

第5章 担体を用いた高効率連続メタン発酵とビタミン B₁₂の生産

5-1 序

前述したようにメタン生成菌による B₁₂ の生産の利点は、1) 従来に用いたプロピオン酸細菌 10 倍の含有量、2) 安価な基質（メタノール、酢酸、CO₂ など）、3) プロピオン酸細菌では生産阻害の著しい有機酸を生成するのに対し、メタン生成細菌は阻害性のないメタンを生成する、したがって高濃度菌体培養系が得られやすいと考えられる。4) さらに興味深い点としてコリノイドは大部分(70%)菌体外に蓄積する。一方、欠点は絶対嫌気条件下での培養の難しさ、並びに増殖速度、菌体収率が低いため、高濃度菌体の培養が困難である。これに対して、発酵槽内の菌体を高密度で滞留させ、メタン生成速度を高めることにより、この問題を克服しようとする研究が数多く行われた。Bugante, E. C. ら(1989) はカラム型リアクターを用いて Thermophilic methanogens の培養を行い、CO₂、CO、H₂ の混合ガスからのメタン発酵を行った。カラム内の菌体密度は 5.5 g /L に保持した。Mazumder, T. K. ら(1987) は高濃度菌体培養系を実現するため、多孔性無機担体を充填した固定床リアクターによるコリノイド生産を試みた。その結果、55 日連続培養後、高濃度の菌体(39.6g dry cell/l-reactor) の保持が可能となり。ビタミン B₁₂ の生産性 36mg/L・day

を得ている。しかしながら二酸化炭素と水素資化性メタン菌を用いて B_{12} の生産性に関する研究は非常に少ない。特に担体を用いる CO_2 と H_2 の混合ガスを連続供給した高効率メタン発酵におけるビタミン B_{12} の生産についての検討は全くされていない。

本研究はこれまで得られた知見を用い、本菌最適な基礎塩類及び微量金属イオン濃度の培地を用いて、高効率メタン発酵を行い、ビタミン B_{12} の生産に適する操作条件を求めることを本章の目的とした。

5-2 実験材料及び方法

5-2-1 実験装置

図 5-1 は本実験を用いた固定床メタン発酵装置である。基質ガスである CO_2 / H_2 と菌体との接触効率を上げるために、ダイヤフラム型ポンプとガス分散器で CO_2 と H_2 (20/80、v/v)の混合ガス基質を液相から気相へ循環を行った。ガスポンプからニードル弁付きガスフロメーターを通して定量的、連続的に基質ガスをリアクターに供給した。消化ガスの出口には酸素の逆流を防止するために逆流防止弁を用いた。発酵槽密閉のための栓及び輪リングなどはすべてブチルゴムを使用した。2.8L のジャーファーメンタに 0.6L の培養液を発酵槽の底部に置く、液体部分の上、円柱型(110mm 直径×90mm 高さ)に成形したへ

