

第4章 植種汚泥が水素および有機酸発酵に及ぼす影響

4-1 概説

本章では、異なる植種汚泥を用いて、グルコースを基質とした高温酸発酵実験を行う。そして、各種有機酸や水素の生成量の違いを把握し、あわせて菌相解析を行うことで、酸発酵生成物が異なる反応機構についての考察を試みる。

4-2 文献考察

生ごみやその他炭水化物含有有機性廃棄物からの高温水素発酵の条件として pH5~6 が提唱されている(Shin et al., 2004; Shin and Youn, 2005; Ueno et al., 2006; Ueno et al., 2007; Akutsu et al., 2008; Akutsu et al., 2009; Luo et al., 2010)。また、水素発酵の失敗として、高負荷による乳酸の蓄積も報告されている(Ueno et al., 2001; Temudo et al., 2007; Liu et al., 2008; Akutsu et al., 2009)。それに対して、前章で述べたとおり、*B. coagulans* による光学純度の高い乳酸発酵が、非滅菌下で可能であり、最適な条件として pH5~6 および 55°C が示されている (Akao et al., 2007a; 2007b)。同様の報告は他にも見られる(Rosenberg et al., 2005; Michelson et al., 2006; Sakai and Ezaki, 2006)。Lee ら(2008)は、pH5.5 で乳酸が生成し水素が生成しなかったのに対して、pH6 以上では水素が生成したことを、台所の野菜生ごみを基質に生ごみコンポストを植種した高温発酵で報告している。このように、乳酸発酵と水素発酵は同様の発酵条件下で競合しており、目的とする生成物にならない可能性がある。しかしながら、生成物を決定する因子は明確にされていない。

4-3 実験方法

表 4.1 に示す 3 種類の種汚泥 (X1、X2、および X3) を用いた。X1 は前章と同じ反応器を用いた実験室での培養汚泥であり、模擬生ごみを基質として pH6.5、温度 55°C で 2 日おきにリアクターから発酵液を 0.7L 抜いた後にグルコース 25g/L、ポリペプトン 2.5g/L および Yeast Extract 2.5g/L を含む培地を 0.7L 投入し水素発酵を行っている水素菌優占溶液である。これは、pH6.5 とすることで、水素生成が見られたとの報告(Akao et al., 2007a)に基づいて設定した条件である。X2 および X3 は、嫌気性消化の実施設から頂いた汚泥である。X2 は畜産系廃棄物を対象とした中温メタン発酵、X3 は生ごみを基質とした高温メタン発酵の発酵槽からの汚泥である。

これらの種汚泥を用いて、表 4.2 に示す条件下で 72 時間の回分式実験を行った。A1 のみ pH6.5 とし、人工生ごみを基質とし、汚泥培養条件と同じ運転を行った。それ以外は、前章と同様にグルコースを基質とし、pH は 5.5 とし、乳酸発酵と水素発酵が競合する条件

を意図した。A1 および A4 は X1 を種汚泥に用いた。A2 および A3 は、実施設からの汚泥である X2 および X3 を、それぞれ用いた。基質を加えて最終的には 1 L として、それぞれ 72 時間の回分式培養を、前章と同様の方法で行い、同様の分析を行った。菌相解析も同様の方法により行った。ただし、pH 制御はより扱いやすい 2N KOH を用いた。本実験では直接乳酸からポリ乳酸の合成は考えていないので、アンモニアである必要はないと考えたからである。水素については、ガスクロマトグラム (GC-14B、島津製作所) を用いて測定した。

表 4.1 種汚泥の運転条件

植種汚泥	基質	温度	pH	TS (g/L)	規模
X1	人工生ごみ	高温	6.5	93	実験室
X2	畜産廃棄物	中温	制御なし	44	実規模
X3	生ごみ	高温	制御なし	57	実規模

表 4.2 回分式実験の条件

Run	植種汚泥 (体積, mL)	基質	温度	pH
A1	X1 (250)	人工生ごみ ^a	55°C	6.5
A2	X2 (300)	グルコース主体 ^b	55°C	5.5
A3	X3 (300)	グルコース主体 ^b	55°C	5.5
A4	X1 (250)	グルコース主体 ^b	55°C	5.5

^a 250 g

^b グルコース 25g/L、ポリペプトン 2.5g/L および Yeast Extract 2.5g/L を含む培地

4-4 結果および考察

実験結果を表 4.3 および図 4.1 にまとめて示す。Run A1 では、発酵の進行が遅く、乳酸の他にイソ酪酸および蟻酸が多く生成した。最終的な濃度は、イソ酪酸が 9.2g/L、蟻酸が約 6.0g/L であった。また、48 時間後以降に乳酸の減少が見られた。乳酸濃度は最終的に約 16g/L となった。水素は最終的に約 300mL 生成した。Run A2 では、蟻酸がほとんど生成せず、乳酸の他に酪酸が多く生成した。酪酸濃度は最終的に約 3.0g/L、乳酸濃度は最終的に約 14g/L となった。水素の生成量は最も多く、最終的に約 560mL 生成した。Run A3 では、蟻酸がほとんど生成せず、乳酸の他に酪酸の生成が見られた。酪酸濃度は最終的に約 6.2g/L、乳酸濃

