

有用菌株を用いた酸生成時の有機酸挙動

○NPO 法人環境文明 2 1 木科 大介
日大生産工 大木 宜章
日大生産工 高橋 岩仁

1. 序文

近年、化石燃料の大量使用による地球温暖化や人間活動による廃棄物の増加は深刻な環境問題となっている。これに対し、メタン発酵によるエネルギー生産は、下水汚泥や生ごみといった有機性廃棄物を利用することから、環境に負荷の少ない新エネルギーの一つとして期待されている。

メタン発酵によるエネルギー生産過程は、嫌気性細菌の分解作用により進行する。この分解過程は酸生成とメタン生成に大別される。先ず、酸生成過程では炭水化物、タンパク質、脂質などの有機物が単糖類やアミノ酸といった構成単位にまで加水分解された後、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、メタン生成過程では中間物が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 CH₄ および CO₂ へと変換される。ここで、各過程は多様な細菌群の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酸生成過程からの菌株の分離培養を行い、これにより得られた菌株の中から 2 株の有用菌株を特定した。

そこで本研究は、特定した 2 株の有用菌株を用い、純培養による各菌株の増殖能力および代謝による有機酸生成特性について検討した。さらに、各菌株は酸生成槽に導入し、バッチ実験により酸生成時の有機酸挙動の検討を行った。これにより、有用菌株の導入による酸生成過程の効率化について検討を行った。

2. 実験概要

2. 1 純培養による各菌株の増殖能力および代謝による有機酸生成の挙動

本研究で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(NG 培地)とした。表-1 に生ごみ培地の組成を示す。この培地は炭水化物、タンパク質および脂質といった有機物を主成分としている。なお、酸生成過程の条件に近づけるため、培地の pH は 4 とした。

先ず、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保存培地から有用菌株の継代を行った。写真-1 に寒天プレート培地を示す。なお、本実験で使用した菌株は、これまでの分離培養で得られた約 50 株

表-1 生ごみ培地の組成

成分	使用試薬	使用量 (g/L)
炭水化物	グルコース	24.90
タンパク質	ペプトン	10.68
脂質	脂肪酸グリセリンエステル	3.16



写真-1 寒天プレート培地

Study on the Organic Acid Behavior at the Time of the Acid Generation
by the Useful Bacterial Strain.

Daisuke KISHINA, Takaaki OHKI and Iwahito TAKAHASHI

の中から、酸生成過程の条件において最も増殖能力および有機酸生成能力に優れた2株を選定した。培養後、増殖したコロニーは単一であることを確認した後、白金針で釣菌し、これを試験菌株とした。

写真-2に純培養に使用した試験管培地を示す。純培養には酸生成過程を想定し、pHを4に調整した生ごみ液体培地(NG4培地)を使用した。測定は、有用菌株の継代時を0時間目とし、培養液を適時サンプリングした。サンプリングした培養液は、分光光度計により吸光度の測定および高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)により有機酸濃度の測定を行った。

2.2 各菌株の導入による酸生成過程の有機酸挙動

実験は図-1に示した装置を3基使用して行った。装置規模は有効容量を700mLとし、攪拌による発酵効率を上げるため、槽の中心に合門型の羽根を中心シャフトに取り付け、上部モーターにより攪拌できるようにした。また、下部からの加温により36度を保持した。槽内の種汚泥は、本実験で稼働している2段階メタン発酵装置の酸生成槽の汚泥を使用した。

有用菌株は装置の規模に合わせて大量培養を行なった。まず、各菌株はNG4液体培地(15mL)で培養した後、250mLメディウム瓶により培養した。これを各菌株2つずつ作製し、計500mLの培地容量を遠心分離機により固液分離し、集菌を行った。

投入試料は、一般家庭から廃棄される生ごみを想定した模擬生ごみとした。模擬生ごみの作成方法は、キャベツを破砕機によりスラリー状にし、有機分として試薬を添加し調整した。投入試料の性状を表-2に示す。

実験条件を表-3に示す。CASE1およびCASE2では、種汚泥400mLに有用菌株(No. A, No.B)を導入した。CASE3は基準として菌株を導入せず、通常酸生成槽400mLとした。実験はこれらの種汚泥400mLに投入試料300mLを混合し均一化した状態で行った。測定は、試料投入時を0時間目として、24時間おきに試料



写真-2 純培養に使用した試験管培地

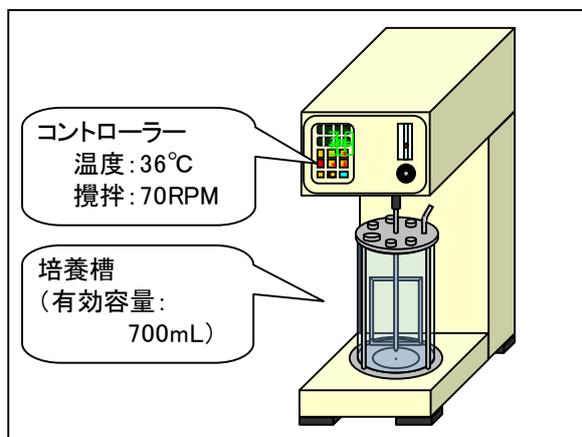


図-1 実験装置

表-2 投入試料性状

項目	測定値
間隙率 %	8.76
TSS (g/L)	85.12
TVS (g/L)	76.67
灰分 (g/L)	8.44
pH	7.2
糖類 (g/L)	55.4
セルロース (g/L)	6.9
タンパク質 (g/L)	26.7
脂質 (g/L)	7.9

