

嫌気性消化におけるセルロースの分解に及ぼす 可溶性デンプンおよびペプトン添加の影響

EFFECTS OF THE ADDITION OF SOLUBLE STARCH AND PEPTONE ON CELLULOSE DEGRADATION IN ANAEROBIC DIGESTION

矢口 淳一*・野池 達也**・松本 順一郎***
By Junichi YAGUCHI, Tatsuya NOIKE and Junichiro MATSUMOTO

The effects of the addition of soluble starch and peptone on cellulose degradation in anaerobic digestion were investigated using an anaerobic chemostat-type reactor at 35°C and with SRT of 2.2 and 4.8 days. The synthetic substrate containing 5 000 mg/l of cellulose powder was supplemented with the various concentrations of soluble starch and peptone. The addition of small amounts of soluble starch promoted cellulose degradation. Especially, the addition of 3 000 mg/l resulted in a 25 % increase at SRT of 4.8 days. The addition over 7 500 mg/l, however, depressed cellulose degradation because of the competition of cellulolytic and non-cellulolytic bacteria for essential mineral salts except ammonium bicarbonate. The addition of peptone was more effective than that of soluble starch, and cellulose degradation percentage increased by 42.7 % and 32.3 % at SRT of 2.2 and 4.8 days, respectively.

1. 緒 論

セルロース性物質を大量に含むバイオマスは、再生可能で豊富なエネルギー源として近年注目を集めている。嫌気性消化法は、従来から下水汚泥、し尿および高濃度有機性廃水など廃棄物バイオマスの処理に適用されており、廃棄物中に蓄積された太陽エネルギーを、メタン、エタノール、水素などの燃料、または酢酸、酪酸、ブタノール、アセトンなどの化学原料に変換することができる。

嫌気性消化法によるバイオマス中のセルロース性物質の分解は、酸、アルカリを用いる化学的分解法あるいは熱分解法、またセルロース分解酵素を用いた酵素分解法に比べ、セルロースの分解と酵素生産および燃料、化学原料の生成が単一槽で同時に進行するという利点を有する¹⁾。しかし本プロセスにおけるセルロースの分解速度は非常に遅く、それぞれの基質を単一炭素源とする動力学的研究によれば、セルロースの最大比基質分解速度はグルコースの60分の1、可溶性デンプンの40分の1にしか達しない²⁾。またメタン生成菌の動力学的特性値と

の比較から、セルロース性物質を大量に含む固形性有機物の嫌気的分解では、メタン生成過程よりむしろセルロース分解過程が全消化プロセスの律速段階であると考えられている^{3),4)}。

ところで反すう動物の第一胃(ルーメン)に関する研究では、少量のデンプン添加がセルロースの分解を促進させると報告されている^{5),6)}。しかし従来の嫌気性消化法の研究は、グルコース、酢酸などの単一基質を中心に行われ、実際の廃水により類似した混合基質を用いて基質相互間の影響を検討する研究はほとんどなされていない。

本研究は、上記の認識に基づき、嫌気性消化によるセルロースの分解を促進させることを目的として、実験Ⅰでは可溶性デンプンを、実験Ⅱではペプトンをそれぞれセルロース基質中に添加し、それらのセルロース分解に及ぼす影響について検討したものである。

2. ルーメンにおけるセルロース代謝

ルーメンにおけるセルロース代謝に関与するのはある種の嫌気性細菌で、絨毛虫類はあまり重要ではない。Bryant⁷⁾は、ルーメン中のセルロース代謝に関与する細菌群を次の4つにまとめた。

(a) セルロース分解細菌

* 学生会員 工修 東北大学大学院工学研究科博士課程学生 (〒980 仙台市荒巻字青葉)

** 正会員 工博 建設省土木研究所下水道部三次処理研究室長

*** 正会員 工博 東北大学教授 工学部土木工学科

- (b) セルロース分解細菌によって生成された可溶性炭水化物を発酵する細菌
- (c) (b) の細菌によって生成されたコハク酸，ギ酸，乳酸などの有機酸を分解する細菌
- (d) 電子供与体として他の細菌によって生産された水素とギ酸を利用して炭酸ガスを還元するメタン生成細菌

これら (a)~(d) の細菌群間の相互作用を通じて飼料中の大部分を占めるセルロースは消化される。また嫌気性消化槽内細菌叢を構成する細菌群の分類⁸⁾によれば，(a) と (b) は加水分解細菌 (hydrolytic bacteria)，(c) は水素生成アセトジェニック菌 (H_2 -producing acetogenic bacteria)，(d) はもちろんメタン生成菌に相当する。嫌気性消化ではこれ以外に酢酸を利用するメタン生成菌も重要となるが，消化槽とルーメンの細菌叢はほぼ同種の細菌群から構成されていることが知られる。

前述のようにルーメンでは少量のデンプン添加がセルロース消化を促進させるといふ現象がみられる^{5),6)}。これはルーメン細菌叢の生態と代謝が，デンプン添加によってセルロース分解細菌の栄養要求性を満足させるように変容するため生じるらしい⁹⁾。最近 Miura ら¹⁰⁾はこうした考えに基づき，Fig.1 に示した (a) のセルロース分解菌と (b) に含まれるデンプン分解菌の相互作用に関するモデルを提示した。ルーメンにおける主要なセルロース分解菌は，アミノ酸などの有機性窒素類を利用できないので窒素源としてアンモニアを必要とし，側鎖揮発性脂肪酸を含むある種の揮発性脂肪酸を栄養上要求する⁷⁾。デンプンを添加した場合これを分解する細菌の増殖収率は高く，またその自己分解係数も大きい。そのため細菌タンパク質の分解によって生じる側鎖揮発性脂肪酸量も増大し，セルロース分解菌の代謝は活発となる。こうしてルーメンでは，セルロース分解菌とデンプン分

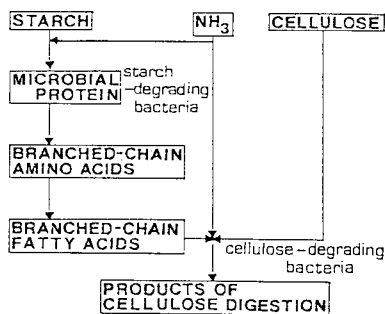


Fig. 1 Nutritional interaction between cellulolytic bacteria and non-cellulolytic (starch-degrading) bacteria with respect to certain volatile fatty acids in rumen ecosystem¹⁰⁾.

