

メタノールを利用した高温メタン発酵槽における酸生成

——発酵槽内の嫌気性細菌のエコシステムを中心に——

山口 一

(技術研究所)

成富 隆昭

(技術研究所)

岡村 和夫

(技術研究所)

南 清司

(技術研究所)

§ 1. はじめに

わが国におけるメタン発酵による廃水処理は、1970年頃まで糖蜜を原料とするアルコール発酵の蒸留廃液およびその他の食品産業、パルプ産業などに活用されていたが、好気活性汚泥法の急速な普及が環境基準をクリアできる等を踏まえ、メタン発酵は下水処理場の余剰汚泥処理を含め一部に活用されていたに過ぎなかった。その理由は、長期間の処理日数を要する割にはCOD除去率も低く、かつ運転が不安定である等の原因が考えられた。

メタン発酵の欠点を取り除くため、1970年後半よりメタン生成細菌を主とした嫌気性汚泥を高密度にリアクター内に保持した固定床法、流動床法、UASB(上向流嫌気汚泥床)法が普及した。このような状況の中で、1985年より通産省は大型プロジェクト「水総合再生利用システムの研究開発(アクアルネッサンス'90)」の一環として、より高密度に汚泥を保持するため、上記方法に膜を複合したリアクターの研究を行ってきた。メタン発酵は、高濃度廃水の高負荷処理、余剰汚泥の削減、さらにエネルギー源となるメタンガス生産等、種々の利点を有し、現在の地球環境問題にかんがみ今後期待される手法の一つである。

我々は、アクアルネッサンス'90計画の一員として、紙パルプ蒸留廃水の高効率高温メタン発酵処理の研究を行ない、実容積5mlのバイオリアクターを用い、BOD容積負荷35kg/m³/日以上効率で長期間運転に成功した^{1)~3)}。しかし、C1化合物であるメタノールを主成分とする紙パルプ廃水の高温メタン発酵槽において、時折C2化合物である酢酸、およびC3化合物であるプロピオン酸等の揮発性有機酸生産に伴う運転効率低下が観察された。このような酸生成現象が発生すると、リアクター内の有機酸はほとんど分解されず蓄積し、リアクターの処理効率は低下した(図-1)。さらに、正常発酵への復帰も非常に困難となり、リアクター運転時の大きな問題となっていた⁴⁾。

メタン発酵では、最終的には有機物質はメタンガスと二酸化炭素に分解されるが、バイオリアクター中では主要細菌であるメタン生成細菌ばかりでなく、酸生成細菌や硫酸還元菌等、種々の嫌気性細菌が重要な働きを行っている。しかし、これら嫌気微生物のエコシステム、およびその生化学プロセスについての知見は非常に乏しい。したがって、メタノールを利用した高温メタン発酵槽の運転効率低下を予知・防止し、高効率運転を維持するため酸生成機構の解明を試みた。

§ 2. メタン発酵と酸生成

一般的に、酸素の遮断された嫌気下ではタンパク質、炭水化物および脂質等の高分子物質は、嫌気性微生物によって分泌された加水分解酵素によって、構成単位であるアミノ酸、ブドウ糖、脂肪酸等になり、これらは多くの微生物によって発酵され、アルコール、酢酸等の有機酸、水素ガス、炭酸ガスへと変換される。さらに、これ

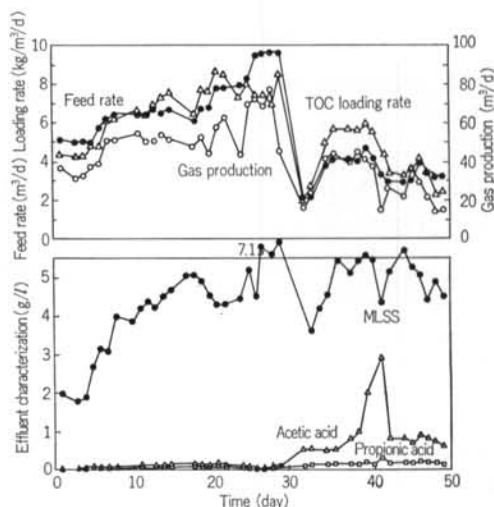


図-1 運転効率低下時におけるメタン発酵槽

らの副産物はメタン生成細菌により発酵され、最終的にはメタンガスと CO_2 になる (図-2)⁸⁾。 $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ は、ごく一部を除いて殆どすべてのメタン生成細菌がメタン生成の基質とするが、酢酸、メタノール、メチルアミンは、*Methanosarcina* 属、*Methanothrix* 属および *Methanobolus* 属等一部のメタン生成細菌しか利用できない。ギ酸は、*Methanobacterium* 属、*Methanobrevibacter* 属および *Methanococcus* 属等の酢酸を利用できない種類の一部で、利用可能である。

嫌気条件下における酢酸およびプロピオン酸は、一般には *Clostridium thermoaceticum* 等による高分子からの分解により生成されるが (図-2)、 CO_2 、 CO 、ギ酸およびメタノール等の C1 化合物からの酢酸生成も知られ

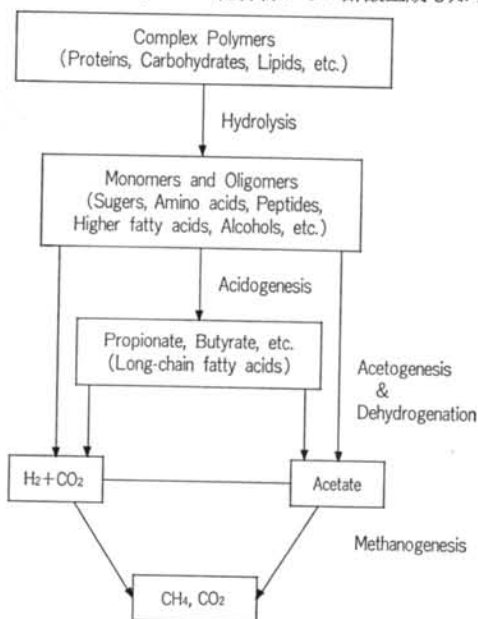


図-2 高分子の嫌気分解

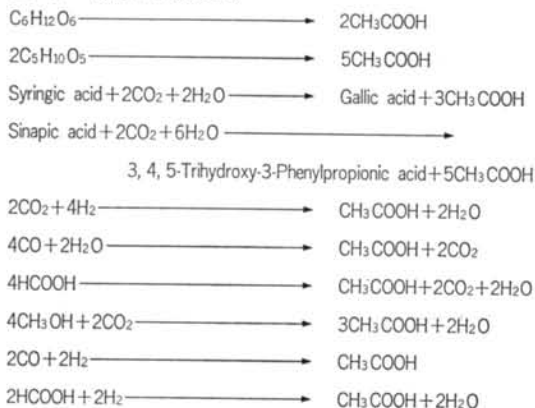
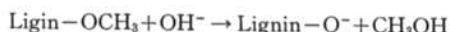


