

中温および高温メタン発酵に及ぼす高級脂肪酸の阻害効果の比較

褚春鳳¹・李玉友²・宮原高志³・野池達也⁴

¹学生会員 工修 東北大学博士後期課程学生 工学部土木工学科 (〒980-77 仙台市青葉区荒巻字青葉)

²正会員 工博 アタカ工業(株)技術研究所 (〒551 大阪市大正区船町2丁目2-11)

³正会員 工博 東北大学講師 工学部土木工学科 (〒980-77 仙台市青葉区荒巻字青葉)

⁴正会員 工博 東北大学教授 工学部土木工学科 (〒980-77 仙台市青葉区荒巻字青葉)

中温および高温条件における酢酸酸化性メタン生成に対する高級脂肪酸の阻害特性を回分実験を通して比較検討を行った。飽和高級脂肪酸はデカン酸 [C_{10:0}], ラウリン酸 [C_{12:0}], ミリスチン酸 [C_{14:0}], パルミチン酸 [C_{16:0}] およびステアリン酸 [C_{18:0}] を用い、不飽和高級脂肪酸はエライジン酸 [C_{18:1}(trans)], オレイン酸 [C_{18:1}(cis)], リノール酸 [C_{18:2}], リノレン酸 [C_{18:3}] を用いた。中温と高温のいずれの条件においても不飽和高級脂肪酸である C_{18:2}, C_{18:3}, C_{18:1}(cis) による阻害効果は最も強く、その次は C_{12:0}, C_{14:0}, C_{10:0} であり、C_{16:0}, C_{18:0} および C_{18:1}(trans) による阻害効果は比較的小さかった。高級脂肪酸による阻害効果は高温条件で著しく緩和されている。

Key Words : acetate, anaerobic treatment, inhibition, long-chain fatty acid, methanogenesis, mesophilic, thermophilic

1. はじめに

嫌気性処理は好気性処理法に比べ、(1)ばっ気が不要なのでエネルギーを節約できる、(2)余剰汚泥の発生量が少ない、(3)メタンガスを回収利用できる等の利点がある。また、嫌気性ろ床法およびUASBリアクターに代表される高効率プロセスの採用により、COD負荷を10ないし数10 kg/m³/dまで高めることができる。この値は好気性活性汚泥法の実用負荷(1 kg/m³/d以下)の数10倍に当たる。従って、中・高濃度工場排水の処理における嫌気性プロセスの採用は、処理コストの低減、有価資源の回収および所用敷地の節約につながる。このような利点があるため、近年、嫌気性処理プロセスの応用範囲の拡大を目標とする様々な研究が内外において活発に行われている¹⁾。

脂質は食品工場排水、下水汚泥、食堂排水、都市下水、パーム油工場排水などに40~33,000mg/Lの濃度で含まれており、特に下水汚泥の場合は、全CODの42%、食堂排水は30%、都市下水は20~25%を脂質が占めている²⁾。脂質の加水分解によって生成する高級脂肪酸(LFA)はその嫌気的分解過程で次のような問

題があるため、難分解性または阻害性物質と見なされている。

(1) LFAの嫌気的分解は水素生成性酢酸生成細菌により行われ、その反応が熱力学的に不利なため、酢酸または水素利用細菌との共生反応は必要不可欠である。そのため、LFA分解は、β-酸化の生成物である水素に阻害されることもあり、分解システム全体の律速段階となりがちである。

(2) LFAは、特に(酢酸、水素利用者である)メタン生成細菌に対して吸着阻害性を有するため、高濃度のLFAはメタン発酵プロセスを失敗させる原因物質となる³⁾。

このように、LFAは嫌気性処理において蓄積し易く、その結果、汚泥の沈降性を悪化させたり、微生物の働きに阻害作用をもたらしたりして、処理効果に悪影響を及ぼす場合が多い。これらの問題を解決するために、嫌気性処理におけるLFAの挙動に関する研究が注目を集めている。

LFAは中温嫌気性細菌に対して強い阻害効果を有することはすでに花木ら⁴⁾、Kosterら⁵⁾、Prinsら¹⁰⁾及び亀井ら¹¹⁾に報告されている。また、花木ら⁴⁾はCa²⁺、

Mg²⁺の添加により、中性pH域において水中に陰イオンとして存在するLFAがそれと結合して不溶性の石けんかすを形成させることで、LFAによる阻害を緩和することができたことを報告している。Komatsuら¹²⁾は不飽和LFAの阻害性は飽和LFAより強いことに着目して、二相消化法を採用することで、阻害効果の強い不飽和LFAを酸生成相で飽和LFAに変換させ、メタン生成相におけるLFAの阻害性を軽減できたことを報告している。Akiら¹³⁾は粒子状活性炭の添加により、LFAの吸着性を促進し、遊離LFAの濃度を減少させることで、LFAによる阻害効果を緩和できると同時に、粒状活性炭は共生微生物の増殖、固定化に寄与し、結果としてLFAの分解反応を促進したことを見出した。このように、既往の研究は大きく分けて(1)嫌気性処理に及ぼすLFAの阻害効果の把握と緩和方法の検討、(2)嫌気性処理におけるLFAの分解の促進という二つの課題に集約されている。しかし、従来の研究は中温処理に集中しており、LFAの分解性および阻害性に対する温度の影響はほとんど知られていない。