解菌を含む非セルロース分解菌との間の側鎖揮発性脂肪酸を媒介とした相互作用によってセルロースの分解が促進される。

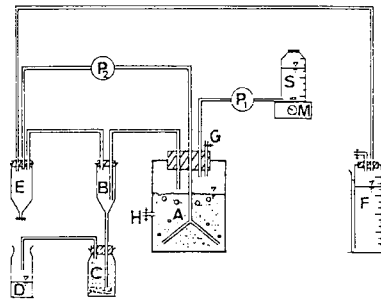
3. 実験装置，材料および方法

(1) 実験装置

実験装置は Fig. 2 に示したように，基質の連続的投入とガス循環による混合液の連続的引き抜きの可能な嫌気的ケモスタット型反応槽である^{3),11)}。基質の投入はマイクロチューブ・ポンプによって連続的に行ったが，菌体滞留時間(以下 SRT と略記) 4，8 日の系列では，チューブの目詰りを防ぐためタイマーを併用して 1 回約 30 分ずつ 1 日に 12 回に分けて間欠的に投入した。また実験装置は $35 \pm 1^\circ C$ に保たれた恒温槽内に設置した。

(2) 種汚泥

福島市下水道浄化センターの嫌気性消化槽より採取した消化汚泥を，SRT 20 日，消化温度 $35 \pm 1^\circ C$ の培養条件下で，Table 1 に示したセルロース濃度 5000 mg/l の合



- A : Reactor
- B, C, D : Mixed liquor overflow system
- E, F : Gas collection system
- G : Gas sampling port
- H : Mixed liquor sampling port
- M : Magnetic stirrer
- P₁ : Feed pump
- P₂ : Gas recirculation pump
- S : Feed cylinder

Fig. 2 Schematic of experimental apparatus.

Table 1 Composition of synthetic substrate.

Component	Concentration (mg/l)
Cellulose	5000
NH_4HCO_3	2510
K_2HPO_4	125
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	100
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	100
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	25
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	15
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.125

成基質に約5か月間馴致させた。

(3) 投入基質

Table 1 に示したセルロースを単一炭素源とする化学的合成基質を用いた。実験に使用したセルロースは粉末汙紙（東洋汙紙製；Cellulose Powder E）で、その結晶化度、比表面積、平均重合度は推定値でそれぞれ70%以上、1.5 m²/g、400~600である。

(4) 実験方法

反応槽に(2)の種汚泥を植種して約10日間 Table 1 に示した合成基質を用いて連続培養し、十分なガス発生が認められた後、以下に記したように可溶性デンプン、ペプトンをそれぞれ投入基質中に添加した。

(a) 実験Ⅰ 基質中に添加した可溶性デンプン濃度は、それぞれ0、1000、3000、5000、7500、10000 mg/l であり、また基質のC/N比を5.0に保つため可溶性デンプン添加量に応じて重炭酸アンモニウム濃度を高めた。

(b) 実験Ⅱ 基質中に添加したペプトン（極東製薬製）濃度は、それぞれ0、500、1000、2500、5000、7500、10000 mg/l である。

各系のSRTは、流入流量と反応容積の調節によって、実験Ⅰ、Ⅱともメタン生成相を含まない二相型の酸生成相に相当する2.2日と、メタン生成相を含む従来の単槽型消化槽に相当する4.8日の二系列設けた。また各系が定常状態に達するのを保証するため連続実験は1~2か月間継続した。

(5) 分析方法

反応槽内混合液および発生ガス中の各成分は以下の分析方法に基づいて分析された。全糖類（アンスロン-硫酸法）¹²⁾、タンパク質（Lowry法）¹³⁾、菌体有機性窒素（ケルダール分解後インドフェノール法）¹⁴⁾、アンモニア性窒素（インドフェノール法）¹⁴⁾、全有機酸（以下TOAと略記する）（Standard Methods¹⁵⁾準拠）、揮発性脂肪酸（FID式ガスクロマトグラフ法）、ガス組成（N₂、CH₄、CO₂）（TCD式ガスクロマトグラフ法）。

4. 実験結果

(1) 実験Ⅰ；可溶性デンプン添加の影響

Fig. 3 に定常状態におけるセルロース分解量と可溶性デンプン添加量の関係を示した。ここでセルロース分解量は、流入セルロース濃度から反応槽内不溶性糖濃度を差し引いて求めた。反応槽中の不溶性糖類には、残存セルロース以外に細菌細胞内の多糖類が含まれてくる。多くの細菌では炭素源、エネルギー源と異なる増殖必須因子が制限された場合細胞内貯蔵多糖含量が増加するといわれており¹⁶⁾、嫌気性消化では可溶性デンプン基質を用いた場合、菌体中に10~30%の多糖類の蓄積がみられ

たという報告¹⁷⁾がある。しかし Fig. 4 に示した菌体有機性窒素濃度から本実験の菌体中多糖含量を見積もると、有機性窒素の約10倍が菌体量と考えられるので、菌体中の多糖類は可溶性デンプン添加量10000 mg/l の場合でも500 mg/l 以下となり、残存セルロース濃度に対して無視できるものと考えられる。

