

醱酵食品残渣成分で培養した乳酸菌が産生する高濃度乳酸の電気透析法による回収方法

上野良平¹, 森智和¹, 斉藤美貴², 橋本卓也², 小嶋匡人², 長沼孝多², 木村英生²

(¹山梨県環境科学研究所, ²山梨県工業技術センター)

要約 醱酵食品残渣由来の成分を含む乳酸菌の回分培養から、迅速に乳酸を回収するために、電気透析法の適用を試みた。私どもは、pH調整剤として高濃度アンモニアを含む、乳酸菌*Lactobacillus rhamnosus*培養後の醱酵食品残渣成分培地を用いて、乳酸とアンモニアの分離条件を検討した。毎回の透析前に、0.5% (w/v) 硝酸でバイポーラ膜を洗浄すれば、産業レベルの乳酸発酵を反映した10% (w/v)程度の高濃度乳酸を含む、乳酸菌培養後の醱酵食品残渣培地から、一旦分離したアンモニウムイオンの逆拡散を起こさずに、一度の透析操作で酸・アルカリ分離を行うことができた。本研究で提案する手法は、微生物の生育に必要な微量成分が培養液から除去されるという、既往の電気透析醱酵法の問題を解決するものと考えられる。

Recovery of highly-concentrated Lactic Acid Produced by Lactic Acid Bacterium in the Media Containing Food Processing Waste Components using Electrodialysis

Ryohei UENO¹, Tomokazu MORI¹, Miki SAITO², Takuya HASHIMOTO², Masato KOJIMA², Kota NAGANUMA², and Hideo KIMURA²

(¹Yamanashi Institute of Environmental Sciences, ²Yamanashi Prefectural Industrial Technology Center)

Abstract Bipolar Membrane Electrodialysis (ED) method was applied for rapid separation of lactic acid from culture of a lactic acid bacterium containing high concentration of ammonia (supplied to control pH). By washing the bipolar membrane with dilute nitric acid, ammonium and lactic acid were separated from culture broth of *Lactobacillus rhamnosus* with high concentration of lactate (ca. 10% (w/v); reflecting industrial practice) by a single ED run without back-diffusion of ammonium ion which is supposed to occur when a large amount of this compound is included in the culture. The method proposed in this work is expected to solve a problem with conventional electrodialysis fermentation which causes co-separation of the trace elements in the media that are essential for growth of lactic acid fermentation bacteria.

1. 緒言

本研究では、県内で発生する醱酵食品残渣を、乳酸菌による乳酸醱酵の培地成分として使用できることを明らかにしてきた¹⁾。次の段階として、醱酵食品残渣成分で培養した乳酸菌が生産する乳酸を、簡便・迅速に精製する手法の開発が求められる。ここでは、電気化学的手法である、バイポーラ膜を用いた、3室法による電気透析を試みた。

微生物による乳酸醱酵において、乳酸菌は、自らが生産した乳酸の濃度上昇が引き起こすpH低下によって、醱酵を進めることができなくなる。これを生成物阻害という。この阻害を緩和するために、アルカリを培養液に添加してpHを制御しながら、生成した乳酸を電気透析で分離して、醱酵を促進させる手法(即ち、菌の連続培養と電気透析を組み合わせた電気透析醱酵法)が提案されている。しかし、この方法では、電気透析が本来目的とする乳酸とアンモニアの分離だけでなく、培地に微生物の生育に必要な栄養源として添加した金属塩類やアミノ酸類の分離も起こってしまうため、乳酸菌の連続培養へ電気透析を適用することには問題がある。

このような事情を考慮すれば、乳酸醱酵によって得られる乳酸の分離精製に電気透析を利用する場合、連続培養への適用よりも、回分培養後の乳酸分離を目的として用いる方が好ま

しいと考えられる。

本研究では、バイポーラ膜//アニオン交換樹脂膜//カチオン交換樹脂膜からなる3室構造の電気透析機による、回分培養を終えた培養液から、乳酸とアルカリの同時分離を行うための最適条件を検討した。

2. 実験方法

2-1 透析装置

電気透析装置には、バイポーラ膜電気透析装置 AS-02B-5型(アストム(株))を用い、同社のバイポーラ膜BPを2枚、陽イオン交換膜 CMBIを1枚、陰イオン交換膜 AHA 1枚を1セルペアとして、20セルペア(有効膜面積0.4m²)を貼り合わせたカートリッジを使用した。図1に電気透析のメカニズムを、図2に装置の概要を示す。