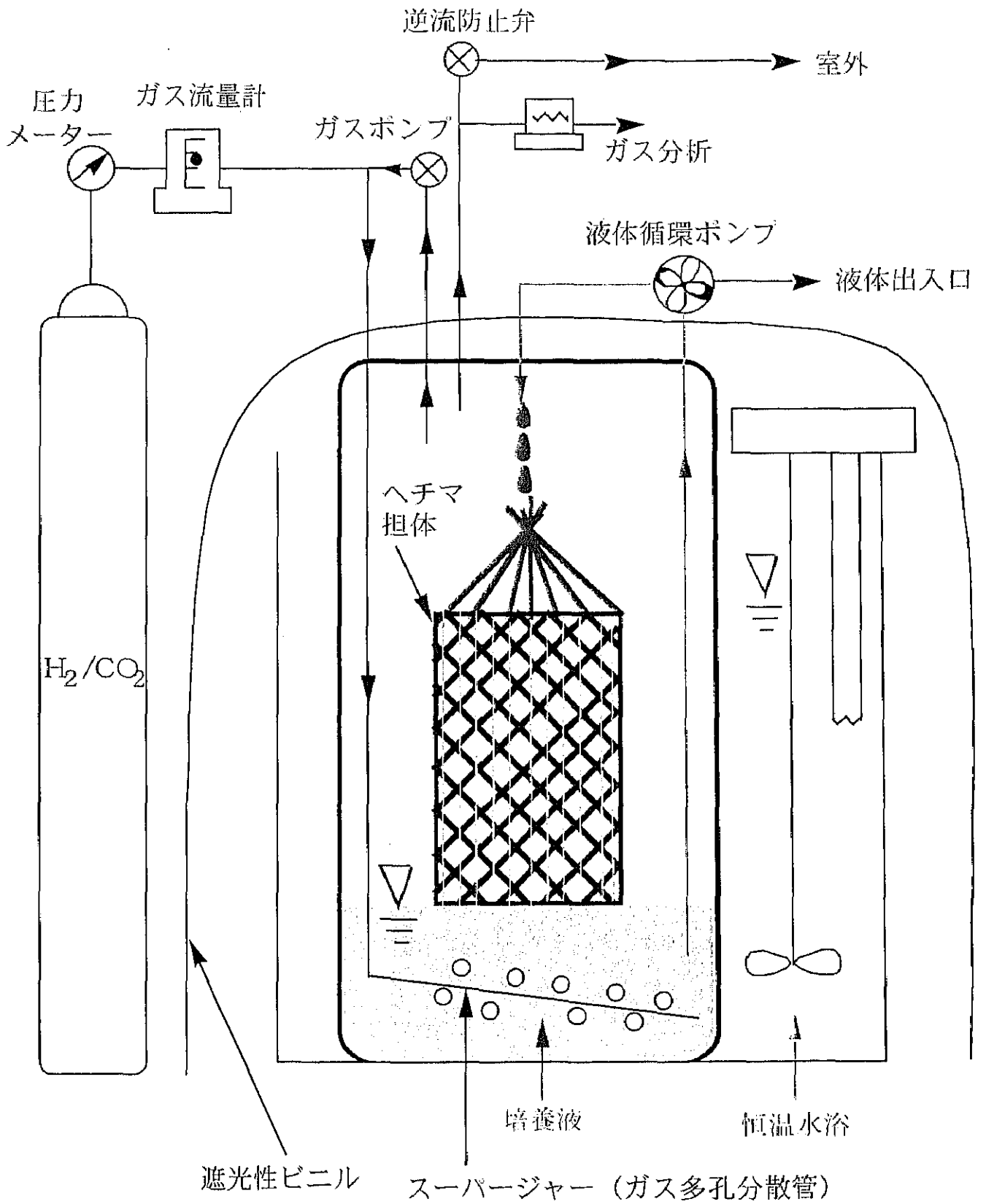


図5-1. 固定床型メタン発酵装置図

チマを見掛け体積で 1.4 L を置いた。液体ポンプを用いて培地を吸い込む、吸い込まれた培地をシャワーのようにヘチマ担体を濡らし。短絡流の発生を防ぐため、円柱型ヘチマ担体の上、円錐型に組み立てられた 16 本竹の棒を固定された。この工夫で培地を均一に固定床全体を流れることが成功した。発酵温度は 37°C で行った。装置全体の外側は遮光性ビニルを付けて、光を遮断する。

5-2-2 菌種

菌種は嫌気状態で筑波大学構内の池の底泥体積物から採集し、CO₂ と H₂ (20/80、v/v)を基質とし、微量金属塩など含む標準濃度の無機混合培地により、温度 37°C、2.8L のジャーファーマンタで 6 ヶ月の半連続馴養を行った。また、馴養されたメタン菌群は CO₂ と H₂ (20/80、v/v) を基質とする菌種が優先菌となり、位相差顕微鏡 (オリンパス、BX50) の観察でほとんど長かん菌であることを判った。写真 5-1 で示す。これを種菌としてメタン発酵槽のスタートアップに用いた。

5-2-3 培地

基礎培地は表 5-1 に示したように準備する。実験の際添加する時、10 倍に希釈する。微量金属液の組成は表 5-2 に示している。1L の培地に 10mL の微

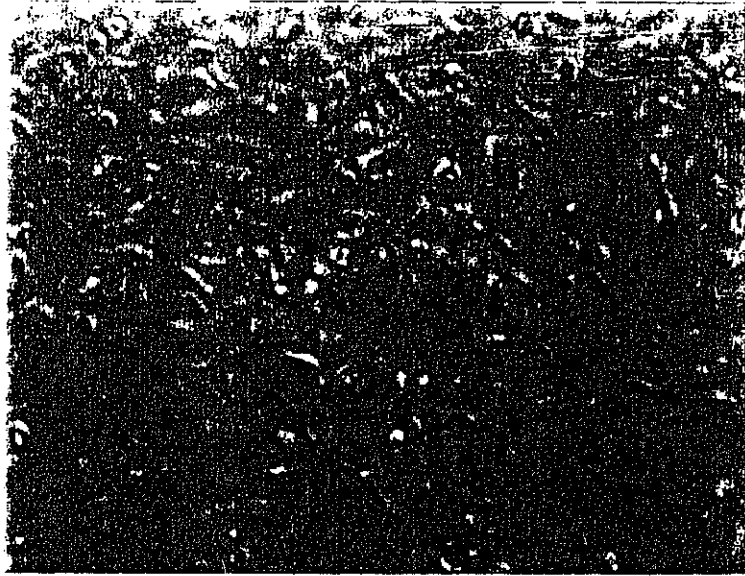


写真 5-1. 接種用メタン菌

量金属液を添加する。

硫源として、非揮発性の L- システインを用い、その濃度は Zhang, Z. Y. and Maekawa, T.(1994)が得られた最適濃度 3.6 mM とした。また、L- システイン濃度を培養に伴い、システムのガス連続供給による硫源損失を防ぐため、6 mM まで添加を行った。

表 5-1. 基礎培地の組成

成分	濃度(mg/L)
K_2HPO_4	3400
KH_2PO_4	3400
Na_2CO_3	2540
NH_4Cl	2130

表 5-2. 微量金属液の組成

成 分	濃度 (mg/L)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	600
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.3
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	125
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{GaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8
$\text{Al K} (\text{SO}_4)_2$	1
H_3BO_3	1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5

5-2-4 実験方法

1) リアクターのスタートアップ

2.5 L のフラスコで前培養を行い、対数増殖期の菌を採集して接種菌とした。還元剤を除いた全ての培地 500 ml を発酵槽に投入後、溶存酸素除去のため発酵槽を不活性ガス N_2 に置換した後、 CO_2 と H_2 (20/80、v/v) を導入、置換し、1 時間程度循環した。その後、空気を N_2 に置換した注射器で対数増殖期のメタン菌 100 ml 接種を行い。その時、システインは 3 mM、微量金属塩の添加濃度は 0.1 mL/L であった。

2) 連続操作実験

装置を連続操作による発酵槽のメタン生成速度が定常状態になった後、HRT = 3 day に設定し、メタン生成速度を定常状態に達したから HRT = 6 day に変換して、定常状態まで連続操作を行い、それぞれ期間中の発酵槽の特性及び B_{12} の含有濃度を調べた。表 5-3 に実験条件を示す。発酵槽が定常状態に達しているかを判断する指標として、発酵槽の中の菌体密度およびメタン生成速度を用いた。つまり、菌体濃度及びメタン生成速度を定量になってから 2 倍の HRT を経過するとき、定常状態として判断した。

表 5-3. 連続操作による固定床メタン発酵槽の操作条件

RUN	HRT (day)	運 転 時 間 (day)	温 度 (°C)	微 量 金 属 塩 濃 度 (mL/L)	硫 源 濃度(mM)
1	3	10	37	10	6
2	6	11			

5-2-5 分析方法

1) ガス組成 (出口からサンプルを採集し、3 章と同じ方法、3 回平均測定を行った)

2) pH

3) B₁₂ の含有量 (3 章と同じ測定方法)

