

嫌気好気式活性汚泥法における
嫌氣的有機物摂取に関する基礎的研究

佐藤 弘泰

佐藤 弘泰

目次

| | |
|--|----|
| 1 はじめに | 1 |
| 2 緒論 | 2 |
| 2.1 嫌気好気式活性汚泥法とは | 2 |
| 2.2 既往の研究 | 3 |
| 2.3 本研究の目的と焦点 | 5 |
| 3 代謝機構に関する検討 | 7 |
| 3.1 酢酸、プロピオン酸の嫌氣的摂取モデルの比較 | 8 |
| 3.1.1 酢酸の嫌氣的摂取モデル | 8 |
| 3.1.2 プロピオン酸の嫌氣的摂取モデル | 12 |
| 3.1.3 各代謝モデルの比較 | 16 |
| 3.2 乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの摂取機構 | 18 |
| 3.2.1 プロピオン酸発酵の経路 | 18 |
| 3.2.2 乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの嫌氣的摂取時に蓄積される PHA の組成および物質収支 | 21 |
| 3.3 ポリリン酸によらないエネルギー供給機構 | 26 |
| 3.4 まとめ | 28 |
| 4 実験室汚泥による回分式実験 | 30 |
| 4.1 実験の概要 | 30 |
| 4.2 汚泥の馴致方法 | 30 |
| 4.3 回分式実験の方法 | 35 |
| 4.4 結果 | 36 |
| 4.4.1 酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取 | 36 |
| 4.4.2 乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの嫌氣的摂取 | 39 |
| 4.5 考察 | 45 |
| 4.5.1 嫌氣的有機物摂取機構 | 45 |
| 4.5.2 A 系の汚泥でプロピオン酸発酵を行ったのは本当に脱リン菌なのか？ | 57 |
| 4.5.3 3HV 発酵菌と脱リン菌の競合関係 | 58 |
| 4.6 まとめ | 60 |
| 5 バイロットプラントの汚泥による回分式実験 | 62 |
| 5.1 バイロットプラントの概要 | 62 |
| 5.2 回分式実験の方法 | 62 |
| 5.3 各種有機酸の嫌氣的摂取 | 64 |

図表目次

| | | |
|--------|--|----|
| 図 2-1 | 嫌気好気式活性汚泥法と通常の活性汚泥法の違い | 2 |
| 図 2-2 | 嫌気好気式活性汚泥法で観察される上澄水中の有機物およびリン酸の挙動 | 2 |
| 図 2-3 | 脱リン菌の暮らし | 3 |
| 図 2-4 | PHA の構造 | 4 |
| 図 3-1 | acetyl-CoA から PHB までの代謝反応の概略 | 9 |
| 図 3-2 | 酢酸の嫌氣的摂取モデル (Mino モデル) | 11 |
| 図 3-3 | プロピオン酸の嫌氣的摂取モデル | 14 |
| 図 3-4 | 3H2MV の生成過程 (Claisen 縮合型反応を仮定した仮説) | 14 |
| 図 3-5 | [2- ¹⁴ C]プロピオン酸を用いた標識実験の結果。3HV の 1 位と 2 位の炭素が解糖由来だと考え ると説明できる。 | 14 |
| 図 3-6 | 発酵と嫌氣的有機物摂取の比較 | 18 |
| 図 3-7 | コハク酸・プロピオン酸経路によるプロピオン酸発酵 (Gottschalk, 1978 より) | 19 |
| 図 3-8 | アクリル酸経路によるプロピオン酸発酵 (Gottschalk, 1978 より) | 20 |
| 図 3-9 | リンゴ酸からの acetyl-CoA の生成経路 | 23 |
| 図 3-10 | グルコースの嫌氣的摂取モデル (PHA として蓄積される場合。解糖系として EMP 経路が用 いられる場合) | 25 |
| 図 3-11 | グルコースの嫌氣的摂取モデル (グリコーゲンとして蓄積される場合) | 25 |
| 図 3-12 | グリコーゲンを基質とした 3HV 発酵によるエネルギー生産 (解糖が EMP 経路で行われる場 合) | 26 |
| 図 4-1 | 実験室嫌気好気式活性汚泥リアクター | 30 |
| 図 4-2 | A 系の運転記録 | 33 |
| 図 4-3 | B 系の運転記録 | 34 |
| 図 4-4 | A 系の汚泥による酢酸の嫌氣的摂取 (A-HA、嫌気条件 4 時間の後好気条件 3 時間) | 37 |
| 図 4-5 | A 系の汚泥によるプロピオン酸の嫌氣的摂取 (A-HP、嫌気条件 4 時間の後好気条件 3 時間) | 37 |
| 図 4-6 | B 系の汚泥による酢酸の嫌氣的摂取 (B-HA、嫌気条件 6 時間の後好気条件 1.5 時間) | 38 |
| 図 4-7 | B 系の汚泥によるプロピオン酸の嫌氣的摂取 (B-HP、嫌気条件 6 時間の後好気条件 1.5 時間) | 38 |
| 図 4-8 | 乳酸の嫌氣的摂取 | 40 |
| 図 4-9 | ビルビン酸の嫌氣的摂取 | 40 |
| 図 4-10 | リンゴ酸の嫌氣的摂取 | 41 |
| 図 4-11 | コハク酸の嫌氣的摂取 | 41 |
| 図 4-12 | グルコースの嫌氣的摂取 | 42 |
| 図 4-13 | 蓄積された PHA のモル組成 (a) と成分別の量 (b) | 43 |
| 図 4-14 | 嫌氣的有機物摂取に関与する代謝系 | 46 |
| 図 4-15 | 嫌氣的有機物摂取に関与する酸化還元反応およびエネルギー生成・消費反応 | 47 |
| 図 4-16 | acyl-CoA の収支 | 51 |
| 図 4-17 | 水素当量還元力(H)の収支 | 52 |

| | |
|---|----|
| 図 4-18 嫌氣的有機物摂取の際のエネルギー収支・その1 (酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸のについて表 4-9 の(b1)および(g1)を用いた) | 55 |
| 図 4-19 嫌氣的有機物摂取の際のエネルギー収支・その2 (酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸のについて表 4-9 の(b2)および(g2)を用いた) | 56 |
| 図 5-1 UBC バイロットプラントの概要 | 62 |
| 図 5-2 回分式実験におけるサンプリングの方法 | 63 |
| 図 5-3 バイロットプラントの活性汚泥による酢酸、プロピオン酸およびリンゴ酸の嫌氣的摂取 ('94.5.24 に行われた P-HA-3、P-HP-2、P-Mal、P-Blk-3) | 65 |
| 図 5-4 バイロットプラントの活性汚泥による乳酸、ビルビン酸、およびコハク酸の嫌氣的摂取 ('94.5.26 に行われた P-Lac、P-PV、P-Suc、P-Blk-4) | 65 |
| 図 5-5 嫌氣的有機物摂取に伴って蓄積された PHA の組成 (P-HA-3、P-HP-2、P-Mal、P-Blk-3、P-Lac、P-PV、P-Suc、P-Blk-4) | 66 |
| 図 5-6 acyl-CoA の生成・消費に基づく物質収支 | 67 |
| 図 5-7 バイロットプラントの汚泥による嫌氣的有機物摂取時の酸化還元収支 | 70 |
| 図 5-8 バイロットプラントの汚泥による嫌氣的有機物摂取時のエネルギー収支 (解糖が EMP 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応 1 モルあたり 1 モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合) | 70 |
| 図 5-9 バイロットプラント汚泥による嫌気好気実験 (P-HA-4、P-HP-3、P-sewage、P-Blk-5) | 71 |
| 表 2-1 嫌気好気式活性汚泥の蓄積する主な PHA | 5 |
| 表 3-1 酢酸摂取の際の関連代謝物質の理論的化学量論比 (括弧内は酢酸摂取 1 モルあたり) | 12 |
| 表 3-2 プロピオン酸摂取の際の関連代謝物質の理論的化学量論比 (括弧内はプロピオン酸摂取 1 モルあたり) | 16 |
| 表 3-3 酢酸、およびプロピオン酸摂取時の関連代謝物質の変化量 (酢酸・プロピオン酸摂取 1 モルあたり) | 17 |
| 表 3-4 3HV 発酵による酢酸摂取時の化学量論関係 | 28 |
| 表 3-5 3HV 発酵によるプロピオン酸摂取時の化学量論関係 | 28 |
| 表 4-1 A 系の流入水組成 | 32 |
| 表 4-2 B 系の流入水組成 | 32 |
| 表 4-3 実験室汚泥による回分式実験一覧 | 36 |
| 表 4-4 A 系の汚泥による酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取における化学量論関係 | 37 |
| 表 4-5 リン酸の放出を伴わない酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取時の化学量論関係 | 39 |
| 表 4-6 乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの摂取時の関連代謝物質の代謝量 | 43 |
| 表 4-7 嫌氣的有機物摂取時の acyl-CoA の生成量・消費量の比、および PHA に変換された propionyl-CoA と acetyl-CoA の比 (測定値と理論値の比較) | 44 |
| 表 4-8 リンゴ酸の嫌氣的摂取における acetyl-CoA と propionyl-CoA の生成・消費量 | 44 |
| 表 4-9 酸化還元およびエネルギー生成・消費に関する反応量の計算法 | 50 |
| 表 4-10 各酸化還元反応における還元力(H)の生成量 | 51 |
| 表 4-11 オキサロ酢酸生成時のエネルギー収支 | 52 |
| 表 4-12 嫌氣的有機物摂取に関与する反応における高エネルギーリン酸結合の生成・消費量 | 54 |
| 表 4-13 A 系の汚泥による有機物摂取の比較 | 58 |
| 表 4-14 3HV 発酵菌が優占したと思われる汚泥に関する報告 | 60 |
| 表 5-1 バイロットプラントの汚泥を用いて行った回分式実験 | 63 |
| 表 5-2 サンプリング用試験管のサンプル採取量の誤差 | 63 |

| | | |
|-------|--|----|
| 表 5-3 | 各回分式実験における嫌気条件下での関連代謝物質の変動量の概要 | 66 |
| 表 5-4 | パイロットプラント汚泥による有機物摂取のまとめ | 67 |
| 表 5-5 | 酢酸、プロピオン酸の嫌氣的摂取時の関連代謝物質の代謝量（基質摂取 6 モルあたりに換算） | 68 |
| 表 5-6 | プロピオン酸、コハク酸摂取時の <i>propionyl-CoA</i> の生成量と消費量の比較 | 68 |

の生成と消費のバランスが、代謝系全体のエネルギー収支に大きく影響する。特に、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。

本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。

本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。

本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。

本研究では、パイロットプラント汚泥を用いた嫌気消化実験を行い、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支がどのように変化するかを明らかにした。その結果、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、嫌気条件下で容易に代謝され、エネルギーを生産する。一方、長鎖脂肪酸や芳香族化合物などは、代謝に多くのエネルギーを必要とする。したがって、基質の種類や濃度、反応条件などによって、代謝系全体のエネルギー収支は大きく変化する。

1 はじめに

本研究では、嫌気好気式活性汚泥法とよばれる微生物を利用した下廃水の処理技術の原理機構の解明を試みた。微生物学的にみた嫌気好気式活性汚泥法の最大の特徴は、微生物が嫌気条件と好気条件に数時間ごとに交互にさらされ、しかも比較的低濃度の基質（有機物）が嫌気条件下であたえられるところである。この、いわば“嫌気好気条件”は、人類が新たにつくりだした微生物環境である。嫌気好気条件の下では、嫌気条件下で供給される有機物を何らかの方法で摂取・蓄積し、続く好気条件下でそれを酸化分解してエネルギーを獲得するとともに、増殖する生活形態が有利である。このような微生物代謝が存在することは、嫌気好気式活性汚泥法が開発されてはじめて知られるようになった。

嫌気好気式活性汚泥法で生成される汚泥中にはしばしば、嫌気条件下でポリリン酸をエネルギー源として有機物を摂取・蓄積する微生物（この論文では“脱リン菌”と呼ぶことにする）が卓越してくる。脱リン菌は嫌気条件下で消費したポリリン酸を好気条件下で再生する。そのため、嫌気好気式活性汚泥法の処理工程における上澄水中の成分の挙動を追うと、嫌気条件下では有機成分の減少にともなってリン酸が増加し、好気条件下ではリン酸が顕著に減少する。リン酸が十分に減少したところで上澄水と汚泥を分離すれば、生物学的にリン除去が行えることになる。そのため、嫌気好気式活性汚泥法は生物学的リン除去プロセスとも呼ばれる。生物学的リン除去プロセスは、通常の活性汚泥法と比べて汚泥発生量、建設コスト、運転コストなどほとんど変わらず、経済的なリン除去プロセスとして位置づけられている。我が国では平成7年3月現在で全国で9湖沼に関して窒素・リンの削減対策を盛り込んだ第二期の湖沼水質保全計画が策定されており、海域に関しても平成5年10月より排水基準が実施されている。そうした状況の中で、今後嫌気好気式生物学的リン除去法は採用例が増加するものと考えられる。

嫌気好気式活性汚泥法による生物学的リン除去にはいくつか問題が残されている。

まず、脱リン菌が嫌気条件下で有機物を摂取・蓄積するメカニズムが十分に解明されていない。エネルギー的な側面についてはポリリン酸で説明ができるとしても、酸化還元バランスの維持機構については十分な説明がなされていない。酢酸、プロピオン酸といった有機物の場合についてのみ、これらの物質がPHA (poly 3-hydroxyalkanoates) とよばれるポリエステルとして蓄積され、この代謝にはグリコーゲンの解糖による還元力の供給が関与していることが確かめられている。しかし、その他のさまざまな低分子化合物が嫌気条件下で摂取されることが知られているにも関わらず、それらの摂取・蓄積機構は解明されていない。

また、嫌気条件下でのエネルギー源についても不明な点が残されている。松尾ら(1982)、深瀬ら(1985)、Cechら(1990, 1993)など、嫌気条件下での有機物摂取にポリリン酸の加水分解が関与していない場合があることを報告している。嫌気条件下で有機物の摂取・蓄積を行うために、ポリリン酸が必ずしも必要ないということになると、嫌気好気式活性汚泥法が必ずしも脱リン菌の集積に結びつかないことになる。嫌気条件下でのエネルギーの供給機構としてポリリン酸依存のものとポリリン酸に依存しないものがあるようだが、後者の原理機構を解明し、脱リン菌の集積を確実に行うようなプロセスの運転法を見いだしていく必要があるだろう。

この研究では、嫌気好気式活性汚泥中の微生物がどのようにして嫌気条件下でさまざまな有機物を摂取・蓄積するのかエネルギー面および酸化還元収支の面から解明することを目的とした。

2 緒論

2.1 嫌気好気式活性汚泥法とは

嫌気好気式活性汚泥法は 1975 年ごろに南アフリカの Barnard により開発された (Barnard, 1975)。

嫌気好気式活性汚泥法 (図 2-1.a) は通常の活性汚泥法 (図 2-1.b) と異なり、嫌気条件と好気条件を組み合わせた処理工程を持つ。活性汚泥と下廃水はまず、嫌気条件下 (硝酸や亜硝酸も存在しない) で 1~2 時間程度混合され、その後、好気条件下で 3~4 時間程度混合される。ただし、運転条件によって、嫌気時間・好気時間の長さはかなり幅がある。好気条件の次には汚泥と処理水を分離する沈殿池がある。そこで分離された汚泥の大部分は再び嫌気槽に戻され、一部は余剰汚泥として水処理系から引き抜かれて汚泥処理プロセスに送られる。1 章で述べたように通常の活性汚泥法との違いは嫌気条件が処理系に組み込まれているかいないかだけである。

嫌気好気式活性汚泥法での上澄水中の有機物とリン酸の挙動を模式的に示したのが図 2-2 である。嫌気条件下で上澄水中の有機物のほとんどが除去されるとともに、上澄水中のリン酸の濃度が急上昇する。続く好気条件下では上澄水中の残りの有機物が除去されると共に、上澄水中のリン酸が除去される。嫌気条件下で放出されるリン酸の量より好気条件下で吸収されるリン酸の方が多く、結局流入水中のリンのほとんどを除去することが可能である。

このような観察事実を、Spector (1977)、Marais ら (1983)、Comeau ら (1986) など多くの研究者は次のように説明している。

嫌気好気式活性汚泥法では、好気条件下でポリリン酸を蓄積し、嫌気条件下でそのポリリン酸を分解することによりエネルギーを得て有機物を摂取することができる微生物 (ここでは脱リン菌と呼ぶことにする) が活性汚泥中に優占してくる。ここで、通常の好気性細菌と通性好気性細菌、通性嫌気性細菌、および脱リン菌を比較してみる。通常の好気性細菌と通性好気性細菌は

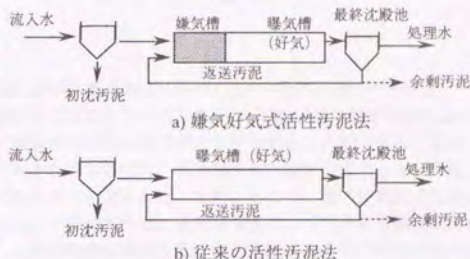


図 2-1 嫌気好気式活性汚泥法と通常の活性汚泥法の違い

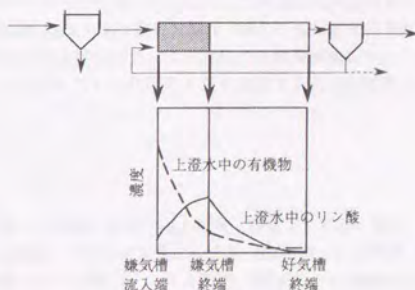


図 2-2 嫌気好気式活性汚泥法で観察される上澄水中の有機物およびリン酸の挙動

嫌気条件下では呼吸ができず、従ってエネルギーを作り出すことができないため、嫌気条件下では有機物摂取を行うことができない。通性嫌気性細菌はグリコーゲンなどの発酵のための有機物源があれば、それを利用してエネルギーを獲得することはできる。しかしながら、その場合、通常の有機酸発酵やアルコール発酵などを行えば発酵生成物の有機酸やアルコールなどを細胞外に排出することになり、結局有機物摂取は嫌気条件下ではできず好気条件になるまで待たなければならない。一方脱リン菌は、嫌気条件下で有機物を摂取するのに必要なエネルギーをポリリン酸を加水分解することにより獲得することができる。そして、脱リン菌は好気条件下では嫌気条件下で蓄積した有機物を酸化分解して、増殖したりポリリン酸の再合成を行って次の嫌気条件への準備をする(図 2-3)。脱リン菌は嫌気条件下で他の細菌より速やかに有機物を摂取・蓄積し、好気条件下で増殖を行うのである。脱リン菌は厳しい生存競争を勝ち抜くために、見事なまでに嫌気好気式活性汚泥法の条件に適応したライフスタイルをもっている。

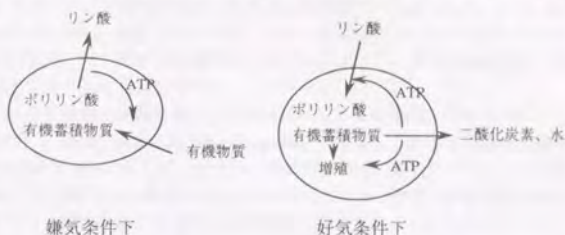


図 2-3 脱リン菌の暮らし

なお、ここで、嫌気好気式活性汚泥法における嫌気条件についてさらに詳しく述べておく。

嫌気好気式活性汚泥法における酸素がないことはもちろんであるが、硝酸、亜硝酸も存在しない。従って、硝酸呼吸、亜硝酸呼吸を含めて呼吸ができない条件だといえることができる。また、微生物は嫌気条件だけでなく好気条件にもさらされるので、絶対嫌気性の微生物はほとんど存在しないか、または存在してもごくわずかであろうと考えられる。実際のところ、嫌気好気式活性汚泥中にはほとんどメタン発酵菌は存在しない。一方池本らは、絶対嫌気性のはずである硫酸還元菌が実際には嫌気好気式活性汚泥中に存在し、その活動が嫌気好気式活性汚泥中の糸状性細菌の増殖に大きく影響を及ぼしていることを報告している(池本ら、1994)。池本らによれば嫌気好気式活性汚泥に嫌気条件下でプロピオン酸を添加したときの硫酸還元速度は 1mgS/gMLSS/h を越える場合もあるがおおむね 0.1mgS/gMLSS/h 程度のオーダーである。それに対して嫌気好気式活性汚泥によるプロピオン酸の摂取速度は最大で 20mgO/gMLSS/h (COD 換算) 程度であり、硫酸還元速度よりはるかに大きい。そこで、硫酸還元菌が嫌気好気式活性汚泥による嫌氣的有機物摂取において何らかの役割を果たしているのは事実としても、行われている代謝の大筋を把握する上で硫酸還元は無視してもよいものと考えられる。

2.2 既往の研究

嫌気条件下で摂取される有機物の種類は多い。松尾・宮の一連の研究(松尾ら、1984; 松尾、宮、1987)によれば、グルコース、低級脂肪酸の酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、iso-酪酸、n-吉草酸、TCA サイクルの有機酸であるコハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサール酸、解糖系の有機酸であるピルビン酸、解糖系周辺の有機酸である乳酸、そして、アミノ酸であるアスパラギン酸、セリン、アラニン、グルタミン酸がよく (MLSS の 5%~10% の重量) 摂取された。一方、蟻酸、クエン酸、3-ケトグルタル酸、メタノール、エタノール、フェニルアラニンは摂取されなかった。多くの種類の有機物が微生物の乾燥重量に対してかなりの量嫌氣的に摂取される。

一方、嫌気条件下で微生物がさまざまな有機物を摂取・蓄積するためには、いくつかの条件を克服する必要がある。摂取のために必要なエネルギーをどのようにして獲得するか、摂取した有機物をどのような形態で蓄積するか、そして、細胞内の酸化還元バランスをどのようにして維持するか、の三点である。

エネルギーの供給機構については、嫌気好気式活性汚泥法が開発された当初から、微生物が蓄積したポリリン酸の加水分解によるのだとされている。このことは、嫌気条件下での有機物の摂取に伴って汚泥から上澄水にリン酸がはきだされることからほぼ推測がつく。嫌氣的有機物摂取時、およびそれに続く好気条件下でのポリリン酸の挙動は、化学的な分析法や (Mino et al., 1985a and 1985b) P^{31} NMR により (Hill et al., 1989) 確認されている。また、Mussig-Zufika ら (1994) はゲルクロマトグラフ法による分析により、リン酸が 100 個ほどつながったポリリン酸が嫌氣的摂取に伴って減少し、好気条件下で増加することを報告している。

一方、嫌気条件下で摂取された有機物の蓄積形態として報告されている物質は、これまでのところグリコーゲン (深瀬ら, 1982) と PHA (poly 3-hydroxyalkanoates) である。これまでの報例を総合すると、一般的な蓄積形態は PHA である。そして、グリコーゲンの蓄積は、馴致にグルコースが利用られ、グルコースが嫌気条件下で摂取された場合に限定されるようである。通常の蓄積形態は PHA であると考えられる。また、アミノ酸類の場合はそのままの形態で蓄積されることもあるようだという報告もある (松尾, 宮 1987; Arun et al., 1989a)。

自然界や活性汚泥中にみられる PHA は、一般に図 2-4 ような構造を持った物質であり (Anderson and Dawes, 1990; Doi, 1990)、活性汚泥中のほか、感潮域などの底質の中にも見いだされる (Findlay et al., 1983, 1985)。R は通常、炭素数 10 程度までの直鎖飽和だが、分岐を含むものや不飽和結合を持つものなども条件によっては生成される (Steinbüchel et al., 1995)。微生物の蓄積する PHA は 3-ヒドロキシ酪酸のホモポリマー (PHB) の場合もあるが、その他の成分も含む場合は通常共重合体である。その組成は微生物の種類により、また、炭素源となる有機物の種類により異なる。炭素源となる有機物を工夫することにより、4-ヒドロキシ酪酸のような 3-ヒドロキシ酸でない成分を含む PHA も蓄積されることがわかってきている (Doi, 1990)。なお、余談になるが、PHA は生物による分解を受ける熱可塑性の高分子 (生物分解性プラスチック) として注目をされており、菌種の改良や培養条件・炭素源の工夫による発酵合成の効率化や共重合体組成の工夫による物性の改良が試みられている。

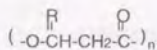


図 2-4 PHA の構造

これまで、通常の活性汚泥に見いだされている PHA は、3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) と 3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) のほか、炭素数 6 (側鎖がプロピル基)、炭素数 7 (側鎖が n-ブチル基) および炭素数 8 (側鎖が n-ペンチル基) のものが報告されている (Wallen and Rohwedder, 1974; Odham et al., 1986)。

嫌気好気式活性汚泥が蓄積する PHA として、当初知られていたのは PHB だけであった。Comeau ら (1987) は嫌気好気式活性汚泥中に 3HB に加えて 3HV が蓄積されることを示したが、著者はさらに 3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸 (3H2MB) と 3-ヒドロキシ-2-メチル吉草酸 (3H2MV) を嫌気好気式活性汚泥中に発見した (Satoh et al., 1992)。3H2MB と 3H2MV は、 α 炭素からメチル側鎖が出ているという点が特徴である。嫌気好気式活性汚泥は、嫌気条件下で酪酸を摂取すると、3HB 主体の PHA を蓄積する。また、プロピオン酸を摂取すると 3HV と 3H2MV を含む PHA を蓄積する。嫌気好気式活性汚泥の蓄積する PHA を表 2-1 に示す。

表 2-1 嫌気好気式活性汚泥の蓄積する主な PHA

| | 3-hydroxybutyrate (3HB) | 3-hydroxyvalerate (3HV) | 3-hydroxy-2-methylbutyrate (3H2MB) | 3-hydroxy-2-methylvalerate (3H2MV) |
|------------|---|---|---|---|
| Free Acid | $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-COOH} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-COOH} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{OH} \text{ CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH-CH}_2\text{-COOH} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{OH} \text{ CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH-CH}_2\text{-COOH} \end{array}$ |
| In PHA | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (-\text{O-CH-CH}_2\text{-CO-}) \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (-\text{O-CH-CH}_2\text{-CO-}) \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_3 \\ \quad \\ (-\text{O-CH-CH-CH}_2\text{-CO-}) \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (-\text{O-CH-CH}_2\text{-CO-}) \end{array}$ |
| Precursors | 2 acetyl-CoA | 1 acetyl-CoA 1 propionyl-CoA | 1 acetyl-CoA 1 propionyl-CoA | 2 propionyl-CoA |