Fig. 3 によれば、セルロース分解量はSRT 2.2、4.8日の両系列とも少量の可溶性デンプンを添加した系で、対照となる可溶性デンプン無添加系より増加したことが知られる。SRT 2.2日の系列では、添加量1000 mg/l の系でセルロース分解量は最大となり、セルロース分解率は対照系より約11%向上した。またSRT 4.8日の系列では、添加量3000 mg/l の系でセルロース分解量は最大となり、分解率は対照系より約25%向上した。しかし添加量が7500 mg/l 以上になるとセルロース分解量は急激に減少し、特にSRT 2.2日の系列では可溶性デンプンを10000 mg/l 添加した場合セルロースの分解は完全に停止した。

また溶解性糖類についてはデータは示していないが、反応槽内溶解性糖濃度はすべての系で100 mg/l 以下に抑えられ、嫌気性消化プロセスの可溶性デンプン分解活性はセルロース分解活性より著しく高いことが知られた。

Fig. 4 には定常状態における菌体有機性窒素濃度と可溶性デンプン添加量の関係を示した。菌体有機性窒素濃度は、槽内混合液を遠心分離（14000 rpm；4°C、10分間）した後、汚泥部分を蒸留水で洗浄しさらに遠沈を3回繰り返して、残った汚泥をケルダール分解させ上記の分析方法で測定した。したがって得られた菌体有機性窒素濃度は細菌細胞へ同化された窒素量を示し、細菌の増殖量を表わす。Fig. 4 から、消化槽内細菌叢を構成する各種の

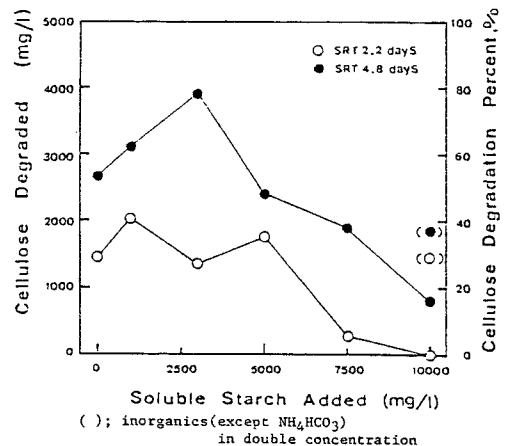


Fig. 3 Effect of soluble starch addition on cellulose degradation.

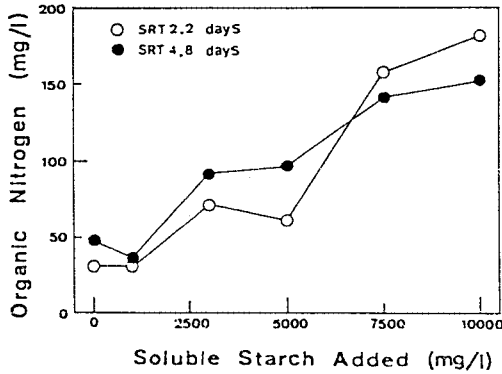


Fig. 4 Effect of soluble starch addition on organic nitrogen in biomass.

細菌の増殖量は、ほぼ可溶性デンプン添加量に比例して増加することが知られた。Fig. 3より添加量7500 mg/l以上の系ではほとんどセルロースの分解がみられないので、これらの系の菌体有機性窒素濃度は、可溶性デンプン基質による細菌の増殖量と考えることができる。

Fig. 5に定常状態におけるpH、TOA濃度および揮発性脂肪酸濃度と可溶性デンプン添加量との関係を示した。pHはいずれの系も6.4~6.8の範囲内に落ち着いたが、SRT 2.2日の系列では添加量が7500 mg/l以上になるとpHが低下する傾向がみられた。

TOA濃度は可溶性デンプン添加量の増大に伴って指数関数的に増大しており、また生成された揮発性脂肪酸の大部分は酢酸とプロピオン酸で、プロピオン酸濃度はTOA濃度と同様に可溶性デンプン添加量に追従して増大した。可溶性デンプン無添加の系では酢酸の比率が高いのに対し、添加量の増加に伴ってプロピオン酸の比率がしだいに高まり、添加量10000 mg/lの系では両者は逆転した。こうした傾向は両SRT系列で観測され、揮発性脂肪酸の分布形態はSRTの影響をほとんど受けないことが知られる。Scheifingerら¹⁸⁾はセルロースからのプロピオン酸の生成とデンプンからのプロピオン酸生成は、非常に異なった経路を経てなされることを報告している。したがって可溶性デンプンからのプロピオン酸生成経路は、可溶性デンプン分解菌の増殖にとって有利だと考えられ、可溶性デンプン添加量の増大に伴ってプロピオン酸生成比率が高まったものと推察される。また酸生成相で通常高濃度となるn-酪酸は少量しか検出されなかった。

Fig. 6にメタン生成収率と可溶性デンプン添加量との関係を示した。ここでメタン生成収率は、メタン生成量をセルロース分解量と可溶性デンプン分解量の和で除して求めた。メタン生成収率は無添加系を除いてSRT 4.8日の系列の方が常にSRT 2.2日の系列より高く、また

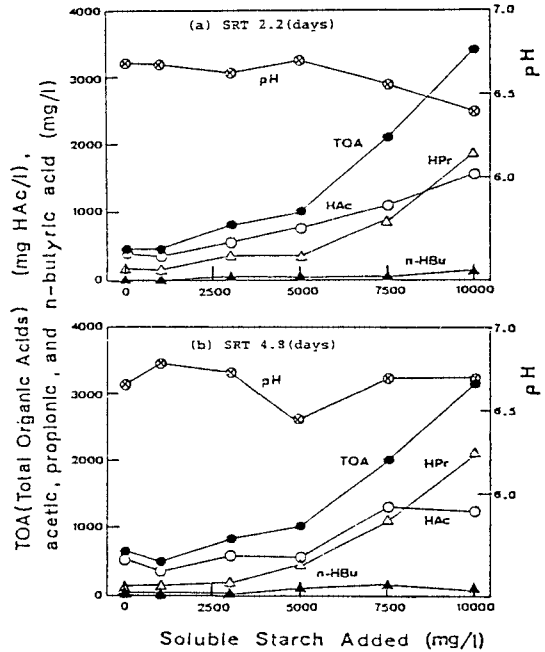


Fig. 5 Relationships among soluble starch addition, TOA concentration (as acetic acid), and volatile fatty acids (acetic, propionic, n-butyric acid) concentrations.