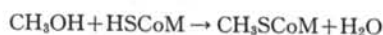
図-3 種々の基質からの酢酸生成

ている (図-3)⁹⁾。

わが国では年間約 900 万トンのパルプが生産され、その 70% 以上がクラフトパルプである⁷⁾。クラフトパルプ製造工程における脱リグニンには、水酸化ナトリウム等によるアルカリ加水分解によるリグニンの低分子化が主体である。木材中には 5% 程度のメトキシ基が存在し、リグニンの芳香核に結合し、アルカリによって加水分解され、次式のようにメタノールを生成する。



メタノールを利用した *Methanosarcina* のメタン発酵は、 CO_2 を利用したメタン発酵のように複雑な代謝経路をとらず、メタノールから CoM を経てメチル CoM が生じ、メタンへの変換には、メチル CoM メチルレダクターゼが関与していることが Wolfe らのグループより報告されている⁸⁾。



(HSCoM: メルカプトエタンスルホン酸)

メタノールを用いたメタン発酵が順調に進行している場合、理論的には酢酸・プロピオン酸生成は行なわれないと考えられる。

§ 3. 実験方法

3.1 培地の組成および調製方法

表-1 に in vitro 実験の基本培地組成を示す。炭素源としてメタノールを含有し、微量生育因子としてビタミン

KH_2PO_4	0.3 g
NaCl	0.6 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.08 g
NH_4Cl	1.0 g
KHCO_3	2.0 g
Methanol	5.0 ml
Resazurin	1.0 mg
Cysteine-HCl $\cdot$ H_2O	0.3 g
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.3 g
Trace element solution ¹⁾	10 ml
Vitamin solution ²⁾	10 ml
Distilled water	1000 ml

Adjust final pH to 6.8

1): DSM medium 141

2): DSM medium 318

表-1 メタン生成細菌用基本培地

ン水溶液および数種の金属塩を混合した Trace element solution を添加した。これらのビタミン水溶液および Trace element solution の組成は、ニトリロ三酢酸無添加を除き DSM 培地 318 に準拠した。また、酸生成細菌分離の場合を除き、酵母エキスをペプトンは培地から除去した。Hungate の方法により pH を 7.2 に調製後、酸素を除去した窒素ガスを通気して完全に嫌気状態にした後、10ml ずつ嫌気用試験管に分注し、121℃で15分間オートクレーブ滅菌した。

酸生成実験では、必要に応じ基本培地より栄養塩類やその他の組成物質を除去した。リン酸を除去する場合は、 KH_2PO_4 と K_2HPO_4 を添加せず、 NaCl 2.0g の代わりに NaCl 1.6g と KCl 0.4g を培地に添加した。カリウムを除去する場合は、 KH_2PO_4 と K_2HPO_4 の代わりに NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 を培地に添加した。その他の物質を除去する場合は、他の物質による成分補正は行っていない。また、メタノール濃度を必要に応じ、2%、3%、4%あるいは5%(w/v)に調製した。

阻害添加実験では、必要濃度に調製した種々の薬剤を滅菌濾過膜を使用して滅菌培地に添加した。

3.2 使用菌株および培養条件

使用した菌株は、高温メタン生成細菌として唯一高温でメタノールを利用する分離株 *Methanosarcina* 属のうち CHTI-55(DSM2906)を使用した。CHTI-55は、100mlの基本培地で前培養後、還元剤およびレザズリンを添加した嫌気用生理食塩水で洗浄を行なった。培養液の10倍の濃度に菌を懸濁後、0.5ml ずつ 10ml の種々の培地に含有した試験管に分注し、55℃にて静置培養した。

標識実験では、C源となるメタノールは $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$ を用いた。*Methanosarcina* sp. (CHTI-55) の培養は、培地を調製・滅菌後、滅菌濾過膜を使用して、5μM の2-プロモエタンスルホン酸を添加した100ml 培養瓶で1週間行なった。

3.3 模擬廃水の組成および運転条件

表一2に、本実験の基本培地組成を示した。アンモニウム塩無添加の実験では、内部に抗火石を充填した容積200lのバイオリアクターを使用し、メタノール濃度1%で50l/日の供給を行なった。運転が安定したところで、基本培地中の硫酸アンモニウムを等モルの硫酸ナトリウムに変更し、アンモニウム塩の添加を中止し、リアクター中のアンモニウム塩を徐々に低下させて、アンモニウム塩濃度の低下による運転への影響について調査した。

二硫化ジメチル (DMDS) 添加実験では、内部に抗火

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,700 g/ml
KH_2PO_4	1,000 g/ml
K_2HPO_4	240 g/ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	240 g/ml
Methanol	10,000 g/ml
Residue from alcohol distillate	600 ml/ml
Mineral salt sol.*)	1,000 ml/ml

*) 山口ら(1990)⁴⁾ 参照

表一2 バイオリアクター用模擬培地

石を充填した容積1lのバイオリアクターを使用し、メタノール濃度1%で300ml/日の供給を行なった。運転が安定したところで、種々の濃度の DMDS を規定濃度のメタノールに溶解させて培地に加え、DMDS 添加による運転への影響について調査した。

200lおよび1lバイオリアクターの温度とともに、外筒部に温水を循環させることにより55℃に調節した。

200lバイオリアクター仕様

バイオリアクター：容積	200 l
材質	ステンレス
サージタンク：容積	2 l
材質	ステンレス
pH 調整槽：容積	2 l
材質	ステンレス
脱 硫 塔：容積	2 l (60mm×700mm)
材質	硬質ガラス
(酸化第2鉄を充填)	
原料供給ポンプ：メーカー	髙イワキ
形式	ダイヤフラムポンプ
能力	250 ml/分
最大吐出圧	10kg/cm ²
循環ポンプ：メーカー	髙イワキ
形式	ダイヤフラムポンプ
能力	1,700 ml/分
最大吐出圧	10kg/cm ²
pHおよびORP計	キセロライト

なお、1lバイオリアクターは硬質ガラスを使用し、システムは200lバイオリアクターと同様であった。

3.4 酸生成細菌の分離および培養条件

リアクター内より試料を採取して適度に希釈し、直接ロールチューブへ植菌後、55℃にて静置培養した。ロールチューブに出現したコロニーは基本培地で馴養後、再度ロールチューブでコロニー分離を行なった。