2-2 乳酸菌と醱酵液

*Lactobacillus rhamnosus*を、増殖用培地であるMRS培地¹⁾、または醱酵食品残渣培地¹⁾中で培養した。乳酸菌培養後、培地中の乳酸濃度は、前者で4.4%(w/v)、後者で8.3~11.4%(w/v)であった。

2-3 模擬醱酵液、MRS培地、または醱酵食品残渣培地から乳酸の分離

酸液槽とアルカリ液槽に超純水(TOC濃度: 5 ppb 以下)を、塩液槽には模擬醱酵液として2.5~10% (w/v) 乳酸アンモニウム溶液(和光純薬製: 40% (w/v)のものを、超純粋で希釈して作成)を投入した。実際に、乳酸菌による醱酵液を用いた実験では、塩液槽に培養後のMRS培地、または醱酵食品残渣を成分とする培地(以下、食品残渣培地)を投入した。乳酸菌培養液は、予め、孔径0.45 μmのフィルターでろ過して、菌細胞を除去した後、80℃、15分間加熱して、菌体外酵素を失活させた。電気透析は塩液、酸液、アルカリ液を流速1.6 L/minでカートリッジに循環させながら、電極間で35Vの電圧を印加した。塩液とは培養液である。5分毎に各液のpHと電気伝導度を測定した。透析膜に流れる電流値が0となった時点で透析を終了した。透析終了後、迅速に各液のサンプルを採取した。

透析に使用したバイポーラ膜は、0.5% (w/v) 硝酸による洗浄(30分)を1回、続いて超純水による洗浄(30分)を2回行った後、超純水中4℃で保存した。また、硝酸が透析膜に及ぼす洗浄効果を、次の手順で調べた。はじめに、未使用の透析膜カートリッジを使用して、2.5または10% (w/v)乳酸アンモニウム(模擬醱酵液)を電気透析に供し、透析が完了するまでの時間を測定した。次に、乳酸菌培養後の人工の栄養培地であるMRS培地(乳酸とアンモニア以外の電解質を含む)を電気透析で分離した。最後に、再び模擬醱酵液を透析して、MRS培地の透析作業を行う前後で、乳酸アンモニウムのみを含む模擬醱酵液の分離に要する速度と時間を比較した。対照として、MRS培地の透析後、硝酸洗浄を行わなかった(即ち、超純水による洗浄のみを行った)透析膜を用いて、2回目の模擬醱酵液分離を行った。

2-4 分析方法

電気透析中、5分おきに塩液、酸液、アルカリ液のpHと電気伝導度、および積算電流を測定した。測定は、塩液の電気伝導度が0になるまで行った。透析による分離後の塩液、酸液、アルカリ液中の乳酸濃度をNollの方法²⁾、アンモニア濃度をBergmeyerとBeutlerの方法³⁾で測定した。

3. 結果

3-1 模擬醱酵液からの乳酸分離

はじめに、予備実験として、高濃度アンモニアを含む培養液の特徴を反映した模擬醱酵液として、10% (w/v) 乳酸アンモニウム溶液を電気透析に供した。塩液の電気伝導度がゼロになった時点で、電気透析が可能な物質がすべて酸、アルカリ槽へ移動したものと判断して、透析を終了した(図3)。透析後の培養液槽、酸液槽、およびアルカリ液槽の各々に含まれる、アンモニウムイオンの分布を調べた(図4)。透析時間が100 minを越えると、いったんアルカリ槽へ分離されたアンモニウムイオンの逆拡散によって培養液槽のpHが上昇した(図3の点線枠部分)。従って、アンモニウムイオンの逆拡散を防ぐために、模擬醱酵液を透析に供する前に、希釈する必要があっ

電気透析は塩を酸とアルカリに分ける操作。(中和の逆)