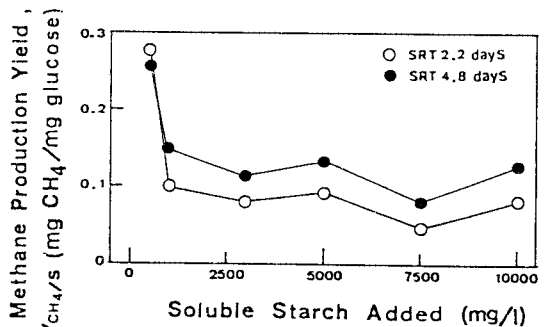


Fig. 6 Effect of soluble starch addition on methane production yield.

酢酸消費メタン菌の限界SRTは約3.0日^{11),19)}であると知られているので、SRT 2.2日の系列は、酢酸からのメタン生成が起きない二相型の酸生成相であると考えられる。

メタン生成速度はデータは示していないが、TOA濃度と異なり、可溶性デンプン添加量に追従した増大はみられず、両系列とも約400 ml/l/day以上には増加しなかった。そのためFig. 6中のメタン生成収率は可溶性デンプン無添加系が最も高く、添加量の増大とともに低下していく傾向がみられた。このことから可溶性デンプンの添加は、水素と炭酸ガスからのメタン生成もまた酢酸からのメタン生成も阻害していることが知られた。

(2) 実験II ; ペプトン添加の影響

Fig. 7 に定常状態におけるセルロース分解量とペプトン添加量の関係を示した。ここでセルロース分解量は実験Iと同様な方法で算出した。ペプトンを用いた複合基質の場合栄養上の制限は考えられないので、細菌細胞中への多糖の蓄積は少なく残存セルロース濃度に対して無視できるものと思われる。Fig. 7 より、セルロース分解量は、両SRT系列ともペプトンを添加したすべての系で対照となるペプトン無添加系より増大したことが知られる。セルロース分解率はSRT 2.2日の系列では最大42.7%、SRT 4.8日の系列では最大32.3%それぞれ向上した。しかし両系列とも1000 mg/l以上にペプトン量を増大させてもセルロース分解量はそれ以上増加しなかった。実験Iと比較すると、ペプトン添加によるセルロース分解の促進効果は可溶性デンプン添加による効果を大きく上回り、ペプトン添加は可溶性デンプン添加よりセルロース分解には一層効果的であることが知られる。

このような実験結果は、都市ゴミなどのセルロース性物質を大量に含む廃棄物バイオマスの処理においては、微生物タンパクの集塊である余剰汚泥などを添加することによって処理効率の改善が期待できることを示唆するとともに、多様な有機物を含む下水汚泥、し尿などの処理においては従来考えられていたほどセルロース性物質の分解速度は遅くないという見解を支持する。

Fig. 8 に定常状態におけるpH、TOA濃度および揮発性脂肪酸濃度とペプトン添加量の関係を示した。pHは両系列ともペプトン添加量1000 mg/l以上の系では、SRT 4.8日、添加量5000 mg/lの系を除いて7.0前後に落ち着いていた。しかし添加量500 mg/lの系ではpHは低く、SRT 4.8日の場合6.5以下に低下した。TOA濃度はpHとよく対応しており、ペプトン添加量の増大に伴って増加する傾向がみられた。また添加量500 mg/l

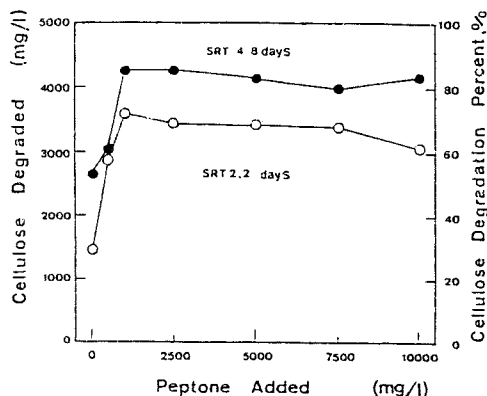


Fig. 7 Effect of peptone addition on cellulose degradation.

の系ではpHと関連してTOA濃度が高くなった。生成された主要な揮発性脂肪酸は酢酸とプロピオン酸で、酸生成相で通常高濃度を示すn-酪酸はほとんど検出されなかった。SRT 2.2日の系列では、添加量500 mg/lおよび10000 mg/lの高TOA濃度を示した系でプロピオン酸の比率が高かったが、SRT 4.8日の系列ではいずれの系でも酢酸濃度がプロピオン酸濃度を上回った。Fig. 7より添加量1000 mg/l以上ではセルロース分解量は変化しないことが知られるので、添加量の増大に伴って増加した揮発性脂肪酸がペプトンからの代謝産物であると考えられる。したがってペプトンの異化代謝は、SRTの影響によって代謝経路が変わり、SRT 2.2日ではプロピオン酸、SRT 4.8日では酢酸がそれぞれ主要な代謝産物として生産される。またペプトン中のタンパク質からは側鎖脂肪酸類も生成されたが、これらについては後述する。