メタン生成細菌と酸生成細菌の混合培養は、各々前培養した培養液を0.5ml ずつ 10ml の培養液に植菌し培養を行なった。

3.5 分析方法

3.5.1 発生ガス量、ガス組成および全有機炭素量の測定方法

ガス量は、発生ガスを注射用シリンジにて収集・測定し、ガス組成はシリンジに収集した発生ガスを直ちにガスクロマトグラフ(島津製作所・GC-7A, TCDタイプ)にて測定した。

全有機炭素(TOC)量の測定方法はJIS K 0102に準拠し、TOC装置(島津製作所製 TOC-500)にて測定した。

3.5.2 メタノールおよび有機酸濃度の測定方法

メタノールおよび酢酸、プロピオン酸等の有機酸濃度の測定には、高速液体クロマトグラフを用いた。液体クロマトグラフの分析条件は下記に示した。

使用機種: 日本分光工業株式会社高速液体クロマトグラフ
Eluent: 0.003M HClO₄ 水溶液
ポンプ: 日本分光工業株式会社 880-PU
流量: 1.0ml/分
サンプル注入量: 20 μ l
メインカラム: Shodex KC-811 8mm ϕ 300mm 2本
プレカラム: KC-810p 6mm ϕ 50mm 1本
カラム温度: 60.0 $^{\circ}$ C
RI検出器: 日本分光工業株式会社 RID-300
UV-VIS検出器: 有機酸は分離した酸とBTBの反応による色調をUV-VIS検出器で検出した
日本分光工業株式会社 870-UV
波長 445 nm
Reagent 0.002 M BTB
0.051 M Na₂HPO₄
ポンプ 日本分光工業株式会社 880-PU
流量 1.5ml/分
データ処理装置: 日本分光工業株式会社 805-GI

3.5.3 無機イオンの測定方法

イオンクロマトグラフを用い、電気伝導度検出器により測定を行なった。

使用機器: 横河電気株式会社 IC-500S
CD検出器: IC-500S 付属
UV検出器: 横河電気株式会社 LC-100U
データ処理装置: 横河電気株式会社 DS-50
(i)陰イオン

プレカラム: 横河電気株式会社 PAX1-035 $\times$ 2
メインカラム: 横河電気株式会社 SAX-205
カラム温度: 45.0 $^{\circ}$ C
溶離液: 4.0mM NaHCO₃
除去液: 15.0mM H₂SO₄
流量: 2.0ml/分

(ii)陽イオン(1価)

プレカラム: 横河電気株式会社 PCX1-035
メインカラム: 横河電気株式会社 SCX1-205

カラム温度: 45.0 $^{\circ}$ C

溶離液: 5.0mM HNO₃

除去液: なし

流量: 2.0ml/分

(iii)陽イオン(2価)

カラムは陽イオン(1価)と同様

溶離液: 2.0mM エチレンジアミン
4.0mM 酒石酸

除去液: なし

流量: 2.0ml/分

3.5.4 GC-MS測定条件

使用機種: 日本電子工業株式会社
JMS D300質量分析計
島津GC-7A ガスクロマトグラフ
データ処理: 日本電子工業株式会社 JMA-3500
データ処理システム
キャリアガス: ヘリウムガス (50ml/分)
(GC部)
カラム液相: 5% FFAP
担体: Uniport S 80/100 mesh
タイプ: Packed 2m $\times$ 3mm i.d.
カラム温度 Initial: 100 $^{\circ}$ C, Rate 8 $^{\circ}$ C/min
Final: 260 $^{\circ}$ C
注入口温度: 260 $^{\circ}$ C
セパレータ温度: 260 $^{\circ}$ C
(MS部)
イオン化方式: EI
イオン化電流: 300 μ A
電子加速電圧: 70V
イオン源温度: 200 $^{\circ}$ C
イオン加速電圧: 3kV
走査範囲: m/z 10-850 (3sec/full range)
走査間隔: 4sec

3.5.5 ¹³CNMR測定条件

装置: JEOL JNM-GX400型
観測周波数: 100.5 MHz
溶媒: D₂O
基準: DSS (TMS+1.8 ppm)
温度: 27 $^{\circ}$ C
観測幅: 25000 Hz
データ点: 32K
Flip angle: 45 $^{\circ}$
Pulse delay time: 16sec
積算回数: 3601

CD₃COOD 炭素の化学シフト値
[CD₃Cl 溶媒 TMS基準]
メチル炭素: 20.0 ppm
カルボニル炭素: 178.0 ppm

§ 4. 結果

4.1 メタノールを単一C源とする高温メタン発酵における有機酸生成の再現

紙パルプ実廃水処理の場合、酸生成を伴う運転効率の低下は種々の原因で起こると考えられる。したがって、これら種々の原因を解明するために、メタノールを単一C源とする模擬廃水を用い、バイオリアクターを人工的に種々の異なった条件で運転し、低運転効率時の有機酸生成を再現させ、バイオリアクター内の菌相の変化等、エコシステムを調査した。

4.1.1 アンモニウム塩無添加の影響

図-4に、培地中のアンモニウム塩を除去した場合のリアクターの状況について示した。実験開始時は、模擬廃水中に480mg/l濃度のアンモニウムを添加し、処理水に260mg/l濃度のアンモニウムが排出されていた。この場合、処理水中に酢酸、プロピオン酸およびメタノール

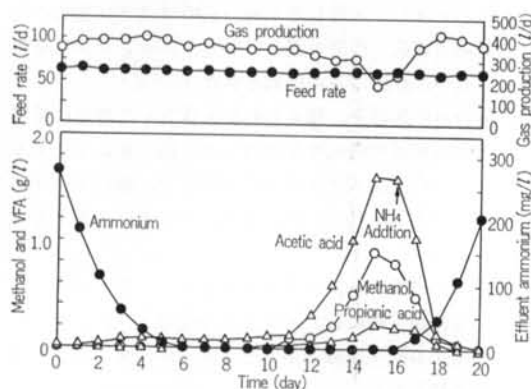


図-4 メタン発酵におけるアンモニウム塩の影響

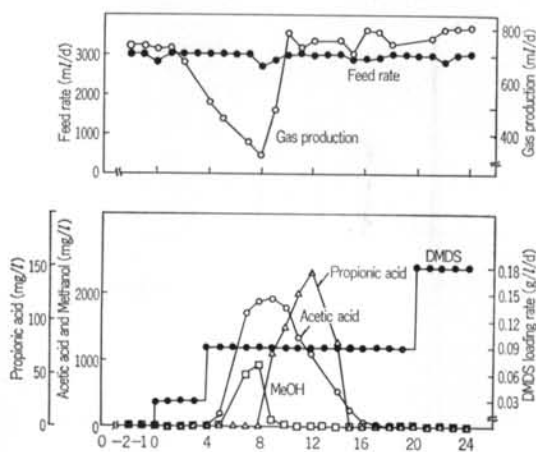


図-5 メタン発酵におけるDMDSの影響

は検出されなかった。

最初、模擬廃水中のアンモニウム濃度を1/10に減少させ、リアクターの運転を継続した。3日後には処理水中に若干の酢酸が検出され、5日後には処理水中のアンモニウムイオンは検出されなかった。以後、5日間同じ条件で運転を継続したが、リアクターに変化は認められなかった。したがって、次日に模擬廃水中のアンモニウムの添加を停止し、その影響について調査した。添加停止後、直ちに処理水中に多量の酢酸、プロピオン酸およびメタノールが検出され、5日後には酢酸濃度1,700mg/l、プロピオン酸濃度300mg/lおよびメタノール濃度1,000mg/lに達した。この時点で発生ガス量は減少し、実際のリアクター運転効率が低下した場合と同様な状態となった。

