

(15) 複合基質からの酸生成及びメタン生成に及ぼす相分離の効果

EFFECT OF PHASE SEPARATION ON THE ACIDOGENESIS AND METHANOGENESIS
FROM A COMPLEX SUBSTRATE

長瀬 道彦^{*}・松尾 友矩^{*}・花木 啓祐^{*}

Michihiko NAGASE, Tomonori MATSUO, Keisuke HANAKI

ABSTRACT; Acidogenesis from a powdered whole milk solution in a CFSTR at 37°C was studied over the pH range from 3.6 to 7.0 and HRT range from 6 to 30 hours, with respect to the decomposition of the constituents and the product distribution. The decomposition ratio of carbohydrate and protein ranged from 95 to 100 and from 20 to 50 per cent, respectively. Only less than 10 per cent of lipid was decomposed at all pH values and all HRT values. As for the fermentation products, acetic acid and propionic acid were the main products in the higher pH range and the longer HRT range, while butyric acid appeared in high concentration in the lower pH range and the shorter HRT range. In order to investigate the effect of phase separation on the methanogenesis, the mixed liquor of the acid reactor and the unacidified substrate were inoculated with a methanogenic sludge from a single-phase digester. Retardation of acidogenesis from the unacidified substrate, probably because of the temporal accumulation of higher fatty acids, was observed, while the mixed liquor of the acid reactor was acidified and converted to methane without retardation.

KEYWORDS; phase separation, complex substrate, higher fatty acids

1. はじめに

廃棄物、汚泥のメタン発酵は、エネルギー回収の可能な処理法として有効であるが、純粋な化学製法に比べてメタンの発生速度が遅いため、槽容積が大きくなり、建設コストがかさむ等の欠点がある。そこで、メタン生成過程に含まれる酸生成菌、メタン生成菌という、増殖速度、適性な環境条件の異なる二つの細菌群を二槽に分離し、それぞれに対して最適の生育条件を保障し、メタンの発生効率を上げることを目的とした二相消化法が注目を集めている。グルコースを基質にした実験により、酸生成槽を設けることにより、メタン生成槽におけるメタン生成速度が数倍に上昇すること、ショックロードに対する安定性が向上することなどが確かめられている⁽¹⁾⁽²⁾。また、Ghoshら⁽³⁾によつて下水汚泥の場合も、二相消化の方が単相消化に比べて、小さい槽容積でもより大きなメタン生成が実現されることが示されている。しかし、比較的組成の明らかな複合基質を使って、蛋白質、炭水化物、脂質等が酸生成槽でどのように分解を受けるのか、あるいは酸生成槽を設けることにより、これらの基質からのメタン生成に対してどのような効果があるかについて調べた例はない。本報は、これら成分の複合物であるベビーミルクからの酸生成、メタン生成の特性を相分離の効果に着目して調べ、その知見を報告するものである。

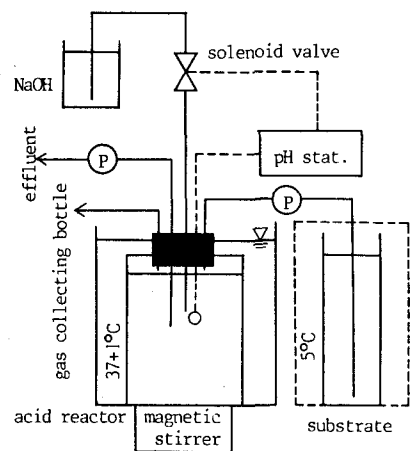


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental apparatus.

