

抽出法による連続的な乳酸発酵プロセスの検討

Examination of extractive fermentation for continuous lactic acid production process

○金子隆盛¹, 多胡敦史², 角田雄亮³, 平野勝巳³*Ryusei Kaneko¹, Atsushi Tago², Yusuke Kakuta³, Katsumi Hirano³

Abstract: Extractive fermentation is an efficient method to control pH and to collect the product. If the extractive fermentation is performed continuously, examination of extraction conditions is necessary. Then, extractive fermentation using diethyl ether was examined and effect of extraction repetition was investigated. In this study, extraction was performed after a portion of broth fractionated to reduce the organic solvent. As a result, it was confirmed that the distribution ratio and the solvent ratio can be calculated by the pH of broth. However, lactobacillus killing was caused by solvent toxic; consequently the fermentation velocity was decreased. Therefore, the fractionated ratio should be decreased to increase the number of living lactobacillus.

1. 緒言

近年, 石油系プラスチックの代替品としてバイオマス由来のポリ乳酸が注目されている. しかし, ポリ乳酸の製造過程における乳酸発酵は中和に伴う薬品および精製コストが高いことが問題である.

そこで, 発酵液に有機溶媒を添加し, 乳酸を抽出することで pH を制御する抽出発酵について検討した. なお, 本研究では発酵液を分取した後, 有機溶媒を添加して乳酸を抽出し, 発酵槽に返流する方法を採用した. この方法では少量の水相に対して溶媒を添加するため溶媒量の削減が期待でき, 有機溶媒の毒性により菌が死滅しても生菌が残存するため連続的な発酵が可能である.

本年度は, 抽出条件として必要となる溶媒比(有機相の体積(V_o)/水相の体積(V_w))および分配比(D)^[1]を算出し, この条件をもとに実際に連続的な抽出発酵が可能か検証した.

2. 実験

2. 1 培養液の調整

滅菌済み MRS 寒天培地 15ml をシャーレに添加し, 凝固後に乳酸菌(*Lactobacillus paracasei*)を植菌した. これを専用パウチ袋に入れて密閉し, インキュベーター内で 30°C にて 72 時間静置培養した. 培養後, ディスポーザブルループで 1 コロニー採取し, これをグルコース濃度が 5wt% の GYP 培地に溶解させ培養した. なお, 0.5 マクファーランド(生菌数濃度 1.5×10^8 CFU/ml)に希釈した培地を菌溶液とした.

2. 2 抽出

発酵液と所定溶媒比のジエチルエーテルを分液ロートに流入させ, 20 分攪拌した後 30 分静置した.

その後, 発酵液(水相)を回収し, pH を測定した.

2. 3 分配比および溶媒比の算出

分配比を式(1)に示す. ここで, g_o は有機相の乳酸量, g_w は水相の乳酸量, V_o は有機相の体積, V_w は水相の体積である. 溶媒比を 1.0 とし, pH が 4.30 の発酵液に対して抽出を行い, pH の値から解離乳酸量を, 解離定数を用いて非解離乳酸量を算出し, これらの和を g_w とした. また, 抽出前の乳酸量から抽出後における g_w の差し引いた値を g_o とし, 式(1)より分配比を算出した.

次に, 溶媒比を算出するため pH が 4.30 の発酵液に対して抽出を行った際, 返流後の pH が 4.40 となるように設定し, g_o , g_w を算出した. なお, 分取割合は発酵液全量の 75vol% とした. この値と上記分配比を用いて溶媒比を算出した.

$$D = \frac{g_o/V_o}{g_w/V_w} \quad (1)$$

2. 4 抽出発酵

50ml 三角フラスコにグルコース濃度が 5wt% の GYP 培地 50ml および菌溶液 15 μ l を添加し, 30°C で発酵させた. その後, pH が 4.30 の発酵液を 75vol% で分取し, 2.3 項より得られた溶媒比で抽出および返流を行った. なお, 今回は抽出を 4 回繰り返した.