次に、嫌氣的有機物摂取の際には細胞内で酸化還元バランスが維持されなければならない。例えば酢酸を 3HB 主体の PHA に変換する反応は還元力を消費するので、還元力が供給されなければ酢酸の摂取ができなくなってしまう。還元力の供給源として、TCA サイクルによる酢酸の酸化 (Comeau et al., 1986; Wentzel et al., 1986)、グリコーゲンの解糖 (Mino et al., 1987; Arun et al., 1988)、グリオキシル酸経路による酢酸の部分酸化 (Ramey ら、私信)、といった説が出されている。また、嫌氣的に摂取される有機物の種類によっては PHA に変換されるまでに、還元力を消費するのではなくむしろ生成してしまう場合もあると考えられる。余剰の還元力を消費するために、コハク酸・プロピオン酸発酵系路が用いられているという説を著者は提案している。

この問題については次章で詳しく議論する。

2.3 本研究の目的と焦点

これまでに述べたように、嫌気好気式活性汚泥法による有機物除去やリン除去の原理について、いまだに十分な理解がなされていない。そのため嫌気好気式活性汚泥法によるリン除去の原理機構を正確に把握し、プロセスをより有効に運転するために必要な知識が欠落している。

本研究の範囲では、嫌気条件下での微生物による有機物摂取時の酸化還元バランスの維持機構とエネルギーの供給機構の解明に焦点を置いた。脱リン菌が炭素源を獲得するのが主に嫌気条件下であることを考えると、この問題は脱リン菌の代謝特性および生理的特性を理解する上で非常に重要なことである。

実験条件や時間的な制約から、検討の対象とする有機物を低分子の微生物により利用されやすい有機物に絞った。また、実験系として純菌をつり上げてその代謝を検討するというのではなく、混合培養系のまま活性汚泥中の代謝関連物質の挙動を化学的に分析して顕著に生じている代謝を明らかにしようという方針で望んだ。また、混合培養系で活性汚泥を扱う場合でも、実験室で人工下水を用いて馴致した活性汚泥を用いる場合と、パイロットプラントや実規模のプラントで実際の下水処理に用いられている活性汚泥を用いる場合がある。本研究ではまず人工下水で馴致した活性汚泥を用いてさまざまな有機物の嫌氣的摂取の機構にかんしてモデルを提案し、ついでパイロットスケールのプラント (カナダの University of British Columbia のパイロットプラント) の活性汚泥についてモデルがどの程度適用できるか検討を行った。

なお、検討の対象として有機物の種類は酢酸、プロピオン酸、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースに限った。酢酸、プロピオン酸は下水が嫌気条件下におかれると比較的多量に生成することが知られており、また、嫌気好気式活性汚泥にも嫌気条件下で良好に摂取される。一方、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースも嫌気条件下でよく摂取されることが知られているが、下水中にはほとんど存在しない。これらの物質は、次の 3 章で代謝経路の推定を行うが、それに密接に関連する有機物として選択した。

3 章での代謝経路の推定につづいて、4 章では人工下水により馴致された実験室の活性汚泥を用

いて行った代謝機構の検討、そして、5章で実際の下水を処理しているパイロットプラントの汚泥による代謝機構の検証について述べていく。

3 代謝機構に関する検討

この章では、微生物による有機物の分解、無機物の合成、酸化還元反応、窒素の固定と脱窒、リンの固定と溶解、硫酸塩の還元、硫酸の生成と硫酸化、有機物の酸化と有機物の還元について述べていく。細菌による代謝機構の検討は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。この中で、微生物の代謝機構の理解は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。

微生物の代謝機構は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。この中で、微生物の代謝機構の理解は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。

微生物の代謝機構は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。この中で、微生物の代謝機構の理解は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。

微生物の代謝機構は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。この中で、微生物の代謝機構の理解は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。

微生物の代謝機構は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。この中で、微生物の代謝機構の理解は、微生物の代謝機構の理解に不可欠な基礎知識である。

3 代謝機構に関する検討

この章では、嫌気好気式活性汚泥による嫌気条件下での酢酸、プロピオン酸、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの摂取機構について検討する。酢酸およびプロピオン酸の嫌気の摂取については、実際に観察される代謝関連成分の挙動に基づいて、いくつかのモデルが提案されている。3.1 節ではそうしたモデルのうちどのモデルがもっともよく現象を説明しているのか、検討する。

3.1 節の結果を先に述べてしまうと、ポリリン酸の加水分解によるエネルギーの供給系、汚泥内のグリコーゲンの解糖系、および 3HB、3HV、3H2MB、3H2MV を成分とする PHA の蓄積系の、三つの代謝系を組み合わせたモデルにより、酢酸、プロピオン酸の嫌気の摂取をもっともよく説明できることが示された。

つづいて 3.2 節では、3.1 節では乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの嫌気の摂取機構を説明することを試みた。これらの物質の嫌気の摂取機構を説明する際、酢酸、プロピオン酸の嫌気の摂取モデルをもとにして摂取機構を基礎として説明しようという姿勢で臨んだ。嫌気好気条件に生きる微生物にとっては、できるだけ単純な代謝系により、できるだけ多くの種類の有機物を嫌気条件下で摂取することができた方が有利である。そのため、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの嫌気の摂取機構は、多くの部分が酢酸、プロピオン酸の嫌気の摂取機構と共通していると考えるのは、自然なことだろう。

そこで、これらの物質は、酢酸、プロピオン酸の嫌気の摂取機構に基づいて考えると、グリコーゲンと同様にして acetyl-CoA をへて PHA になると予想できる。しかし、この場合、実際には還元力が過剰に生成することになってしまう。そこで、過剰に生成された還元力を消費するような代謝が行われると予想できる。過剰な還元力を消費する代謝は、エネルギーが豊富な条件下では、タンパク質や核酸の合成など、非常に多くの可能性が考えられる。しかし、嫌気の有機物摂取は利用可能なエネルギー量の限られた条件下での代謝であるから、タンパク質、核酸の合成などが行われる可能性は全くないとはいえないだろうが、主要な余剰還元力の消費機構であるとは考えにくい。一方、過剰な還元力を消費するような代謝は、多くの嫌気性発酵においても行われる。しかし、この場合には通常は最終生成物を細胞外に放出してしまうので、嫌気好気条件での代謝としてはつづく好気条件下では有用な炭素源となるものを損失してしまうことになる。ところがここでもし、嫌気性発酵の最終生成物を PHA として蓄積することができればその損失を避けることができる。嫌気性発酵の最終生成物で容易に PHA に取り込まれる可能性があるのは酢酸の他に、プロピオン酸と酪酸が考えられる (Doi, 1990)。好気条件下で活発に活動する細菌で酪酸発酵を行うものはあまり知られていないので、そこで、過剰に生成された還元力を消費するための代謝系として、多くの通性、あるいは偏性の嫌気性細菌の行うプロピオン酸発酵系が関与していると考えた。この場合には、代謝の過程で生成した中間体の一部をプロピオン酸経路で propionyl-CoA とすることにより、過剰の還元力を消費でき、また、propionyl-CoA は PHA に変換して蓄積することができる。

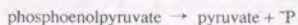
次いで 3.3 節では、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの嫌気の摂取モデルと同じ代謝経路を用いて、グリコーゲンを PHA、特に 3HV に変換することによりエネルギーを取り出すことが可能なことを述べる。このエネルギー生成代謝、いわば“3HV 発酵”は、ポリリン酸によらない嫌気条件下でのエネルギー生成機構である。ポリリン酸の消費を伴わない嫌気の有機物摂取

の観察例が少数ながら報告されている(60ページの表 4-14参照)が、3HV 発酵によるエネルギー生成を行う微生物が実際に存在するとすると、そのようなポリリン酸に依存しない嫌氣的有機物摂取を説明することができる。

なお、本章での検討の下地となる生化学反応は、Gottschalk の"Bacterial Metabolism, 2nd edition"と日本生化学会編の"代謝マップ"に基づいており、本文中では引用はいちいち示さない。

また、本章では還元力のキャリアー、及び高エネルギーリン酸結合を次のように示すことにする。

- 還元力のキャリアーとして NADH や NADPH が知られているが、嫌氣的有機物摂取において関与するのがどちらなのかいまのところ不明である。ここでは還元力を水素当量の(H)で表すことにする。
- 高エネルギーリン酸結合を表す記号として、"-P"を用いる。例えばホスホエノールビルビン酸からビルビン酸が生成される場合は次のように表す。



また、acetyl-CoA と propionyl-CoA が同時に生成される場合、そこから生成される PHA の成分を正確に予測することはできない。例えば、等モル量の acetyl-CoA と propionyl-CoA が生成される場合は恐らく 3HV が主体の PHA が生成されるのだろうが、酵素(thioketolase)の基質特異性がルースなために副成物として 3HB、3H2MB、3H2MV といった成分も PHA に含まれてくる。しかし、本章では典型的なモデルとして現象を記述するために、そして表記を簡単にするために、あえてこのような場合も"3HV"が蓄積されるという表現をした。

3.1 酢酸、プロピオン酸の嫌氣的摂取モデルの比較

酢酸、プロピオン酸の嫌氣的摂取については既にいくつかのモデルが提案されている。いずれのモデルでもこれらの物質は摂取された後 PHA として蓄積される。酢酸、プロピオン酸が PHA になる反応は還元反応であり、そのため還元力を消費する。モデル間の違いは還元力の供給機構である。

この節では既知の生化学的知見に基づいて、既に提案されている代謝モデルをレビューする。

3.1.1 酢酸の嫌氣的摂取モデル

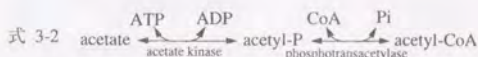
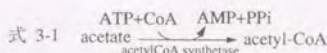
酢酸は下水中にもっとも多く存在する低分子有機化合物である。下水の嫌氣的な分解に伴って生成され、また、脱リン活性を持つ嫌気好気活性汚泥にもよく利用されることもあって、酢酸の嫌氣的摂取機構が当初から注目された。

嫌気条件下での酢酸の摂取に必要なエネルギー源についてはポリリン酸で説明できる。しかしながら、酢酸を摂取して acetyl-CoA とするまでに必要なエネルギーがどの程度かは、pH などの環境条件や、用いられる酵素系により異なる。一方、酢酸を 3HB に変換する反応は還元力を消費する。その還元力の供給源は、いくつか考えられる可能性がある。この節の前半では酢酸を acetyl-CoA に変換するまでのエネルギー的側面に注目し、後半で還元力の供給源に注目して議論を進める。

A) 酢酸を acetyl-CoA にするために必要なエネルギー量

細胞外の酢酸を細胞内へ輸送するために必要なエネルギーは pH によって異なり、0-0.5 モル-P/モル酢酸ということである(Smolders, 1994)。

一方、細胞内に取り込んだ酢酸を acetyl-CoA に変換する主要な経路として、次の 2 通りが知られている。



動植物など高等生物は acetyl-CoA synthetase により acetyl-CoA を合成する。また、*E. coli* など多くの細菌もこの経路を用いる。一方 acetate kinase を用いる式 3-2 の経路はもっぱら細菌により用いられる。acetyl-CoA synthetase による acetyl-CoA の生成では消費される高エネルギーリン酸結合が 2 モル-P/モル酢酸であるのに対し、acetate kinase の場合には 1 モル-P/モル酢酸である。

acetyl-CoA synthetase と acetate kinase のどちらの酵素系が酢酸の摂取に有利であるか、一概には言えない。エネルギーの消費量からみると、acetate kinase の方が有利である。しかし、酢酸を acetyl-CoA に変換する反応が消費するエネルギー (pH7.0 で $\Delta G' = -7.5 \text{ kcal/mol}$) は ATP を ADP にすることにより得られるエネルギーとほとんど同じレベル (pH7.0 で $\Delta G' = -7.3 \text{ kcal/mol}$) なので、酢酸と acetyl-CoA の濃度差によっては acetyl-CoA synthetase の方が有利な場合も有り得る。

嫌気好気活性汚泥法の嫌気槽での有機物摂取に関していえば、どちらの場合もあり得ると考えられる。流入水が人工下水で酢酸を多量に含む場合、あるいは流入下水を発酵させて有機酸を増やしてから嫌気槽に導く場合には、酢酸の濃度が高いので acetate kinase 系 (式 3-2) の方が有利かもしれない。逆に、流入下水の発酵が嫌気槽で起こる場合、酢酸の濃度はそれほど高くならないであろうから、acetyl-CoA synthetase による酢酸の摂取の方が有利かもしれない。

以上まとめると、細胞内に取り込んだ酢酸を acetyl-CoA とするために必要なエネルギーは 1 モル-P/モル酢酸 (acetate kinase の場合) の場合と 2 モル-P/モル酢酸の場合がある。あとで 3.1.3 述べるように多くの研究者による実験結果と比較するとこの値は通常 1 モル-P/モル酢酸のようである。

B) acetyl-CoA を 3HB に変換するために必要な還元力の供給機構

acetyl-CoA が 3HB に変換される反応は還元反応であり、還元力を消費する。好気条件下で *Alcaligenes eutrophus* など多くの細菌が acetyl-CoA から PHB を合成するときの代謝経路は図 3-1 のようになっており、還元力は NADPH により供給される。そして、さらに還元力のもとをたどると、ペントースリン酸経路での解糖による NADPH の生成や、あるいは acetyl-CoA を TCA サイクルにより分解する際に生成された NADH に由来すると考えられる。この還元力の供給源が議論された。

これまでに提案されている還元力の供給機構には次のようなものがある。

- (1) TCA サイクルによる acetyl-CoA の酸化 (Comeau et al., 1986; Wentzel et al., 1986)
- (2) Entner-Doudoroff 経路 (ED 経路) または Embden-Meyerhof-Parnas 経路 (EMP 経路) によるグリコーゲンの解糖 (Mino et al., 1987; Arun et al., 1988)
- (3) グリコーゲンの解糖 (ペントースリン酸経路)
- (4) グリオキシル酸経路による acetyl-CoA の部分酸化

以下、それぞれの場合について詳しく検討を行っていく。

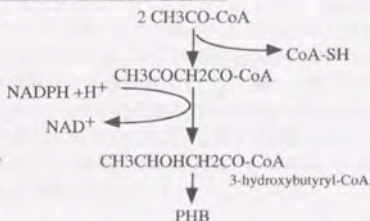


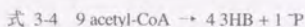
図 3-1 acetyl-CoA から PHB までの代謝反応の概略

(1) TCA サイクル

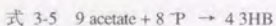
TCA サイクルによる acetyl-CoA の酸化では、結局次のように 1 モルの acetyl-CoA から水素当量として 8 モルの還元力が生成される。また、1 モルの GDP がリン酸化されて GTP になる。



ここで生じる還元力により PHB が合成されるとすると、9 モルの acetyl-CoA から 4 モルの 3HB が生成されることになる。



従って、酢酸摂取の式は次式のようになる。



すなわち、9 モルの酢酸が摂取されるときに 4 モルの 3HB が蓄積され、そして 8 モルの高エネルギーリン酸結合が不足することになる。

しかし、嫌気条件下で TCA サイクルにより酢酸から還元力を得ることは、実際には難しいと考えられている。TCA サイクルにおける還元力の生成は、イソクエン酸が 2-オキソグルタル酸になる反応 (isocitrate dehydrogenase)、2-オキソグルタル酸が succinyl-CoA になる反応 (2-oxoglutarate dehydrogenase)、コハク酸がフマル酸になる反応 (succinate dehydrogenase)、そしてリンゴ酸がオキサロ酢酸になる反応 (malate dehydrogenase) の 4 カ所である。これらの反応のうち、3 カ所 (isocitrate dehydrogenase、2-oxoglutarate dehydrogenase、malate dehydrogenase) では、基質の酸化反応にともなって NAD が還元されて NADH₂ となる。NAD/NADH 系の E_0' は -0.32V、acetoacetyl-CoA/3-hydroxybutyryl-CoA 系の E_0' は -0.24V なので、生成された NADH は容易に 3-oxoacetyl-CoA を還元して 3-hydroxyacetyl-CoA とすることによりもとの NAD にもどる (あるいは、NADH がいったん NADP に還元力を移し、NADPH が 3-oxoacetyl-CoA を還元するのかもしれない)。しかし、succinate dehydrogenase がコハク酸をフマル酸にする反応では、フマル酸/コハク酸系の E_0' が 0.03V であるため、NAD を還元することができない。タンパク質結合型の FAD については FAD-protein/FADH₂-protein 系の E_0' が約 -0.06V なので、NAD ではなくタンパク質結合の FAD が補因子として働く。酸化還元電位から見て、還元された FADH₂ が acetoacetyl-CoA を還元する反応は通常の条件では進みそうにない。

なお、Bordacs ら (1987) は放射性炭素で標識された酢酸の嫌気の摂取課程に関する実験を行っている。彼らの結果によると、嫌気条件下では二酸化炭素中に放射能があらわれない。これは、TCA サイクルが嫌氣的酢酸摂取の際に働かなかったためだと解釈できるだろう。

(2) グリコーゲンの解糖 (ED 経路、または EMP 経路)

Mino らは酢酸の嫌氣的摂取の際に汚泥中の多糖類が顕著に消費されることを発見し、還元力はグリコーゲンの解糖により供給されるという説を発表した。そして解糖系として EMP 経路を仮定し、また酢酸摂取に必要なエネルギーを 1 モル-P/モル酢酸と仮定して、図 3-2 にしめすような代謝モデルを発表した。このモデルでは、結局式 3-6 に示すように、6 モルの酢酸が摂取されるとき、1 モルのグリコーゲンが消費され、4 モルの 3HB が生成され。また、解糖における基質レベルのリン酸化の寄与で、高エネルギーリン酸結合の不足は 3 となる。足りないエネルギーはポリリン酸の加水分解により供給される。

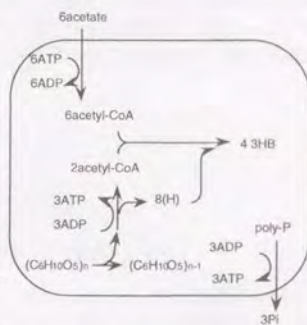
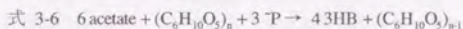
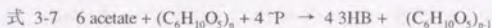


図 3-2 酢酸の嫌氣的摂取モデル (Mino モデル)



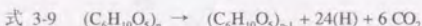
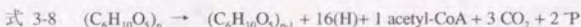
エネルギーの生成量、消費量を見れば、式 3-6 の反応式自体は EMP 経路でも ED 経路でも結局同じである。しかし、ED 経路より EMP 経路の方が解糖における ATP の生成量が多いため、エネルギーの収支には違いが出る。解糖系として ED 経路が用いられる場合の基質摂取の式は次のようになる。



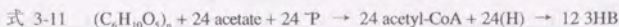
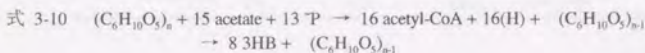
(3) グリコーゲンの解糖 (ペントースリン酸経路)

ペントースリン酸経路による解糖は、主として増殖に必要な還元力 (NADPH) を供給することにあるとされている。嫌気好気条件下では、微生物の増殖はほとんど好気条件下で起こると考えられるので、ペントースリン酸経路が働くのは好気条件下であると予想することもできるが、嫌気条件下で働かないという保証はないだろう。また、ペントースリン酸経路による解糖で生成される還元力は、ほとんど NADPH である。このことは、acetoacetyl-CoA を 3-hydroxybutyryl-CoA に還元するための還元力が NADPH により供給されるという知見と一致している。

ペントースリン酸経路では、経路の用いかたによって、次のようにグリコーゲン 1 モルが部分酸化されて acetyl-CoA が 1 モル生成される場合とグルコースが全酸化される場合がある。

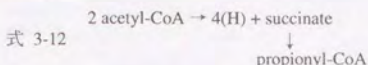


それぞれの場合について嫌氣的酢酸摂取の式をたてると、次のようになる。

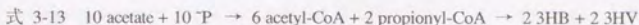


(4) グリオキシル酸サイクルによる acetyl-CoA の部分酸化

もう一つ提案されているモデルは、酢酸の一部がグリオキシル酸サイクルにより酸化されて還元力を供給するというものである。この場合、結局 2 分子の酢酸から 1 分子のコハク酸と 4 分子の還元力(H)が生成することになる。生成したコハク酸は結局 propionyl-CoA に変換され、PHA に組み込まれる。



この時の酢酸の摂取は結局次のようになる。



すなわち、10 モルの酢酸が摂取されるときに、2 モルの 3HB と 2 モルの 3HV が蓄積される。

酢酸を基質として好気条件下で生育する菌の多くがグリオキシル酸サイクルを出発点として生成を行う。嫌氣的に酢酸を摂取して PHB を蓄積する菌も、好気条件下では PHB を acetyl-CoA に変換し、グリオキシル酸サイクルにより生成を行うと考えられる。理論的には嫌気条件下でも進行しうる代謝であり、酵素自体も脱リン菌に備わっていても不思議ではないので、あり得ない代謝様式ではないかもしれない。

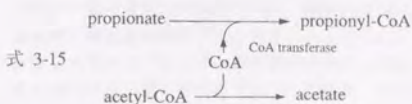
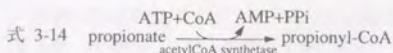
以上で述べてきたモデルでの酢酸の摂取量、グリコーゲンの解糖量、PHA の蓄積量とその組成、および不足するエネルギー量を表 3-1 に示す。なお、表 3-1 において不足するエネルギー（酢酸の摂取・蓄積に伴って消費されるエネルギー）は、通常の場合ポリリン酸の加水分解によりまかなわれることになる。

表 3-1 酢酸摂取の際の関連代謝物質の理論的化学量論比（括弧内は酢酸摂取 1 モルあたり）

| 還元力の供給機構 | 酢酸摂取量 | グリコーゲン消費量 | PHA蓄積量 | PHAの組成 | 不足エネルギー量 |
|-----------------------------|-----------|-------------|-------------|------------------|--------------|
| TCAサイクル | 9 (1) | 0 (0) | 4 (0.44) | 3HBのみ | 8 (0.89) |
| 解糖 (EMP経路) | 6 (1) | 1 (0.17) | 4 (0.67) | 3HBのみ | 3 (0.5) |
| 解糖 (ED経路) | 6 (1) | 1 (0.17) | 4 (0.67) | 3HBのみ | 4 (0.67) |
| 解糖 (ペントースリン酸 経路、部分酸化) | 15 (1) | 1 (0.07) | 8 (0.53) | 3HBのみ | 13 (0.87) |
| 解糖 (ペントースリン酸 経路、全酸化) | 24 (1) | 1 (0.04) | 12 (0.5) | 3HBのみ | 24 (1) |
| グリオキシル酸経路 | 10 (1) | 0 (0) | 4 (0.4) | 等モル量の 3HBと3HV | 10 (1) |

3.1.2 プロピオン酸の嫌氣的摂取モデル

細胞内に取り込んだプロピオン酸を propionyl-CoA に変換する反応は、acetyl-CoA synthetase による場合と CoA transferase による場合が知られている。

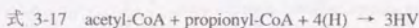
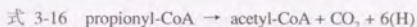


acetate kinase に相当するような酵素 (propionate kinase) は知られていない。

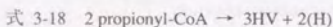
acetate synthetase による場合は前述のように高エネルギーリン酸結合が2つ消費されるが、CoA transferase による場合には1つですむことも有り得る。3.1.3で述べるように、酢酸の場合と同様プロピオン酸1モルを propionyl-CoA に変換するために必要なエネルギーは通常1モル-P/モルプロピオン酸であると考えられる。

蓄積形態や酸化還元バランスからみたプロピオン酸の嫌氣的摂取機構は、酢酸の場合に比べてさらに未解明な部分が多い。Comeau ら (1987) はプロピオン酸を摂取した汚泥が3HVを蓄積していたという報告をしたが、プロピオン酸からどのように3HVが生成されるのか、説明されなかった。ここで、プロピオン酸から3HVが生成される経路を考えると、次の二通りがある。

一つめは propionyl-CoA の一部が酸化されて二酸化炭素と acetyl-CoA となり、acetyl-CoA が propionyl-CoA と縮合したという可能性である。この場合、次のような反応が行われることになる。



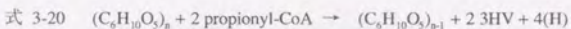
結局、これらをまとめると次式のように還元力があまってしまう。



もう一つの説明は、acetyl-CoA が解糖により供給されるという考え方である。



この式と式 3-17より、この場合にもやはり還元力が過剰に生成されてしまう。



もしも、propionyl-CoA 二分子が縮合、還元されて PHA の構成成分ができるならば、このように過剰に生じた還元力を消費して細胞内の酸化還元バランスを保つことができる。

この代謝機構の真偽はともかく、蓄積される PHA に 3H2MV という新しい構成単位が含まれるのは確かである。そこで、3H2MV の存在を考慮しつつ、酢酸の場合と同様にプロピオン酸の摂取機構を考えていく。

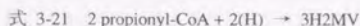
プロピオン酸の場合、PHA 生成のための還元力の供給機構は次のものが考えられる。

- (1) propionyl-CoA を acetyl-CoA にまで酸化。
- (2) (1) で生成された acetyl-CoA をさらに TCA サイクル、またはグリオキシル酸経路で酸化。
- (3) EMP 経路、または ED 経路によるグリコーゲンの解糖。
- (4) ペントースリン酸経路によるグリコーゲンの解糖。

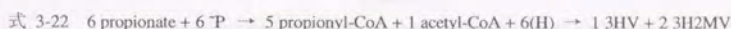
以下に、それぞれの可能性について議論を行う。

(1) propionyl-CoA を acetyl-CoA にまで酸化して還元力を得る場合

この場合には、式 3-16、式 3-17 に次の反応式を組み合わせればよい。



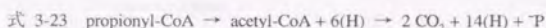
このとき、全体の反応式は次のようになる。



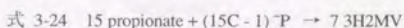
(2) (1) で生成された acetyl-CoA をさらに TCA サイクルまたはグリオキシル酸経路で酸化する場合