^{*} 東京大学 Univ. of Tokyo

2. 実験方法

2.1 実験の概要

実験は大きく分けて二つの部分からなる。第一はベビーミルクからの酸生成特性を、連続槽を用いて種々の pH 及び滞留時間で調べたもの、第二は、酸生成槽の混合液に、単相培養したメタン生成菌を接種し、メタンの発生状況を調べたバッチ試験である。

2.2 酸生成槽 pH 調整実験

Fig. 1 に示した容量 3 l の連続槽を用いた。基質は M 社製ベビーミルクを 3 g/l の濃度で水道水に溶かしたもので、組成は Table 1 の通りである。COD は 4600 mg COD/l で、滞留時間は 18 時間に固定したので、負荷は 6132 mg COD/l・day である。pH は B 社製 pH コントローラを用いて、2N NaOH の自動滴定で調整した。種汚泥は筆者らがベビーミルクで単相培養してきた汚泥で、pH 7.0 で運転を始め、定常に達したと考えられた時点から 1～2 週間データを取り、以後 pH を下げていき、同様のことを繰り返した。

2.3 酸生成槽滞留時間調整実験

Fig. 1 と同じ形式で、容量 2 l の連続槽を使った。基質、種汚泥は 2.1 と同じである。滞留時間 30 時間で運転を始め、1～2 週間の定常データを取ったあと、順次滞留時間を短くしていった。pH は基質に NaHCO₃ を添加して 6.0 ± 0.1 に保った。

2.4 バイアル実験

Fig. 1 の槽から引き抜いた混合液 20 ml を、容量約 70 ml のバイアルに取り、単相のメタン生成槽の混合液を等量混合し、気相部の O₂ を N₂ でバージしたのち密栓する。これを何本か用意し、サンプリング毎に 1 本ずつ開封していった。同時に、酸生成槽に入る前の生基質についても同様の操作を行ない、酸生成、メタン生成の状況を比較した。

2.5 分析方法

分析項目及び分析方法是 Table 2 の通りである。

3. 実験結果と考察

2.1 pH 調整実験

各 pH における定常運転中の分析値の平均を Table 3, Fig. 2, Fig. 3 に示した。Table 3 は流入 COD がどのような形に転換されて槽外に出たかを計算した結果である。これによれば、pH が 3.6 及び 4.0 の場合を除いて、COD 転換率はだいたい 30～40 % で大きな差はなかったと考えられる。転換された COD の中では炭素数 6 個までの揮発酸が最も多く、80～90 % を占める。次いでエタノールが多く 5～20 % である。pH が 3.6 の場合を除けば、乳酸、蟻酸の割合は小さい。生成ガス中の水素の分率は pH 5.4 で最大となり、70 % 前後に達するが、COD に換算すると非常に小さく、酸生成槽においては実質的な COD 除去はなかったと考えられる。

次に基質の成分別にその分解状況を検討してみる。Fig. 2 に示したように、炭水化物は pH 7.0～4.5 の範囲で 95 % 以上が分解された。蛋白質の分解率は pH が高いほど良好となったが、pH 6.0 以上では大き

Table 1. Composition of the substrate^a

	Ingredient information	Measured value	COD fraction
Carbohydrate	1701	1594	42.9
Protein	390	240 ^b	6.1
Lipid	750	786	51.0
COD	—	4600	—
COD(S) ^c	—	2050	—

^aExpressed as mg/l except COD fraction(%).

^bExpresses as egg-white albumin.

^cFiltrate COD.

Table 2. Analytical methods.

Gas content	Gas chromatography (TCD)
Volatile fatty acids ^a	Gas chromatography (FID)
Ethanol	Gas chromatography (FID)
Lactic acid	Liquid chromatography
Formic acid	Liquid chromatography
Protein	Modified Lowry-Folin method ⁽⁴⁾
Carbohydrate	Phenol-sulfuric acid method
Lipid	Bligh-Dyer method ⁽⁵⁾
Higher fatty acids ^b	Gas chromatography (FID)

^aLower fatty acids with the carbon number of 2 to 6.

^bDetermined both before and after saponification with the lipid sample.