2. 5 菌数測定

マクファーランド比濁度測定により抽出後および返流後の総菌数を測定した. また, コロニーカウント

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・院(前)・応化 3: 日大理工・教員・応化

法により生菌数を測定し、比濁度測定との差分を死菌数とした。

3. 結果および考察

3. 1 分配比および溶媒比の算出

式(1)より、分配比(D)を算出すると 0.21 となった。また、pH を 4.30 から返流後に 4.40 に上昇させる場合の溶媒比(Vo/Vw)を算出すると 5.1 となった。この条件をもとに抽出発酵を行った。

3. 2 抽出発酵

抽出発酵による水相 pH の経時変化を Figure 1 に、抽出後および返流後の生死菌数を Figure 2 に示す。

Figure 1 より、抽出しないと pH が低下するが、抽出を行うと pH が 4.30 から上昇し、返流後に 4.40 となることがわかる。ただし、抽出を繰り返すと pH の低下が遅滞し、pH が 4.30 に達する時間が長くなった。

Figure 2 より、抽出後および返流後の死菌数が同程度となっていることがわかる。これは、分取して抽出した発酵液(75vol%)中の菌が死滅しており、残存した発酵液中の菌が生菌として検出されたことを示している。これらのことから、抽出を行うと理論値通りに pH を制御できることが判明した。また、抽出後も連続的に乳酸発酵可能だが、分取した水相の菌が溶媒毒性により死滅し、抽出前の同 pH に比べて生菌割合が低下するため、抽出を繰り返す度に発酵速度が低下したと考えられる。

以上のことから、発酵速度を低下させずに連続的な乳酸抽出発酵を行うためには、分取割合を低下させる必要がある。

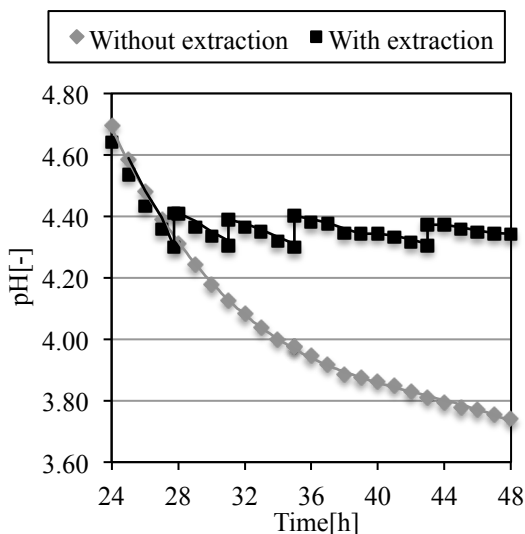


Figure1. Change of pH in broth during the extractive fermentation

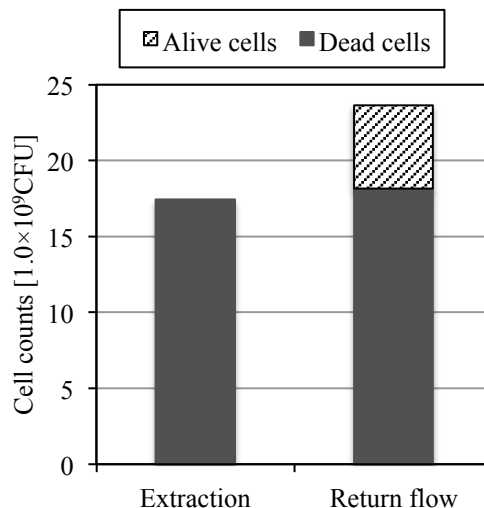


Figure2. Distinction between alive and dead cells of lactobacillus

4. 結言

抽出条件として必要となる溶媒比および分配比を算出し、この条件をもとに実際に連続的な抽出発酵が可能か検証した結果、以下のことが明らかになった

- 抽出前後の pH を設定すると分配比から溶媒比を定めることが可能であり、実測と一致することが確認された。
- ジエチルエーテルを溶媒とした場合、連続的な発酵は可能だが、溶媒毒性により菌が死滅するため抽出を繰り返す度に発酵速度が低下する。
- 発酵速度を低下させずに、連続的に乳酸抽出発酵を行うためには、分取割合を低下させる必要がある。

5. 参考文献

[1] 本水昌二他 基礎教育シリーズ分析化学 p.201 (2011)