

第5章 乳酸発酵および水素発酵の競合実験

5-1 概説

昨年度に異なる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とが示された。そこで本章では、水素生成汚泥に対して、乳酸や乳酸生成汚泥を混合することにより、水素生成特性の変化を把握し、乳酸発酵および水素発酵の競合関係をモデル化することを試みる。

5-2 実験方法

競合実験回分式条件を表 5.1 にまとめて示す。異なる混合条件下での回分式実験を行い、水素生成特性を比較した。乳酸発酵液は、これまでの実験と同様に、pH 5.5 および 55°C の条件下での連続運転から得た。有効容積 1 L の反応器を用いて、最初に *B. coagulans* を植種し、グルコース (25 g/L)、ポリペプトン (2.5 g/L) および yeast extract (2.5 g/L) を含む基質 0.3 L を 48 時間ごとに投入した。この条件は、*B. coagulans* による L-乳酸発酵が安定して進行する条件である (Akao et al., 2007a; 2007b; Hidaka et al., 2010)。「乳酸発酵液」には、*B. coagulans* に加えて、乳酸および *B. coagulans* が生成した抗菌物質が含まれている。「乳酸発酵ろ液」は、遠心分離および孔径 0.45 μm のろ紙によるろ過で得ており、乳酸および抗菌物質は含まれるものの、*B. coagulans* 自体は含まれていない。「水素発酵液」は、別の pH 5.5 および 55°C の条件下での連続運転から得た。本報告書の第 4 章の実験 (Run A) で、最も水素が生成した Run A2 の汚泥を元に、同様の基質にて同様の半連続培養を行った。いずれの連続培養も 60 日間以上安定して運転した。Run B では、水素発酵汚泥の濃度が水素生成に及ぼす影響を評価した。Run C では、乳酸発酵液と水素発酵液の競合関係を評価した。Run D では、乳酸濃度の影響を評価した。Run D1、D2 および D3 では、最初にだけ乳酸を添加した。添加乳酸濃度は、それぞれ Run C1、C2 および C3 の初期乳酸濃度に合わせている。Run D4 では、乳酸 3.6 g/L を 0 h に、ならびに 4 g/L を 11、13 および 16 h に添加した。これは、Run C2 における乳酸生成特性に合わせている。Run E では、乳酸および抗菌物質の影響を評価した。これらの実験では、発酵液などに加えて、グルコース (25 g/L)、ポリペプトン (2.5 g/L) および yeast extract (2.5 g/L) を含む基質 0.7 L を混合し、最終的には 1 L にして、48 時間の回分式実験を pH 5.5 および 55°C の条件下で行った。

表 5.1 競合実験条件

No.	乳酸発酵液 (mL)	乳酸発酵ろ液 (mL)	水素発酵液 (mL)	乳酸添加 (g/L)
B1	–	–	75	–
B2	–	–	150	–
B3	–	–	225	–
C1	225	–	75	(含有) ^a
C2	150	–	150	(含有) ^a
C3	75	–	225	(含有) ^a
D1	–	–	75	5.4 ^b
D2	–	–	150	3.6 ^b
D3	–	–	225	1.8 ^b
D4	–	–	150	3.6 + 4 + 4 + 4 ^c
E1	–	225	75	(含有) ^d
E2	–	150	150	(含有) ^d
E3	–	75	225	(含有) ^d

^a 乳酸は、最初の乳酸発酵液に含まれていた

^b 0 h に添加

^c 3.6 g/L を 0 h に添加、4 g/L を 11、13 および 16 h に添加 (合計 15.6 g/L)

^d 乳酸は、最初の乳酸発酵ろ液に含まれていた

5-3 実験結果

Run B での水素生成結果を図 5.1 にまとめて示す。15 時間後の水素生成量は、初期の水素発酵汚泥の濃度によって異なっていたものの、48 時間後にはいずれも 600 mL 程度の水素が生成し、これは昨年度の Run A2 と同程度であった。水素生成量に大きな差がなかったことは、これらの条件下では初期菌濃度の影響が無視できることを意味する。Run C での水素生成結果を図 5.2 にまとめて示す。Run C1、C2 および C3 で水素生成量は 150~180 mL まで減少し、主たる生成物は乳酸であった。Run C では、乳酸、*B. coagulans* および *B. coagulans* が生産する抗菌物質が含まれた条件下での発酵であり、水素生成減少の主たる要因がどれかは不明である。そこで、この点を評価するために、乳酸のみを添加した Run D、および乳酸、および *B. coagulans* が生産する抗菌物質が含まれた発酵ろ液を添加した Run E を設定