な差は出ておらず、最大でも 50 % 前後である。脂質の分解率は 10 % 以下と低い。18 時間程度の滞留時間ではほとんど分解は進まないと考えてよいであろう。Table 1 に示した基質組成から考えて、Table 3 の転換率に寄与しているのは、大部分がミルク中の乳糖であると考えられる。

最後に、pH の変化に対する発酵産物の組成変化について考える。Fig. 3 からわかるように、酢酸、プロピオン酸、酪酸、

吉草酸が主要な産物である。酢酸、プロピオン酸は pH の上昇とともに増大する傾向にある。酪酸は逆の傾向を示し、pH が 6 以下で多くなり、pH 4.5 で最大となる。pH の変動に従い、生物相あるいは代謝経路が移行することを示している。Zoetemeyer ら⁽⁶⁾は、グルコース 10000 mg/l を基質として、pH 調整実験を行なっている。それによれば、酪酸は pH 6.5 ~ 4.5 で卓越し、ほぼ一定のレベルを保ち、6.5 を越えるに従い少なくなっていく。これに対して酢酸は酪酸よりも少なく、pH 4.5 ~ 7.0 ではほぼ一定、7.0 を越えると酪酸とは逆に増加する。プロピオン酸は pH 5.7 以下で出現するが量的には小さい。かわりに乳酸がかなりの高濃度で出現する。酪酸が低 pH で卓越すること、酪酸の減少と

酢酸の増加が並行することは本研究と類似するが、プロピオン酸、乳酸の挙動が異なる。pH 6.0 以下で酪酸発酵、pH 6.0 ~ 7.0 でヘテロ乳酸発酵と、生物相の移行が明確であるのに対して、本研究では生物相が多少複雑になっていると考えられる。Zoetemeyer らの研究では、炭水化物濃度が本研究の約 6.3 倍である。発酵産物組成の違いを負荷の差、基質組成の差から検討する必要がある。

3.2 滞留時間調整実験

各定常状態における分析値の平均を

Table 4, Fig. 4, Fig. 5 に示した。滞留時間が 6 時間から 30 時間まで、COD 転換率に大きな変動はみられず、長い滞留時間が酸生成に効果的とはいえない。炭水化物は 3.1 と同様にほとんど分解は終了して

Table 3 Steady-state data in the acid reactor at different pH values^a

pH	Operation period	COD	COD(S)	MLVSS	VFA ^b	HLac ^b HFor	EtOH	H ₂	COD Conversion ratio ^c
7.0	16	4486	1998	413	1452	45	177	4.0	36.5
6.8	15	—	—	—	1678	62	96	0.9	36.6
6.6	13	4307	1880	447	1609	5	90	0.1	37.0
6.3	12	—	—	—	1847	25	246	13	46.3
6.0	10	4503	1949	391	1449	25	159	0	35.5
5.7	9	—	—	—	1640	16	134	74	40.1
5.4	7	4490	1910	490	1373	48	248	101	37.9
5.1	8	—	—	—	1327	37	321	57	37.6
4.8	9	4430	1875	425	1120	0	282	73	31.7
4.5	9	—	—	—	1275	0	146	38	31.5
4.0	6	4421	1847	406	1020	53	83	35	25.7
3.6	10	4617	2096	352	595	287	43	0	20.1

^aExpressed as mg COD/l except operation period(days), MLVSS (mg/l), H₂(mg COD/l·day) and COD conversion ratio(%).

^bVFA=volatile fatty acids, HLac=lactic acid, HFor=formic acid.

^cFraction of COD converted to VFA, HLac, HFor, EtOH and H₂.

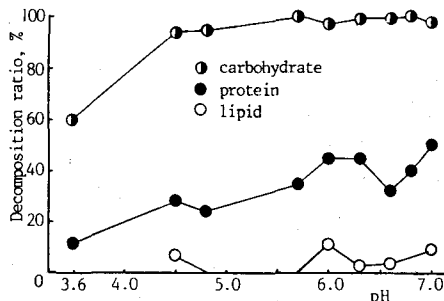


Fig.2 Decomposition ratio of the constituents at different pH values.

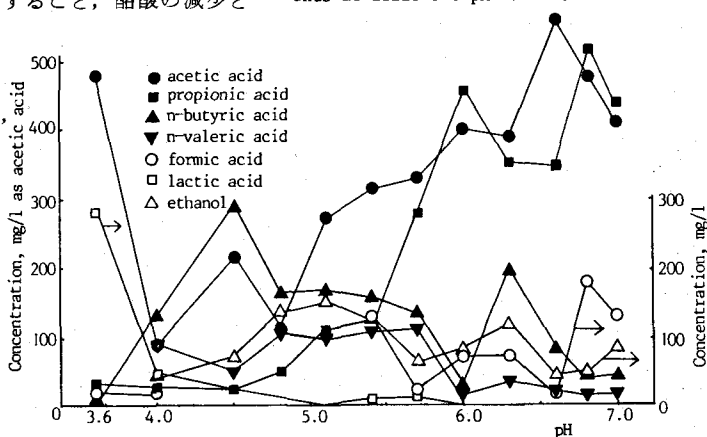


Fig. 3 Concentration of fermentation products at different pH values.