この場合、生成された acetyl-CoA がすべて二酸化炭素となるか、あるいはコハク酸経路で propionyl-CoA に戻されることになる。

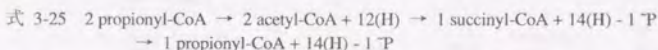
TCA サイクルが働く場合は次のようになる。



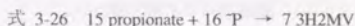
従って、プロピオン酸から PHA が生成されるまでは次のようになる。



一方、グリオキシル酸経路が働く場合は次のように還元力が生成される。



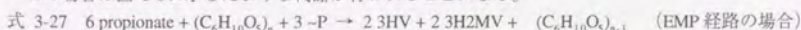
従って、プロピオン酸から PHA が生成されるまでは次式のようにになる。



これら二つの還元力の供給機構を比べた場合、エネルギー的にみれば TCA サイクルの方が有利だが、TCA サイクルに関しては酢酸の項で議論したとおり、succinate dehydrogenase の再生が問題である。また、いずれの供給機構がとられる場合でも、恐らく生成される acetyl-CoA の全てがさらに酸化分解されるのではなく、一部は propionyl-CoA と縮合して 3HV になると思われる。

(3) EMP 経路または ED 経路によるグリコーゲンの解糖

この場合は図 3-3 に示したような代謝が行われることになる。



式 3-28 $6 \text{ propionate} + (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n + 4 -\text{P} \rightarrow 2 \text{ 3HV} + 2 \text{ 3H2MV} + (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_{n-1}$ (ED 経路の場合)

(4) ペントースリン酸経路による解糖

ペントースリン酸経路により還元力が供給される場合は、酢酸の場合と同様に考えることができる。

式 3-29 $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n + 15 \text{ propionate} + 13 \text{ P} \rightarrow 15 \text{ propionyl-CoA} + 1 \text{ acetyl-CoA} + 16(\text{H}) + (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_{n-1}$
 $\rightarrow 1 \text{ 3HV} + 7 \text{ 3H2MV} + (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_{n-1}$ (グリコーゲンが部分酸化される場合)

式 3-30 $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n + 24 \text{ propionate} + 24 \text{ P} \rightarrow 24 \text{ propionyl-CoA} + 24(\text{H}) + (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_{n-1}$
 $\rightarrow 12 \text{ 3H2MV} + (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_{n-1}$ (グリコーゲンが全酸化される場合)

以上の考察をまとめると、表 3-2 のようになる。表 3-2 中の不足エネルギー量は、通常はポリリン酸の加水分解によりまかなわれることになる。

表 3-2 プロピオン酸摂取の際の関連代謝物質の理論的化学量論比 (括弧内はプロピオン酸摂取 1 モルあたり)

| 還元力の供給機構 | プロピオン酸 摂取量 | グリコーゲン消費量 | PHA蓄積量 | PHAの組成 3HV : 3H2MV | 不足エネルギー量 |
|--|---------------|-------------|-------------|-----------------------|--------------|
| propionyl-CoA \rightarrow acetyl-CoA | 6 (1) | 0 (0) | 3 (0.5) | 1:2 | 6 (1) |
| propionyl-CoA \rightarrow acetyl-CoA \rightarrow TCAサイクル | 15 (1) | (0) | 7 (0.47) | 3H2MVのみ | 14 (0.93) |
| propionyl-CoA \rightarrow acetyl-CoA \rightarrow グリオキシル酸経路 | (1) | (0) | (0.47) | 3H2MVのみ | 16 (1.07) |
| 解糖 (EMP経路) | 6 (1) | 1 (0.17) | 4 (0.67) | 1:1 | 3 (0.5) |
| 解糖 (ED経路) | 6 (1) | 1 (0.17) | 4 (0.67) | 1:1 | 4 (0.67) |
| 解糖 (ペントースリン酸 経路、部分酸化) | 24 (1) | 1 (0.04) | 12 (0.5) | 1:7 | 13 (0.87) |
| 解糖 (ペントースリン酸 経路、全酸化) | 24 (1) | 1 (0.04) | 12 (0.5) | 3H2MVのみ | 24 (1) |

3.1.3 各代謝モデルの比較

酢酸、プロピオン酸、ともにいくつかの還元力の供給源が考えられた。それぞれの場合で共通なのは、EMP 経路、ED 経路、またはペントースリン酸経路による解糖により還元力が供給される場合である。また、酢酸については TCA サイクルによる酸化分解やグリオキシル酸経路による部分酸化の可能性が、そして、プロピオン酸に関しては酸化して acetyl-CoA として代謝する経路が考えられた。プロピオン酸から生成した acetyl-CoA は、TCA サイクルやグリオキシル酸経路でさらに代謝されるという可能性もなくはないが、恐らくその前に propionyl-CoA と縮合されて PHA に変換されるであろう。

これら還元力供給機構のうち、もっとも融通がきくのは解糖による還元力供給機構だろう。酢酸摂取のために必要な還元力をグリオキシル酸経路に頼っている細菌が仮に存在するとすると、そのような細菌はプロピオン酸の摂取はできないか、または、propionyl-CoA を acetyl-CoA に酸化する代謝系を持っていないか。逆に、プロピオン酸の摂取のための還元力を propionyl-CoA の acetyl-CoA への酸化に頼っている細菌が存在するとすると、そのような細菌は酢酸摂取の時の還元力の供給法に問題が生じてしまう。一方、還元力を解糖により供給する方法なら、酢酸の場合にもプロピオン酸の場合にも対応できる。こうしたことから、還元力の供給源としてグリコーゲンの解糖が重要なことが予想できる。

表 3-3 に既往の文献にあった酢酸およびプロピオン酸摂取時の関連代謝物質の変化量をまとめた。ほとんどの報告で、酢酸、またはプロピオン酸の摂取に伴って顕著な量の解糖が起きたことが確認できる。

表 3-3 に既往の文献にあった酢酸およびプロピオン酸摂取時の関連代謝物質の変化量をまとめた。ほとんどの報告で、酢酸、またはプロピオン酸の摂取に伴って顕著な量の解糖が起きたことが確認できる。

3.1.1 および 3.1.2 で議論したように、酢酸・プロピオン酸の摂取代謝モデルにおいて基質摂取 1 モルあたりの解糖量が一番大きいのは、グリコーゲンの EMP 経路または ED 経路による解糖の場合である。この時、基質摂取 1 モルあたり 0.17 モルである。表 3-3 の実測値のほとんどがこの値に非常に近い値、またはそれ以上になったということから、EMP 経路または ED 経路による解糖が酢酸・プロピオン酸の摂取の際の還元力のもっとも主要な供給源だと判断できる。また、プロピオン酸の嫌氣的摂取について著者が得た結果は、消費された汚泥内炭水化物の量の高蓄積された PHA の組成についても図 3-3 に示したモデルと非常に近い結果であった。このことも、グリコーゲンの EMP 経路または ED 経路による解糖が主要な還元力の供給源になっていることを示している。

一方、酢酸またはプロピオン酸を acetyl-CoA または propionyl-CoA に変換するために必要なエネルギー量は、酢酸・プロピオン酸の摂取に伴って放出されるリン酸の量から判断できる。EMP 経路、または ED 経路によるグリコーゲンの解糖により還元力が供給される場合に不足する高エネルギーリン酸結合の量は、表 3-1 および表 3-2 に示した。それによると細胞内に取り込んだ酢酸・プロピオン酸を acetyl-CoA、propionyl-CoA に変換するために必要な高エネルギーリン酸結合が 1 モル-P/モルの場合 (acetate kinase と phosphotransacetylase、および CoA transferase が関与する場合) は 0.5 モル以上高エネルギーリン酸結合が不足するはずである。不足した高エネルギーリン酸結合はポリリン酸の加水分解によりまかなわれるので 0.5 モル以上のリン酸が上澄水に放出されるはずである。一方、2 モル-P/モルの場合 (acetyl-CoA synthetase が関与する場合) に不足する高エネルギーリン酸結合の量を計算すると、基質摂取 1 モルあたり 1.5 モル以上となる。つまり、この場合 1.5 モル以上のリン酸が上澄水に放出されるはずである。表 3-3 で実際に報告された結果と比べると、実測されたリ

表 3-3 酢酸、およびプロピオン酸摂取時の関連代謝物質の変化量 (酢酸・プロピオン酸摂取 1 モルあたり)

| Substrate | Carbohydrates Consumed | PHA Accumulated | Composition of accumulated PHA | Phosphate Released | Source |
|-----------|------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| | | | mmol / mmol substrate uptake | | |
| HAc | 0.30 | | | 0.58 | from Arun et al. (1988) |
| HAc | 0.20 | | | 0.78 | from Arun et al. (1988) |
| HAc | 0.31 | | | 0.58 | from Arun et al. (1988) |
| HAc | 0.02 | | | 0.42 | from Arun et al. (1988) |
| HAc | 0.34 | | | 0.78 | from Mino et al. (1987) |
| HAc | 0.33 | | | 0.29 | from Mino et al. (1987) |
| HAc | 0.20 | 0.65 | 88% 3HB, 10% 3HV | 0.87 | from Satoh et al. (1992) |
| HAc | | 0.60 | 3HB | 0.5 - 1.5 | from Smolders et al. (1993) |
| HPy | 0.13 | | | 1.21 | from Arun et al. (1989) |
| HPy | 0.25 | | | 1.74 | from Arun et al. (1989) |
| HPy | 0.18 | 0.67 | 46% 3HV, 48% 3H2MV | 0.98 | from Satoh et al. (1992) |

ン酸の放出量はほとんどの場合 1.5 モル以下であった。このことから、酢酸、プロピオン酸を acetyl-CoA、propionyl-CoA に変換するために必要な高エネルギーリン酸結合が 1 モル-P/モルであると判断できる。

なお、放出されるリン酸の量からグリコーゲンの解糖において EMP 経路、ED 経路のどちらが関与しているか、放出されるリン酸の量から判断できる可能性もなくはないが、ここであげられているデータから EMP 経路か ED 経路のどちらの解糖系が働いているのか判断するのは難しい。

3.2 乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの摂取機構

この節では前節で議論した酢酸およびプロピオン酸の嫌気的摂取モデルをもとに、そのモデルを改良することにより、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、及びグルコースの摂取機構を説明することを試みる。

前節で議論したように、酢酸、およびプロピオン酸の摂取の場合にはグリコーゲンの解糖により還元力が供給されることはほぼ確実である。一方、ここで議論する物質のうち、乳酸やビルビン酸、グルコースの場合は acetyl-CoA を経て PHA に変換されると考えると、それだけでは還元力が過剰になってしまう。これまでに知られている嫌気性発酵では過剰に生成された還元力のはけ口として、乳酸の生成、アルコールの生成、揮発性脂肪酸の生成といった代謝が行われる。しかし、これでは発酵生成物を細胞外に排出してしまうので、嫌気条件の後に好気条件が続く嫌気好気式活性汚泥法では大切なエネルギー源を無駄にしてしまうことになる(図 3-6)。そこで、本章の冒頭で述べたように、余剰の還元力をプロピオン酸発酵により処理し、生成した propionyl-CoA をプロピオン酸にしないで PHA として蓄積するようにすれば、そのような無駄を避けることができる。そこで、ここでは余剰の還元力を吸収するためにプロピオン酸発酵の経路が働くことと仮定をして以下の議論を行っていく。

なお、以下で述べる議論では、本来、プロピオン酸発酵を行う細菌と PHA を蓄積する細菌が同一ではないという可能性も考慮しておかなければいけない。プロピオン酸発酵菌と PHA 蓄積菌の共存の可能性については 4 章であらためて議論する。

3.2.1 プロピオン酸発酵の経路

プロピオン酸発酵の経路として、大きく分けて二つが知られている。すなわち、コハク酸・プロピオン酸経路とアクリル酸経路である。いずれも乳酸やビルビン酸が出発物質となる。

コハク酸・プロピオン酸発酵(図 3-7)では、乳酸が酸化されてビルビン酸となり、炭酸付加されてオキサロ酢酸となる。TCA サイクルを逆行してフマル酸となり、さらにコハク酸、methylmalonyl-CoA などを経て propionyl-CoA が生成される。この反応は還元力を消費する反応である。そこで、酸化還元収支をあわせるために、一部のビルビン酸が酸化的に脱炭酸されて acetyl-CoA となる。これまで知られているプロピオン酸発酵では、acetyl-CoA と propionyl-CoA は加水分解され

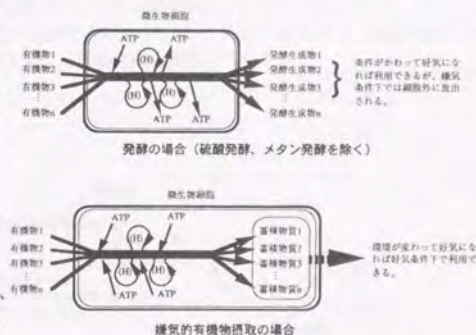
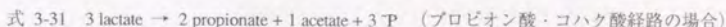
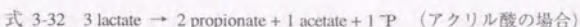


図 3-6 発酵と嫌気的有機物摂取の比較

でそれぞれ酢酸、プロピオン酸となり細胞外に排出される。しかし、嫌氣的有機物摂取においては acetyl-CoA や propionyl-CoA は縮合、還元、重合されて PHA として細胞内に蓄積されると考えられる。エネルギーは フマル酸がコハク酸に変換される反応のエネルギーを利用した酸化リン酸化と、acetyl-CoA が酢酸になる反応と共役した基質レベルのリン酸化により生成される。乳酸が出発物質の場合のコハク酸・プロピオン酸経路の反応は結局次のようになる。



一方アクリル酸経路 (図 3-8) では、乳酸が lactyl-CoA となり、脱水されて acrylyl-CoA となる。そして、さらに水素が付加されて propionyl-CoA となる。コハク酸・プロピオン酸経路と同様、酸化還元収支をあわせるために一部の乳酸が酸化されてピルビン酸を経て acetyl-CoA となる。エネルギーの生成は acetyl-CoA が酢酸に加水分解される反応に共役した基質レベルのリン酸化反応においてのみ行われる。そのため、乳酸を出発物質としたアクリル酸経路によるプロピオン酸発酵は次のように要約される。



Gottschalk(1986)によれば、これら二通りの経路のうち、アクリル酸経路は比較的限られた細菌だけが行う (*Clostridium propionicum* や *Peptostreptococcus elsdenii*) のに対し、ほとんどのプロピオン酸発酵細菌はコハク酸・プロピオン酸経路でプロピオン酸発酵を行うとされる。そこで、アクリル酸経路が用いられる可能性については否定できないが、コハク酸・プロピオン酸経路により propionyl-CoA が生成される場合について詳しく代謝機構を検討していく。

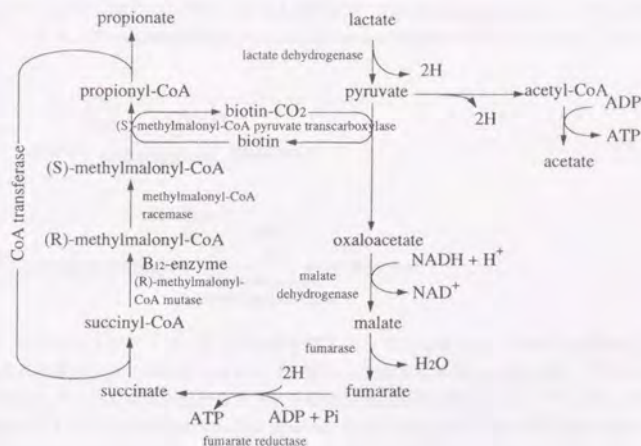


図 3-7 コハク酸・プロピオン酸経路によるプロピオン酸発酵 (Gottschalk, 1978 より)

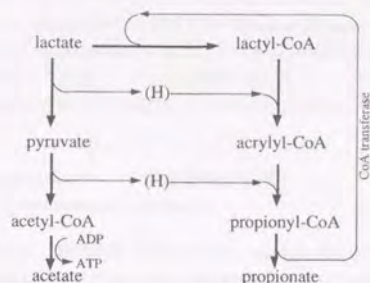
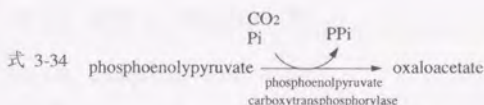
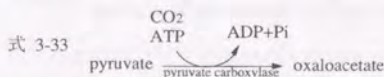


図 3-8 アクリル酸経路によるプロピオン酸発酵 (Gottschalk, 1978 より)

図 3-7 にしめたコハク酸・プロピオン酸経路は一つの例であり、用いられる酵素や出発物質によりいくつかのバリエーションがある。出発物質がグルコースの場合、オキサロ酢酸がホスホエノールビルビン酸から直接つくられる場合とビルビン酸を経由してつくられる場合がある。また、methylmalonyl-CoA の脱炭酸が常にビルビン酸のカルボキシル化と共役するわけではなく、その場合は (S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase ではなく (R)-methylmalonyl-CoA decarboxylase が働く。こうした点についてももう少し詳しくみていく。

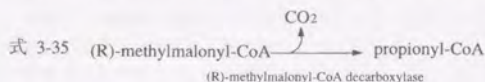
ビルビン酸からのオキサロ酢酸の生成に関与する酵素は (S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase の他に、pyruvate carboxylase が知られている (式 3-33)。この反応はエネルギーを消費する反応で、pyruvate carboxylase によりオキサロ酢酸が生成する場合は ATP が消費される。しかし、(S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase が関与する場合は反応を進めるために必要なエネルギーがビルビン酸のカルボキシル化と同時に起こる (S)-methylmalonyl-CoA の脱炭酸により供給される。つまり、(S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase を利用した方がエネルギーの節約になる。



一方、グルコースやグリコーゲンが出発物質となっている場合は、オキサロ酢酸がビルビン酸から生成される場合とホスホエノールビルビン酸から生成される場合 (式 3-34) の二通りが考えられる。ホスホエノールビルビン酸からオキサロ酢酸が生成される際のエネルギー収支であるが、ビルビン酸経由でかつ (S)-methylmalonyl-CoA pyruvate transcarboxylase が関与する場合は反応 1 モルあたり 1 モルの ATP が生成される。また、ビルビン酸経由の場合であっても pyruvate carboxylase によりオキサロ酢酸が生成される場合、およびホスホエノールビルビン酸から式 3-34 のように直接オキサロ酢酸が生成される場合はエネルギー生成は行われないことになる。ただし、(S)-methylmalonyl-CoA の脱炭酸と共役してホスホエノールビルビン酸のカルボキシル化を行う酵素がもしも存在すれば、

その酵素反応により基質レベルのリン酸化が行われるのではないだろうか。

一方、methylmalonyl-CoA の脱炭酸を行う酵素には、(S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase の他に(R)-methylmalonyl-CoA decarboxylase が知られている。この酵素は(R)-methylmalonyl-CoA から脱炭酸を行う。この酵素が関与する場合、ビルビン酸やホスホエノールビルビン酸からオキサロ酢酸を生成するためには必然的にエネルギーを投入しなければならない。



なお、コハク酸・プロピオン酸発酵系の酵素のうち、methylmalonyl-CoA mutase はビタミン B₁₂ に依存する。また、(S)-methylmalonyl-CoA pyruvate transcarboxylase と (R)-methylmalonyl-CoA decarboxylase はビオチン要求性である。

3.2.2 乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの嫌氣的摂取時に蓄積される PHA の組成および物質収支

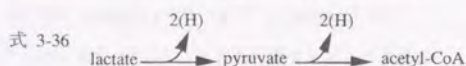
コハク酸・プロピオン酸発酵で生成された propionyl-CoA を、プロピオン酸として細胞外に排出してしまうのではなく、PHA に変換して細胞内に貯蔵するようにすれば、大切な炭素源を失うことなく細胞内の過剰な還元力を消費することができる。

ここでは PHA の蓄積とコハク酸・プロピオン酸発酵に基づいて、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの代謝について、一つ一つ検討していく。

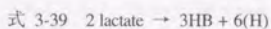
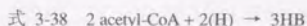
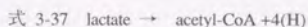
なお、この節では 1 モルのビルビン酸から 1 モルのオキサロ酢酸を生成する際に消費される高エネルギーリン酸結合の量を k で表すことにする。 k は 0 または 1 である。

A) 乳酸の場合

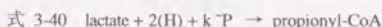
乳酸は、次のようにして acetyl-CoA に変換される。



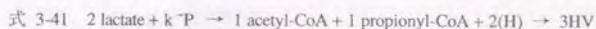
このようにして生じた acetyl-CoA が PHA に変換されるとすると、次のように還元力が過剰になってしまう。



過剰な還元力を相殺するためには、生成したビルビン酸の一部が 3.2.1 で議論したようなコハク酸・プロピオン酸発酵のようにして propionyl-CoA になると考えればよい。



従って、式 3-37 および式 3-40 より等モル量の acetyl-CoA と propionyl-CoA が生成され、それらが縮合・還元されて PHA になるとすると、次式のようにちょうど酸化還元バランスが成り立つことになる。



すなわち、2 モルの乳酸を摂取し PHA に変換するために必要なエネルギーは 0~1 モル、蓄積される PHA は 1 モルで、その主成分は 3HV である。ただし、最終生成物を 3HV としたが、本章の冒頭でも述べたように、これはあくまで主として生成される構成成分であり、副生成物として 3HB、3H2MB、3H2MV が少量生成される可能性はある。

なお、この場合、酢酸・プロピオン酸の場合と異なり解糖が関与する必然性はない。しかし、解糖が仮に起きるとすると、後で述べる 3HV 発酵のようなグリコーゲンの代謝が重なって起きていると考えることができる。この場合、PHA に変換される acetyl-CoA と propionyl-CoA の比率が、3HV 発酵によるグリコーゲンの代謝でも式 3-41 による乳酸の代謝でも 1:1 になるので、乳酸摂取の場合には蓄積される PHA の組成は解糖の有無に関わらず 1:1 になると考えられる。

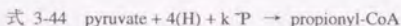
一方、物質収支であるが、1 モルの乳酸からは acetyl-CoA と propionyl-CoA あわせて 1 モル、1 モルのグルコシルユニットの解糖からは acetyl-CoA と propionyl-CoA あわせて 2 モルが生成するので、次のような関係が成立するはずである。

$$\text{式 3-42} \quad \frac{(\text{生成された acyl-CoA})}{(\text{消費された acyl-CoA})} = \frac{(\Delta \text{lactate}) + 2 (\Delta \text{glycogen})}{2 (\Delta \text{PHA})} = 1$$

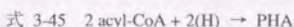
ここで、($\Delta \text{lactate}$)は摂取された乳酸のモル量、($\Delta \text{glycogen}$)は解糖されたグリコーゲンのモル量、(ΔPHA)は蓄積された PHA のモル量である。

B) ビルビン酸の場合

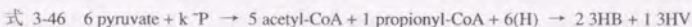
ビルビン酸の場合、次のようにして acetyl-CoA および propionyl-CoA となる。



一方、PHA が acyl-CoA から生成されるときは式は

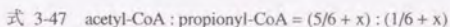


式 3-43×5 + 式 3-44 + 式 3-45×3 より次の式を得る。



ただし、ここでも式 3-46 の右辺で生成される PHA の組成は副生成物として 3H2MB や 3H2MV を少量含む可能性がある。式 3-46 によると、acetyl-CoA と propionyl-CoA の比は 5:1 すなわち 1:0.2 となる。また、ビルビン酸 6 モルを摂取するためには 0~1 モルの高エネルギーリン酸結合が消費される。

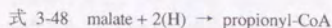
解糖が同時に起きる場合には、解糖は 3.3 節で述べるように等モル量の acetyl-CoA と propionyl-CoA を生じて PHA に変換されるので、acetyl-CoA と propionyl-CoA の比率が変わってくる。1 モルのビルビン酸が摂取されるときに x モルのグリコーゲンが解糖されるとすると、acetyl-CoA と propionyl-CoA の比率は次のようになる。



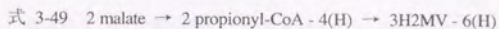
物質収支 (acyl-CoA の収支) は式 3-42 により計算すればよい。

C) リンゴ酸の場合

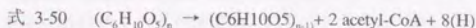
リンゴ酸は、フタル酸、コハク酸、succinyl-CoA を経て propionyl-CoA となる。その時の酸化還元反応は次のようである。



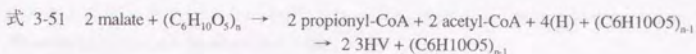
そこで、リンゴ酸が次のようにして PHA になるとすると、還元力が不足してしまう。



この還元力が解糖により供給されるとすると、

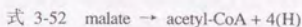


式 3-45、式 3-48、および式 3-50 より

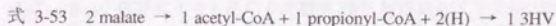


この式によると、2 モルのリンゴ酸を摂取するときにグリコーゲンが1 モル消費され、2 モルの PHA が蓄積されることになる。また、蓄積される PHA の成分は 3HV 主体となるはずである。ここでも、蓄積される PHA は、3HV の他に、副成物として 3HB、3H2MB、3HV を含むはずである。

還元力の生成経路としてもう一つ考えられるのは、リンゴ酸の一部がビルビン酸を経て acetyl-CoA となる場合である。図 3-9 にはリンゴ酸が還元されると同時に脱炭酸されてビルビン酸となる場合と、オキサロ酢酸を経てビルビン酸となる場合、および糖新生の時に用いられる phosphoenolpyruvate carboxykinase によりオキサロ酢酸がいったんホスホエノールビルビン酸を経てビルビン酸になるような経路を示した。この時の反応は次のように表される。



いずれにせよ、この場合リンゴ酸の一部は還元されてコハク酸を経て propionyl-CoA となり、残りは酸化されてビルビン酸を経て acetyl-CoA となる。従って、式 3-45、式 3-48、式 3-52 より次の式が得られる。また、この反応は全体としてみると高エネルギーリン酸結合の生成や消費は伴わない。



解糖が起きている場合でも、グリコーゲンからは 3.3 で述べるように等モル量の acetyl-CoA と propionyl-CoA が生成されるので、PHA に変換される acetyl-CoA と propionyl-CoA の比は 1 のはずである。また、acyl-CoA の収支は乳酸、ビルビン酸と同じく式 3-42 のようになるはずである。

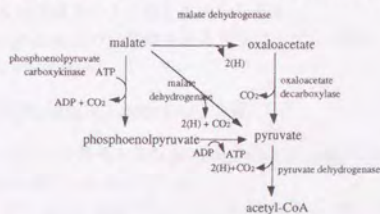
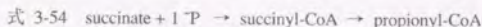


図 3-9 リンゴ酸からの acetyl-CoA の生成経路

D) コハク酸の場合

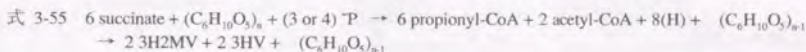
コハク酸の場合、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸に比べて代謝経路を予想するのが簡単である。コハク酸はコハク酸・プロピオン酸発酵によりプロピオン酸または propionyl-CoA が生成されるときの中間体である。コハク酸は succinyl-CoA、malonyl-CoA などを経て、結局脱炭酸されて propionyl-CoA を生じる。この反応は酸化・還元を伴わない反応である。