した。Run D での水素生成結果を図 5.3 に、Run E での水素生成結果を図 5.4 にまとめて示す。いずれも水素生成量は Run B に比して減少したものの、Run C ほどではなかった。

各影響因子についての結果を図 5.5 にまとめて示す。Run B での水素生成量が最も多く、Run C では最も少なかった。Run E では Run D よりも水素生成量が減少した。Run C と Run E の違いは、*B. coagulans* 自身および Run C で生成された抗菌物質が原因である。これらより、水素生成は、乳酸により阻害され、また *B. coagulans* が生成する抗菌物質にも阻害されることが分かる。

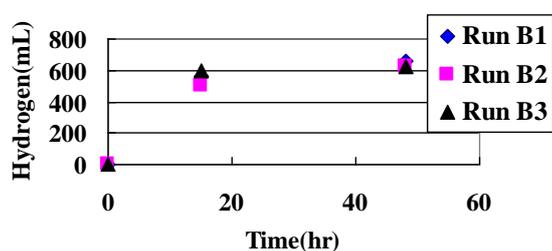


図 5.1 Run B での水素生成結果

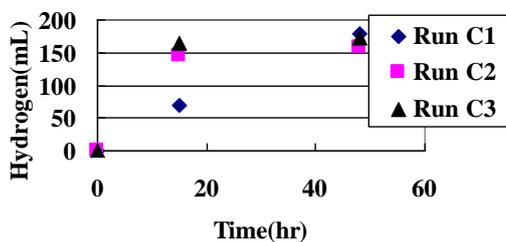


図 5.2 Run C での水素生成結果

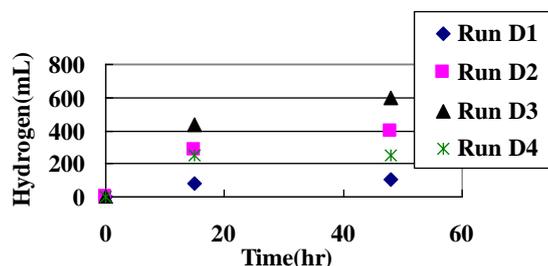


図 5.3 Run D での水素生成結果

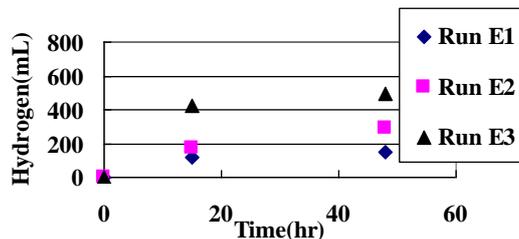


図 5.4 Run E での水素生成結果

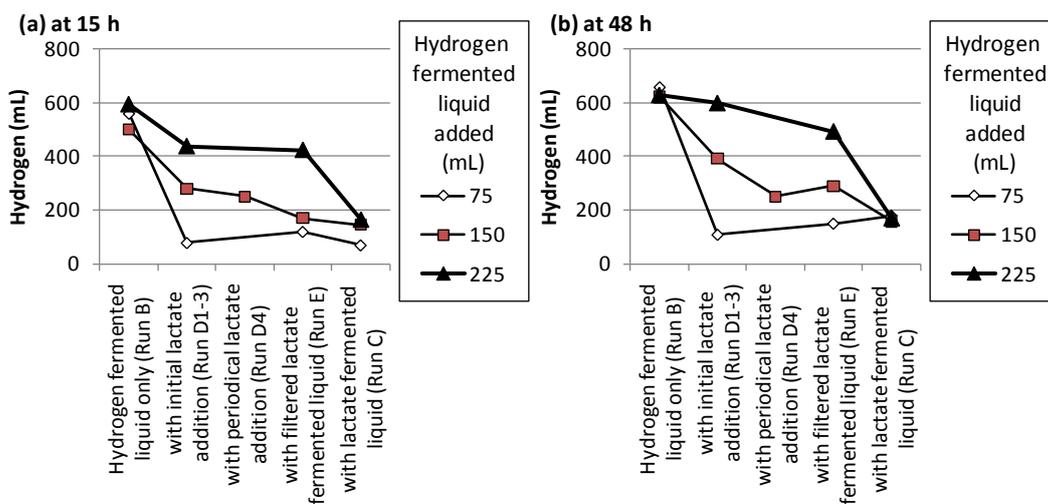


図 5.5 各影響因子についての水素生成結果

5-4 数理モデルの開発