いる。蛋白質の分解率は滞留時間の増加とともに高くなるが、6～25 時間では大きな差がなく 30 % 前後である。MLVSS のデータからは生物量が最大となる条件が明確でないが、蛋白質の比分解率は 6 時間で最大となっている。6 時間以下の範囲での実験と

Table 4 Steady-state data in the acid reactor at different HRT values^a

HRT (hrs)	Operation period	COD	COD(S)	MLVSS	VFA	HLac HFor	EtOH	H ₂	COD conversion ratio
30	16	4446	1933	460	1483	34	148	1.4	36.2
25	8	4617	2101	474	1591	42	131	36	39.2
20	7	4410	1985	412	1732	84	71	26	41.5
15	10	4514	2007	465	1507	30	65	1.4	34.8
10	10	4431	1923	401	1400	—	142	107	34.5
6	7	4593	2052	483	1081	—	236	212	29.8

^aFor reference see Table 3.

もに、MLVSS よりも生物量を正しく反映する指標が必要である。脂質の分解率は 3.1 と同様 10 % 以下と低い。滞留時間が 30 時間でもメタンの発生がみられなかったが、そのことが脂質の分解率の低さの原因になっていると考えられる。

Fig. 5 は発酵産物の組成変化を示す。滞留時間が長いほど酢酸、プロピオン酸が増大し、酪酸が減少する傾向が明らかである。酪酸発酵が高希釈率で卓越することを示している。速藤らはグルコース 11700 mg/l を基質として、種々の pH で生成する揮発酸の組成を調べているが、pH 5.0～6.5 付近でプロピオン酸が高濃度に出現する。滞留時間を比較すると、速藤らの場合が 2.4 時間、Zoetemeyer らの場合が 3.3 時間となっている。このことは、プロピオン酸が低希釈率で多く出現することを示していると考えられる。

3.3 バイアル実験

バイアル実験では、pH 6.0, 5.0, 4.0 で運転した酸生成槽の混合液についてそれぞれ行なった。各混合液及び比較のために使用した生基質の性状については Table 5 にまとめた。最初に、相分離の効果を、酸生成、メタン生成の速度で比較する。Fig. 6 は各 Run での累積メタン生成量、累積酸生成量の経時変化を、COD の転換率で評価したものである。Run 1 A, 2 A, 3 A 及び Run 1 B, 2 B, 3 B の 2 つのグループを比較すると、酸生成槽混合液に植種した場合、酸生成、メタン生成が遅滞なく進行するのに対して、生基質に植種すると転換率が 40 % を越えたところで酸生成に一時的な停滞がみられた。この時点では炭水化物はほぼ 100 % 分解されている。この停滞はおそらく脂質の阻害に起因するものであろう⁽⁸⁾。

脂質の分解に対する相分離の効果を、中性脂肪の加水分解の観点から検討したのが Table 6 である。けん化後に増加する高級脂肪酸量によって、中性脂肪のままで残存していた量が評価できるとすれば、ミルク中の中性脂肪のうち、酸生成槽で加水分解される率は pH 5.0 で 30.6 %, pH 4.0 で 13.8 % と低い。脂質に関して、相分離の効果は、酸生成槽において中性脂肪の加水分解が進行することにあるのではなく、例えば脂質が酸生成菌に吸着されて流入するため、直接メタン生成菌や Acetogenic 菌に吸着しなくなることで、が考えられる。

次に基質の成分別にその分解を検討してみよう。Fig. 7, 8 は Run 2, Run 3 について炭水化物、蛋

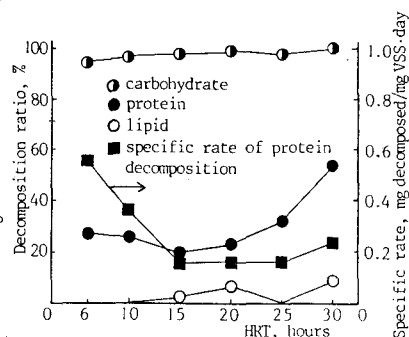


Fig. 4 Decomposition ratio of the constituents at different HRT values.

