3-29

消化工程における効率的酸生成菌株の分離培養

○日大生産工　木科　大介　　日大生産工　大木　宜章
日大生産工　高橋　岩仁　　日大生産工　関根　宏

１．序文

メタン発酵は，有機性廃棄物（下水汚泥や生ごみ等）を嫌気性細菌の活動により分解しメタン（CH_4）を生産する生物化学変換技術の一つである。近年，化石燃料に起因する地球温暖化，また生活レベルの向上に伴う廃棄物量の増加等の環境問題が深刻化するなか，メタン発酵によるバイオマス資源の積極的なエネルギー化は資源循環型社会に即した新エネルギーとして注目されている。しかし，各家庭や施設等から排出される生ごみは他の可燃ごみと区別されずに扱われており，資源として回収しようとすればコストの上昇がまぬがれない。そこで，本研究は小規模コミュニティー（施設，家庭等）において排出される生ごみを発生現場でエネルギー化するメタン発酵システムの構築を図るものである。

このメタン発酵の有機物分解過程は，大きく酸生成とメタン生成の2段階に分けられる。先ず，高分子有機物である炭水化物，タンパク質，脂質等は加水分解によって単糖類やアミノ酸といった構成単位にまで分解された後，酸生成菌により高級脂肪酸およびエタノール等の中間物を生成する。その後，中間物は酢酸生成菌により低級脂肪酸に変換され，メタン生成古細菌によりCH_4およびCO_2へと変換される。ここで，各過程は複合微生物系によるものであり，多様な細菌群が競合により複数の分解経路を経由しガス化する。なかでも，酸生成過程における細菌群の生態バランスは生成する中間物の割合を変化し，これがメタン生成過程における分解経路を決定する。これまでの研究では，2段階メタン発酵の1段階目である消化工程から酸生成菌株を分離培養し，分離菌株の増殖能力および代謝による有機酸生成特性から有用菌株（*Clostridium bifermentans*）の特定を行った。しかし，有用菌株の導入による2段階メタン発酵システムの稼動実験においては，有用菌株による効率化が図られなかった。この要因として，培養条件とメタン発酵システムの環境が異なり有用菌株の持つ代謝能力が見られなかったといえる。

そこで本研究は，2段階メタン発酵システムの消化工程における効率的酸生成菌株の特定を目的とした。このため，模擬生ごみと成分を合わせた生ごみ培地を作製し，菌株の分離培養を行なった。さらに，分離培養により得られた各菌株を純培養し，消化工程(pH4)の環境下における増殖能力および代謝による有機酸生成特性の比較から，効率的酸生成菌の特定を行った。

２．実験概略

2段階メタン発酵システム概略を図-1に示す。本研究のメタン発酵システムは家庭より排出される生ごみからのエネルギー化を目的としたものである。投入試料は実際の生ごみに成分

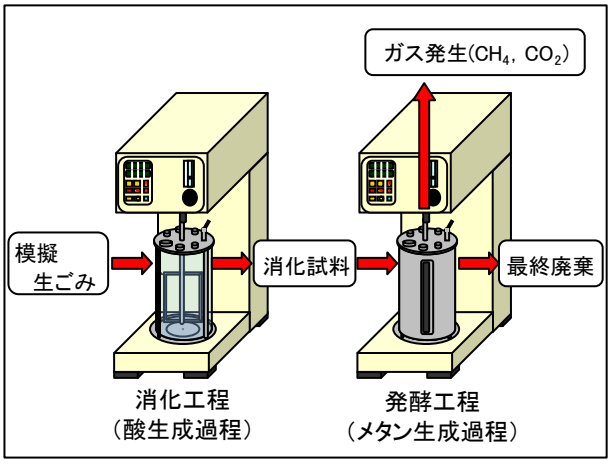


図-1　２段階メタン発酵システム概略図

Study on Isolation Culture of Effective Acid Producing Bacteria
In a Digestion Process.
Daisuke KISHINA, Takaaki OHKI, Iwahito TAKAHASHI and Hiroshi SEKINE

を調整した模擬生ごみを使用した。なお，本装置は消化工程と発酵工程で装置を分ける2段階メタン発酵となっている。表-1に2段階メタン発酵システムの稼動状態を示す。本実験は，酸生成菌が多く生息している消化工程の種汚泥を分離培養の試料とした。

