豆腐製造排水のメタン発酵特性と微生物菌群解析

ハオ リン ユン* 片 岡 直 明** 宮 晶 子**
石 田 健 一*** 山 田 紀 夫*** 鈴 木 隆 幸***

Characteristics and Microbial Community Structural Analysis of Methane Fermentation Sludge for Treating Bean-Curd-Processing Wastewater

Ling-yun HAO*, Naoaki KATAOKA**, Akiko MIYA**,
Kenichi ISHIDA***, Norio YAMADA*** and Takayuki SUZUKI***

* Biotechnology Laboratory, Ebara Research Co., Ltd., 2-1, Honfujisawa 4-chome, Fujisawa-shi 251-8502, Japan

** Research & Development Department, Ebara Corp., 2-1, Honfujisawa 4-chome, Fujisawa-shi 251-8502, Japan

*** Environmental Engineering Group, Ebara Corp., 1-6-27 Kohnan, Minato-ku, Tokyo 108-8480, Japan

Abstract

The characteristics of methane fermentation for treating bean-curd (*tofu*)-processing wastewater (BCW) containing waste bean curd frying oil were determined. To facilitate the dispersion and degradation of the oil in the wastewater, lipase and two emulsifiers were adopted. Lipase pretreatment accelerated methane fermentation. Three anaerobic digester series were continuously supplied with BCW and operated under the following conditions: Run 1, without lipase pretreatment, thermophilic methane fermentation (55°C); Run 2, with lipase pretreatment, thermophilic methane fermentation; Run 3, with lipase pretreatment, mesophilic methane fermentation (35°C). Triglycerides and long-chain fatty acids (LCFAs) were completely eliminated by lipase pretreatment in the digesters (Runs 2 and 3). The calculation of mass balance demonstrated that 70% of the supplied COD_{Cr} in BCW was eliminated in Run 2, and that 60% of the supplied COD_{Cr} was converted to methane. However, only 30-40% of the supplied COD_{Cr} was converted to methane in Run 3 or 1. The analysis of the microbial community structure in the sludge of the three digesters showed that the sulfate-reducing activity in Run 2 was lower and sulfate-reducing population was also smaller than those in Runs 1 and 3. Lipase pretreatment and thermophilic methane fermentation conditions promote the prevalence of LCFA utilizing hydrogen-producing acetogenic bacteria in the sludge of Run 2.

Key words: lipase; long-chain fatty acids; methane fermentation; mesophilic; thermophilic

1. はじめに

植物性または動物性油脂を多く含む食品加工排水の処理方式として、資源循環やエネルギー回収の観点から、嫌気性処理法（メタン発酵法）が注目されている。中性脂肪は主に油脂分解酵素（リパーゼ）によってグリセロールと炭素数11以上の高級脂肪酸に加水分解され¹⁾、グリセロールは酢酸、水素を経由してメタンにまで速やかに生物変換される²⁾。一方、高級脂肪酸は分解速度が非常に遅く、水素生産性酢酸生成菌やメタン生成菌を阻害しやすいため、メタン発酵過程で反応律速となる³⁻⁵⁾。したがって、油脂排水・廃棄物を対象としたメタン発酵プロセスの設計では、油脂分解速度、高級脂肪酸による反応阻害、油脂の分散性や微生物との接触効率を十分配慮する必要がある⁶⁻⁷⁾。

油脂類のメタン発酵処理を目的とした従来研究では、活

性炭等の脂質吸着剤でメタン発酵阻害を低減する方法⁸⁾、乳化剤添加によって油脂分散性を向上する方法⁹⁾などが報告されている。また、リパーゼを用いて中性脂肪分解を促進してメタン発酵する方法も提案されている。しかしながら、乳化剤による油脂分散やリパーゼによる中性脂肪分解を前処理に適用した場合のメタン発酵特性や発酵促進効果に関して具体的に検討した研究報告はない。

本研究では、油脂含有排水に豆腐製造排水を用い、前処理として高温処理（50°C）、乳化剤添加、リパーゼ添加を適用した場合のメタン発酵特性について、回分および連続実験系で研究した。さらに、リパーゼで前処理してメタン発酵連続運転した系での微生物菌群の特性に関して、メタン発酵阻害剤を用いた回分実験、最確数法（MPN法）による微生物計数、FISH法（fluorescence in situ hybridization）およびPCR-DGGE法（polymerase chain

* (株) 作原総合研究所 生物研究室 〒251-8502 神奈川県藤沢市本藤沢4-2-1

** (株) 作原製作所 管理本部研究開発部 〒251-8502 神奈川県藤沢市本藤沢4-2-1

*** (株) 作原製作所 環境エンジニアリング事業本部水処理統括 〒108-8480 東京都港区港南1-6-2

Table 1 Conditions of pretreatment for BCW.

