

グルコース基質を用いた高温 L-乳酸発酵と水素発酵の競合に関する研究

京都大学 向阪悠佑, 八木春香, 日高平, 楠田育成, 西村文武, 津野洋

Competition between thermophilic L-lactate fermentation and hydrogen fermentation from glucose

Yusuke KOSAKA, Haruka YAGI, Taira HIDAKA, Yasunari KUSUDA, Fumitake NISHIMURA

and Hiroshi TSUNO

1. はじめに

近年、循環型社会の形成を目指し、バイオマスの有効利用が唱えられているが、その一つとして生ごみの利活用が注目されており、生ごみからの発酵法により、比較的容易に工学純度の高い L-乳酸が得られることが報告されている。赤尾ら^{1) 2)}は、非滅菌模擬生ごみから、糖化などの過程は経ずに直接高光学純度の L-乳酸を製造することに成功した。赤尾ら²⁾によると、pH5.5、温度 55℃は、有孢子乳酸菌 *Bacillus coagulans* が優占化し、植種を伴わずに非滅菌模擬生ごみから L-乳酸が生成する最適な条件とされている。一方で Chu ら³⁾、堆ら⁴⁾は pH5.5、温度 55℃という条件の下で、高温水素発酵に関する研究を行っている。今述べたように、水素発酵は高温 L-乳酸発酵と同じ温度と pH で行うことができるが、高温 L-乳酸発酵を行っている際、万が一水素が生成してしまうと、L-乳酸の収率が低下するばかりでなく、爆発事故につながる危険性もある。本研究では、半連続式実験において、*B.coagulans* と水素発酵菌の競合を評価すること、およびその競合に影響している因子を見つけ出すことを目的とした。この目的を達成するために、*B.coagulans* と水素発酵菌の両方を添加し、グルコース基質を用いた回分式実験を行った。

2. 実験方法

2.1 実験条件

各 Test において、リアクターとして容積 1L のガラス製反応器を用いた。温度の設定は、リアクターをウォーターバス(アズワン(株)、TM-1)に浸漬することにより行った。リアクターは密閉構造とし、リアクター内の気相部は培養開始時に窒素で置換し、また窒素ガスを入れたガスパックも装備し、サンプリング時においてもリアクター内を常に嫌気性に保持できるようにした。そして別途、発生した気体の捕集用として別の 2L のガスパックも装備した。本研究では、人工培地を基質とした回分式実験を行った。サンプリングは、発酵液をサンプリング口から毎回 5mL 程度採取した。また、TestA1 を除く全てで pH は 5.5 で温度は 55℃とし、培地はグルコース 25g/L、ポリペプトン 2.5g/L および Yeast Extract 2.5g/L を含む培地とした。TestA1 では、模擬生ごみのみを基質とした。

2.2 競合試験に用いる水素菌培養液の選定(TestA)

競合試験に用いる適切な水素菌発酵液を検討することを目的として TestA を行った。TestA で用いた種汚泥の性状を表 1 に示す。また、TestA の各条件を表 2 に示す。種汚泥として、京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻水環境工学研究室で作成されてきた模擬生ごみを基質として pH6.5、温度 55℃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(X1)、牛や豚の糞尿を基質として行われているメタン発酵の中温メタン発酵槽の畜産系汚泥(X2)、および家庭

生ごみを基質として行われている高温メタン発酵の発酵槽の培養液(X3)の3種類の植種材料を植種した。なお、模擬生ごみは、本研究室に置いて継続使用されているものである(洪ら、2004)。攪拌の都合から、作成した模擬生ごみを蒸留水で2倍希釈した生ごみ培地を、滅菌操作を行わずに利用した。

表1 TestA で用いた種汚泥の性質

種汚泥	基質	温度	pH(-)	TS (g/L)	スケール
X1	模擬生ごみ	高温	6.5	93.0	laboratory-scale
X2	livestock waste	中温	no control	43.9	full-scale
X3	生ごみ	高温	no control	57.4	full-scale