水素発酵および乳酸発酵の競合関係の数理モデル化を試みた。ここでは、Hidaka et al. (2010) の乳酸発酵モデルを基本として、水素菌による水素発酵の基質阻害が、*B.coagulans* による乳酸発酵と同様に Haldane モデルを用いて表すことができ、また乳酸阻害の阻害形式は非拮抗阻害型を用いて表すことができるとした。数理モデルの概念図を図 5.6 に、用いた記号の一覧を表 5.2 に、設定したパラメーター一覧を表 5.3 に、反応速度式を表 5.4 に、物質収支式を表 5.5 に示す。乳酸の分解による水素や他の有機酸の生成は考慮していない。ギ酸および水素は同一の状態変数として扱った (野池ら, 2009)。ここで、 K_3 、 $K_{E_{H_2}}$ 、 γ_L 、 γ_{bu} および γ_{ac} は、Run B の結果を参考にして求めた値、その他のパラメータは乳酸発酵と同じ値を用いた。物質収支は COD を基準としたので、酪酸、酢酸および水素の収支式においては、1 mol あたりの COD 量を換算する係数が必要である。

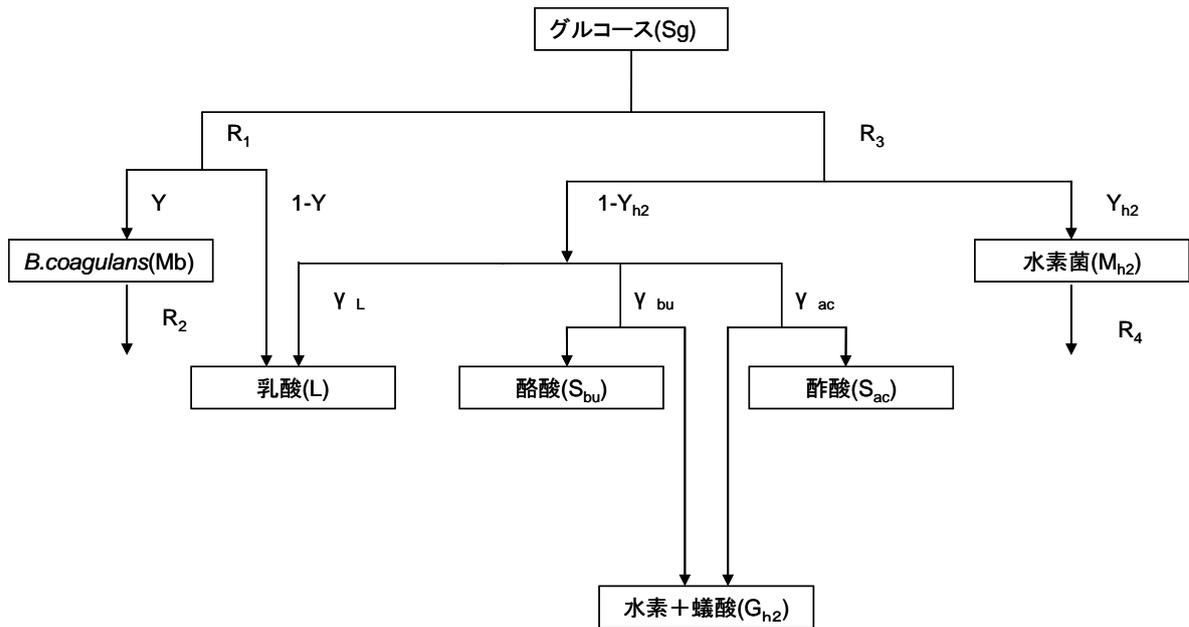


図 5.6 競合試験の概念図

表 5.2 用いた記号の一覧

R_1	gCOD/L/hr	<i>B.coagulans</i> によるグルコース分解速度
R_2	gCOD/L/hr	<i>B.coagulans</i> の死滅、分解速度
R_3	gCOD/L/hr	水素菌によるグルコース分解速度
R_4	gCOD/L/hr	水素菌の死滅、分解速度
S_g	gCOD/L	グルコース濃度
L	gCOD/L	乳酸濃度
S_{ac}	gCOD/L	酢酸濃度
S_{bu}	gCOD/L	酪酸濃度
G_{h2}	mL/L-reactor	水素ガス+蟻酸
M_{h2}	gCOD/L	水素菌濃度
M_b	gCOD/L	<i>Bacillus coagulans</i> 濃度

