

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5469092号
(P5469092)

(45) 発行日 平成26年4月9日 (2014.4.9)

(24) 登録日 平成26年2月7日 (2014.2.7)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 P 5/02 (2006.01)

C 1 2 P 5/02 Z N A

C 1 2 R 1/145 (2006.01)

C 1 2 P 5/02 Z N A

C 1 2 R 1:145

請求項の数 8 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2010-541688 (P2010-541688)	(73) 特許権者	510191274
(86) (22) 出願日	平成20年12月8日 (2008.12.8)		シュマック ビオガス ゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2011-509086 (P2011-509086A)		ミット ベシュレンクテル ハフツング
(43) 公表日	平成23年3月24日 (2011.3.24)		ドイツ連邦共和国、92421 シュヴァ
(86) 国際出願番号	PCT/DE2008/075014		ンドルフ、バイエルンヴェルク 8
(87) 国際公開番号	W02009/086810	(74) 代理人	100098464
(87) 国際公開日	平成21年7月16日 (2009.7.16)		弁理士 河村 洸
審査請求日	平成22年8月20日 (2010.8.20)	(74) 代理人	100149630
(31) 優先権主張番号	102008003805.9		弁理士 藤森 洋介
(32) 優先日	平成20年1月10日 (2008.1.10)	(72) 発明者	ロイター、モニカ
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ連邦共和国、84503 アルテッ
微生物の受託番号	DSMZ DSM 19861		ティンク、カルルーオルフ-シュトラッセ
前置審査			32
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 バイオガスの生成のためのクロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発酵反応槽中でバイオマスからメタンを生成するための方法であって、
該バイオマスに微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が微生物培養物の形で添加され、該微生物培養物中において、該微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が該培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 1 % を占めていることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記微生物培養物中において、前記微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が該培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 10 % を占めていることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) の純粋培養物が添加されることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は少なくとも 1 つの固定化された微生物培養物の成分として前記バイオマスに添加されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) の

10

20

添加のすぐ後または同時に、さらなるバイオマスが前記発酵反応槽中に加えられ、それにより該発酵反応槽の容積負荷がバイオマスの連続的な添加によって連続的に高められることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

バイオマスからのバイオガスの生成が、容積負荷 $0.5 \text{ kg OTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ 以上にて行われることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が、添加後に該微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) の含有量が発酵基質中に存在する微生物の総数の $10^{-4}\%$ ~ 10% を占める量で該発酵基質に添加されることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が、添加後に該微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) の含有量が発酵基質中に存在する微生物の総数の $10^{-3}\%$ ~ 1% を占める量で該発酵基質に添加されることを特徴とする請求項 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) 種の微生物を使用してバイオマスからバイオガスを生成する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

バイオガスプラントは微生物による有機物質の分解プロセスを通じてメタンを生成する。この場合、バイオガスは嫌気性微生物すなわち空気の排除下における当該微生物の活動による多段階の発酵もしくは腐敗プロセスによって生成する。

【0003】

基質として使用される有機物は、化学的な視点から見ると、高分子構造を有しており、その構造はバイオガスプラントの各工程における微生物の代謝活性によって、低分子量ビルディングブロックに分解される。しかし、有機発酵基質の発酵に活性な微生物集団の特徴は、未だ十分解明されていない。

30

【0004】

現在の知識水準によれば、逐次的にも、並行的にも進行し、互いに相互作用する 4 つの個々の生化学的プロセス、すなわち加水分解、酸生成、酢酸生成およびメタン生成が認められ、有機発酵基質を最終生成物であるメタンと二酸化炭素に分解することができる。

【0005】

加水分解においては、しばしば粒子状で存在する高分子有機化合物は、発酵細菌の細胞外酵素（たとえばセルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ）によって可溶性分解生成物に変換される。すなわち、たとえば脂肪は脂肪酸に、そして炭水化物たとえば多糖類は、オリゴ糖類および単糖類に、そしてタンパク質はオリゴペプチドまたはアミノ酸に分解される。これらと一緒に発生する気体生成物は、主に二酸化炭素からなる。

40

【0006】

通性嫌気性細菌および偏性嫌気性細菌は、しばしば加水分解細菌と同じ細菌であって、酸生成過程で加水分解生成物（たとえば単糖類、二糖類、ジペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸、グリセリン、長鎖脂肪酸）を細胞内で短鎖脂肪酸またはカルボン酸、たとえば酪酸、プロピオン酸および酢酸、そして短鎖アルコール、たとえばエタノール、および気体生成物である水素および二酸化炭素に代謝する。

【0007】

続く酢酸生成過程では、酸生成過程で生成した短鎖脂肪酸およびカルボン酸ならびに短鎖アルコールを酢酸生成細菌が取り込み、 β 酸化後、酢酸として再び分泌する。酢酸生成

50

の副生成物は CO_2 および水素分子(H_2)である。

【0008】

酢酸という酢酸生成の生成物のみならず、メタノールおよびギ酸エステルといった別の基質も、偏性嫌氣的に進行するメタン生成過程でメタン生成生物によってメタンおよび CO_2 に変換される。ここで生成する CO_2 のほか、別のプロセス工程、たとえば加水分解で生成する CO_2 も同様に、 H_2 とともに微生物によってメタンに変換される。

【0009】

与えられた量の出発物質からの最終生成物の収量を向上させることは、バイオガスの製造においても、あらゆる化学反応と同様、プロセスを実施する上で不可欠な目標である。バイオマスからのバイオガスの生成について言えば、これは所定量の有機発酵基質からできるだけ多量のメタンが生成されるべきであることを意味している。

10

【0010】

また上記と並んで、発酵槽のできるだけ高い容積負荷が達成されなければならない。発酵槽の容積負荷とは、発酵槽に供給される基質の量を発酵槽容積 $1\text{ m}^3 \cdot 1$ 日あたりの有機乾燥基質のキログラムで表したものと理解される。生成されるバイオガスの量は発酵槽の容積負荷によって大きく左右され、その際、容積負荷が高まるにつれてますます多量のバイオガスが発生されることになる。したがって、高い容積負荷は経済的にバイオガス産生プロセスの採算性をますます高めることになるが、ただし他方で、生物学的発酵プロセスをより不安定化する結果ともなる。

【0011】

20

それゆえ、従来法と比較して容積負荷を高めることができる、バイオガスの生成方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0012】

本発明の目的は、発酵反応層の容積負荷を従来技術と比較して向上させることを可能にするバイオガス生成方法を提供することである。

【0013】

本発明によれば、この課題は請求項1に記載のバイオガスの生成方法によって解決される。本発明のさらなる利点の詳細、実施態様および実施形態は、従属項、発明の詳細な説明および実施例によって明らかとなろう。

30

【0014】

本発明は発酵反応槽におけるバイオマスからのバイオガスの生成方法を提供する。バイオマスに微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)を添加する。