表2 TestA における各条件

Test	種汚泥 (mL)	基質	温度(°C)	pH(-)
A1	X1 (250)	模擬生ごみ	55	6.5
A2	X2 (300)	グルコース、ポリペプトン、Yeast Extract	55	5.5
A3	X3 (300)	グルコース、ポリペプトン、Yeast Extract	55	5.5
A4	X1 (250)	グルコース、ポリペプトン、Yeast Extract	55	5.5

2.3 乳酸発酵と水素発酵の競合(TestB-E)

TestB では、畜産系汚泥を用いた水素菌培養液の植種量による影響を調べるため、表3に示す3種類の量を植種した。TestC では、L-乳酸発酵と水素発酵の競合を調べるため、表3に示す割合でL-乳酸発酵液と畜産系汚泥を用いた水素菌培養液を添加した。TestD では、乳酸添加による水素発酵への影響を評価するため、TestC と同じ量の、畜産系汚泥を用いて作成した水素菌培養液に表に示す量の乳酸を添加した。TestE では、*B.coagulans*によって生産される抗菌物質の影響を調べるために、TestC と同じ量の、畜産系汚泥を用いて作成した水素菌培養液に、L-乳酸発酵液を遠心分離した後に、ろ過を行って作成した上澄み液を添加した。

表3 TestB-E における植種量および乳酸添加量(1/2)

Test	L-乳酸発酵液 (mL)	L-乳酸発酵液の 上澄み液(mL)	水素菌発酵液 (mL)	乳酸添加量(g/L)
B1	—	—	75	—
B2	—	—	150	—
B3	—	—	225	—
C1	225	—	75	(included) ^a
C2	150	—	150	(included) ^a
C3	75	—	225	(included) ^a

表3 TestB-Eにおける植種量および乳酸添加量(2/2)

Test	L-乳酸発酵液 (mL)	L-乳酸発酵液の 上澄み液(mL)	水素菌発酵液 (mL)	乳酸添加量(g/L)
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	(included) ^d
E2	—	150	150	(included) ^d
E3	—	75	225	(included) ^d

a L-乳酸発酵液に最初から含まれている

b 初期に添加

c 初期に 3.6g/L、11, 13, 16 時間後に 4g/L 加えた

d L-乳酸発酵液の上澄み液に最初から含まれている

3. 結果

3.1 競合試験に用いる水素菌培養液の選定(TestA)

種々の汚泥を用いた TestA の結果を表 4 に示す。表 4 より、pH5.5、温度 55℃の条件で水素が生成する TestA2 と TestA3 の 2 つの発酵液のうち、より水素の生成量の多かった畜産系汚泥を使用した発酵液(TestA2)が *B.coagulans* による高温 L-乳酸発酵との競合を見る実験に適していると判断した。

表4 TestA の実験結果

Test	乳酸(g/L)	光学純度(%)	水素 (mL)	蟻酸 (g/L)	水素+蟻酸 (mL)
A1	15.6	79.8	301	6.51	3800
A2	13.9	66.3	563	0.06	594
A3	17.9	85.5	344	0.06	375
A4	24.6	91.4	0	3.05	1621

3.2 乳酸発酵と水素発酵の競合(TestB-E)

TestB-E の結果を図 1 に示す。TestB では、畜産系汚泥を用いた水素菌培養液の植種量による影響を調べることを目的とした。図 1 に示されるように、水素菌培養液の植種量は、最終的な水素の生成量にはほとんど影響しないことがわかった。

次に、L-乳酸発酵と水素発酵の競合を調べることを目的とした TestC の結果を見ると、図 1 に示されるように、*B.coagulans* 培養液を添加することによって、水素の生成量は大きく低下することがわかる。しかし、TestC の結果だけでは、水素生成量の低下は、*B.coagulans* が高温 L-乳酸発酵に基質を消費したことによる基質の不足によるものなのか、乳酸の影響によるものなのか、*B.coagulans* によって生産される抗菌物質の影響によるものなのかを判断することはできない。

次に、初期に乳酸を添加した TestD の結果を見ると、TestB の水素菌培養液のみを添加した場合と比べ、水素の生成量は減少しているが、*B.coagulans* 培養液を添加した TestC より水素の生成量は