嫌気性処理は反応槽温度によって無加温嫌気性処理、中温嫌気性処理(35°C前後)および高温嫌気性処理(50~55°C)に分けることができる。一般に、高温嫌気性処理の反応速度は高く、特に固体およびスラリー状の廃水に対しては中温処理と比較して高温処理の効率が高いことが報告されている¹⁴⁾。このため、糖蜜工場、コーヒー工場、フルフラール、くえん酸工場、焼酎廃液、食品工場などのような高温(温度60~90°C)・高濃度(10~120gCOD/L)排水^{2),15),20)}に対しては高温嫌気性処理が適していると考えられる。

本研究では、中温および高温におけるLFA阻害効果を比較することを目的として、酢酸資化性メタン生成反応に対する飽和LFA(C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0})および不飽和LFA(C_{18:1}(trans), C_{18:1}(cis), C_{18:2}, C_{18:3})の阻害効果について検討を行った。また、LFAによる阻害効果をそれらの化学特性及び温度条件と関連させて考察を行った。

2. 実験方法

(1) 種汚泥

本研究に用いた中温および高温種汚泥は、それぞれM流域下水処理場の中温汚泥消化槽およびT下水処理場の高温汚泥消化槽より採取した消化汚泥に酢酸を単一有機炭素源とした人工合成基質を添加して、中温(35°C)および高温(55°C)の条件でそれぞれ3ヶ月以上馴致したものである。汚泥馴致用基質の組成

Table 1 Media composition of batch culture.

Nutrient	Concentration
Sodium Acetate	1.0-2.0 g/L
Resazurine	0.002 g/L
Mineral solution ^(a)	10 ml/L
Vitamin solution ^(b)	10 ml/L
KH ₂ PO ₄	0.4 g/L
K ₂ HPO ₄	0.4 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.21 g/L
Na ₂ S·9H ₂ O	0.25 g/L
L-Cysteine·HCl·H ₂ O	0.5 g/L
NaHCO ₃	4.36 g/L
pH	7.0 - 7.2

(a) Contains, in grams per liter of distilled water: N(CH₂COOH)₃, 4.5; FeCl₂·4H₂O, 0.4; CoCl₂·6H₂O, 0.12; AlK(SO₄)₂, 0.01; NaCl, 1.0; CaCl₂, 0.02; Na₂MoO₄, 0.01; MnCl₂·4H₂O, 0.10; ZnCl₂, 0.10; H₃BO₃, 0.01; CuSO₄·5H₂O, 0.01; NiCl₂·6H₂O, 0.02.

(b) Contains, in milligrams per liter of distilled water: biotin, 2; folic acid, 2; pyridoxine HCl, 10; thiamine HCl, 5; riboflavin, 5; nicotinic acid, 5; DL-calcium pantothenate, 5; Vitamin B₁₂, 0.1; p-aminobenzoic acid, 5; lipoic acid (DL-thioctic acid), 5.

(mg·L⁻¹)は、酢酸: 5000; (NH₄)₂HPO₄: 700; MgSO₄·7H₂O: 250; NH₄Cl: 850; KCl: 750; MgCl₂·6H₂O: 810; FeCl₃·6H₂O: 420; NaHCO₃: 6720; CoCl₂·6H₂O: 18であった。また、中温および高温の種汚泥は嫌気性ケモスタット型反応槽を用いて滞留時間10日で培養した。

(2) 試薬および培地

全てのLFAはそのナトリウム塩試薬を用いた。飽和LFAはデカン酸[C_{10:0}], ラウリン酸[C_{12:0}], ミリスチン酸[C_{14:0}], パルミチン酸[C_{16:0}]およびステアリン酸[C_{18:0}]を用い、不飽和LFAはエライジン酸[C_{18:1}(trans)], オレイン酸[C_{18:1}(cis)], リノール酸[C_{18:2}], リノレン酸[C_{18:3}]を用いた。C_{16:0}は東京化成工業株式会社の薬品を用いた。それ以外のLFAは和光工業株式会社の薬品を用いた。Table 1は阻害実験用基礎培地を示した。LFA濃度はこの酢酸を単一有機炭素源とした基礎培地に添加するLFA量を変化させて調整した。

(3) 阻害実験の操作および分析方法

本研究に用いた実験装置は120mlのバイアル瓶をそれぞれ35°Cおよび55°Cの恒温振盪培養槽に設置したものである。バイアル瓶には、それぞれ種汚泥40mlとLFA濃度を調整した培地40mlを注入した。また、阻害実験では種汚泥が空気と接触することを避けるため、バイアル瓶の気相部をN₂(80%)+CO₂(20%)の混合ガスで換気しながら注射器を用いて種汚泥40mlを注入し、速やかにプシルゴム栓とアルミ製締金属で密栓した。次に注射器を用いてLFA濃度を調整した培地40mlを注入し、1分間ほど換気した。また、pHによるメタン生成細菌への阻害の影響を無視するため、この時点でpH7.1程度になるように調整した。