Vial No.	Conditions of pretreatment		
	Temperature	Emulsifier (0.1g·l ⁻¹)	Lipase (5kU·l ⁻¹)
A-1	Room temperature	—	—
A-2	50℃	—	—
A-3	50℃	Bentonite	—
A-4	50℃	Alginate	—
A-5	50℃	—	+

reaction — denaturation gradient gel electrophoresis) による分子生物学的手法で解析した。

2. 実験材料および方法

2.1 前処理によるメタン発酵性能への影響の検討

2.1.1 油脂分解実験

A食品製造工場の豆腐製造排水 (bean-curd-processing wastewater, BCW) に豆腐揚げ廃油 5g·l⁻¹ 添加した試料を用い (VSS 15,300mg·l⁻¹, COD_{Cr} 33,200mg·l⁻¹, pH3.9), 1mol·l⁻¹ NaOHでpH6~7に調整後, **Table 1**に示す温度, 乳化剤, リパーゼの条件で一晩前処理を行った。リパーゼ処理には, Novo Nordisk Bioindustry, Ltd. の油脂分解酵素SP398を用いた (100kU·g⁻¹, 細菌由来, 液状, 至適温度40~60℃, 適用pH 6~11)。前処理後, 全脂質成分を抽出, 定量分析し, 排水中の脂質成分に対する前処理効果を調べた。

2.1.2 メタン発酵回分実験

回分実験用の種汚泥は, 生ごみの高温メタン発酵汚泥⁹⁾を豆腐製造排水で53℃, 3ヶ月間馴致した汚泥を用いた (VSS 3,420mg·l⁻¹, COD_{Cr} 7,940mg·l⁻¹, ヘキサン抽出物質 2,720mg·l⁻¹, 中性脂肪 1,500mg·l⁻¹, 高級脂肪酸 299mg·l⁻¹, pH7.8)。馴致に用いた排水は, 豆腐製造排水に豆腐揚げ廃油 5ml·l⁻¹を添加し, 乳化剤としてアルギン酸ナトリウム 50mg·l⁻¹を調整した。

前処理した豆腐製造排水のメタン発酵回分実験は125mlバイアル瓶で行った。バイアル瓶に各前処理水3mlとメタン発酵種汚泥37mlを添加後, 気相部を窒素置換し, F/M比 0.78 (COD_{Cr}/VSS), 55℃, 100r·min⁻¹で約2週間振盪培養した (オイルバスシェーカMH-10, タイテック)。

2.1.3 メタン発酵連続実験

豆腐製造排水に豆腐揚げ廃油 0~1ml·l⁻¹を添加したものを連続実験の原水とした (中性脂肪 0.5~1.5g·l⁻¹)。原水調整には, 乳化剤としてアルギン酸ナトリウム (300~400cP) とベントナイト, pH調整剤として水酸化カルシウムを用いた (いずれも試薬特級, 和光純薬工業)。リパーゼ (4kU·l⁻¹) による前処理は, 50℃, 1日行った。前処理後は5℃で冷蔵保存した。**Table 2**に原水性状を示す。

メタン発酵連続実験は, 前段に酵素前処理槽 (有効容積 2.5l, ジャーファーマンターMBF-250ME, 東京理化工業), 後段に完全混合型メタン発酵槽 (有効容積3.5l, 塩化ビニル製) からなる装置で行った。種汚泥は, 生ごみの高温メタン発酵汚泥⁹⁾と豚糞尿の中温メタン発酵汚泥¹⁰⁾を用いた。メタン発酵装置3系列 (Run 1~3) を用いて連続実験を行い, 処理特性を調べた。連続運転方法は**Table 3**に示すように, Run 1: リパーゼ前処理なし・高温 (55℃) メタン発酵; Run 2: リパーゼ前処理・高温メタン発酵; Run 3

Table 2 Properties of the BCW with or without lipase pretreatment (mg·l⁻¹)¹⁾.

Lipase pretreatment		+	—
TS		18,900	18,600
VTS		13,100	12,600
SS		5,950	5,810
VSS		5,570	5,150
COD _{Cr}	Total	22,900	20,300
	Soluble	9,500	9,540
BOD	Total	10,900	12,400
	Soluble	7,120	8,400
Kjeldahl-nitrogen		1,160	1,390
VFA ²⁾		5,050	4,400
Lipids	Hexane extracts	2,590	2,380
	TG ³⁾	1,410	56
	LCFA ⁴⁾	378	1,620
pH		5.4	7.0

¹⁾ Data of BCW containing 1ml·l⁻¹ frying-oil

²⁾ Volatile fatty acids, ³⁾ Triglycerides, ⁴⁾ Long-chain fatty acids

Table 3 Operational conditions of continuous methane fermentation.

