

7. ポリ乳酸のケミカルサイクルに関する研究

静岡県立御殿場南高等学校 生物部
2 年 今田裕貴 市来隼一 杉山大知 加藤遼馬 他 9 名

1 研究の動機

本研究は地球環境問題に興味を持ったことがきっかけである。中でも私たちの身の回りにあふれているプラスチックは有限の資源である石油からできおり、容易に分解されないことから環境に悪影響を与えることがある。そこで私たちは生分解性プラスチックに着目した。

生分解性プラスチックは微生物に分解されるため、ケミカルサイクルが可能である。さらに、植物由来の原料を利用した場合、分解時に放出される二酸化炭素は植物の光合成によって吸収したものが大気中に戻ると考えることができるため、空気中の二酸化炭素は増加しない。これをカーボンニュートラルという。このように生分解性プラスチックは通常のプラスチックより環境への影響が少ない。

昨年は、身近な食物から生分解性プラスチックの作成を試みた。しかし、食べられる物を利用するのはもったいないと考え、発酵によって得られる乳酸を原料としてポリ乳酸（バイオプラスチック）を作成し、廃棄されるものを利用したケミカルサイクルの完成を目指すことにした。

2 ポリ乳酸のケミカルサイクル（化学物質の循環）について

植物を食物として利用した後に生じた廃棄物を乳酸発酵させ、発酵液から乳酸を分離し、ポリ乳酸を作成する。使用後に生分解もしくは焼却処分して生じた二酸化炭素は植物が光合成により固定したものであるため、地上の炭素の絶対量は変わらず、植物によって再び吸収され光合成に利用される。この一連の地球環境に配慮した循環システムをケミカルサイクルという（図 1）。



図 1 ポリ乳酸のケミカルサイクル

3 昨年の研究

昨年は、試薬として購入した乳酸から作成したポリ乳酸が環境中で生分解されることを確認した。

また、ポリ乳酸の原料の乳酸を生成する方法として、廃棄物である米のとぎ汁を発酵させると発酵液中に乳酸が生成されることを HPLC（高速液体クロマトグラフィー）を用いて確認できた。HPLC は横浜薬科大学 生化学研究室にてお借りした。

4 今年の研究

（1）目的

乳酸発酵により原料となる乳酸を作成し、発酵液から分離してポリ乳酸を作成することで、乳酸のケミカルサイクルを完成させる。

（2）研究の流れ

今年は、昨年使用した米のとぎ汁より回収や扱いが容易で、産業廃棄物でもある「米ぬか」を使用することにした。米ぬかを選んだのは、ぬか漬の酸味が乳酸によるものだというのを知り、乳酸が得やすいと考えたからである。実験は次の 3 つに分けて行った。

実験 1 ポリ乳酸の作成方法の改良と生分解性の検証

実験 2 米ぬかの水溶液から乳酸を効率よく作成する方法の探索

実験 3 米ぬか発酵液から乳酸を取り出す方法の探索

(3) 実験 1 ポリ乳酸の作成方法の改良と生分解性の検証

昨年、試薬の乳酸から作成したポリ乳酸は加水分解を起こしやすく、時間を置くと表面がべたついてしまった。その点を改良するため触媒の添加により固化の促進を試みた。

ア 実験 1 の目的

触媒を添加することにより、ポリ乳酸の固化を促進し、作成したポリ乳酸の生分解性を確認する。

イ 方法

乳酸 10mL をアルミカップに取り、触媒としてエチルヘキサン酸すず(Ⅱ)をそれぞれ 1, 2, 3 滴加えた。ホットプレートで段階的に加熱し、重合させた。加熱温度と時間は 130℃で 2 時間、160℃で 2 時間、220℃で 18 時間、合計 22 時間である。作成したポリ乳酸を花壇の土に埋めた。

ウ 結果

加熱直後は触媒 1 滴 2 滴 3 滴すべて固化した。図 2 では割れたポリ乳酸の縁が角張っている様子がわかる。4 週間後には触媒 1 滴のものは表面が加水分解を起こし、べたついていた。触媒 3 滴ものは、べたつかず固く、縁は尖ったままだった。土に埋め、4 週間たったものは、触媒 1 滴 2 滴 3 滴すべて、少しべたべたしたものが残っていたが、ほとんど溶けてなくなっていた (図 3)。