種汚泥の菌体濃度は阻害実験直前に測定した。実験期間中、ガス生成量およびガス組成を測定した。ガス生成量はゴム栓に注射器を差し込むことによって定量した。ガス組成(N₂, CO₂, CH₄)はTCD式ガスクロマトグラフを用いて測定した。pHは下水試験法に従って測定した。本研究ではLFAが菌体に付着することによる影響を除くためにタンパク質濃度を菌体量の指標とした²¹⁾。タンパク質の定量はLowry法により行い、(菌体タンパク質)/(VSS)=0.6²²⁾の換算係数を用いて菌体VSS量を算出した。

3. 実験結果

(1) 異なるLFA濃度条件下でのメタン生成活性の求め方

中温35°Cおよび高温55°Cの条件で、酢酸を基質とした培地に、飽和LFA(C_{10,0}, C_{12,0}, C_{14,0}, C_{16,0}, C_{18,0})および不飽和LFA(C_{18,1}(trans), C_{18,1}(cis), C_{18,2}, C_{18,3})をそれぞれ添加して、一連の回分実験を行い、酢酸資化性メタン生成反応に対する各LFAの阻害特性を検討した。Fig. 1に一例として高温実験における累積メタン生成量の経時変化に及ぼすC_{12,0}濃度の影響を示した。実験の初期において各条件での累積メタン生成量は時間の経過とともに直線的に増加しており、その直線の傾きは各C_{12,0}濃度条件下でのメタン生成活性を表している。ここで求めたメタン生成活性はC_{12,0}濃度の増大に伴って変化している。本研究では各LFA濃度におけるメタン生成活性(ACT)を次のように定義した。

$$ACT = \frac{V_i}{V_0} \quad (1)$$

ここで、

- V₀ : 阻害剤がない時の基質分解活性
- V_i : 阻害剤がある時の基質分解活性

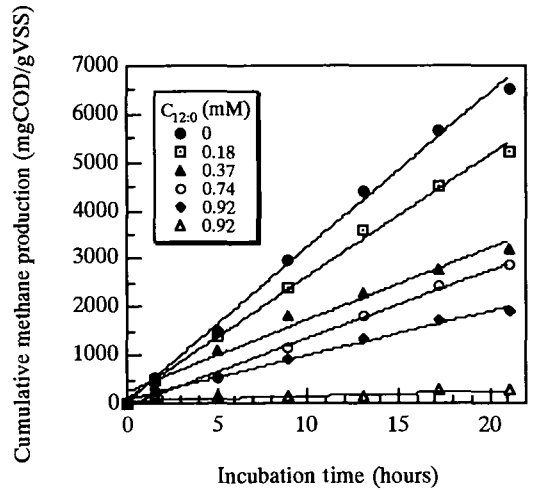


Fig. 1 Cumulative methane production at different concentration of C_{12,0} in thermophilic condition.

Han and Levenspielら²³⁾の研究によれば、最大比基質利用速度に及ぼす阻害剤添加濃度の影響は次式で表される。

$$k^* = \left[1 - \frac{C_i}{C_i^*} \right]^n \quad (2)$$

ここで、

- k* : 相対最大比基質利用速度
- C_i : 阻害剤濃度
- C_i* : 活性がなくなる阻害剤の限界濃度
- n : 定数

本研究で定義したACTは式(2)のk*に相当することおよびLFAによる阻害は菌体量と関係していることから、ACTに対する同一阻害物の影響を式(3)で表現できると考えて、得られた実験データを解析した結果をFig. 2に示す。