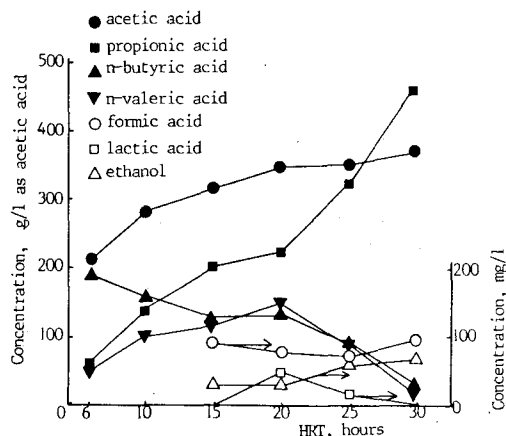


Fig. 5 Concentration of fermentation products at different HRT values.

白質、脂質の分解を追ったものである。最初に炭水化物について考える。Run 2 A, 3 Aでは実験開始時にほぼ炭水化物の分解は終了している。しかし、生基質を用いたRun 2 B, 3 Bでも Fig. 7, Fig 8 から、最初の1日で炭水化物がなくなっていることがわかる。炭水化物は生基質中に占めるCOD分率は Table 1より約43%である。この炭水化物に相当するCODがメタンに転換されるのに要する日数を Fig. 6によって調べると、Run 2 Aで約4.5日、Run 2 Bで約6日、Run 3 Aで約4日、Run 3 Bで約5日である。Run 2 A, Run 3 Aでは、実験開始前に、酸生成槽においてすでに18時間を経ているわけであるから、炭水化物からのメタン生成は相分離によってさほど促進されていないと考えられよう。

次に蛋白質について考える。蛋白質は濃度変動が小さいうえで、Run 2 AとRun 2 B, Run 3 AとRun 3 Bの間にあまり差がない。そのため、蛋白質の分解が酸生成槽混合液、生基質からの酸生成、メタン生成に大きく効いているとは考えにくい。本実験のように蛋白質の少ない基質では、相分離の効果は大きくないといえよう。

最後に脂質について考える。まず Run 2 AとRun 2 Bを比較してみよう。

Run 2 Aでは中性脂肪の加水分解は1～2日で終了している。加水分解で生成した高級脂肪酸が蓄積しているが、その後はすみやかに分解を受けている。これに対してRun 2 Bではけん化後的高级脂肪酸が2日目まで増加している。これは Fig. 7中の脂質が、10000rpmで10分間遠心分離した汚泥部分だけから抽出したものであるため、最初の2日間に中性脂肪が上ずみから汚泥へ移行するためであろう。汚泥部分に移行した中性脂肪が、比較的すみやかに加水分解されるのに対して、生成した高級脂肪酸の分解がRun 2 Aに比べて遅れている。この遅れが Fig. 6中の酸生成の停滞に対応するものと考えられる。Run 3 Aでは最初の1日で加水分解が終了している。それと同時に、高級脂肪酸の分解も進んでいる。ここでもRun 2 Aと同じく、2

Table 5 Condition of the vial experiment*

Run No.	Substrate	COD	COD(S)	MLVSS
1A	mixed liquor of the acid digester(pH 6)	4520	1875	413
1B	unacidified substrate	4435	1920	—
2A	mixed liquor of the acid digester(pH 5)	4188	1801	451
2B	unacidified substrate	4376	2031	—
3A	mixed liquor of the acid digester(pH 4)	4672	1685	382
3B	unacidified substrate	4485	2113	—

*Expressed as mg/l.