表 5.3 モデル式に用いた各パラメータ

パラメータ	単位	乳酸発酵		水素発酵	
発酵速度定数	1/hr	k_1	12.8 ^{a)}	k_3	8
発酵菌分解速度定数	1/hr	k_2	0.01 ^{a)}	k_4	0.01
半飽和定数	gCOD/L	K_S	3.1 ^{a)}	K_{Sh2}	3.1
グルコース阻害	gCOD/L	K_{ES}	127 ^{b)}	K_{ESh2}	127
乳酸阻害	gCOD/L	K_{EI}	5.11 ^{a)}	K_{Eih2}	0.5
乳酸蓄積阻害	gCOD/L	L_{ct}	40 ^{a)}	—	—
乳酸蓄積阻害	gCOD/L	L_{max}	87.5 ^{b)}	—	—
水素蓄積阻害	gCOD/L	—	—	L_{cth2}	40
水素蓄積阻害	gCOD/L	—	—	L_{maxh2}	87.5
乳酸菌収率	—	Y	0.12 ^{a)}	—	—
水素菌収率	—	—	—	Y_{h2}	0.12
乳酸変換割合	—	1		γ_L	0.65
酪酸変換割合	—	—	—	γ_{bu}	0.3
酢酸変換割合	—	—	—	γ_{ac}	0.05

a) Hidaka et al. (2010) より b) 本報告書第4章より

表 5.4 反応速度式

<p>乳酸発酵</p> $R_1 = k_1 \cdot \frac{Sg}{K_S + Sg \cdot \left(1 + \frac{Sg}{K_{ES}}\right)} \cdot \frac{K_{EI}}{K_{EI} + L} \cdot \left(1 - \frac{ L - L_{ct} _+}{L_{\max} - L_{ct}}\right) \cdot M_b$ <p>ただし、 $L - L_{ct} < 0$ の時、$L - L_{ct} _+ = 0$ $L - L_{ct} \geq 0$ の時、$L - L_{ct} _+ = L - L_{ct}$</p>
<p><i>Bacillus coagulans</i> 自己分解</p> $R_2 = k_2 \cdot M_b$
<p>水素発酵</p> $R_3 = k_3 \cdot \frac{Sg}{K_{Sh2} + Sg \cdot \left(1 + \frac{Sg}{K_{ESh2}}\right)} \cdot \frac{K_{EIh2}}{K_{EIh2} + L} \cdot \left(1 - \frac{ L - L_{cth2} _+}{L_{\max h2} - L_{cth2}}\right) \cdot M_{h2} \quad (3.1)$ <p>ただし、 $L - L_{cth2} < 0$ の時、$L - L_{cth2} _+ = 0$ $L - L_{cth2} \geq 0$ の時、$L - L_{cth2} _+ = L - L_{cth2}$</p>
<p>水素発酵菌自己分解</p> $R_4 = k_4 \cdot M_{h2}$

表 5.5 物質収支式

$\frac{dM_b}{dt} = Y \cdot R_1 - R_2$
$\frac{dM_{h_2}}{dt} = Y_{h_2} \cdot R_3 - R_4$
$\frac{dS_g}{dt} = -R_1 - R_3$
$\frac{dL}{dt} = (1 - Y) \cdot R_1 + (1 - Y_{h_2}) \cdot R_3 \cdot \gamma_L$
$\frac{dS_{bu}}{dt} = (1 - Y_{h_2}) \cdot R_3 \cdot \gamma_{bu} \cdot \frac{160}{192}$
$\frac{dS_{ac}}{dt} = (1 - Y_{h_2}) \cdot R_3 \cdot \gamma_{ac} \cdot \frac{128}{192}$
$\frac{dH_2}{dt} = \left\{ (1 - Y_{h_2}) \cdot R_3 \cdot \gamma_{bu} \cdot \frac{32}{192} + (1 - Y_{h_2}) \cdot R_3 \cdot \gamma_{ac} \cdot \frac{64}{192} \right\} \cdot \frac{1000 \cdot 22.4 \cdot (273.15 + 25)}{16 \cdot 273.15}$