度は最終的に約 18g/L となった。そして、水素は最終的に約 340mL 生成した。Run A4 では、蟻酸や酢酸が生成したものの、水素は生成しなかった。蟻酸および酢酸濃度は最終的にいずれも約 4.0g/L となった。乳酸濃度は最終的に約 25g/L となった。

表 4.3 水素生成量の結果

Run	水素生成量 (mL)
A1	301
A2	563
A3	344
A4	0

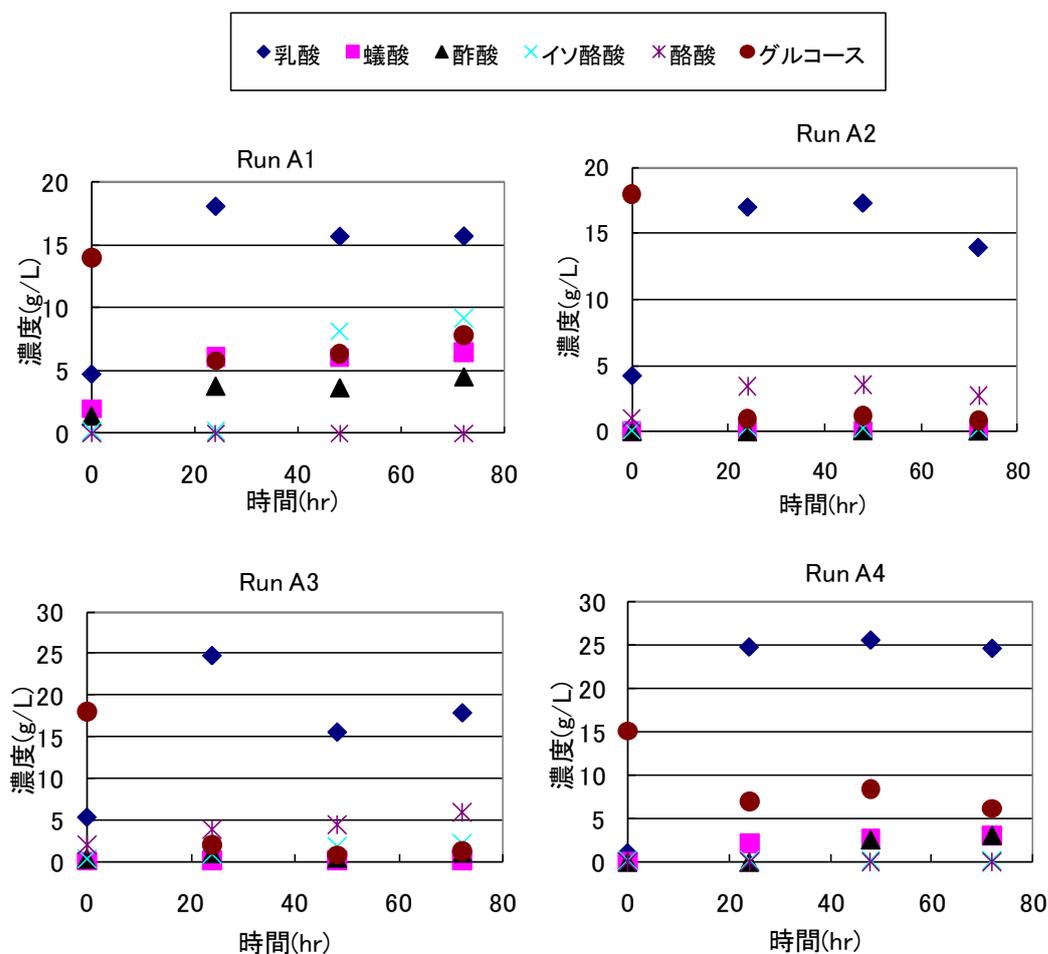


図 4.1 グルコースおよび有機酸濃度の経時変化

菌相解析の結果を表 4.4 にまとめて示す。種汚泥 X2 を用いた Run A2 では、*Bacillus* spp. が 27% 検出されたものの、*Bacillus coagulans* は全く検出されなかった。最も優占していたのは *Clostridiales* (クロストリジウム目) で、その中でも *Clostridium* spp. が最も多かった。種汚泥 X3 を用いた Run A3 では、*Clostridiales* (クロストリジウム目) に属している *Sporanaerobacter acetigenes* が優占していることが示された。*Clostridium* sp. など検出されていたのに対して、*Bacillus coagulans* はほとんど検出されていない。種汚泥 X1 を用いた Run A4 では、*Bacillus coagulans* が 51% を占めていたのに対して、Run A2 および Run A3 でよく検出された *Clostridiales* (クロストリジウム目) は全く検出されなかった。その他に、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* や *Lactobacillus* spp. も検出された。種汚泥の培養時は pH6.5 としていたので、前章の培養のように、*Bacillus coagulans* がほとんど 100% を占めるという結果にはならなかったものの、多数を占めていたことから、pH5.5 に培養条件を変更すると、*Bacillus coagulans* による乳酸発酵が進み、他の菌群の活性が抑制され、水素ガスはほとんど生成しない結果になったものと考えられる。