分離培養に使用した培地は，模擬生ごみと成分を合わせた生ごみ培地(pH4，7)およびGAMブイヨン培地(pH4)とした。表-2に使用した培地組成を示す。これらの培地は炭水化物，タンパク質および脂質といった有機物を主成分としており，酸生成菌の増殖を図るのに適した培地である。なお，培地は2%寒天によりシャーレに固定化し，これを寒天プレート培地として使用した。分離培養の手順として，まず試料を寒天プレート培地に塗布し， 36℃で3，4日間培養した。なお，培養は通性好気および通性嫌気の2方法で行った。次に，コロニーの形態的特徴から菌株を選別し分離培養を行った。この作業を3～4回繰り返し，菌株を分離した。分離した菌株は，光学顕微鏡（KEYENCE社製）によりコロニーおよび菌形の観察をした後，高層培地およびスラント培地で保存した。

分離培養により得られた菌株は，増殖能力および有機酸生成特性を比較検討すべくバッチ実験を行った。バッチ実験には消化工程を想定し，生ごみ液体培地(pH4)を用いた。測定は，各菌株の継代時を0時間目として，適時培養液をサンプリングし，分光光度計により吸光度およびHPLCにより有機酸濃度の測定を行った。

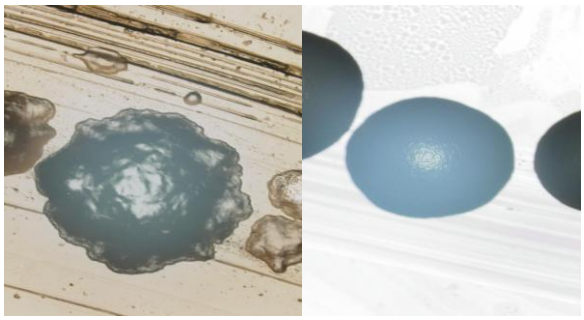
表-1　2段階メタン発酵システムの稼動状態

	消化工程	発酵工程
有効容量　(L)	4.0	6.0
発酵温度　(℃)	36	36
HRT　(days)	20	40
TVS負荷量　(g/L/day)	3.8	1.5
TVS減少率　(%)	24.3±0.2	75.1±0.3
pH　(ー)	3.86±0.05	7.53±0.13
ORP　(mV)	0±20	350±50
有機酸濃度　(mg/L)	7500±1200	750±690
ガス発生量 (ml/g-TVS)	ー	399±59

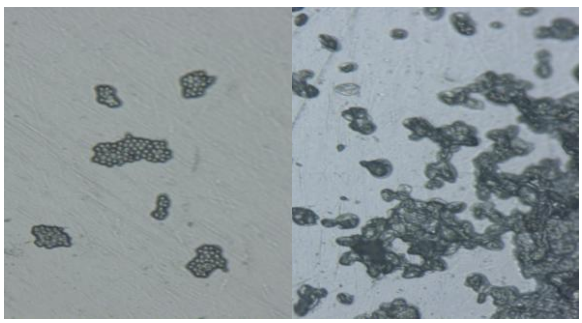
表-2　使用した培地組成

GAMブイヨン培地(g/L)	
Pepton	10
大豆 Pepton	3
プテオースPepton	10
消化血清末	13
Yeast extract	5
Meat extract	2.2
肝臓エキス末	1.2
グルコース	3
リン酸二水素ナトリウム	2.5
NaCl	3
可溶性でんぷん	5
L-システイン塩酸塩	0.3
チオグリコール酸ナトリウム	0.3

生ごみ培地(g/L)	
グルコース	24.9
ペプトン	10.7
脂肪酸グリセリンエステル	3.16



コロニーの形状



菌の形状

写真-1　コロニーおよび菌形の顕微鏡写真

3．実験結果および検討

消化工程における種汚泥を試料とし培養を行なったところ，培養 4 日目には培地表面に菌が増殖しコロニーの形成が確認できた。

写真-1 に分離培養後のコロニーおよび菌形の顕微鏡写真を示す。光学顕微鏡による各菌株の観察結果より，培養条件によりコロニーおよび菌形の偏りはみられなかった。表に示すとおり，コロニーの形態的特徴は様々なものがみられた光沢があり球体のおよび菌形は大きく 2 種