$$ACT = \left[1 - \frac{L_i}{L_i^*} \right]^z \quad (3)$$

ここで、

- L_i : 阻害剤負荷
- L_i* : 活性がなくなる阻害剤の限界負荷
- z : 定数

Fig. 2において点は実験データを示し、曲線は実験データに基づき式(3)より解析した最終結果の回帰曲線を示している。

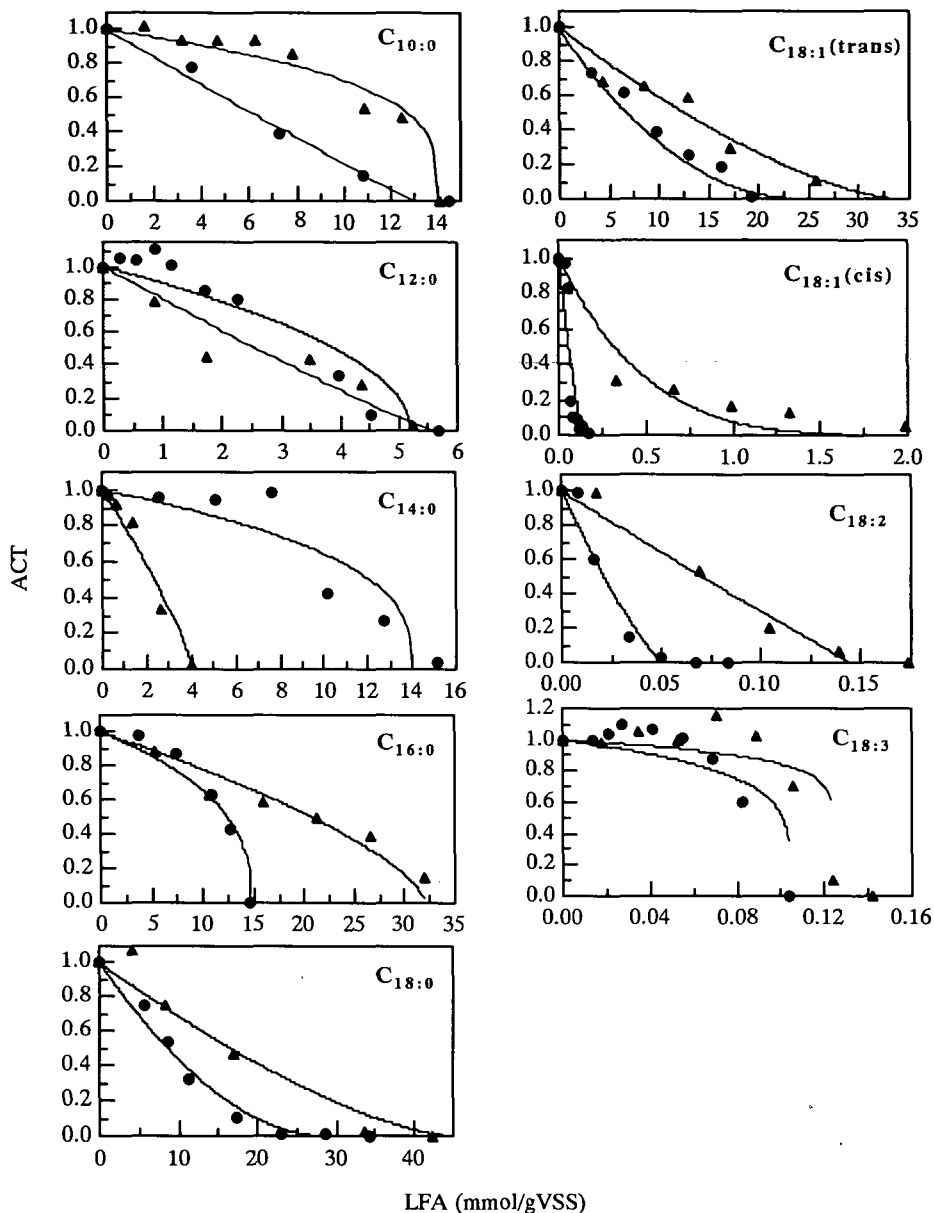


Fig. 2 Inhibition of relative activities by LFA. Symbols: ● experimental date at 35°C; ▲ experimental date at 55°C. Curves in figures are theoretical predictions fitted to the date.

(2) 中温および高温における相対メタン生成活性(ACT)に対するLFAの阻害影響

Fig. 2は中温および高温条件下での相対メタン生成活性ACTに及ぼす各種LFA荷の影響を示している。C_{14:0}を除いてあらゆる実験条件においてLFAによる阻害効果は高温の方が低いことが明らかである。これらの結果はLFAによるメタン生成活性への阻害が高温嫌気性処理を行うことで緩和されることを示唆している。

また、Fig. 2は式(3)を用いて、阻害剤負荷の変化に伴うACTの変化傾向を表現できることも示している。式(3)を用いて、非線形回帰によって求めた中温および高温条件下での各LFAの限界負荷 L_i^* と阻害指数 z の値をTable 2に示す。これらのパラメータの有意性を検定するため、t-テストを行った。実測値と計算値の相関係数 R^2 、t値および信頼区間をTable 2にまとめた。相関係数は0.831以上であった。式(3)を用いて阻害剤負荷に対するACTの変化傾向が表現でき

Table 2 Summary of the inhibition coefficients and statistic indicators obtained using equation (3) to analyze the experimental data show in Fig. 2.

