

(47) 高温メタン発酵槽における溶解性・固形性有機物分解に及ぼす硫酸塩の影響評価

Effect of sulfate on the biodegradation of soluble and solid organic matters in thermophilic methanogenic process.

谷川大輔*, 山口隆司**, 市坪誠**, 珠坪一晃***, 宮晶子****, 大橋晶良*, 原田秀樹*
Daisuke TANIKAWA*, Takashi YAMAGUCHI**, Makoto ICHITSUBO**,
Kazuaki SYUTSUBO***, Akiko MIYA****, Akiyoshi OHASHI*, Hideki HARADA*

ABSTRACT; Effect of sulfate on intermediate production and degradation in thermophilic methanogenic process was investigated using four CSTRs fed with starch or shochu waste as organic matters. The CSTRs were operated as semi-continuous manure, one time of feeding for 3~4 days, at 55°C, pH 7, 1.2 kg/m³/day of CODcr volumetric loading rate, and 25~33 days of HRT. The “St-7” reactor and “St-S” reactor were fed with starch at different initial sulfate level, that is, 33 mgS/L and 100 mgS/L respectively. The “Sh-7” reactor and “Sh-S” reactor were fed with shochu waste with 33 mgS/L and 100 mgS/L of sulfate respectively. As the results, St-7 marked higher VFA and hydrogen partial pressure than Sh-7 in each feeding. Hydrogen partial pressure was increased up to 10²~10³ Pa in St-7, whereas it was suppressed lower 10¹ Pa in Sh-7. As to reactors St-S and Sh-7, the Gibbs free energy ($\Delta G'$) for propionate degradation were kept minus, and propionate degradation was occurred in the early stage of their fermentation. On the other hand, St-7 had unfavorable condition to propionate degradation, and beginning of the degradation was delayed. Sulfate-reducing bacteria act as a hydrogen consumer in the all of reactor. It was revealed biodegradation of propionate could be enhanced by the maintenance of low hydrogen pressure such as 10 Pa, and sulfate-reducing bacteria have effectiveness to achieve that condition.

KEYWORDS; the Gibbs free energy, hydrogen partial pressure, propionate degradation, sulfate-reducing bacteria, thermophilic methanogenesis

1. はじめに

有機性廃棄物処理技術のひとつであるメタン発酵法は、有機物分解を行うと共に、その最終生成物であるメタンをエネルギーとして再利用可能であることから、循環型処理技術として実用化への取り組みが進められている¹⁾。これまで、筆者らの研究グループは、溶解性スターチ及び大豆蛋白廃水の処理を高温メタン発酵法により行い、運転条件や制御因子の検討等を行ってきた。その結果、高温メタン発酵法における最大の阻害物質であるプロピオン酸の蓄積制御及び分解促進に、硫酸塩の添加が効果的であるという新たな知見を得ること

* 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.)

** 呉工業高等専門学校 環境都市工学科 (Dept. of Civil Eng., Kure National College of Tech.)

*** (独) 国立環境研究所 水・土壌・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.)

ができた²⁾。しかしながら、高温メタン発酵系におけるプロピオン酸の生成・分解に対する硫酸塩寄与のメカニズムは明らかになっておらず、他の基質への適用可能性の検討も行われていない。そこで、本研究では、前年度基質として用いた溶解性スターチの対照系として、固形性有機物含量の高い焼酎粕廃液を基質として用い、溶解性と固形性の基質間での処理性能の比較を行いながら、特に硫酸塩添加が有機物分解に及ぼす効果に注目して実験を行った。また、基質投入後の水素分圧、有機酸濃度等の経時変化の測定データを用いて自由エネルギー変化量 $\Delta G'$ の算出を行い、熱力学的見地からプロピオン酸分解反応の解析を行った。

