

(10) スターチとプロテインを炭素源とする高温メタン発酵槽における
有機酸分解特性および微生物生態の評価

**Characteristics of volatile fatty acids degradation and ecological
significance of microbe in thermophilic methanogenic system
fed with starch or protein as a carbon source**

谷川大輔*, 山口隆司*, 市坪誠*, 荒木信夫**, 高橋康晴**,
珠坪一晃***, 宮晶子****, 長屋由亀****, 原田秀樹*****

Daisuke TANIKAWA*, Takashi YAMAGUCHI*, Makoto ICHITSUBO*, Nobuo ARAKI**, Yasuharu TAKAHASHI**,
Kazuaki SYUTSUBO***, Akiko MIYA****, Yuki NAGAYA****, Hideki HARADA*****

ABSTRACT; We examined the characteristic of intermediate fermentation and ecological significance of microbe in thermophilic methanogenic system. Our study focused on ecological significance of sulfate-reducing bacteria contributing to propionate degradation, and the effects of the operating parameters such as pH level, COD loading and sulfate concentration on propionate accumulation. Six CSTRs were operated at a temperature of 55 °C and HRT of 25-75 days. The reactor "S-7" was placed as a control reactor, which was fed with starch as a carbon source under a constant condition of pH7, 33 mgS/L of sulfate, and COD loading of 1.2 kg/m³/day. Other five CSTRs were operated at various conditions such as pH levels (pH6 to pH8), COD volumetric loading rate (3.0 kg/m³/day), sulfate concentration (33 and 100 mgS/L), and feeding of protein as a different type of carbon source. As the results, propionate accumulation in the sulfate-rich reactor, "S-S", was found at 100-200 mg/L, which was 1/10 of the control reactor, "S-7". Propionate-degrading activity test for sludge in "S-S" reactor with feeding of initial sulfate at 400 mgS/L showed that the propionate-degrading activity was enhanced up to three-fold compared to one in "S-7". Community structure in hydrolysis and acid producing processes was examined by domain bacterial 16S rDNA targeted PCR-DGGE analysis. "Band B" or "Band P" on PCR-DGGE analysis found more starch- or protein-degrading bacteria, respectively, from all reactors. Fluorescence *In-situ* Hybridization was utilized for the identification of Thermophilic sulfate-reducing bacteria. By the analysis, *Desulfotomaculum* sp. was found in all CSTRs.

KEYWORDS; VFA accumulation, propionate degradation, thermophilic methanogenesis, hydrogen-scavenger, sulfate-reducing bacteria

-
- * 呉工業高等専門学校専攻科 建設工学専攻 (Dept. of Civil Eng., Kure National College of Tech.)
** 長岡工業高等専門学校専攻科 環境都市工学専攻 (Dept. of Civil Eng., Nagaoka National College of Tech.)
*** (独) 国立環境研究所 水圏環境研究領域 (Water and soil Environ. Div., Nat. Inst. Environ. Stud.)
**** (株) 荏原製作所 技術・研究開発統括 (Technologies, R. & D. Division, Ebara Corp.)
***** 長岡技術科学大学 環境システム工学系 (Dept. of Environ. Sys. Eng., Nagaoka Univ. of Tech.)