4) 菌体密度

固定床メタン発酵槽に存在している菌体は、脱離液に浮遊した菌体、固定床内部の液体に捕集された菌体、固定床のハチマに付着した菌体など三つに分けることができる。脱離液に浮遊した菌体は図 5-1 に示したリアクターに備えた液体循環パイプから採集した。固定床内部の液体に捕捉された菌体は固定床頂部、中部、底部 6 ヶ所から採集し、その測定値の平均値を求めた。実験終了後、固定床のハチマを取り出してトレイに置き、固定床頂部、中部、底部 7 ヶ所か

ら大きさ 1 cm^3 のヘチマサンプルを採集した。それからヘチマを基礎培地に入れ、3 分間激しく振とうしてから超音波洗浄装置に入れ、3 回繰り返し、すべての洗浄液を収集した。これによりヘチマに付着した菌体を回収した。ヘチマ担体に付着した菌体を全部回収できたかどうかをチェックするため、最後の洗浄液を位相差顕微鏡で観察した。写真 5-2 はヘチマに付着した菌体最後洗浄液の写真である。菌体はほぼ検出されなかった。これらの採集したサンプルを濾紙(WHAT-MAN No.4) で粗大粒子を除去してヘチマに付着した菌体密度の分析を行った。

菌体密度の計測方法は第 4 章に述べた同じ方法を用いて測定した。

5-3 結果及び考察

5-3-1 微量金属液の添加によるメタン菌への影響

Fe、Co、Ni、Mg、Zn、Al、Cu、Mn、などの微量金属は、メタン生成細菌に対する増殖(活性)促進作用が明らかになっているものである(Speece, R. E. 1996)。メタン生成速度に影響を及ぼす栄養素は相乗的に作用する。それゆえ、必要な栄養素がどれか一つでも不足・欠乏すると、メタン生成は減速するか、あるいは完全に停止する。Speece, R. E. (1996)には、もし嫌気性処理プロセスが良好に機能していなければ、微量金属のバイオアベイラビリティを直ちに

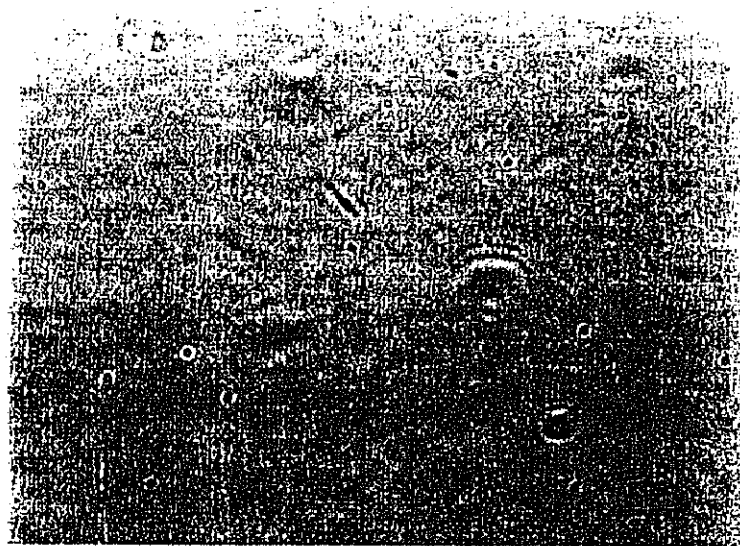


写真 5-2. 洗淨後

調査すべきであることが指摘される。また、Zhang, Z. Y. and Maekawa, T.(1994)は微量金属液濃度によるメタン生成速度への影響より、メタン菌増殖への影響が大きい結果が発表された。図 5-2 担体を用いた CO₂ と H₂(20/80、v/v) 連続供給したメタン発酵初期の微量金属添加濃度変化のメタン生産速度への影響は明らかになった。発酵初期、微量金属濃度 1 (mL/L) 添加するとメタン生成速度が上がってきたが、一日たったらメタン生成速度が下げてきた。濃度 3 (mL/L) 添加すると前のようにメタン生産速度を再び上がってきた、そのままの濃度を一日経つと、同様にメタン生産速度を下げてきた。それから、一気に濃度 10 (mL/L) まで添加するとメタン生産速度は上昇し、その濃度で二日間経過してもメタン生成速度はほとんど安定した状態であった。このことから、この発酵システムの微量金属塩濃度は 10 (mL/L) に維持する必要があると判明した。

5-3-2 メタン生成速度と HRT との関係

本実験は CO₂ と H₂ (20/80、v/v) 混合基質ガスを連続供給し、培地の流入速度を調節して液の滞留時間をそれぞれ 3 日、6 日に設定した。それぞれの滞留時間について定常状態を得るまで連続発酵を行った。定常状態の判定はガス発生速度及びメタン菌の密度を適宜測定し、一定に保っているかどうかによ