2. 実験方法

2.1 集積培養

完全混合型のメタン発酵槽（CSTR：液層部 10L）を用い、焼酎粕廃液を炭素源とし、HRT25～33 日、55℃の条件で、添加硫酸塩濃度の異なる 2 系列（Sh-7, Sh-S）の運転を行った。焼酎粕廃液には麦焼酎粕廃液を用いた。この廃液の組成を Table 1 に示す。焼酎粕廃液の有機物濃度は 108,000 mgCODcr/L であり、固形性の COD が全体の 32 % を占める。実験にはこの廃液を適宜希釈（COD 濃度 3,600 mgCODcr/L）して用いた。また、植種汚泥には高温消化汚泥を用いた。Fig.1 にリアクターの概要図を示す。リアクター内の基質濃度を均一にするため、生成ガスによる撹拌を行った。また、硫化物による阻害を防止するため、全系列共にガスライン中に脱硫塔を装着した。Table 2 は、各系列の炭素源、回分初期 COD 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。基質の投入は半連続で、3～4 日に 1 度行った。標準系（コントロール）である Sh-7 の添加硫酸塩濃度は、33 mgSO₄²⁻-S/L とした。これに対し、Sh-S は高硫酸塩系とし、硫黄負荷を Sh-7 の約 3 倍（100 mgSO₄²⁻-S/L）にして運転を行った。また、前年度実験を行ったスターチ分解系との比較を行う為、スターチ分解系のコントロールに当たる St-7 と、高硫酸塩系 St-S の培養条件も Table 2 中に示した。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;NH₄Cl、500;MgCl₂·6H₂O、400;CaCl₂、113;FeCl₂·4H₂O、2.0;CoCl₂·6H₂O、0.17;ZnCl₂、0.07;H₃BO₃、0.06;MnCl₂·2H₂O、0.50;NiCl₂·6H₂O、0.04;CuCl₂·2H₂O、0.027;Na₂MoO₄·2H₂O、0.025;EDTA、5.0;NaHCO₃、1000;KH₂PO₄、6805;K₂HPO₄、8710。

Table 1 Representative characteristics of barley shochu waste.

Parameter	Concentration
pH	4.0
CODcr total (mgCOD/L)	108,000
CODcr soluble (mgCOD/L)	73,900
VFA (mgCOD/L)	12,900
SS (mg/L)	30,800

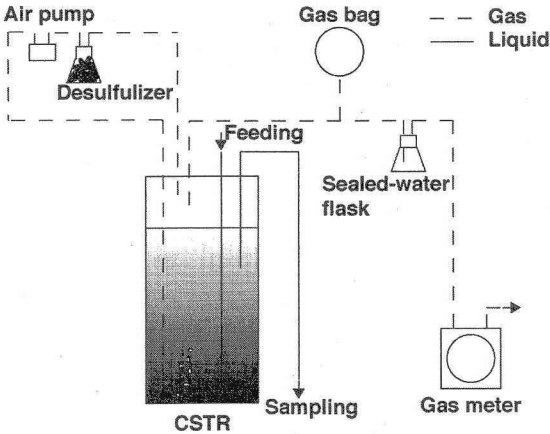


Fig.1 Schematic of thermophilic anaerobic CSTR.

Table 2 Designed operating conditions of thermophilic CSTRs.

CSTR	Carbon source	CODcr conc. mgCOD/L	CODcr load. kgCOD/m ³ /day	pH	Sulfate conc. mgSO ₄ ²⁻ -S/L
Sh-7	Shochu	3,600	0.9~1.2	7.0	33
Sh-S	[as a solid]				100
St-7	Starch				33
St-S	[as a soluble]				100

2.2 プロピオン酸分解に対する初期硫酸塩濃度・初期水素分圧の影響評価

プロピオン酸分解に対する硫酸塩濃度・水素分圧の影響を評価するため、CSTR 保持汚泥について、初期硫酸塩濃度・水素分圧を変化させた条件下で（添加硫酸塩濃度：0、33、100、200、400 mgSO₄²⁻-S/L、添加水素（H₂/CO₂；80%/20%）濃度：0、0.325、0.673、1.37、13.7、25.4、78.2 %）、プロピオン酸分解活性（Propionate-degrading activity、PDA）を測定した。プロピオン酸のバイアル内初発濃度は、500 mgCODcr/L とした。活性は COD 換算値として、gCOD/gVSS/d 単位で示した。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）と等量の汚泥を分注し、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。その後基質投入を行い、気層部を窒素ガスで完全に置換し、55℃に設定したシェーカー（回転半径 5cm、120rpm）で振とうを行った。経時的にガス量、ガス組成、硫酸塩濃度、揮発性有機酸（volatile fatty acid、VFA）濃度を測定して活性を求めた（詳細：Yamaguchi らの方法³⁾）。また、初期水素分圧の影響評価実験では、各水素分圧系に対して硫酸塩無添加系（S0：0 mgSO₄²⁻-S/L）と硫酸塩添加系（S100：100 mgSO₄²⁻-S/L）を用意し、硫酸塩の有無による影響の評価も行った。