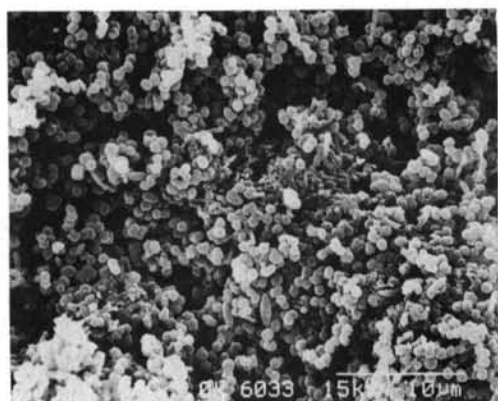
次に、リアクターを正常な状態に復帰させるために、次日模擬廃水中に実験開始時と同濃度のアンモニウム塩を添加した。添加後直ちに、処理水中にアンモニウムイオンが検出され、酢酸、プロピオン酸およびメタノールも減少し、4日後には有機酸およびメタノールはすべて消失し、リアクターは正常状態に復帰した。

4.1.2 DMDS 添加の影響

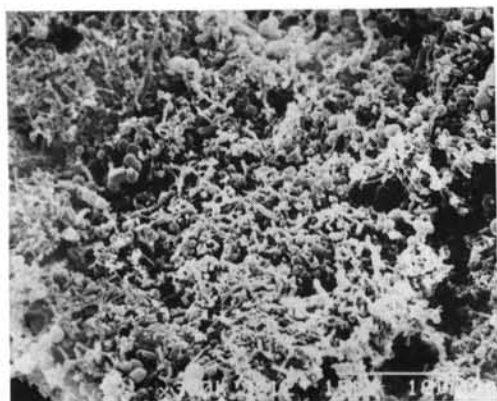
図-5に、クラフトパルプ製造廃水中に存在し、メタン発酵に悪影響を与えられているDMDSを培地添加した場合のリアクターの状況について示した。リアクター運転安定後、0.1g/lのDMDSを培地に添加し4日間運転を行ない、5日目にDMDS添加濃度を0.3g/lに上昇させた。処理水中に酢酸およびメタノールが検出され、4日後に酢酸濃度約1,900mg/l、メタノール濃度約900mg/lとなった。以後、処理水中の酢酸およびメタノールは減少していった。プロピオン酸は5日目より検出され、8日目には約150mg/lの濃度まで上昇し、以後酢酸およびメタノールと同様に減少した。また、ガス発生量は処理水中の酢酸濃度の増加とともに減少し、酢酸の消失とともに正常に復帰した。さらに、DMDS添加濃度を0.6g/lまで上げたがリアクターの状態は変化せず、リアクター内および処理水中にDMDSあるいは他の硫黄化合物は検出できず、発生ガス中に低濃度のメチルメルカプタンを検出した。

写真-1に、走査電子顕微鏡で撮影した実験開始時と終了時のリアクターの菌相を示した。実験開始時には、メタン生成細菌と思われる球菌が優勢であるが、実験終了時には球菌ばかりでなく、若干の桿菌が観察された。これらの桿菌が酸生成に関連する菌か、DMDS分解に関連した菌であるかは現在不明である。

上記の結果から判断して、DMDSはリアクターに影



(1)正常運転時



(2)異常運転時

写真—1 バイオリアクター内菌相の走査電子顕微鏡像
響を与え、酸生成およびメタノール漏洩を伴ったリアクター運転効率低下を導くが、DMDS 馴養後リアクターはDMDS 分解能を有し、DMDS に対し抵抗性をもつと考えられる。

また、このような菌相の変化は、アンモニウム塩無添加および実際の運転効率低下の際にも観察された。

4.2 メタノールを単一C源とする高温メタン発酵からの酸生成細菌の分離とその性格化

リアクター運転効率低下、菌相の変化および有機酸生成は密接な関係にあり、有機酸生成に直接に関与しているであろう酸生成細菌をリアクターより分離し、その性格化を行なうことは、リアクターを効率良く運転するために重要であると考えられる。

嫌気発酵における高分子からの酢酸およびプロピオン酸等の揮発性有機酸の生成（あるいは分解）は多くの文献で報告されているが、C1化合物からのC2およびC3化合物の合成については、*Clostridium* 属等による若干

の報告しかない⁶⁾。特に、メタノールを単一C源とする高温メタン発酵における揮発性有機酸生成を担う細菌についての報告は皆無であると思われる。

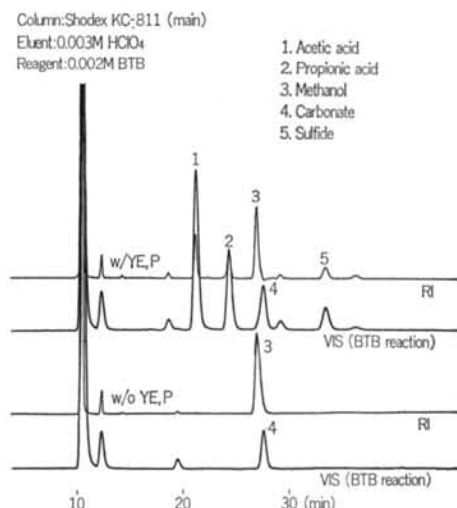
4.2.1 バイオリアクターからの種々の酸生成細菌の分離

運転効率が低下し、酢酸、プロピオン酸あるいはメタノールが漏洩している状態のリアクターより試料を採取し、ロールチューブでコロニーを直接分離した。分離コロニーを各々培養し、発生ガスの組成および培養液中の成分を分析した。正常なリアクターより分離したコロニーと比較し、異常時のリアクターより分離した多くのコロニーが、培養液中に酢酸およびプロピオン酸を放出した。

培養液中にこれら有機酸が検出された菌株について、さらに調査を行なった。メタンガスの含有率は発生バイオガスの50%以下であり、メタンガスを生成しないコロニーも存在した。これら菌株の培養液を顕微鏡観察したところ、メタンガス含有率が低いものはメタン生成細菌と思われる球菌と桿菌の混合であり、メタンガスを発生しないものは桿菌のみが観察された。

