

循環型社会形成推進科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

- ・研究課題名=有機性廃棄物の嫌気性消化による再資源化技術の反応機構解析
- ・研究番号=K 2 1 2 5, K 2 2 0 7 1

・国庫補助金精算所要額 (円) =5,977,000

・研究期間 (西暦) =2009-2010

・研究年度 (西暦) =2010

・代表研究者名=日高 平 (京都大学)

・共同研究者名=西村 文武 (京都大学) (2010年度のみ)

・研究目的=京都議定書が発効し、世界的にも地球温暖化効果ガス排出量の削減が求められ、また我が国においても、資源循環型社会の構築が重要との観点で施策や法律的な取り組みがなされつつある。カーボンニュートラルであるバイオマスとして、都市から発生する生ごみや食品廃棄物といった有機性廃棄物からのエネルギーの創出は、将来の化石燃料資源の枯渇への対応や地球温暖化の防止などにつながる。また嫌気性消化生成物である乳酸などは、生分解性プラスチックの原材料としての適用が注目されており、高効率な乳酸発酵技術により、有機性廃棄物の資源としての活用が可能となる。様々な有機性廃棄物を対象とした嫌気性消化技術の研究例は多くあり、実用化が進んでいるものの、これらの目的で研究されている嫌気性消化技術の反応機構については、未だに不明な点が多い。本研究では、グルコースおよび人工生ごみの酸発酵運転で分子生物学的手法による微生物群集の定量技術を確認しながら、菌相変化が生成物に及ぼす影響を検討し、水素発酵と乳酸発酵の競合実験を行いながら、有機性廃棄物の嫌気性消化における反応機構を明らかにすることを目的とした。

・研究方法=グルコースおよび生ごみを基質とした酸発酵実験を行い、菌相や生成物の違いについてを検討しながら、数理モデルを構築した。

1. グルコースを基質とした乳酸発酵

本実験では、植種材料としてL-乳酸発酵液を作成し使用した。この発酵液は、グルコースを主体とした種培地に、模擬生ごみのL-乳酸発酵液を植種して、pH5.5で培養温度55°Cの条件下で約2日間培養して作成した。この植種材料を、発酵開始時に10 mL添加した。リアクターとして容積1Lのガラス製反応器を用いた。pHの調整は10%アンモニア水溶液を中和剤として用いて、pHコントローラー((株)日伸理化、NPH-660)のON/OFF制御で行った。運転は完全混合で行い、サンプリングは、発酵液をサンプリング口から毎回5 mL程度採取した。実験条件を表1および表2にまとめて示す。回分式実験(Run 1–Run 6)および連続式実験(Run 7)を行った。発酵温度は55°Cに制御し、pHは、5.5に制御した。Run 1は再現性の確認のため2回行った。(Run 1a および 1b)。基質はグルコースとし、Runにより乳酸およびNaClを最初から添加した。連続式実験では3日おきにリアクターから発酵液を2/3 L抜いた後に基質を2/3 L投入するという操作を行った。人工培地には、栄養源としてポリペプトン(和光純薬、一級)と Yeast extract

(日本製薬、D-3) を用い、グルコース濃度：ポリペプトン濃度：Yeast extract=10：1：1とした。あわせて、得られた実験結果を再現しうる数理モデルを構築した。阻害影響などの数式表現や係数を実験結果から求め、その妥当性を実験結果と比較して検証した。

表 1 回分式実験条件

Run		1a	1b	2	3	4	5	6
グルコース	(g/L)	10	10	10	10	50	50	100
乳酸	(g/L)	-	-	20	-	-	6	-
NaCl	(g/L)	-	-	-	20	-	-	-

表 2 連続式実験条件

Run		7a	7b	7c
経過日数	(h)	0-864	865-1512	1513-2088
基質のグルコース濃度	(g/d)	50	100	25
OLR	(g/(L·d))	11.1	22.2	5.55