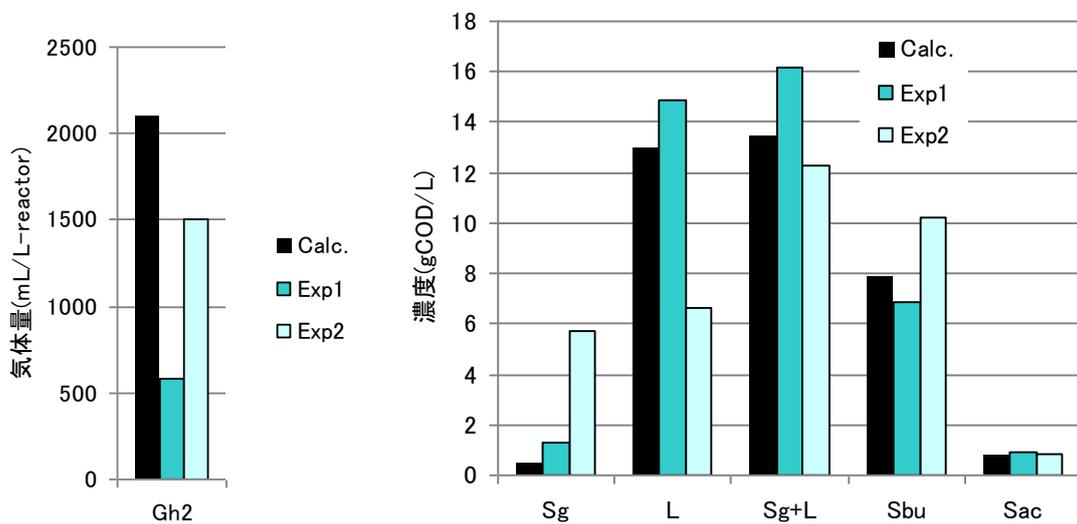


図 5.7 水素発酵におけるシミュレーション結果と実測値との比較

これらのモデル式による計算結果と、水素発酵の半連続式実験における実測値との比較を行った。図 5.7 にその結果を示す。なお、図における Calc.はモデル式による計算値、Exp1

は発酵開始 144 時間後の測定値、Exp2 は発酵開始 288 時間後の測定値を表している。Exp1 の水素ガスの生成量以外はよく適合していると考えられる。Exp1 の水素ガスの量がモデル式の計算結果と大きく異なっているが、これは、ガス生成量が少ない段階でガスパックによる気体の捕集に問題があったためであると考えられる。

Run B2、Run C1、Run C2、Run C3、Run D1、Run D2、Run D3 および Run D4 の結果が、モデル式に適合しているかをシミュレーションした。シミュレーション結果と実測値との比較を図 5.8 に示す。また、Run D では *B.coagulans* の 0.001 gCOD/L の混入を仮定した。

先ほど述べた水素測定の精度の問題を考慮すると、実測値と計算結果の適合は見られると判断でき、Run C においては *B.coagulans* 培養液添加による水素生成の阻害が再現されている。蟻酸の生成が見られる Run D2 および Run D3 において、実際の水素の生成量がモデル式による計算結果より多くなっている。それは、 γ_L 、 γ_{bu} および γ_L の比を本モデルでは一定としてあるが、実際は一定ではなく、蟻酸が存在するなどの条件によって異なる可能性が考えられる。例えばエタノールなどの他の物質が生成している可能性も考えられる。全体としてはおおむね乳酸および水素の生成状況や二種類の菌群の競合関係を再現できたと考えられる。世界水協会の ADM1 モデル (Batstone, 2002) での酸発酵の扱いとは異なり、複数の菌群を考慮しているため、今後異なる特定菌群を定量する技術を開発することで、より詳細な反応機構の把握が可能になることが期待できる。