前述のように中間体として生成される(R)-methylmalonyl-CoA から propionyl-CoA までの代謝経路は2通りが知られている。一つは racemase により(S)-methylmalonyl-CoA を経て、(S)-methylmalonyl-CoA pyruvate transcarboxylase が(S)-methylmalonyl-CoA の CO_2 をビルビン酸に渡すことにより propionyl-CoA となる経路である。この反応では、同時にビルビン酸に CO_2 を付加されてオキサロ酢酸となる。一方、もう一つの経路は(R)-methylmalonyl-CoA が(R)-methylmalonyl-CoA decarboxylase により脱炭酸されて propionyl-CoA となる経路である。コハク酸の摂取においてはビルビン酸のカルボキシル化と共役することはないので、(S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase ではなく(R)-methylmalonyl-CoA decarboxylase が働くことになる。

一方、コハク酸は酸化されてフマル酸、リンゴ酸を経て、図 3-9 のようにして acetyl-CoA となる場合も考えられなくはない。しかし、この場合 3.1.1 で議論したように succinate dehydrogenase が酸化型に戻る機構を説明することが難しい。そこで、ここでは当面コハク酸から acetyl-CoA が生成される可能性はないものと考えて解析を進める。

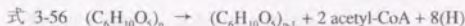
コハク酸が式 3-54 に従って propionyl-CoA になるとすると、コハク酸の嫌氣的摂取における酸化還元バランスおよび物質収支はプロピオン酸の場合と同様に考えることができる。すなわち、解糖が還元力の供給のためだけに行われる場合、3.1.2 節で論じたプロピオン酸の摂取と同じような式が成り立つ。



すなわち、物質収支に関しては乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸の場合と同様式 3-42 が成り立ち、PHA に変換される acetyl-CoA と propionyl-CoA の比は 1:3 となる。そして、摂取されたコハク酸の量と解糖されるグリコーゲンの量の比は 6:1 (=1:0.167) となる。消費される高エネルギーリン酸結合の量は、コハク酸摂取 1 モルあたり解糖が EMP 経路場合は 3 モル、ED 経路の場合は 4 モルとなる。

解糖が過剰に行われる場合、還元力が過剰になるので、解糖により生成されたビルビン酸（またはホスホエノールビルビン酸）の一部が還元されて propionyl-CoA になると考えられる。過剰に解糖されたグリコーゲンの代謝はあとで述べる図 3-12 のようになり、1 モルのグリコーゲンの解糖で 1 モルの acetyl-CoA と 1 モルの propionyl-CoA が生成されると考えられる。そこで、この場合の acetyl-CoA と propionyl-CoA の比は次のようにして求められる。

式 3-56 のようにして acetyl-CoA だけに変換されるグリコーゲンの量は、既に議論したようにコハク酸摂取 1 モルあたり 1/6 モルである。



一方、3.3 節で述べるようにして等モル量の propionyl-CoA と acetyl-CoA に変換されるグリコーゲンの量をコハク酸摂取 1 モルあたり b モルとする。

この時、コハク酸摂取 1 モルあたり生成される acetyl-CoA の量は $1/3 + b$ モル、そして propionyl-CoA の量は $1 + b$ モルである。すなわち

$$\text{式 3-57} \quad \frac{\text{propionyl-CoA}}{\text{acetyl-CoA}} = \frac{1+b}{1/3+b}$$

ここで、bの値は、実際に測定されたコハク酸1モルあたりの汚泥中炭水化物の減少量から1/6を引くことにより得られる。

一方、物質収支に関しては過剰の解糖がある場合でも式 3-42が成り立つと考えられる。

E) グルコースの場合

グルコースの嫌氣的摂取は、図 3-10に示すように解糖により生成された中間体（ピルビン酸やホスホエノールピルビン酸）の一部がコハク酸・プロピオン酸発酵により propionyl-CoA に、そして残りが acetyl-CoA になり、それらが縮合・還元、重合を経て PHA になるとすると説明ができる。図 3-10 は EMP 経路で解糖が行われる場合だが、解糖が ED 経路の場合もほぼ同様の代謝が行われる。また一方、図 3-11に示すようにグルコースがそのままグルコースのポリマーとして蓄積される場合もあることも知られている（深瀬ら,1982）。

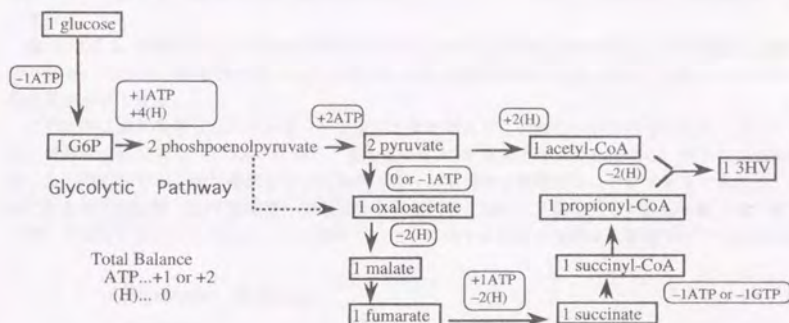


図 3-10 グルコースの嫌氣的摂取モデル（PHA として蓄積される場合。解糖系として EMP 経路が利用される場合）

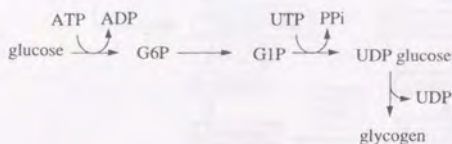


図 3-11 グルコースの嫌氣的摂取モデル（グリコーゲンとして蓄積される場合）

物質収支に関しては次の式が成り立つ。

$$\begin{aligned} \text{式 3-58} \quad \frac{(\text{生成されたacyl-CoA})}{(\text{消費されたacyl-CoA})} &= \frac{2 \{(\Delta \text{glucose}) + (\Delta \text{glycogen})\}}{2 (\Delta \text{PHA})} \\ &= 1 \end{aligned}$$

ここで、(Δglucose)は摂取されたグルコースの量、(ΔPHA)は蓄積された PHA の量である。また、

(Δ glycogen)は解糖されたグリコーゲンの量であるが、グルコースがグリコーゲンとして蓄積される場合この値が形式上負となる。

一方、酸化還元の出支を考えると、蓄積される PHA の組成は 3HV が主体であり、PHA に変換される acetyl-CoA と propionyl-CoA の比は 1:1 になるはずである。

エネルギー収支に関しては、解糖が ED 経路で行われ、しかもオキサロ酢酸の生成が (S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase により行われなかったとしても、高エネルギーリン酸結合の消費は伴わない。また、解糖が EMP 経路で行われたりオキサロ酢酸の生成が (S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase により行われる場合にはエネルギー収支はむしろ正になる。

3.3 ポリリン酸によらないエネルギー供給機構

これまでに、PHA の蓄積に関わる代謝として、グリコーゲンの解糖とコハク酸・プロピオン酸発酵を取り上げた。これらの代謝をうまく組み合わせると、図 3-12 のようにグリコーゲンを 3HV に変換することにより、細胞内の酸化還元電位を乱すことなくエネルギーを取り出す方法があることに気付く。

図 3-12 では、解糖系として EMP 経路の場合を示しているが、ED 経路の場合もほぼ同様な代謝が行われる。ただし、ED 経路が用いられる場合は EMP 経路がもちいられる場合に比較しエネルギー生成量が小さくなる。

この代謝は嫌気条件下でエネルギーを生成する反応であり、発酵の一つの形態と考えてよいだろう。最終生成物が主として 3HV なので、本論文では 3HV 発酵と呼ぶことにする。ポリリン酸を蓄積しない微生物でも、3HV 発酵を行えば嫌気条件下で有機物を摂取することができるであろう。この代謝を行う微生物 (3HV 発酵菌) は嫌氣的有機物摂取において生物学的リン除去を担う菌 (脱リン菌) と競合すると考えられる。その意味で、注目に値する非常に重要な代謝機構だといえるだろう。

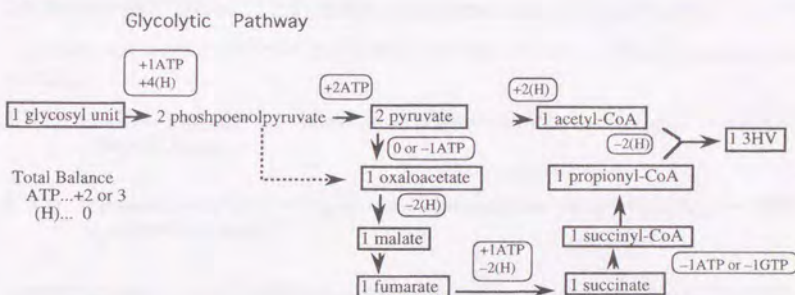
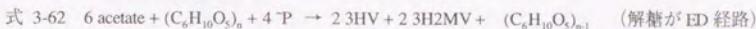
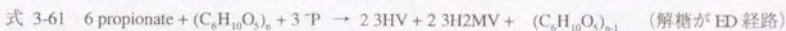
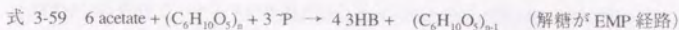


図 3-12 グリコーゲンを基質とした 3HV 発酵によるエネルギー生産 (解糖が EMP 経路で行われる場合)

この代謝経路では、用いられる解糖系の別 (EMP 経路か ED 経路か)、また、オキサロ酢酸の生成機構によりエネルギー生成量が変わってくる。3HV 発酵によるエネルギー生成による酢酸、プロピオン酸の摂取時の化学量論的關係を、以下に試算してみる。

ここで用いる仮定であるが、酢酸・プロピオン酸を PHA に変換するための還元力はグリコーゲンの解糖により供給されるものとする。また、酢酸、プロピオン酸を摂取して acetyl-CoA または

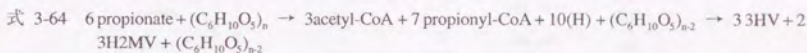
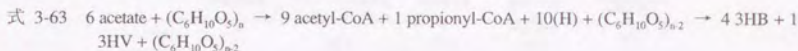
propionyl-CoA とするために必要な高エネルギーリン酸結合は、基質摂取 1 モルあたり 1 モルであるとする。そうした場合の酢酸、プロピオン酸の摂取の式は次のようになる。



これらの式の左辺の高エネルギーリン酸結合が 3HV 発酵により供給されるとして議論を行う。

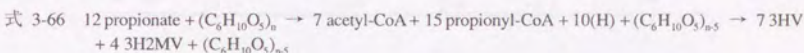
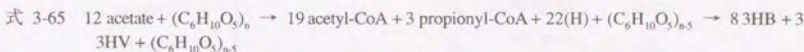
(1) 解糖が EMP 経路で行われ、オキサロ酢酸が (S)-methylmalonyl-CoA pyruvate transcarboxylase により生成される場合

この場合、1 モルのグリコーゲンの 3HV 発酵で 3 モルの高エネルギーリン酸結合が生成されることになる。式 3-59、式 3-61 より次のようになる。



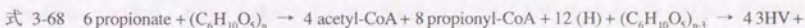
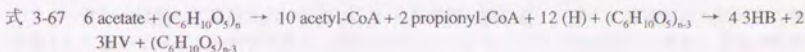
(2) 解糖が EMP 経路で行われ、オキサロ酢酸が pyruvate carboxylase により生成される場合

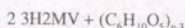
この場合、1 モルのグリコーゲンの 3HV 発酵で 2 モルの高エネルギーリン酸結合が生成されることになる。



(3) 解糖が ED 経路で、オキサロ酢酸が (S)-methylmalonyl-CoA pyruvate transcarboxylase により生成される場合

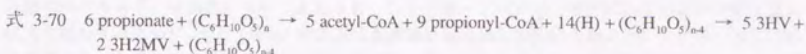
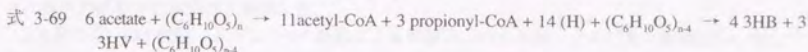
この場合にも、1 モルのグリコーゲンの 3HV 発酵で 2 モルの高エネルギーリン酸結合が生成されることになる。式 3-60、式 3-62 より次のようになる。





(4) 解糖が ED 経路で、オキサロ酢酸が phosphoenolpyruvate carboxytransferase または pyruvate carboxylase により生成される場合

この場合、1 モルのグリコーゲンの 3HV 発酵で 1 モルの高エネルギーリン酸結合が生成されることになる。式 3-60、式 3-62 より次のようになる。



これらをまとめると、表 3-4 および表 3-5 のようになる。なお、表中には中間体として生成される acetyl-CoA と propionyl-CoA の比率も示した。

表 3-4 3HV 発酵による酢酸摂取時の化学量論関係

| | 酢酸摂取量 | グリコーゲン消費量 | PHA蓄積量 | PHAの組成 | propionyl-CoA acetyl-CoA |
|--------|-------|-----------|--------|-----------|-----------------------------|
| (1)の場合 | 6 | 2 | 5 | 3HB : 3HV | |
| (1) | (1) | (0.33) | (0.83) | = 4 : 1 | 0.11 |
| (2)の場合 | 12 | 5 | 11 | 3HB : 3HV | |
| (1) | (1) | (0.42) | (0.92) | = 8 : 3 | 0.16 |
| (3)の場合 | 2 | 1 | 2 | 3HB : 3HV | |
| (1) | (1) | (0.5) | (1) | = 2 : 1 | 0.20 |
| (4)の場合 | 6 | 4 | 7 | 3HB : 3HV | |
| (1) | (1) | (0.67) | (1.17) | = 4 : 3 | 0.27 |

表 3-5 3HV 発酵によるプロピオン酸摂取時の化学量論関係

| | プロピオン酸摂取量 | グリコーゲン消費量 | PHA蓄積量 | PHAの組成 | propionyl-CoA acetyl-CoA |
|--------|-----------|-----------|--------|-------------|-----------------------------|
| (1)の場合 | 6 | 2 | 5 | 3HV : 3H2MV | |
| (1) | (1) | (0.33) | (0.83) | = 3 : 2 | 2.33 |
| (2)の場合 | 12 | 5 | 11 | 3HV : 3H2MV | |
| (1) | (1) | (0.42) | (0.92) | = 7 : 4 | 2.14 |
| (3)の場合 | 2 | 1 | 2 | 3HV : 3H2MV | |
| (1) | (1) | (0.5) | (1) | = 2 : 1 | 2.00 |
| (4)の場合 | 6 | 4 | 7 | 3HV : 3H2MV | |
| (1) | (1) | (0.67) | (1.17) | = 5 : 2 | 1.80 |

3.4 まとめ

本章では、3.1 節においてポリリン酸をエネルギー源とした嫌気条件下での酢酸、プロピオン酸の摂取機構を検討した。酢酸、プロピオン酸はそれぞれ acetyl-CoA、propionyl-CoA を経て、縮合、還元、重合されて PHA として蓄積されることが知られている。この反応で必要とされる還元力の供給機構として考えられるものを列挙し、理論面、および既往の文献からの実験結果との比較から、検討を行った。その結果、Mino ら、および Arun らの提唱している ED 経路、または EMP 経路によるグリコーゲンの解糖による還元力の供給がもっとも実験結果に近く、また、理論的にも還元力の供給源として優れていることが示された。理論的には、ペントースリン酸経路での解糖、基質が酢酸の場合についてグリオキシル酸経路、基質がプロピオン酸の場合について propionyl-CoA の acetyl-CoA への酸化、といった機構による還元力の生成が考えられたが、これらは文献からの実験結果とはあまり一致しなかった。還元力の供給源として、EMP 経路、または ED 経路が主として利用

されていることが確認された。

3.2 節では、嫌氣的有機物摂取にプロピオン酸発酵、特に、コハク酸・プロピオン酸経路によるプロピオン酸発酵が関与しているとの仮説を提案した。すなわち、乳酸、ピルビン酸、グルコースなどが嫌気条件下で摂取された場合、acetyl-CoA を経て PHA になるとすると、還元力が過剰になってしまう。過剰な還元力を消費するための機構として、摂取した有機物の一部をコハク酸・プロピオン酸発酵系によって propionyl-CoA とし、PHA に組み込む代謝が理論的に見てもっとも妥当であると考えた。そして、この仮説に基づいて乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの嫌氣的摂取の代謝機構を検討した。

3.3 節では、ED 経路、または EMP 経路による解糖系、コハク酸・プロピオン酸発酵系、そして PHA の合成系の三つの代謝を組み合わせたエネルギーの生成機構である 3HV 発酵を提案した。この発酵ではエネルギーは解糖において生成され、コハク酸・プロピオン酸発酵系は細胞内の酸化還元収支を維持するために、そして PHA 合成系は炭素源を細胞外に排出せず細胞内にとどめておくために機能する。この代謝を効率的に行う微生物が仮に存在するとすると、嫌氣的有機物摂取において生物学的リン除去を担う脱リン菌と競合する可能性がある。



図 3.3 3HV 発酵の代謝経路図 (仮定)

「3HV 発酵」は、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、プロピオン酸、グルコースなどの有機物を、ED 経路または EMP 経路による解糖系、コハク酸・プロピオン酸発酵系、そして PHA の合成系を組み合わせた代謝機構である。この代謝機構は、細胞内の酸化還元収支を維持するために、そして PHA 合成系は炭素源を細胞外に排出せず細胞内にとどめておくために機能する。この代謝を効率的に行う微生物が仮に存在するとすると、嫌氣的有機物摂取において生物学的リン除去を担う脱リン菌と競合する可能性がある。

「3HV 発酵」は、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、プロピオン酸、グルコースなどの有機物を、ED 経路または EMP 経路による解糖系、コハク酸・プロピオン酸発酵系、そして PHA の合成系を組み合わせた代謝機構である。この代謝機構は、細胞内の酸化還元収支を維持するために、そして PHA 合成系は炭素源を細胞外に排出せず細胞内にとどめておくために機能する。この代謝を効率的に行う微生物が仮に存在するとすると、嫌氣的有機物摂取において生物学的リン除去を担う脱リン菌と競合する可能性がある。

4 実験室汚泥による回分式実験

4.1 実験の概要

前章で検討した嫌気好気式活性汚泥法における嫌気条件下での有機物摂取機構のモデルを検証するために、実験室規模のリアクターを運転し、その汚泥を用いて回分式実験を行った。ここではその実験方法と結果について説明する。ここで用いた嫌気好気式活性汚泥は酢酸、プロピオン酸、ペプトンなどの成分を主体とする人工下水で馴致した汚泥である。

馴致の結果、次の4.2節で述べるように良好なリン除去を行い、かつ、嫌気条件下で顕著な有機物摂取を行う汚泥と、ポリリン酸を蓄積しないにも関わらず顕著な嫌氣的有機物摂取を行う汚泥が得られた。

これらの活性汚泥の嫌氣的有機物摂取機構を調べるために、回分式実験を行った。すなわち、これらの汚泥をリアクターの好気槽末端から取り出し、嫌気条件下に保ち、酢酸、プロピオン酸などの有機物を投与して、嫌気条件下での有機物摂取過程を追跡した。

4.2 汚泥の馴致方法

実験室汚泥による実験に用いた汚泥は、都市下水処理場から採取した活性汚泥を図 4-1 に示す連続式嫌気好気リアクターで馴致したものである。

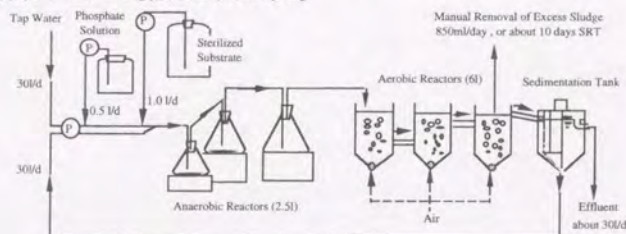


図 4-1 実験室嫌気好気式活性汚泥リアクター

嫌気槽は三角フラスコを用い、また、沈殿池と好気槽は底部を円錐形とした塩化ビニール樹脂製の槽を用いた。嫌気槽の攪拌はマグネティックスターラーにより、また、好気槽の攪拌は曝気することによりおこなった。沈殿池は汚泥が底部にたまるのを防ぐために、モーターを用いて緩やかに攪拌を行った。嫌気槽は、容量 2L ~ 3L で、ガラス製の数個の三角フラスコからなっていた。一方好気槽はそれぞれ 2000ml の容量からなる槽三つ（好気槽容量計 6000ml）からなっていた。

流入水（人工下水）は図 4-1 に示すように、滅菌した濃厚基質とリン酸水素二カリウム溶液を水道水により希釈して供給した。これらはチューブポンプにより連続的に送液した。濃厚基質の流量は 1L/d、リン酸水素二カリウム溶液の流量は 0.5L/d、そして水道水の流量は 30L/d である。流入水は 30L/d で返送されている返送汚泥と混合された後リアクターの嫌気槽に導入された。従って、汚泥返送率は約 100% である。水理学的滞留時間（HRT）は嫌気槽の容量が約 2.5L、好気槽の容量が

6Lであるから約6.5時間である。1日1回余剰汚泥を好気槽末端から引き抜くことにより、汚泥滞留時間をほぼ10日に制御した。

本研究ではA系とB系の二系列のリアクターを運転した。表4-1と表4-2に各系列のリアクターの流入水組成を示す。A系の植種汚泥は東京都の三河島下水処理場の嫌気好気法で運転されている系列から採取した。本来の目的としてはアミノ酸の嫌氣的摂取機構を調べる目的でプロセスを運転していたため、タンパク質やアミノ酸主体の流入水を用いていた。一方、B系の植種汚泥は工業技術院生命工学研究所の複合微生物研究室で運転されていた実験室規模の嫌気好気式リアクターから得た。そのリアクターの植種汚泥をさらにたどると茨城県の霞ヶ浦浄化センター（循環式硝化脱窒プロセス）の汚泥である。B系はもとをたどれば嫌気好気式活性汚泥の代謝を調べるという目的というよりは、むしろ嫌気好気式活性汚泥による生物分解性プラスチックの生産の可能性を探るために運転していた。

A系ではほとんどの期間でリン除去が良好で、汚泥のリン含有率は7%前後であった。一方B系では汚泥のリン含有率が最初の100日間は4%前後、そのあとは2%前後にまで低下し嫌気好気式活性汚泥法による生物学的リン除去の促進はまったく見られなかった。しかしながら、嫌気条件下での有機物摂取はリン除去を良好に行っている汚泥と大差ないレベルであった。

表 4-1 A 系の流入水組成

| Period | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Date | | 1'24 | 25'45 | 46'50 | 51'66 | 67'75 | 76'84 | 85'94 | 95' |
| Acetate | mg/l | 0 | 0 | 0 | 238 | 238 | 238 | 199 | 238 |
| Glutamate | mg/l | 0 | 0 | 0 | 160 | 160 | 160 | 198 | 198 |
| Aspartate | mg/l | 0 | 0 | 0 | 79 | 79 | 159 | 159 | 159 |
| Alanine | mg/l | 0 | 0 | 0 | 79 | 79 | 159 | 159 | 198 |
| Phenylalanine | mg/l | 0 | 0 | 0 | 79 | 79 | 79 | 79 | 79 |
| Pepton | mg/l | 198 | 238 | 317 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Yeast Extract | mg/l | 20 | 24 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Beaf Extract | mg/l | 0 | 0 | 0 | 317 | 397 | 238 | 238 | 159 |
| KCl | mg/l | 42 | 50 | 67 | 167 | 167 | 167 | 167 | 167 |
| CaCl ₂ | mg/l | 10 | 12 | 16 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| MgSO ₄ | mg/l | 53 | 64 | 85 | 213 | 213 | 213 | 213 | 213 |
| K ₂ HPO ₄ | mg/l | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 |

表 4-2 B 系の流入水組成

| Period | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|------|------|-------|--------|---------|---------|---------|------|
| Date | | 1'63 | 64'89 | 90'101 | 102'120 | 121'130 | 131'202 | 203' |
| Acetate | mg/l | 222 | 190 | 159 | 111 | 95 | 79 | 111 |
| Propionate | mg/l | 0 | 32 | 64 | 95 | 95 | 95 | 95 |
| Butyrate | mg/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 32 | 0 |
| Peptone | mg/l | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 |
| Yeast Extract | mg/l | 0 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| KCl | mg/l | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 |
| CaCl ₂ | mg/l | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| MgSO ₄ | mg/l | 85 | 85 | 85 | 85 | 85 | 85 | 85 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | mg/l | 0 | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 |
| K ₂ HPO ₄ | mg/l | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 |

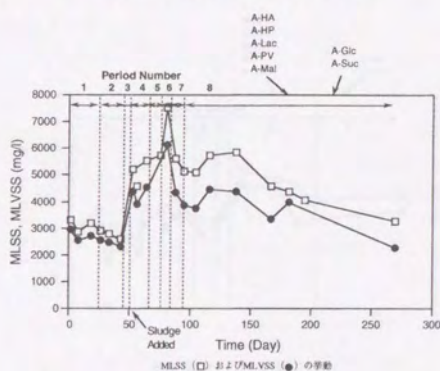
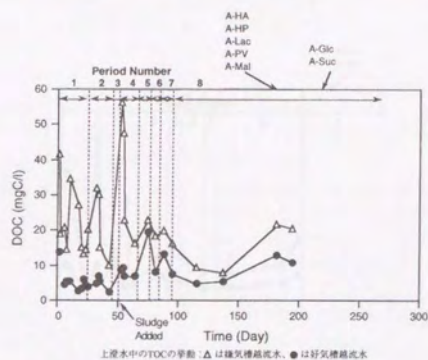
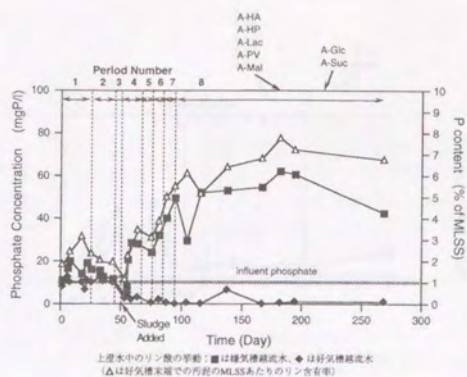
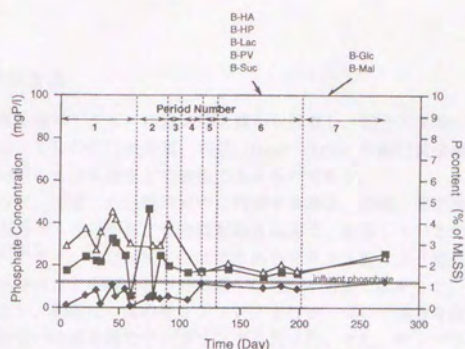
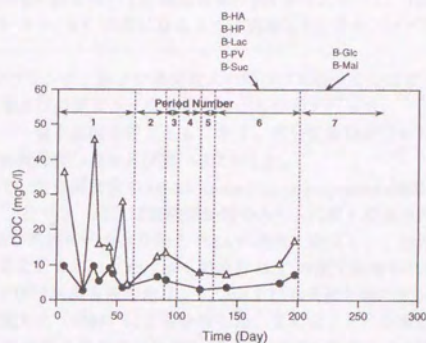