【0015】

驚くべきことに、発酵基質に微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)を添加することにより、発酵槽の容積負荷を高めることができると共に、生成されるバイオガスの量も著しく増加させることができることが見出された。実験から明らかにし得たように、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)の添加により、発酵プロセスの不安定化を招くことなく、発酵槽の容積負荷を50%を超えて高めることができる。また、容積負荷の増加と並行して、生成されるバイオガスの量も倍増する。加えて、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)を添加しない場合よりも著しく多量の有機乾燥物質が分解されるため、バイオガスの比収量(spezifische Ausbeute)も向上する。分解率の高まりにより、基質利用率の改善と共にガス比収量の著しい向上を達成することができる。微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)の添加により、ガス収量を一定に維持しつつ、発酵基質の発酵槽内滞留時間を著しく短縮することが可能であり、これにより容積負荷を高めることが可能になる。それゆえ、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)の使用はバイオガスプラントの性能および効率の飛躍的な改善をもたらす。

40

50

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】発酵の測定結果を示す図である。図中には、生成されたバイオガス量、生成されたバイオガス量の6日間の移動平均、理論的ガス生成ならびに発酵槽の容積負荷が時間に対して表されている。

【図2】図1による発酵の測定結果を示す図である。図中には、酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酢酸当量およびpH値が時間に対して表されている。

【図3】図1による発酵の測定結果を示す図である。図中には、発酵槽の容積負荷、発酵基質中の乾燥物質の含有率および有機乾燥物質の含有率が時間に対して表されている。

【図4】クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1を添加し、その他については図1～3と同一の発酵条件下で行われた発酵の測定結果を示す図である。図中には、生成されたバイオガス量、生成されたバイオガス量の6日間の移動平均、理論的ガス生成ならびに発酵槽の容積負荷が時間に対して表されている。

【図5】図4による発酵の測定結果を示す図である。図中には、酢酸濃度、プロピオン酸濃度、酢酸当量およびpH値が時間に対して表されている。

【図6】図4による発酵の測定結果を示す図である。図中には、発酵槽の容積負荷、発酵基質中の乾燥物質の含有率および有機乾燥物質の含有率が時間に対して表されている。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の趣旨による発酵とは、微生物の作用による、バイオガスの生成をもたらす嫌気性ならびにまた好気性物質変換のいずれをも含んでいる。この用語「発酵」の解説は、レンプ化学百科事典(Roempp-Chemielexikon)、第9増補版、Georg Thieme Verlag刊、1306頁に「発酵(Fermentation)」の見出しで記述されており、その記述の全体は参照によって本願明細書に組み込まれる。

【0018】

生成したバイオガスの比収量は、生成したバイオガスの量を有機乾燥物質の量で除して算出される。一定の条件下で特定の発酵槽内でのバイオガスの生成が芳しい品質で進行するか否かの問題は生成したバイオガスの量のみで判定することはできない。生成したバイオガスの量は、言うまでもなく、供給された基質の量、すなわち、有機乾燥物質のキログラム重量で表される有機乾燥物質に大きく依存している。発酵プロセスに不安定化が生ずる場合には、ガス比収量は低下する。本発明による微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) の添加が行われる場合には、容積負荷を通常のレベル以上にまで高めることが可能であり、これにより、著しく高いガス量が生成される。また、分解率の高まりによって、基質利用率の改善と同時に著しく高いガス比収量を達成することが可能である。

【0019】

本発明の趣旨において、「微生物種」なる呼称は、生物分類学において対応する基本的なカテゴリーとして理解される。微生物種はそれらのDNA配列によって同定され、区別される。その際、一定の種に該当するのは、ごく特定のDNA配列を有した微生物だけでなく、それらの遺伝的変異体も一定範囲まで含まれる。関係する専門家には、いかなる微生物株が「クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) 種」に該当するかは既知である。従来技術からして、たとえば乳児の排泄物からの微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) の単離 (Stark, P.L.; Lee, A.; J. Pediatr. 1982;100(3), p. 362-365) は公知に属するが、ただし、有機基質の発酵によるバイオガスの製造と関連した形での微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は知られていない。

【0020】

本発明の好ましい実施形態によれば、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は、主として微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) からなる微生物培養物の形で添加される。バイオ

10

20

30

40

50

ガスプラントの発酵基質中では、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、存在している微生物の総数に対して $10^{-4}\%$ を下回る極めて低い割合の僅少な痕跡量でしか検出されなかった。微生物の添加にとっては天然の分布から単離された微生物の量だけでは十分でないため、ふつう、培養の形で増殖が行われる。実際には、微生物の添加は、微生物培養物の形で発酵槽内の発酵基質へ直接的添加するのが最も簡単である。

【0021】

クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の培養物の添加は、懸濁培養液の形、乾燥、凍結乾燥あるいは湿潤細胞ペレットの形もしくは孢子懸濁液、孢子調製物または乾燥、凍結乾燥あるいは湿潤孢子ペレットの形で行うことが可能である。

10

【0022】

すでに言及した発酵プロセスに対する様々な好ましい効果は微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) と結びついているため、この微生物種は添加された培養物中に天然の分布を上回る量で存在していなければならない。言うまでもなく、任意の組成の混合培養物を添加に使用することも可能である。ただし、そのための前提条件は専ら、クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) 種が天然の分布に比較して豊富な量で存在しているということである。

【0023】

混合培養物中の様々な種類の微生物の比率の決定は専門家にとってなんら問題ではない。それゆえ、たとえば蛍光標識オリゴプローブを用いて、混合物中の微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の比率を特異的に検知することが可能である。既述したように、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は好ましくは、主として微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) からなる微生物培養物の形で発酵基質に添加される。微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の数の測定と並行して、微生物の総数の測定も行われれば、培養物中に占める微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の割合は百分率で表すことができる。この場合、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、それが混合培養物中に存在する様々な微生物種のうちで最も高い百分率を有していれば、混合培養物中に主たる種として存在する微生物種であるということができる。

20

30

【0024】

本発明の好ましい実施形態によれば、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、発酵基質に添加される培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも $10^{-4}\%$ を占める。特に好ましくは、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも $10^{-2}\%$ を占め、さらに好ましくは、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 1 % を占める。

40

【0025】

さらに別の好ましい実施形態によれば、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 10 % を占め、好ましくは微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 50 % を占め、そしてさらに好ましくは、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 90 % を占める。

【0026】

特に極めて好ましい実施形態にあつては、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の純粋培養物が添加される。微生物の純粋培養物は

50

、様々な微生物の混合物から多段階プロセスを通じて単離される単一細胞の子孫を含んでいる。この多段階メカニズムは、細胞集団からの単一細胞の分離をもって開始し、当該細胞から生長と細胞分裂によって生ずるコロニーもまた分離されたままであることを必要とする。コロニーの慎重な分離、液体中への新たな懸濁化および塗抹の繰返しによって、微生物の純粋培養物を適確に得ることが可能である。