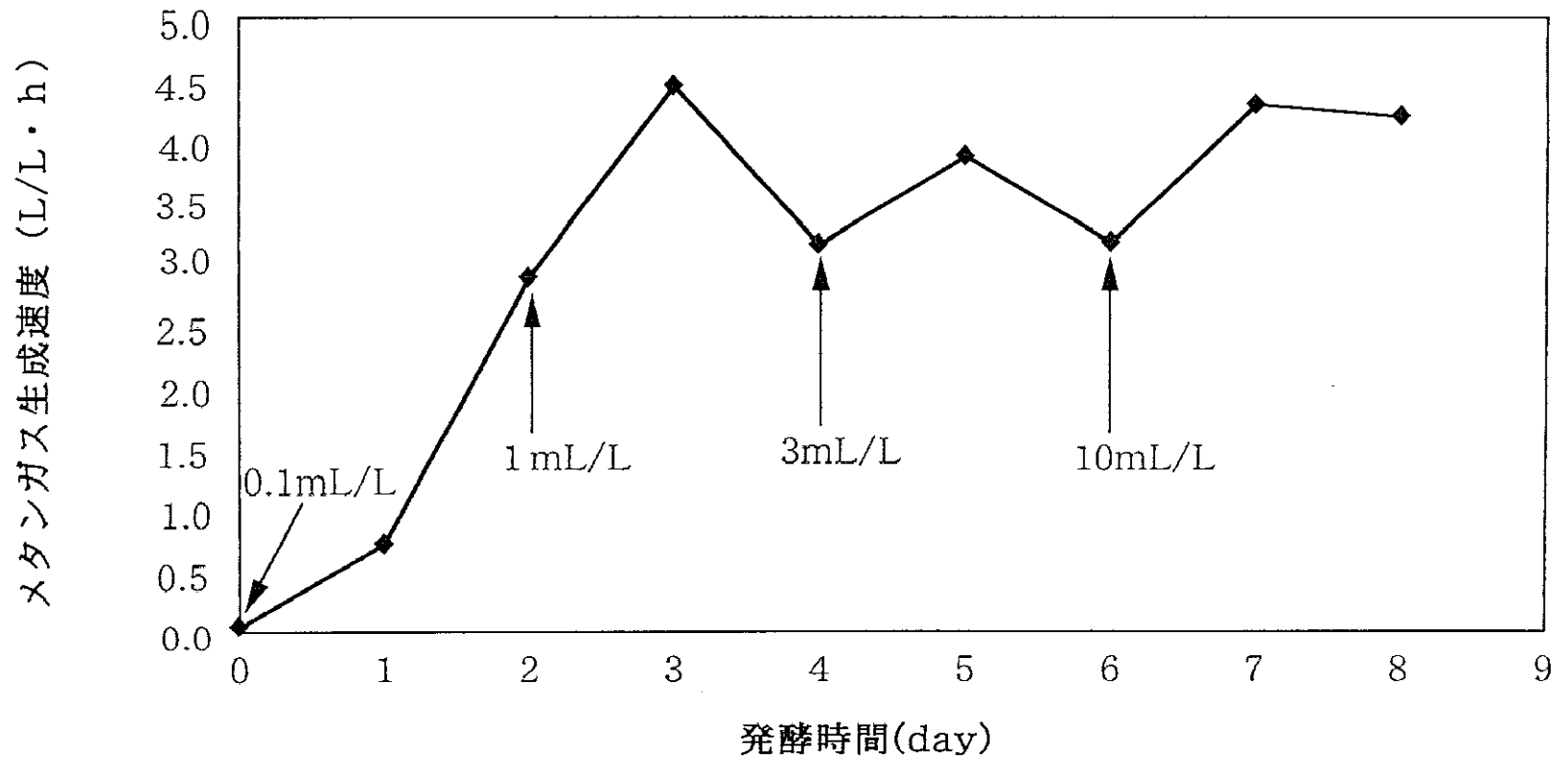


図 5-2. 発酵初期の微量金属添加濃度変化とメタン生成速度への影響

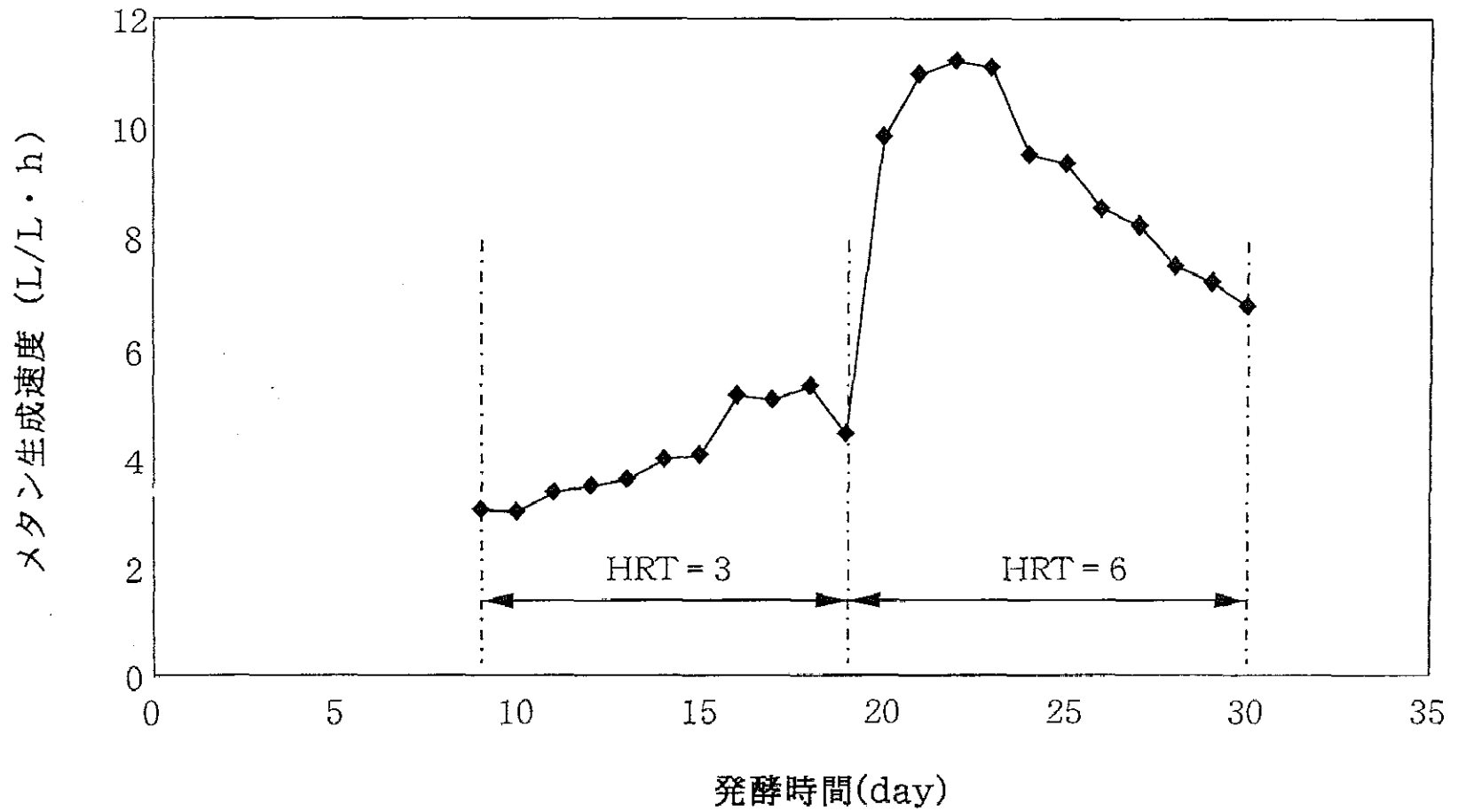


図 5-3. メタン生成速度とHRTとの関係

って判定する。図 5-3 に示したように HRT = 3 day の場合、7 日後定常状態を得た、それを伴ったメタン生成速度は 5.38 (L/L·h) である。一方、HRT = 6 day の場合 2 日だけで定常状態を得た、その時のガス生成速度は 11.2 (L/L·h) まで達した。その後、何らかの原因でガスの生成速度は徐々に減少した。おそらく微量金属塩の不足によるものと考ええる。この方式では、毎日の添加液量が槽内液量の 1/3 以上、すなわち滞留日数 3 日以下程度になると添加時の変動負荷が大きく、リアクター安定化されるまで長い時間が必要であった。しかし滞留日数 6 日になると直ちに安定化され、高いガス生成速度も得た。もちろん嫌気性発酵プロセスに必要な滞留時間は基質の種類によるためであって、処理プロセスの種類によるためではないことである (Speece, R. E. 1996)。本実験に対しては適切な滞留時間は 6 日であることが明らかになった。

5-3-3 固定床発酵槽におけるビタミン B₁₂ の生産

1) HRT の変化とビタミン B₁₂ の生成の関係