2.3 プロピオン酸の分解・生成に対する自由エネルギー変化量 $\Delta G'$ の影響評価

St-7、St-S 及び Sh-7 リアクターにおけるワンバッチ基質分解試験の結果を用い、プロピオン酸分解反応（CH₃CH₂COO⁻ + 3H₂O → CH₃COO⁻ + HCO₃⁻ + H⁺ + 3H₂、 $\Delta G^0 = 76.1 \text{ kJ/reaction}$ ）に対する自由エネルギー変化量 $\Delta G'$ （pH 7.0、55℃）の算出を行った。温度補正には、ファントホッフの式を用いた。 $\Delta G'$ （kJ/reaction）の算出には、バッチ試験の測定値（水素分圧、有機酸濃度等）を元に回帰分析を行ったものを使用した。

3. 実験結果と考察

3.1 発酵特性

高温 CSTR によるスターチ、焼酎廃液の連続処理実験を異なる硫酸塩濃度条件下で行った。Table 3 に各リアクターの定常状態における運転特性（槽内 pH、酢酸蓄積濃度、プロピオン酸蓄積濃度、メタン回収率；平均値 ± 標準偏差）を示す。両基質共

Table 3 Summary of process performance in a steady-state condition.

CSTR	Sh-7	Sh-S	St-7	St-S
pH	7.1 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2
Acetate (mgCOD/L)	33 ± 29	32 ± 20	98 ± 138	49 ± 52
Propionate (mgCOD/L)	218 ± 283	124 ± 210	152 ± 241	108 ± 170
Methane recovery (%)	87 ± 11	89 ± 9	87 ± 13	83 ± 20

に運転 12 日以降から定常運転が可能となり、HRT 25 日の条件下で、投入基質の 80%以上がメタンに転換され、良好な処理とメタン生成が行われた。また、高硫酸塩系である St-S と Sh-S では、投入硫酸塩は全て消

費されており、硫酸塩還元細菌による有機物分解が確認された。これら 2 系列において硫酸塩還元細菌によって利用された COD は、投入有機物量の 6% であった。連続運転期間において、汚泥濃度の低下によって処理が悪化し、一時的に有機酸の蓄積が確認されたが、植種汚泥を追加投入したところ、汚泥濃度を維持することが可能となり、再び安定した処理を行うことができた。

基質分解と酸生成の様相を詳細に観察するため、リアクターへの基質投入後のメタン生成量、VFA 濃度及び水素分圧の挙動を追うバッチの基質分解試験を St-7 および Sh-7 リアクターについて行った。なお、基質

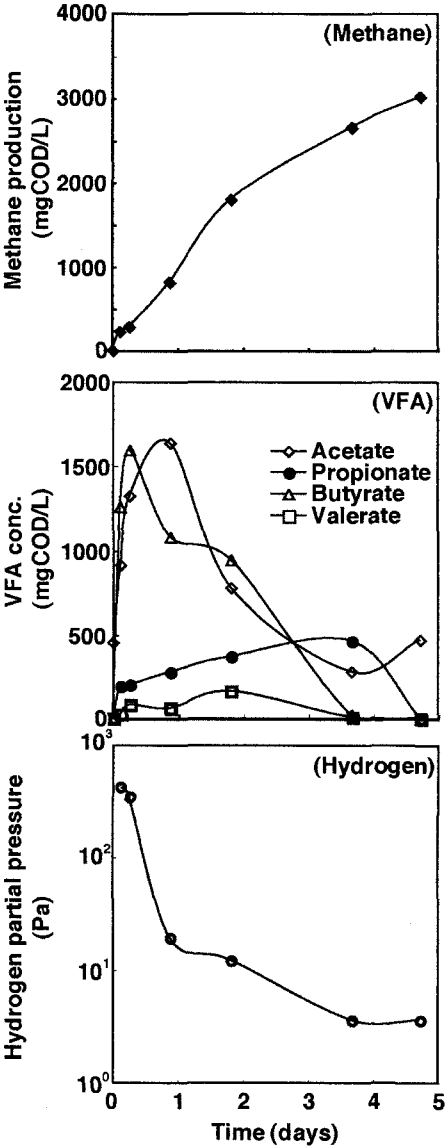


Fig.2 Time course of methane, VFA concentration and hydrogen partial pressure in St-7 after pulse feed of starch substrate.