1. はじめに

メタン発酵法は、エネルギー回収が可能であるという利点を有することから、循環型処理技術として注目されている。その中でも、高温メタン発酵法は、処理速度、有機物分解率が中温メタン発酵法と比較して高いことから、実用化に向けての研究が進められている¹⁾。既往の高温メタン発酵に関する研究では、生ゴミ処理を対象としたものが多く行われている。しかしながら、生ゴミの主要構成要素である、炭水化物、蛋白質、脂質、セルロース等の個別成分に着目した処理特性に関する研究報告は少なく、特に加水分解・酸生成過程に関する情報は乏しい。また、その過程で生じるプロピオン酸等の有機酸の蓄積が発酵の妨げになるという問題があり、その適切な制御方法に関する知見も少ない²⁾。筆者らのグループは、これまでにセルロースの分解を対象とした研究を行い報告している³⁾。そこで本研究では、炭水化物、蛋白質を対象とした高温メタン発酵プロセスの制御因子の検討と、プロセスに保持される微生物群の生態評価を目的として実験を行った。実験では、6系列の高温完全混合型リアクター (Completely stirred tank reactor, CSTR) を運転し、高温メタン発酵における発酵特性の評価及び、発酵に関わる微生物の生態評価を行った。各系列では、pH、COD 負荷、硫酸塩濃度を運転パラメーターとし、特に発酵特性及び微生物生態に与える硫酸塩の影響に注目して実験を行った。

2. 実験方法

2.1 集積培養

CSTR (液層部 10L) を使い、炭水化物として溶性スターチ (和光純薬)、蛋白質として大豆製蛋白粉末 (和光純薬) を炭素源とし、HRT25~75 日、55℃の条件で、6 系列の運転を行った。Fig.1 は装置図を示す。装置内の基質濃度を均一にするため、生成ガスによる攪拌を行った。また、硫化物による障害を防止するため、全系列共にガスライン中に脱硫塔を設置した。Table.1 は、各系列の炭素源、回分初期 COD 濃度 ([] 内は RUN4 での初期濃度)、COD 容積負荷 (HRT25 日における値)、回分初期硫酸塩濃度を示す。ここで、系列名の S はスターチ系、P はプロテイン系を表し、数字は培養時の pH、S-S は高硫酸塩系、S-H は高負荷系をそれぞれ表す。S-7 が、CSTR 運転のコントロールに相当する条件である。培養基質は、上記炭素源と硫酸ナトリウムに、以下の微量元素 (単位:mg/L) を添加して構成した; NH_4Cl , 500 (スターチ系のみ); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400; CaCl_2 , 113; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.0; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.17; ZnCl_2 , 0.07; H_3BO_3 , 0.06; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.50; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.04; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.027; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025; EDTA, 5.0; NaHCO_3 , 1000; KH_2PO_4 , 6805; K_2HPO_4 , 8710。なお、植種汚泥には高温消化汚泥を用いた。

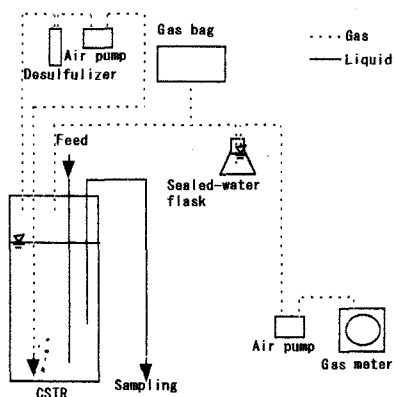


Fig.1 Schematic of thermophilic anaerobic CSTR

Table 1 Designed operating conditions of thermophilic CSTRs.

CSTR	Carbon source	CODcr conc. mgCOD/L	CODcr load. kgCOD/m ³ /d	pH	Sulfate conc. mgSO ₄ ²⁻ -S/L
S-6	Starch	1200 [3600]	1.2	6	33
S-7				7	
S-8				8	
S-S		3000 [9000]	3.0	7	100
S-H					
P-7	Protein	1200 [3600]	1.2		33

本実験における運転期間は、基質の投入頻度により RUN1～RUN4 からなる。RUN1 では投入基質 COD 量に相当するメタン生成量が確認されてから基質を投入した (HRT 25～75 日)。全系列共に処理が安定してきたため、RUN2 では毎日基質投入を行った (HRT 25 日)。RUN3 では、RUN2 の期間に蓄積した有機酸を分解させるため、一時的に基質の投入を停止し、酢酸濃度が 400 mgCODcr/L 以下となった系列のみに基質投入を行った。有機酸の蓄積阻害を緩和するため、運転 133 日目に S-6、S-8、S-H について無機培地を用いリアクター混合液を 2 倍希釈した。RUN3 の期間中、良好なメタン発酵が確認されなかったため、運転 193 日目に植種汚泥を新たに 2L ずつ添加した RUN4 では、3～4 日に 1 度の基質投入とし、有機酸分解を十分進行させてから基質投入を行った (1 回当たりの基質投入量を RUN1、RUN2 の 3 倍とした、HRT25～33 日)。