桿菌のみの菌株を、種々のC源を含有した培地に植菌し、これら桿菌の資化性を調査した。図—6に示すように、これらの菌はメタノールを利用せず、酵母エキスあるいはペプトンを利用した。また、グルコース等、種々の糖を利用した。

これらの結果から、メタノールを単一C源とするリアクター運転異常時には、メタノールでなく、高分子のC源を利用する酸生成細菌がリアクター中に多く存在することが予想された。



図—6 酸生成細菌による代謝産物のHPLC分析

4.2.2 コロニー分離した酸生成細菌とメタン生成細菌の混合培養

リアクター運転異常時に多く存在する桿菌と思われる酸生成細菌が、メタン生成細菌の育成に対し影響を与えるか調査した(図-7)。分離メタン生成細菌である *Methanosarcina* 属 CHT1-55 は成長が良好な場合、植菌後5日程度で定常期に至るが、酸生成細菌と混合培養した場合、メタン生成細菌の育成は阻害され、植菌後6日目に若干の成長が確認された。混合培養した培養液中には酢酸およびプロピオン酸が確認されたが、各々の濃度は酢酸800mg/l、プロピオン酸300mg/l程度であった。メタノールを単一C源とする高温メタン発酵において、このような有機酸濃度ではメタン生成細菌に影響を与えないことが判明しており⁹⁾、酸生成細菌によるメタン生成細菌の育成阻害は単純な機構でないことが予想された。また、この酸生成細菌の成長速度は、メタン生成細菌と比較し劣っていた。

4.2.3 混合培養における酸生成細菌の阻害効果低減の可能性

メタン生成細菌に対し影響がなく、今回リアクターより分離した酸生成細菌のみに影響を与えるような薬剤を探索し、リンコマイシンおよびカナマイシン等、数種の

抗生物質が有効であることを確認した。

図-7に、メタン生成細菌と酸生成細菌の混合培養におけるリンコマイシンの影響について示した。リンコマイシン塩酸塩を10mg/l、25mg/l、50mg/lおよび100mg/lの濃度となるように添加した。10mg/lの濃度で酸生成細菌は50%の育成阻害を受け、酢酸およびプロピオン酸の生成量は減少した。100mg/lの濃度では酢酸生成は殆ど阻害されていたが、プロピオン酸生成は若干行なわれていた。しかし、10mg/lのリンコマイシン塩酸塩添加で、メタン生成細菌のみの培養と同様に、混合培養での発酵は良好であった。また、100mg/lのリンコマイシン塩酸塩を添加した場合でも、メタン発酵に影響はなかった。

また、これらの現象はカナマイシン等でも確認した。

4.3 メタノールを単一C源とする高温メタン発酵における有機酸の生成

メタノールを単一C源とする高温メタン生成細菌である *Methanosarcina* 属の酢酸生成の報告は皆無であると思われるが、in vitro 培養中にしばしば観察された。

有機酸生成を阻害する立場から、高温メタン生成細菌におけるC1化合物であるメタノールからの酢酸生成機構について、さらに検討を行なった。

4.3.1 必須栄養源欠乏によるメタン生成細菌の酢酸生成の可能性

アンモニウム塩、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩あるいはカルシウム塩を各々培地中より除去した場合、メタン生成細菌は酢酸を培地中に放出した。また、ビタミン水溶液、Trace element solutionあるいはNa₂Sを除去した場合も若干の酢酸放出を確認した。基本培地中での育成に比較し、栄養塩類を除去した培地での育成は遅れるが、酢酸の放出はメタン生成細菌の育成時のみに認められた(図-8、表-3)。傾向として、培地中の酢酸濃度が約100mg/l未満の場合、新鮮な1%メタノール基本培地に再植菌すると短いlag phaseで成長が確認できた。しかし、培地中の酢酸濃度が数100mg/l以上の場合、新鮮な1%メタノール基本培地に再植菌しても成長には長いlag phaseが必要であった。このような条件では、成長が認められない場合もあった。これらの事実から、メタン生成細菌はかなりのダメージを受けている場合、酢酸を培地中に放出していると判断した。

同様な結果が、培地中のメタノール濃度が2%、3%の場合にも確認された。

4.3.2 CoM類似体によるメタン生成細菌の酢酸生成の可能性

メタノールのメチル基のメチルCoMからメタンへの

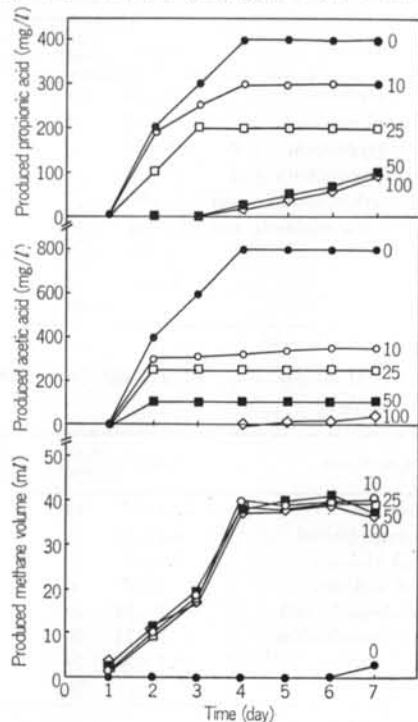


図-7 メタン生成細菌と酸生成細菌混合培養におけるリンコマイシンの影響

転移を阻害する物質であると考えられている CoM の類似体を種々の濃度で基本培地に添加し、メタン生成細菌の酢酸放出の可能性について検討を行なった(表-4)。メタン生成細菌は、2-プロモエタンスルホン酸あるいは2-クロロエタンスルホン酸を5 μ M 添加した培地で、最も酢酸を培地中に放出した。また、2-メルカプトプロピオン酸添加培地では5 mM で、メタン生成細菌からの酢酸放出が最も多く確認された。基本培地中でのメタン生成細菌の成育と比較し、これら3種の薬剤が上記の濃度添加された培養では、メタン発酵はほぼ50%阻害されていた。また、これら3種の薬剤を高濃度添加し