LFA	35°C					55°C				
	inhibition coefficients		statistic indicators			inhibition coefficients		statistic indicators		
	L_i^* (mmol/gVSS)	z	R^2	t-value	Confidence intervals	L_i^* (mmol/gVSS)	z	R^2	t-value	Confidence intervals
$C_{10:0}$	13	1.1	0.988	5.06	99%	14	0.3	0.929	1.89	90%
$C_{12:0}$	5.2	0.50	0.963	1.86	90%	5.6	1.1	0.862	2.77	95%
$C_{14:0}$	14	0.35	0.831	2.89	97%	4.0	0.8	0.979	2.42	94%
$C_{16:0}$	15	0.37	0.985	2.67	96%	32	0.7	0.958	3.11	98%
$C_{18:0}$	29	2.0	0.981	4.15	99%	45	1.5	0.959	2.41	93%
$C_{18:1}$ (trans)	23	1.6	0.990	3.45	99%	34	1.5	0.941	2.64	95%
$C_{18:1}$ (cis)	0.14	1.3	0.866	1.93	91%	2.7	5.5	0.942	2.03	91%
$C_{18:2}$	0.051	1.3	0.953	2.51	93%	0.14	1.0	0.980	2.70	95%
$C_{18:3}$	0.10	0.20	0.933	1.86	90%	0.12	0.10	0.911	1.94	90%

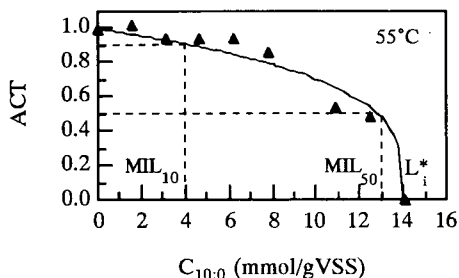


Fig. 3 Determination of MIL_{10} MIL_{50} by using experimental data and equation (3).

Table 3 Comparison of MIL_{10} and MIL_{50} for various LFA at mesophilic and thermophilic condition.

LFA	MIL_{10} (mmol/gVSS)		MIL_{50} (mmol/gVSS)	
	35°C	55°C	35°C	55°C
$C_{10:0}$	1.2	4.4	6.3	13
$C_{12:0}$	1.0	0.50	3.9	2.6
$C_{14:0}$	3.6	0.50	12	2.3
$C_{16:0}$	3.7	4.7	12	21
$C_{18:0}$	1.5	3.1	8.6	17
$C_{18:1}$ (trans)	1.4	2.3	8.0	13
$C_{18:1}$ (cis)	0.011	0.051	0.057	0.32
$C_{18:2}$	0.0040	0.014	0.021	0.071
$C_{18:3}$	0.043	0.079	0.10	0.12

る場合、 L_i^* が小さいほど阻害性が大きく、また z が大きいほどACTの低下はより低い濃度で起きる。**Table 2**に示したように、同一のLFAに対して高温での L_i^* 値は中温のそれより高く、高温で阻害効果は若干緩和されたことを意味している。また同じ温度条件では飽和LFAの L_i^* は $C_{12:0}$ が5.2mmol/gVSSと一番小さく、 $C_{10:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ の間では炭素数の増加に伴って大きくなっている。これはLFAによるメタン生成反応への阻害効果は炭素数の増加に伴い、低くなることを意味している。さらに、 C_{18} に関しては飽和および不飽和の L_i^* を比較すると、不飽和の C_{18} は飽和の $C_{18:0}$ に比べてより大きい阻害効果を示した。

一方、工学的見地からは、活性がゼロになる阻害剤負荷よりも微生物の代謝活性に顕著な阻害効果をもたらす始める阻害剤負荷の方がより重要な意味を持つ。ここでは活性が10%低下した場合に反応槽の運転に明らかな影響を与えると考え、阻害を防止する

ための最大許容負荷として MIL_{10} を用いた。また、一般に活性を50%低下させる阻害剤濃度は MIC_{50} と呼ばれており阻害研究で最もよく用いられる指標である⁹⁻¹¹⁾が、本研究で用いたLFAによる阻害は菌体量と重要な関係があるため活性を50%低下させる阻害剤負荷である MIL_{50} を用いる方が適している。そこで**Fig. 3**に示すようにメタン生成活性に10%および50%の低下をもたらすLFAの負荷を MIL_{10} および MIL_{50} と定義した。**Table 3**には中温および高温における各種LFAの MIL_{10} および MIL_{50} を式(3)と**Table 2**に示したパラメータを用いて算出した結果をまとめた。同一のLFAに対する高温での MIL_{10} および MIL_{50} は中温のそれより高く、中温条件での阻害効果が大きいことを示唆している。同じ温度条件で比較すると、飽和LFAの MIL_{10} と MIL_{50} は $C_{12:0}$ が最も小さく、全体の傾向として炭素数の増加に伴って大きくなった。即ち、炭素数が少ないほど阻害効果が強い傾向がある。な

お、同じ C_{18} の飽和 LFA および不飽和 LFA の阻害効果を比較すると、中温における MIL_{10} と MIL_{30} の大きさはいずれも $C_{18.2} < C_{18.1}(\text{cis}) < C_{18.3} < C_{18.1}(\text{trans}) < C_{18.0}$ であるのに対して、高温における MIL_{10} の大きさは $C_{18.2} < C_{18.1}(\text{cis}) < C_{18.3} < C_{18.1}(\text{trans}) < C_{18.0}$ であり、 MIL_{30} の大きさは $C_{18.2} < C_{18.3} < C_{18.1}(\text{cis}) < C_{18.1}(\text{trans}) < C_{18.0}$ となった。不飽和 LFA は飽和 LFA よりも強い阻害効果を有しており、また不飽和 LFA の中でも $C_{18.2}$, $C_{18.3}$, $C_{18.1}(\text{cis})$ の阻害効果は大きかった。