2.2 活性試験

培養汚泥を供試汚泥として、メタン生成活性 (Methane-producing activity、MPA) を評価した。いずれも COD 換算として、gCOD/gVSS/d 単位で求めた。酢酸、H₂/CO₂ (80%/20%、1.4atm) を電子供与体とし、バイアル内濃度は 2000 mgCODcr/L とした。嫌気条件下で、あらかじめバイアル瓶に分注しておいた 2 倍濃度の活性試験用培地 (リン酸緩衝液、無機塩、酸化還元指示薬等を含む) に汚泥濃度が 1/2 となるように汚泥を分注し、硫化ナトリウムを添加後、持ち込みの有機物を分解させた上で基質投入を行い、H₂/CO₂ 基質では気層部を H₂/CO₂ に、それ以外では窒素ガスに完全に置換し、シェーカー (回転半径 5cm、120rpm、55℃) に装着した。経時的にガス量、ガス組成を測定して活性を求めた (詳細: Yamaguchi らの方法⁴⁾)。

また、プロピオン酸分解に対する硫酸塩濃度の影響を評価するため、回分初期硫酸塩濃度をふったバイアル瓶 (添加硫酸塩濃度: 0、33、100、200、400 mgSO₄²⁻-S/L) のシリーズを用い、プロピオン酸分解活性 (Propionate-degrading activity、PDA) を測定した。この実験は、RUN4 (運転日数 215 日目) における S-7 と S-S について行った。

2.3 PCR-DGGE 法

運転日数 20 日目 (D20)、41 日目 (D41) の培養汚泥を対象に PCR-DGGE 法を行った。DNA 抽出にはビーズビーター法を適用し、フェノール・クロロホルム・エタノール沈澱を行った。Table 2 は、PCR 条件を示す。保持微生物の 16S rDNA をターゲットとした Touch down PCR を行った。プライマーセットは 16SrDNA V3 region (341-534) を用いた。DGGE には D code system (Bio Rad 社) を使用した。10%アクリルアミドゲル中の変性剤の濃度勾配を 35～55%に設定し、60℃、200V、3.5 時間の条件下で PCR 産物の電気泳動を行った。電気泳動終了後、ビストラググリーンで 15 分染色し、紫外線蛍光下でバンドの確認を行った。

Table 2 PCR condition for primer set 16SrDNA V3 region (341-534)

Step1 (Touch down PCR)			Step2		
94℃	10min	× 1cycle	94℃	1min	× 10cycle
96℃	30sec		55℃	1min	
94℃	1min	× 18cycle (goes down 2℃ every 2cycle)	72℃	2min	
64-56℃	1min		72℃	10min	× 1cycle
72℃	2min		4℃		
					∞

2.4 FISH 法

D20、D41 の培養汚泥を対象に、FISH 法による代表的な高温種硫酸塩還元細菌 *Desulfotomaculum* 属の特異的検出を行った。プローブは *Desulfotomaculum* 属に特異的な DEM1164 を用いた⁹⁾。ハイブリダイゼーションの手法は Amann の方法に準拠した⁹⁾。汚泥サンプルは 4%-パラホルムアルデヒド溶液にて固定後、超音波分散処理を行い、プレパラートに滴下した。FISH は Hybridization Buffer 8 μ L (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.2, 0.01% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)、ホルムアミド 10%) をスポットし、さらに 1 μ L (50ng) のプローブを含むのプローブ溶液を加えて 46℃で 3 時間ハイブリダイズした。その後 DAPI による全菌染色を行った。試料は落射蛍光顕微鏡 (Olympus BX60-FLA) を用いて観察した。