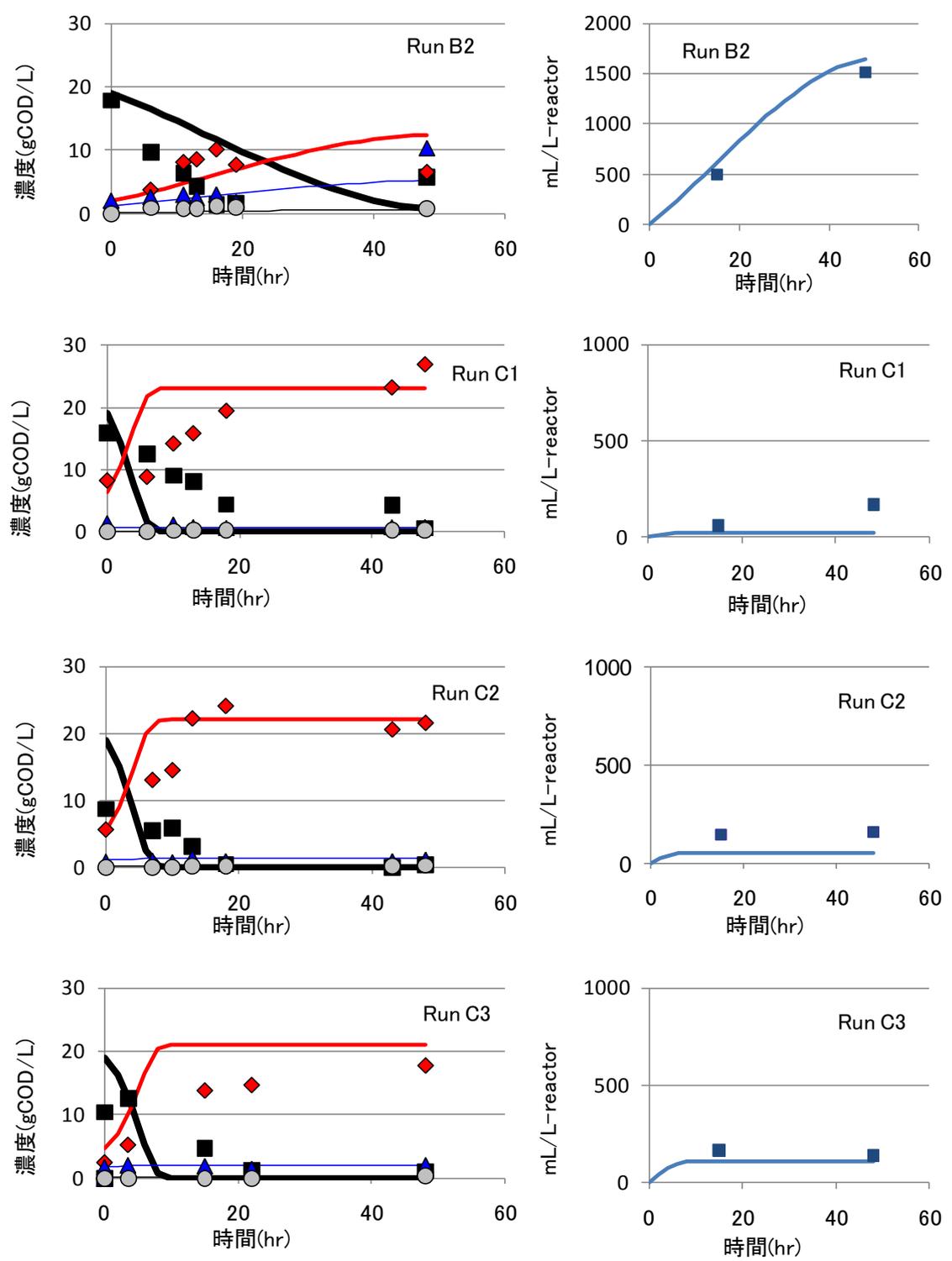
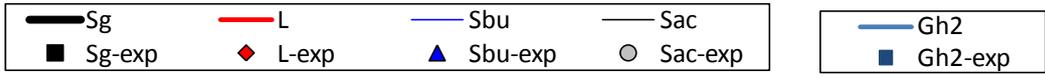


図 5.8 水素発酵におけるシミュレーション結果と実測値との比較 (その 1)