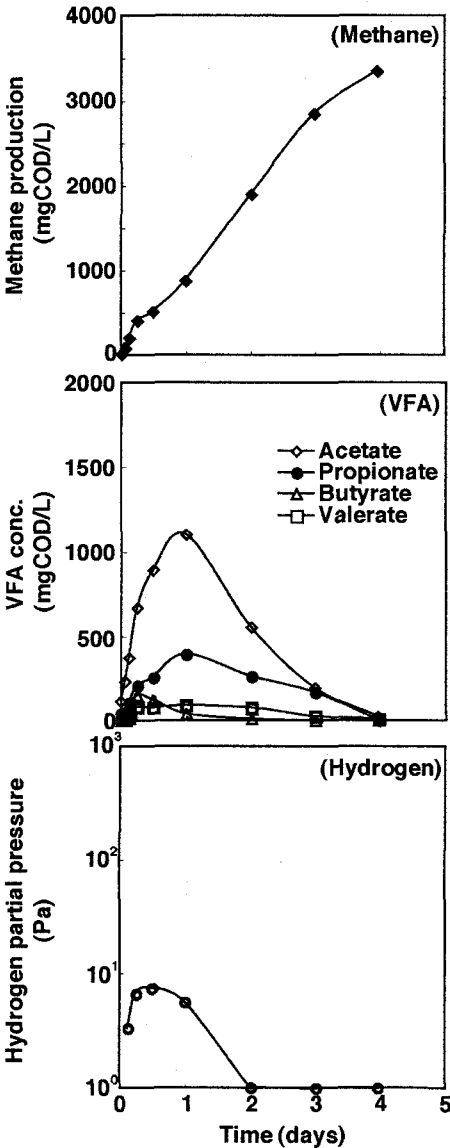


Fig.3 Time course of methane, VFA concentration and hydrogen partial pressure in Sh-7 after pulse feed of shochu substrate.

のメタンへの完全な転換が図られる状況を観察するため、基質は実験開始時にのみ添加し、投入基質と同程度のメタン生成が確認された時点で実験を終了した。Fig.2 は運転 206 日目の St-7 リアクター、Fig.3 は運転 133 日目の Sh-7 リアクターにおける基質投入後のメタン生成量、VFA 濃度及び水素分圧の経時変化（バッチ基質分解試験の結果）をそれぞれ示したものである。スターチ基質では基質投入 5 日後、焼酎基質では 4 日後に投入 COD 濃度の 80% 以上に相当するメタン生成が確認された。発酵過程で生成される主要な有機酸は、両基質共に酢酸とプロピオン酸であった。また、スターチ基質では発酵初期に酪酸の生成も確認された。基質間の発酵特性の違いとして、有機酸、水素共にスターチ基質において、より生成されやすい傾向が観察された。この理由として、溶解性有機物であるスターチは固形分を含む焼酎粕廃液と比較して分解されやすく、加水分解・酸生成過程が短時間で完了していることが考えられる。しかしながら、有機酸の蓄積や発酵槽内の高水素分圧は、その後のメタン生成過程に阻害的な影響を与えることが知られている⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。実際に、St-7 では、連続実験の際、プロピオン酸が蓄積する傾向にあった²⁾。したがって、スターチ基質である St-7 では、発酵初期における有機酸の蓄積と高水素分圧を回避することが必要であると考えられる。それらの制御方法に関しては、3.3 節に後述する。