【 0 0 2 7 】

ただし、純粋培養物の単離は、所望の生物が出発材料中で数的に多数を占めているかぎり、液体培地中でも行うことが可能である。培養液中での懸濁液の連続的な希釈によって、最後の希釈段階においてたった1個の細胞しか存在しないようにすることができる。この細胞がかくして純粋培養のベースとなる。この用語「純粋培養」の説明ならびにこうした純粋培養物を得るために考えられる方法は、Hans G. Schlegelの著書“ Allgemeine Mikrobiologie ”、第7改訂版、1992、Georg Thieme Verlag刊、205頁に「純粋培養(Reinkultur)」の見出しで述べられており、その記述の全体は参照によって本願明細書に組み込まれる。

10

【 0 0 2 8 】

このようにして得られた純粋培養物は、特異的な代謝過程および代謝活性、ならびに特異的増殖条件により生物化学的に特徴付けられる。特異的な代謝過程および代謝活性に基づき、発酵微生物の純粋培養物の添加は、複雑なバイオガス生産過程のより良い制御に大きく貢献することができる。

【 0 0 2 9 】

20

本発明のさらに別の特に好ましい実施形態によれば、微生物の少なくとも一つの固定化培養物の成分として微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が添加される。自然界に存在する微生物から単離した微生物の量では微生物の添加には十分でないため、通常は培養物の形で増殖がはかられる。実際では、発酵槽の発酵基質に微生物を添加するには、微生物を固定化した培養物の形で添加するのが最も簡単であることは明らかである。

【 0 0 3 0 】

すでに言及した発酵に対する様々な好ましい効果には、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が関係しているので、添加する固定化培養物中に存在するこの微生物種は、自然界に存在する量と比較して豊富な量で存在すべきである。任意の組成の固定化混合培養物が添加に使用できることは言うまでもない。その前提は、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が自然界に存在するより多量に存在しているという点だけである。

30

【 0 0 3 1 】

本発明の好ましい実施形態によれば、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は、発酵基質に添加される固定化培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも $10^{-4}\%$ を占める。特に好ましくは、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は、固定化培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも $10^{-2}\%$ を占め、さらに好ましくは、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は、固定化培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 1% を占める。

40

【 0 0 3 2 】

さらに好ましい実施形態によれば、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は、固定化培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 10% を占め、とくに好ましくは微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は、固定化培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 50% を占め、そしてさらに好ましくは、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は、固定化培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 90% を占める。

【 0 0 3 3 】

50

全くとりわけ好ましい実施形態によれば、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の少なくとも一つの固定化純粋培養物が添加される。

【 0 0 3 4 】

微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) を固定化する支持体材料としては、天然または合成ポリマーが使用可能である。好ましくはゲル形成ポリマーが使用される。これらのポリマーは、ゲル構造の内部に細菌を取り込むか、あるいは沈着させ得るという利点がある。好ましくは、材料は、水にゆっくり溶解するかまたは分解し、その結果、比較的長時間にわたって微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) を遊離するために使用される。

10

【 0 0 3 5 】

好適なポリマーとしては、たとえばポリアニリン、ポリピロール、ポリビニルピロリドン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリビニルアルコール、ポリエチレン、ポリプロピレン、エポキシ樹脂、ポリエチレンイミン、アガロース、アルギン酸塩またはセルロースなどの多糖類、エチルセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、酢酸セルロース、硫酸アルカリセルロース、ポリスチレンと無水マレイン酸とのコポリマー、スチレンとメタクリル酸メチルとのコポリマー、ポリスチレンスルホネート、ポリアクリレートおよびポリメタクリレート、ポリカーボネート、ポリエステル、シリコーン、セルロースフタレート、ゼラチン、アラビアゴム、アルブミンまたはフィブリノーゲンなどのタンパク質、ゼラチンと水ガラスの混合物、ゼラチンとポリホスフェートの混合物、ゼラチンと、無水マレイン酸とメチルビニルエーテルとのコポリマーとの混合物、セルロースアセテートブチレート、キトサン、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド、ポリアクリル酸とポリジアリルジメチルアンモニウムクロライドとの混合物、ならびにそれらの混合物を挙げることができる。高分子材料は通常の架橋剤、たとえばグルタルアルデヒド、尿素 / ホルムアルデヒド樹脂、またはタンニン化合物で架橋してもよい。

20

【 0 0 3 6 】

アルギン酸塩は、一方でクロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) 微生物の活性に何ら負の影響を及ぼすことはないし、他方で微生物によって徐々に分解されるため、固定化材として特に有利である。アルギン酸塩固定化材がゆっくり分解すると内部に包み込まれた微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) が徐々に放出される。

30

【 0 0 3 7 】

固定化するには、微生物とポリマーゲルとを混合し、それから適当な硬化剤溶液で硬化させる。それには、まずゲル溶液と混合し、それから適当な高さから硬化剤溶液中に滴下する。固定化の正確な実施方法は当業者にとって既知である。

【 0 0 3 8 】

さらに別の実施形態において、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の添加と時間的に近接して、さらなるバイオマスが発酵反応槽中に加えられる。この場合、「時間的に近接して」とは、微生物の添加とそれに続く新たな基質の添加との間に経過する時間幅に関する。この時間幅はできるだけ短くされる必要があり、それゆえ、「時間的に近接して」なる表現は微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) と新たな基質との並行添加をも含む。

40

【 0 0 3 9 】

ただし、上記の時間幅は数時間から 1 日または数日までに及ぶこともできる。その際、発酵槽の容積負荷は新しい基質を連続的に添加することによって連続的に増加させること、または一定に保持することができ、そして発酵はあらゆる容積負荷で実施することが可能であるが、好ましくは 1 m^3 当たり、1 日当たりの乾燥有機物 (organischer Trockensubstanz) $0.5 \text{ kg oTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ 以上で、そして、さらに好ましくは容積負荷 $4.0 \text{ kg oTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ 以上で、そして、特に好ましくは容積負荷 $8.0 \text{ kg oTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ 以上で実施することが可能であり、現在の技術水準と比べて、容

50

積負荷の増加は2倍を超える。

【0040】

したがって、さらに別の好ましい実施形態において、発酵反応槽の容積負荷はバイオマスの連続的な添加によって連続的に高められる。特に好ましくは、バイオマスからのバイオガスの生成は、容積負荷が $0.5 \text{ kg o T S / m}^3 \cdot \text{日}$ 以上、特に好ましくは $4.0 \text{ kg o T S / m}^3 \cdot \text{日}$ 以上、特に極めて好ましくは $8.0 \text{ kg o T S / m}^3 \cdot \text{日}$ 以上に行われる。

【0041】

特に、使用される発酵基質は、固形成分の割合を高くすることができる。加水分解活性を有する発酵微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) を添加すれば、これらの固形成分は少なくとも部分的に液状化する。微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) を添加して発酵基質を液状化すれば、発酵槽基質の濃密化を防止し、適切に対処することができる。さらに水または液肥の形で液体を発酵基質に導入すれば回避できる。このように淡水資源の節約という形でさらなる利点がある。さらに、基質の攪拌とポンプ輸送の維持が可能であることも利点である。上記液状化によって攪拌装置およびポンプの損傷は防止され、攪拌に要するエネルギーは大幅に少なくてすむ。