Fig. 9には、アンモニア性窒素生成量と分解されたタンパク質の関係を示した。ここで分解タンパク質量は、ペプトン添加量にペプトン中のタンパク含有比率(45.5%)を掛け、槽内溶解性タンパク質濃度を差し引いて求めた。一方アンモニア性窒素生成量は流出入の差から算出した。Fig. 9より両者の相関性は非常に高く、またこの回帰直線のx切片の値は小さいことが知られ、ペプ

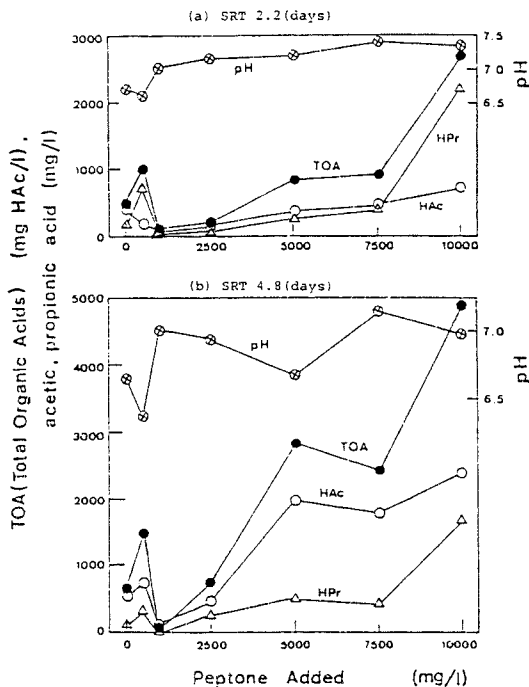


Fig. 8 Relationships among peptone addition, TOA concentration (as acetic acid), and volatile fatty acids (acetic, propionic acid) concentration.

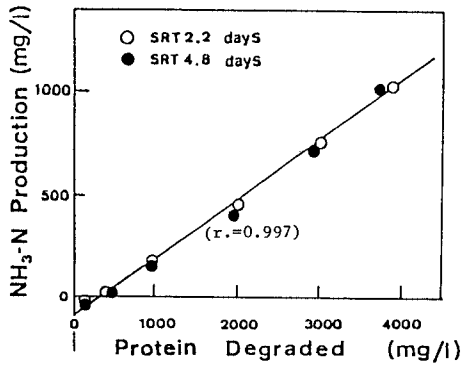


Fig. 9 Relationship between protein degradation and $\text{NH}_3\text{-N}$ production.

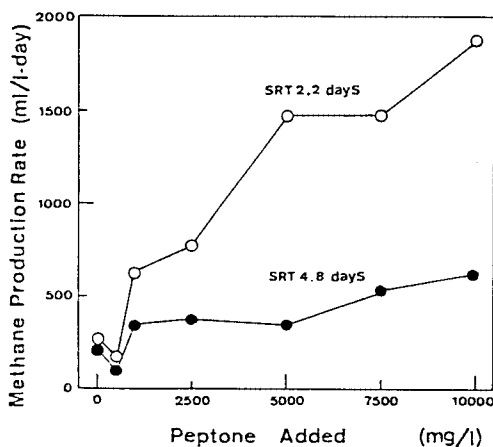


Fig. 10 Effect of peptone addition on methane production.

トン中のタンパク質はその大部分がタンパク質分解細菌によって異化代謝されたと考えられる。またペプトン添加量 500 mg/l の系では両系とも流出アンモニア性窒素濃度が流入濃度を下回り、明らかに菌体中の有機性窒素は大部分アンモニア性窒素から合成されたことを示している。

Fig. 10 に定常状態におけるメタン生成速度とペプトン添加量の関係を示した。メタン生成速度はペプトン添加量の増大に伴って増加しており、特に SRT 2.2 日の系列の増加が著しい。前述のように SRT 2.2 日の系列は二相型の酸生成相と考えられるので、ペプトン添加は水素と炭酸ガスからのメタン生成を刺激するのではないと思われる。また添加量 500 mg/l の両系でメタン生成速度が低下したのは、おそらく揮発性脂肪酸の蓄積と pH 低下 (Fig. 8) によってメタン生成菌の代謝が阻害されたためだと推察される。

5. 考 察

嫌気性消化におけるセルロースの分解に及ぼす可溶性

デンプン添加の影響を検討するために計画された実験 I から、少量の可溶性デンプン添加はセルロースの分解を促進させ、また大量の添加はセルロースの分解を阻害することが知られた。セルロースと可溶性デンプンは異なる細菌群によって代謝されるため、実験 I の結果からセルロース分解細菌と可溶性デンプン分解細菌との間に偏利共生、偏害共生または競争といった何らかの相互作用が働いていると考えられる。

嫌気性消化の浄化機構の解明はいまだに初歩的レベルにあり、特に微生物学的研究は乏しい。嫌気性消化におけるセルロースの分解に関与する細菌群の分離同定もほとんどなされておらず、これらの細菌の栄養要求性は明らかではない。しかしルーメンと嫌気性消化プロセスの相違点は、前者の滞留時間が比較的に短いこと、また前者の生態系中に多数の原生動物が存在することなどであるが、少量のデンプン添加に対するセルロース分解の応答が両者とも類似しているため、実験 I におけるセルロース分解の促進は、ルーメンと同様にセルロース分解菌とデンプン分解菌との間の側鎖揮発性脂肪酸を含むある種の揮発性脂肪酸を媒介とした相互作用によってもたらされたと考えることができる。

また実験 II では、ペプトン添加によってセルロース分解は少量の可溶性デンプン添加以上に促進されることが知られた。純粋培養系と異なりペプトン中のタンパク質は大部分異化代謝される (Fig. 9) ので、ペプトン中のタンパク質は Fig. 1 中のデンプン分解細菌タンパク質に相当する。したがってペプトンを添加した場合、生成される側鎖揮発性脂肪酸量はさらに増大し、セルロース分

Table 2 Volatile fatty acids (iso-butyric, iso-valeric, *n*-valeric acids) concentrations in Experiment 1.