3. 実験結果と考察

3.1 発酵特性

Fig. 2 は、スターチ系における蓄積した酢酸・プロピオン酸濃度の経日変化を示す (蓄積有機酸分解期間とした RUN3 は除く)。RUN1 では、有機酸の高い蓄積は見られず、投入基質濃度と同程度のメタン生成量が確認された。RUN2 では、COD 負荷を 3 倍に上昇させたため、徐々に有機酸が蓄積し、運転 70 日目以降では、メタン生成量が 3~4 割低下した。この期間では、特に酢酸の蓄積が目立った。蓄積有機酸分解期間とした RUN3 では、良好なメタン発酵は行われず、培地によるリアクター混合液希釈後に、徐々に有機酸の分解が進行した。RUN4 では、有機酸の蓄積は RUN1 と同程度であり、投入基質濃度と同程度のメタン生成が行われた。なお、乳酸、蟻酸、及びこはく酸等のトリカルボン酸サイクルに関する脂肪酸の分析も行ったが、これらの酸の蓄積は、いずれの期間においても見られなかった。

有機酸の蓄積に対する pH の影響 (pH6、7、8) を評価すると、S-6 では、酪酸濃度が 3000mgCOD/L まで蓄積したことが特徴であり、S-7、S-8 の約 3 倍の蓄積レベルであった。S-7 のプロピオン酸蓄積状況に注目すると、RUN2 の期間では、最も高いプロピオン酸蓄積が起きた。この原因としては、高濃度に蓄積した酢酸が、プロピオン酸分解を阻害したことが考えられる⁷⁾。一方、RUN4 では、RUN2 と負荷が同程度であるにもかかわらず、プロピオン酸の蓄積は見られなかった。S-H では、酢酸・プロピオン酸・酪酸が蓄積しやすく、S-7 と比較して、酢酸・プロピオン酸では 2~3 倍、酪酸では 5 倍程度の蓄積が見られた。有機酸の蓄積に対する硫酸塩濃度の影響を評価すると、S-S では、全期間を通して、有機酸の蓄積が低レベルに抑えられ、有機酸の蓄積が確認された RUN2 の期間においても、S-7 の約 1/10 の蓄積量であった。よって、硫酸塩添加操作により、有機酸の蓄積を低く抑えることができることが分かった。

Fig.3 は、プロテイン系における酢酸・プロピオン酸濃度の経日変化を示す (RUN3 は除く)。各 RUN における有機酸蓄積の挙動は、S-7 と同様であった。有機酸の蓄積に対する炭素源の影響を評価すると、P-7 では、酢酸の蓄積量は S-7 の 1/2 となったが、プロピオン酸は S-7 の約 2 倍蓄積した。したがって、プロテイン系の方が、スターチ系と比較してプロピオン酸が蓄積しやすいことが分かった。

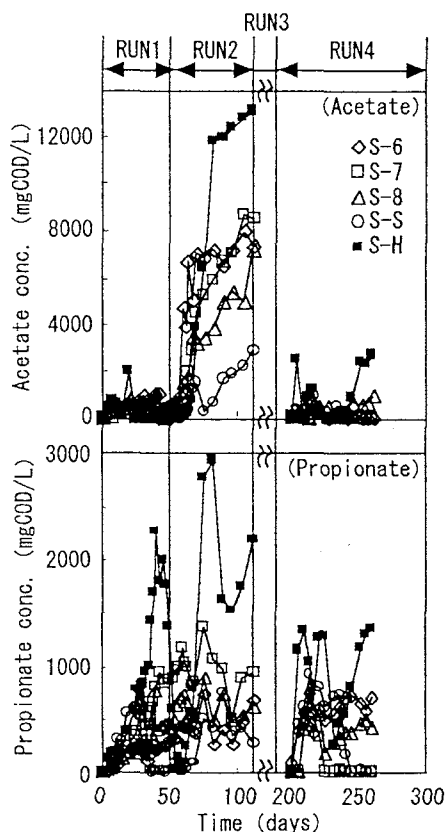


Fig.2 Time course of acetate and propionate concentration of starch CSTRs.