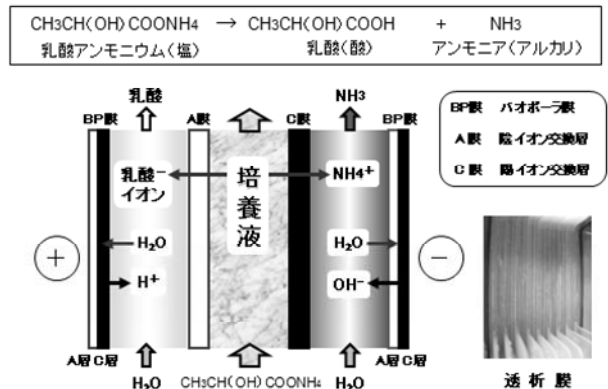


図1 バイポーラ膜を用いた電気透析の原理

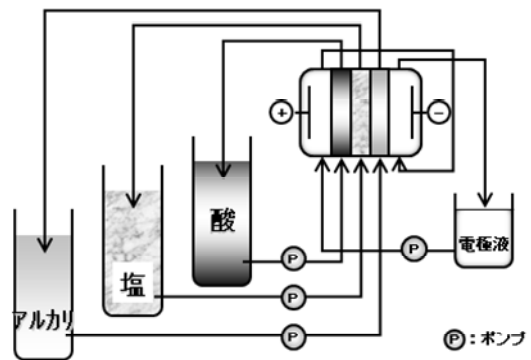


図2 電気透析装置の概要

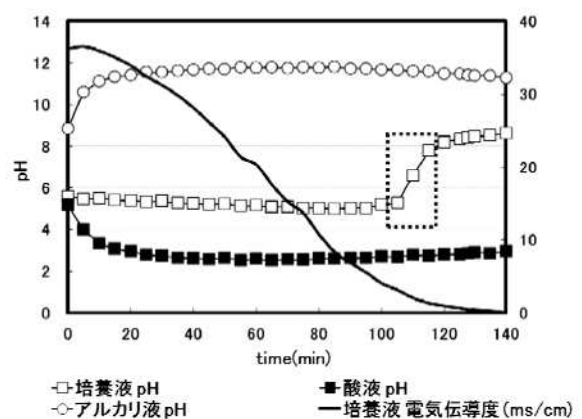


図3 10%(w/v) 乳酸アンモニウム溶液(模擬醱酵液)の電気透析結果
点線の枠はアンモニウム逆拡散による培養液槽pHの上昇を示す。

た。そこで、模擬醱酵液として使用する乳酸アンモニウム溶液の濃度を2.5または5%(w/v)に変更して、同様の透析実験を行ったところ、アンモニウムイオンの逆拡散を防ぐことができ

た。さらに、透析に要する時間も、乳酸アンモニウム溶液の初期濃度が10%(w/v)の場合に比較して、2.5%(w/v)の場合で約6割、初期濃度5%(w/v)の場合では33%減少した。

3-2 乳酸菌を培養したMRS培地からの乳酸分離

つぎに、食品残渣培地中で生産された乳酸の精製を行う前段階として、乳酸菌用の栄養培地であるMRS中で、乳酸菌が生産した4.4% (w/v) 乳酸の分離を行う電気透析実験を行った。その結果、透析終了までに要した時間は4h 程度であり、10% (w/v) 乳酸アンモニウム溶液である模擬醗酵液を用いた場合の約2倍であった。その原因として、MRS醗酵液には、乳酸以外に、微生物の2次代謝産物や、微量金属塩、タンパク質消化物をはじめとする、多様な電解質が溶解しているため、酸・アルカリへの分離に時間が掛かることに加えて、分子サイズが大きい有機物の、透析膜への付着が考えられた。

また、透析終了までの積算電流値 (1.85 Ah)は、模擬醗酵液である5% と10% (w/v) の乳酸アンモニウム溶液を分離する際に必要とした積算値 (1.22と2.33 Ah) の中間の値を示した(図5)。模擬醗酵液の透析に要した積算電流値は、その中に含まれる乳酸イオン濃度に依存している(図5)。しかし、乳酸濃度が4.4%(w/v)と低いMRS培地で、積算電流値が高く出ている。これは、培地に乳酸以外の電解質を含むので、積算電流値を高くなったものである。