Digester		Run 1	Run 2	Run 3
Temperature (°C)		55	55	35
HRT (days)		16	15	16~25
Addition of frying-oil (ml·l ⁻¹)		0ml·l ⁻¹ until 84 th day 1ml·l ⁻¹ after 85 th day		
Addition of emulsifier (0.1g·l ⁻¹)		Alginate until 142 nd day Bentonite from 143 rd day	Bentonite through entire operant period	
Lipase pretreatment		—	+	
Returning of digested sludge	Start	143 rd day	43 rd day	143 rd day
	Interval	2 weeks	3 weeks	
COD _{Cr} loading (g·l ⁻¹ ·d ⁻¹)		1.43	1.35	0.81
Lipids loading (mg·g ⁻¹ VSS·d ⁻¹)	Hexane extracts	33.8	28.4	40.7
	TG	18.4	0.67	0.96
	LCFA	4.93	19.3	27.7

: リパーゼ前処理・中温 (35℃) メタン発酵で行った。なお, リパーゼ前処理なし・中温メタン発酵は脂肪酸阻害で安定な連続運転が難しいと判断し^{1), 5)}, 実施しなかった。

2.2 豆腐製造排水のメタン発酵系の微生物菌群解析

2.2.1 阻害剤を用いたメタン発酵回分実験

回分実験の種汚泥は, 豆腐製造排水のメタン発酵連続実験Run 1~3の汚泥を用いた。回分実験は, 豆腐製造排水に豆腐揚げ廃油 5g·l⁻¹を加え, pH7に調整後, リパーゼ 5kU·l⁻¹を添加して55℃, 1日前処理した排水を用いた。硫酸還元菌阻害剤としてモリブデン酸ナトリウムを, 高級脂肪酸分解菌の阻害剤には水素生産性酢酸生成菌を代謝阻害する酢酸と水素を用いた。また, 汚泥のメタン生成活性と硫酸還元活性の競合関係を調べるため, 硫酸イオン混合液 (重量比 Na₂SO₄:K₂SO₄: (NH₄)₂SO₄=1:1:1) を用いた。

Table 4に阻害実験条件を示す。リパーゼ前処理した豆腐製造排水15mlとそれぞれの種汚泥 (Run 1~3) 40mlを125ml

Table 4 Addition of inhibitors into methane fermentation vials.

Vial No.	Inhibitors and adding conditions
B-1	Without inhibitor
B-2	Na ₂ MoO ₄ (20mmol·l ⁻¹)
B-3	H ₂ (150kPa) + acetate (1,000mgCOD·l ⁻¹)
B-4	Na ₂ MoO ₄ (20mmol·l ⁻¹) + SO ₄ ²⁻ (150mg·l ⁻¹)
B-5	SO ₄ ²⁻ (150mg·l ⁻¹)
B-6	Sludge control

Table 5 Probes used in FISH.

DNA probe	Target
EUB338-FITC	Eubacterium ¹⁴⁾
SRB385-TRITC	Sulfate reducing bacterium of δ -proteobacteria ¹⁴⁾ , and other δ -proteobacteria species and Gram-positive bacteria ^{14), 16)}
MT757-TRITC	Acetate utilizing methanogenic bacteria (A-MPB, <i>Methanosaeta</i>) ¹⁷⁾
MB318-TRITC	Hydrogen utilizing methanogenic bacteria (H-MPB, including <i>Methanobacter</i> group, <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosaeta</i> species etc.) ¹⁷⁾

TRITC: Tetramethylrhodamine isothiocyanate, G excision: 554nm.

FITC: Fluorescein isothiocyanate, B excision: 488nm.

The hybridizations were carried out at 45°C, 30% formamide for probe EUB338 and SRB385, at 42°C, 20% formamide for MB318, at 46°C, 20% formamide for MT757.