表-3 実験条件

	CASE1	CASE2	CASE3
菌株の導入	有用菌株A	有用菌株B	基準(なし)
種汚泥量	400mL		
投入試料量	300mL		
温度	36°C		
攪拌	70RPM		

のサンプリングを行った。試料は pH 測定および HPLC により有機酸生成量と有機酸割合を測定し、各 CASE の比較検討を行った。

3. 実験結果および検討

3. 1 純培養による各菌株の増殖能力および代謝による酸生成の挙動

図-2 に純培養による有用菌株の増殖度合の経時変化を示す。なお、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。結果より、各菌株で増殖がみられた。純培養に使用した NG4 培地は酸生成過程と同様の条件である。したがって、各菌株は酸生成過程においても増殖できることを示している。また、各菌株は NG7 培地にでも増殖がみられたことから、pH の環境変化に耐性を持つ菌株であるといえる。なお、有用菌株 A は、培養 12 時間目には増殖がみられ、24 時間目以降は緩慢な変化を示した。これは、分離培養により得た 50 株の中で最も優れた値であった。これに対し、有用菌株 B は培養 48 時間目に増殖傾向を示し、120 時間目においても増殖を示した。

図-3 に培養 120 時間目における各菌株の有機酸生成量および有機酸割合を示す。酸生成過程では、有機酸生成量が高いほど、有用な菌株であるといえる。結果より、有用菌株 B の有機酸生成量は 1217mg/L を示し、有用菌株 A より高い値となった。また、有用菌株 B の有機酸割合は酢酸が 539mg/L(44.3%)と高い割合を示し、ついで乳酸が 381 mg/L (31.3%)であった。ここで酢酸はメタン生成過程においてガス化し易い有機酸である。このことから、有機酸生成量が多く、酢酸の割合が高い有用菌株 B は、酸生成過程に適した菌株であるといえる。これに対し、有用菌株 A の有機酸生成量は 965 mg/L となった。有機酸生成割合は、コハク酸が 461 mg/L (47.7%)と最も高く、ついで酢酸が 352mg/L (36.5%)を示した。また、有用菌株 B で生成された乳酸は有用菌株 A では生成されなかった。

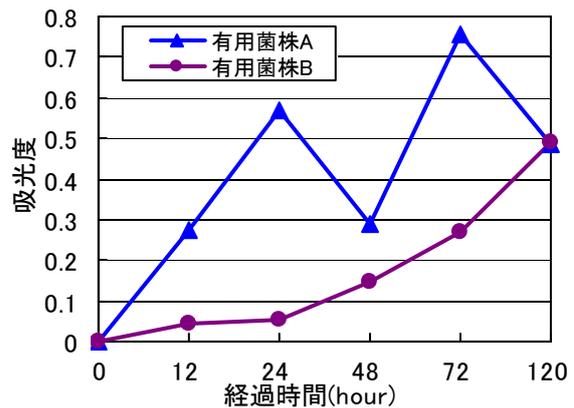


図-2 純培養による増殖度合

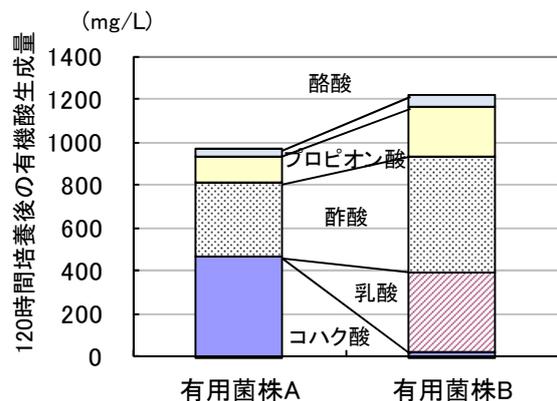


図-3 培養 120 時間目における有機酸生成量

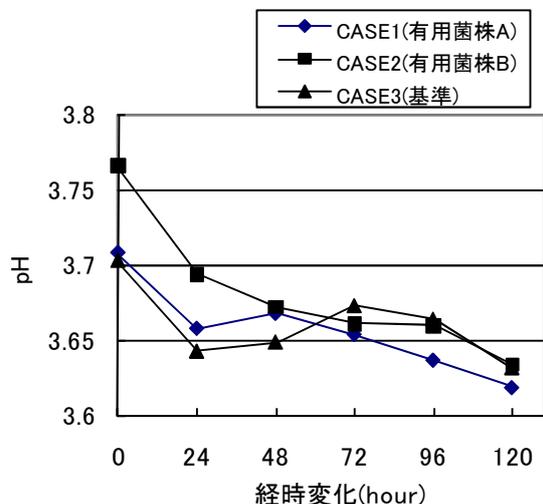


図-4 バッチ実験による pH の経時変化

3. 2 各菌株の導入による酸生成過程の有機酸挙動

図-4 にバッチ実験による pH の経時変化を示す。結果より、pH は各 CASE とも初期段階で急激に低下した。これは、各 CASE とも初期段階で急激な有機酸生成が行われたことを示している。その後、24 時間目以降は緩慢な低下を