3-3 バイポーラ膜の硝酸洗浄が、透析に及ぼす影響

3-2で示したように、MRS培地は乳酸以外の電解質を多く含んでいる。これを透析すると、無色のバイポーラ膜が着色する。従って、MRS培地成分が膜に付着することは明白である。このMRS培地成分が付着したバイポーラ膜の希硝酸洗浄が、その後で行う模擬醗酵液(2.5%(w/v)または10%(w/v) 乳酸アンモニウム溶液)の分離に及ぼす影響を調べた。醗酵液槽中の電気伝導度の経時変化を図6に示す。模擬醗酵液中の乳酸濃度が2.5%の場合、希硝酸による膜洗浄を施した後に行った透析実験では、膜洗浄を行わない場合のそれに比べて、透析に要した時間は54%短縮された。同様に、乳酸アンモニウムを10% (w/v)含む模擬醗酵液を分離した場合も、希硝酸による膜洗浄を行うと、行わない場合に比べて、分離に要する時間は14%短縮した(図中の矢印は洗浄による時間短縮を示す)。

3-4 乳酸菌を培養した食品残渣培地からの乳酸分離

3-3の結果から、バイポーラ膜の硝酸洗浄により、透析時間が短縮することがわかった。そこで、本実験では透析前に希硝酸による膜洗浄を行った。食品残渣培地の透析結果を図7に示す。食品残渣培地で乳酸菌*Lactobacillus rhamnosus*培養後の食品残渣成分培地を培養すると、培地中の乳酸濃度は8.3-11.4% (w/v) となり、その濃度は、3-1で行った模擬醗酵液(10%)と同様に高いため、図3に示したアンモニウムイオンの逆拡散が予想された。さらに、希硝酸で膜に付着した培地成分の除去が十分に行われなければ、乳酸分離反応の停止もありう

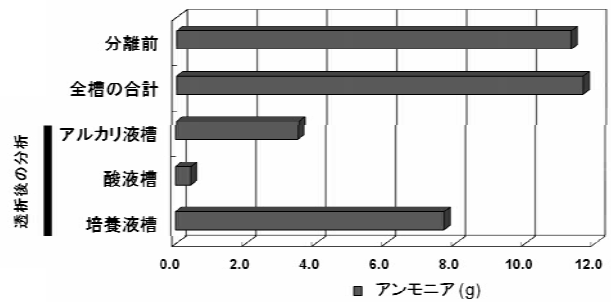


図4 10%(w/v) 乳酸アンモニウム溶液 (模擬醗酵液)を145分間電気透析後、各槽中に含まれるアンモニウムイオンの分布

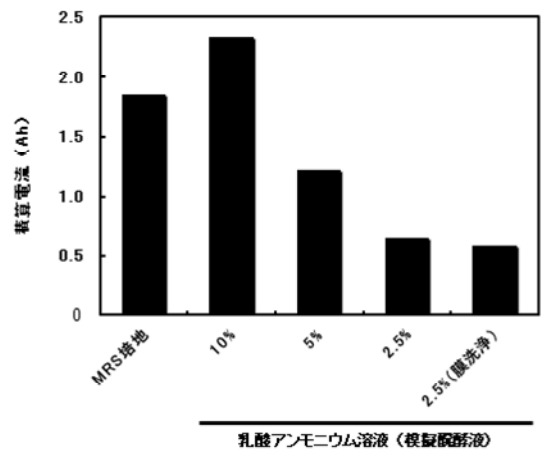


図5 濃度の異なる乳酸アンモニウム溶液 (模擬醗酵液)またはMRS培地の電気透析に要した積算電量の比較。2.5%、5%、10%は、乳酸アンモニウム液の濃度を示す。

