

II-628

高級脂肪酸の嫌氣的分解過程における硫酸塩還元菌の役割

長岡技術科学大学 学 ○山口隆司, 久野智明

長岡技術科学大学 正 原田秀樹, 正 桃井清至

1. はじめに 脂質の加水分解より生成される高級脂肪酸の嫌氣的分解は、 β -酸化を行なう水素生産性酢酸生成菌と、その代謝物である水素と酢酸を最終的にメタンにまで分解するメタン生成細菌とが共生する生態系により遂行される。一方、嫌気性微生物群の生態系に硫酸塩還元菌（SRB）が存在すると、生態系は種々の影響を受けることが報告されている。本研究では、SRBが高級脂肪酸の嫌氣的分解過程に如何に寄与するかについて、高級脂肪酸濃度が一定で硫酸塩濃度の異なる条件において培養した汚泥を、代謝活性試験とSRBの高級脂肪酸分解特性評価実験（SRBが高級脂肪酸を直接利用するか否かを判定する実験）に供して検討した。

2. 実験方法 種汚泥に、脂質リッチの排水処理を行っていたグラニュー汚泥を嫌氣的条件下で分散処理した汚泥を用い、供試汚泥を3種培養した。供試汚泥の培養は、720mlのバイアル瓶を用いバッチ方式で行なった。馴養基質パルミチン酸（基質供給時濃度=1000mgCOD/l）に対して、それぞれ基質供給時硫酸塩濃度を約600, 300, 0mg/lとして培養した（以下、Sludge-A (600), Sludge-B (300), Sludge-C (0) とする）。いずれの汚泥も培養開始後2週間程度で、供給時濃度1000mgCOD/lのパルミチン酸を、およそ24時間以内に完全に分解するようになった。（A）活性評価：培養された3種の汚泥と種汚泥に対して、テスト基質パルミチン酸、酢酸、水素についてメタン生成活性（硫酸塩添加系と無添加系の両系）のおよび硫酸塩還元活性を求めた（120mlのバイアル瓶を用いた。バイアル内には、無機塩、還元剤、酸化還元指示薬、緩衝液（pH7.0 $\pm$ 0.2）を含む。35 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cの条件下で、経時的にガス組成、ガス生成量、硫酸塩濃度を測定した）。（B）SRBの高級脂肪酸分解特性評価実験：バイアル内の条件をPhase1からPhase4の間で変化させ、SRBが高級脂肪酸を直接分解するか評価する。Phase1：パルミチン酸を基質とした活性試験（A）と同条件の培地でパルミチン酸の分解を図る。Phase2：クロロホルム、酢酸を注入し、更

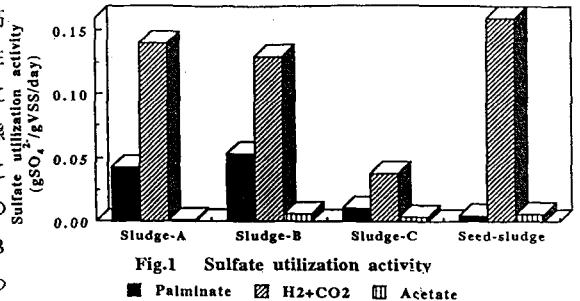


Fig.1 Sulfate utilization activity

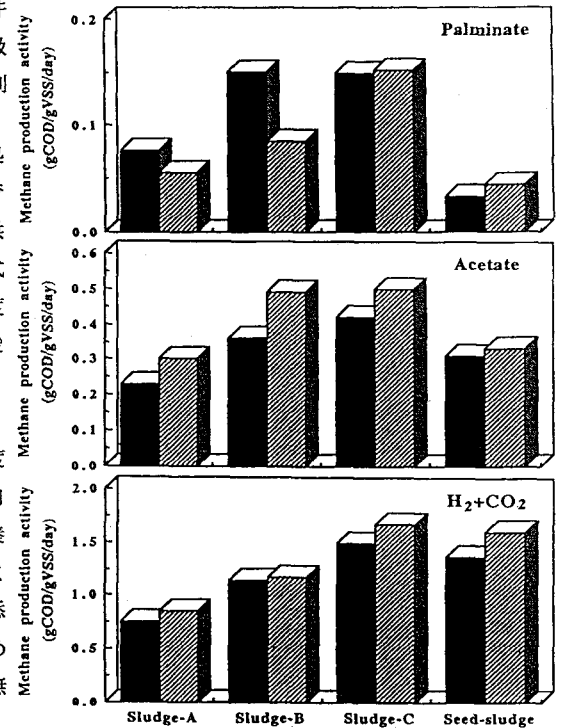
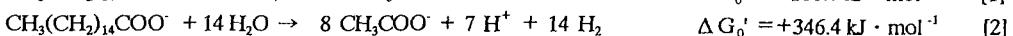
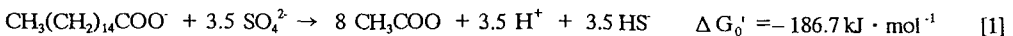
■ Palmitate ▨ H₂+CO₂ □ Acetate

Fig.2 Methane production activity

■ with SO₄ ▨ without SO₄

$$\Delta G \text{ (kJ/reaction)} = -186.7 + 5.89 \log \left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]^8 [\text{H}^+]^{3.5} [\text{HS}^-]^{3.5}}{[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-] [\text{SO}_4^{2-}]^{3.5}} \right) \quad [3]$$

$$\Delta G \text{ (kJ/reaction)} = +346.4 + 5.89 \log \left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]^8 [\text{H}^+]^7 \{P_{\text{H}_2}\}^{14}}{[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-] [\text{H}_2\text{O}]^{14}} \right) \quad [4]$$