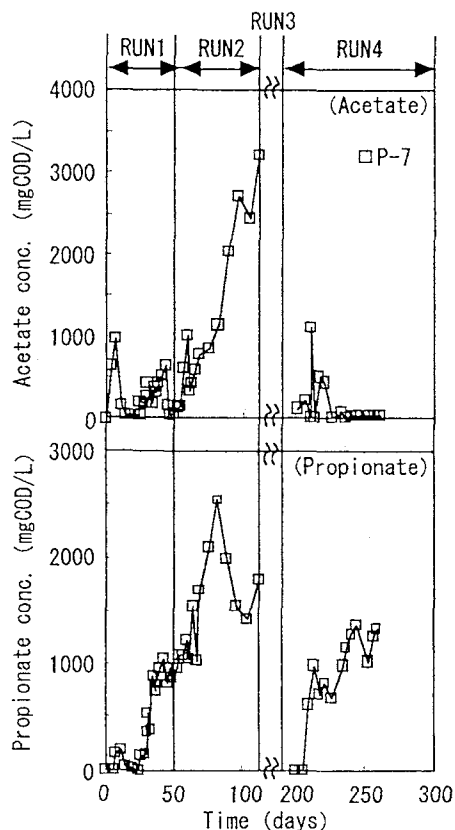


Fig.3 Time course of acetate and propionate concentration of protein CSTR.

3.2 活性試験

Fig.4、Fig.5 は、それぞれスターチ系の酢酸資化性メタン生成活性 (MPA-Ac) 及び水素資化性メタン生成活性 (MPA-H₂) を示す (RUN3 は除く)。両基質に共通して、運転 91 日目における MPA-Ac が低下しているが、これに対応して Fig.2 の酢酸の蓄積がみられた。

次に、Fig.2 において、S-S と S-H でプロピオン酸の分解が進行した RUN1、RUN4 の活性に注目すると、S-S と S-H 共に MPA-H₂ が他の系列より高いレベルとなっている。共生細菌によるプロピオン酸分解のためには水素除去者の存在が不可欠である⁹⁾。S-S と S-H では、プロピオン酸を分解を進行させるための水素除去者として水素資化性メタン生成古細菌 (Methane-producing bacteria, MPB) が寄与していたことが分かる。また、RUN4 では、S-6、S-H でも RUN1 と同等以上の活性を示し良好なメタン発酵が進行した。

Fig.6 は、S-7 と S-S における PDA と回分初期硫酸塩濃度の関係を示す。S-7 では硫酸塩添加による活性の上昇は見られなかった。これに対して S-S では、硫酸塩濃度の増加に対応した活性の上昇が見られた。通常培養時の硫酸塩濃度である 100mgSO₄²⁻/S/L では、無添加時と比較して、活性は 2.0 倍上昇した。ここで、回分終了時における各系列の硫酸塩濃度を測定したところ、S-7 では最大利用量が 50mgSO₄²⁻/S/L 程度であったのに対し、S-S では最大 170mgSO₄²⁻/S/L の利用が確認された。すなわち、元々高い硫酸塩還元能を有する S-S では、硫酸塩濃度に対応したプロピオン酸分解が可能であるが、S-7 では硫酸塩還元能の限界が