10

【0042】

さらに別の実施形態では、バイオマスからのバイオガス生成は、発酵基質を絶えず攪拌しながら行われる。発酵基質を絶えず攪拌することで、クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) 培養物は、発酵基質内によく分散する。またさらに、生成されたバイオガスを発酵プロセスからより良好に取り出すことが可能である。

20

【0043】

また、発酵基質を絶えず攪拌すれば発酵反応槽内の熱分布は一樣になる。一定の間隔において連続的に行った発酵槽内の温度測定から、発酵基質の発酵は、 20 から 80 の温度範囲、好ましくは約 40 から 50 の温度範囲で行うと効率がよいことが示された。したがって本発明においては、これらの温度範囲が好ましい。加水分解とならんで、発酵プロセスの特に最終工程、すなわちメタン生成微生物によるメタンの生成は、昇温温度で特に効率よく行われる。

【0044】

したがって、好ましくは、バイオマスからのバイオガスの生成は 20 から 80 の温度にて、特に好ましくは、 40 から 50 の温度にて行われる。

30

【0045】

本発明のすべての実施形態は、言うまでもなく、一段式のバイオガス製造方法に制限されるものではない。二段式または多段式製造法でも微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) を使用して行うことができる。

【0046】

さらに別の実施形態によれば、発酵基質および微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は連続的に添加される。微生物群が安定していれば、発酵槽を連続運転してバイオガスを連続的に製造すべきであり、プロセスの不調により発酵のための基質供給が中断されることは避けなければならない。

40

【0047】

同様に、非連続運転、たとえば「バッチ式」の発酵によって、この発酵法およびそれと関連するプロセスを実施することも考えられる。そこで別の実施形態によれば、微生物種クロストリジウム・スポロスフェロイデスの発酵中に、たとえば一定の時間間隔で発酵基質を添加してもよい。微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) を一定の時間間隔で添加すると生細胞の数が増えるため、発酵プロセス、たとえば加水分解の進行が向上し、同時に発酵に対する発酵基質の利用率が高まる。

【0048】

本発明の好ましい実施形態によれば、添加後の微生物種クロストリジウム・サルタゴフ

50

オルマム (*Clostridium sartagoformum*) の割合が、発酵基質中に存在する微生物の総数の $10^{-8}\%$ から 50% を占める量で発酵基質に微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) を加える。所望の効果を得るには、特に発酵槽の大きさに依存して、したがって発酵基質の量に依存して、極めて大きく異なる量の微生物を添加する必要がある。

【0049】

発酵基質中の微生物の総数を決定することと発酵基質中の異なる微生物種の割合を決定することは、当業者にとっては何ら問題ではない。すなわち、たとえば蛍光標識オリゴプローブを使えば、発酵基質中の各種微生物の割合は、上に記述した方法によって、同定できる。

10

【0050】

特に好ましくは、添加後の微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の割合が、発酵基質中に存在する微生物の総数の $10^{-6}\%$ から 25% を占める量で発酵基質に微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) を加える。そして特に好ましくは、添加後の微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の割合が、発酵基質中に存在する微生物の総数の $10^{-4}\%$ から 10% を占める量で発酵基質に微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) を加える。全く好ましくは、添加後の微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の割合は、発酵基質中に存在する微生物の総数の $10^{-3}\%$ から 1% を占める量で発酵基質に微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) を加える。

20

【0051】

微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の添加は発酵プロセスの任意のいかなる時点にも行なうことが可能である旨再度指摘しておくこととする。とりわけ、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、発酵槽の初回運転開始時または再運転開始時の発酵基質の接種にも使用することができる。

【0052】

発酵プロセスに不調が生じた場合、発酵を安定させるために微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) を添加することができる。このような不調は、所定の発酵特性パラメータを監視することで早期に認識可能である。特性パラメータはバイオガスを製造するための稼動する発酵プロセスの質に関する情報を提供する。このような特性パラメータは、発生バイオガスの量および発生バイオガス中のメタン含有量だけではなく、たとえば発生バイオガス中の水素含有量、発酵基質の pH 値、発酵基質の酸化還元電位、発酵基質のカルボン酸含有量、発酵基質中に含まれる各種カルボン酸の割合、発酵基質の水素含有量、発酵基質における乾燥物の割合、発酵基質における乾燥有機物の割合、発酵基質の粘性および発酵槽の容積負荷も含む。

30

【0053】

本発明は、バイオマスから発酵によるバイオガスの製造に対する微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) の使用を包含する。

40

【0054】

同じく、本発明は、DSM 19861 の番号の下に寄託されている微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 株を包含する。微生物クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 は、ブダペスト条約に基づいてブラウンシュバイクにある Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH に純粋培養物として寄託した。その名称はクロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1、寄託番号は DSM 19861 である。

【0055】

細菌種クロストリジウム・サルタゴフォルマム (*Clostridium sartagoformum*) は、当

50

業者に既知の方法によって、発酵槽の発酵基質から単離可能である。単離する場合、発酵槽から採取した適当な基質を選択培地に移し、比較的長時間培養し、最後に選択培地から微生物の個々のコロニーを単離する。そこから得られた微生物DNAをPCRによって増幅したのち、16S rRNAに基づいて微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) を選び出すことができる。

【0056】

細菌クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 は二次発酵槽の発酵基質から単離した。それには、液体選択培地に窒素および二酸化炭素を通気し、それからNa₂Sを選択培地に添加し、オートクレーブ処理(121で20分間)した。つづいて、二次発酵槽から得られたバイオマスを選択培地に移し、少なくとも1週間、少なくとも30の温度で培養した。液体選択培地から得られた試料を固体選択培地に移し、それから固体選択培地上で生育した微生物コロニーを選び出した。得られた微生物DNAをPCR法によって増幅したのち、既知のDNA配列と比較した。

【0057】

細菌クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 が二次発酵槽の発酵基質から単離することに成功した後、この微生物は配列分析に付された。16S rRNA配列(配列番号1)は948個のヌクレオチドを含んでいる。最も近い類縁種として、遺伝子配列(配列番号2)を有する非培養細菌クローン a a a 6 2 b 0 7 が同定された。配列の比較から、総計9個のヌクレオチド交換またはギャップが存在することが判明する。クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の948個のヌクレオチド配列長において、FASTAアルゴリズムにより、99.2%の同一性が算出される。

【0058】

本発明は、配列番号1のヌクレオチド配列との配列同一性が99.2%を超える配列領域を含むヌクレオチド配列を有する核酸をもつ微生物も包含する。特に好ましくは、該ヌクレオチド配列が、配列番号1のヌクレオチド配列との配列同一性が99.4%を超える配列領域を含む、そして、特に好ましくは、該ヌクレオチド配列が、配列番号1のヌクレオチド配列との配列同一性が99.6%を超える配列領域を含む。