4. 考察

(1) LFA の分子構造と阻害性との関係

LFA は細菌に吸着して阻害を起こすことから^{8),21)}、阻害強さは菌体当りの LFA 負荷量で表す方が適している。LFA による細菌の代謝活性への阻害効果については部分的ではあるが幾つかの報告がある⁹⁾⁻¹¹⁾。Koster ら⁹⁾は、UASB プロセスのグラニュールを用いて、30°C で酢酸酸化性メタン生成に対する LFA の阻害実験を行い、 $C_{10.0}$ 、 $C_{12.0}$ 、 $C_{14.0}$ 、 $C_{18.1}(\text{cis})$ の MIL_{30} 値はそれぞれ 0.98, 0.72, 0.80 および 0.73 mmol/gVSS であったことを報告している。亀井ら¹¹⁾は、ショ糖で馴致したグラニュールを用い、35°C で酢酸酸化メタン生成に対する LFA の阻害実験を行った結果、 $C_{10.0}$ 、 $C_{12.0}$ 、 $C_{14.0}$ 、 $C_{16.0}$ 、 $C_{18.0}$ 、 $C_{18.1}(\text{cis})$ の MIL_{30} 値はそれぞれ 1.33, 0.14, 0.09, 0.36, 0.7 および 0.03 mmol/gVSS であったことを報告した。このように従来の研究は中温嫌気性処理に集中している。本研究では 9 種 LFA のそれぞれの阻害効果を系統的に検討した結果、中温の MIL_{30} は $C_{10.0}$: 6.3, $C_{12.0}$: 3.9, $C_{14.0}$: 12, $C_{16.0}$: 12, $C_{18.0}$: 8.6, $C_{18.1}(\text{trans})$: 8.0, $C_{18.1}(\text{cis})$: 0.057, $C_{18.2}$: 0.021, $C_{18.3}$: 0.10 mmol/gVSS であって、全体として Koster ら⁹⁾ および亀井ら¹¹⁾ の報告値より高かった。

LFA による細菌の代謝活性への阻害効果は LFA の分子構造と密切な関係がある。Koster ら⁹⁾の研究では、阻害効果強さの順は $C_{12.0} > C_{18.1} > C_{14.0} > C_{10.0} > C_{8.0}$ であり、飽和 LFA 中で $C_{12.0}$ による阻害が最も強いとされている。亀井ら¹¹⁾の研究では、阻害強さは $C_{18.1} > C_{14.0} > C_{12.0} > C_{16.0} > C_{18.0} > C_{10.0} > C_{8.0}$ であり、飽和 LFA では $C_{14.0}$ による阻害が最も強いことが明らかにされている。Galbraith ら²⁴⁾は、純粋培養した数種類の細菌の活性に及ぼす飽和 LFA および不飽和 LFA の阻害効果を比較した結果、飽和 LFA の阻害の強さは、 $C_{8.0} < C_{10.0} < C_{12.0} \geq C_{14.0} > C_{16.0} \geq C_{18.0}$ であり、 $C_{12.0}$ と $C_{14.0}$ による阻害効果が大きかったと報告している。また、不飽和 LFA については、 $C_{18.0} < C_{18.1}(\text{trans}) < C_{18.1}(\text{cis}) < C_{18.2} \leq C_{18.3}$ の順番になっており、 $C_{18.2}$ と $C_{18.3}$ による阻害効果は特に大きかった。本研究では飽和 LFA

の場合、中温において $C_{12.0} > C_{10.0} > C_{18.0} > C_{14.0} = C_{16.0}$ であるのに対して、高温では $C_{14.0} > C_{12.0} > C_{10.0} > C_{18.0} > C_{16.0}$ であった。また、 C_{18} で比較すると、中温において、 $C_{18.2} > C_{18.1}(\text{cis})$, $C_{18.3} > C_{18.1}(\text{trans}) > C_{18.0}$ であるのに対して、高温では $C_{18.2} > C_{18.3} > C_{18.1}(\text{cis}) > C_{18.1}(\text{trans}) > C_{18.0}$ であった。つまり、飽和 LFA では、 $C_{12.0}$ 、 $C_{14.0}$ による阻害効果が大きく、不飽和 LFA では $C_{18.2}$ 、 $C_{18.1}(\text{cis})$ 、 $C_{18.3}$ による阻害効果が大きかった。