(a) SRT 2.2 (days)

Soluble Starch Added (mg/l)	VFA Production (mg/l)		
	iso-HBu	iso-HVa*	<i>n</i> -HVa
0	7.0	3.9	1.1
1000	4.8	2.0	0
3000	0	3.3	14.2
5000	6.0	4.7	0
7500	3.0	3.1	28.2
10000	0	9.5	27.3

(b) SRT 4.8 (days)

Soluble Starch Added (mg/l)	VFA Production (mg/l)		
	iso-HBu	iso-HVa*	<i>n</i> -HVa
0	10.3	7.7	3.3
1000	10.0	6.4	2.3
3000	11.4	7.0	4.6
5000	28.1	14.4	30.0
7500	0	13.6	24.6
10000	0	17.3	7.6

* containing 2-methyl-butyric acids

解菌とタンパク質を分解する細菌の相互作用は活発になる。

Table 2 および Table 3 にそれぞれ実験 I, II における側鎖揮発性脂肪酸濃度と *n*-吉草酸濃度を示した。ルーメン中のセルロース分解細菌の増殖必須因子である揮発性脂肪酸には、*iso*-酪酸、*iso*-吉草酸、2-メチル酪酸の3つの側鎖脂肪酸と *n*-吉草酸が含まれる⁷⁾。本実験では *iso*-吉草酸と 2-メチル酪酸は分離して定量しなかったため、表中の *iso*-吉草酸濃度は 2-メチル酪酸濃度を含む。Table 2 および Table 3 より、可溶性デンプンを添加した場合これらの揮発性脂肪酸濃度は添加量によってあまり変化しないが、大量のペプトンを添加した場合揮発酸濃度が著しく増大することが知られた。代表的なセルロース分解菌の一菌種である *Ruminococcus albus* は、最大の増殖に 0.04 mM (3.6 mg/l) 以上の *iso*-酪酸が必要であるといわれており¹⁰⁾、実験 I では可溶性デンプン添加量 5 000 mg/l 以下の系で *iso*-酪酸濃度は 0.04 mM を越えた。一方添加量 7 500 mg/l 以上のセルロース分解が抑制された系では *iso*-酪酸はほとんど検出されなかった。

また実験 II では、両 SRT 系列ともペプトン添加量 500 mg/l の系でこれらの揮発性脂肪酸濃度が非常に高いのに対し、添加量 1 000 mg/l の系ではペプトン無添加系よりいずれも低くなった。添加量 500 mg/l の系ではセルロース分解量がそれ以上のペプトン添加系より少ないので、揮発性脂肪酸以外のペプトン中に含まれるセ

ルロース分解菌の増殖必須因子が不足しているのではないかと考えられる。そのためセルロース分解菌は十分にこれらの揮発性脂肪酸を利用できない、一方添加量 1 000 mg/l 以上の系ではこのような増殖必須因子が十分に供給されるので、セルロース分解菌は高い増殖活性を示し、揮発性脂肪酸消費量も増大する。

こうした増殖必須因子には、ビタミン類や各種の微量元素が含まれていると考えられ、ペプトン添加によって少量の可溶性デンプン添加以上にセルロース分解が促進されたことも、ペプトン中におけるこれら因子の存在を裏付ける。したがってペプトン添加によるセルロース分解の促進は、セルロース分解菌へのペプトン中のビタミン類や微量元素の直接的供給とペプトン中のタンパク質の異化分解による側鎖脂肪酸を含む揮発性脂肪酸の間接的供給とによってもたらされるものと推察される。また 1 000 mg/l 以上にペプトン添加量を増大させても、それ以上セルロース分解量が増加しないので、直接供給されるペプトン中の増殖必須因子も、間接的に供給される揮発性脂肪酸類もペプトン添加量 1 000 mg/l でセルロース分解菌の増殖にとって十分であると考えられる。

Bryant⁷⁾ および el-Shazly ら²⁰⁾ はデンプンのような易分解性の炭水化物がセルロース基質中に大量に添加された場合、ルーメンにおけるセルロース分解が阻害される原因として次の4点について検討している。

- (a) デンプン分解菌による阻害剤の生成
- (b) デンプンの発酵によって生成される有機酸の蓄積による pH 低下
- (c) セルロース分解菌と非セルロース分解菌（デンプン分解菌を含む）の、エネルギー源と異なる必須栄養に関する競合現象
- (d) セルロース分解菌それ自身の一部によるセルロース以外のエネルギー源（デンプン）の利用

このうち (a) の阻害剤の生成については現在までのところそのような報告はない。また (d) については、ルーメン中の主要なセルロース分解菌のうち *Bacteroides succinogenes* はセルロース以外の他の炭水化物を利用できるが、*R. albus* および *R. flavefaciens* は他の炭水化物を利用できないことが知られている⁷⁾。しかし嫌気性消化プロセスのような混合培養系では、セルロース分解菌がデンプンを利用できるかどうか検討することは非常に難しい。

そこで (b) および (c) について下記のように実験を計画し、大量の可溶性デンプン添加によるセルロース分解抑制の原因を検討した。実験消化槽には最もセルロース分解が抑制された可溶性デンプン添加量 10 000 mg/l の両系を選び、まず SRT 2.2 日の系では本実験終了後 10 N NaOH 溶液を基質中に添加することによ

Table 3 Volatile fatty acids (*iso*-butyric, *iso*-valeric, *n*-valeric acids) concentrations in Experiment 2.