バイアル瓶に加え、気相部を窒素または水素+窒素混合ガスで2分間ガス置換後、ブチルゴム栓とアルミシールで密栓した。高温メタン発酵汚泥 (Run 1とRun 2) は55°Cで、中温メタン発酵汚泥 (Run 3) は35°Cで振盪培養した。

2. 2. 2 MPN法によるメタン発酵汚泥の菌数計数

最確数 (MPN) 法の計数操作は、下水試験方法¹¹⁾に準じた。高級脂肪酸分解菌は、オレイン酸ナトリウム0.3g·l⁻¹またはステアリン酸ナトリウム1.0g·l⁻¹を含有する嫌気性基礎培地¹²⁾で培養し、炭素源のないコントロール系と比較してメタン生成の有無から陽性判定した。硫酸還元菌の培養は下水試験方法¹³⁾にしたがい、硫酸還元菌培地の炭素源として乳酸ナトリウム3.5g·l⁻¹またはオレイン酸ナトリウム0.3g·l⁻¹を添加した。硫酸還元反応による硫化物の黒色沈殿の有無から陽性判定した。

2. 2. 3 FISH法によるメタン発酵汚泥の菌数計数

Amannら¹⁴⁾の方法を用いて、汚泥中の硫酸還元菌とメタン生成菌を計数した。実験に用いたDNA蛍光標識プローブをTable 5に示す。また、核酸染色剤DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole, U励起:380nm)を用いて全菌数を計数し、FISH法での各種菌数の全菌数に占める割合を算出した。

顕微鏡観察は、試料10μlをゼラチンコーティングした穴付きスライドガラス (12.56mm²/穴) に塗布し、落射型蛍光顕微鏡 (オリンパスBH-2型) で各試料ごとに、全菌 (DAPI, 青色発光) と標的細菌 (in-situ hybridization, 赤色発光, 緑色発光) をそれぞれ5視野程度の画像を取り込んだ (6.3×10⁻³mm²/視野)。その後、全菌の青色発光と標的細菌の赤色発光, 緑色発光を比較しながら菌数

を計数した。

2. 2. 4 DGGE法によるメタン発酵汚泥の菌群解析

DNA抽出は、汚泥試料1mlを取り、Millerらのビーズビーター法¹⁸⁾で行った。抽出DNAをテンプレート (50ng·reaction⁻¹) として、真正細菌の16SrDNAのV3領域を標的としたプライマー341F-GC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA CCG GGG-CCT ACG GGC GGC AGC AG) と534R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG) 及びAmpliTaQ Gold™ Kit (Perkin Elmer) を用いて、Touch Down PCR¹⁹⁾を行った。PCR産物は、DCode Electrophoresis System (BioRad) を用い、35~55%まで変性剤濃度勾配を持つアクリルアミドゲルで200V, 60°C, 3.5hの条件で電気泳動した。検出された幾つかのDNAバンドを切り出し、再度PCR増幅を行った後、アガロースゲルで泳動、QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。精製DNAは、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI PRISM) を用いたPCR反応後、DNA Sequencer 377 (Perkin Elmer) で塩基配列を決定した。

2. 3 分析方法

原水およびメタン発酵汚泥中の脂質は、ヘキサン:イソプロパノール (5:3) 混合溶媒を用いた試験管法で抽出し、ヘキサン抽出液を80°C乾燥して得られた抽出物質重量からヘキサン抽出物質濃度を算出した。そして、ヘキサン抽出物質中の全脂質成分をクロマトロード-SⅢおよびTLC/FID分析計 (Iatroscan TH-10, Iatron) で中性脂肪 (TG)、高級脂肪酸 (LCFA)、極性脂質 (Polar lipid, リン酸や塩基などを含む脂質群) の各濃度を定量分析した。さらに、ヘキサン抽出物質中の高級脂肪酸濃度をガスクロマトグラフで分析した (島津GC-17A, 検出器FID, キャピラリーカラムDB-FFAP)。

発生ガスの組成は、ガスクロマトグラフで分析した (ジーエルサイエンスGC-322, 検出器TCD, カラムActive carbon 30/60, カラム温度95°C, TCD電流値120mA)。

揮発性脂肪酸 (Volatile fatty acid, VFA) は、高速液体クロマトグラフで分析した (エルマ光学ERC-8710, 検出器RI, カラムShodex RSpak KC-811, カラム温度60°C, 移動相0.1%リン酸)。COD_{Cr}分析は、米国のStandard Methods 18th Edition (1992年) に準じた。TS (Total solids), VTS (Volatile total solids), SS (Suspended solids), VSS (Volatile suspended solids), BOD, ケルダール窒素, pHの分析は、下水試験方法上巻 (1997年版) に準じた。

硫酸イオンは、イオンクロマトグラフで分析した (日本ダイオネクスDX120, 分離カラムIonPac AS12A, ガードカラムIonPac AG12A, 溶離液2.7mM Na₂CO₃/0.3mM NaHCO₃, サプレッサーASRS-1, 電気伝導度検出器, バックグラウンド12~16μS)。

3. 実験結果および考察

3. 1 前処理によるメタン発酵処理特性

3. 1. 1 前処理による油脂分解効果

油脂の分散性や低分子化を促進する方法として、乳化剤、油脂分解酵素を用いた前処理が挙げられる。これらの前処理効果を比較するため、前処理による排水中の脂質成分の変化を調べた (Fig. 1)。その結果、50°C高温処理、乳化剤添加によって油脂分散することができたが、主成分の中性脂肪は減少しなかった。一方、リパーゼ前処理では、

Fig. 1 Effect of pretreatment with or without lipase on the compositions of hexane extracts in BCW.