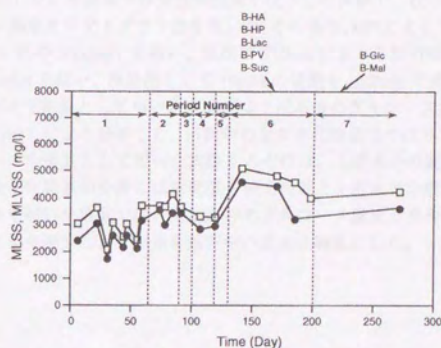
図 4-2 A 系の運転記録



上澄水中のリン濃度の変動: ■ は嫌気槽流出水、◆ は好気槽流出水
(△ は好気槽末端での汚泥のMLSSあたりのリン含有率)



上澄水中のDOCの変動: △ は嫌気槽流出水、● は好気槽流出水



MLSS (□) およびMLVSS (●) の変動

図 4-3 B系の運転記録

4.3 回分式実験の方法

活性汚泥を連続式実験室リアクターの好気槽末端から採取し、回分式実験に供した。回分式実験に用いたリアクターは、1 Lの広口試薬瓶、容量 100ml~200ml の細口試薬瓶、または容量 300ml の三角フラスコで、いずれもゴム栓などで密栓できるものである。

回分式実験に先だって、採取した活性汚泥中に残存する酸素、硝酸、亜硝酸を次のようにして除去した。まず、窒素ガスを10分から20分程度吹き込んで、溶存している酸素および気相中の酸素を除いた。さらにリアクターをゴム栓またはすりあわせガラス栓により密栓し、1時間ないし2時間攪拌を続け、内生呼吸による酸素および硝酸・亜硝酸の消費をはかった。

以上の準備操作のあと、基質投与前のサンプリングを行い、ついで基質を所定濃度になるように投入した。その後は所定の時間間隔でサンプリングを行った。また、サンプリングのためには汚泥混合液が浮遊成分を多く含んでいるため先端が欠けたホールビペットを用いた。

回分式実験中は、適時 pH 計を用いて汚泥混合液の pH をモニターし、1N の硫酸または水酸化ナトリウムを用いて pH を 7 ~ 8.5 の間になるように調節した。また、マグネティックスターラーにより攪拌を行った。

なお、pH 調整、サンプリング、および基質投入の際はゴム栓（またはガラス栓）をあける必要があったが、そのような場合は窒素ガスを吹き込みながら作業を行った。

表 4-3に回分式実験の一覧を実験条件とともに示す。回分式実験が行われたところの実験室嫌気好気式リアクターの運転状況は図 4-2および図 4-3に示した。

各回分式実験において、汚泥混合液の MLSS (mixed liquor suspended solid)、MLVSS (mixed liquor volatile suspended solid)、全リン（以上は実験開始時のみ）、汚泥上澄水水中の DOC (dissolved organic carbon)、リン酸、および汚泥中の炭水化物と PHA の濃度を測定した。投与した基質の残存濃度は、その物質を直接測定することもあったが、多くの場合 DOC の測定結果から換算した。

MLSS、MLVSS、および汚泥混合液の全リンについては基質投与前のサンプルについてのみ測定した。これらは下水試験方法 (1984) により分析した。また全リンの分解は過硫酸カリウム分解法により行い、分解液を中和した後アスコルビン酸-モリブデン青法により定量した。DOC は島津 TOC-500 を用いて測定した。有機酸や揮発性脂肪酸を投与した実験で、投与した基質濃度を直接追跡する場合にはイオン排除クロマトグラフ法を用いた。その場合、HPLC として、島津製作所の LC-6A システムまたは Waters 社の Module1 を使い、検出は 210nm における紫外吸収によった。カラムには島津製作所の SCR101H を使い、移動相として 10mM の硫酸を 1ml/min で流した。カラム槽温度は 70°C とした。グルコースを基質として用いた実験では上澄み中のグルコース濃度をアンスロン-硫酸法 (Gaudy & Gaudy, 1981) により分析した。汚泥中の全炭水化物量はやはりアンスロン-硫酸法により測定した。グルコースを基質として用いた実験をのぞけば、上澄水水中の炭水化物濃度は無視するので、汚泥中の全炭水化物量の分析には汚泥混合液を汚泥と上澄水を分離することなく用いた。基質としてグルコースを用いた実験では、上澄み中のグルコース濃度と混合液中の炭水化物量をそれぞれアンスロン法により測定し、その差を汚泥中の炭水化物量とした。

表 4-3 実験室汚泥による回分式実験一覧

| Sludge Used | Exp. No. | Date in the Run | Substrate | Substrate Added mg/l | Condition | MLSS mg/l | MLVSS mg/l | Init. Cont. of Phosphorus % of MLSS | Init. Cont. of Carbohydrates % of MLSS |
|-------------|----------|-----------------|------------|----------------------|---------------|-----------|------------|-------------------------------------|--|
| A | A-HA | 181 | Acetate | 520 | An 4 + Ox 3 | 5400 | 3900 | 6.9 | 10.1 |
| A | A-HP | 181 | Propionate | 520 | An 4 + Ox 3 | 5400 | 3900 | 6.9 | 10.1 |
| A | A-Lac | 181 | Lactate | 540 | An 7 | 5400 | 3900 | 6.9 | 10.1 |
| A | A-PV | 181 | Pyruvate | 490 | An 7 | 5400 | 3900 | 6.9 | 10.1 |
| A | A-Mal | 181 | Malate | 510 | An 7 | 5400 | 3900 | 6.9 | 10.1 |
| A | A-Suc | 219 | Succinate | 490 | An 7 | 4000 | 2900 | n.a. | 9.4 |
| A | A-Glc | 219 | Glucose | 500 | An 7 | 4000 | 2900 | n.a. | 9.4 |
| B | B-HA | 167 | Acetate | 460 | An 6 + Ox 1.5 | 4800 | 4300 | 1.7 | 22.7 |
| B | B-HP | 167 | Propionate | 490 | An 6 + Ox 1.5 | 4800 | 4300 | 1.7 | 22.7 |
| B | B-Lac | 167 | Lactate | 530 | An 6 | 4800 | 4300 | 1.7 | 22.7 |
| B | B-PV | 167 | Pyruvate | 510 | An 6 | 4800 | 4300 | 1.7 | 22.7 |
| B | B-Mal | 222 | Malate | 500 | An 7 | 3400 | 3000 | n.a. | 22.6 |
| B | B-Suc | 167 | Succinate | 510 | An 6 | 4800 | 4300 | 1.7 | 22.7 |
| B | B-Glc | 222 | Glucose | 500 | An 7 | 3400 | 3000 | n.a. | 22.5 |

実験条件の表記例：An 4 嫌気 4 時間
An 4 + Ox 2 嫌気 4 時間の後好気 2 時間

汚泥中の PHA は、メチル化分解の後ガスクロマトグラフにより分離・同定・定量した。汚泥混合液 10ml を遠心分離し上澄水を捨てた後、微生物反応を止めるために沸騰水浴上で 3 分ほど保持した。その後汚泥を凍結乾燥し、2ml のクロロホルム溶液（安息香酸メチルを 200mg/l 程度含む）と 2ml の 20%硫酸酸性のメタノールを加え、テフロンライナーつきのスクリューキャップで密栓し、よく攪拌して沸騰水浴中に 7 時間保持した。室温まで冷却した後、28%アンモニア水 1ml を加え、激しく攪拌した後遠心分離によりクロロホルム層を分離した。クロロホルム層 1.75ml を回収して別のネジ口遠心分離管にとり、純水 0.5ml を加えて再びよく攪拌してクロロホルム層を精製し、ガスクロマトグラフによる分析に供した。ガスクロマトグラフは GC-14A（島津製作所）を用い、また、カラムは Neutrabond 1（内径 0.25mm、長さ 30m、膜厚 0.4 μ m、GL サイエンス社製）を用いた。キャリアガスにはヘリウム（2ml/min）を用い、検出は水素炎イオン化検出器（FID）で行った。サンプル注入量は 0.5 μ l で、スプリット比 1:20 で注入した。注入口温度は 230 $^{\circ}$ C、検出器温度は 250 $^{\circ}$ C、カラムオープンの温度は初期温度 80 $^{\circ}$ C で 4 分間維持した後、8 $^{\circ}$ C/min で 120 $^{\circ}$ C まで昇温し、さらに 200 $^{\circ}$ C まで 30 $^{\circ}$ C/min で昇温して 3 分間 200 $^{\circ}$ C で保持した。成分の同定と定量は、3-ヒドロキシ酪酸ナトリウム、*Alcaligenes eutrophus* から抽出・精製された ^1H NMR により組成を決定された P(3HB co 3HV)（理化学研究所の土肥義治博士の研究グループ（当時東京工業大学）より厚意により譲っていただいた）、および活性汚泥から抽出・精製され ^1H NMR により組成を決定された 3HB、3HV、3H2MB、3H2MV の四元共重合体を標準物質として行った（佐藤ら、1993）。

4.4 結果

4.4.1 酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取

通常、酢酸やプロピオン酸の嫌氣的摂取時には汚泥中のポリリン酸が加水分解されて上澄水中にオルトリン酸として放出されることが知られている。実際、A 系の汚泥については嫌気条件下での酢酸、プロピオン酸の摂取に伴ってはつきりと上澄水中のリン酸濃度の増加が観察された。しかし、B 系の汚泥では上澄水中のリン酸濃度の増加はごく僅かであった。

A系汚泥による酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取

図4-4にA系の汚泥による酢酸の嫌氣的摂取回分実験(A-HA)の結果を示す。この実験では、嫌気条件4時間の後、容器のふたを開放して好気条件としてさらに3時間運転した。好気条件での代謝はあとで議論することにして、嫌気条件での代謝に絞って議論を進めたい。

嫌気条件下での酢酸の摂取に伴って上澄水の中のリン酸が増加し、汚泥中の炭水化物が減少し、PHAが蓄積された。また、蓄積されたPHAの組成は3HBが主体であった。このような挙動は古くから知られており、深瀬ら(1985)、松尾ら(1984)、Minoら(1987)、Comeauら(1987)、そして著者の以前の研究(1992)でも報告されている。

図4-5はA系の汚泥によるプロピオン酸の嫌氣的摂取である(A-HP)。この実験でも嫌気条件で行った最初の4時間に注目する。嫌気条件下での挙動は蓄積されたPHAの組成を除けば酢酸の摂取の場合と同様であった。蓄積されたPHAの主成分は酢酸の場合は3HBであったのに対し、プロピオン酸の場合は3HVと3H2MVであった。

酢酸、プロピオン酸の嫌氣的摂取過程での化学量論比と蓄積されたPHAの組成を表4-4に示す。表中の理論値は、3.1節で議論したさまざまな代謝モデルのうち、還元力がED経路またはEMP経路により供給される場合のものである(表3-1および表3-2参照)。なお、表中には著者の修士課程での実験結果もあわせて示した。化学量論比は若干理論値から外れるものがあったが、おおむね理論値に一致した。

表 4-4 A系の汚泥による酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取における化学量論関係

| Substrate | Exp. No. | Stoichiometric Relations (Acetate taken up is set to 1.) | | | | Composition of the Accumulated PHA (%) | | | |
|------------|-------------|---|------------------------|-----------------|--------------------|--|-------|-----|-------|
| | | Substrate Taken Up | Carbohydrates Consumed | PHA Accumulated | Phosphate Released | 3HB | 3H2MB | 3HV | 3H2MV |
| Acetate | A-HA | 1 | 0.20 | 0.64 | 1.07 | 87 | 2 | 11 | 0 |
| | Theoretical | 1 | 0.17 | 0.67 | 0.5~1.17 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Propionate | A-HP | 1 | 0.32 | 0.71 | 1.64 | 0 | 5 | 49 | 47 |
| | Theoretical | 1 | 0.17 | 0.67 | 0.5~1.17 | 0 | 0 | 50 | 50 |

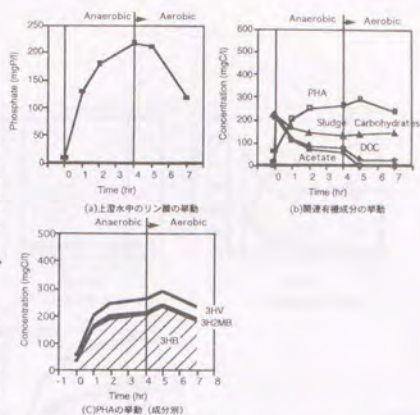


図 4-4 A系の汚泥による酢酸の嫌氣的摂取 (A-HA、嫌気条件4時間の後好気条件3時間)

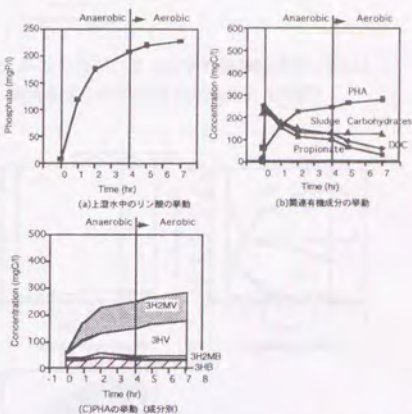


図 4-5 A系の汚泥によるプロピオン酸の嫌氣的摂取 (A-HP、嫌気条件4時間の後好気条件3時間)

B) B 系の汚泥による酢酸・ プロピオン酸の嫌氣的摂 取

4.2 節で記したように B 系の運転成績は、嫌気条件下でのリン酸の放出、好気条件下でのリン酸の摂取は観察されなかったが、嫌気条件下での有機物の除去は良好であった(図 4-3)。B 系の汚泥による酢酸、プロピオン酸の摂取過程を図 4-6 と図 4-7 にそれぞれ示す。これらの実験では、嫌気条件 6 時間の後、さらに 1 時間半ほど容器のふたを開放して好気条件下での代謝を追跡した。

嫌気条件下での酢酸、プロピオン酸の摂取に伴って汚泥中の PHA が増加し、汚泥中の炭水化物が減少した点は通常の嫌氣的有機物摂取と共通しているが、リン酸の放出がほとんど見られなかった。また、注意深く図 4-4、図 4-5 と図 4-6、図 4-7 を比べると、酢酸、プロピオン酸いずれの場合でも、リン酸の放出を伴わない汚泥による摂取の方が汚泥中の炭水化物の減少量が大きく、また、蓄積された PHA 中の 3HV の割合が大きいの気がつく。

B 系の汚泥について、酢酸、プロピオン酸の嫌氣的摂取過程での化学量論比と蓄積された PHA の組成を表 4-5 に示す。表中にはポリリン酸をエネルギー源とした基質摂取の場合の理論値と、3.3 節で論じた 3HV 発酵によりエネルギーが供給されるとした場合の理論値(表 3-4、表 3-5)を併記した。B 系の汚泥による嫌氣的有機物摂取時の汚泥中の炭水化物の減少量、PHA の蓄積量及びその組成、そしてリン酸の放出量は、ポリリン酸を主たるエネルギー源とした場合の理論値より、むしろ 3HV 発酵によりエネルギーが供給されるとした場合の理論値に近く、なかでも 3.3 節で議論した各シナリオのうち、(2)および(3)の場合(解糖が EMP 経路で行われ、オキサロ酢酸が pyruvate carboxylase により生成される場合、および解糖が ED 経路で行われ、オキサロ酢酸が(S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase により生成される場合。いずれの場合も 1 モルのグリコーゲンの 3HV 発酵で 2 モルの ATP が生成される)にもっとも近いものとなった。

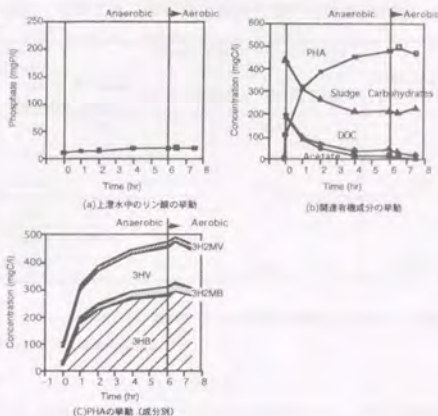


図 4-6 B 系の汚泥による酢酸の嫌氣的摂
取(6 時間の後好気条件 1.5 時間)

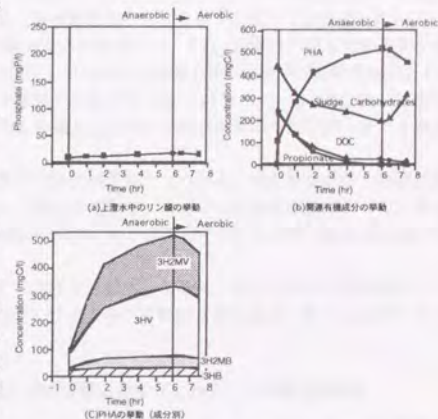


図 4-7 B 系の汚泥によるプロピオン酸の嫌氣的摂
取(6 時間の後好気条件 1.5 時間)

表 4-5 リン酸の放出を伴わない酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取時の化学量論関係

| Substrate | Exp. No. | Stoichiometric Relations (Substrate taken up is set to 1.) | | | | Composition of the Accumulated PHA (%) | | | | propionyl-CoA acetyl-CoA |
|------------|-------------------|---|---------------------------|------------------------|-----------------------|--|-------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| | | Substrate Taken Up | Carbohydrates Consumed | PHA Accumulated | Phosphate Released | 3HB | 3H2MB | 3HV | 3H2MV | |
| Acetate | B-HA | 1 | 0.44 | 1.04 | 0.04 | 73 | 5 | 21 | 1 | 0.16 |
| | Theoretical (PP) | 1 | 0.17 | 0.67 | 0.5 ¹ 1.17 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Theoretical (3HV) | 1 | 0.33 ⁰ 0.67 | 0.83 ¹ 1.17 | 0 | 80 ⁵ 7 | 0 | 20 ⁴ 3 | 0 | 0.11 ⁰ 0.27 |
| Propionate | E-HP | 1 | 0.51 | 1.00 | 0.04 | 3 | 9 | 51 | 37 | 2.0 |
| | Theoretical (PP) | 1 | 0.17 | 0.67 | 0.5 ¹ 1.17 | 0 | 0 | 50 | 50 | 3 |
| | Theoretical (3HV) | 1 | 0.33 ⁰ 0.67 | 0.83 ¹ 1.17 | 0 | 0 | 0 | 60 ² 9 | 40 ⁷ 1 | 2.33 ¹ 1.80 |

注) Theoretical (PP)はエネルギー源として主としてポリリン酸が用いられる場合の理論値。Theoretical(3HV)はエネルギーが主として3HV 発酵により供給される場合の理論値。

C) 好気条件下での挙動

好気条件下では、PHA が分解されるとともに微生物の増殖とポリリン酸やグリコーゲンの合成が行われることが予想される。しかし、本研究で行った実験では好気条件の設定に問題があり空気の供給量が十分でなかった場合があり、あまりよい結果が得られなかった。

図 4-4から図 4-7に示した A-HA、A-HP、B-HA および B-HP での好気条件は、嫌気条件下では閉じていた三角フラスコや細口試薬瓶のふたを開放しただけである。そのため実験によっては酸素の供給が不十分で、好気条件下で観察されるべき現象をはっきりと示すことができなかった。

A-HA では好気条件下で顕著なリン酸の取り込みが観察され、また、汚泥内の炭水化物も若干増加した。しかし、嫌気時間内に摂取されずに残存してしまった酢酸が好気条件下で摂取されたために、PHA は好気の最初の1時間は増加し、その後減少に転じた(図 4-4)。また、B-HP ではリン酸の取り込みは僅かしか観察されなかったが、PHA の減少と汚泥内の炭水化物の増加ははっきりと確認できた。

一方、A-HP では、好気条件下で嫌気条件下で取り残されたプロピオン酸の摂取がやや加速されたものの、リン酸は摂取されず寧ろ放出され、PHA は増加し、汚泥中の炭水化物量はほとんど変化しなかった。B-HA では、好気条件下での PHA の減少、および汚泥中の炭水化物の増加は B-HP の場合ほどではなかった。

好気条件下でのポリリン酸やグリコーゲンの再生過程は、今後明らかにされるべき課題の一つである。この実験自体はうまく行かなかったが、好気条件下で供給される酸素の量との比較において議論する必要があることが示唆された。

4.4.2 乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの嫌氣的摂取

3.2.2 で、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの摂取には、菌体細胞内の酸化還元収支を保つために解糖系だけでなくプロピオン酸発酵系も関与するであろうと予想した。ここでは A 系の汚泥と B 系の汚泥にこれらの有機物を投与し、その嫌氣的摂取過程を追跡した実験結果を示す。

図 4-8から図 4-12に乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの嫌氣的摂取時の関連代謝物質の経時的变化を示す。

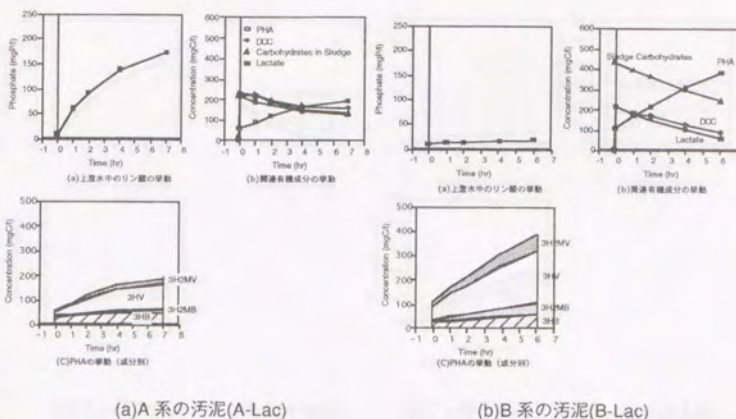


図 4-8 乳酸の嫌氣的摂取

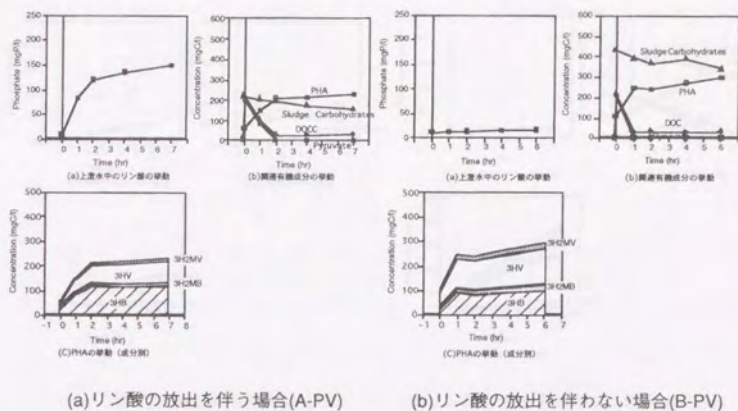
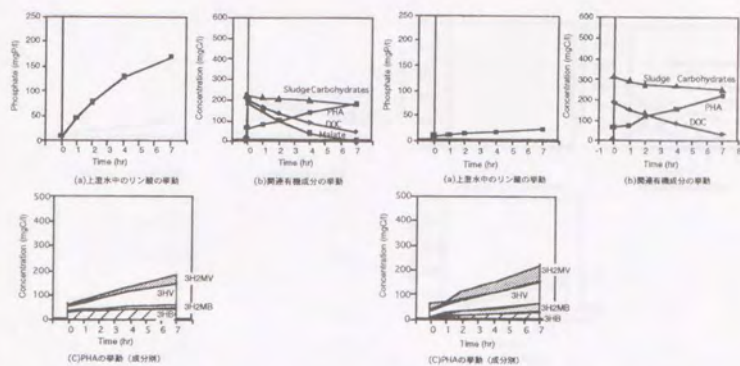


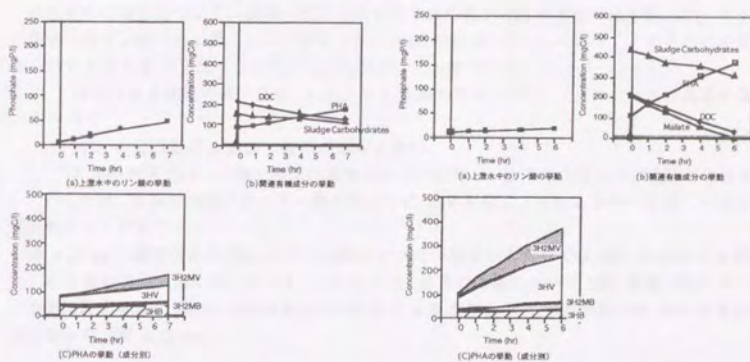
図 4-9 ピルビン酸の嫌氣的摂取



(a)リン酸の放出を伴う場合(A-Mal)

(b)リン酸の放出を伴わない場合(B-Mal)

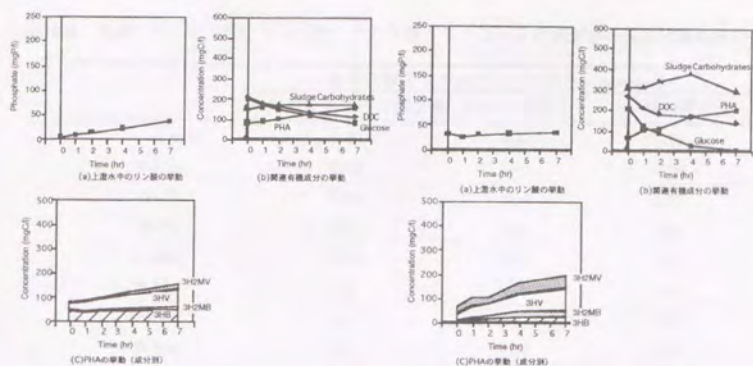
図 4-10 リンゴ酸の嫌氣的摂取



(a)リン酸の放出を伴う場合(A-Suc)

(b)リン酸の放出を伴わない場合(B-Suc)

図 4-11 コハク酸の嫌氣的摂取



(a)リン酸の放出を伴う場合(A-Glc)