【0059】

さらに別の好ましい実施形態によれば、前記微生物は、配列番号1のヌクレオチド配列との配列同一性が99.8%を超える配列領域を含むヌクレオチド配列を有し、特に好ましくは、該ヌクレオチド配列が、配列番号1のヌクレオチド配列との配列同一性が99.9%を超える配列領域を含む。

【0060】

特に極めて好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド配列に一致した配列領域を含んでいる。

【0061】

したがって、本発明はまた、そのヌクレオチド配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して1ヵ所においてのみヌクレオチド交換を有する少なくとも1つの配列領域を含んだ核酸を有するすべての微生物をも含んでいる。また同じく、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して2ヵ所においてのみヌクレオチド交換を有する少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。その他になお、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して3ヵ所においてのみヌクレオチド交換を有する少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。

【0062】

さらに本発明はまた、そのヌクレオチド配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して4ヵ所においてヌクレオチド交換を有する少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物をも含んでいる。また同じく、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して5ヵ所においてヌクレオチド交換を有する少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。その他になお、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチ

ド配列と比較して6カ所においてヌクレオチド交換を有する少なくとも1配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。

【0063】

その他にさらに本発明はまた、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して7カ所においてヌクレオチド交換を有する少なくとも1配列領域を含んだすべての微生物をも含んでいる。また同じく、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して8カ所においてヌクレオチド交換を有する少なくとも1配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。

【0064】

ヌクレオチド交換はDNA配列の任意の位置に存在していてよいことは自明である。特にこれらの交換は互いに任意に離間した位置に存在していてよい。配列番号1のヌクレオチド配列と比較して、たとえば6個のヌクレオチドが交換されている場合には、交換されたこれらの6個のヌクレオチドは互いに隣接して存在していてもよい。この場合には、配列番号1のヌクレオチド配列の6ヌクレオチド長フラグメントが変更されていることになろう。ただし、交換された6個のヌクレオチドは同じく、たとえば互いにそれぞれ100個のヌクレオチド分だけ離間していてもよい。したがって、交換は任意の組み合わせで存在してよい。

【0065】

同じく、上記の交換はギャップの形で存在していてもよい。したがって、本発明はまた、そのヌクレオチド配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して1カ所においてのみヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだ核酸を有するすべての微生物をも含んでいる。また同じく、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して2カ所においてのみヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。その他になお、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して3カ所においてのみヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。

【0066】

さらに本発明はまた、そのヌクレオチド配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して4カ所においてヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物をも含んでいる。また同じく、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して5カ所においてヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。その他になお、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して6カ所においてヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。

【0067】

その他にさらに本発明はまた、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して7カ所においてヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物をも含んでいる。また同じく、そのDNA配列が配列番号1のヌクレオチド配列と比較して8カ所においてヌクレオチドが欠失している少なくとも1つの配列領域を含んだすべての微生物も含まれている。

【0068】

ヌクレオチドはDNA配列の任意の位置において欠失していてよいことは自明である。特にこれらのギャップは互いに任意に離間した位置に存在してよい。配列番号1のヌクレオチド配列と比較して、たとえば6個のヌクレオチドが欠失している場合には、配列番号1のヌクレオチド配列中のこれらの6個のヌクレオチド欠如カ所は互いに隣接して存在していてもよい。この場合には、配列番号1のヌクレオチド配列の6ヌクレオチド長のフラグメントが欠失していることになろう。ただし、配列番号1のヌクレオチド配列中のこれらの6個のヌクレオチド欠失は同じく、たとえば互いにそれぞれ100個のヌクレオチド分だけ離間していてもよい。したがって、ギャップは任意の組み合わせで存在してよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

本発明はまた、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した微生物培養物であって、該微生物培養物中には D S M 1 9 8 6 1 の番号で寄託された微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 が存在しており、この場合、この微生物が培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも $10^{-4}\%$ を占めている、微生物培養物を含む。

【 0 0 7 0 】

本発明はまた、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した微生物培養物であって、該微生物培養物中には、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 99.2% の配列同一性を有する配列領域を含んだヌクレオチド配列を有する微生物が存在しており、この場合、この微生物が培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも $10^{-4}\%$ を占めている微生物培養物をも含む。

10

【 0 0 7 1 】

好ましくは、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した微生物培養物中には、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 99.4% 以上の配列同一性を有する配列領域を含んだヌクレオチド配列を有する微生物が存在している。特に好ましくは、このヌクレオチド配列は配列番号 1 のヌクレオチド配列と 99.6% 以上の配列同一性を有する配列領域を含んでいる。

【 0 0 7 2 】

さらに別の好ましい実施形態において、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した微生物培養物中には、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 99.8% 以上の配列同一性を有する配列領域を含んだヌクレオチド配列を有する微生物が存在している。特に極めて好ましくは、このヌクレオチド配列は配列番号 1 のヌクレオチド配列と 99.9% 以上の配列同一性を有する配列領域を含んでいる。

20

【 0 0 7 3 】

特に極めて好ましい実施形態において、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した微生物培養物中には、配列番号 1 のヌクレオチド配列に一致した配列領域を含んだヌクレオチド配列を有する微生物が存在している。

【 0 0 7 4 】

さらに別の好ましい実施形態において、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも $10^{-2}\%$ 、好ましくは少なくとも 1% を占めている。特に好ましくは、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 10%、特に好ましくは少なくとも 25% を占めている。

30

【 0 0 7 5 】

特に極めて好ましくは、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) は培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 50%、特に少なくとも 75% を占めている。

【 0 0 7 6 】

同じく好ましいのは、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が培養物中に存在する微生物の総数の少なくとも 90% をなしている実施形態である。特に好ましいのは、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した微生物の純粋培養物であり、これは D S M 1 9 8 6 1 の番号で寄託された微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 またはそのヌクレオチド配列に関して上述した特徴を有する微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の純粋培養物である。

40

【 0 0 7 7 】

上述したケースにおいて、特に好ましいのは固定化された微生物培養物である。

【 0 0 7 8 】

50

本発明はまた、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した固定化された微生物培養物であって、D S M 1 9 8 6 1 の番号で寄託された微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム (*Clostridium sartagoformum*) が存在している固定化された微生物培養物を含む。

【 0 0 7 9 】

本発明はまた、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した固定化された微生物培養物であって、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 9 9 . 2 % の配列同一性を有する配列領域を含むヌクレオチド配列を有する微生物が存在している固定化された微生物培養物をも含む。

【 0 0 8 0 】

10

好ましくは、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した固定化された微生物培養物中には、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 9 9 . 4 % 以上の配列同一性を有する配列領域を含むヌクレオチド配列を有する微生物が存在している。特に好ましくは、このヌクレオチド配列は配列番号 1 のヌクレオチド配列と 9 9 . 6 % 以上の配列同一性を有する配列領域を含んでいる。

【 0 0 8 1 】

さらに別の好ましい実施形態において、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した固定化された微生物培養物中には、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 9 9 . 8 % 以上の配列同一性を有する配列領域を含むヌクレオチド配列を有する微生物が存在している。特に極めて好ましくは、このヌクレオチド配列は配列番号 1 のヌクレオチド配列と 9 9 . 9 % 以上の配列同一性を有する配列領域を含んでいる。