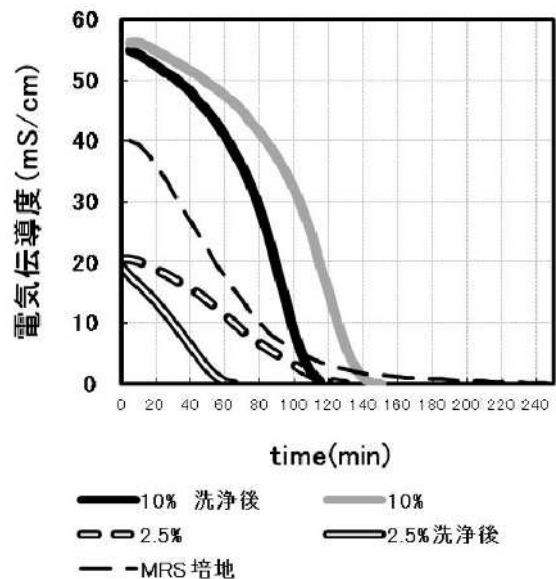


図6 MRS培地成分が付着したバイポーラ膜の希硝酸洗浄が、模擬醗酵液の透析時間に及ぼす効果。2.5%、10%は、乳酸アンモニウム液の濃度を示す。

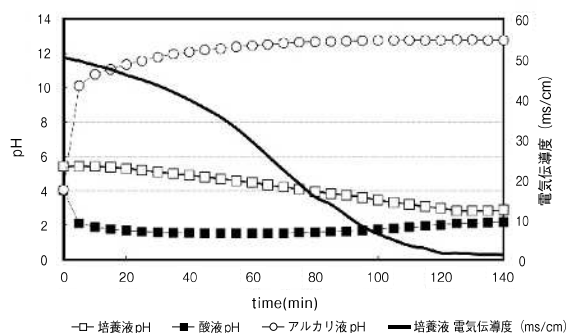
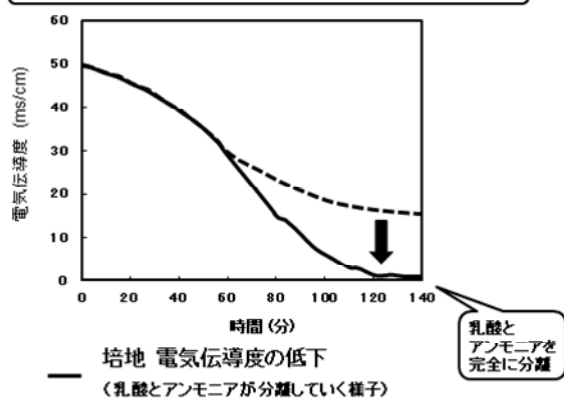


図7 *Lactobacillus rhamnosus*培養後の食品残渣培地を電気透析した結果

電気透析による醗酵液から高濃度乳酸の精製 ①



電気透析による醗酵液から高濃度乳酸の精製 ②

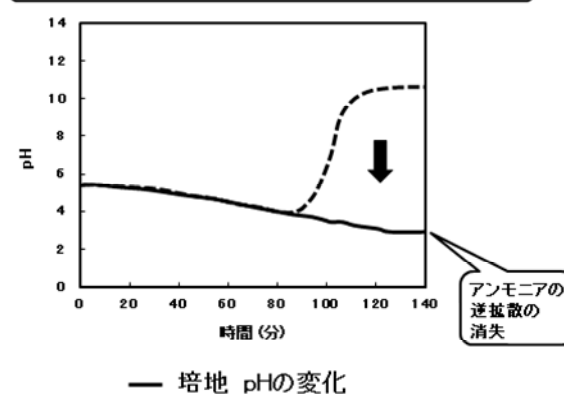
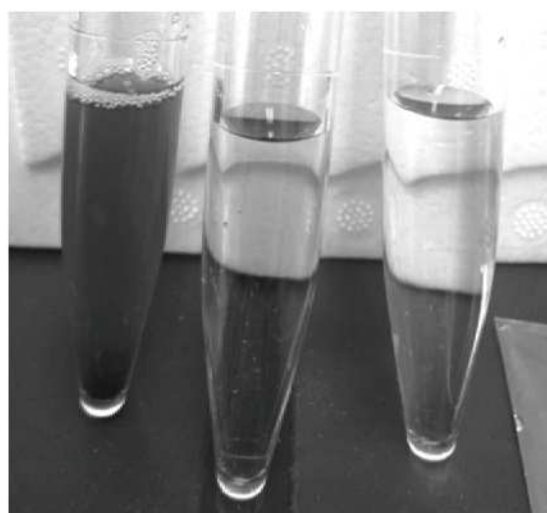


図8 膜洗浄が高濃度乳酸の分離に及ぼす影響
希硝酸洗浄により、乳酸とアンモニアの完全分離を達成(上)、またアンモニアの逆拡散を防止できた。点線は、希硝酸洗浄を行わない場合、実線は行った場合を示す。