排水中の中性脂肪は90%以上高級脂肪酸へ加水分解された。

3. 1. 2 前処理によるメタン発酵促進効果

豆腐製造排水を前処理して9日間のメタン発酵回分実験を行った (Fig. 2)。その結果、室温 (A-1)、50°C (A-2)、ベントナイト (A-3)、アルギン酸ナトリウム (A-4) で前処理した系ではメタン発酵促進効果は認められなかったのに対して、リパーゼ (A-5) で前処理した場合はメタン発酵促進効果が認められた。すなわち、乳化前処理によって油脂分散性を向上させただけではメタン発酵にかかわる微生物反応を促進できないものと考えられた。

3. 1. 3 リパーゼ前処理によるメタン発酵連続処理特性

豆腐製造排水に豆腐揚げ廃油0~1ml・l⁻¹を添加したものを、約8ヶ月間、3系列のメタン発酵連続実験を行った。リパーゼによる前処理効果を検討するため、約2週間隔でメタン発酵槽に残留したヘキサン抽出物質の組成を定量分析した (Fig. 3)。リパーゼ前処理しない系 (Run 1) では、発酵槽内に中性脂肪が残留していることがわかった。一方、リパーゼ前処理系 (Run 2とRun 3) では、中性脂肪はほぼ完全に除去され、高級脂肪酸も90%以上除去された。これらの結果より、油脂のメタン発酵においてはリパーゼの前処

Fig. 2 Effect of pretreatment on the methane fermentation of BCW.

Fig. 3 Elimination of lipids in the continuous methane fermentation for treating BCW.

理が有効であることがわかった。

3. 1. 4 物質収支

3系列のメタン発酵連続運転データから、COD_{Cr}物質収支を解析した (Fig. 4)。データ解析は、処理が安定した運転期間中のガス生成量 (運転146~174日目の29日間のデータ)、原水およびメタン発酵汚泥のCOD_{Cr}平均値 (運転146, 160, 174日目の3回の分析結果) を基に行った。

リパーゼ前処理・高温メタン発酵系 (Run 2) では、豆腐製造排水のCOD_{Cr}除去率71%、除去COD_{Cr}の86%をメタンとして回収できた。これに対して、リパーゼ前処理なし・高温メタン発酵系 (Run 1) では、COD_{Cr}除去率は64%だったが、メタン回収量は除去COD_{Cr}の64%であった。また、リパーゼ前処理・中温メタン発酵系 (Run 3) では、COD_{Cr}除去率は84%と最も高かったが、メタン回収量は除去COD_{Cr}の29%と非

Fig. 4 COD_{Cr} mass balance.

Calculated from data obtained in a 29-day operant period from 146th day to 174th day.

常に少なかった。これらの結果より、メタン回収を主目的に豆腐製造排水のメタン発酵を行う場合、リパーゼ前処理と高温メタン発酵を組み合わせたプロセスが最適であると考えられた。

連続運転中の3系列の発酵槽内を観察した。中温メタン発酵Run 3では液表層に多量のスカムが蓄積し、発酵槽内壁にも油脂状物質が厚く付着していた(Fig. 4のUnknown画分と推定される)。油脂メタン発酵の中温汚泥は疎水性が強く、これが発生ガスの放出・回収に影響があるものと推察される。これに対して、高温メタン発酵系Run 1とRun 2では、液表層でのスカム発生はほとんどなく、発酵槽内壁に付着した油脂状物質の量はRun 1>Run 2の順であった。

3.2 豆腐製造排水のメタン発酵汚泥の微生物菌群解析

3.2.1 阻害剤を用いたメタン発酵実験

リパーゼ前処理した豆腐製造排水は、高級脂肪酸が主な脂質成分となった。高級脂肪酸の嫌気分解は、主に水素生産性酢酸生成菌(hydrogen producing acetogenic bacteria, HAB), 硫酸還元菌(sulfate reducing bacteria, SRB), 酢酸資化性(acetate utilizing, A-)および水素資化性(hydrogen utilizing, H-)メタン生成菌(methane producing bacteria, MPB)が関与している。本研究では、リパーゼ前処理および発酵温度の影響に関して、これら菌群のメタン発酵汚泥での特徴を調べた。