20

【 0 0 8 2 】

特に極めて好ましい実施形態において、バイオマスから発酵によってバイオガスを生成する方法に使用するのに適した固定化された微生物培養物中には、配列番号 1 のヌクレオチド配列に一致した配列領域を含むヌクレオチド配列を有する微生物が存在している。

【 0 0 8 3 】

本発明を図解してその長所を明らかにするため、実施例を挙げて説明する。実施例は図 1 から図 6 を参照しながら詳しく説明する。実施例と関連して記述する内容が本発明の範囲を限定するものでないことは言うまでもない。

【実施例】

30

【 0 0 8 4 】

[比較例]

図 1 は、容積 1 5 0 L のテスト発酵槽による実際のプラント条件下での発酵プロセス中の種々異なった特徴を有するパラメータの測定結果を示している。符号 1 0 の付された曲線は 1 立方メートル当たり 1 日当たりの有機乾燥物質のキログラム ($\text{kg o T S} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$) で表された発酵槽の容積負荷の時間的推移を示しており、符号 2 0 の付された曲線は 1 日当たりの標準リットル ($2 7 3 . 1 5 \text{ K}$ かつ $1 0 1 3 \text{ m b a r}$ でのガス体積) ($\text{N L} / \text{日}$) で表された、生成された総バイオガス量の時間的推移を示している。符号 3 0 により、 $[\text{N L} / \text{日}]$ で生成された総バイオガス量の 6 日間の移動平均の時間的推移が表されており、 $[\text{N L} / \text{日}]$ での理論的ガス生成の時間的推移には符号 4 0 が付されている。

40

【 0 0 8 5 】

農業技術・土木機構 (Kuratorium fuer Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V.) (K T B L) ならびに州農業研究所 (Bundesforschungsanstalt fuer Landwirtschaft) は、安定した発酵時に基質使用量に応じておおよそどれほどの量のバイオガスを見込むことができるかを示す基準値を公表している。したがって、これらの基準値は理論的に生成可能なバイオガス量を反映することができる。またこれに代えて、その他の州のその他の研究機関によって公表された基準値も使用することが可能である。 $[\text{N L} / \text{日}]$ で符号 4 0 により示した理論的ガス生成の時間的推移はこれらの基準値に基づいて計算された。

【 0 0 8 6 】

50

図 1 から、最初の 35 日間の経過中、約 $6.5 \text{ kg OTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ までの容積負荷の高まりならびにこうした容積負荷の高まりと共に連続的に増加するバイオガス生成を特徴とした連続的な安定した発酵プロセスが生ずることがわかる。36 日目以降は、生成されたバイオガス量と理論的ガス生成との乖離を観察することができる。図 2 に示したように発酵基質中の酸濃度が勝手に増加するため、38 日目以降、容積負荷は基質供給増加の中断によってほぼ一定に保たれる。ただし、酸濃度は制御不能のままであるため、67 日目と 76 日目には基質は供給されず、78 日目以降、基質供給は完全に停止される。 $5.5 \text{ kg OTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ の最大容積負荷が達成されたことが明らかになった。ただし、容積負荷がこれ以上高くなると発酵プロセスがブレークダウンするため、安定した運転はもはや不可能である。

10

【0087】

図 2 は、すでに図 1 に関連して説明した発酵プロセス中の、特徴的なカルボン酸濃度の時間依存動向を示している。同図には、pH 値（符号 60 の付された曲線）、揮発性脂肪酸を測定するための酢酸当量（符号 70 の付された曲線）、酢酸濃度（符号 80 の付された曲線）およびプロピオン酸濃度（符号 90 の付された曲線）のそれぞれの時間的推移が示されている。この場合、酸濃度は発酵基質 1 L 当たりのミリグラム（ mg / L ）で表されている。

【0088】

発酵基質中の加算パラメータとしての揮発性脂肪酸の測定は、リン酸で酸性化された発酵基質試料の水蒸気蒸留によって行われた。蒸留物は続いて水酸化ナトリウム水溶液を用いてフェノールフタレインで滴定された。別法としてまたは個々のカルボン酸を識別するため、ガスクロマトグラフィーによる測定も可能である。

20

【0089】

テスト中の最初の 35 日間、pH 値は pH 7.5 でほぼ安定していたことが見出された。36 日目以降、酸濃度が勝手に高まるため、図 1 に関連して説明したように、基質供給は差し当たりそれ以上増加されず、67 日目、76 日目および 78 日目以降は完全に停止された。酸濃度の制御不能な高まりに伴って、pH 値はやや低下して弱酸性環境となり、それと共に不安化した発酵プロセスが目立ち始める。pH 値はその後、酸濃度がゼロに向かって低下していくと初めて、再び中性からややアルカリ性までの環境に安定する。こうした pH 値の回復は、さらなる基質供給の欠如によって支持される、微生物による発酵基質中の酸の分解によって説明することができる。

30

【0090】

図 3 は、すでに図 1 および 2 に関連して説明した発酵プロセス中の容積負荷と関連した発酵槽内の乾燥物質含有量を示している。同図には、 $[\text{kg OTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}]$ で表された容積負荷（符号 10 の付された曲線）、乾燥物質含有率（符号 110A の付された曲線）および有機乾燥物質の含有率（符号 110B の付された曲線）のそれぞれの時間的推移が示されている。乾燥物質の含有率は、有機物質および無機物質たとえば砂の総質量を表している。

【0091】

図 3 から、図 2 に示された 36 日目の酸濃度の上昇と共に、同じく乾燥物質含有率および有機乾燥物質含有率も上昇していることがわかる。38 日目に行われた容積負荷の減少 - これは 38 日目から 67 日目までの間、 $5.5 \sim 6.0 \text{ kg OTS} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ でほぼ一定のままである - にもかかわらず、もはや十分に発酵させることのできない有機乾燥物質 110B が増加する。78 日目の基質供給の停止によって初めて生物学的プロセスは回復し、こうして、有機乾燥物質は再び発酵させられるが、これは乾燥物質含有量 110B の低下からわかる。

40

【0092】

[クロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1]

細菌種クロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 は、二次発酵槽の発酵基質から単離することに成功した。この微生物はブダベスト条約

50

に基づいてブラウンシュバイクにあるDeutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHに純粋培養物として寄託した（クロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）S B G 1、寄託番号D S M 1 9 8 6 1）。

【 0 0 9 3 】

上記微生物の単離は、唯一の炭素源としてカルボキシメチルセルロースを含んだ選択培地を用いて行われた。カルボキシメチルセルロースはバイオガスプラントの発酵基質に含まれているセルロースと非常に大きな類似性を有しており、さらに、ヒドロキシル基とカルボキシメチル基（ $-CH_2-COOH-$ ）との結合により水性培地への溶解性が改善されている。クロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）S B G 1の選択に使用された培地は、嫌気性条件下で選択を行うことができるようにするため、 N_2 および CO_2 でガス処理された。含まれていた残留酸素は続いて $0.5\text{ g/L Na}_2\text{S}$ で還元された。

