比較糖化実験

前処理比較の糖化実験結果を図 3-1 に示す。水生植物では、希硫酸処理が最も高いグルコース変換率となり、変換率は最大で 0.16 であった。一方で、A/O 処理についても希硫酸処理に匹敵する高い変換率(0.15)となった。クリーニングクロップでは、A/O 処理が最も高いグルコース変換率となり、約 0.34 であった。

この結果より、酵素糖化における効率的な前処理方法としては、水生植物では希硫酸処理、クリーニングクロップでは A/O 処理となった。ただし、水生植物では希硫酸処理と A/O 処理にあまり差がみられないこと、また水生植物とクリーニングクロップに対して別々の前処理を行うことは、同じ設備で資源化することを前提とすれば、実用上望ましくない。以上の理由から以降の酵素糖化における前処理方法は、全て A/O 処理で行うこととした。

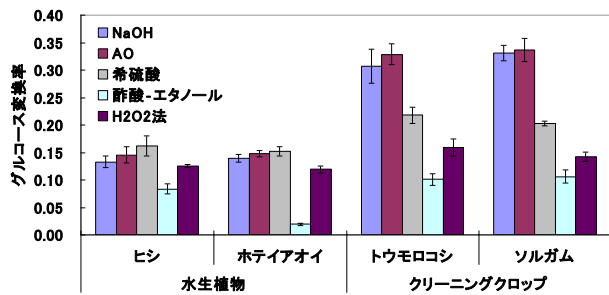


図 3-1 前処理比較糖化実験結果

3.3 酵素糖化・高温 L-乳酸発酵

高温 L-乳酸発酵の結果を図 3-2, 図 3-3 に示す。なお、酵素糖化の結果は、水生植物およびクリーニングクロープとも 1 日で酵素糖化が終了した。その際のグルコース変換率は、ヒシ:0.14, ホテイアオイ:0.12, トウモロコシ:0.32 およびソルガム:0.33 であった。図 3-2 について、水生植物のヒシ, ホテイアオイとも 48 時間後には L-乳酸変換率の増加がわずかとなり、48 時間までに L-乳酸発酵がほぼ終了することを確認した。48 時間後の L-乳酸変換率は、ヒシで 0.22, ホテイアオイで 0.18 であった。図 3-3 について、クリーニングクロープのトウモロコシおよびソルガムでは、24 時間まで、L-乳酸がわずかしか生成しておらず、約 48 時間後から L-乳酸の増加が確認できた。最終的な L-乳酸変換率は、トウモロコシは 0.20, ソルガムは 0.26 であった。また、72 時間後にどちらもグルコースが残っていることより、トウモロコシおよびソルガムの高温 L-乳酸発酵では、72 時間以上の発酵期間が必要であると思われる。

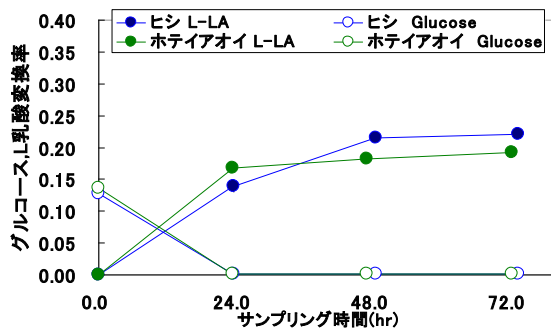


図 3-2 水生植物の酵素糖化・高温 L-乳酸発酵結果

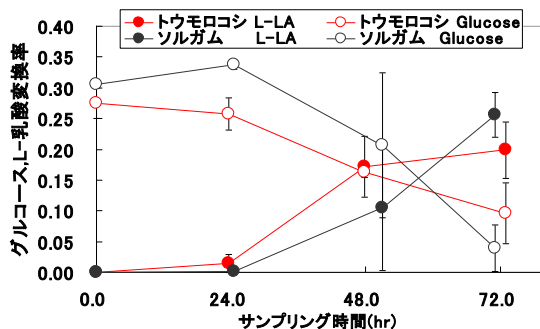


図 3-3 クリーニングクロープの酵素糖化・高温 L-乳酸発酵結果

3.4 同時糖化 L-乳酸発酵

同時糖化 L-乳酸発酵の結果を図 3-4, 図 3-5 に示す。水生植物の同時糖化 L-乳酸発酵では、ヒシおよびホテイアオイともおよそ 48 時間で発酵が終了することが確認できた。L-乳酸変換率は、ヒシ:0.17, ホテイアオイ:0.12 であった。従来の酵素糖化(24 時間)および高温 L-乳酸発酵(24~48 時間)に比べて、乳酸発酵全体にかかる時間の短縮が可能であることが確認できた(本研究では、ヒシとホテイアオイ合わせて 24 時間~48 時間)。

クリーニングクロープの同時糖化 L-乳酸発酵では、およそ 96 時間で発酵が終了することが確認できた。L-乳酸変換率では、トウモロコシは 0.26, ソルガムは 0.19 であった。トウモロコシはおよそ 48 時間後に酵素糖化・高温 L-乳酸発酵の L-乳酸変換率と同じ(0.19)になり、96 時間後にはより高い L-乳酸変換率(0.26)になることが確認できた。ソルガムは酵素糖化・高温 L-乳酸発酵に比べて、低い値(0.19)となった。ただし、ソルガムの高温 L-乳酸発酵では、発酵時間が不十分であった可能性が高いため、乳酸発酵が 4 日以上かかることから、同時糖化 L-乳酸発酵での糖化・発酵時間の短縮ができたと考えられる。

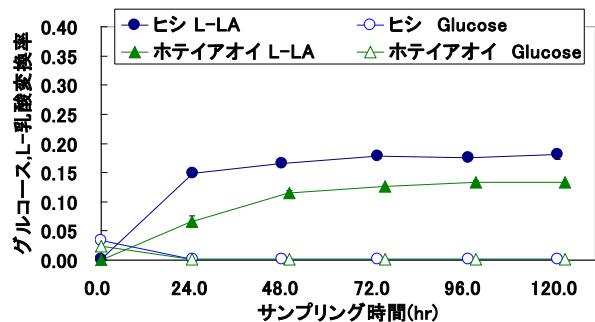


図 3-4 水生植物の同時糖化 L-乳酸発酵結果

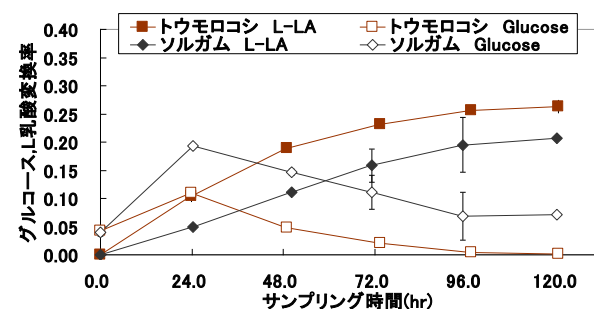


図 3-5 クリーニングクロープの同時糖化 L-乳酸発酵結果

まとめ

本研究では、水生植物(ヒシ, ホテイアオイ)およびクリーニングクロープ(トウモロコシ, ソルガム)に対して、同時糖化 L-乳酸発酵を実施した。その結果、水生植物(ヒシ, ホテイアオイ)およびクリーニングクロープ(トウモロコシ, ソルガム)とも、同時糖化 L-乳酸発酵での糖化・発酵時間の短縮が行えた。