(b)リン酸の放出を伴わない場合(B-Glc)

図 4-12 グルコースの嫌氣的摂取

それぞれの場合について、基質摂取 1 モルあたりの汚泥中の炭水化物の減少量、PHA の生成量、上澄水へのリン酸の放出量、および蓄積された PHA の組成を表 4-6 に示す。それぞれの基質の場合について A 系と B 系を比べると次のことに気がつく。すなわち

汚泥内炭水化物の減少量が、A 系よりも B 系の方が大きい。(グルコースが基質の場合を除く)

PHA の蓄積量は A 系よりも B 系の方が大きい。

A 系の汚泥ではリン酸が顕著に放出されたのに対し、B 系ではほとんど放出されなかった。

このことは、B 系の汚泥がポリリン酸の代わりに 3HV 発酵によりエネルギーを得ていたと考えれば説明がつくだろう。

図 4-13 (a)に蓄積された PHA のモル組成をす。モル組成からだけでは 3HV の割合は B 系よりもむしろ A 系の方が大きくなっている。このことは、B 系の汚泥において 3HV 発酵が起きていたという予想に反するが、しかし、絶対量を比較すると A 系よりも B 系の方が多くの 3HV を蓄積した結果になった (図 4-13 (b))。

表 4-6 乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの摂取時の関連代謝物質の代謝量

| | 基質摂取 1 モルあたりの代謝量 (mol/mol) | | |
|-------|----------------------------|---------|---------|
| | 汚泥内炭水化物の減少量 | PHAの蓄積量 | リン酸の放出量 |
| A-Lac | 0.46 | 0.87 | 2.15 |
| B-Lac | 0.61 | 1.08 | 0.06 |
| A-PV | 0.06 | 0.51 | 0.65 |
| B-PV | 0.21 | 0.60 | 0.03 |
| A-Mal | 0.16 | 0.52 | 1.38 |
| B-Mal | 0.25 | 0.79 | 0.13 |
| A-Suc | 0.34 | 0.76 | 0.62 |
| B-Suc | 0.41 | 0.97 | 0.05 |
| A-Glc | 0.16 | 0.71 | 0.54 |
| B-Glc | -0.08 | 0.78 | 0.11 |

P-Glc-2の汚泥内炭水化物の減少量が負になっているのは汚泥内の炭水化物量がむしろ増えたことを示す。

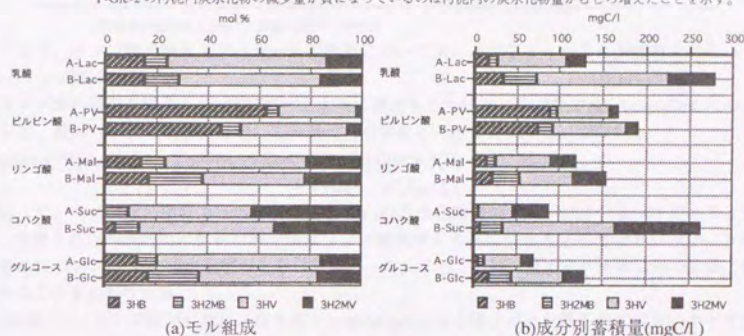


図 4-13 蓄積された PHA のモル組成 (a) と成分別の量 (b)

3.2 節で、acetyl-CoA と propionyl-CoA の生成量、消費量、およびそれらの比に関する議論を行った。その理論値と実測値の比較を表 4-7に示す。実測値はおおむね理論値と一致し、汚泥内の摂取された有機物のほとんどが PHA として蓄積され、汚泥内の酸化還元バランスを維持するためにプロピオン酸発酵が行われたことが示された。

表 4-7 嫌氣的有機物摂取時の acyl-CoA の生成量・消費量の比、および PHA に変換された propionyl-CoA と acetyl-CoA の比 (測定値と理論値の比較)

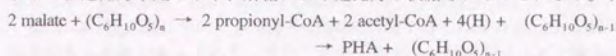
| | acyl-CoAの消費量と生成量の比 (消費量/生成量) | PHAに変換されたpropionyl-CoAと acetyl-CoAの比 (propionyl-CoA/acetyl-CoA) |
|-------|---------------------------------|---|
| A-Lac | 0.91 (1.00) | 0.98 (1.00) |
| B-Lac | 0.97 (1.00) | 1.00 (1.00) |
| A-PV | 0.92 (1.00) | 0.24 (0.25) |
| B-PV | 0.84 (1.00) | 0.43 (0.36) |
| A-Mal | 0.79 (1.00) | 1.15 (1.00) |
| B-Mal | 1.05 (1.00) | 1.10 (1.00) |
| A-Suc | 0.91(1.00) | 2.47 (2.32) |
| B-Suc | 1.07 (1.00) | 1.83 (2.16) |
| A-Glc | 0.61 (1.00) | 1.06 (1.00) |
| B-Glc | 0.85 (1.00) | 0.98 (1.00) |

括弧内の数字は 3.2 節での議論に基づく理論値

ここで、リンゴ酸の摂取とグルコースの摂取について次に述べるようなことが観察された。

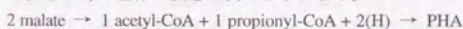
(1) リンゴ酸の摂取

リンゴ酸の摂取の場合、3.2 節で述べたように摂取されたリンゴ酸が全て propionyl-CoA になるとすると、還元力不足となり、解糖により還元力が供給されることになる。すなわち、



従って、リンゴ酸の摂取 1 モルにつき、汚泥内の炭水化物は 0.5 モル減少するはずである。しかし、実測された汚泥内炭水化物の減少量はリンゴ酸摂取 1 モルにつき A 系の場合 0.16 モル、B 系の場合 0.25 モルで、上の式の予想の半分以下であった。このことは、還元力が解糖以外の方法で供給されたことを示している。

3.2 節では、リンゴ酸がピルビン酸を経て acetyl-CoA になる場合があり得るのではないかと予想した。その時の全体の反応は次のようになる。



実際、表 4-8 に示すように PHA に変換された propionyl-CoA の量は摂取されたリンゴ酸の量よりも小さく、また、汚泥内炭水化物の減少量から計算した acetyl-CoA の生成量は PHA に変換された acetyl-CoA の量よりも小さかった。このことは、摂取されたリンゴ酸の一部が acetyl-CoA に変換されたと考えれば説明できる。その経路は明らかではないが、図 3-9 に示した経路のうちのいずれかであろう。

表 4-8 リンゴ酸の嫌氣的摂取における acetyl-CoA と propionyl-CoA の生成・消費量

| | 摂取されたリンゴ酸 の量 | PHAに変換された propionyl-CoAの量 | 汚泥内炭水化物の減 少量から計算した acetyl-CoAの生成量 | PHAに変換され たacetyl-CoAの量 |
|-------|-----------------|------------------------------|---|---------------------------|
| A-Mal | 3.8 | 2.1 | 1.2 | 1.8 |
| B-Mal | 3.7 | 2.7 | 1.6 | 2.4 |

(2) グルコースの摂取

グルコースの摂取においては、いったん汚泥中の炭水化物が増加し、やがて減少に転ずるという現象が観察された(図 4-12)。この現象は、特に B 系の汚泥において顕著であった。摂取されたグルコースが一時的にポリマー化したという可能性と、グルコース-6-リン酸として細胞内に保持されていたという可能性が考えられるだろう。ただし、B 系の汚泥中に増加した炭水化物の量は最大時で 1mmol/l 程度だったが、これをすべてグルコース-6-リン酸として蓄積していたとすると上澄水中のリン酸濃度が顕著に減少しなければならない。図 4-12(b)で、上澄水中のリン酸の量はほとんど変化しなかったため、グルコースポリマーとして蓄積されていたと考えるのが妥当だろう。

4.5 考察

4.5.1 嫌氣的有機物摂取機構

3 章において、嫌氣的有機物摂取に関与する代謝として、ポリリン酸の加水分解によるエネルギーの生成、解糖による還元力の生成、コハク酸・プロピオン酸発酵による余剰還元力の消費、そして acetyl-CoA および propionyl-CoA の縮合とそれに続く還元・重合による PHA の生成をあげた。これらの代謝系を図 4-14 に模式的に示す。3 章で、これらの代謝系を組み合わせ、酢酸、プロピオン酸、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、およびグルコースの嫌氣的摂取機構について検討し、物質収支や蓄積される PHA の組成について予想を立てた。そして、4.3 節で実験結果と照らし合わせたところ、実験結果と 3 章で立てた予想はよく一致していた。また、ポリリン酸の加水分解を伴わない嫌氣的有機物摂取において、嫌氣的有機物摂取に必要なエネルギーが解糖系、コハク酸・プロピオン酸発酵系・PHA 蓄積系を組み合わせるの 3HV 発酵により生成されることも確認された。

図 4-14 の模式図について、解糖系が EMP 経路で行われるのか、ED 経路で行われるのかは今後明らかにする必要があるだろう。また、図中、オキサロ酢酸がビルビン酸から生成されるように示したが、ホスホエノールビルビン酸から生成される可能性もある。図 4-14 中で、両端に矢印のある直線は逆反応も起こりうることを示している。実際に、リンゴ酸の嫌氣的摂取において摂取されたリンゴ酸の一部が acetyl-CoA となったことが示された。3.3.2 項の図 3-9 に示したような経路でリンゴ酸がオキサロ酢酸、ビルビン酸を経て acetyl-CoA になったものと考えられる。

また、3.2.1 項で述べたように、 propionyl-CoA の生成の経路として、コハク酸・プロピオン酸発酵経路の他にアクリル酸経路が考えられる。しかし、アクリル酸経路はコハク酸・プロピオン酸発酵に比べると限られた微生物しかもっておらず、エネルギーの生成効率もコハク酸・プロピオン酸発酵の方がよい。アクリル酸経路の概要を図 3-8 に示したように、アクリル酸経路にはリンゴ酸やコハク酸は関与していない。このことは、アクリル酸経路を仮定した場合、リンゴ酸やコハク酸の嫌氣的摂取を説明しにくいことを意味する。こうしたことから判断すると、アクリル酸経路が働いている可能性は否定できないものの非常に低く、主として働いているのはコハク酸・プロピオン酸発酵系路であるといえるだろう。なお、*Rhodococcus ruber* は好気条件下でグルコースや乳酸、ビルビン酸から 3HB と 3HV の共重合体を生成するが、その際の propionyl-CoA の生成の経路がコハク酸・プロピオン酸発酵系であることが知られている (Anderson et al., 1995)。*R. ruber* の場合にはポリリン酸が関与せず、また条件が好気条件下であるにせよ、図 4-14 と同様な代謝が微生物界に知られていることは、コハク酸・プロピオン酸発酵系が嫌氣的有機物摂取において働いている可能性を支持するものである。

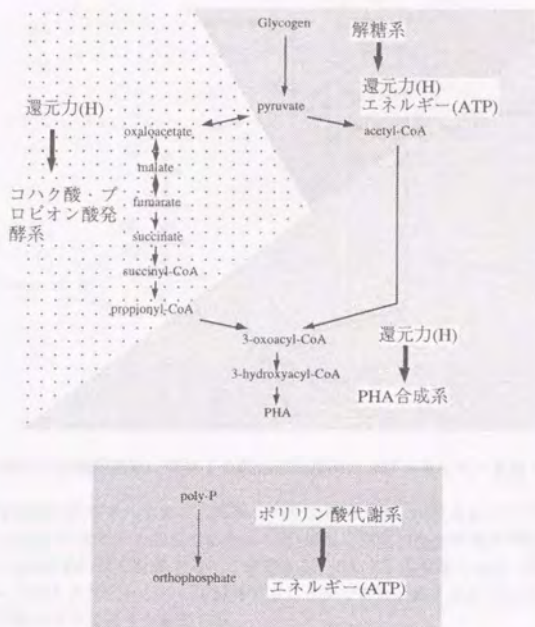


図 4-14 嫌氣的有機物摂取に關する代謝系

図 4-14の代謝モデルをもとにして、物質収支、酸化還元収支、エネルギー収支について再検討してみる。物質収支は acyl-CoA (acetyl-CoA と propionyl-CoA の和) の、酸化還元収支は水素当量還元力の、そしてエネルギー収支は高エネルギーリン酸結合の、生成量と消費量を計算する。

以下、次の順で考察を行っていく。

- A) 嫌氣的有機物摂取の際の代謝反応量の算出
- B) acyl-CoA の生成と消費
- C) 水素当量還元力の生成と消費
- D) 高エネルギーリン酸結合の生成と消費

A) 嫌氣的有機物摂取の際の代謝反応量の算出

嫌氣的有機物摂取に關する代謝系は、これまでに議論したように解糖系、プロピオン酸発酵系、そして PHA 合成系である。それらの代謝における酸化還元反応およびエネルギー生成・消費反応を図 4-15に示す。図中、(a)~(g)および(w)~(z)の番号を付した反応が酸化還元またはエネルギーの生成・消費を伴う反応である。なお、解糖系の個々の反応は省略した。また、解糖生成物の一部がビルビン酸にならず、ホスホエノールビルビン酸から直接オキサロ酢酸になる場合もあり得る。そのような場合は、ここでは形式上、ホスホエノールビルビン酸がビルビン酸をへてオキサロ酢酸となるとして扱うことにする。

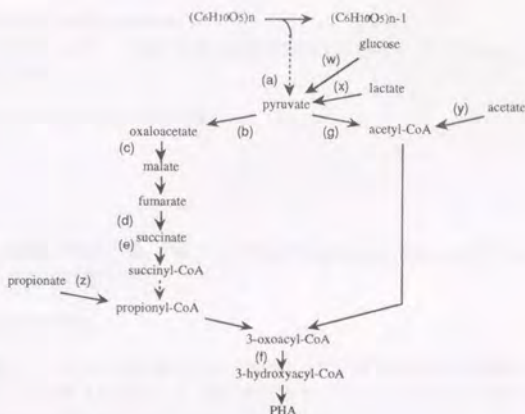


図 4-15 嫌氣的有機物摂取に関する酸化還元反応およびエネルギー生成・消費反応

嫌気条件下で有機物が摂取される際に、摂取された有機物の量、消費されたグリコーゲンの量、および蓄積された PHA の量とその組成を測定しておけば、嫌氣的有機物摂取に伴って行われた(a)～(g)および(w)～(z)の反応の量を計算することができる。そして、各反応で生成・消費される還元力およびエネルギーの量もそれをもとにして計算することができる。以下にその方法を示す。

以下の議論では次のように記号を定義する。

($C_6H_{10}O_5$)：消費された汚泥中の炭水化物の量 (mmol/l)

(substrate)：摂取された有機物の量 (mmol/l)

(3HB)：生成された 3HB の量 (mmol/l)

(3H2MB)：生成された 3H2MB の量 (mmol/l)

(3HV)：生成された 3HV の量 (mmol/l)

(3H2MV)：生成された 3H2MV の量 (mmol/l)

(PHA)：生成された PHA の量 (mmol/l)

$(3HB) + (3H2MB) + (3HV) + (3H2MV)$

(acetyl-CoA)：PHA に変換された acetyl-CoA の量 (mmol/l)

$(acetyl-CoA) = 2(3HB) + (3H2MB) + (3HV)$

(propionyl-CoA)：PHA に変換された propionyl-CoA の量 (mmol/l)

$(propionyl-CoA) = (3H2MB) + (3HV) + 2(3H2MV)$

(a)、(w)の計算

酢酸、プロピオン酸、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸のどの場合も基質摂取に伴って消費された汚泥中の炭水化物の量から計算できる。

式 4-1 $(a) = (C_6H_{10}O_5)$

である。

一方グルコースの場合は、次の二通りのケースが考えられる。すなわち、摂取に伴って汚泥中の炭水化物が減少する場合とむしろ増加する場合である。汚泥中の炭水化物が減少する場合には、

$$(a) = (C_6H_{10}O_5), (w) = (\text{substrate})$$

として計算すればよい。また、汚泥中の炭水化物が増加する場合については $(C_6H_{10}O_5)$ の正負の定義に注意して計算すると

$$\text{式 4-2} \quad (a) = 0, (w) = (\text{substrate}) + (C_6H_{10}O_5)$$

となる。

(b)の計算

(b)の値は酢酸、乳酸、ピルビン酸、グルコースの摂取の場合には、PHA に変換された propionyl-CoA の量から次のようにして計算できる。

$$\text{式 4-3} \quad (b) = (\text{propionyl-CoA})$$

一方、コハク酸、プロピオン酸の場合には、次のように二通りの考え方で計算できる。

一つは、解糖により生成されたピルビン酸（またはホスホエノールピルビン酸）の量から PHA に変換された acetyl-CoA の量を差し引いて求める方法である。

$$\text{式 4-4} \quad (b1) = 2(C_6H_{10}O_5) - (\text{acetyl-CoA})$$

もう一つの方法は、PHA に変換された propionyl-CoA の量から摂取されたコハク酸、プロピオン酸の量を引いて求める方法である。コハク酸にこの方法が適用できるのは、嫌気条件下ではコハク酸が TCA サイクルにより酸化されてフマル酸やリンゴ酸になる可能性がないからである。

$$\text{式 4-5} \quad (b2) = (\text{propionyl-CoA}) - (\text{substrate})$$

リンゴ酸の場合もコハク酸、プロピオン酸と同様の方法で(b)を計算することができる。しかし、リンゴ酸の場合、3.2.2 節で議論したように、(b)の反応は図 4-15中の矢印とは反対の向きに進むこともありうる。そのような場合は、算出される(b)の値は負となる。

(c)の計算

(c)はオキサロ酢酸が還元されてリンゴ酸となる反応である。この値は(b)の値に等しい。

(d)の計算

(d)はフマル酸が還元されてコハク酸となるとき反応で、1 モルのフマル酸が 1 モルのコハク酸となるとき 1 モルの(H)が生成される。

(d)の値はリンゴ酸の場合を除けば(b)と同じである。リンゴ酸の場合は、(d)は PHA に変換された propionyl-CoA の量から計算できる。

$$\text{式 4-6} \quad (d) = (\text{propionyl-CoA})$$

(e)の計算

(e)の値はコハク酸の場合を除けば(d)の値に等しい。コハク酸の場合、(e)の反応量は(b)、(c)、(d)の反応を経て生成されたコハク酸の量に、摂取されたコハク酸の量を足せばよい。すなわち

$$\text{式 4-7} \quad (e) = (b) + (\text{substrate})$$

(f)の計算

(f)は acetyl-CoA または propionyl-CoA が縮合されて生成した 3-oxoacyl-CoA が還元されて 3-hydroxyacyl-CoA となる反応である。本研究で用いたどの有機物についても、この値は次の式で計算できる。

$$\text{式 4-8} \quad (f) = (\text{PHA})$$

(g)の計算

プロピオン酸、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの場合には、(h)の値は PHA に変換された acetyl-CoA の量から計算できる。

$$\text{式 4-9} \quad (g) = (\text{acetyl-CoA})$$

一方、酢酸の場合には次の二通りの計算法がある。

一つは、解糖により生成されたピルビン酸（またはホスホエノールピルビン酸）の量から PHA に変換された propionyl-CoA の量を差し引いて求める方法である。

$$\text{式 4-10} \quad (g1) = 2 (C_6H_{10}O_6) - (\text{propionyl-CoA})$$

もう一つは、PHA に変換された acetyl-CoA の量から摂取された酢酸の量を引けば、解糖によりピルビン酸を経て生成された acetyl-CoA の量がわかる、という計算法である。

$$\text{式 4-11} \quad (g2) = (\text{acetyl-CoA}) - (\text{substrate})$$

(x)、(y)、(z)の計算

これらの反応は、摂取される基質の量から計算できる。

以上の考察をまとめると表 4-9 のようになる。

表 4-9 酸化還元およびエネルギー生成・消費に関する反応量の計算法

| | Acetate | Propionate | Lactate | Pyruvate | Malate | Succinate | Glucose |
|------|--|---|---|---|---|---|--|
| (a) | (C ₂ H ₄ O ₂) | (C ₃ H ₆ O ₂) | (C ₃ H ₅ O ₂) | (C ₃ H ₄ O ₂) | (C ₄ H ₄ O ₅) | (C ₄ H ₄ O ₄) | (C ₆ H ₁₂ O ₆) (if ≥ 0) or 0 (if < 0) |
| (b) | 2 (C ₂ H ₃ O ₂) - (acetyl-CoA) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) | 2 (C ₂ H ₃ O ₂) - (acetyl-CoA) | 2 (C ₂ H ₃ O ₂) - (acetyl-CoA) | (propionyl-CoA) |
| (b1) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) | (propionyl-CoA) |
| (b2) | (propionyl-CoA) - (substrate) | (propionyl-CoA) - (substrate) | (propionyl-CoA) - (substrate) | (propionyl-CoA) - (substrate) | (propionyl-CoA) - (substrate) | (propionyl-CoA) - (substrate) | (propionyl-CoA) - (substrate) |
| (c) | (b) | (b) | (b) | (b) | (b) | (b) | (b) |
| (d) | (b) | (b) | (b) | (b) | (propionyl-CoA) | (b) | (b) |
| (e) | (b) | (b) | (b) | (b) | (b) | (b) + (substrate) | (b) |
| (f) | (PHA) | (PHA) | (PHA) | (PHA) | (PHA) | (PHA) | (PHA) |
| (g1) | 2 (C ₂ H ₃ O ₂) - (propionyl-CoA) | (acetyl-CoA) | (acetyl-CoA) | (acetyl-CoA) | (acetyl-CoA) | (acetyl-CoA) | (acetyl-CoA) |
| (g2) | (acetyl-CoA) - (substrate) | | | | | | |
| (w) | | | | | | | (substrate) (if (C ₂ H ₃ O ₂) ≥ 0) (substrate) + (C ₂ H ₃ O ₂) (if (C ₂ H ₃ O ₂) < 0) |
| (x) | | | (substrate) | | | | |
| (y) | (substrate) | | | | | | |
| (z) | | (substrate) | | | | | |

B) acyl-CoA の生成と消費

acyl-CoA の生成量と消費量の計算法については既に 3.1 節、3.2 節でも述べた。また、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの場合については既に表 4-7 に acyl-CoA の生成量と消費量の比を示した。

図 4-15 から acyl-CoA の生成量は (e) + (g) + (y) + (z)、消費量は 2 (f) である。しかし、そのようにして計算すると、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、グルコースの場合には表 4-9 から

$$\begin{aligned}
 \text{式 4-12} \quad (e) + (g) + (y) + (z) &= (\text{acetyl-CoA}) + (\text{propionyl-CoA}) \\
 &= \{2 (3\text{HB}) + (3\text{HV}) + (3\text{H2MB})\} + \{(3\text{HV}) + (3\text{H2MB}) + 2 (3\text{H2MV})\} \\
 &= 2 \{ (3\text{HB}) + (3\text{HV}) + (3\text{H2MB}) + (3\text{HV}) \} = 2 (\text{PHA}) = 2 (f)
 \end{aligned}$$

となってしまう。

acyl-CoA の生成量は摂取された基質の量と消費されたグリコーゲンの量から計算すべきだろう。グルコース以外の場合、摂取された基質 1 モルから 1 モルの acyl-CoA が生成される。また、グルコースやグリコーゲンからは 1 モルあたり 2 モルの acyl-CoA が生成される。すなわち、

$$\begin{aligned}
 \text{式 4-13} \quad \text{acyl-CoA の生成量} &= (\text{substrate}) + 2 (\text{C6H10O5}) \quad (\text{グルコース以外の基質の場合}) \\
 \text{acyl-CoA の生成量} &= 2 (\text{substrate}) + 2 (\text{C6H10O5}) \quad (\text{グルコースの場合})
 \end{aligned}$$

一方、acyl-CoA の消費量は蓄積された PHA の量から計算できる。

$$\text{式 4-14} \quad \text{acyl-CoA の消費量} = 2 (\text{PHA})$$

以上のようにして計算した acyl-CoA の生成量、消費量、およびそれらの比（消費量／生成量）を図 4-16 に示す。A-Glc を除けば acyl-CoA の生成量と消費量の比はおおむね 1 ± 0.2 の範囲に入っていた。このことから、摂取された有機物の貯蔵形態のほとんどが PHA で説明できることがわかる。

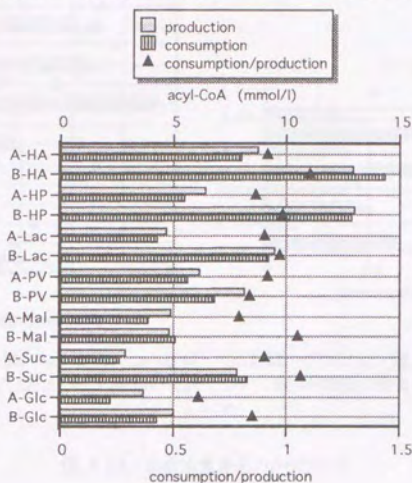


図 4-16 acyl-CoA の収支

C) 水素当量還元力の生成と消費

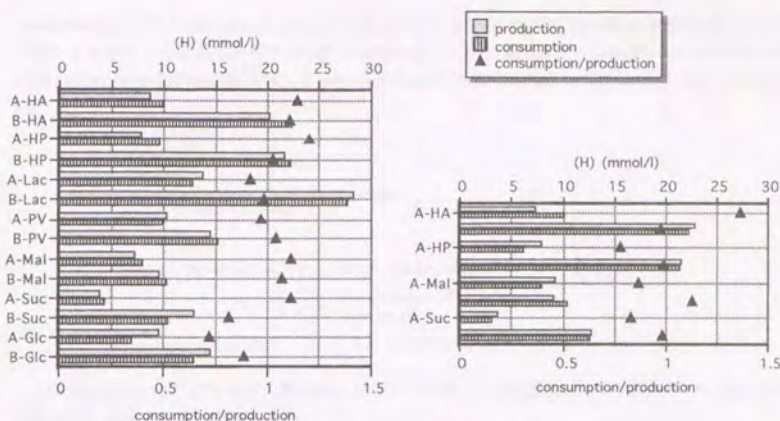
3.4.1 で議論した反応のうち、酸化還元反応に関与するのは(a)、(c)、(d)、(f)、(g)、(w)、および(x)である。各反応で生成または消費される還元力を水素当量(H)で表すと、表 4-10 のようになる。

表 4-10 各酸化還元反応における還元力(H)の生成量

| 反応 | 反応 1 モルあたりの還元力(H)の生成量 |
|-----|-----------------------|
| (a) | 4 |
| (c) | -2* |
| (d) | -2* |
| (f) | -2* |
| (g) | 2 |
| (w) | 4 |
| (x) | 2 |