これらは、処理結果の違いに合致する菌相であると考えられる。同じ基質を用いて同じ pH や温度条件下で培養しても、菌相が異なると、少なくとも有機酸発酵の最初の段階では生成物が異なることが示された。有機酸生成をモデル化する際に、熱力学的な考察 (Rodríguez ら, 2008) は重要であるものの、乳酸の光学異性体を区別することができない。ADM1 (Batstone ら, 2002) の酸生成細菌の扱いを発展させ、菌相の違いおよびそれぞれの反応速度や阻害影響などをあわせて考慮することで、水素や各種有機酸の生成をより精度よく予測できるモデルが開発できるものと考えられる。

4-5 まとめ

3 種類の異なる種汚泥を用いて、基質、pH および温度条件を同じにした回分式培養実験を行ったところ、有機酸および水素生成特性はそれぞれ異なっており、菌相もそれに合致して異なっていた。これらの結果より、菌相の違いおよびそれぞれの反応速度や阻害影響などをあわせて考慮することで、水素や各種有機酸の生成をより精度よく予測できるモデルが開発できるものと考えられた。

表 4.4 菌相解析の結果

Phylum (門)	Order (目)	Family (科)	Species (種)	平均 相同 性 (%)	占有率(%)		
					A2	A3	A4
<i>Firmicut es</i>	<i>Bacillale s</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	99		1	51
			<i>Bacillus spp.</i>	97	27	7	21
			[others]			1	
	<i>Clostridi ales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	97	3		77
			<i>Clostridium spp.</i>	94	45		10
			[others]			23	
	<i>Thermoa naeroba cterales</i>		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	98			11
	<i>Lactoba cillales</i>	<i>Lactobacillace ae</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	99			7
			[others]				4
<i>Proteob acteria</i>	<i>Burkhol deriales</i>	<i>Comamonadac eae</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	99			2
			<i>Pseudom onadales</i>	<i>Moraxellaceae Acinetobacter sp.</i>	97		
Uncertain					3		1
分析クローン数					92	96	94

【第 4 章参考文献】

Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J. (2007) Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure. *Water Res.* **41**(8), 1774-1780.

Akao, S., Tsuno, H., Horie, T., Mori, S. (2007) Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition. *Water Res.* **41**(12), 2636-2642.

Akutsu, Y., Li, Y., Tandukar, M., Kubota, K., Harada, H. (2008) Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen

- fermentation of starch. *Int J Hydrogen Energy* **33**(22), 6541-6548.
- Akutsu, Y., Li, Y., Harada, H., Yu, H. (2009) Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *Int J Hydrogen Energy* **34**(6), 2558-2566.
- Lee, Z., Li, S., Lin, J., Wang, Y., Kuo, P., Cheng, S. (2008) Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. *Int J Hydrogen Energy* **33**(19), 5234-5241.
- Liu, D., Zeng, R. J., Angelidaki, I. (2008) Effects of pH and hydraulic retention time on hydrogen production versus methanogenesis during anaerobic fermentation of organic household solid waste under extreme-thermophilic temperature (70 degrees C). *Biotechnol. Bioeng.* **100**(6), 1108-1114.
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., Zhou, Q. (2010) Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresour. Technol.* **101**(3), 959-964.
- Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I., Nurk, A. (2006) I(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology* **39**(4), 861-867.
- Rodríguez, J., Lema, J. M., Kleerebezem, R. (2008) Energy-based models for environmental biotechnology. *Trends in Biotechnology* **26**(7), 366-374.
- Rosenberg, M., Rebros, M., Kristofikova, L., Malatova, K. (2005) High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats. *Biotechnol. Lett.* **27**(23-24), 1943-1947.
- Sakai, K. and Ezaki, Y. (2006) Open L-lactic acid fermentation of food refuse using thermophilic *Bacillus coagulans* and fluorescence in situ hybridization analysis of microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**(6), 457-463.
- Shin, H., Youn, J., Kim, S. (2004) Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy* **29**(13), 1355-1363.
- Shin, H. S. and Youn, J. H. (2005) Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation* **16**(1), 33-44.
- Temudo, M. F., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M. (2007) Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnol. Bioeng.* **98**(1), 69-79.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y. (2001) Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**(1-2), 65-73.

Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y. (2006) Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *J. Appl. Microbiol.* **101**(2), 331-343.

Ueno, Y., Fukui, H., Goto, M. (2007) Operation of a Two-Stage Fermentation Process Producing Hydrogen and Methane from Organic Waste. *Environ. Sci. Technol.* **41**(4), 1413-1419.