2. 異なる微生物群集下での乳酸発酵および水素発酵

連続実験を、4.5 L の完全混合反応器を用いて行った。ウォーターバスにより 55°C を維持し、10 N NaOH の自動添加制御により pH を 6 に維持した ((株)日伸理化, NPH-660)。人工生ごみは、東京での調査結果に基づいて、14 種類の材料を混合して作成した。作成した人工生ごみは二倍に希釈して実験に用いた。一日一回、汚泥を引き抜き、基質を添加した。種汚泥は、本研究室にて数年間同じ基質で培養してきたメタン発酵汚泥を用いた。運転条件は表 3 に示すとおりである。

表 3 連続運転条件

		Run 1	Run 2	Run 3
期間	(d)	0-25	26-110	111-300
HRT	(d)	3.5	3.5	3.5
SRT	(d)	10.5	7	3.5
OLR	(gCODcr/(L-reactor·d))	43	43	43
pH	(-)	6	6	6

3. 植種汚泥が水素および有機酸発酵に及ぼす影響

表 4 に示す 3 種類の種汚泥 (X1、X2、および X3) を用いた。X1 は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。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 5 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、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 はそれぞれ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、それぞれ 72 時間の回分式培養を行った。pH 制御はより扱いやすい 2N KOH を

用いた。

表 4 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 5 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

表 6 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

4. 乳酸発酵および水素発酵の競合実験

競合実験回分式条件を表 6 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。「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。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。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の評価した。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。

・結果と考察

1. グルコースを基質とした乳酸発酵

Run 1a では、培養開始 4 時間後から RNA 遺伝子濃度および乳酸濃度が急速に増加し始め、同時にグルコース濃度が減少し始めた。RNA 遺伝子濃度の増加は 7 時間後に停止し、それ以降は、 1×10^{11} copies/L 程度を維持した。それに対して、乳酸濃度は 10 時間後まで増加し、グルコース濃度がほぼ 0 になった時点で停止した。最終乳酸濃度は 8.6 g/L であり、発酵中の光学純度(OP)はほぼ 100%であった。他の Run も含めた、実験結果のまとめを表 7 に示す。Run 1a および Run 1b でほぼ同じ結果が得られたので、本実験の再現性が確認できた。Run 1 および Run 2 を比較すると、最初に 20 g/L の乳酸を添加した場合には、乳酸生成が遅延していることが分かる。Run 1 および Run 4 では、初期グルコース濃度がそれぞれ 10 g/L および 50 g/L であり、乳酸生成開始時間およびグルコースからの乳酸転換率はほぼ同じである。しかしながら、Run 6 で初期グルコース濃度が 100 g/L の場合は、最終乳酸濃度が 52 g/L であり、一部のグルコースが残存した。Run 4 と比較して、乳酸生成開始も遅延していた。Run 3 では、NaCl を 20 g/L 最初に添加しており、Run 1 と比較して最終乳酸濃度は同程度であったものの、乳酸生成開始が遅延した。OP はいずれの場合も 98.3%以上であった。

表 7 Run 1~6 の結果

Run		1a	1b	2	3	4	5	6
発酵開始時間	(h)	6	6	20	11	6	7	9
最終乳酸濃度	(g/L)	8.6	9.3	29	9.3	45	48	52
乳酸転換率	(-)	0.86	0.93	0.74	0.89	0.90	0.84	0.52
OP	(%)	100	100	100	100	100	100	98.3