類のものがみられたが，菌形は写真に示した 2 通りが主であった。形態的特徴として，コロニーは白色，淡黄色および茶色等であり透明性のあるものが確認できた。形状も辺縁，断面，大きさ等に個体差があり，分離培養前の段階では複数種の菌株の存在が確認できた。そこで，コロニーの形態的特徴から菌株を選別し，分離培養を行なった。

分離培養の結果，本実験では計 38 の菌株を分離した。培養条件別にみると，最も多く分離したのは GAM ブイヨン(pH4)培地で 21 株，次に生ごみ(pH7)培地で 10 株，生ごみ(pH4)培地で 9 株となった。なお，pH4 の培地において，嫌気での培養は好気に比し分離菌株が得られない傾向を示した。特に，生ごみ(pH4)培地での嫌気培養は，初期段階の増殖はみられたものの，継代することにより分離数は減り，最終的に培養ができなくなり，分離株を得ることができなかった。したがって，これら 38 株の分離菌および *C.bifermentans* を試験菌株としてバッチ実験を行った。

図-2 にバッチ実験における分離菌株の増殖度合の経時変化を示す。なお，バッチ実験は分離培養で得られた 38 株およびを用いたが，グラフには増殖がみられた菌株および *C.bifermentans* を示している。また，吸光度は透過率の逆数を対数で示した値である。したがって，吸光度の上昇は培養により菌株が増殖していることを示している。バッチ実験の結果，38 の菌株中で増殖がみられたのは 12 株(No.19, 22，24，25，28，31，33，34，35，36，37，38)であった。ここで，表-3 にバッチ実験により増殖がみられた分離菌株の培養条件および形態的特徴を示す。今回の条件で増殖がみられた菌株は生ごみ培地で分離培養されたものが多く，GAM 培地で培養したものは No.19 の 1 株であった。また，生ごみ(pH7)培地で分離培養した菌株にも増殖がみられたことから，酸生成菌は pH の変化に対する対応能力を持っていることが分かる。なお，*C.bifermentans* はこれまでの実験で最も増殖能力および代謝能力に優れた菌株であるが，今回行った pH4 の環境下では増殖がみられなかった。

グラフより，pH4 の環境下における増殖能力は各菌株により差異が生じた。増殖期への移行が最も早かった菌株は No.24 であった。No.24 は培養 12 時間後には増殖がみられ，72 時間目にピークとなった。他の菌株は平均的に 48 時間目に増殖期へ移行し，培養 120 時間目においても増殖は続いた。また，No.37 は最も遅く 72 時間目に移行がみられた。