図 2 加熱重合直後のポリ乳酸 左から触媒 1 滴、2 滴、3 滴 図 3 土に埋めて 4 週間後のポリ乳酸

エ 考察

ポリ乳酸の加水分解を防ぐには、エチルヘキサン酸すず(Ⅱ)は触媒として有効であると考えられる。また、触媒を添加しても生分解性が失われないことを確認できた。

(4) 実験 2 米ぬかの水溶液から乳酸を効率よく作成する方法の探索

ア 実験 2 の目的

ポリ乳酸の原料となる乳酸を効率よく生成する方法を探索する

イ 方法

(ア) 直接培養法

初めに、ペットボトルに米ぬかと純水を入れて発酵させた。

(イ) 基質液交換法

直接培養法では発酵液の分離が困難であったため、米ぬかの発酵液から乳酸菌を培養して(図 4) 乳酸菌ビーズを作り、バイオリアクターとして乳酸発酵を行った。乳酸菌ビーズはアルコール発酵に酵母菌を封入したアルギン酸ナトリウムが利用されることを応用して作成した。



図 4 乳酸菌のコロニー 図 5 基質液交換法

三角フラスコに乳酸菌ビーズを入れ、基質液として 5% グルコース水溶液、または米ぬか水溶液をろ過した液をそれぞれ 200mL ずつ加えて 4 日間培養した (図 5)。乳酸菌ビーズが繰り返し使用できることを確認するため同じ乳酸菌ビーズを使い、基質液は 4 回入れ替えた。

(ウ) 連続滴下法

直接培養法では、発酵液の分離は容易であったが、4 日ごとに基質を交換する必要がある。この点を改良したのが連続滴下法である。この方法では乳酸菌ビーズをつめた注射器を作成しバイオリアクターとして利用した。滴下装置はペットボトルの栓にガラス管を付け、ローラークランプを通したシリコンチューブをつなげた。チューブにバイオリアクターをつなげ、注射器から出てくる発酵液を集めた (図 6, 7)。ローラークランプで滴下速度を調節し 1 滴/1 秒, 1 滴/15 秒の速さで基質液を滴下した。予備実験で 34 滴で 1 mL だったので 1 秒 1 滴では 1 mL 流すのに 34 秒、15 秒 1 滴では 1 mL 流すのに 8 分 30 秒かかる。



図 6 連続滴下装置の全体

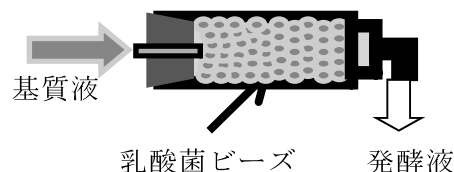


図 7 バイオリアクターの模式図

ウ 結果

(ア) 直接培養法

それぞれのペットボトル内の培養液の pH は表 1 のようになった。ボトルにより pH が下がる様子に差があったが、25 日目にはほとんど差はなくなった。発酵液と残った米ぬかの分離は、ろ紙を用いたろ過では完全に分離できなかった。

表 1 発酵液の pH の変化

培養日数	4 日	9 日	15 日	25 日
No.1	pH6	pH5	pH4	pH4
No.2	pH5	pH4	pH 4.5	pH 4.5
No.3	pH6	pH5	pH5	pH 4.5
No.4	pH5	pH4	pH4	pH4

(イ) 基質液交換法

三角フラスコ内の培養液それぞれの pH は表 2 のようになった。グルコースは 4 回とも 4 日目には pH=4、米ぬか水溶液は 4 回の実験でそれぞれ pH=5~7 となった。発酵液の分離は容易であったが、4 日ごとに基質を交換する必要がある。

表 2 4 日間培養した発酵液の pH

基質の種類	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目
グルコース	pH4	pH4	pH4	pH4
米ぬか液	pH5	pH7	pH6	pH5

(ウ) 連続滴下法

グルコース液の場合、1 滴/1 秒滴下の発酵液は pH6~7、1 滴/15 秒滴下の発酵液は pH4.5 になった。米ぬか水溶液は 1 滴/15 秒滴下の発酵液は pH=5 になった。発酵液の分離は容易であり、基質を交換する必要がないため、最も効率の良い方法であるが、基質液を 200mL 滴下するのに 28 時間かかり、途中でチューブ内にカビが生えてしまった。

エ 考察

乳酸菌ビーズは基質液交換法で繰り返し使用しても毎回 pH4 の発酵液が得られたことから、バイオリアクターとして利用できることがわかった。

基質液交換法では米ぬか液の発酵液の pH は基質を交換するごとに異なり、連続滴下法でも pH = 4 までは下がらなかった。これは米ぬかの中に含まれている乳酸発酵の基質となる物質の含有量