3.2 プロピオン酸分解に対する初期硫酸塩濃度・初期水素分圧の影響評価

Fig.4 は Sh-S、St-S リアクター保持汚泥の PDA と活性測定時の初期硫酸塩濃度の関係を示す。前年度に報告したスターチ処理高濃度硫酸塩添加 CSTR、St-S リアクター保持汚泥では、硫酸塩濃度の増加に対応して PDA の上昇（最大：硫酸塩無添加系の 3.0 倍）が確認された。焼酎粕廃液処理 Sh-S リアクター保持汚泥については、初発硫酸塩濃度 $100 \text{ mgSO}_4^{2-}\text{-S/L}$ のシリーズで活性が最大となり（硫酸塩無添加系の 2.0 倍）、200、400 $\text{mgSO}_4^{2-}\text{-S/L}$ では活性の低下が見られた。しかしながら、硫酸塩無添加系と比較した場合、どの硫酸塩濃度においても活性の上昇が確認された。したがって、焼酎基質においては、プロピオン酸分解に対する最適な硫酸塩濃度が $100 \text{ mgSO}_4^{2-}\text{-S/L}$ 前後であることが分かった。基質の種類によって最適な硫酸塩濃度が異なる原因のひとつとして、各基質から生成される水素の量が関係していると考えられる。3.1 節からも分かるように、スターチ基質では基質投入直後に水素分圧が $10^2\sim10^3 \text{ Pa}$ に上昇している。これに対し、焼酎粕廃液からは、硫酸塩濃度 $33 \text{ mgSO}_4^{2-}\text{-S/L}$ のコントロール系においても、生成される水素のレベルは 10^1 Pa と低く、St-7 の $1/100\sim1/10$ のレベルであった。この結果から、発酵初期に生成される水素分圧のレベルによって、硫酸塩添加がプロピオン酸分解に及ぼす効果が異なることが考えられた。

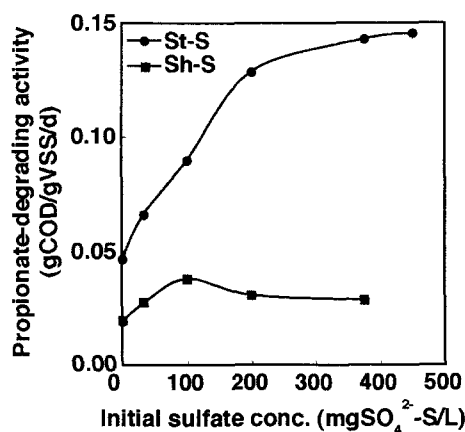


Fig.4 Effect of initial sulfate concentration in batch test on propionate-degrading activities of St-S and Sh-S.

そこで、次にプロピオン酸分解活性に対する初期水素分圧の影響評価を行った。Fig.5 は各初期水素分圧条件におけるプロピオン酸分解活性を硫酸塩添加・無添加バイアルにおいて比較したものである。また、図中に示す実線及び点線はそれぞれ、硫酸塩添加系 (S100: 100 mgSO₄²⁻-S/L) と無添加系 (S0: 0 mgSO₄²⁻-S/L) における、水素無添加時の活性を示している。S0 における活性の変化を見ると、初期水素分圧 10²~10³ Pa の範囲において、水素無添加時と比較して約 50%の活性低下が確認された。このことから、発酵初期に高い水素分圧に曝されると、プロピオン酸分解に対して阻害的な影響が働くことが分かった。これに対し、S100 では同様の水素分圧範囲においても、水素無添加時とほぼ同等の活性を保っていた。この時、両系列の水素分圧の挙動を観察したところ、S0、S100 共に実験開始 1 時間後には、10² Pa 以下まで低下していることが確認されたが、S100 の水素分圧のレベルは S0 の約 50%であった。従って、発酵初期の水素分圧の履歴によるプロピオン酸分解阻害を、硫酸塩の添加によって回避できることが明らかになった。すなわち、プロピオン酸分解に対する硫酸塩還元細菌の寄与として、共生系におけるプロピオン酸分解に水素除去者として機能する⁸⁾ことによって発酵槽内の水素分圧を低レベルに維持し、プロピオン酸分解の起こりやすい環境を作り出していることが分かった。