(a) SRT 2.2 (days)

Peptone Added (mg/l)	VFA Production (mg/l)		
	<i>iso</i> -HBu	<i>iso</i> -HVa*	<i>n</i> -HVa
0	7.0	3.9	1.1
500	29.2	52.3	1.8
1 000	4.1	3.2	0.7
2 500	6.4	6.5	1.6
5 000	18.0	33.6	6.3
7 500	29.4	38.4	10.0
10 000	121.8	155.1	35.4

(b) SRT 4.8 (days)

Peptone Added (mg/l)	VFA Production (mg/l)		
	<i>iso</i> -HBu	<i>iso</i> -HVa*	<i>n</i> -HVa
0	10.3	7.7	3.3
500	17.4	19.0	3.3
1 000	2.0	3.0	0.0
2 500	34.8	75.8	7.2
5 000	179.0	306.2	32.6
7 500	107.2	251.7	25.5
10 000	391.7	848.0	91.9

* containing 2-methyl-butyric acids

て、槽内 pH を 6.9 に調整して約半月連続実験を行い、次いで Table 1 に示した合成基質中の重炭酸アンモニウム以外の無機塩濃度を 2 倍にした基質を用いてさらに約半月実験を続けた。一方 SRT 4.8 日の系では、可溶性デンプン添加量が 10 000 mg/l の場合でも pH 低下はみられなかったため、pH 調整実験は行わず、重炭酸アンモニウム以外の無機塩濃度を 2 倍にする実験のみを約 1 か月間継続した。重炭酸アンモニウム濃度は基質の C/N 比を 5.0 に保つため、可溶性デンプン添加量に応じて調整しており、また Fig. 4 に示した菌体有機性窒素濃度から残存アンモニア性窒素濃度は比較的高いことが知られ、セルロース分解抑制の原因として窒素源の摂取における競合現象は考えられない。

これらの実験結果は Fig. 3 中に括弧でくくって示した。SRT 2.2 日の系では pH を 6.9 に調整してもセルロース分解量は変化せず完全に抑制された状態が続いた。しかし重炭酸アンモニウム以外の無機塩濃度を 2 倍にした基質を用いると、可溶性デンプン無添加系と同程度までセルロース分解量は回復した。また SRT 4.8 日の系でも重炭酸アンモニウム以外の無機塩濃度を 2 倍にした基質を用いることによって、添加量 7 500 mg/l の系と同程度までセルロース分解は改善された。したがって大量の可溶性デンプン添加によるセルロース分解の抑制は(c)の原因、すなわちセルロース分解菌と非セルロース分解菌（デンプン分解菌を含む）との間の重炭酸アンモニウムを除く無機塩類に関する競合現象によって生じることが知られた。

Fig. 11, Fig. 12 にセルロース分解速度と可溶性デンプン

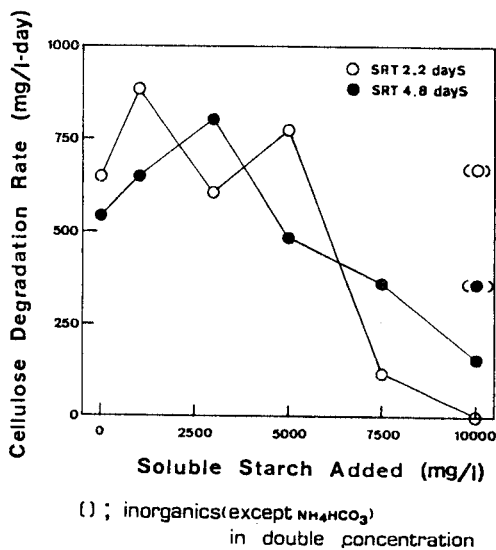


Fig. 11 Effect of soluble starch addition on cellulose degradation rate.

ンおよびペプトン添加量の関係を示した。前述のように酢酸消費メタン菌の限界滞留時間は約 3.0 日^{11),19)}であり、SRT 2.2 日の系列は酢酸をメタンに転換するメタン菌の存在しない二相型の酸生成相である。これに対し SRT 4.8 日の系列は従来の単槽型消化槽に相当し、酢酸を経由してメタンが発生するので、Fig. 6 に示したようにメタン生成収率は SRT 2.2 日の系列より高くなった。

Fig. 11 より可溶性デンプンを添加した場合、両 SRT 系列のセルロース分解速度はほとんど変わらないことが知られた。一方 Fig. 12 よりペプトンを添加した場合、SRT 2.2 日の系列は SRT 4.8 日の系列の約 2 倍のセルロース分解速度を示すことが知られた。酢酸消費メタン菌は酸生成段階で生成した有機酸をメタンへ転換して pH 低下を防ぐことができるので、代表的な酢酸消費メタン菌である *Methanosarcina barkeri* を用いてセルロース分解率を改善した実験例^{21),22)}もある。本実験では可溶性デンプン、ペプトンを添加した場合とも、両 SRT 系列で pH に著しい差異はみられず、また上記の pH 調整実験によってもセルロース分解抑制は改善されなかったため、pH の介在によるセルロース分解菌と酢酸消費メタン菌の相互作用は機能していないことが明らかになった。しかしペプトンを添加した場合には、酢酸消費メタン菌の存在しない SRT 2.2 日の系列のセルロース分解速度が SRT 4.8 日の系列を大きく上回ったことから、ペプトンを添加した場合、セルロース分解菌と酢酸消費メタン菌との間にペプトン中に含まれる物質の摂取に関する競合関係が成り立つことが示唆された。