高級脂肪酸を分解する水素生産性酢酸生成菌の代謝阻害剤、硫酸還元菌の生育阻害剤および硫酸イオン混合液を用いてメタン発酵回分実験を行った結果をFig. 5に示す。 Na_2MoO_4 を添加した場合、メタン生成量がRun 1>Run 3>Run 2の順で大幅に減少した。よって、Run 1とRun 3のメタン

発酵系において硫酸還元菌がメタン生成反応に大きく関与していると推測された。水素生産性酢酸生成菌の阻害剤を添加した場合、高温メタン発酵汚泥(Run 1とRun 2)でメタン生成が一時的に阻害された。これに対して、中温メタン発酵汚泥(Run 3)には影響なかった。この結果から、高温メタン発酵系では水素生産性酢酸生成菌がメタン生成に大きく関与していることが示唆された。

回分実験終了後の硫酸イオン濃度を測定した結果、添加した硫酸イオンは、Run 1とRun 3では完全に除去されたのに対して、Run 2ではわずかに消費された程度だった。この結果からも、硫酸還元菌はRun 1とRun 3のメタン生成反応に重要な役割を果たしているものと考えられた。硫酸イオンを添加せずに Na_2MoO_4 のみを添加したバイアルNo. B-2でも硫酸イオンが検出された。これは豆腐製造排水から持ち込まれた硫酸イオンまたは菌体代謝生産物としての硫酸イオンであると考えられる。

Fig. 6に回分実験終了後の各汚泥のLCFAおよびVFAの分析結果を示す。Run 1とRun 3の汚泥では硫酸還元菌阻害剤を添加したバイアルNo. B-2とB-4においてLCFAが残留したのに対し、Run 2ではLCFAの残留は認められなかった。この結果から、Run 2では主に水素生産性酢酸生成菌が高級脂肪酸を分解していることが示唆された。また、高温メタン発酵汚泥での硫酸還元菌阻害剤を添加したバイアルNo. B-2とB-4において酢酸が顕著に蓄積した。これにより、豆腐製造排水の高温メタン発酵では酢酸資化性硫酸還元菌はメタン生成菌と共に酢酸を分解していることが示された。Run 3の汚泥ではプロピオン酸が蓄積し、酢酸蓄積は見られなかった。これらの結果から、中温メタン発酵系の酢酸除去は主にメタン生成菌によるものと推測できる。

Fig. 5 Effect of inhibitors on the methanogenic and sulfate reducing activities of sludge for treating BCW.

Fig. 6 Effects of inhibitors on elimination of fatty acids in the methane fermentation sludge.

以上のように、豆腐製造排水の高温メタン発酵では硫酸還元菌の阻害剤添加によってメタン生成活性が阻害され、硫酸還元菌がメタン生成に大きく関与していることが示唆された。硫酸還元菌の関与には、不完全酸化型硫酸還元菌による高級脂肪酸から酢酸への分解、完全酸化型硫酸還元菌による水素、酢酸の消費の2通りが挙げられる。これらの代謝では、油脂排水中の硫酸イオン濃度が低い場合にはメタン発酵促進効果があるが、硫酸イオン濃度が高い場合には硫酸還元菌とメタン生成菌との基質競合が生じ、また、大量の硫化水素生成を伴ってメタン発酵阻害を生じる恐れがある。

3. 2. 2 油脂排水のメタン発酵汚泥の菌数

嫌気性脂肪酸分解菌のMPN法解析では (Table 6), 高級脂肪酸分解菌数はRun 2>Run 1>Run 3であった。一方、高級脂肪酸資化性の硫酸還元菌数は、Run 1>Run 3>Run 2であった。

Fig. 7は、豆腐製造排水のメタン発酵汚泥中の真正細菌、硫酸還元菌、メタン生成菌をFISH法で計数した結果を全菌数との割合で示す。DAPIによる全菌数は、高温汚泥Run 1とRun 2が同程度、中温汚泥Run 3はその半分程度であった。そして、全菌数に占める各菌種の割合は、高温汚泥Run 1とRun 2ではH-MPBの割合がA-MPBより多く、中温汚泥Run 3では逆の結果であった。硫酸還元菌の割合は、汚泥Run 3>Run 1>Run 2の順であった。これらの結果は、前述の阻害剤を用いたメタン生成試験の結果と一致した。

Table 6 Population of anaerobic bacteria counted by MPN (cells·m⁻¹).