Run 1~ Run 6 での発酵実験結果および数理モデルによる計算結果を図 1 に示す。ここでは、real-time PCR による測定値を、実験値に基づく割合として 6.47×10^{10} copies/gCOD-バイオマスをを用いて COD 値に換算した。それぞれの Run で、グルコースの消費および乳酸生成について、実験結果および数理モデルによる計算結果がおおむね一致していた。Run 2 での乳酸阻害、Run 3 での NaCl 阻害、Run 6 での基質および最大乳酸濃度による阻害が再現された。指数関数的な微生物の増加や自己分解も再現できた。本研究では、発酵開始時の遅滞相は考慮せずに、実測の RNA 遺伝子濃度を初期値として入力した。そのため、微生物濃度の増殖の計算結果が、実測値より早い場合もあった。しかし、すべての Run の範囲で、グルコース消費、乳酸生成および微生物の増殖が同時に計算できた。これらの結果により、開発し

た数理モデルや、real-time PCR による測定が適用可能であることが示された。

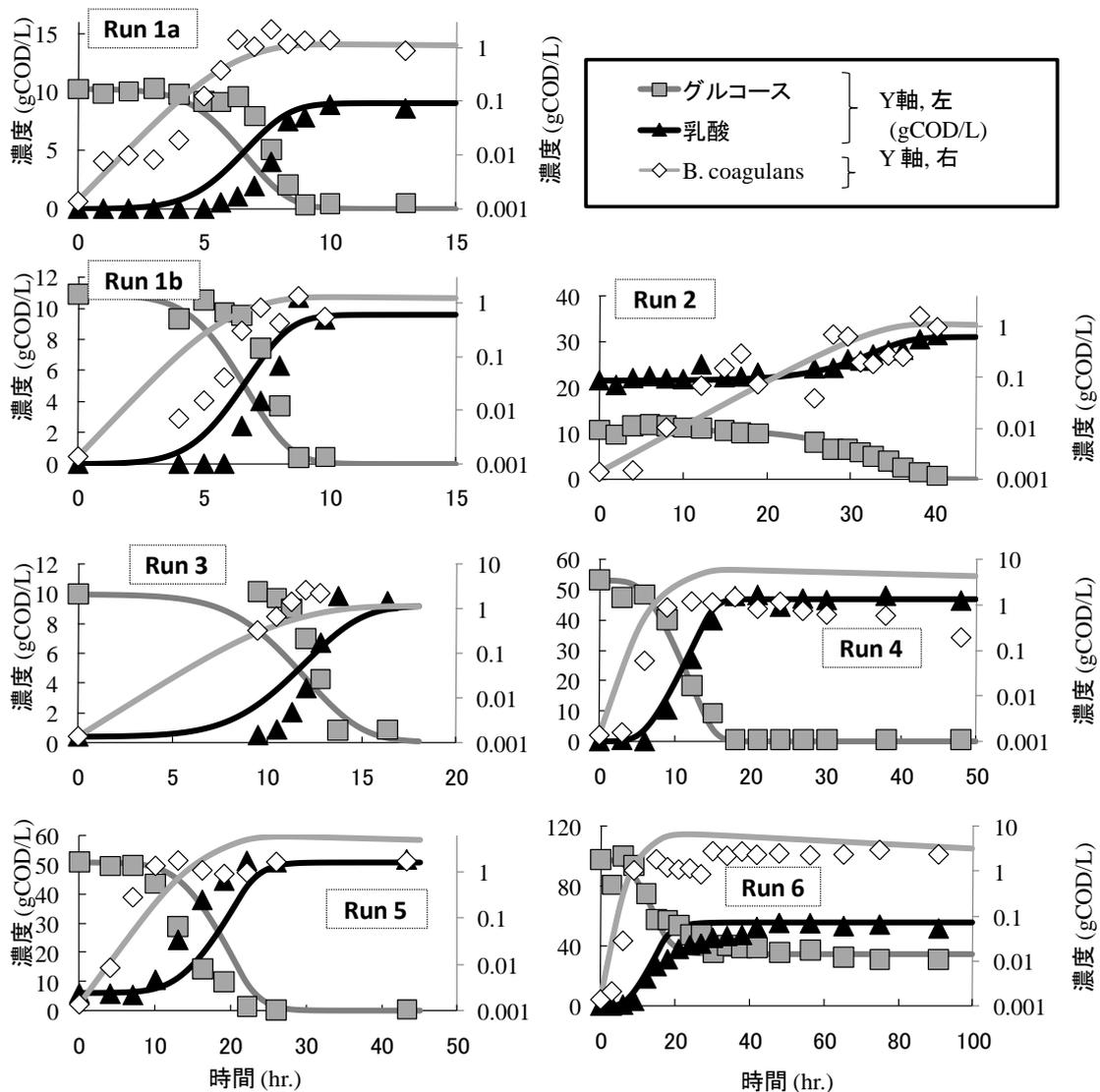


図 1 発酵実験結果および数理モデルによる計算結果

連続実験 (Run 7) でも運転は安定して行えた。OLR が増加すると、16S rRNA 遺伝子濃度と濁度がともに増加するという相関関係が見られる。これらの結果により、連続式運転において、異なる OLR における比較をする際には、16S rRNA 遺伝子濃度が菌体量把握の指標として有用であると判断できる。生ごみなどを基質とする場合でも、菌体量を把握する指標として活用できると考えられる。

2. 異なる微生物群集下での乳酸発酵および水素発酵

連続運転での生成ガスの成分は主として二酸化炭素および水素であり、メタンは検出されなかった。酢酸、プロピオン酸および吉草酸濃度はおおむね 5 gCOD/L 以下であり、生成した有機酸は主として酪酸および乳酸であった。有機酸組成は、特に酪酸および乳酸が劇的に変化した。酪酸発酵は Run 1 の長い SRT 条件下で進行し、SRT を短くするに従い Run 3 では乳酸生成が増加し、酪酸および水素生成は低下した。微生物群集の解析結果を表 8 にまとめて示す。ほとんどの OTU は、*Firmicutes* に属しており、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* および *Thermotogae* に属する OTU も検出された。Run 1 で