が一定ではないことが考えられる。

3つの作成方法のうち、バイオリアクターを用いた連続滴下法が最も効率よく乳酸を得られる可能性がある。ただし、シリコンチューブ内にカビが生えたり、温度条件を一定に保つことが難しい点など装置には改良の余地がある

(5) 実験3 米ぬか発酵液から乳酸を取り出す方法の探索

ア 実験3の目的

米ぬかの発酵液から純粋な乳酸を取り出す方法を探る。

イ 方法

(ア) 乳酸(カルボン酸)と、アルコール類(ヒドロキシ基)を濃硫酸を触媒にして加熱し、脱水縮合させてエステルを生成する。

(イ) アルコール類の選択については分留は沸点122℃の乳酸と沸点の差が大きいほうが効果的であると考え、エタノールとプロパノールを用いたが、エステル化が十分に起こらなかったため、ブタノールとペンタノールを追加した(表3)。

(ウ) エステル化により油層には乳酸エステルが移行し、水層には発酵残渣が残る。

(エ) 油層だけを取り出し、純水と濃硫酸を加えて加水分解する。

(オ) 加水分解したものを分留し、純粋な乳酸を得る。

表3 炭素数2～5のアルコールとエステルの沸点

	乳酸	エタノール	プロパノール	ブタノール	ペンタノール
沸点	122℃	78.37℃	97～98℃	117℃	138℃

ウ 結果

アルコールの種類とエステル化、油層の分離、加水分解、分留について表4にまとめた

表4 アルコールの種類とエステル化、油層の分離、加水分解、分留の結果

アルコール	エタノール	プロパノール	ブタノール	ペンタノール
エステル化の条件	湯煎	オイルバス	オイルバス	オイルバス
分留の条件	湯煎	オイルバス	オイルバス	オイルバス
カルボン酸	乳酸エチル	乳酸プロピル	乳酸ブチル	乳酸ペンチル
エステル化	○(におい有り)	○(におい有り)	○	○
油層分離	×	×	○	○
加水分解			○	×
分留			×	

○：反応が確認できた ×：反応が確認できなかった

エ 追加実験 発酵液のエステルの分析

今回の実験では、エステルの生成の確認は油層ができたかどうかと、純乳酸のエステルのにおいを基準に判断した。加水分解の確認は、油層がなくなったことを基準とした。

本当にエステル化ができているのか、確認するために、液体クロマトグラフィー／飛行時間型分離装置(TOF MS)により発酵液のエステルの分析を行った。TOF MSは国立沼津高専

でお借りし、試料の分析をしていただいた。試薬の乳酸で作成したエステルでは、乳酸エステルの分子量である 147 にピークがあり、自分たちの方法でエステルが生成できていたことが確認できた。発酵液をブタノールでエステル化したものを分析した結果は分子量 147 も検出されたが不純物も多く検出され、エステル化する前の段階で不純物が多く含まれていたことが考えられる。

オ 考察

エタノール、プロパノールは乳酸と沸点の差が大きいので、アルコールを先に気化させることで乳酸が残ると考えた。しかし、エステル化はエステル臭がする程度で反応が進まず、乳酸は得られなかった。これは炭素数の小さいアルコールは水溶性のため、脱水縮合（エステル化）と加水分解が可逆的に起こると考えられ、水溶性のエタノール、プロパノールは生成したエステルが加水分解して元に戻ってしまったためと推測される。

エステル化と加水分解ができたので、乳酸を分離するためにはブタノールが最も有力な物質であると考えられる。乳酸ブチルの生成は分析機器を用いて確認できた。

米ぬか発酵液から乳酸ブチルを得ることができたことから、米ぬかは乳酸ケミカルサイクルに有効な物質であることがわかった。

5 今後の課題

グルコースと米ぬか液から生成される乳酸を定量的に測定して比較し、米ぬかの基質としての有効性を検証する。発酵液から純粋な乳酸を得るために、エステル化した油層の加水分解を行う前に、不純物を取り除く実験操作を行う。方法としてはシリコンオイルを用いた蒸留を考えている。

最終的には発酵液から分離した乳酸からポリ乳酸を作成して、乳酸ケミカルサイクルを完成させる。

6 参考文献

公開特許公報 2002-128727 乳酸の蒸留精製方法

2007-114017 乳酸発酵液からの乳酸成分の分離方法および分離装置

入門 生分解性プラスチック 生分解性プラスチック研究会編

尿素を用いた乳酸樹脂の分解処理 中村 健二（技術研究所）