多くなっているのに、*B.coagulans* 培養液を添加したことによる水素生成量の低下は初期乳酸の影響によるものだけではないと判断される。また、高温 L-乳酸発酵によって各時刻において生成される乳酸による影響を調べるため、乳酸を経時的に添加した TestD4 では、図 1 に示されるように、発酵開始 15 時間後以降水素の生成は止まっており、乳酸 3.6g を初期にのみ添加した TestD2 と比べ、最終生成量も少ない。

次に、*B.coagulans* によって生産される抗菌物質の影響を調べるために、L-乳酸発酵液を遠心分離した後、ろ過を行って作成した上澄み液を初期に添加した TestE の結果を見ると、TestC の水素菌培養液のみを添加した場合と比べ、水素の生成量は減少しているのに、水素発酵は *B.coagulans* によって生産される抗菌物質によって影響を受けていると判断される。

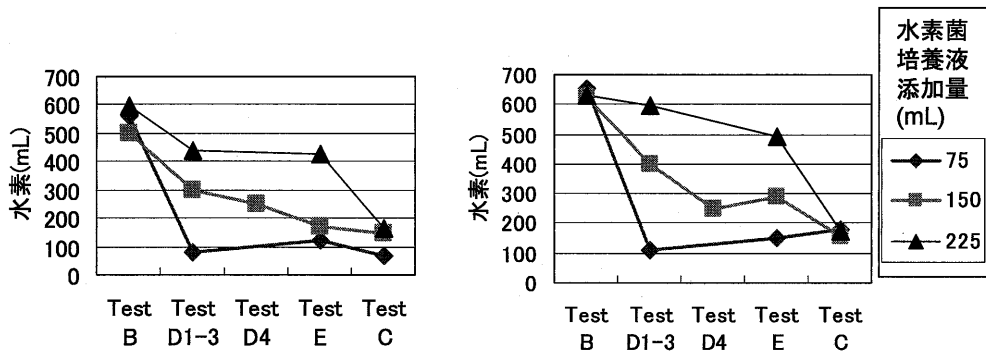


図 1 15 時間後(左図)、および48時間後(右図)の TestB-E の水素生成量

4. 結論

- 1) 水素菌培養液の植種量は、最終的な水素の生成量にはほとんど影響しないことがわかった。
- 2) 高温 L-乳酸発酵を行う際に水素菌が混入した場合、乳酸の収率が低下することがわかった。
- 3) 水素発酵は初期乳酸、高温 L-乳酸発酵によって生成される乳酸および *B.coagulans* によって生産される抗菌物質によって影響を受けることがわかった。

参考文献

- 1) S. Akao, H. Tsuno, T. Horie and S. Mori : Effects of pH and temperature on products and bacterial community in l-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, *Water Research*, 41, pp.2636-2642, 2007
- 2) 赤尾聡史, 津野洋, 堀江匠 : 植種を伴う非滅菌高温 L-乳酸発酵における培養温度と pH の影響, 環境工学研究論文集, 43, pp.39-46, 2006
- 3) Chun-Feng Chu, Yu-You Li, Kai-Qin Xu, Yoshitaka Ebie, Yuhei Inamori and Hai-Nan Kong : A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste, 2008
- 4) Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garacia, F., Cecchi, F., and Poggi-Varaldo, H. M.: *Int. J. Hydrogen Energy*, 30, pp.1383-1391, 2005

キーワード : 乳酸発酵、水素発酵、*Bacillus coagulans*、阻害、グルコース

Key Words : lactate fermentation, hydrogen fermentation, *Bacillus coagulans*, inhibition, glucose

¹⁾ S. Akao, H. Tsuno, T. Horie and S. Mori : Effects of pH and temperature on products and bacterial community in l-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, *Water Research*, 41, pp.2636-2642, 2007

²⁾ 赤尾聡史, 津野洋, 堀江匠 : 植種を伴う非滅菌高温 l-乳酸発酵における培養温度と pH の影響, 環境工学研究論文集, 43, pp.39-46, 2006

³⁾ Chun-Feng Chu, Yu-You Li, Kai-Qin Xu, Yoshitaka Ebie, Yuhei Inamori and Hai-Nan Kong : A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste, 2008

⁴⁾ Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garacia, F., Cecchi, F., and Poggi-Varaldo, H. M.: *Int. J. Hydrogen Energy*, 30, pp.1383-1391, 2005