Sludge*	Carbon source			
	Anaerobic bacteria medium		Sulfate reducing bacteria medium	
	Stearate C18:0	Oleate C18:1	Lactate C5:0	Oleate C18:1
Run 1	1.2×10 ⁸	7.9×10 ⁸	7.9×10 ⁷	1.3×10 ⁸
Run 2	1.7×10 ⁸	4.9×10 ⁹	2.8×10 ⁷	7.0×10 ⁴
Run 3	2.1×10 ⁶	2.2×10 ⁷	4.9×10 ⁷	1.1×10 ⁷

*Sludge of Runs 1 and 2 were incubated at 55°C, sludge of Run 3 was incubated at 35°C for 1 month.

Fig. 7 Population of microorganisms counted by FISH.

3. 2. 3 油脂排水のメタン発酵汚泥の微生物菌群解析

メタン発酵汚泥における微生物種とその生育特性を把握するため、PCR-DGGE法と塩基配列決定法で菌叢を解析した。Run 1~3汚泥の抽出DNAについて、真正細菌をターゲットにしてPCR-DGGE解析した結果をFig. 8に示す。これらを比較すると、中温と高温メタン発酵汚泥の菌種は大きく異なっており、リバーゼで前処理した高温メタン発酵汚泥では、優占となる真正細菌の種類が多くなっていた。

さらに、高温汚泥Run 2と中温汚泥Run 3について、PCR-DGGE法を用いて各菌種DNAの分離精製を行い、幾つかの菌種の塩基配列を決定した。その結果、高温メタン発酵汚泥の主要バンドは*Thermobacter proteolyticus*²⁰⁾と97%の相同性があり、中温メタン発酵汚泥の主要バンドはUncultured Banisveld landfill bacterium BVA69²¹⁾と92%の相同性があった。*Thermobacter proteolyticus*は生育温度55°C、タンパク質分解菌として報告されており^{20),22)-23)}、また、高温嫌気性のオレイン酸集積培養系にも優占的に出現することが報告されている²⁴⁾。しかし、この菌種と油脂分解菌との関わりについての報告例はない。これら以外に塩基配列を決定できた中温および高温性菌種についても、従来報告されていないものであった。今後、油脂メタン発酵プロセスの制御方法を検討していく上では、メタン発酵連続運転での微生物の菌種構成や量の変動をモニタリングしながら微生物への影響を詳しく調べていく必要がある。

Sludge of Run 2

- B1 *T. proteolyticus* (167/172, 97%)
 B2 Uncultured eubacterium AA39 (102/104, 98%)
 B3 *Candidate* division OP9 clone OPB72 (103/108, 95%)
 B4 Uncultured eubacterium AC08 (166/168, 98%)

Sludge of Run 3

- C1 Uncultured Banisveld landfill bacterium BVA69 (182/196, 92%)
 C2 Uncultured bacterium clone TDC-Si:8 (179/185, 96%)
 C3 *Aquaspirillum delicatum* (173/175, 98%)
 C4 Uncultured eubacterium AA39 (102/104, 98%)
 C5 Uncultured bacterium SHA-38 (175/189, 92%)
 C6 *Syntrophus* sp. (176/195, 90%)

Fig. 8 DGGE profile of methane fermentation sludge for treating BCW.

4. まとめ

油脂含有排水として豆腐製造排水を用いたメタン発酵の回分および連続実験から、リバーゼ前処理と高温メタン発酵の組合せが有効であることが明らかになった。豆腐製造排水をリバーゼで前処理し、高温または中温メタン発酵した系では、中性脂肪と高級脂肪酸がほぼ完全に除去された。さらに、リバーゼ前処理+高温メタン発酵系ではメタン転換率60% (COD_{Cr}基準) と最も高かった。

メタン発酵汚泥のメタン生成活性、硫酸還元活性、微生物菌群構成を解析した結果、高級脂肪酸分解には硫酸還元菌が大きく関与していることが分かった。高級脂肪酸を分解する硫酸還元菌は、リバーゼ前処理しない高温メタン発酵汚泥、リバーゼ前処理+中温メタン発酵汚泥で多かった。リバーゼ前処理+高温メタン発酵汚泥では、高級脂肪酸資化性の水素生産性酢酸生成菌の優占化が示唆された。

今後は、リバーゼ添加法や発酵装置の最適化によって処理費用低減を進め、油脂類の再資源化と処分費削減を図る。

謝 辞

本研究の一部は、農林水産省の「エコシステムの制御による高度排水処理技術の開発」において、食品産業環境保全技術研究組合の委託研究として実施されたものである。本研究のFISH法実験では新庄尚史氏、水質分析では川辺通子氏、加藤裕子氏、微生物解析実験では長岡技術科学大学生物機能工学課程 工藤 久氏に協力を得ました。感謝の意を表します。