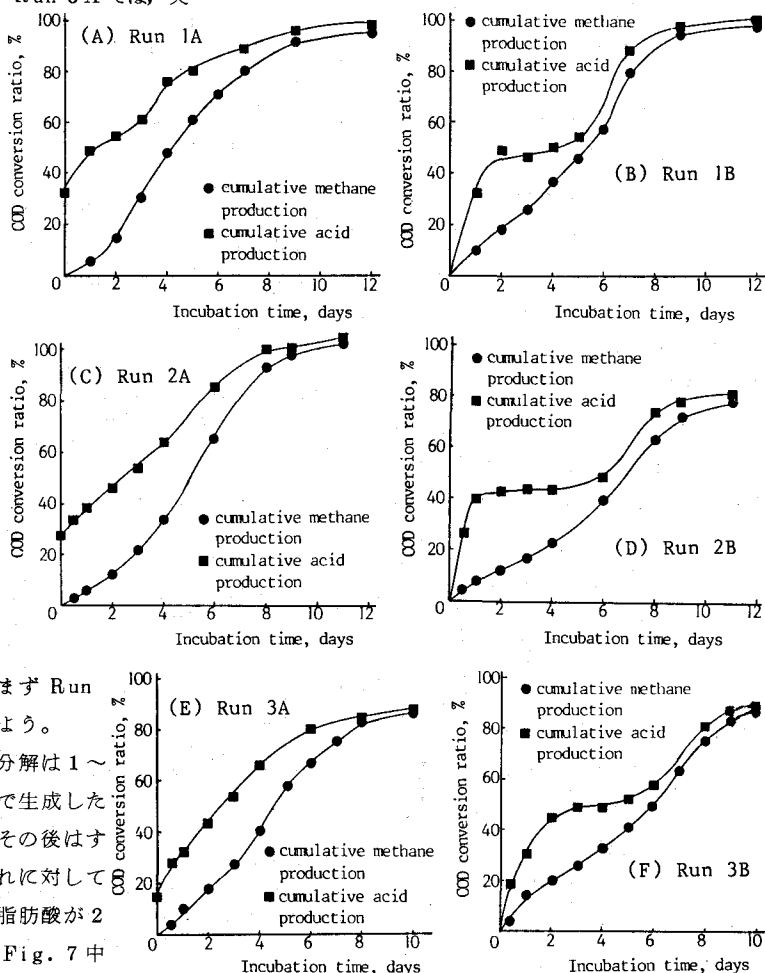


Fig. 6 Acid and methane production from the mixed liquor of the acid reactor operated at three pH values and from the unacidified substrate.

日程度の高級脂肪酸の蓄積はみられたものの、その後の分解は速い。Run 3 B では加水分解に 2 日を要するのに加えて、高級脂肪酸の分解が Run 3 A に比べてゆるやかになっている。Run 2, Run 3 の結果から、中性脂肪からの酸生成、メタン生成においては、加水分解よりも、中間物質の高級脂肪酸の分解が律速になっていることが推察される。

なお、バイアル実験に用いたメタン生成汚泥は単相培養されたものであるため、3 つの Run がそのまま相分離の効果を示すものではないといえる。しかし、酸生成槽を設けることにより、脂質の障害が少なくなる点などは、連続運転された二相消化槽にもある程度適用できるものと考えられる。

4. 結論

(A) 酸生成槽において炭水化物は pH 4.5 ~ 7.0, 滞留時間 6 ~ 30 時間の条件で

95 % 以上が分解された。脂質の除去率は低く 10 % 以下にとどまる。わずかに中性脂肪の加水分解が pH 5.0 で 30.6 %, pH 4.0 で 13.8 % 進んだ。

(B) 炭水化物からの発酵産物の組成からみた場合、酢酸、プロピオン酸より分解が速いとされる⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ 酪酸の多くなる pH 4.5 ~ 5.0, 滞留時間 6 ~ 10 時間の運転条件が好ましい。

(C) 酸生成槽を通過することにより、脂質がメタン生成菌あるいは Acetogenic 菌に対する毒性の低くなる可能性が示された。

(D) 相分離によって炭水化物からの発酵産物の組成を制御できること、脂質の毒性が緩和される、などの意味から、相分離がメタン生成槽の安定性を向上させることが期待できる。