る。しかし、実際には食品残渣培地に含まれるアンモニアの逆拡散を起さず、電気透析による酸・アルカリ分離を行うことができた(図7)。透析膜の希硝酸洗浄が、食品残渣培地成分の分離に及ぼす影響を図8にまとめて示す。本法を用いれば、*L. rhamnosus*培養後の食品残渣成分培地(乳酸濃度 8.3%(w/v))に含まれていた乳酸54.4 gのうち98% (53.4 g)を酸液槽から回収できた(図9、図10)。



培地 乳酸 アンモニア

図9 食品残渣成分含有培地から分離した乳酸液とアンモニア液

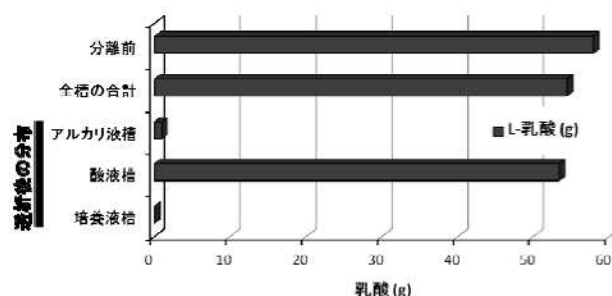


図10 8.3%(w/v) 乳酸を含む醗酵食品残渣成分培地を電気透析後、各槽に含まれるL-乳酸の分布 (*L. rhamnosus*は微量のD-乳酸を生産したが、生成乳酸のほぼ100%がL体であったことを付記する。)

4. 考察

3-1で述べたように、模擬醗酵液の乳酸アンモニウム濃度を低くすれば、透析時間を減少させることはできる。しかし、分離前の乳酸アンモニウム濃度依存的に、透析時間が減少するわけではない。また、産業レベルの乳酸発酵では、発酵液中の乳酸濃度が10% (w/v) に到達する。従って、一度の透析作業で、産業レベルで生産される高濃度の乳酸を、短時間で分離するための新たな工夫が必要であると考えられた。

次に、3-3で示したように、同じ濃度の模擬醗酵液(乳酸アンモニウム溶液)を分離する場合、希硝酸による透析膜洗浄を行えば、透析に要した時間が大幅に短縮できることがわかった。その効果は、10% (w/v) の高濃度乳酸を透析した場合でも確認できた。即ち、酸、アルカリ以外の有機物を多く含む培地であるMRS培地を透析した後では、膜の分離性能が低下するが、希硝酸洗浄は、この低下を防止できる。希硝酸洗浄の効果は、透析時間の短縮にとどまらない。すなわち、高濃度の乳酸塩液を分離した際に発生する、アルカリ成分の逆拡散を防止することが明らかになった。

本研究で使用した透析膜カートリッジは、研究に先立ち、数種の塩類から酸・アルカリ成分の分離に数回用いられたものであり、水洗浄のみのメンテナンスを受けてきたものである。つまり、図3で当初認められた、電気透析中のアンモニウムイオン逆拡散の原因は、透析膜への高分子物質の付着であると推察された。

従って、透析を行うたびに、透析膜の希硝酸洗浄を励行すれば、食品残渣成分培地のような、多様な電解質を含む溶液からでも、10%(w/v)程度の高濃度乳酸を、一度の透析作業で短時間・簡便に回収することが可能となろう。

5. 結 言

バイポーラ膜を希硝酸で洗浄すれば、醗酵残渣成分を含む乳酸菌培養液から、一旦分離したアンモニウムイオンの逆拡散を起こさずに、一度の透析操作で酸・アルカリ分離を行うことができた。その際、希硝酸が透析膜の分離性能を低下させることはなかった。本研究の成果は、既往の電気透析醗酵法において、微生物の生育に必要な微量成分が培地から分離除去される問題を解決するものである。

6. 謝 辞

本研究のコーディネーターとして、試験の進行や取りまとめに際し適切なご助言を頂いた、総合理工学研究機構の市川和規特別研究員に厚く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 斎藤美貴, 橋本卓也, 小嶋匡人, 長沼孝多, 木村英生:
山梨県総合理工学研究機構研究報告, 6, p.47-50 (2010)
- 2) Noll F: In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd edn, Vol. VI. Verlag Chemie, Weinheim, pp 582–588 (1984)
- 3) Bergmeyer, H.U. and Beutler, H-O.: In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd edn, Vol. VI. Verlag Chemie, Weinheim, pp 454–461 (1985)