(原稿受付 2003年 8月29日)

(原稿受理 2004年 2月 6日)

参 考 文 献

- Hanaki, K., Matsuo, T. and Nagase, M. (1981) Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion. *Biotech. Bioeng.*, **12**, 1591-1610.
- Dubourguier, H.C., Samain, E., Prensier, G. and Albagnac, G. (1986) Characterisation of two strains of *Pelobacter carbinolicus* isolated from anaerobic digesters. *Arch. Microbiol.*, **145**, 248-253.
- Koster, I.W. and Cramer, A. (1987) Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Appl. Env. Microbiol.*, **53** (2), 403-409.

- 山口隆司, 原田秀樹, 桃井清至, 曾怡禎 (1995) 高級脂肪酸の嫌気的分解過程における硫酸還元菌の生態学的役割, *水環境学会誌*, **18** (6), 499-510.
- チュウ春鳳, 李玉友, 宮原高志, 野池達也 (1997) 中温および高温メタン発酵に及ぼす高級脂肪酸の阻害効果の比較, *土木学会論文集*, **559** (VII-2), 31-38.
- Angelidaki, I. and Ahring, B.K. (1995) Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic (55°C) enrichment culture degrading long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (6), 2442-2445.
- Lalman, J.A. and Bagley, D.M. (2000) Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. *Wat. Res.*, **34** (17), 4220-4228.
- Beccari, M., Majone, M., Petrangeli Papini, M. and Torrisi, L. (2001) Enhancement of anaerobic treatability of olive oil mill effluents by addition of Ca(OH)₂ and bentonite without intermediate solid/liquid separation. *Wat. Sci. Tech.*, **43**(11), 275-282.
- チュウ春鳳, 片岡直明, 宮品子, 山田紀夫 (1999) 生ゴミのメタン発酵特性, 第33回日本水環境学会年会講演集, 278.
- 片岡直明, 鈴木隆幸, 石田健一, 山田紀夫, 本多勝男 (1999) 家畜糞尿のメタン発酵処理システムの実証試験, *環境工学研究論文集*, **36**, 443-453.
- 日本下水道協会 (1997) 計数及び同定, 「下水試験方法」 pp. 701-707.
- Angelidaki, I., Petersen, S.P. and Ahring, B.K. (1990) Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 469-472.
- 日本下水道協会 (1997) 硫酸還元菌, 「下水試験方法」 pp. 623-627.
- Amann, R.L., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. and Stahl, D.A. (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 614-623.
- Ramsing, N.B., Fossing, H.M., Ferdelman, T.G., Andersen, F. and Thamdrup, B. (1996) Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1391-1404.
- Rabus, R., Fukui, M., Wilkes, H. and Widdel, F. (1996) Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from Crude Oil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (10), 3605-3613.
- 珠坪一晃, 関口勇地, 原田秀樹, 大橋晶良, 多川正, 大関弘和, 荒木信夫 (1997) 16S rRNA 標的モレキュラー・プローブのIn-situ Hybridization による嫌気性汚泥微生物叢の生態学的構造解析, *環境工学研究論文集*, **34**, 51-60.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L. and Ghiorse, W.C. (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65** (11), 4715-4724.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H. and Hrayama, S. (1998) Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (11), 4396-4402.
- Ollivier, B.M., Mah, R.A., Ferguson, T.J., Boone, D.R. and Garcia, J.L. (1985) Emendation of the genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a proteolytic acetogen from a methanogenic enrichment. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 425-428.
- Roling, W.F.M., Breukelen, B.M., Braster, M., Lin, B. and Verseveld, H.W. (2001) Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (10), 4619-4629.
- Rainey, F.A. and Stackebrandt, E. (1993) Transfer of the type species of the genus *Thermobacteroides* to the genus *Thermoanaerobacter* as *Thermoanaerobacter acetotylus* (Ben-Bassat and Ziekus 1981) comb. nov., description of *Coprothermobacter* gen. nov., and reclassification of *Thermobacteroides proteolyticus* as *Coprothermobacter proteolyticus* (Ollivier et al., 1985) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 857-859.
- Etchebehere, C., Pavan, M.E., Zorzopulos, J., Soubes, M. and Muxi, L. (1998) *Coprothermobacter platensis* sp. nov., a new anaerobic proteolytic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 1297-1304.
- Menes, R.J., Fernandez, A. and Muxi, L. (2001) Physiological and molecular characterisation of an anaerobic thermophilic oleate-degrading enrichment culture. *Anaerobe*, **7**, 17-24.