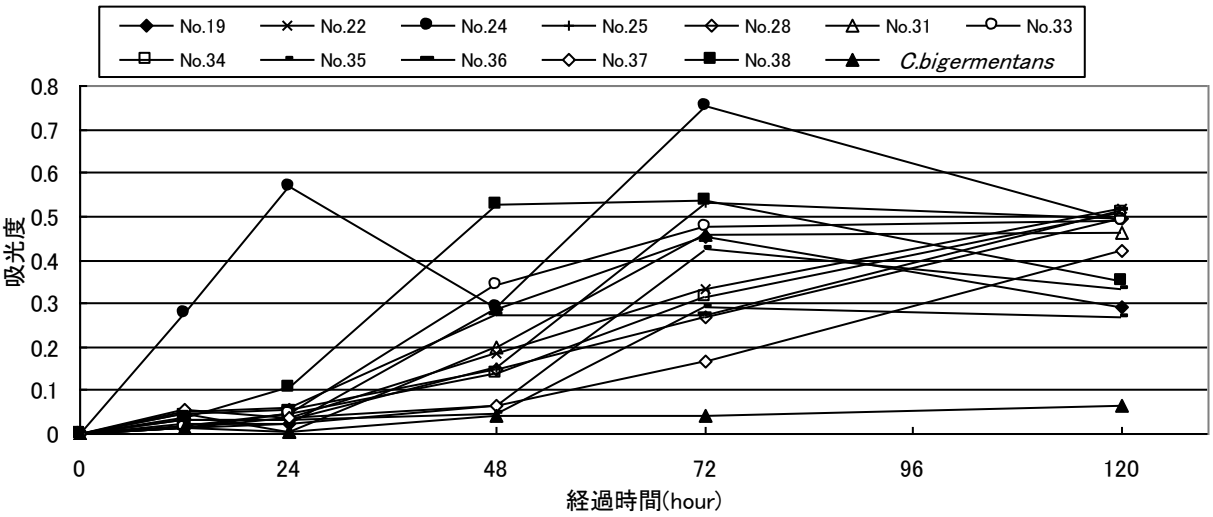


図-2　バッチ実験による分離菌株の増殖度合の経時変化

表-3　バッチ実験により増殖のみられた分離菌株の培養条件および形態的特徴

分離No.	培養条件			コロニーの形態的特徴							菌の形態的特徴	
	培地	pH	好気・嫌気	大きさ	色	透明性	辺縁	光沢	断面	芯	大きさ	形状
19	GAM	4	嫌気	極小	淡黄茶	無	波状	無	平面	無	小	球
22	生ごみ	7	好気	中	淡黄	無	なめらか	有	凸状	無	大	球
23				大	淡黄茶	無	波状	無	凸状	無	大	長球
24				小	淡黄	無	なめらか	有	平面	無	小	球
25				小	淡黄	無	なめらか	有	凸状	無	小	球
28			嫌気	極小	茶	有	葉状	無	平面	無	小	球
31				極小	茶	有	葉状	無	平面	無	大	球
33		4	好気	小	淡黄茶	無	波状	有	平面	無	小	球
34				小	淡黄茶	無	波状	無	凸状	無	小	球
35				小	淡黄茶	無	なめらか	有	凸状	無	大	球
36				小	淡黄茶	無	なめらか	無	凸状	無	大	球
37				極小	茶	無	なめらか	無	平面	無	小	球
38				小	淡黄茶	無	なめらか	無	凸状	無	小	球

表-4　バッチ実験による分離菌株培養 120 時間後の有機酸濃度

	No.19	No.22	No.24	No.25	No.28	No.31	No.33	No.34	No.35	No.36	No.37	No.38
コハク酸	0.00	1.74	3.90	0.67	0.12	0.57	3.90	0.68	0.67	0.43	0.12	0.94
乳酸	3.83	4.28	0.00	3.36	4.23	1.83	0.00	2.06	1.94	2.41	1.21	2.45
酢酸	2.97	7.31	5.86	7.11	8.98	5.71	5.86	4.57	7.11	4.11	3.50	5.71
プロピオン酸	4.40	2.10	1.65	0.82	3.12	0.99	1.65	1.22	0.82	0.64	0.35	1.72
酪酸	1.08	0.78	0.34	0.09	0.58	0.58	0.34	0.47	0.09	0.13	0.20	0.26
総量	12.28	16.21	11.75	12.05	17.03	9.68	11.75	9.00	10.63	7.72	5.38	11.08

（mmol/L）

表-4に分離菌培養120時間後の有機酸濃度を示す。なお，消化工程は有機酸を生成する過程であり，ここでは有機酸生成量の多い菌株が有用であるといえる。表より，各菌株の有機酸の生成量および生成割合には差異がみられた。特に，No.28の菌株は17.03mmol/Lと他の菌株に比し最も高い値であった。また，生成された有機酸種はコハク酸，乳酸，酢酸プロピオン酸，酪酸が挙げられるが，酢酸が52%と最も高い割合であった。酢酸は有機酸の中でも低分子であり，発酵工程において分解し易いとされている。一方，増殖能力に優れたNo.24の有機酸生成量は11.75mmol/Lと平均的なものであった。

以上，バッチ実験による増殖能力および代謝による有機酸生成能力の検討から，分離No.24およびNo.28の菌株が増殖能力および有機酸生成能力と生成特性において他の菌株に比し優れていることから，消化工程における効率的有用菌株となり得ることが確認された。

4．まとめ

本研究は，2 段階メタン発酵の効率化を目的とし，消化工程より酸生成菌の分離培養を行った。さらに，得られた分離菌株を用いて，バッチ実験により増殖能力および代謝による有機酸生成特性の比較検討を行った。得られた知見を以下に示す。

1)分離培養の結果，培地の組成および形態的特徴から異なる 39 株の分離菌株が得られた。

2)得られた 39 株の分離菌株と *C.bifermentans* を用いて消化工程と同様の環境下によりバッチ実験を行ったところ，増殖能力および代謝能力には差異がみられた。このなかで，分離 No.24 および No.28 の菌株は増殖能力および代謝能力に優れており，効率的有用菌となり得ることが確認された。