(2) LFA の疎水性と阻害性との関係

LFA による阻害効果は LFA の溶解性、疎水性および分子の表面面積と関係することが指摘されており²⁴⁾、LFA が阻害効果を表すためには水に溶解する必要があることから、水への溶解性が高いほど阻害効果は大きくなり、LFA の疎水性が大きいかほど LFA と細菌の親和性が高まることから阻害効果は大きくなる。飽和 LFA は炭素数の増加に従って溶解性が低下し、疎水性が増大するため、溶解性および疎水性による総合的阻害効果は中温においては $C_{12.0}$ で最大となり、結果として $C_{12.0}$ による阻害効果が一番高くなると考えられており²⁴⁾、本研究の場合も中温では $C_{12.0}$ による阻害効果が最も高い傾向を示した。 C_{18} 不飽和 LFA の場合 ($C_{18.1}(\text{trans})$ 例外) 飽和 LFA と違い、水和物として水に溶解することから、水への溶解性と高い疎水性を併せ持つため阻害性が強くなる²⁴⁾。また、5 種類の C_{18} による阻害効果が異なることは溶解性とその界面特性の違いが原因と考えられる。不飽和 LFA は飽和 LFA より分子の表面面積が大きく、cis 型は trans 型より表面面積が大きいこと²⁴⁾が明らかになっており、LFA の表面面積が大きいかほど阻害性は強くなることから、本研究で阻害性の強さが $C_{18.1}(\text{trans}) > C_{18.0}$ となった原因は LFA の表面面積の増大であり、 $C_{18.1}(\text{cis}) > C_{18.1}(\text{trans})$ の原因は溶解性と表面面積が増加するためであると考えられる。また、二重鎖数が増加するほど阻害性は高くなる²⁴⁾傾向と $C_{18.2}$ と $C_{18.3}$ の阻害性が高くなったことは一致した。

(3) 温度と阻害性との関係

Nemethy-Scherage²⁵⁾によると、非極性有機分子が水中に存在する時、van der Waals-London 分散力および氷状構造の生成によってエンタルピーは変化する。エンタルピーは疎水性相互作用の安定性に影響を及ぼす重要な因子であることが指摘されており、エンタルピーが大きいかほど疎水性相互作用は安定である²⁶⁾。例えば Leucine-isoleucine 間の疎水性相互作用は、70°C 以下では、温度の上昇につれて、エンタルピーが減少するため弱くなること、また、その他の結合の温度依存性も Leucine-isoleucine の結合と類似してい

ることが報告されている²⁵⁾。本研究において中温に比較して高温における阻害効果が低くなったことは、高温におけるLFAと菌体の疎水性相互作用が中温に比較して弱くなったことが原因である可能性がある。

5. 結論

中温および高温における酢酸資化性メタン生成活性に対する各種LFAの阻害特性について比較検討を行った結果、以下の結論が得られた。

- (1) $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}(\text{trans})$, $C_{18:1}(\text{cis})$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$ の各種LFAによる阻害効果は中温と比較して、高温で小さかった。即ち、多くのLFAによる阻害は高温で緩和された。
- (2) 実験した9種類のLFAの中で中温および高温のいずれの条件においても不飽和LFAである $C_{18:2}$, $C_{18:3}$, $C_{18:1}(\text{cis})$ による阻害効果は大きく、次に $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ であり、 $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ および $C_{18:1}(\text{trans})$ による阻害効果は比較的小さかった。
- (3) MIL₅₀から判断した阻害の強さは、飽和LFAで比較すると、中温では $C_{12:0} > C_{10:0} > C_{18:0} > C_{14:0} = C_{16:0}$ であるのに対して、高温では $C_{14:0} > C_{12:0} > C_{10:0} > C_{18:0} > C_{16:0}$ であった。また、 C_{18} で比較すると、中温では、 $C_{18:2} > C_{18:1}(\text{cis})$, $C_{18:3} > C_{18:1}(\text{trans}) > C_{18:0}$ であるのに対して、高温では $C_{18:2} > C_{18:3} > C_{18:1}(\text{cis}) > C_{18:1}(\text{trans}) > C_{18:0}$ となった。

参考文献

- 1) 沈振寰, 周曉俊, 李玉友, 野池達也: アミノ酸系排水の嫌気性ろ床および嫌気性ハイブリットリアクターにおける性能比較, 水環境学会誌, Vol.17, No. 2, pp. 99-108, 1994.
- 2) You, H.S.: Examples of the assessment in the food processing wastewater treatment process, *The workshop of the assessment technology of wastewater treatment process and the technology of anaerobic fluidized bed in wastewater treatment*, Shinjwu, Taiwan, pp. 4-21, 1991.
- 3) Quemeneur, M. and Marty, Y.: Fatty acids and sterols in domestic wastewaters, *Wat. Res.*, Vol. 28, No. 5, pp. 1217-1226, 1994.
- 4) Eastman, J.A. and Ferguson, J.F.: Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion, *J. WPCF*, Vol.53, No. 3, pp. 352-366, 1981.
- 5) Ma, A.N. and Ong, A.S.H.: Palm oil processing - new development in effluent treatment, *Wat. Sci. Technol.*, Vol.18, pp. 35-40, 1986.
- 6) Hanaki, K., Matsuo, T. and Kumazaki, K.: Treatment of oily cafeteria wastewater by single-phase and two-phase anaerobic filter, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 22, pp. 299-306, 1990.
- 7) 山口隆司, 原田秀樹, 桃井清至, 曾怡禎: 高級脂肪酸の

嫌気的分解過程における硫酸塩還元菌の生態学的役割, 水環境学会誌, Vol. 6, No. 18, pp. 499-510, 1995.