は 78% の OTU が *Clostridium* spp. に近縁で、平均相同性は 97% であった。Run 2 では、約半分の OTU が *Bacillus* spp. に近縁であったものの、*B. coagulans* には近縁でなく、残り半分の OTU は、*Clostridium* spp. に近縁であった。Run 3 では、ほとんどの OTU が、*B. coagulans* に近縁で、平均相同性は 99% であった。*Lactobacillus* spp. に近縁で平均相同性 99% の OTU も *Firmicutes* の中で検出されたものの、その割合は低かった。Run 1 から Run 3 にかけて、微生物群集は *Clostridium* spp. から *Bacillus* spp.、特に *B. coagulans* に変化した。

表 8 微生物群集の解析結果

Phylum	Order	Genus	Average similarity	day								
				Run 1	Run 2			Run 3				
Number of clone analyzed				25	45	67	82	103	124	153	180	219
				91	94	93	93	92	104	95	93	94
<i>Actinobacteria</i>								1			1	
<i>Bacteroidetes</i>											1	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	99%	3			1		93	89	88	69
		<i>Bacillus</i> spp.	99%	10	50		34	82		1	3	9
		[others]					3					1
	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium</i> spp.	97%	78	37	91	42	12			1	19
		<i>Thermoanaerobacterium</i> spp.	100%								1	
		[others]		1	4	2	13	2				
	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	99%	4	4	4			1	7		1
		[others]				1	2			2	2	1
<i>Proteobacteria</i>					1		2	3	1		2	
<i>Thermotogae</i>									4			
Uncertain				3	3	1	2		1			

乳酸および酪酸、ならびにランダムクローニング法による *B. coagulans* および *Clostridium* spp. の割合の経時変化を図 2 にまとめて示す。酪酸から乳酸への生成物の変化および *Clostridium* spp. から *B. coagulans* への菌相変化が同時に見られる。乳酸濃度が増加すると酪酸濃度が低下し、酢酸やプロピオン酸など他の有機酸濃度はそれほど変化していない。