50mgSO₄²⁻-S/L 程度であるため、硫酸塩濃度の増加に関わらず、活性がほぼ一定となったものと考えられる。

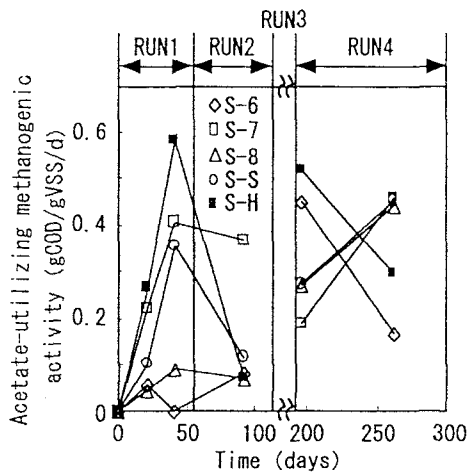


Fig.4 Acetate-utilizing methanogenic activity of starch CSTRs.

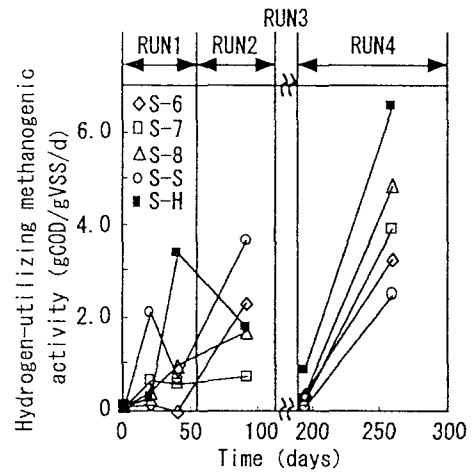


Fig.5 Hydrogen-utilizing methanogenic activity of starch CSTRs.

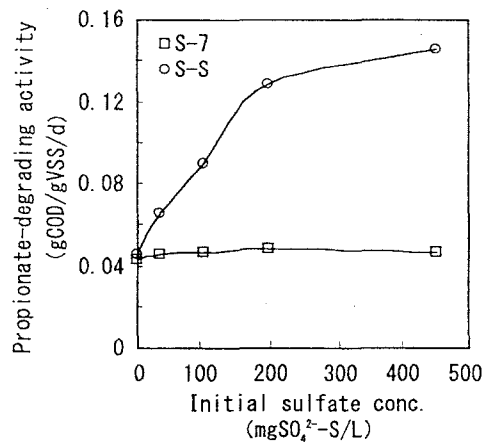


Fig.6 Effect of initial sulfate concentration in batch test on propionate-degrading activity of S-7 and S-S.

3.3 PCR-DGGE 法

Fig.7 は、運転 20 日目 (D20)、41 日目 (D41) の培養汚泥についての DGGE の結果を示す。コントロールレーンに、高温メタン発酵条件下での炭水化物集積系で優占化する細菌に相当するバンド B と蛋白質集積系で優占化する細菌に相当するバンド P を示した³⁹⁾。バンド B は、*Petrotoga mobilis* に近縁である³⁹⁾。全系列バンド P は、家畜糞尿を処理する高温メタン発酵汚泥から分離された *Coprothermobacter proteolyticus* の近縁種であり、蛋白質を資化し、酢酸、プロピオン酸、i-吉草酸、乳酸、水素を主に生成することが明らかになっている⁹⁾。全系列に共通してバンド P が見られるが、これは植種汚泥が蛋白質成分を含有する生ゴミ

を処理していた汚泥であるためだと考えられる。スターチ系では、集積の経過とともにバンド B の蛍光強度が増し、それに対応してバンド P の蛍光強度は低下している。このことから、炭水化物を基質としたスターチ系では、炭水化物集積系で優先化するバンド B に相当する細菌が優先化していることが考えられる。一方、プロテイン系では、集積とともにバンド B の蛍光強度は低下し、D41 では全系列中で最もバンド P の蛍光強度が強くなっている。このことから、蛋白質を基質としたプロテイン系では、蛋白質集積系で優先化するバンド P に相当する細菌が優先化していることが考えられる。