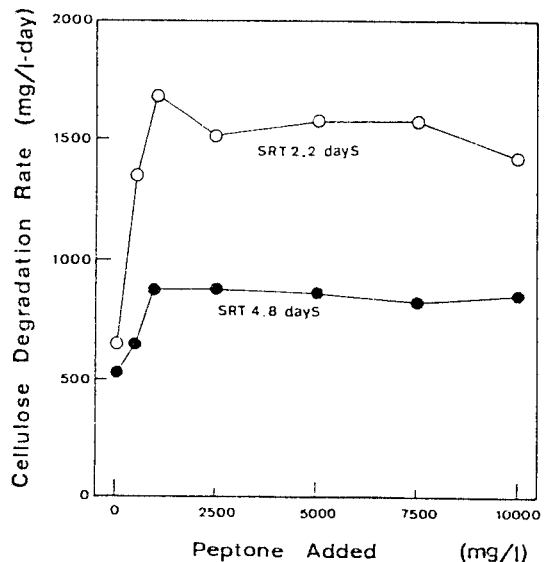


Fig. 12 Effect of peptone addition on cellulose degradation rate.

6. 結 論

本研究より得られた知見は次のように要約される。

(1) 少量の可溶性デンプンの添加は、嫌気性消化におけるセルロースの分解を促進させる。

(2) 大量の可溶性デンプンの添加はセルロース分解を抑制し、その原因はセルロース分解菌と非セルロース分解菌との間の重炭酸アンモニウムを除く無機塩類の摂取に関する競合現象であると考えられる。

(3) ペプトンの添加は、少量の可溶性デンプン添加以上にセルロースの分解を著しく促進させる。しかし必要なペプトン量は少量である。

謝 辞：本研究を行うにあたり、実験の面でご尽力下さった東北大学工学部学生（当時）福田 実君に心から感謝致します。

なお、本研究の一部は昭和56年度文部省科学研究費総合研究(A)、ならびに昭和57年度文部省科学研究費一般研究(C)によることを付記致します。

参 考 文 献

- Cooney, C. L., Wang, D. I. C., Wang, S., Gordon, J. and Jiminez, M. : Simultaneous cellulose hydrolysis and ethanol production by a cellulolytic anaerobic bacterium, *Biotech. and Bioeng. Symp.* No. 8, pp. 103~114, 1978.
- 野池達也：嫌気性消化の浄化機構と二相消化法へのアプローチ，公書と対策，Vol. 17, pp. 751~758, 1981.
- 遠藤銀朗・野池達也・松本順一郎：嫌気性消化の酸生成相におけるセルロースとグルコースの分解特性，土木学会論文報告集，第325号，pp. 61~68, 1982年9月。
- Weimer, P. J. and Zeikus, J. G. : Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 33, pp. 289~297, 1980.
- Belasco, I. J. : The role of carbohydrates in urea utilization, cellulose digestion and fatty acid formation, *J. Anim. Sci.*, Vol. 15, pp. 496~508, 1956.
- Cline, J. H., Hershberger, T. V. and Bentley, O. G. : Utilization and/or synthesis of valeric acid during the digestion of glucose, starch, and cellulose by rumen microorganisms in vitro, *J. Anim. Sci.*, Vol. 17, pp. 284~292, 1958.
- Bryant, M. P. : Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria, *Fed. Proc.*, Vol. 32, pp. 1809~1813, 1973.
- Zeikus, J. G. : Microbial populations in digesters, In "First International Symposium on Anaerobic Digestion (Cardiff Univ.)", Applied Science Publishers, pp. 61~87, 1979.
- Hemsley, J. A. and Moir, R. J. : The influence of higher volatile fatty acids on the intake of urea-supplemented low quality cereal hay by sheep, *Aust. J. Agric. Res.*, Vol. 14, pp. 509~517, 1963.
- Miura, H., Horiguchi, M. and Matsumoto, T. : Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Magasphaera elsdenii*, and *Ruminococcus albus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 40, pp. 294~300, 1980.
- 張 祖恩・野池達也・松本順一郎：嫌気性消化のメタン生成相に及ぼす滞留時間と投入基質濃度の影響，土木学会論文報告集，第320号，pp. 67~76, 1982年4月。
- Herbert, D., Phipps, P. J. and Strange, R. E. : Chemical analysis of microbial cells, In "Methods in Microbiology, Vol. 78", Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (Eds.), pp. 209~344, Academic Press, N. Y., 1971.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L. : Protein measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, Vol. 193, pp. 265~275, 1951.
- Scheiner, D. : Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method, *Water Res.*, Vol. 10, pp. 31~36, 1976.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th ed. pp. 527~529, Amer. Pub. Health Assn., N. Y., 1975.
- Wilkinson, J. F. : The problem of energy-storage compounds in bacteria, *Experimental Cell Res. Suppl.*, Vol. 7, pp. 111~130, 1959.
- 矢口淳一・野池達也・松本順一郎：可溶性デンプンの嫌気性酸発酵に関する研究，第36回土木学会年次学術講演会概要集，pp. 95~96, 1980.
- Scheifinger, C. C. and Wolin, M. J. : Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*, *Appl. Microbiol.*, Vol. 26, pp. 789~795, 1973.
- Lawrence, A. W. and McCarty, P. L. : Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment, *Jour. WPCF*, Vol. 41, pp. R 1~R 17, 1969.
- el-Shazly, K., Dehority, B. A. and Johnson, R. R. : Effect of starch on the digestion of cellulose in vitro and in vivo by rumen microorganisms, *J. Anim. Sci.*, Vol. 20, pp. 268~273, 1961.
- Laube, V. M. and Martin, S. M. : Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by triculture of *Acetivibrio cellulolyticus*, and *Desulfovibrio sp.*, and *Methanosarcina barkeri*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 42, pp. 413~420, 1981.
- Khan, A. W. : Degradation of cellulose to methane by a coculture of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Methanosarcina barkeri*, *FEMS Microbiol. Letters*, Vol. 9, pp. 233~235, 1980.