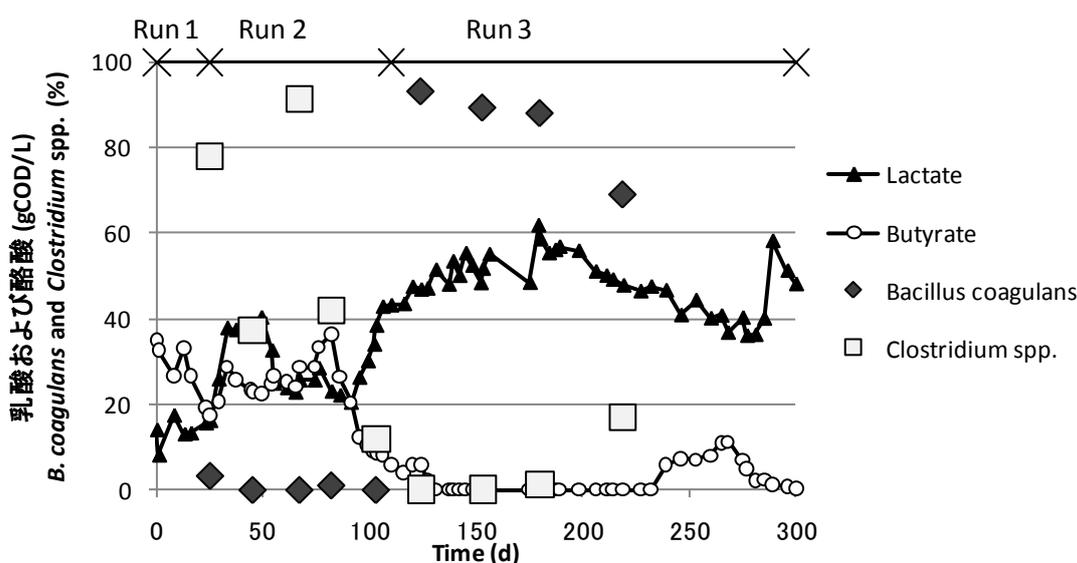


図 2 乳酸および酪酸、ならびにランダムクローニング法による *B. coagulans* および *Clostridium* spp. の割合の経時変化を

全菌および *B. coagulans* の 16S rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR 法による測定も行った。全菌については、おおむね 10^{12} copies/L 程度で一定しており、*B. coagulans* については、 10^8 – 10^{11} copies/L の範囲で

変動していた。ランダムクローニング法およびリアルタイム PCR 法により測定した *B. coagulans* の割合の関係を図 3 に示す。明確な関係が示されており、 $R^2=0.9$ であり、この関係によりいずれの方法でも *B. coagulans* の優占を把握できることが示されている。ランダムクローニング法による *Bacillus* spp. の割合と、リアルタイム PCR 法による *B. coagulans* の割合の関係もあわせて示している。こちらは $R^2=0.5$ で先ほどよりも低く明確な関係は得られておらず、このプライマーが *B. coagulans* を特異的に検出できることを示している。