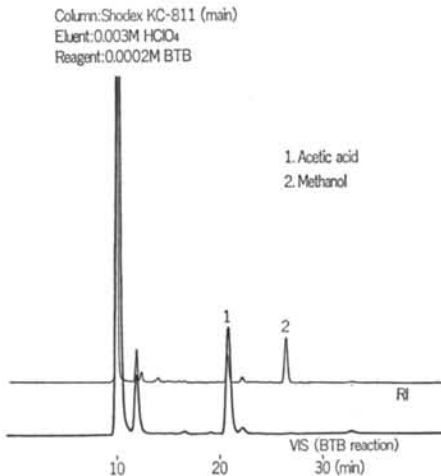


図-8 アンモニウム塩除去におけるメタン生成細菌酢酸生成のHPLC分析

	Gas (ml)	Acetic acid (mg/l)
Deletion of nutrients		
NH ₄ ⁺	5	550
PO ₄ ³⁻	15	410
K ⁺	10	300
Ca ²⁺	17	400
Mg ²⁺	3	50
S ²⁻	30	5
Cystein	30	0
Methanol (w/o YE*)	0	0
Methanol (w/YE*)	0	0
High conc. of methanol (w/v)		
2 %	30	500
3 %	20	400
4 %	10	200
Control	30	0

*) YE: Yeast extract (5g/l)

表-3 メタン生成細菌によるメタノールからの酢酸生成の可能性

た場合、メタン発酵は完全に阻害されたが、酢酸放出は認められなかった。さらに、2-メルカプトプロピオン酸の異性体であり、CoMと構造が異なる β -メルカプトプロピオン酸は20 mM までメタン生成細菌の成育を阻害せず、酢酸放出を促さなかった。また、エタントールおよびエタンスルホン酸についても各々30 mM までメタン生成細菌の成育を阻害せず、培養液中に酢酸は認められなかった(表-5)。

その他、メタン生成細菌の成育阻害剤として知られるメチル CoM からメタンへの変換に関与するメチルレダクターゼの阻害剤、あるいは脱共役剤等の薬剤の影響を調査したが、酢酸生成は確認できなかった。

4.4 メタノールを利用した高温メタン生成細菌における酢酸生成の証明

前項において、高温メタン生成細菌によるメタノールからの酢酸産生の可能性について述べた。しかし、高温メタン生成細菌が酢酸を放出することは示されたが、この現象は高温メタン生成細菌が直接にメタノールを用い酢酸生成を行なっているとも考えられるが、メタン生成細菌自身の菌体を形成する種々の高分子等からの分解による可能性も否定できない。したがって、本研究では

Chemicals	Conc.	Gas (ml)	A.A.*) (mg/l)
Ethyl mercaptan	30 mM	20	0
Ethanesulfonic acid	1 mM	20	0
2-Mercaptopropionic acid	10 mM	11	350
3-Mercaptopropionic acid	20 mM	24	0
2-Chloroethanesulfonic acid	5 μ M	16	700
2-Bromoethanesulfonic acid	0.5 μ M	30	0
	5 μ M	16	400
	50 μ M	0	0
Control	—	30	0

*) A.A.: Acetic acid

表-4 CoM 類似体によるメタン生成細菌における酢酸生成の可能性

Chemicals	Conc.	Gas (ml)	A.A.*) (mg/l)
Chloroform	0.06 mM	14	130
2,4-Dinitrophenol	0.5 mM	8	0
Methyl viologen	0.1 μ M	13	0
Benzyl viologen	5 μ M	6	0
2-Nitrobenzoic acid	0.3 mM	20	0
1,10-Phenanthroline	2 mM	20	0
Chloral hydrate	0.5 mM	20	0
Control	—	30	0

*) A.A.: Acetic acid

表-5 種々の阻害剤によるメタン生成細菌における酢酸生成の可能性

^{13}C メタノールを使用し、特に標識したメチル基を追跡することにより酢酸生成の機構を検討した。

4.4.1 GC マススペクトルによる検討

標品酢酸水溶液について、GC および GC-MS 法による測定を行なった。まず、ガスクロマトグラムにおいて標品酢酸のピークを7.62min に検出し、マススペクトルでは標品酢酸の分子イオンピークを m/z 60 に確認した。

次に、C源として $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$ を用いた培養液をフィルター濾過後濃縮調製し、上記と同様に測定を行なった。ガスクロマトグラムの7.59 min に主成分ピークが観測され、これは標品酢酸ピークの R.T. (min) とほぼ一致した。さらに、マススペクトルを測定したところ、図9より $^{13}\text{CD}_3\text{COOH}$ (分子量 64) と $^{13}\text{CD}_3^{13}\text{COOH}$ (分子量65) の約1対1の混合物であることが確認された。

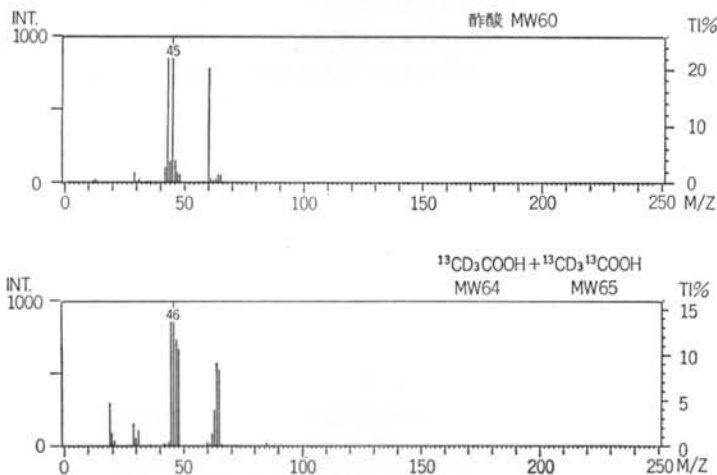


図9 酢酸標品と ^{13}C ラベルした試料のマススペクトル

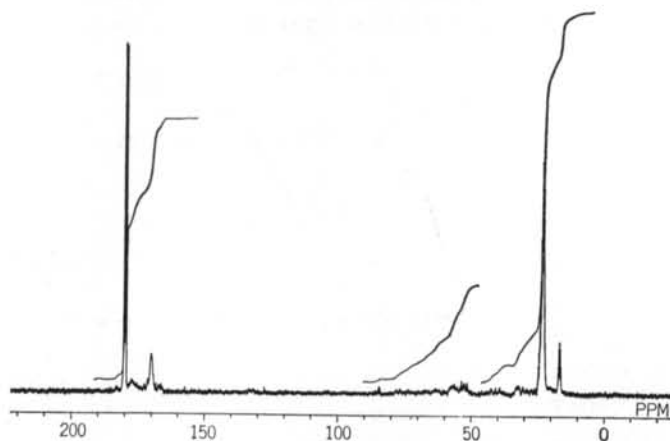


図10 ^{13}C ラベルした試料の ^{13}C NMR スペクトル

4.4.2 NMR による検討

図10に、10%の重水を添加した水溶液中の ^{13}C NMR スペクトルを示した。これより、かなりの不純物ピークが観測された。179.9 ppm に観測された doublet ピークは酢酸のカルボニル炭素ピークであり (§ 3. 参照)、分裂の大きさ (53 Hz) より ^{13}C — ^{13}C スピン結合によるカップリングであることが分かった。また、23.4 ppm に観測された multiplet ピークは酢酸のメチル炭素ピークであり、 ^{13}C — ^{13}C スピン結合以外に ^{13}C — ^2D スピン結合によるカップリングがあるため、multiple に分裂したと考えられる。