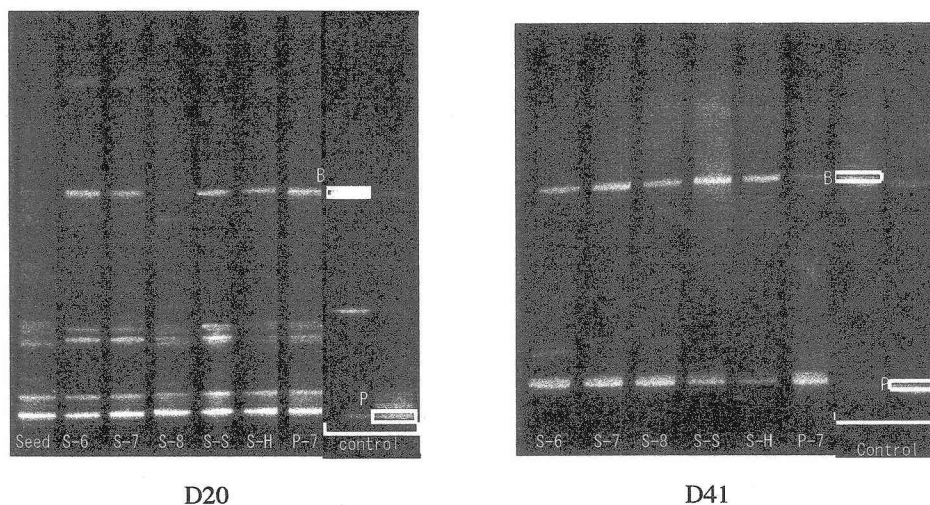


Fig.7 Domain bacterial 16S rDNA targeted PCR-DGGE analysis for the sludges harvested from each CSTRs in days 20 (D20) and days 41 (D41).

3.4 FISH 法による硫酸塩還元細菌の解析

Fig.8は、S-Hに*Desulfotomaculum*属を特異的に検出するDEM1164プローブを適用したFISH写真を示す。

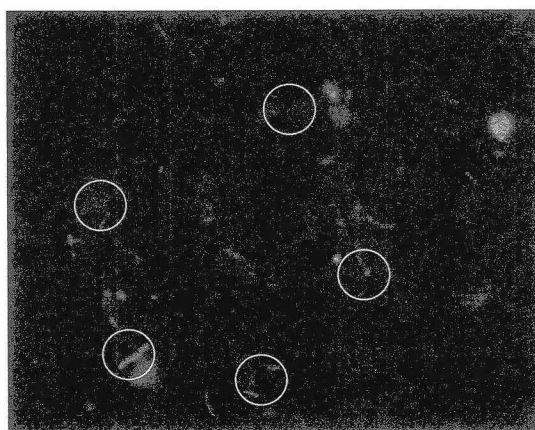


Fig.8 Photograph of fluorescence *in-situ* hybridization of sludge in S-H reactor. It hybridized with genus *Desulfotomaculum* plobe (DEMI 1164) .

これまでに高温種の硫酸塩還元細菌として *Desulfotomaculum* 属、*Thermodesulfovibrio* 属と *Thermodesulfobacterium* 属細菌が報告されている。本研究では *Desulfotomaculum* 属の検出を試みたところ、シグナルを発する桿菌を確認した。この桿菌のダイレクトカウントでは、DAPI 染色細胞に占める割合は約 5%であった。*Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* subsp.は、水素資化性 MPB との共生培養条件下で硫酸塩を電子受容体として利用しながらプロピオン酸を利用すると報告されている¹⁰⁾。これは、プロピオン酸の分解に何らかの形で硫酸塩還元細菌が関与していることを示唆しているが、どのような硫酸塩還元細菌がどのような代謝様式でプロピオン酸の分解に寄与しているかについては再調査が必要である。