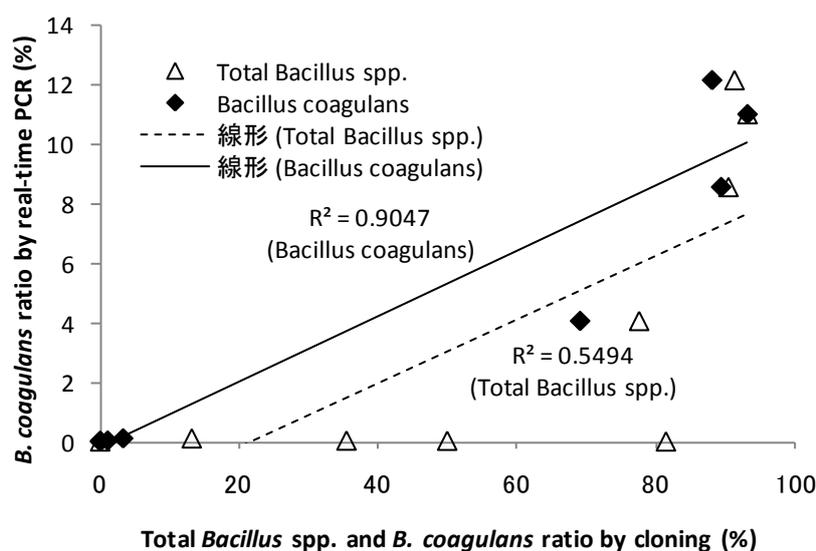


図3 ランダムクローニング法およびリアルタイム PCR 法により測定した *B. coagulans* の割合の関係

炭水化物からの高温水素発酵の研究は多数報告されている。生ごみやその他の炭水化物を多く含む有機性廃棄物からの高温水素発酵について、典型的な最適運転条件は、pH 5-6 程度である。乳酸生成による水素発酵の失敗も、高負荷条件下で報告されている。本研究では実験期間中、基質、HRT、OLR、および固形性 COD 濃度は同じだったが SRT のみが異なっていた。実用化時の水素発酵では、廃棄物に含まれる *B. coagulans* による水素生成の失敗の危険性がある。乳酸発酵過程で生成される抗菌物質も水素発酵を阻害し、これが *B. coagulans* の優占につながっている可能性もある。基質に *B. coagulans* が含まれている可能性があるものの、連続的な水素生成が維持されている研究例では、*B. coagulans* 以外の菌群を含む汚泥返送や植種汚泥が、*B. coagulans* の増殖を防いでいる可能性が考えられる。HRT よりも長い SRT というのは、一種の汚泥返送であり、これが *Clostridium* spp. の維持に寄与していると考えられる。

これらにより、水素発酵や酸発酵における微生物群集の重要性が示され、リアルタイム PCR 法の適用性も実証された。リアルタイム PCR 法は、ランダムクローニング法に比べて、費用や時間の面で有利である。回分式実験では、遅滞相、対数増殖相、死滅相などの増殖段階によって遺伝子の挙動が異なる可能性があるものの、本研究のように連続的に運転されている反応器ではこうした影響が緩和され、リアルタイム PCR 法が適用できたものと考えられる。

3. 植種汚泥が水素および有機酸発酵に及ぼす影響

Run A1 で、水素は最終的に約 300mL 生成した。Run A2 は、水素の生成量は最も多く、最終的に約 560mL

生成した。Run A3 で、水素は最終的に約 340mL 生成した。Run A4 で、蟻酸や酢酸が生成したものの、水素は生成しなかった。菌相解析もあわせて行った。種汚泥 X2 を用いた Run A2 では、*Bacillus* spp. が 27% 検出されたものの、*B. 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、*B. 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、*B. 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。