図 5-4 は異なった HRT におけるビタミン B₁₂ の含有量を示した。HRT = 3 day の場合、最高生成量は 2.88 mg/L である、それに対して、HRT = 6 day になると、ビタミン B₁₂ の生成は大幅に増加した。最大収量は 37.5 mg/L まで達成した。その値は Matsumuder, T. K. ら (1987) が報告した 36 mg/L よ

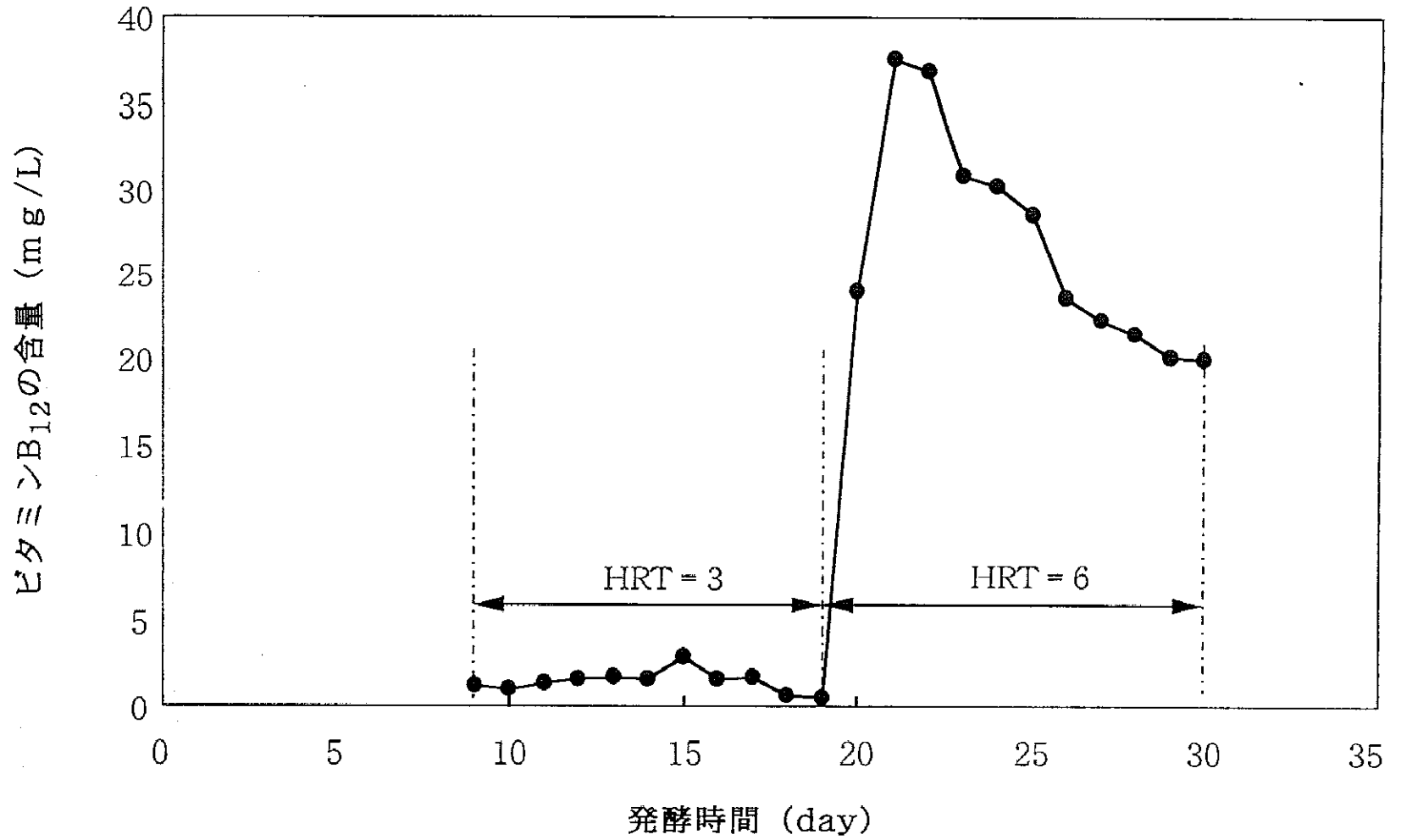


図 5-4. HRT の変化とビタミンB₁₂生成の関係

りも上回ってきた。しかも HRT=6 day の場合、10 日間以上比較的安定した生産率を得た。異なった HRT におけるビタミン B₁₂ 含有量の差が大きい原因の一つは HRT=3 day の場合、リアクターの変動負荷が大きく、リアクターが安定化されるまで長い時間かかってしまったことになる。または、滞留日数が短いため、必要の栄養塩、特にビタミン B₁₂ の生成に欠かせない微量金属塩の一つ Co を十分摂取していなかった事を考えられる(Speece, R. E. 1996)。一方、HRT=6 day の場合、2 日間だけ定常状態を得た。その時のガス生成速度は 11.2 (L/L·h) まで達した。その速度は HRT=3 day の間より倍以上であった。栄養は充分と共に菌の活性も高い、より多くのビタミン B₁₂ を菌の外に分泌される可能性があると考えられる。その後、何らかの原因でビタミン B₁₂ の含有濃度は徐々に減少した。おそらく微量金属塩の不足によるものと考えられる。