にバイアル気相部を水素ガスで置換し、水素生産性酢酸生成菌によるパルミチン酸の分解反応（[1] 式）が熱力学的に進行しない環境（自由エネルギー ΔG が正）とする。Phase3：硫酸塩を添加し（SRBによるパルミチン酸分解反応（[2] 式）の ΔG は負）、パルミチン酸が硫酸塩の減少を伴って分解されるか否かを定性する。Phase4：バイアル内へモリブデン酸ナトリウム溶液を注入し、硫酸塩還元反応を停止させる。ただし、パルミチン酸の分解反応の ΔG は、[1] と [2] の化学量論式を基に、[3] 式（硫酸塩還元反応）と [4] 式（水素生産性酢酸生成反応）より求めた（図5参照）。また、硫化物の濃度は、硫酸塩の減少量に対して pH と温度補正を行ない計算より求めた（イオン強度=1）。

3. 実験結果・考察 図1に各テスト基質における硫酸塩還元活性を示す。パルミチン酸基質（培養52日目）では、Sludge-A、-Bの活性が種汚泥に比べ10倍程度高くなった。水素基質（培養40日目）では、Sludge-A、-Bと種汚泥の活性に有為な差はなかった。酢酸基質（培養52日目）での活性は、すべての汚泥とも、他の基質に比べて極めて低かった。図2に各テスト基質におけるメタン生成活性を示す（培養経過日数は、いずれも硫酸塩還元活性評価と同じ）。メタン生成活性は、いずれのテスト基質とも Sludge-C > Sludge-B > Sludge-A の傾向となった。テスト基質間のメタン生成活性を比較すると、水素 > 酢酸 > パルミチン酸となり、パルミチン酸の分解が、パルミチン酸をメタンにまで分解する過程の律速となっていることが示された。Sludge-A、-Bについてパルミチン酸からのメタン生成活性を、硫酸塩添加系と無添加系を比較した場合、硫酸塩が添加されている系のメタン生成活性が高かった。これより、SRBがパルミチン酸を直接分解し、酢酸生成の役割を果たしていることが考えられる。図3、4、5にSRBの高級脂肪酸分解特性定性実験の結果を示す。水素生産性酢酸生成菌の反応の ΔG が正である環境（図5はSludge-Aを供試汚泥として実験を行なった結果であるが、Sludge-B、Cも同様にPhase2以降では $\Delta G > 0$ であった）に、硫酸塩を添加した結果、Sludge-A、-Bではパルミチン酸の分解が硫酸塩の減少とともに進んだ。特にSludge-Aではパルミチン酸の分解活性が、Phase3 > Phase1となった。この結果より、 $\text{g-SO}_4^{2-} / \text{g-COD} = 0.6 \sim 0.3$ の環境で培養された汚泥では、パルミチン酸がSRBに直接分解されることが分かった。

4. まとめ 本研究で得られた知見をまとめる。

- 1) SRBは、パルミチン酸の分解過程において H_2 scavenger としてのみでなく、直接パルミチン酸を分解することに寄与する。
- 2) SRBは、メタン発酵プロセスにおいてメタンの前駆物質生成に寄与する。

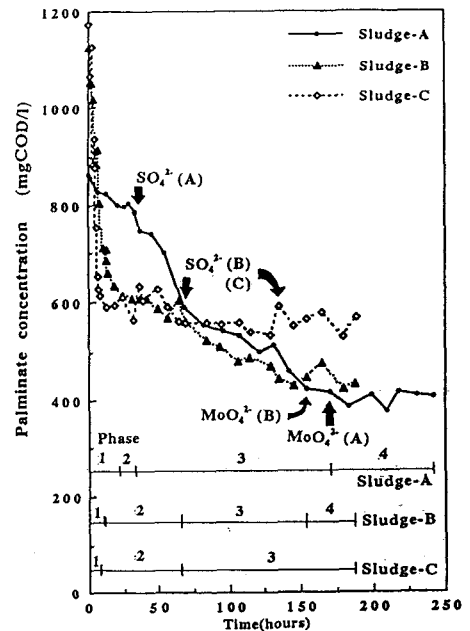


Fig.3 Influence of SO_4^{2-} addition on palmitate degradation (Phase1: Palmitate was added as substrate without SO_4^{2-} ; Phase2: 5mg/l of CHCl_3 and HAc (1550mg/l for Sludge-A, 907mg/l for Sludge-B and 828mg/l for Sludge-C) were added. Gas phase of vial was replaced with H_2 ; Phase3: SO_4^{2-} was added (see Fig.4); Phase4: 20mM of MoO_4^{2-} was added)

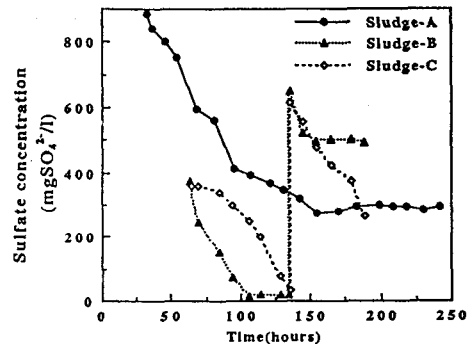


Fig.4 Change in sulfate concentration by sludges A, B and C.

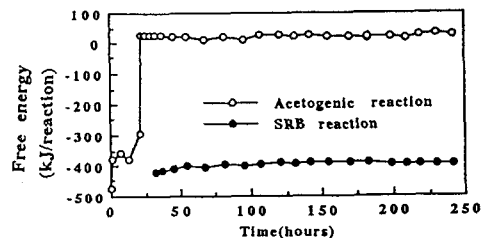


Fig.5 Driving forces of SRB and acetogenic reaction for Sludge-A. Free energy was calculated according to equations [3] and [4].