4. 乳酸発酵および水素発酵の競合実験

各影響因子についての結果を図 4 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。

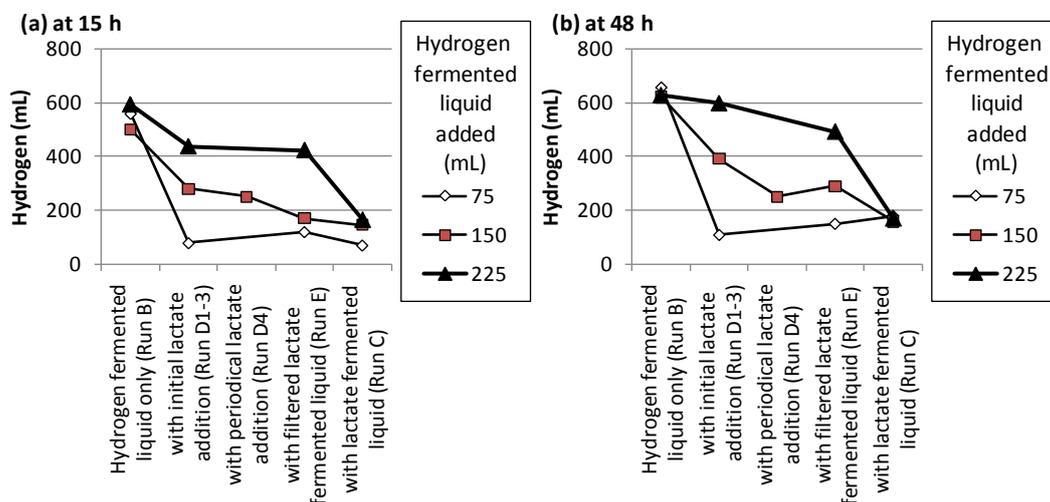


図 4 各影響因子についての水素生成結果

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、1 で開発した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。シミュレーション結果と実測値との比較例を図 5 に示す。Sg はグルコース、L は乳酸、Sbu は酪酸、Sac は酢酸を表し、線は計算値、点は実験値を表す。なお、Run D では *B.coagulans* の 0.001 gCOD/L の混入を仮定した。実測値と計算結果の適合はおおむね見られると判断でき、Run C ~ Run E においては水素生成の阻害が再現された。世界水協会の ADM1 モデル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。