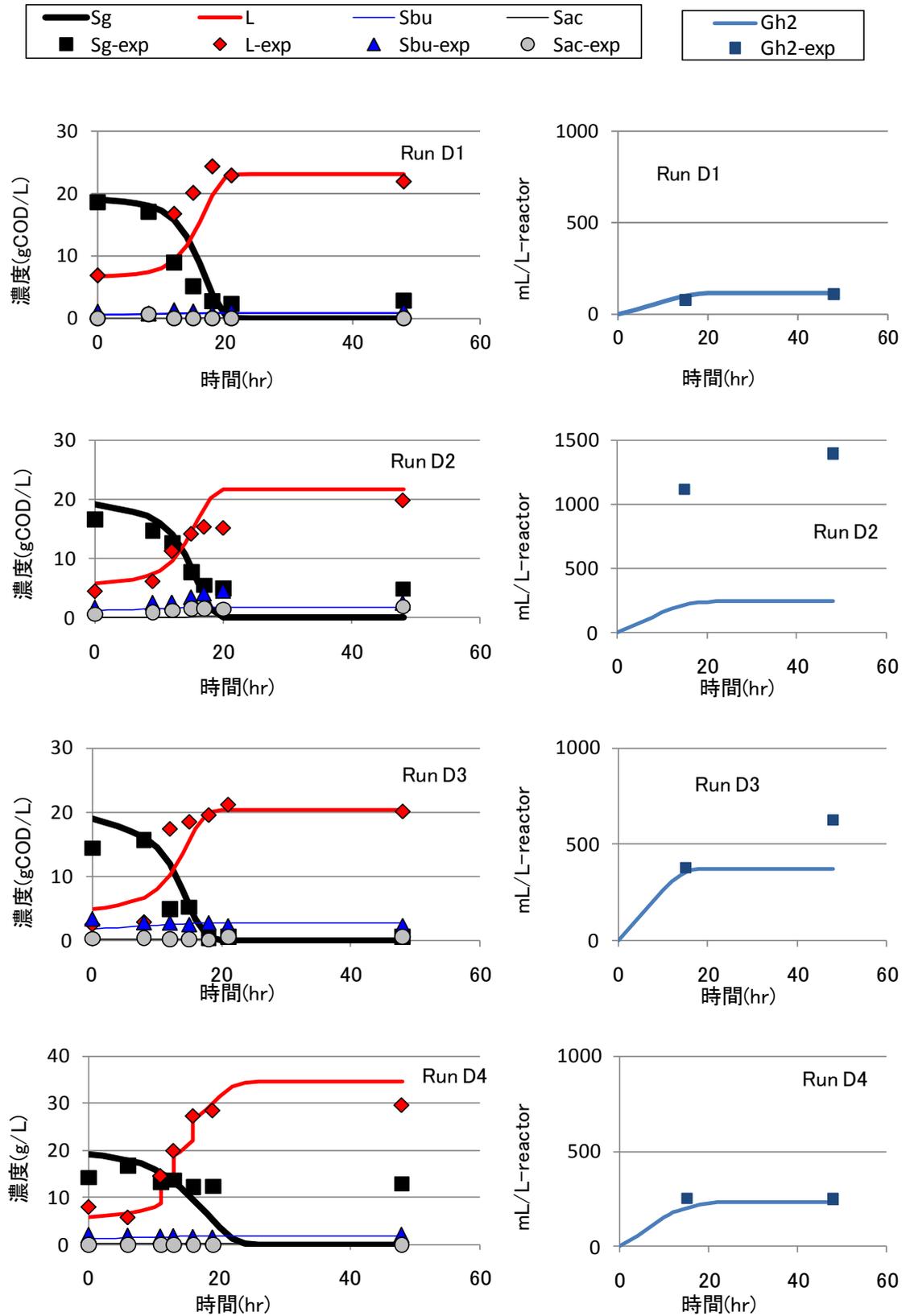


図 5.8 水素発酵におけるシミュレーション結果と実測値との比較 (その2)

5-5 まとめ

本章では、水素発酵と乳酸発酵の競合関係を、回分式実験により明らかにし、その結果を基に数理モデルを構築した。水素発酵において乳酸の生成は失敗であり、また乳酸発酵において意図しない水素が生成すると爆発事故につながる恐れがある。これらの競合関係を把握することは、酸発酵や水素発酵において、意図する生成物を制御する上で重要であると考えられる。

【第5章参考文献】

- Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J. (2007a) 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. (2007b) 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.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H., Vavilin, V. A. (2002) *Anaerobic Digestion Model No.1*. International Water Association (IWA), Publishing, London, UK.
- Hidaka T, Horie T, Akao S, Tsuno H. (2010) Kinetic model of thermophilic l-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification. *Water Res.* **8**, 2554-62.
- 野池達也, 安井英斉, 松本明人, 李 玉友, 河野孝志, 落 修一, 佐藤和明, 渋谷勝利 (2009) *メタン発酵*, 技報堂出版, 東京.