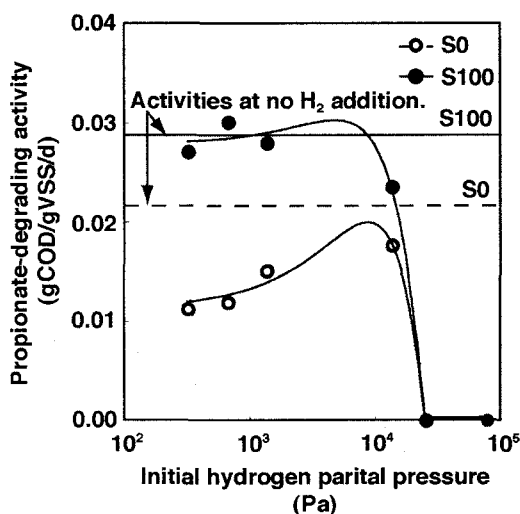


Fig.5 Effect of initial hydrogen partial pressure in batch test on propionate-degrading activities.

3.3 プロピオン酸の分解・生成に対する自由エネルギー変化量 $\Delta G'$ の影響評価

Fig.6 は St-7、St-S 及び Sh-7 リアクターにおける基質投入後のプロピオン酸濃度、プロピオン酸分解速度 (単位汚泥量あたりの速度として表示)、水素分圧及びプロピオン酸分解反応に対する自由エネルギー変化量 $\Delta G'$ の経時変化を示す。プロピオン酸の挙動に注目すると、Sh-7 では基質投入の 4 日後、St-7 では 5 日後には完全に分解されているのに対し、St-S では 5 日後でも生成されたプロピオン酸の 8 割程度が未分解のまま残っている。この時の各リアクター内の汚泥濃度を測定したところ、Sh-7、St-7 ではそれぞれ 3.12、4.22gVSS/L であったのに対し、St-S では 1.21gVSS/L と、他の 2 系列の半分以下の汚泥濃度であることが確認された。St-S では、運転初期に高い硫酸塩濃度で運転を行った為、他の系列よりもスタートアップが遅れ、同時期に汚泥濃度も低下していた。このことが St-S における汚泥濃度の低下及びプロピオン酸分解の遅れが見られた原因であると考えられる。次に、水素分圧に注目すると、St-7 では 10²~10³ Pa と高く、3.1 節で述べたプロピオン酸分解活性の低下が生じる範囲であることが確認された。これに対し、高硫酸塩添加系である St-S では水

素分圧が $10^1 \sim 10^2$ Pa と St-7 の約 1/10 のレベルであり、Sh-7 では 10^1 Pa と St-S のさらに 1/10 のレベルであることが分かる。従って、スターチ基質では硫酸塩の添加が水素分圧の低減に寄与しており、すなわち硫酸塩還元細菌が水素除去者として作用していることが考えられる。また、プロピオン酸分解の様相を見てみると、水素分圧のレベルの低い順に、早期に生成側（マイナス側）から分解側（プラス側）に転じている。ここで、各系列のプロピオン酸分解に対する自由エネルギー変化量 $\Delta G'$ に注目すると、早い時期からプロピオン酸分解の始まる St-S、Sh-7 では、常にマイナス側と分解の進みやすい条件下にあることが分かった。これに対し、St-7 では基質投入後、約 2 日間はプラスの領域にあり、 $\Delta G'$ がマイナスになった後もしばらくプロピオン酸の生成が進んでいることが確認された。この原因として、3.2 節で述べたように、発酵初期に高い水素分圧の履歴を受けることによって、汚泥のプロピオン酸分解活性が低下したことが考えられる。以上のことから、溶性スターチのように分解性が高く、発酵初期に系内の水素分圧が $10^2 \sim 10^3$ Pa 以上に達する基質に対して、水素分圧を低減する制御方法として硫酸塩の添加が有効であることが明らかになった。