*) 負の値は還元力の消費を示す。

表 4-9 と表 4-10 をもとに嫌気的有機物摂取に関与する各酸化還元反応での還元力の生成量・消費量を計算し、さらに、酸化還元収支を計算することができる。還元力の生成量、消費量、およびそれらの比（消費量／生成量）を図 4-17 に示す。還元力の消費量と生成量の比は、ほぼ 1 ± 0.2 の範囲に入っており、酸化還元収支が成り立っていることが示された。



(A)酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸 (B)酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸
については表4.9の(b1)および(g1)を用いて計 については表4.9の(b2)および(g2)を用いて計算し
算した。 算した。

図 4-17 水素当量還元力(H)の収支

D) 高エネルギーリン酸結合の生成と消費

エネルギーの生成、消費に関して厳密に議論する前に、オキサロ酢酸がピルビン酸またはホスホエノールピルビン酸から生成される際のエネルギー収支について、詳しく検討する。

ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸が生成される方法にはいくとおりか考えられる。それぞれの場合の高エネルギーリン酸結合の生成量をまとめると表 4-11 のようになる。

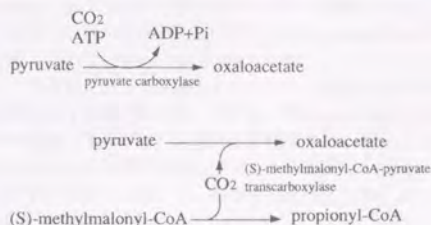
表 4-11 オキサロ酢酸生成時のエネルギー収支

| シナリオ | 高エネルギーリン酸結合の生成量 (代謝1モルあたり) | コメント | (a)におけるエ ネルギー生成量 (mol P/mol) | (b)におけるエ ネルギー生成量 (mol P/mol) |
|---|--------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| (1) ホスホエノールピルビン酸がピルビン酸になり、次いで(S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylaseによりオキサロ酢酸となる場合。 | +1 | 同時に(S)-methylmalonyl-CoAからpropionyl-CoAが生成される。 | 3 or 2* | 0 |
| (2) ホスホエノールピルビン酸がピルビン酸になり、ついでpyruvate carboxylaseによりオキサロ酢酸となる場合。 | +1-1=0 | | 3 or 2* | -1 |
| (3) ホスホエノールピルビン酸がphosphoenolpyruvate carboxykinaseによりオキサロ酢酸となる場合。 | +1 | この酵素は通常オキサロ酢酸を生成する方向には働かないとされる。 | 3 or 2* | 0 |
| (4) ホスホエノールピルビン酸がphosphoenolpyruvate carboxytransferaseによりオキサロ酢酸となる場合。 | 0 (ただし、リン酸がリン酸化されてピロリン酸となる) | | 3 or 2* | -1 |
| (5) ホスホエノールピルビン酸がphosphoenolpyruvate carboxylaseによりオキサロ酢酸となる場合。 | 0 | | 3 or 2* | -1 |

* EMP 経路の場合は 3mol -P/mol、ED 経路の場合は 2mol -P/mol

ピルビン酸のカルボキシル化は、pyruvate carboxylase による場合と(S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate

transcarboxylase (以下単に transcarboxylase と呼ぶ) による場合がある。前者は ATP を消費してピルビン酸をカルボキシル化してオキサロ酢酸を生成する。一方、後者はピルビン酸への炭酸付加と同時に (S)-methylmalonyl-CoA を脱炭酸して propionyl-CoA を生成する反応を同時に行い、ATP を消費しない。

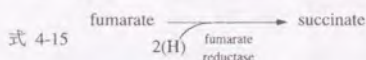


transcarboxylase は、プロピオン酸発酵によりコハク酸から propionyl-CoA が生成される反応が同時に起きている場合のみ利用される。

また、条件によってはオキサロ酢酸やリンゴ酸からピルビン酸が生成されるような場合も考えられる。この反応は 3.2.2 で述べたように、全体で見るとエネルギーの生成、消費を伴わずに進行する。

(a)、(b)以外の反応では、(d)、(e)、(w)、(y)および(z)の反応でエネルギーの生成、消費がある。

(d)の反応ではフマル酸が fumarate reductase によりコハク酸に還元される。



この反応は電子伝達リン酸化による ATP の生成を伴うとされている。実際、還元剤が NADH である場合、この反応の $\Delta G'$ は pH7.0 で -16.1kcal/mol で、ATP を生成するために十分である (ADP とリン酸から ATP をつくるために必要なエネルギー $\Delta G'$ は pH7.0 で 7.3kcal/mol)。プロピオン酸発酵を行う細菌だけでなく、腸内細菌の多くや *Bacteroides* 属、*Veillonella* 属、*Peptostreptococcus* 属などがこの酵素を持っている。

一方、TCA サイクルでコハク酸が酸化されてフマル酸になるときは、ATP は消費されないものの還元力の受けてはタンパク質結合型の FAD である。ここで生成された FADH₂ は式 4-15 の還元剤として働くが、この場合には、ATP は生成されない。なお、TCA サイクルで働くこの酵素は式 4-15 の逆反応を主として行い、succinate dehydrogenase といわれて区別されている。

嫌氣的有機物摂取における式 4-15 の反応では、解糖により多くの NADH が供給されるので、NADH が還元力として働くものと考えられる。また、多くの細菌が fumarate reductase を持っていることから、嫌氣的有機物摂取を行う細菌がこの酵素を持っている可能性も高いと考えられる。従って ATP の生成が行われる可能性は非常に高い。

(e)の反応はコハク酸から succinyl-CoA が生成される反応で、反応 1 モルあたり 1 モルの高エネルギーリン酸結合の消費を伴う。

(w)の反応では、グルコースの摂取 1 モルあたり、EMP 経路の場合 2 モル、ED 経路の場合 1 モルの高エネルギーリン酸結合の生成がある。

(y)および(z)では、3.1.3 で議論したように、酢酸、プロピオン酸の摂取 1 モルあたり通常 1 モルの高エネルギーリン酸結合が消費される。

以上は、次のような 4 つのケースに分けて考えることができる。

(1)解糖が EMP 経路で行われ、ピルビン酸を propionyl-CoA に変換する際にエネルギーが生

成も消費もされない場合（またはホスホエノールビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応 1 モルあたり 1 モル高エネルギーリン酸結合が生成される場合）。

(2) 解糖が EMP 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応 1 モルあたり 1 モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合（またはホスホエノールビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際にエネルギーが消費も生成もされない場合）。

(3) 解糖が ED 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際にエネルギーが生成も消費もされない場合（またはホスホエノールビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応 1 モルあたり 1 モル高エネルギーリン酸結合が生成される場合）。

(4) 解糖が ED 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応 1 モルあたり 1 モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合（またはホスホエノールビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際にエネルギーが消費も生成もされない場合）。

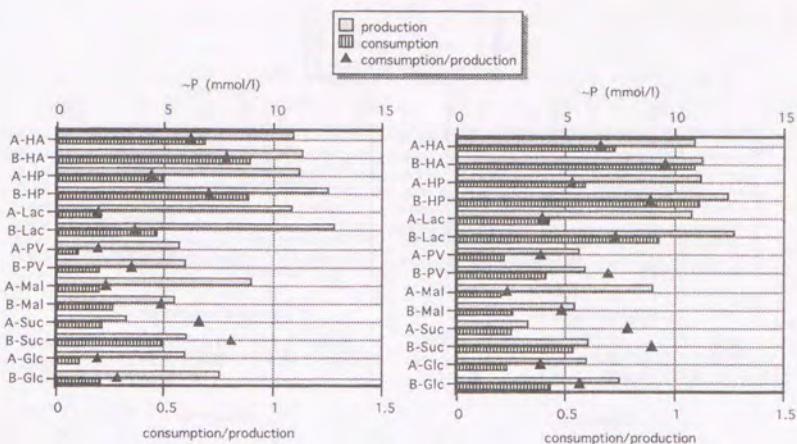
(1)～(4)それぞれの場合について、関与する諸反応 1 モルあたりの高エネルギーリン酸結合の生成・消費量を表 4-12 にまとめた。

表 4-9 と表 4-12 に基づいて計算したエネルギー収支を、図 4-18 および図 4-19 に示す。

表 4-12 嫌氣的有機物摂取に関与する反応における高エネルギーリン酸結合の生成・消費量

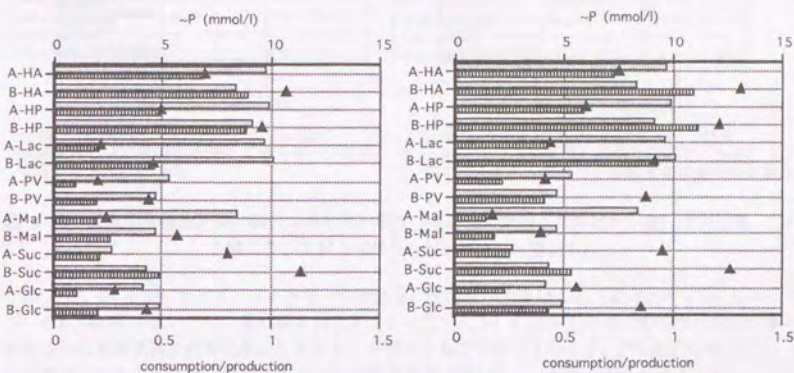
| 反応 | 反応1モルあたりの高エネルギーリン酸結合の生成・消費量 (mol P / mol) | | | |
|-----|---|--|--|---|
| | (1) 解糖が EMP 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際にエネルギーが生成も消費もされない場合 | (2) 解糖が EMP 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応 1 モルあたり 1 モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合 | (3) 解糖が ED 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際にエネルギーが生成も消費もされない場合 | (4) 解糖が ED 経路で行われ、ビルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応 1 モルあたり 1 モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合 |
| (a) | 3 | 3 | 2 | 2 |
| (b) | 0 | -1* | 0 | -1* |
| (d) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| (e) | -1 | -1 | -1 | -1 |
| (w) | 2 | 2 | 1 | 1 |
| (y) | -1 | -1 | -1 | -1 |
| (z) | -1 | -1 | -1 | -1 |

*：逆反応が行われる場合は 0



(1) 解糖がEMP経路で行われ、ピルビン酸をpropionyl-CoAに変換する際にエネルギーが生成も消費もされない場合

(2) 解糖がEMP経路で行われ、ピルビン酸をpropionyl-CoAに変換する際に反応1モルあたり1モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合



(3) 解糖がED経路で行われ、ピルビン酸をpropionyl-CoAに変換する際にエネルギーが生成も消費もされない場合

(4) 解糖がED経路で行われ、ピルビン酸をpropionyl-CoAに変換する際に反応1モルあたり1モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合

図 4-18 嫌氣的有機物摂取の際のエネルギー収支・その1 (酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸のについて表 4-9の(b1)および(g1)を用いた)

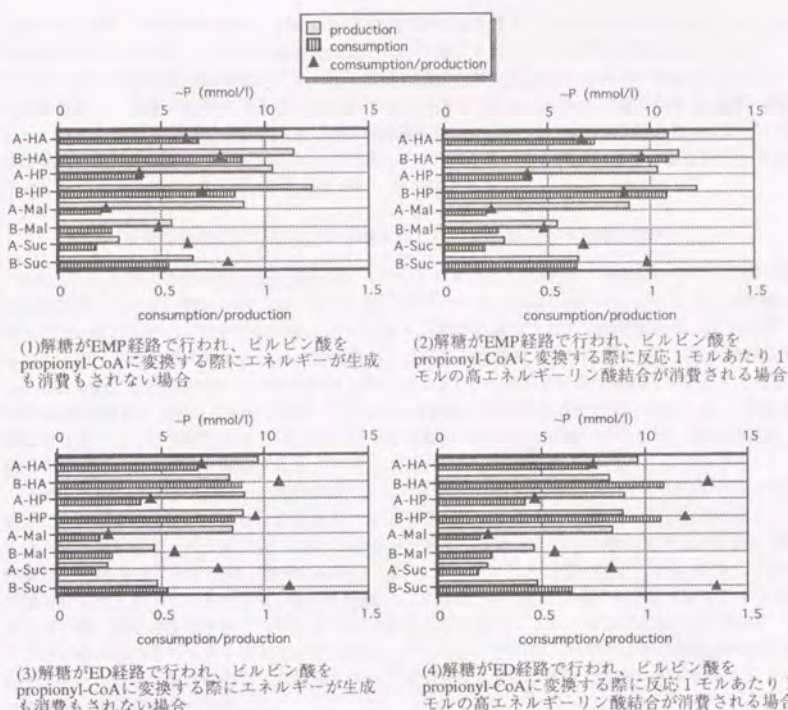


図 4-19 嫌氣的有機物摂取の際のエネルギー収支・その 2 (酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸について表 4-9 の(b2)および(g2)を用いた)

図 4-18、図 4-19 において、エネルギーの消費量/生成量が大きいき (1 に近いとき) はエネルギーの使用効率がよいこと、逆に小さいとき (0 に近いとき) にはエネルギーの利用に無駄が多いかあるいは基質摂取以外の代謝にエネルギーが利用されていることを示す。どの基質の場合にも、A 系の汚泥より B 系の汚泥の方がエネルギーの使用効率がよいという結果が得られた。しかし、このことからただちに 3HV 発酵菌の方が脱リン菌よりエネルギーの使用効率がよいと判断するわけにはいかないだろう。例えば、表 3-3 に示したように多くの研究者が脱リン汚泥による酢酸の嫌氣的摂取時のリン酸の放出量を報告しているが、その値にはばらつきが大きく、0.29~1.5 の間に散らばっている。そのことを考えれば、さらに多くの活性汚泥についてデータを蓄積して検証する必要があるだろう。

また、基質間で比較すると、乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、グルコースに比べて酢酸、プロピオン酸、コハク酸の摂取の方が基質摂取のエネルギー効率がよいという結果が得られた。乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、グルコースの場合は摂取された基質が acetyl-CoA と propionyl-CoA の両方になる。それに対して、酢酸、プロピオン酸、コハク酸の場合は acetyl-CoA と propionyl-CoA のどちらか一方にしかならない。摂取された基質から acetyl-CoA と propionyl-CoA の双方を生成しなければならないということが代謝制御に悪影響を与え、エネルギーの利用効率を落とすということが有り得

るのだろうか？本研究で用いた A 系や B 系の汚泥がたまたまそうだったのかもしれないので、この問題についても今後、さまざまな活性汚泥について検討を行っていく必要があるだろう。

エネルギーの消費量/生成量が 1 を上回る場合は基質摂取に必要なエネルギーが不足してしまうことを意味し、実際にはそのような状況は起こらないはずである。B 系の汚泥（3HV 発酵菌が卓越していると考えられる汚泥）では、ED 経路を解糖系として仮定した(3)や(4)の場合にエネルギーの消費量/生成量が 1 を上回っているケースがあった。このことから、3HV 発酵菌は解糖系として ED 系ではなく EMP 経路を用いている可能性が高いと判断できる。

4.5.2 A 系の汚泥でプロピオン酸発酵を行ったのは本当に脱リン菌なのか？

4.4.2 での A 系の汚泥を用いた実験結果から明らかなように、良好なリン除去を行う A 系の汚泥による乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの摂取の際には、プロピオン酸発酵が関与している。しかし、これらの実験において脱リン菌が直接プロピオン酸発酵を行っていたのではなく、脱リン菌以外の菌がこれらの有機物をプロピオン酸発酵により酢酸やプロピオン酸に変換し、それを脱リン菌が利用していたのかもしれない。また、A 系は良好なリン除去を行っていたが、仮に 3HV 発酵菌が共存していたとするとこれらの有機物を摂取したのが脱リン菌ではなく 3HV 発酵菌だったという可能性もある。そこで、ここでは脱リン菌がコハク酸・プロピオン酸発酵を行う能力を持っているかどうか議論する。

中間体として酢酸やプロピオン酸が生成し、それを脱リン菌が利用したという可能性については次の二つの否定的な証拠がある。すなわち、A 系の汚泥によるピルビン酸の摂取速度が酢酸・プロピオン酸と同程度だったこと（表 4-13）、および摂取 1 モルあたりのリン酸の放出量がピルビン酸の場合に 0.65 モルだったのに、酢酸の場合は 1.07 モル、プロピオン酸の場合は 1.64 モルとピルビン酸よりも大きかったことである。仮に中間体として酢酸、プロピオン酸が生成していたとすれば、ピルビン酸の摂取速度は酢酸・プロピオン酸の場合より小さく、また、リン酸の放出量は酢酸・プロピオン酸の場合より大きくなったはずである。これらのことから、ピルビン酸の嫌氣的摂取においてまずプロピオン酸発酵菌により酢酸、プロピオン酸が生成し、それを脱リン菌が利用したという可能性は否定できるだろう。

一方、A 系の汚泥中に 3HV 発酵菌が共存しており、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースを摂取していたのは脱リン菌ではなく 3HV 発酵菌だったという可能性も低いと考えられる。

その理由の一つとして、これらの基質を摂取する際の汚泥中の炭水化物の減少量を A 系と B 系で比べたとき、B 系の方が多かったことがあげられる。しかし、これらの基質を摂取するためには 3.2.2 で議論したように理論的にはほとんどエネルギーは必要ない。乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸を PHA に変換するために必要な高エネルギーリン酸結合は、基質 1 モルあたり 0 から最大でも乳酸の場合の 0.5 モルである。A 系で消費された量の糖が 3HV 発酵されたとすると、この程度のエネルギーは十分に供給されるはずなので、3HV 発酵菌により摂取が行われたという可能性は残されている。この場合、実際に観察されたリン酸の放出について説明する必要がある。酢酸のアナログであるヨード酢酸を脱リン汚泥に添加すると、ヨード酢酸は摂取されないにも関わらずポリリン酸が加水分解されることが知られている（松尾、宮、1987）。それと同じように、周囲の有機物濃度が上昇したことに脱リン菌が刺激されて、そのためにポリリン酸の加水分解と ATP の合成が促進されたと考えれば説明できる。

もう一つの理由として、A 系の汚泥によるこれらの基質の摂取速度が B 系の汚泥と比べて極端には低くないことがあげられる。表 4-13 によると A 系の汚泥による乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸の摂取速度は B 系のその 6 割から 8 割程度だが、A 系の汚泥中の 3HV 発酵菌がこれほどの速度で基質を摂取できるとすると、3HV 発酵菌はマイナーな微生物群ではなくむしろメジャーな微

生物群であるはずである。3HV 発酵菌が A 系汚泥中のメジャーな微生物群であるとする、A 系の汚泥が良好なリン除去を行うことを説明するのが難しくなる。しかし、A 系の汚泥による基質摂取が大部分がプロピオン酸発酵菌と脱リン菌の協同的な代謝により行われ、一部が 3HV 発酵菌により行われたという可能性は残される。

この一連の実験では脱リン菌がプロピオン酸発酵を行う機能を備えているという確かな証拠を得ることはできなかったが、脱リン菌がコハク酸・プロピオン酸発酵系を持っている可能性は非常に高いといえる。

表 4-13 A 系の汚泥による有機物摂取の比較

| | D系の汚泥 | | E系の汚泥 | |
|--------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| | mgC/gMLSS/h | 実験番号、算出法 | mgC/gMLSS/h | 実験番号、算出法 |
| 酢酸 | 27 | A-HA-1、最初の1時間 | 21 | B-HA-1、最初の1時間 |
| プロピオン酸 | 21 | A-HP-1、最初の1時間 | 25 | B-HP-1、最初の1時間 |
| 乳酸 | 3.9 | A-Lac-1、最初の4時間 | 5.4 | B-Lac-1、最初の4時間 |
| ビルビン酸 | 29 | A-PV-1、最初の1時間 | 43 | B-PV-1、最初の1時間 |
| リンゴ酸 | 6.7 | A-Mal-1、最初の4時間 | 8.7 | B-Mal-3、最初の4時間 |
| コハク酸 | 4.7 | A-Suc-3、最初の4時間 | 7.8 | B-Suc-1、最初の4時間 |
| グルコース | 6.2 | A-Glc-2、最初の4時間 | 14.0 | B-Glc-2、最初の2時間 |

4.5.3 3HV 発酵菌と脱リン菌の競合関係

嫌気好気活性汚泥中に脱リン菌にかわって 3HV 発酵菌が活性汚泥中に優占化すると、ポリリン酸が汚泥中に蓄積されなくなる分リン除去が行われなくなってしまう。そのため、嫌気好気式活性汚泥法により効果的なリン除去を行うためには脱リン菌と 3HV 発酵菌の競合関係を理解し、脱リン菌が確実に優占化するようにプロセスの設計・運転を行う必要がある。

本研究の範囲では、脱リン菌と 3HV 発酵菌の競合関係を明らかにするような実験は行わなかった。B 系の運転についてさえ、なぜ 3HV 発酵菌が優占化し、それが長期に渡って維持されたのかははっきりとした原因が分からない。B 系の運転条件はこれまで著者が行ってきた他の系列の運転条件とそれほど大きくは変わらないのである。

かつて報告されている 3HV 発酵菌の優占化が原因とみられる嫌気好気式活性汚泥法による生物学的リン除去の失敗報告を表 4-14にまとめた。

表 4-14の論文のなかで 3HV 発酵菌が優占化した理由が明確にわかっているのは Liu ら(1994)の場合だけである。Liu ら(1994)の条件ではリンが DNA、RNA、リン脂質など基本的な細胞構成成分を構成するために必要な最低限のレベルしか供給されなかった。従って、脱リン菌はポリリン酸を蓄積することができず、その結果、嫌気条件下で有機物を摂取することができなかった。一方 3HV 発酵菌は嫌気条件下での有機物摂取は影響を受けないので、そのために、3HV 発酵菌が優占化したと考えられる。

Cech and Hartman (1990, 1993) の条件では、流入水がグルコース主体のため、グルコースを 3HV 発酵により PHA に変換することによりポリリン酸を消費しなくてもグルコースを摂取することができる。この時、EMP 経路で解糖が行われればエネルギーはむしろ生成されるはずなので、恐らく嫌気条件下でのエネルギー源として細胞内にグリコーゲンを蓄積する必要さえないであろう。しかし一方で、脱リン汚泥がグルコースをポリグルコースとして蓄積する場合があることも知られている(深瀬ら, 1982; Nakamura et al., 1995)。すなわち、嫌気条件下でポリリン酸をエネルギー源としてグルコースを摂取し、ポリグルコースとして蓄積する微生物も存在するのである。3HV 発酵により

グルコースを取り込むのとポリリン酸を利用してグルコースを取り込むのではどちらがどのような条件下で有利なのか、わからない。結局、彼らのリアクターで 3HV 発酵菌が優占化した理由としては最初に接種された活性汚泥中の微生物相が大きな影響を与えているのだらうというぐらいにしか推測できない。

Fukase et al. (1985) の場合は長い水理学的な滞留時間が何らかの影響を及ぼして 3HV 発酵菌の優占化を促した。しかし、水理学的滞留時間が 3HV 発酵菌の優占化を促進したメカニズムは不明である。

3HV 発酵菌と脱リン菌は、嫌氣的有機物摂取機構が非常に似かよっており、両者の違いはポリリン酸の代謝を行うか否かと、コハク酸・プロピオン酸発酵系の活性だけであると考えられる。これだけのことから両者の競合関係を考察するのは非常に困難である。著者が現在抱いている考えを次に述べる。

まず、嫌気条件下での有機物摂取速度における違いについてである。ポリリン酸を用いた基質摂取ではポリリン酸を加水分解するだけでエネルギーを取り出せる。それに対して 3HV 発酵によるエネルギー生成は非常に多くの反応を経る必要がある。そのため、エネルギーの取り出しやすさからいえば 3HV 発酵よりポリリン酸の加水分解の方が有利だろう。このことから、一般的にいって脱リン菌の方が 3HV 発酵菌より速やかに有機物摂取を行うことができると予想できる。もっとも、3HV 発酵に必要な酵素をたくさん持っていれば 3HV 発酵菌でも脱リン菌より速やかに基質摂取を行う場合もあるだろう。

流入水の基質組成に関しては、摂取のために必要なエネルギーが少なければ少ないほど前述の 3HV 発酵菌の不利な点、すなわちエネルギー供給速度上の弱点が小さくなると考えられる。そのため、ビルビン酸やリンゴ酸、乳酸が多く含まれる流入水では 3HV 発酵菌と脱リン菌のどちらが優占化しても不思議はないかもしれない。これらの有機物の摂取において、代謝系が理想的に働けば理論的には高エネルギーリン酸結合はまったく消費されない。また、プロピオン酸発酵系を備えていない微生物は、他の細菌が発酵して酢酸、プロピオン酸に変換するのを待たなければいけない。そのため、これらの基質の摂取のためにはプロピオン酸発酵系を備えていた方が都合がいい。従って、この点からすると 3HV 発酵菌はこのような流入水にもともと適応しやすいといえるだろう。しかし、このことがすぐに脱リン菌より 3HV 発酵菌の方が有利だということにはつながらないと思う。前の項での議論で述べたように、脱リン菌がプロピオン酸発酵系を備えている可能性はかなり高いのである。

好気条件下での代謝に目を移すと、3HV 発酵菌の場合はグリコーゲンを再合成するだけでよいが、脱リン菌の場合はグリコーゲンとポリリン酸の両方をバランスよく再合成する必要がある。好気条件下での代謝に関しては、代謝制御が簡単で 3HV 発酵菌に分がありそうである。好気条件下でのグリコーゲンやポリリン酸の再生速度が 3HV 発酵菌と脱リン菌でどの程度違うのか、実測されたデータはない。しかし、好気条件下でいくら 3HV 発酵菌が脱リン菌より速やかに蓄積物質の再生ができたとしても、嫌気条件下で他の微生物よりはやく有機物を摂取することの方が優占化するために重要な因子だろう。

栄養要求性からみると、プロピオン酸発酵を行うためにはピオチンやビタミン B₁₂ のような成分が必要である。ピオチンは (S)-methylmalonyl-CoA-pyruvate transcarboxylase および (R)-methylmalonyl-CoA decarboxylase により、また、ビタミン B₁₂ は (R)-methylmalonyl-CoA mutase により要求される。これらの成分の利用可能量が少ない場合には 3HV 発酵菌は増殖しにくいのではないだろうか。

代謝阻害物質を介した競合関係も考えられる。ある種の高等植物は根からある種の化学物質を分泌し、根圏の微生物群集を制御することが知られている (Rice, 1984)。このような化学物質を介した生物種間の相互作用はアレロパシーといわれ、特に高等植物については農地の生産性の向上と関連して広く研究されている。足立らは脱リン能力を失った嫌気好気汚泥に嫌気条件下で有機物を十分に取り込んだ脱リン菌を添加して好気条件下でのリン酸の取り込み速度を検討したところ、汚泥