2) 固定床発酵槽におけるメタン菌活性と B₁₂ 含有量との相関関係

メタン菌活性とビタミン B₁₂ の含量の関係について、図 5-5 に示していた。異なった HRT で、ビタミン B₁₂ の絶対含量も異なったが、菌体活性とビタミン B₁₂ 含量の関係は同じ傾向が見られた。つまり、メタン生成速度を見た場合、対数増殖期を呈し、それと対応してビタミン B₁₂ の含有濃度も同じ傾向で増大した。メタン生成速度が最も高い時、すなわち、メタン菌活性が高い時のピタ

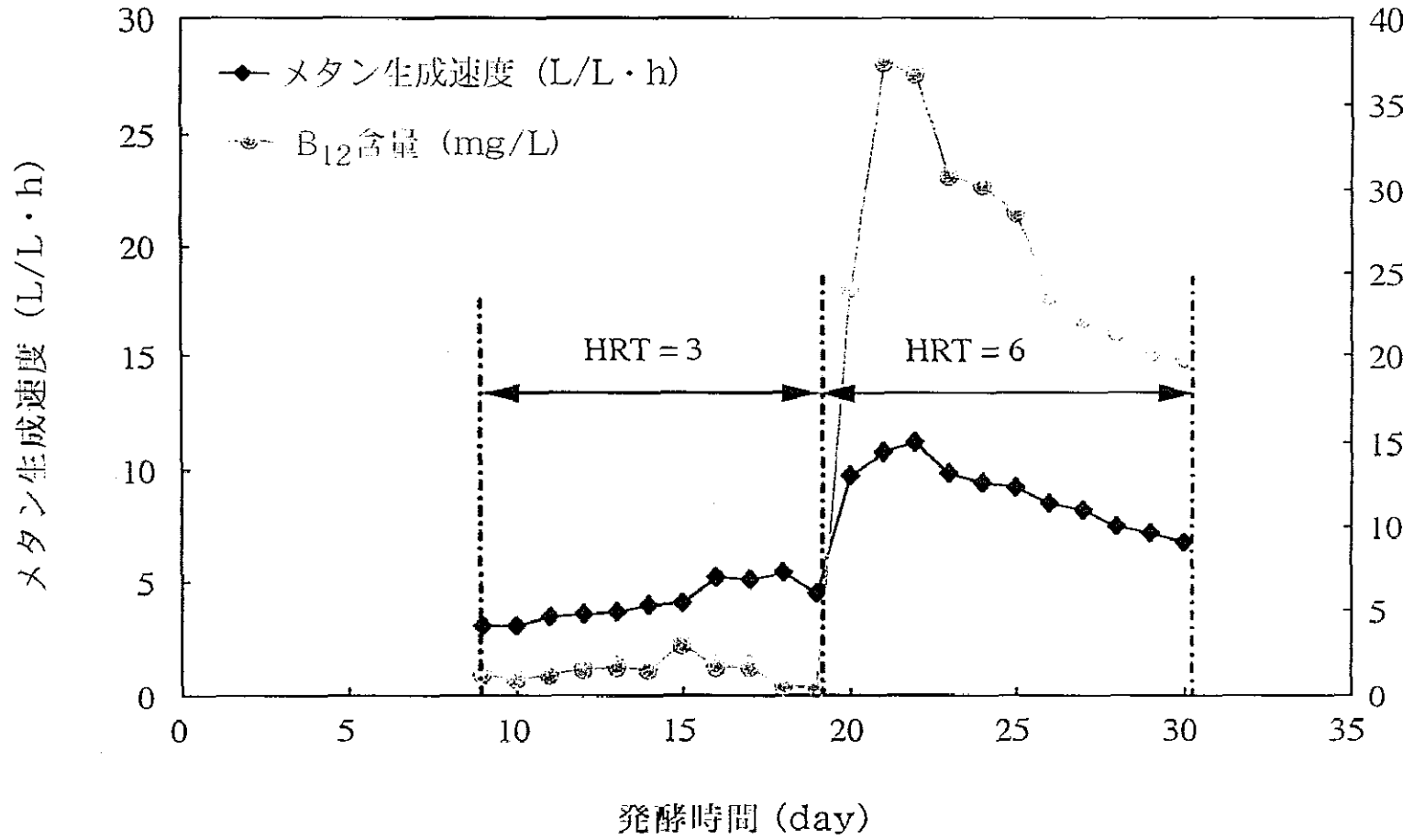


図 5-5. 固定床発酵槽におけるメタン菌活性とビタミンB₁₂含量との相関関係

ミン B₁₂ の濃度は最大であり、それぞれ 2.9 mg/L と 37.5 mg/L に達成した。メタン生成速度が安定期に入ると、ビタミン B₁₂ の生産は減少する傾向が見られた。この結果は、4 章の加圧試験管回分培養の実験結果と一致し、メタン菌の活性はビタミン B₁₂ の生産、とくに高効率ビタミン B₁₂ を生成するため、メタン発酵の一つ重要な操作条件であることが明らかになった。

5-3-4 ヘチマを用いる固定床発酵槽の菌体密度

バイオリアクターに高密度の菌体を維持するため、さまざまな方法が開発されてきた (Albagnac, G. 1990; Murray, W. D. and L Yan den Berg 1981)。生物膜固定床メタン発酵槽による嫌気処理では優れた結果が示された (Kennedy, K. J. et al 1982)。しかし、担体材料の特性は、嫌気プロセスに影響があると報告された (Hickey, R. F. et al 1991)。清水賢ら (1995) の実験によって固定材料としてよく使われてきたセラミックスは細胞増殖の抑制効果があると言われている。または生分解性のないプラスチックなどを担体材料として使うと環境に負担がかかる。また、固定化担体として用いたアルギン酸やカラギナンなどの天然ポリマは物理と化学的にも弱く、長期間の利用が困難であった。従って、より安全、安価でかつ微生物増殖効率のよい担体材料の開発は重要である。本研究では、安価で長期間利用が可能な天然素材、かつ高