4. 結論

- 1) プロピオン酸蓄積に対する pH の影響を評価したところ、メタン発酵が良好に行われた RUN1、RUN4 期間においては、pH7 (S-7) でプロピオン酸蓄積が最小となった。
- 2) 有機酸蓄積に対する COD 容積負荷の影響を評価したところ、高負荷系 (S-H) では、酢酸・プロピオン酸・酪酸が蓄積しやすく、コントロール系 (S-7) と比較して、酢酸・プロピオン酸では 2~3 倍、酪酸では 5 倍程度の蓄積が見られた。
- 3) 有機酸蓄積の低減の制御方法として硫酸塩添加が有効であることが分かった。高硫酸塩系 (S-S、100 mgS/L) では、運転期間を通じて有機酸の蓄積を低レベルに抑えることができ、有機酸蓄積の起こった RUN2 においてもその蓄積量は、コントロール系 (S-7、33 mgS/L) の約 1/10 のレベルであった。
- 4) 高硫酸塩系 (S-S) では、硫酸塩が存在するとプロピオン酸分解活性が上昇することが確認され、硫酸塩が存在しない条件に対して、培養時と同じ硫酸塩レベル (回分初期硫酸塩濃度、100mgSO₄²⁻-S/L) では、プロピオン酸分解活性は 2.0 倍上昇した。
- 5) スターチ、プロテイン基質では、バンド B、P に対応する酸生成細菌が優占化し、加水分解過程を担っていることが分かった。
- 6) 全系列中から高温硫酸塩還元細菌の一種である *Desulfotomaculum* 属が検出され、これらの細菌が有機物除去に関与することが分かった。

謝辞

本研究開発は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) から委託を受けて、「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発」プロジェクトの一環として実施したものである。関係者各位に深謝致します。

参考文献

- 1) 李王友、水野修、船石圭介、山下耕司：二相循環方式高濃度メタン発酵プロセスを用いた生ごみの高速メタン化処理、環境工学研究論文集、40、p321-331、2003
- 2) 中村明靖、大橋晶良、原田秀樹：嫌気共生プロピオン酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の各ヒドロゲナーゼ発現、日本水環境学会年会講演集、37、p283、2003
- 3) 珠坪一晃、長屋由亀、宮晶子：集積培養と PCR-DGGE 法の組み合わせによる高温メタン発酵系での優占セルロース分解細菌の同定、日本水環境学会シンポジウム講演集、5、p101、2002
- 4) Yamaguchi T., Harada H. and I-Cheng Tseng : Competitive Exclusion of Methane-producing Bacteria by Sulfate-reducing Bacteria in Anaerobic Degradation of Long-chain Fatty Acids、Proc. 8th International Conf. on Anaerobic Digestion、2、p362-370、1997
- 5) Stubner,S. and K.Meuser : Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses、FEMS Microbiology Ecology、34、p73-80、2000

- 6) Amann, R. L., W. Ludwig and K. H. Schleifer : Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59, p143-169, 1995
- 7) JULES B. VAN LIER, KATJA C. F. GROLLE, CARLA T. M. J. FRIJTERS, ALFONS J. M. STAMS AND GATZE LETTINGA : Effects of Acetate, Propionate, and Butyrate on the Thermophilic Anaerobic Degradation of Propionate by Methanogenic Sludge and Defined Cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, p1003-1011, 1993
- 8) Imachi H., Sekiguchi Y., Kamagata Y., Ohashi A. and Harada H. : Cultivation and In Situ Detection of a Thermophilic Bacterium Capable of Oxidizing Propionate in Syntrophic Association with Hydrogenotrophic Methanogens in a Thermophilic Methanogenic Granular Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, p3608-3615, 2000
- 9) 長屋由亀、立澤友子、宮晶子、珠坪一晃、山口隆司 : 高温メタン発酵における蛋白質分解細菌、日本水環境学会年会講演集、38、p187、2004
- 10) Caroline M. Plugge, Melike Balk and Alfons J. M. Stams : *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *Thermosyntrophicum* subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionate-oxidizing, spore-forming bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, p391-399, 2002