このメインピーク2本以外にカルボニル炭素領域に観測された170.1 ppm のピークは、酢酸の化学シフト値とは異なる。また、メチル炭素領域に観測された16.5 ppm のピークは、 ^{13}C — ^2D スピン結合のみによる分裂 (7本) をしているが、強度および化学シフト値から酢酸以外の不純物と予想される。以上の結果から、酢酸のメチル炭素がすべて ^{13}C であるとする、 $^{13}\text{CD}_3\text{COOH}$ と $^{13}\text{CD}_3^{13}\text{COOH}$ の混合比は2本のメインピークの積分値から約4対5であるといえる。

§ 5. 考察

N源であるアンモニウム塩を除去した模擬廃水を用いて運転を行なった場合、実廃水を用いたベンチプラントと同様な、有機酸生成を伴った運転効率低下が再現できた。さらに、アンモニウム塩を再度添加すると処理水中の有機酸は消失し、運転効率も正常に復帰した。また、アンモニウム塩の除去を長期間継続すると、メタン発酵の効率はさらに低下し、有機酸生成も減少した。MLSS 濃度が低下していることから判断して、N源欠乏によるリアクター内のすべての菌体の生育が抑制されたと考えられる。この場合、再度アンモニウム塩を添加しても容易にリアクター運転効率の回復はできなかった。

エバポレータ・コンデンセートのような蒸留廃水は塩類を含有せず、栄養塩類を添加する必要がある。塩類の添

加は溶液が最も効率的であると考えられるが、塩の沈澱生成等による添加塩溶液濃度の低下や配管の閉塞等の可能性も考えられ、常時エバポレータ・コンデンセートに最適濃度の必要塩類が供給されていることを確認することが重要であろう。また、容積負荷や菌体の成育により、主要C源であるメタノールばかりでなくN源等の消費率も変化することが考えられるので、容積負荷等との最適比を決定することが重要であろう。本研究ではN源欠乏の影響の結果について示したが、P源の影響についても調査しており、その他の栄養塩類の欠乏による酸生成を伴ったリアクター運転効率低下の可能性は大いに考えられる¹⁰⁾。

エバポレータ・コンデンセート中に含有する硫黄化合物のうち、特に高温メタン発酵に影響を与えていると考えられる DMDS 添加の影響を検討し、N源除去と同様な結果を得た。今回の実験では、酸生成を伴う運転効率低下の現象が再現され、以後 DMDS 分解能の獲得と考えられるリアクター単独の運転効率回復が観察された。今回の DMDS 容積負荷は最高0.09 g/l/日であり、より高い DMDS 容積負荷の場合、分解能を有するかは現在不明であるが、高濃度の DMDS がリアクターに流入した場合、リアクターの運転効率は低下し、リアクターの運転効率の回復は容易でないと考えられる。

アンモニウム塩除去実験および DMDS 添加実験において、酸生成を伴う運転効率低下の際、硫酸還元菌の成育と思われる培地中の硫酸塩消費と運転効率回復時の硫酸塩無消費の事実は留意すべきであろう¹¹⁾。ベンチプラントにおいて運転効率低下時毎に酸生成が起こり、今回2種類の原因の異なるリアクターへのダメージ実験でも酸生成が生じたことは非常に興味深いことである。また、このような現象は容積負荷を上昇させた場合にも観察された。

本研究において、リアクターの運転効率低下時に、リアクター中に高分子のC源のみを利用する酸生成細菌が増殖することを示した。単一C源としてメタノールを添加したリアクターで長期間馴養したにもかかわらず、このような酸生成細菌が生息していた事実は興味深い。正常時には、リアクター内の優勢種であるメタン生成細菌等の代謝物や菌体の死骸分解物等を利用し、若干の酸生成細菌がリアクター内に生息し、異常時にはダメージを受けやすいメタン生成細菌等の代謝物や分解物を利用し、さらに増殖を行なうと想像される。実際、正常時と異常時のリアクターの菌相を走査電子顕微鏡等で観察すると、異常時には球菌であるメタン生成細菌ばかりでなく容易に桿菌が認められ、正常時にも球菌の他、ごくわ

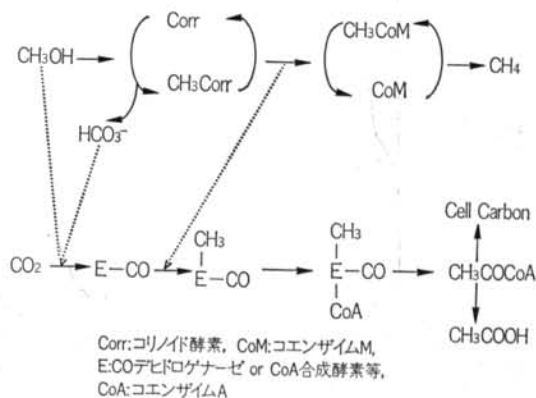
ずかの桿菌が認められた。

異常時における酸生成細菌の増殖は、直接にメタン生成細菌の成育を阻害し、さらにメタン発酵の効率低下を導くであろう。この原因として、酢酸およびプロピオン酸等の有機酸がリアクター内で産生され、pH が酸性側に傾いた場合、これらの有機酸は高温メタン発酵に対して悪影響を及ぼす可能性が考えられる⁹⁾。また、現在知れていない酸生成細菌が生産する成育阻害物質等の可能性もあるが、今後の研究が必要であろう。

正常運転への復帰に多くの時間とコストが費やされる場合、酸生成細菌の特異的阻害剤である抗生物質等をリアクターに短期間添加することは、有効な手段であると考えられる。さらに、今回分離したコロニーの中には、メタノールおよびCO₂を利用し、メタンガスを発生せず、酢酸を生産した菌株も若干認められたが、詳細な検討は行っていない。

培地中の栄養塩類等を除去した場合、メタン生成細菌の成育は阻害され酢酸を放出するが、このような現象は実際のリアクター運転効率が低下した場合に生じる可能性は高いであろう。しかし、本研究の阻害剤添加実験で確認されたように、メタン生成細菌にダメージを与えた場合、必ず酢酸を放出することはない。また、メタン生成細菌が自己分解しやすいという知見から、メタン生成細菌由来の分解酵素による菌成分からの酢酸生成の可能性が考えられるが、人工的にメタン生成細菌を破壊しても、今回観察したような特異的な培地中への酢酸放出は認められなかった。