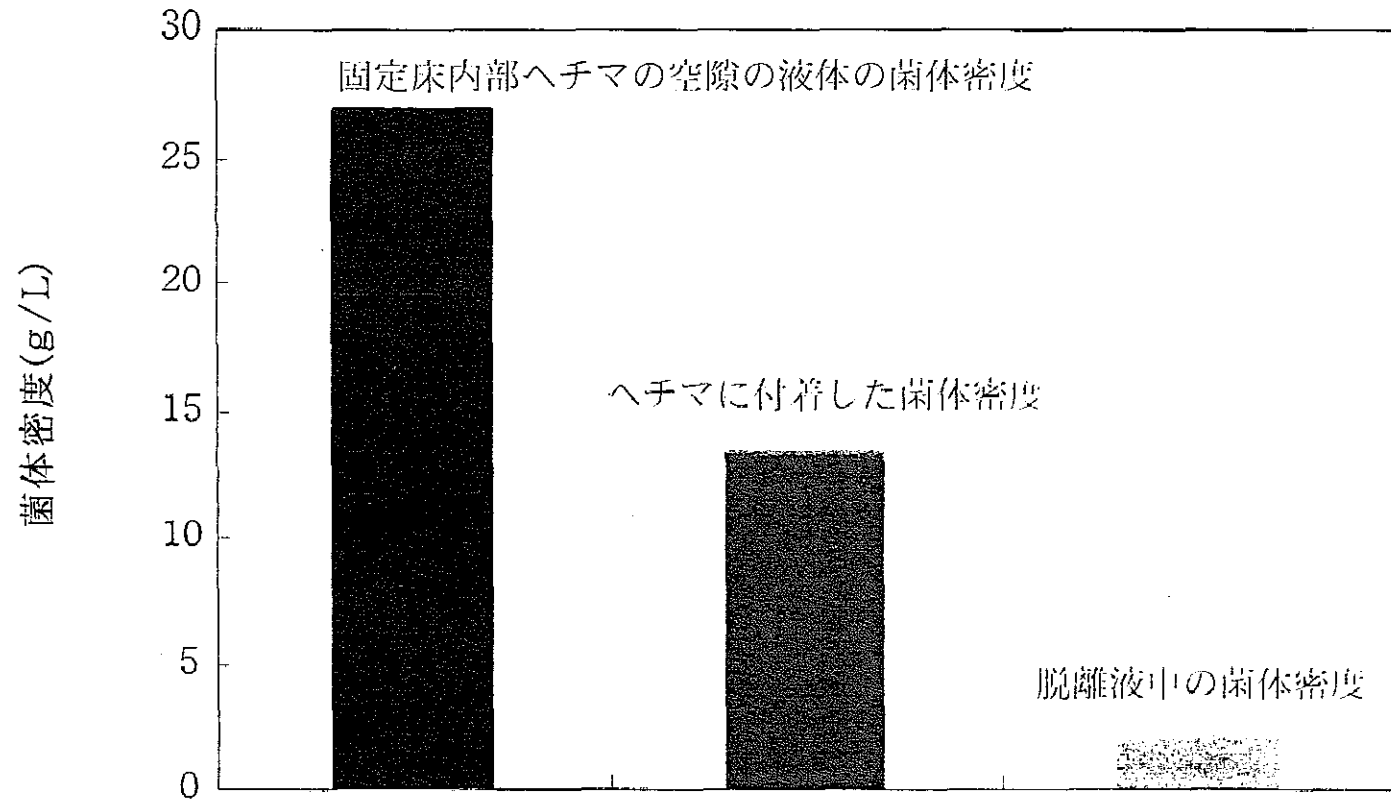


図 5-6. 固定床発酵槽の菌体分布

い間隙率を持つヘチマを担体とする固定床発酵槽を構築し、高濃度菌体培養系の可能性とその固定床リアクターによるビタミン B₁₂ の生産性を検討した。

図 5-6 は固定床におけるメタン菌体の分布図である。固定床メタン発酵槽に存在している菌体は、脱離液に浮遊した菌体、固定床内部の液体に捕集された菌体、固定床のヘチマに付着した菌体など 3 種類の形に存在している。表 5-4 に示したように、固定床内部の液体に捕集された菌体は、ヘチマに付着した菌体密度、固定床発酵槽の脱離液に菌体濃度のそれぞれ約 2 倍、12 倍であった。高濃度の菌体（42.5g dry cell/L-reactor）の保持が可能になった。間隙率の大きいヘチマを担体として、通常担体が目詰まりやすい傾向が避けられ、発酵槽に大量の菌体を維持することによって、固定床内にメタン菌にとって生息し易い環境が備わっていた。また、担体としたヘチマは実験終了までに色は黒くなったが、変形や損壊などが見られず、安全でかつ耐久性にも優れた担体材料と考えられた。