- 8) 花木啓祐, 松尾友矩, 長瀬道彦: 嫌気性消化における脂肪酸の代謝, 下水道協会誌, 18, 30-39, 1981.
- 9) Koster, I.W. and Cramer, A.: Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 53, pp. 403-409, 1987.
- 10) Prins, R.A., Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I.: Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 38, pp. 281-287, 1972.
- 11) 亀井昌敏, 桃井清至, 原田秀樹, 滝沢智, 津恵直美: 上昇流嫌気性スラッジベッド反応槽による脂質含有廃水の嫌気性処理, 水処理技術, Vol. 30, pp. 17-25, 1989.
- 12) Komatsu, T., Hanaki, K. and Matsuo, T.: Prevention of lipid inhibition in anaerobic processes by introducing a two-phase system, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 23, pp. 1189-1200, 1989.
- 13) Aki, I.A. and Ahring, B.K.: Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic (55°C) enrichment culture degrading long-chain fatty acids, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.7, pp. 2442-2445, 1995.
- 14) Ahring, B.K.: Status on science and application of thermophilic anaerobic digestion, *Proc. 7th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, South Africa*, pp. 328-337, 1994.
- 15) Wiegant, W.M., Claassen, J.A. and Lettinga, G.: Thermophilic anaerobic digestion of high strength wastewaters, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 27, pp.1374-1381, 1985.
- 16) Souza, M.E., Fuzaro, G. and Polegato, A.R.: Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 25, No.7, pp. 213-222, 1992.
- 17) McDougall, F.R., Anderson, G.K. and Evison, L.M.: Two-phase anaerobic digestion of coffee wastewater, *Proc. 48th Industrial Waste Conf. May 10-12, 1993, Purdue University*, pp. 677-683, 1993.
- 18) Harris, W.L., Wirtz, R.A., Sung, S. and Dague, R.R.: Anaerobic filter treatment of furfural byproduct wastewater, *Proc. 46th Industrial Waste Conf. May 14-16, Purdue University*, pp. 689-695, 1991.
- 19) Eroglu, V., Ozturk, I. and Bircan, E.: Upgrading the anaerobic contact process capacity using polyurethane carriers, *Proc. 45th Industrial Waste Conf. May 8-10, Purdue University*, pp. 417-423, 1990.
- 20) Gang, L.B. and Mori, T.: Complete treatment of shocho processed wastewater by thermophilic oxidic process, *Proc. Environ. Eng. Res.*, Vol. 30, pp. 165-174, 1993.
- 21) 小松俊哉, 花木啓祐, 松尾友矩: 嫌気性消化における不飽和高級脂肪酸阻害及び分解過程, 衛生工学研究論文集, Vol. 26, pp. 1-8, 1990.
- 22) 古米弘明, 松本明人, 松本順一郎: 嫌気性膨張床におけるメタン生成に及ぼす流入負荷の影響, 下水道協会誌, Vol. 24, No. 280, pp. 25-34, 1987.
- 23) Han, K. and Levenspiel, O.: Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 32, pp. 430-437, 1988.

- 24) Galbraith, H., Miller, T.B., Paton, A.M. and Thompson, J.K. :
 Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal
 with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol, *J.*
Appl. Bact., Vol. 34, No. 4, pp. 803-813, 1971.
- 25) Nemethy, G. and Scheraga, H.A. : The structure of water and
 hydrophobic bonding in proteins. III. The thermodynamic
 properties of hydrophobic bonds in proteins, *J. Phys.*
Chem. Vol. 66, pp. 1773-1789, 1962.
- 26)伊勢典夫：静電のおよび疎水性相互作用と機能, 化学総
 説, Vol. 17, pp. 69-90, 1977.

(1996. 3. 22 受付)

A COMPARATIVE STUDY ON THE INHIBITARY EFFECT OF LONG-CHAIN FATTY ACIDS TO MESOPHILIC AND THERMOPHILIC METHANE FERMENTATION

Chun-Feng CHU, Yu-You LI, Takashi MIYAHARA and Tatsuya NOIKE

The inhibitory effects of long-chain fatty acids (LFAs) on methane fermentation from acetate under mesophilic(35°C) and thermophilic(55°C) conditions were investigated using batch anaerobic toxicity assays. Nine LFAs, including capric C_{10:0}, lauric C_{12:0}, myristic C_{14:0}, palmitoleic C_{16:0}, stearic C_{18:0}, oleic C_{18:1} (cis), elaidic C_{18:1} (trans), linoleic C_{18:2}, linolenic C_{18:3} were used as the inhibitors. The inhibitory effect caused by LFAs under the thermophilic conditions were less than that under the mesophilic conditions and the unsaturated LFAs had higher inhibitory effect than saturated LFAs at the same temperatures. It was found that the inhibition caused by LFAs were correlated with the chemical structure and hydrophobicity of LFAs.