メタノールを利用する高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. (CHTI-55) がメタノールからメタンガスを生成する機構は、正常なメタン発酵を行なっているメタン生成細菌では、メタノールのメチル基がCoMへ転移し、メチルCoMが生成され、メタンガスおよびCO₂産



図一十一 メタン生成細菌によるメタノールからの酢酸生成仮説

生へ進行すると考えられている ($4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$)。また、 CO_2 固定の経路ではメチル基がコリノイド酵素によりアセチル CoA となり、Cell carbon へと移行すると考えられている¹²⁾。

高温メタン生成細菌 *Methanosarcina* sp. (CHTI-55) が酢酸を利用しメタン発酵を行なう場合、酢酸のアセチル基が CoA に移行しアセチル CoA となり、さらにコリノイド酵素を経てメチル CoM となり、メタンガスと CO_2 とを生成すると考えられている ($\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$)¹³⁾。

今回の測定により、 $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$ のメチル基 ($^{13}\text{CD}_3$) が生成された酢酸に移行していることが確認され、生成された酢酸のうち約半分のカルボキシル基 (COOH) にも ^{13}C が確認できた。

この酢酸のカルボキシル基への ^{13}C の移行の機構は、第一にアセチル CoA と代謝経路でのメタノールのメチル基からの直接利用 (メタノール2分子からの酢酸生成)、第二にメタンガス生成後における副産物の HCO_3^- (あるいは CO_2) とアセチル CoA を利用し、酢酸を生成することが考えられる (図-11)。もし、第一の可能性が事実であれば、メタノールから酢酸を生成する新規な経路が存在することになる。しかし、現在知られている C1 化合物であるメタノールからの C2 化合物である酢酸の生成機構は、*Clostridium* 属等で知られているメタノールおよび CO_2 からの生成であり、メタン生成細菌の場合も作用する酵素系は同一でないであろうが、同様な経路を経るとも考えられる⁶⁾。

さらに、高温メタン生成細菌がメタノールから酢酸を生成することは、本研究で見い出された新事実である。

§ 6. おわりに

メタノールの高温メタン発酵における酸生成を伴った運転効率低下の現象を理解するために、本研究においてバイオリアクター内の嫌気性細菌のエコシステムについて調査・解析した。正常時および異常時には明確な菌相の変化が生じ、メタン生成細菌をはじめとした種々の酸生成細菌、硫酸還元菌等が各々微妙に影響し合い、独特のエコシステムを形成した。異常時からの運転効率の回復、早期異常の発見、および高効率運転の維持のためには、物理化学的な手法ばかりでなく根本的なエコシステムの知識が必要であり、これまでの古典的な対処法に代わる、より効率的なニューバイオテクノロジーを応用した運転法が重要になろう。本研究では、これらの内容について記述し、酵素モニタリング等他の手法については既に報告している¹³⁾。

今回は、その構成要素も比較的少ない閉鎖生態系 (エコシステム) であるバイオリアクターが研究対象であったが、上記の手法は CELSS (閉鎖系生命維持システム)、住居内環境等、その他の閉鎖生態系の研究に活用でき、さらに湖沼・河川・海洋汚染等の浄化、土壌中の難分解性物質の浄化および種々の地球環境問題等、応用範囲は広いと考えられる。これら準閉鎖生態系・開放生態系を研究対象とした場合、構成要素はより複雑となるが、主要要素を抽出・解析すれば応用可能であろう。

なお本研究は、通産省と NEDO によりアクアルネサンス技術組合に委託された「高性能分離膜複合メタンガス製造装置開発」のうち、当社が担当したものである。

<参考文献>

- 1) K. Minami, K. Okamura, M. Yamaguchi, Y. Tanimoto, T. Naritomi, S. Ogawa & J. Hake: "Anaerobic Treatment of Wastewater from a Kraft Pulp Mill" Shimizu Technical Research Bulletin, No.10 (1991) pp.27~35
- 2) K. Minami, K. Okamura, S. Ogawa & T. Naritomi: "Continuous Anaerobic Treatment of Wastewater from a Kraft Pulp Mill" J. of Fermentation & Bioengineering, Vol. 71 (1991) pp.270~274
- 3) 岡村和夫, 山口 一, 谷本祐一, 小川恵道, 中村和夫, 南 清司: "分離膜を複合したメタン発酵処理" 清水建設研究報告 第51号 (1990年) pp.47~56
- 4) M. Yamaguchi, K. Okamura, Y. Tanimoto, T. Naritomi, S. Ogawa, J. Hake & M. Minami: "Thermophilic Methane Fermentation of Evaporator Condensate from a Kraft Pulp Mill" TAPPI Environmental Conference (1990) pp.631~639
- 5) S. Nagai & N. Nishio: "Biological Aspects of Anaerobic Digestion (in N.P. Cheremisinoff, ed.; Catalysis, Kinetics, & Reactor Engineering)" Gulf Pub. (1990)

- 6) L.G. Ljungdahl: "The Autotrophic Pathway of Acetate Synthesis in Acetogenic Bacteria" Annual Review of Microbiology, Vol. 40 (1986) pp. 415~450
- 7) 南 清司: "製紙排水対策への新たな提案" 紙パルプ技術タイムズ Vol. 31 (1988年) pp. 66~70
- 8) D.P. Nagel, Jr. & R.S. Wolfe: "Component A of the Methyl Coenzyme Methylreductase System of Methanobacterium: Resolution into Four Components" Proceedings of National Academy of Science, USA, Vol. 80 (1983) pp. 2151~2155
- 9) M. Yamaguchi, K. Minami, Y. Tanimoto & K. Okamura: "Effects of Volatile Fatty Acids on Methanogenesis of Methanol and of Pregrowth with Methanol on Acetate Utilization by Methanogens" J. of Fermentation & Bioengineering, Vol. 68 (1989) pp. 428~432
- 10) "アクアルネッサンス '90平成2年度報告書" アクアルネッサンス '90研究組合 (1990年)
- 11) Y. Tanimoto, M. Tasaki, K. Okamura, M. Yamaguchi & K. Minami: "Screening Growth Inhibitors of Sulfate-Reducing Bacteria and Their Effects on Methane Fermentation" J. of Fermentation & Bioengineering, Vol. 68 (1989) pp. 353~359
- 12) P.E. Rouviere & R.S. Wolfe: "Novel Biochemistry of Methanogenesis" J. of Biological Chemistry, Vol. 263 (1988) pp. 7913~7916
- 13) M. Yamaguchi, J. Hake, Y. Tanimoto, T. Naritomi, K. Okamura & K. Minami: "Enzyme Activity for Monitoring the Stability in a Thermophilic Anaerobic Digestion of Wastewater Containing Methanol" J. of Fermentation & Bioengineering, Vol. 71 (1991) pp. 264~269