示し、120 時間目には各 CASE とも約 3.63 を示した。

図-5 にバッチ実験による有機酸生成量の経時変化を示す。結果より、有機酸生成量は各 CASE で増加傾向を示したが、有機酸生成量および生成速度には差異がみられた。CASE1 (有用菌株 A) の有機酸生成量は初期段階より急激に増加し、24 時間目の段階で 3650mg/L と CASE3(基準)より高い増加を示した。その後、緩やかな増加傾向を示し、120 時間目の段階では 4670mg/L となった。CASE1 に導入した有用菌株 A は、図-2 に示したように、増殖能力に優れた菌株であることが分かっている。したがって、CASE1 における有機酸の増加から、有用菌株 A の導入効果がみられたと考えられる。CASE3 (有用菌株 B) の有機酸生成量は、初期段階において緩やかな変化を示した。その後、96 時間目から急激な増加を示し、120 時間目の段階で 3160mg/L となったが、CASE3 より低い値を示した。初期段階の緩やかな変化の要因として、図-2 に示したとおり、有用菌株 B は増殖の遅い菌株であるため、導入直後に効果がみられなかったものと考えられる。これは、96 時間目からの有機酸生成量の増加をみても有用菌株 B の増殖移行期と同じ傾向を示している。このことから、純培養時における菌株の増殖度合いと導入による有機酸挙動には同様の傾向を示すと考えられる。

図-6 にバッチ実験による有機酸生成割合を示す。結果より、有機酸の生成割合は各 CASE ともプロピオン酸が最も高く、次いで乳酸であった。ここで、乳酸の生成割合は、有用菌株を導入した CASE1 および CASE2 が基準の CASE3 に対し若干ながら低い値を示した。また、メタン生成過程において、分解効率が良いとされる酢酸の生成割合は、高い値を示した。これは、CASE3 がプロピオン酸および乳酸を主として生成するのに対し、CASE1 および CASE2 では主として酢酸を生成する有用菌株を導入したことによる効果がみられたと考えられる。

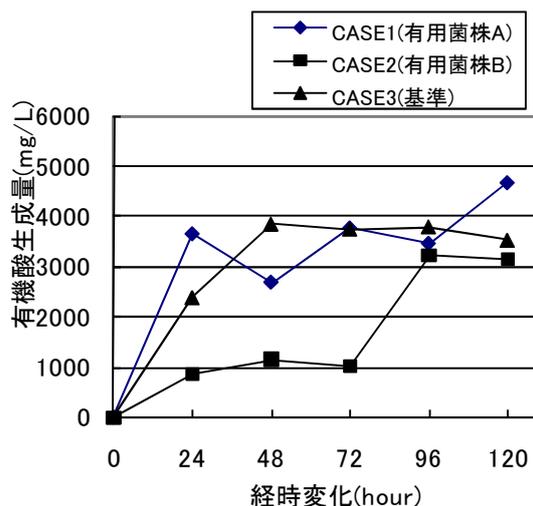


図-5 バッチ実験による有機酸生成量経時変化

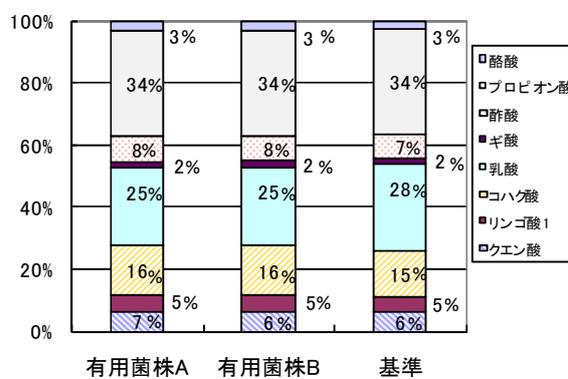


図-6 バッチ実験による有機酸生成割合

4. まとめ

本研究で得られた知見を以下に示す。

- 1) 純培養の結果から、有用菌株の増殖能力および有機酸生成特性について把握することができた。
- 2) 有用菌株の導入によるバッチ実験の結果から、有機酸の生成量および生成割合において、有用菌株の導入による効果がみられ、効率化につながる事が示唆された。

全体を通して実験結果を考察すると、有機酸の生成量および生成割合の変化は、純培養による結果から期待されるほど大きいものではなかった。これは、今後さらに培養を継続することにより導入した菌株が酸生成過程で馴致され、さらなる変化がみられると推測される。また、その結果として、酸生成過程に効果がみられなかった場合、有用菌株の効率的な導入方法について検討することが課題といえる。