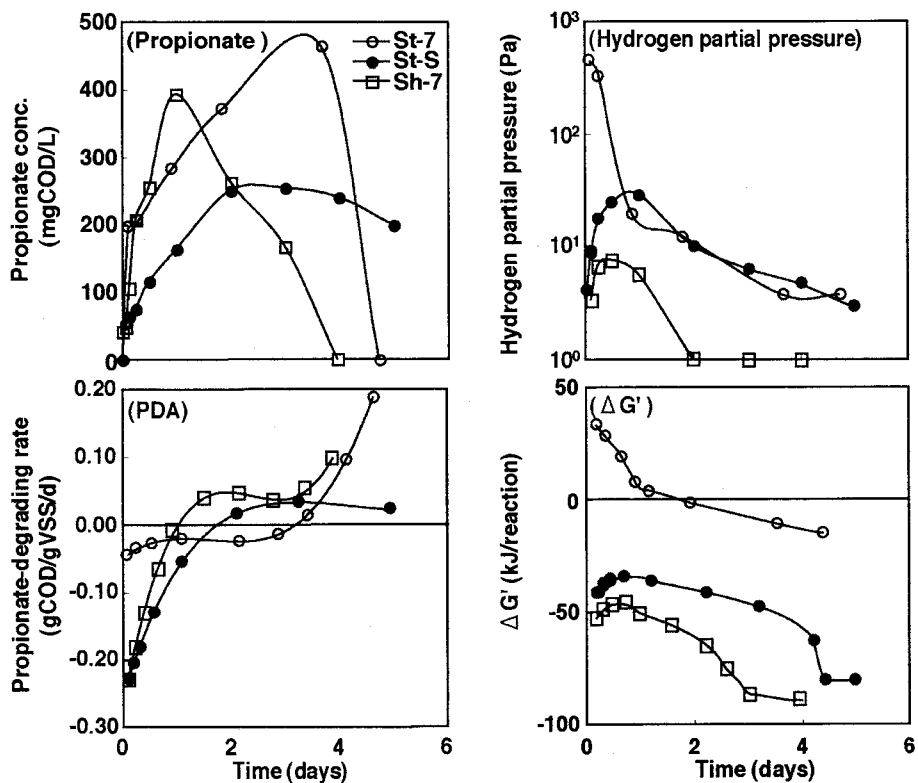


Fig.6 Time course of propionate concentration, propionate-degrading rate, hydrogen partial pressure, and $\Delta G'$ after feeding in St-7, St-S and Sh-7.

4. 結論

- 1) スターチ基質と焼酎基質のメタン発酵特性を比較した場合、溶解性有機物であるスターチ基質の方が固形分を含む焼酎基質よりも、発酵初期に有機酸が蓄積しやすい傾向が観察された。発酵初期の水素分圧は、焼酎基質系で 10^1 Pa レベルであるのに対し、スターチ基質系では $10^2 \sim 10^3$ Pa レベルにまで達していた。このことから、スターチ基質系での水素生成酢酸生成細菌による有機酸分解が熱力学的に不利

となり、有機酸の蓄積が生じることが分かった。

- 2) 硫酸塩還元細菌は、高温メタン発酵系において水素除去者としてプロピオン酸分解に寄与し、発酵初期の水素分圧を低く保つことによって、プロピオン酸分解の進行しやすい環境を作り出していることが考えられた。
- 3) 発酵初期に 10^2 – 10^3 Pa 以上の水素分圧の履歴を受ける基質に対して、水素分圧を低減する制御方法として硫酸塩の添加が有効であるという新たな知見が得られた。

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) 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：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物分解特性及び微生物生態の評価、環境工学論文集、41、p87-95、2004
- 3) 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
- 4) 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
- 5) RAVI K. VOOLAPALLI AND DAVID C. STUCKEY : Relative Importance of Trophic Group Concentrations during Anaerobic Degradation of Volatile Fatty Acids, Appl. Environ. Microbiol, 65, p5009-5016, 1999
- 6) Kuk-Jeong Chin and Peter H. Janssen : Propionate Formation by *Opitutus terrae* in Pure Culture and in Mixed Culture with a Hydrogenotrophic Methanogen and Implications for Carbon Fluxes in Anoxic Rice Paddy Soil, Appl. Environ. Microbiol, 68, p2089-2092, 2002
- 7) Peter F. Pind, Irini Angelidaki and Birgitte K. Ahring : Dynamics of the Anaerobic Process : Effectis of Volatile Fatty Acids, Biotechnol. Bioeng. , 82, p791-801, 2003
- 8) Hellen P. Goorissen, Alfons J. M. Stams and Theo A. Hansen : Methanol utilization in defined mixed cultures of thermophilic anaerobes in presence of sulfate, FEMS Microbiol. Ecol. , 49, p489-494, 2004