【 0 0 9 4 】

続いて、上記選択培地には二次発酵槽から得られた材料の上清を接種した。40にて1週間にわたって培養した後、顕微鏡分析に際して個々の桿菌が確認された。液体培養物のさらなる選択は嫌気性カルボキシメチルセルロースプレートへの塗抹によって行われた。生長したコロニーの細胞材料は、標準プログラムに従い、コロニーPCR法による微生物DNAの複製に使用された。コロニーの配列分析の後、それから発生した配列データの、データベースwww.ncbi.nlm.nih.govのBLASTプログラム(basic local alignment search tool)による系統発生比較から、得られた配列は生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）に最も近い類縁種として分類し得ることが明らかになった。

【 0 0 9 5 】

加水分解活性を有する発酵性微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）S B G 1の純粋培養物によるテストから、高粘稠液状のカルボキシメチルセルロース含有粘稠選択培地への添加は培地の連続的な液化を導くことが示された。

【 0 0 9 6 】

[実施例]

図4は、図1～3に関連して述べたプラント条件下におけるテストプラントの発酵プロセス中の種々異なった特徴を有するパラメータの測定結果を示している。符号10の付された曲線は1立方メートル当たり1日当たりの有機乾燥物質キログラム（ $kg\text{ OTS/m}^3 \cdot \text{日}$ ）で表された発酵槽の容積負荷の時間的推移を示しており、符号20の付された曲線は1日当たりの標準リットル（ 273.15 K かつ 1013 mbar 時のガス体積）（ $NL/\text{日}$ ）で表された、生成された総バイオガス量の時間的推移を示している。符号30により、 $[NL/\text{日}]$ で生成された総バイオガス量の6日間の移動平均の時間的推移が表されており、 $[NL/\text{日}]$ での理論的ガス生成の時間的推移には符号40が付されている。

【 0 0 9 7 】

図1～3に関連して述べた発酵とは異なり、以下に図4～6を参照して論ずる発酵プロセスにあっては、本発明により、微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）が発酵基質に添加された。クロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）S B G 1の添加時点はX軸上の符号50で表された三角印によって示されている。

【 0 0 9 8 】

記述された本実施例では、純粋培養されたクロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）が使用された。ただし、クロストリジウム・サルタゴフォルムム（*Clostridium sartagoformum*）を1成分として含む混合培養物も同じく使用することが可能である。

【 0 0 9 9 】

215日目から、約 $4.25 \text{ kg oTS/m}^3 \cdot \text{日}$ から約 $8.5 \text{ kg oTS/m}^3 \cdot \text{日}$ (314日目)への連続的な容積負荷の引き上げが行われた。この期間中に、クロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の純粋培養物は何回も発酵基質に加えられた。266日目に生じた容積負荷の落ち込みは、同日にバイオガスプラントへの基質供給停止に至った技術的問題に帰することができる。

【0100】

クロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の純粋培養物の最初の使用はテスト235日目に行われた。この最初の微生物添加時点に、発酵槽は有機乾燥物質キログラム重量、約 $4.5 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{日}$ の容積負荷で運転された。これには、約40の温度で5日間にわたってインキュベートされていたクロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の先行培養物1Lから得られた細胞集団が使用された。この先行培養物の細胞数は約 $2.0 \times 10^8 \text{ 個/mL}$ の細胞密度を有し、その生細胞比率は90%以上であった。添加は先ず1L規模で週に2回行われる一方で、添加量はテスト277日目から倍増され、週に2回、クロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の先行培養物2Lから得られた細胞集団の添加が行われた。

【0101】

テスト293日目から、週に3回、クロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の先行培養物2Lから得られた細胞集団が添加された。加えてさらに、先行培養物のインキュベーション期間は少なくとも7日間に拡大されたため、これによって、細胞密度は平均で $1 \times 10^9 \text{ 個/mL}$ に増加した。クロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 の純粋培養物の添加によって、容積負荷は、その後のテストプロセスにおいて、314日目に達成された約 $8.5 \text{ kg oTS/m}^3 \cdot \text{日}$ の最大値にまで高められた。

【0102】

容積負荷の高まりと並行して、バイオガス収量の増加も観察された。この場合、生成されたバイオガス量標準リットル/日 [NL/日] と理論的ガス生成標準リットル/日 [NL/日] との一致が観察され、生成されたバイオガス量はおおよそ288日目から、理論的に予測されるバイオガス収量をほぼ常に上回っていた。これは277日目以降のクロストリジウム・サルタゴフォルム (*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 純粋培養物の添加量増加に帰することができる。

【0103】

テスト日数290日および308日に基づき、さらに、ガス収量は短期間に理論値を著しく越えて上昇し、続いて、再び理論値に接近する旨観察することができる。こうしたバイオガス生成の高まりは添加された微生物量のその都度の増加と共に現れる。このことから、微生物の基本濃度が造成されるべき適応相の後、細胞数の増加が加水分解の促進を導くと推論することができる。

【0104】

図5は、すでに図4に関連して述べた発酵プロセス中の、特徴的なカルボン酸濃度の時間関数としての動向を示している。同図には、pH値(符号60の付された曲線)、符号70で表された、揮発性脂肪酸を測定するための酢酸当量 [mg/L] および酢酸濃度 [mg/L] (符号80の付された曲線)ならびにプロピオン酸濃度 [mg/L] (符号90の付された曲線)のそれぞれの時間的推移が示されている。

【0105】

図5から、pH値は発酵プロセスの間ずっと一定のままであり、pH7~8の間の中性からややアルカリ性の環境にあったことがわかる。すでに発酵プロセスの開始にあたって、酢酸当量の濃度、酢酸濃度およびプロピオン酸濃度の大幅な降下を認めることができた。総じて、脂肪酸濃度は持続的に低いままであり、長鎖脂肪酸の増加を観察することはできなかった。

【0106】

図4に関連してすでに述べた基質供給の大幅な増加も、266日目に行われた基質供給の停止も、いずれもカルボン酸濃度に際立ったピークを生じさせなかった。これは、加水分解中ならびに続く酸・酢酸生成中に生じた中間生成物がバイオガス合成の最終ステップとしてのメタン生成中にバイオガスに変換されることを意味している。したがって、発酵プロセスは高負荷が長く持続する場合にも良好に進行するため、有機中間生成物の増加は生ずることがなく、それゆえ、発酵プロセスの長期安定性が保証されることが示された。

【0107】

図6は、図4および5に関連してすでに説明した発酵プロセス中の、発酵槽内の乾燥物質含有量および容積負荷を示している。同図には、容積負荷[$\text{kg o T S} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$] (符号10で表された曲線)、乾燥物質含有率(符号110Aで表された曲線)および有機乾燥物質の含有率(符号110Bで表された曲線)のそれぞれの時間的推移が示されている。