表 5-4. 固定床発酵槽の菌体分布

菌体の分布	菌体密度 (g/L)
固定床内部ヘチマ空隙の液体の菌体密度	26.8
ヘチマに付着した菌体の密度	13.5
脱離液中の菌体密度	2.17

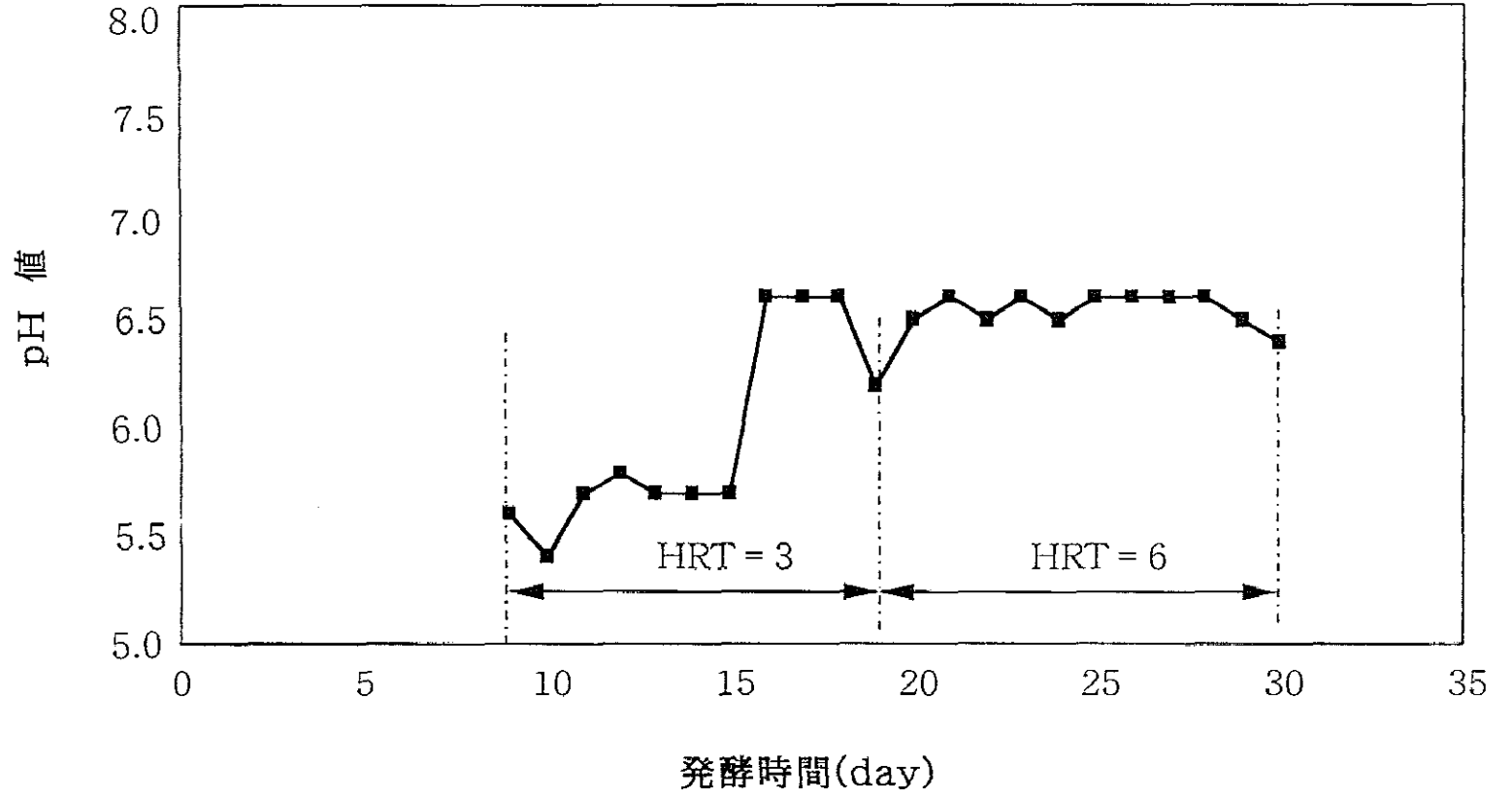


図 5-7. 固定床発酵槽における pH の変化

5-3-5 固定床発酵槽における pH 検討

メタン生成細菌は、ほぼ中性付近の pH 領域を好み、一般に認められているその至適範囲は 6.5~8.2 の間である。メタン生成速度は、上記の至適範囲を外すと急激に減少する。しかし、メタン生成自体は、pH = 6.0 でも継続可能であり、さらに低い pH でも低い速度ながら可能である。ただし、そのような低 pH では重炭酸塩アルカリ度が十分な緩衝能力を果たさず、プロセス全体が非常に不安定になる傾向がある(Speece, R. E. 1996)。本研究は CO₂ と H₂ (20/80、v/v) 混合基質ガスを連続供給による発酵槽の酸性上げ、pH は比較的に低いレベルに続ける傾向が見られた。しかし、それにしてもメタン生成は継続可能であり、安定期に達することができた。図 5-7 による、HRT = 3 day の場合、定常期に達するまでシステムの回復には時間がかかっていたが、pH = 6.6 になると定常期になった。HRT = 6 day の場合、システムは直ちに安定状態になり、それにしてもその時の pH は 6.6 であった。中性よりやや酸性である。付着増殖型システムのメタン生成菌が、浮遊増殖型システムに比べ、バルク溶液中の pH 低下に対してより高い抵抗力を持つことは Matsumoto, A. ら (1992) の報告と一致した結果が得られた。

5-4 まとめ

ヘチマを担体として、CO₂とH₂（20/80、v/v）混合ガスを連続供給基質とするメタン発酵を、最適硫源と微量金属濃度を用い、2.8Lのジャーファーマンタで、メタン菌培養を行った。それより高いメタン菌体密度及びビタミンB₁₂が得られた。本章の結果から以下の知見が得られた。

- 1) 微量金属不足するとシステムが不安定で、微量金属はメタン生成細菌に対して、活性促進作用が明らかになった。本システムに対して、適切な微量金属濃度 10mg/L である。
- 2) 適切な HRT の選択はシステムの安定性、メタン菌の活性、またビタミン B₁₂ の生産に大きな影響があることが明確になった。本研究を調べた結果、HRT = 6 day は最適であることが判った。
- 3) 本固定床発酵槽を用い実験の結果、菌体密度及びビタミン B₁₂ の含量はそれぞれ 42.5 g/L 及び 37.5 mg/L に達した。これらの結果は従来の培養の報告結果と比べ、かなり大きい。ヘチマを担体として発酵槽に充填することで増殖の遅いメタン菌を発酵槽に集積し、より高効率ビタミン B₁₂ 生産の実現が期待できる。
- 4) ヘチマを固定化材料として、基質ガス供給に伴う pH の低下に対して、高い抵抗力を持つことがあった。