Table 6 Free and esterified fatty acids in the acid digester.^a

		C 8:0	C 10:0	C 12:0	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	SUM	total lipid
unacidified substrate	free fatty acids ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	786
	total fatty acids ^c	5.5	8.9	62	38	165	308	84	8.4	680	—
mixed liquor (pH 5)	free fatty acids	0	36	64	0	39	69	0	0	208	931
	total fatty acids	0	4.9	54	41	185	309	108	0	702	—
mixed liquor (pH 4)	free fatty acids	0	0	0	42	52	0	0	0	94	945
	total fatty acids	0	0	52	27	172	342	89	0	681	—

^aExpressed as mg/l. ^bFatty acids before saponification.

^cFatty acids after saponification.

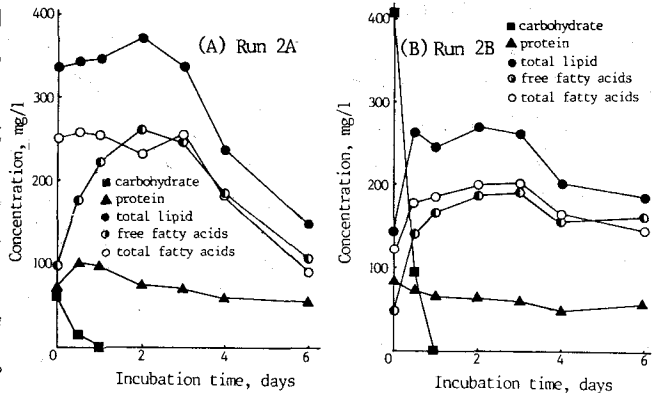


Fig. 7 Time course of the concentration of the constituents in Run 2A and Run 2B. Lipid was extracted only from the solid fraction after centrifugation.

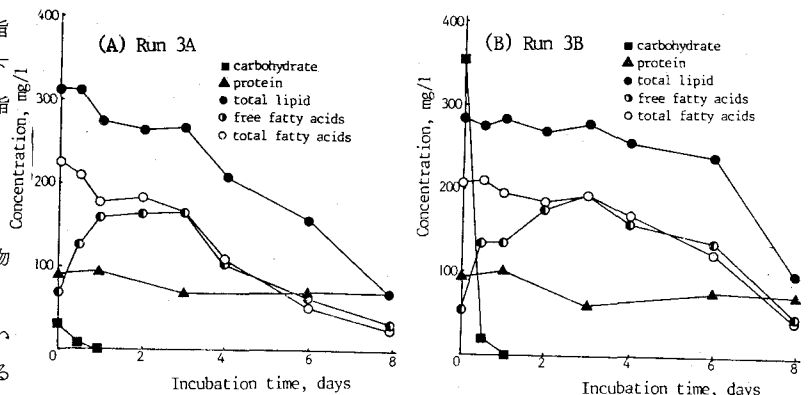


Fig. 8 Time course of the concentration of the constituents in Run 3A and Run 3B. Lipid was extracted from both the solid fraction and the supernatant after centrifugation.

〈参考文献〉

- (1) A. Cohen et al. (1979) : Water Research, 14, 1439
- (2) A. Cohen et al. (1982) : Water Research, 16, 455
- (3) S. Ghosh and D. L. Klass (1978) : Process Biochemistry, 12, 15
- (4) 菅原・副島(1977) : 蛋白質の定量法, 学会出版センター, 110
- (5) 東大農芸化学教室編(1978) : 実験農芸化学(下), 朝倉書店, 150
- (6) Zoetemeyer et al. (1982) : Water Research, 16, 303
- (7) 遠藤・野池・松本(1983) : 土本学会論文報告集, No 330, 49
- (8) 花木・松尾(1980) : 下水道協会誌, 17, 50
- (9) P. L. McCarty(1963) : Journal WPCF, 35, 1501
- (10) J. F. Andrews and E. A. Pearson(1965) : Int. J. Air Wat. Pollution, 9, 439