10

【0108】

テスト235日目に行われた、クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 純粋培養物の最初の添加時点に、発酵槽は有機乾燥物質約4.5 $\text{kg} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ の容積負荷で運転された。プラントの容積負荷はクロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*) S B G 1の添加の結果、さらに増加させることができた。その際、乾燥物質または有機乾燥物質の含有率はほぼ不変のままであった。この観察から、発酵基質の発酵中に非発酵有機乾燥物質の蓄積は生じないと容易に推定することができる。したがって、クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*) S B G 1の純粋培養物の添加は発酵基質に含有された乾燥物塊の連続的な変換に寄与し、これがまたも、乾燥物質の蓄積が回避されることによって、連続的な発酵を導くことになる。

20

【0109】

バイオガスプラントが一定の容積負荷で運転されている期間は、乾燥物質の減少が観察され、そしてそのことは、クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*) S B G 1 微生物が、その加水分解物質代謝活性によって乾燥物質が発酵槽に蓄積するのを減少させるだけでなく、この乾燥物質の加水分解も助長することを意味する。

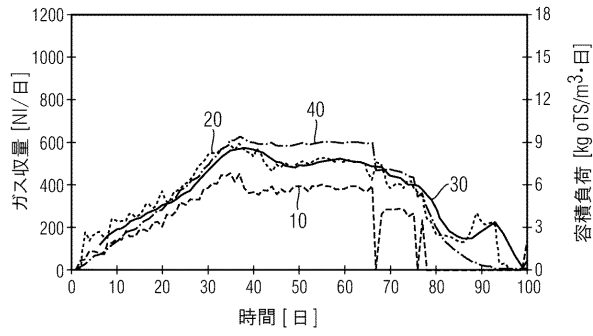
【0110】

したがって、図4～6は、加水分解活性を有する発酵性微生物クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*) S G B 1の添加が有機乾燥物質の加水分解に及ぼす好適な効果を裏付けている。微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)の添加により、その他についてはまったく同一の条件下で、発酵槽の容積負荷は、発酵プロセスが不安定化する徴候すら現れることなく、約5.5 $\text{kg o T S} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ からおよそ8.5 $\text{kg o T S} / \text{m}^3 \cdot \text{日}$ に高めることができ、したがって50%以上も増強させることが可能である。また、容積負荷の高まりと並行して、生成されるバイオガスの量も倍増する。加えてさらに、微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)を添加しない場合よりも著しく多量の有機乾燥物質が分解されるため、バイオガスの収率も増大する。微生物種クロストリジウム・サルタゴフォルムム(*Clostridium sartagoformum*)の使用はバイオガスプラントの能率および効率の飛躍的な改善をもたらす。

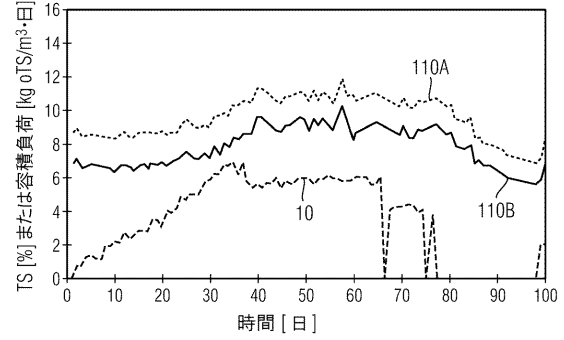
30

40

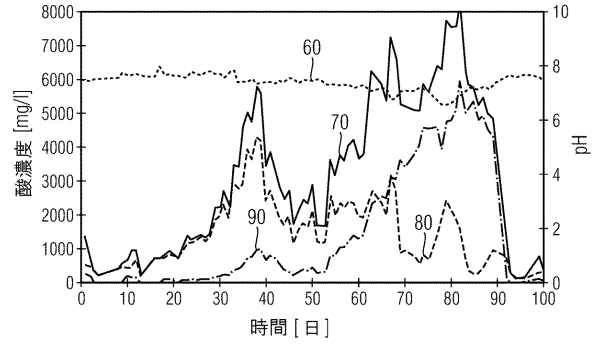
【図 1】



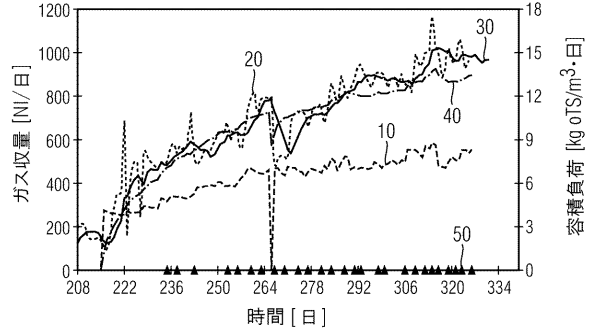
【図 3】



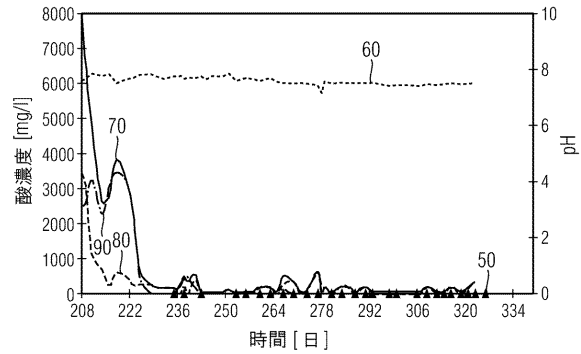
【図 2】



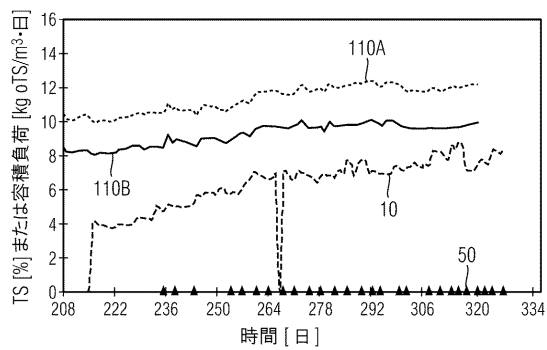
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0005469092000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ドゥホウ、ヴェラ
ドイツ連邦共和国、8 8 4 7 1 ラウプハイム、フリートリッヒ - ガウス ヴェーク 7
- (72)発明者 ファーター、ダニエル
ドイツ連邦共和国、0 2 9 5 3 バット ムスカウ、パウツェナー シュトラーセ 5 7

審査官 北田 祐介

- (56)参考文献 特開2005 - 270046 (JP, A)
国際公開第2006 / 119052 (WO, A1)
国際公開第2006 / 056819 (WO, A1)
特開2006 - 110495 (JP, A)
特開2006 - 314920 (JP, A)
特開2006 - 255580 (JP, A)
特開2006 - 223962 (JP, A)
国際公開第2005 / 077845 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C12P 5 / 02
C12R 1 / 145
CAplus / MEDLINE / BIOSIS / WPIDS (STN)
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
PubMed
Science Direct