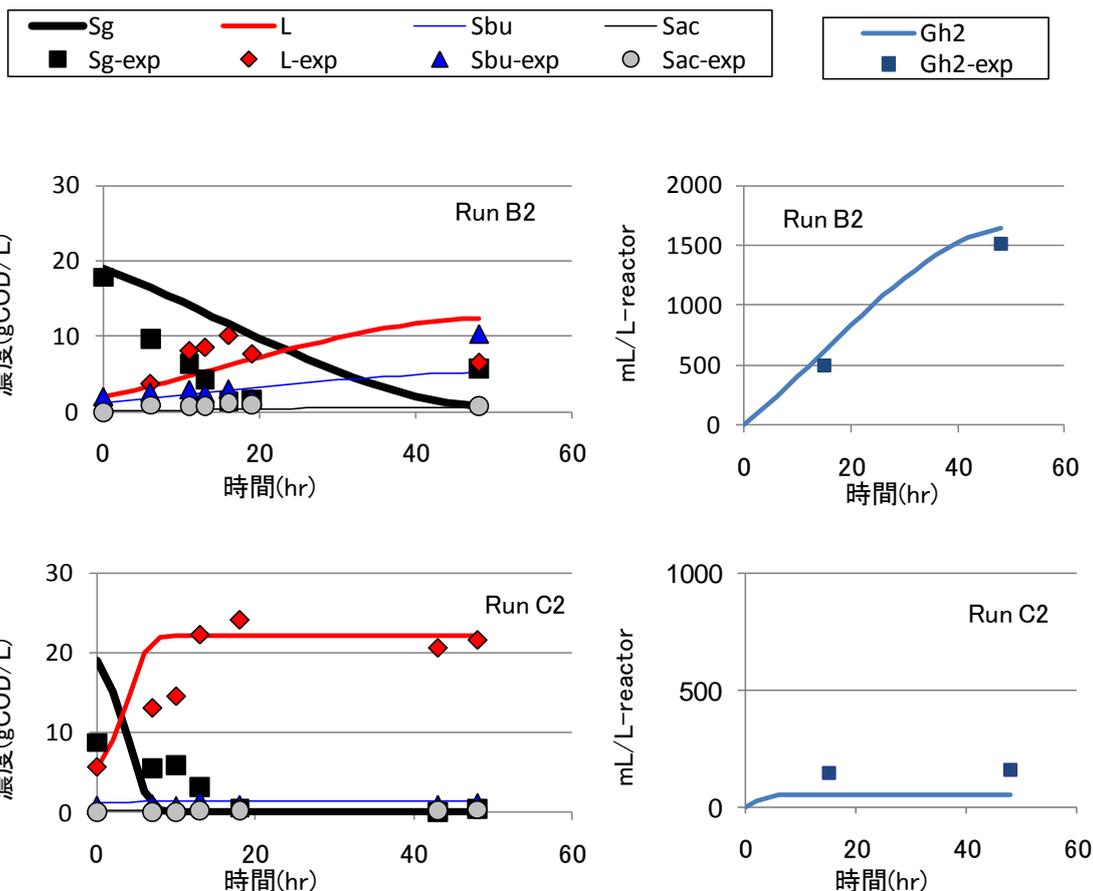


図5 水素発酵におけるシミュレーション結果と実測値との比較例

・結論＝グルコースを基質とした回分式L-乳酸発酵実験では乳酸やグルコースの阻害影響などを把握でき、それを元に構築した数理モデルでは、グルコース消費、乳酸生成および微生物の増殖が同時に計算できた。連続式実験では、OLRが増加すると、16S rRNA 遺伝子濃度と濁度がともに増加するという相関関係が見られ、異なるOLRにおける比較をする際に16S rRNA 遺伝子濃度が菌体量把握の指標として有用であると判断できた。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。人工生ごみを基質として、SRTを変化させた連続酸発酵運転を行った。その結果、SRTを短くするにつれて、酪酸から乳酸への生成物の変化および*Clostridium spp.* から*B. coagulans*への菌相変化が同時に見られた。微生物群集の変化を把握する上で、ランダムクローニング法に比べて、費用や時間の面で有利であるリアルタイムPCR法の適用性が実証された。また、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。本研究では、グルコースおよび人工生ごみからの乳酸発酵および水素発酵を中心に、発酵特性および発酵に関わる微生物群集との関係について、基礎的な知見が示された。実際の現場では、生ごみなど雑多な廃棄物を対象とすることになり、従来の方法では反応に関わる微生物の把握が難しい。本研究で得られた微生物群集の測定技術を今後実廃棄物に適用することで、より精密なモデル開発を行え、従来経験や勘に頼ってきた運転について、より反応機構に基づいた議論が可能になることが期待できる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、汚泥をご提供いただきました実処理施設の関係各位に、深く感謝の意を表します。

英語概要

- ・ 研究課題名 = 「Reaction mechanism analysis of recycling technology for organic wastes by anaerobic digestion」
- ・ 研究代表者名及び所属 = Taira HIDAHA (Kyoto University)
- ・ 共同研究名及び所属 = Fumitake NISHIMURA (Kyoto University) (2010 only)
- ・ 要旨 (200 語以内) = Basic fermentation experiments of lactate fermentation by *Bacillus coagulans* were performed to derive fundamental parameters of growth rate and inhibition effects. Microbial concentration was measured using both real-time polymerase chain reaction (PCR) and traditional methods. *B. coagulans* concentrations were suitably measured using real-time PCR. Three kinds of seed sludge were used for batch experiments under the same condition. When the sludge from a fermenter treating livestock and food waste was used, produced hydrogen quantity was the highest. A continuous thermophilic acid fermentation experiment was performed using kitchen garbage. Hydrogen fermentation occurred under the longer solids retention time (SRT) condition, and when SRT was set at shorter, lactate production increased. Simultaneously, microbial composition change from *Clostridium* spp. to *Bacillus coagulans* was observed. Applicability of real-time PCR quantification to monitor change in *B. coagulans* in kitchen garbage fermentation was verified. Competition between hydrogen producing bacteria and lactate producing bacteria was evaluated using batch experiments. A mathematical model including hydrogen and lactate producing bacteria and effect of inhibition was developed and it was verified with the experimental results. These results are useful for evaluating more complex acid fermentations.
- ・ キーワード (5 語以内) = anaerobic digestion, lactate, hydrogen, real-time PCR, mathematical model