の添加によりリン酸の取り込み速度が低下したという報告をしている。この現象を彼らはやはり化学物質による微生物間の相互作用だと結論している。どのような成分が関与しているのか、今後は是非とも明らかにする必要があるだろう。

表 4-14 3HV 発酵菌が優占したと思われる汚泥に関する報告

松尾ら(1982)

し尿処理を模擬した嫌気好気式活性汚泥法の実験(A系とB系)で、恐らく最初に接種した汚泥の違いによりA系では良好なリン除去が行われ、B系では行われなかった。嫌気条件下での有機物除去はA系、B系のいずれにおいても観察された。A系とB系は接種汚泥の他希釈水の投入位置も異なっていた。

Fukase et al.(1985)

酢酸、ペプトン、酵母エキスを主体とする人工下水を流入水とする嫌気好気式活性汚泥プロセスのUnit AとUnit Bを運転した。Unit Aは流入水BOD135mg/l程度、水理学的滞留時間4.5時間で運転し、Unit Bは運転開始後2ヵ月ほどUnit Aと同様の条件で運転した後、流入水BOD濃度を650mg/l程度にし、水理学的滞留時間を22時間から23時間とした。その結果、Unit BはUnit Aと同じ運転条件下では良好なリン除去を行ったが、水理学的滞留時間を長くしてからリン除去が悪化した。しかし、嫌気条件下での有機物除去は行われていた。

Cech and Hartman(1990, 1993)

酢酸主体の人工下水を投与した系列(Reactor F)とグルコース主体の人工下水を投与した系列(Reactor G)を運転したところ、Reactor Fは良好なリン除去を行ったが、Reactor Gではリン除去が行われなかった。嫌気条件下での有機物摂取はReactor FでもReactor Gでも行われていた。

Liu et al.(1994)

酢酸主体の人工下水中のリンの量を制限することにより、ポリリン酸の蓄積を行わない嫌気条件下で有機物摂取を行う活性汚泥を得た。

このような、脱リン菌と3HV発酵菌が別種の菌だと想定した議論とは別に、これらの細菌が本当にまったく別の菌なのか、という問題も残されていると思う。生育条件によって嫌気条件下でのエネルギー源をポリリン酸の加水分解に依存したり3HV発酵に依存したり、使い分けるものがないものではないだろうか？今後、解き明かされるべき課題だろう。

4.6 まとめ

実験室で人工下水を用いて嫌気好気式活性汚泥を馴致した。馴致の結果、良好なリン除去を行い、嫌気条件下でポリリン酸を消費しつつ有機物摂取を行う汚泥(A系)と、通常の活性汚泥程度のリン除去しか行わず、ポリリン酸を消費せずに顕著に嫌氣的有機物摂取を行う汚泥(B系)を得た。これらの汚泥に嫌気条件下で酢酸、プロピオン酸、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、またはグルコースを投与し、関連代謝物質の経時変化を追跡した。関連代謝物質として、投与した有機物の上澄水溶液中の残存濃度、上澄水中のリン酸、及び汚泥中の炭水化物をPHAの挙動を追跡した。

得られた実験結果を3章で検討した代謝機構のモデルと比較したところ、物質収支、および酸化還元収支についてモデルからの予測と実験結果が良好な一致が見られた。このことは、3章で提案したモデルにより、嫌氣的有機物摂取に関わる代謝機構の全てとはいわないまでも主要な部分を説明できることを示している。得られた知見をまとめると、次のようになる。

1. 良好な脱リンを行う嫌気好気汚泥(A系の汚泥)による酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取には、Minoら、およびArunらの提唱したようにグリコーゲンの解糖が還元力の供給源として関与している。摂取された、酢酸はいったん acetyl-CoA となり、また、プロピオン酸は propionyl-CoA となり、縮合されて 3-oxoacetyl-CoA となった後、解糖から供給される還元力により還元され、重合されて PHA となる。propionyl-CoA の生成される経路としてコハク酸・

プロピオン酸経路が用いられたと推測される。グリコーゲンの解糖により生成されるビルビン酸は acetyl-CoA を経て PHA に組み込まれる。蓄積される PHA の成分として、著者が修士課程の研究で明らかにしたように酢酸が摂取される場合は 3HB 主体、そしてプロピオン酸が摂取される場合はほぼ等モル量の 3HV と 3H2MV となる。基質摂取に必要なエネルギーは基本的にはポリリン酸の加水分解によりまかなわれるが、解糖によってもエネルギーが供給される。

2. 良好な脱リンを行う嫌気好気汚泥 (A 系の汚泥) による乳酸、ビルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースの嫌氣的摂取機構は、解糖系、PHA 合成系、ポリリン酸の加水分解による ATP 供給系の他に、コハク酸・プロピオン酸経路が関与すると考えることで説明することができた。すなわち、乳酸、ビルビン酸、グルコースの場合は、摂取された後に全て acetyl-CoA をへて PHA に組み込まれるとすると、還元力が過剰になってしまう。ここで、コハク酸・プロピオン酸経路により摂取された基質の一部が propionyl-CoA を経て PHA になり、その際に過剰の還元力を消費すると考えると、酸化還元収支をあわせることができる。実験結果はこの代謝機構を支持していた。リンゴ酸の場合は、摂取された後、大部分はコハク酸・プロピオン酸発酵により propionyl-CoA となり、また、残りはコハク酸・プロピオン酸発酵系を逆行してビルビン酸を経て acetyl-CoA をへて PHA に変換されたようである。コハク酸の場合はコハク酸・プロピオン酸発酵系を逆行することなく、全て propionyl-CoA をへて PHA に組み込まれた。4.5.2 で議論したように、脱リン菌が本当にコハク酸・プロピオン酸発酵系を備えているのかどうかは、今回の実験結果だけでは断定することはできなかった。しかし、脱リン菌がコハク酸・プロピオン酸発酵系を持っている可能性は非常に高いといえる。
3. ポリリン酸を消費することなく顕著な嫌氣的有機物摂取を行う汚泥 (B 系の汚泥) による嫌氣的有機物摂取は、EMP 経路による解糖系、コハク酸・プロピオン酸発酵系、そして PHA 蓄積系の代謝の組み合わせにより説明できることが明らかになった。嫌氣的有機物摂取のエネルギー源として、グリコーゲンを解糖し、生成されたビルビン酸 (またはホスホエノールビルビン酸) の半分以上を acetyl-CoA に、残りの半分以上を恐らくはコハク酸・プロピオン酸発酵により propionyl-CoA とし、acetyl-CoA と propionyl-CoA を縮合・還元・重合して PHA とする間にエネルギーを生成する 3HV 発酵が存在することが明らかになった。
4. 脱リン菌と 3HV 発酵菌の競合関係を明らかにすることは、嫌気好気式活性汚泥法によるリン除去を確実にしめるために必須である。今後、その解明のために重点的な研究がなされるべきである。

5 パイロットプラントの汚泥による回分式実験

活性汚泥中の微生物相は流入水の濃度や組成、運転条件、環境条件などに大きく影響される。そうしたことを考えると、実験室で観察されたことが実際の水処理の現場でも観察されるか確認しておく必要がある。

ここではカナダの British Columbia 大学 (UBC) のパイロットプラントの汚泥を用いて、嫌氣的有機物摂取代謝モデルの検証実験を行った結果について述べる。実験において特に注目した点は以下の通りである。

- 嫌氣的有機物摂取に解糖が関与しているか
- 嫌氣的に摂取された有機物の物質収支、および摂取の際の酸化還元収支が成立するか

5.1 パイロットプラントの概要

UBC のパイロットプラントは、反応槽の規模 2.5t の生物学的栄養塩除去プロセスである。嫌気好気式活性汚泥法による脱リンと硝化脱窒法による窒素除去を同時に行うことを目的としており、図 5-1 に示すように反応槽は嫌気部、無酸素部（脱窒部）、好気部に分けられている。生物学的栄養塩除去プロセスには A_2O プロセス、Bardenpho プロセスなどが知られているが、このプロセスはそうした中では UCT (University of Cape Town) プロセスといわれるものである。流入水は発酵槽で最初沈殿地の汚泥と混合され、発酵された後、最初沈殿地を経て反応槽に導かれた。発酵槽での発酵により、流入水中の有機酸濃度は酢酸として 15mg/l 程度増加する。

流入水は大学近辺の住宅地から排出される家庭排水を下水管から 1 日 1 回貯蔵タンクにポンプアップして蓄えたものである。これにより、貯蔵槽内で起こる発酵を除けば一日中ほぼ同じ水質の流入水が一定の流速で反応槽に供給された。

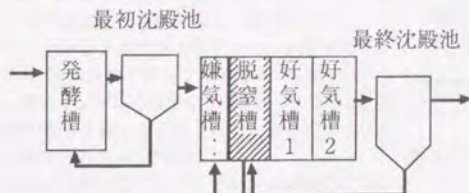


図 5-1 UBC パイロットプラントの概要

汚泥滞留時間は 5 日～10 日、水理的滞留時間は 6 時間程度であり、汚泥滞留時間、水理的滞留時間などの運転条件は研究期間中に若干変更があったものの、実験の間中は $MLSS 1000mg/l \sim 2000mg/l$ 、リン含有率は 3～4% 程度であった。

5.2 回分式実験の方法

パイロットプラントの汚泥を用いて行った回分式実験の一覧を表 5-1 に示す。それぞれの実験で、

比較のために対照として有機物の添加を行わない実験を行った。

表 5-1 バイロットプラントの汚泥を用いて行った回分式実験

| Date | Exp. No. | MLSS (mg/l) | P content (% of MLSS) | Substrate (Conc.) | Condition |
|--------------|---|-------------|-----------------------|---|--|
| Apr 9, 1994 | P-HA-1 P-Blk-1 | 1150 | 2.7 | acetate (12mgC/l) control | 2 hours Anaerobic |
| Apr 18, 1994 | P-HA-2 P-HP-1 P-Blk-2 | 1250 | 3.3 | acetate (15mgC/l) propionate (16mgC/l) control | 3 hours Anaerobic |
| May 24, 1994 | P-HA-3 P-HP-2 P-Mal P-Blk-3 | 1800 | 2.9 | acetate (15mgC/l) propionate (14mgC/l) malate (10mgC/l) control | 3 hours Anaerobic |
| May 26, 1994 | P-Lac P-PV P-Suc P-Blk-4 | 1700 | 2.9 | lactate (14mgC/l) pyruvate (14mgC/l) succinate (13mgC/l) control | 3 hours Anaerobic |
| July 2, 1994 | P-HA-4 P-HP-3 P-sewage P-Blk-5 | 2000 | 2.8 | acetate (12mgC/l) propionate (16mgC/l) fermented sewage control | 2 hours Anaerobic + 3 hours Aerobic |

回分式実験の方法は、基本的には前章で述べた実験室汚泥の場合と同じである。ただし、実験に用いる装置の違いや汚泥の挙動の違いがもとで、方法を多少変更した。以下に、その要点を列挙する。

- リアクター内に残存している溶存酸素、硝酸、亜硝酸の影響を防ぐために、実験に先立って 5 時間～6 時間程度密封したまま攪拌し、内生呼吸による脱酸素、脱氮をおこなった。
- サンプリングのために、先割れのホールビベットを用いるのではなく、窒素ガスを充填した風船により内部を加圧して、サンプリングチューブの先から出てきた試料を細い試験管に受けた（図 5-2）。サンプリング用試験管は内径約 5mm、体積 5.8ml である。定量的にサンプリングする必要がある場合はこの試験管にサンプルを満たしてとり、それを別のサンプル保管用の試験管にうつしとったが、その際のサンプルの体積を 5.8ml として扱った。実際にサンプル採取の操作を繰り返しおこなったときのサンプル採取量の繰り返し再現性を表 5-2 に示す。
- PHA および炭水化物の分析に供するサンプルは、採取後ただちに

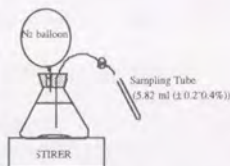


図 5-2 回分式実験におけるサンプリングの方法

表 5-2 サンプリング用試験管のサンプル採取量の誤差

| | 1回目の測定 | 2回目の測定 |
|---------|--------|--------|
| 繰り返し回数 | 10 | 10 |
| 標準標準偏差 | 0.023 | 0.011 |
| 平均値 | 5.82 | 5.82 |
| 変動係数(%) | 0.39 | 0.18 |

硫酸を加えた試験管に移し、pH2 以下にして微生物活動を停止した。炭水化物分析用のサンプルはそのまま分析まで密栓して保存した。また、PHA 分析用のサンプルは遠心分離により汚泥を上澄水から分離して凍結乾燥に供した。なお、上澄水分析用のサンプルは、別にサンプルを採取し、遠心分離を2回行うことによりSSを取り除いた。(初期の実験ではろ紙を用いて固液の分離を行っていたが、ろ紙からの溶出が無視できないレベルだったため遠心分離法を採用した。)

- パイロットプラント汚泥を用いた回分式実験のPHAサンプルの加メチル化分解の条件およびガスクロの分析条件は、4章で述べた実験室汚泥の場合と若干異なる。PHAの分析において、メチル化分解の条件を次のように変更した。すなわち、メチル化分解する際に加える硫酸酸性メタノールの硫酸の濃度を20%から10%に下げ、そのかわり、分解の時間を100℃のオーブン中で20~24時間とした。
- リン酸はアスコルビン酸法、亜硝酸はスルファニルアミド・ナフチルエチレンジアミン法、硝酸はカドミウムカラムを用いて亜硝酸とした後、スルファニルアミド・ナフチルエチレンジアミン法、アンモニアはインドフェノール法 (phenate method) を用いて分析した。分析法はすべて Standard Methods の対応する項目の自動化法を用いた。
- 汚泥内炭水化物の分析は、分析の信頼性を高めるために一つのサンプルを複数回分析した。

5.3 各種有機酸の嫌氣的摂取

5.3.1 結果

94年5月24日に行った酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸を基質として用いた回分式実験の結果を図5-3に、5月26日に行った乳酸、ビルビン酸、コハク酸を基質とした回分式実験の結果を図5-4に、そして、これらの実験での嫌氣的有機物摂取に伴い生成されたPHAの組成を図5-5に示す。

図5-3(a)、図5-4(a)に示されるように、どの有機物を用いた場合にも、投与された炭素は3時間以内にほぼ全量摂取された。また、ビルビン酸、コハク酸の場合、投与した有機物は投入直後のサンプルを採取するまでの数分の間にほとんどなくなった。乳酸についても投与した量の半分ほどが投与後数分で消失した。

図5-3(b)、図5-4(b)に示したように、有機物の摂取に伴ってリン酸の放出が観察されたが、その量は酢酸、プロピオン酸の場合にもっとも多かった。また、乳酸、ビルビン酸、コハク酸の場合は、サンプル投与直後のリン酸濃度を欠測してしまったために断定できないが、プロットの様子から見て初期の急速な摂取はリン酸の放出を伴っておらず、リン酸は初期の有機物摂取の後ゆっくりと放出されたようである。

図5-3(c)、図5-4(c)に示したように酢酸の嫌氣的摂取に伴って汚泥中の炭水化物の減少が観察された。その他の有機物の場合も減少したが、その量は対照実験と比べると同レベルであった。

図5-3(d)、図5-4(d)に示したPHAの経時変化から、嫌氣的有機物摂取の結果PHAが増加したことがわかる。また、対照実験でもPHAの増加がわずかに見られた。乳酸、コハク酸の場合には、初期の急速な摂取から1時間以上経過してからもPHAの増加が見られた。ビルビン酸の場合には、PHAが増加したのは基質投与後の1時間以内であった。

図5-5に示したように、蓄積されたPHAの組成は酢酸の場合3HBが約3/4で、残りは3HVであった。また、プロピオン酸の場合は3HVが3/5程度、3H2MVが2/5程度であった。リンゴ酸、乳酸の場合は3HVが蓄積されたPHAのほぼ8割を占め、残りは3HBだった。ビルビン酸の場合は3HBと3HVがほぼ等量だったが3HVの方が若干多かった。コハク酸の場合3HVが7割と3H2MVが3割程度の組成のPHAが蓄積された。また、対照実験では3HVが主体のPHAが蓄積された。

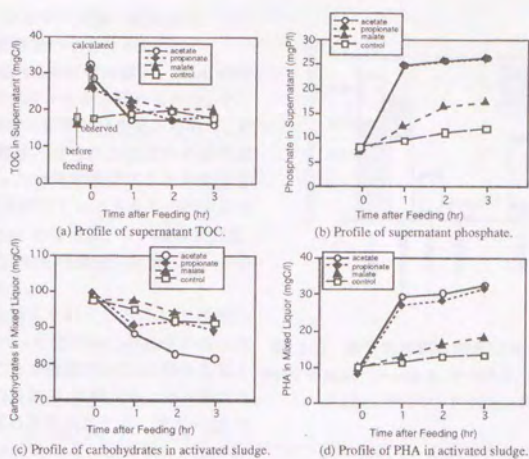


図 5-3 パイロットプラントの活性汚泥による酢酸、プロピオン酸およびリンゴ酸の嫌氣的摂取 ('94.5.24 に行われた P-HA-3、P-HP-2、P-Mal、P-Bik-3)

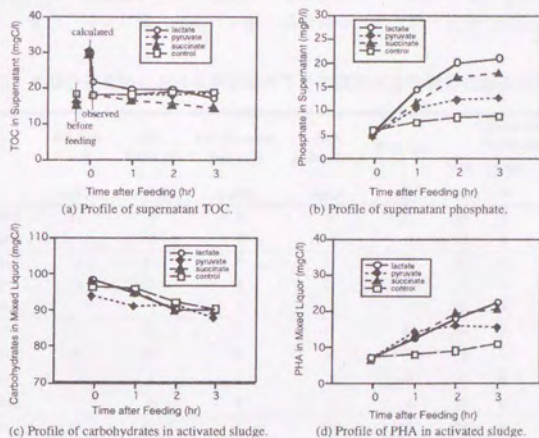


図 5-4 パイロットプラントの活性汚泥による乳酸、ビルビン酸、およびコハク酸の嫌氣的摂取 ('94.5.26 に行われた P-Lac、P-PV、P-Suc、P-Bik-4)

表 5-3に、行った回分式実験の嫌気条件下での関連代謝物質の変動量の概要を示した。

対照実験で汚泥内炭水化物の減少、PHA の増加、リン酸の放出が僅かながら認められた。そこで、投与した有機物の影響だけを見るために、有機物を投与した実験で得られた各成分の変化量から同じ日に行った対照実験で得られた変化量を差し引いて、基質摂取1モルあたりの貯蔵炭水化物の減少量、PHA の蓄積量、リン酸の放出量、そして蓄積された PHA の組成を計算した。その結果を表 5-4に示す。

対照実験による補正を行うことにより、酢酸とプロピオン酸については明確に汚泥中の炭水化物量が減少することが確認できた。酢酸を基質として行った4回の実験で、酢酸摂取1モルあたり、炭水化物の減少量は平均0.2モル、最大0.25モル、最小0.13モルであった。プロピオン酸の場合には3回の実験で、摂取1モルあたり、炭水化物の減少は平均0.14モル、最小0.06モル、最大0.20モルだった。数字に大きなばらつきがあるのは、汚泥中の微生物が行っている代謝の違いを反映しているのか、それとも単に分析上の誤差に由来するのか、明らかではない。汚泥中の炭水化物の分析は、場合によっては測定値に5%近い誤差が出てしまうときもあったからである。

その他の有機物については乳酸、コハク酸については摂取1モルあたり0.1モル程度の炭水化物の減少が見られた。また、リンゴ酸、ビルビン酸の場合はほとんど炭水化物の消費は見られなかった。

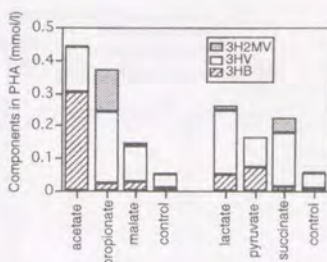


図 5-5 嫌気的有機物摂取に伴って蓄積された PHA の組成 (P-HA-3、P-HP-2、P-Mal、P-Bik-3、P-Lac、P-PV、P-Suc、P-Bik-4)

表 5-3 各回分式実験における嫌気条件下での関連代謝物質の変動量の概要

| | Substrate Fed | DOC Taken Up | Carbohydrates Consumed | PHA Accumulated | Phosphate | Composition of the Accumulated PHA | | | |
|---------------|---------------|--------------|------------------------|-----------------|-----------|------------------------------------|-------|-----|-------|
| | | | | | | 3HB | 3H2MB | 3HV | 3H2MV |
| | | mgC/l | mgC/l | mgC/l | mgP/l | % | % | % | % |
| Apr. 9, 1994 | P-HA-1 | 12 | 9 | 8 | 12 | 11 | 80 | 0 | 20 |
| | P-Bik-1 | | -2 | 4 | 1 | 1 | 58 | 0 | 33 |
| Apr. 18, 1994 | P-HA-2 | 15 | 11 | 9 | 15 | 18 | 82 | 0 | 18 |
| | P-HP-1 | 16 | 15 | 4 | 20 | 19 | 2 | 0 | 56 |
| | P-Bik-2 | | 1 | 2 | 1 | -0 | 100 | 0 | 0 |
| | P-HA-3 | 15 | 16 | 17 | 23 | 19 | 68 | 0 | 30 |
| May 24, 1994 | P-HP-2 | 14 | 13 | 10 | 24 | 19 | 6 | 0 | 59 |
| | P-Mal | 10 | 6 | 5 | 9 | 10 | 20 | 0 | 74 |
| | P-Bik-3 | | 0 | 5 | 3 | 4 | 18 | 0 | 71 |
| | P-Lac | 14 | 12 | 8 | 15 | 16 | 19 | 0 | 76 |
| May 26, 1994 | P-PV | 14 | 12 | 6 | 8 | 8 | 47 | 0 | 60 |
| | P-Suc | 14 | 15 | 8 | 14 | 13 | 5 | 0 | 75 |
| | P-Bik-5 | | -0 | 6 | 4 | 3 | 14 | 0 | 76 |
| | P-HA-4 | 12 | 11 | 10 | 14 | 17 | 72 | 0 | 26 |
| July 2, 1994 | P-HP-3 | 15 | 14 | 7 | 20 | 17 | 3 | 0 | 65 |
| | P-sewage | | 6 | 9 | 15 | 13 | 41 | 0 | 54 |
| | P-Bik-5 | | -2 | 3 | 4 | 2 | 29 | 0 | 60 |

表 5-4 パイロットプラント汚泥による有機物摂取のまとめ

| | Carbohydrates Consumed | PHA Accumulated | Phosphate Released | Composition of the Accumulated PHA | | | |
|--------|------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------------|-------|-----|-------|
| | | | | 3HB | 3H2MB | 3HV | 3H2MV |
| | | | | mmol / mmol substrate uptake | | | % |
| P-HA-1 | 0.13 | 0.62 | 0.87 | 81 | 0 | 19 | 0 |
| P-HA-2 | 0.20 | 0.60 | 1.27 | 80 | 0 | 20 | 1 |
| P-HA-3 | 0.25 | 0.57 | 0.70 | 75 | 0 | 25 | 0 |
| P-HA-4 | 0.22 | 0.49 | 1.05 | 84 | 0 | 16 | 0 |
| P-HP-1 | 0.06 | 0.71 | 1.47 | 0 | 0 | 57 | 43 |
| P-HP-2 | 0.22 | 0.90 | 1.38 | 4 | 0 | 57 | 39 |
| P-HP-3 | 0.14 | 0.67 | 1.18 | 0 | 0 | 64 | 36 |
| P-Mal | 0.00 | 0.69 | 1.51 | 21 | 0 | 75 | 4 |
| P-Lac | 0.11 | 0.58 | 1.18 | 20 | 0 | 76 | 3 |
| P-PV | 0.01 | 0.35 | 0.49 | 58 | 0 | 42 | 0 |
| P-Suc | 0.10 | 0.54 | 1.01 | 2 | 0 | 75 | 23 |

酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取の際の化学量論比を有機物摂取量 1 モルあたりに直すと、表 5-5 のようになる。実験室汚泥の場合に比べてばらつきが大きかったが、傾向としては基質摂取量、解糖量、PHA 蓄積量の比は還元力が EMP 経路または ED 経路による解糖により供給されるとした場合の理論値である 6:1:4 におおむね近い値となった。

acyl-CoA の生成量と消費量、およびそれらの比を図 5-6 に示す。物質収支はおおむねとれていたとはいえ、分析精度の問題もあって実験室汚泥の場合ほどきれいな結果にはならなかったが、それでも消費量/生成量の値はおおむね 1 ± 0.4 の範囲に入った(平均値 0.98、標準偏差 0.24)。分析精度上の問題としてバックグラウンドの DOC が高かったにもかかわらず有機物の摂取量を DOC に基づいて計算したこと、汚泥中の炭水化物の減少量の測定もバックグラウンドが高く変化量がバックグラウンドのせいぜい 1~2 割程度であったことがあげられる。また、PHA の測定は他の指標に比べて誤差の要因が少ないと考えられるが、酢酸の場合に回収率が低く、プロピオン酸の場合に

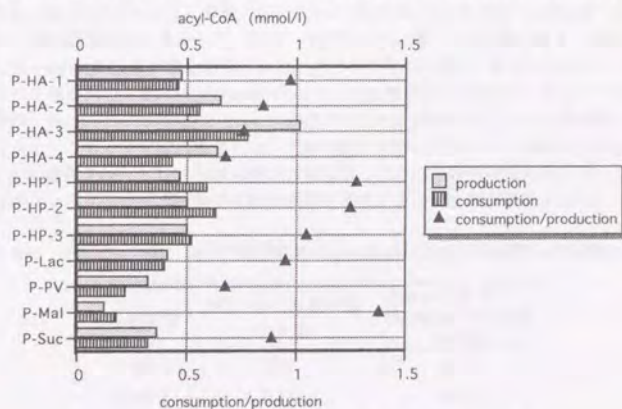


図 5-6 acyl-CoA の生成・消費に基づく物質収支

回収率が高かったことから見てキャリブレーションの方法に問題があったのかもしれない。

蓄積された PHA の組成に注目してみる。

酢酸の場合、3HV 発酵が起きている場合を除けば 3HB のみを含む PHA が蓄積されるはずである。4 章で述べた実験室汚泥の場合には、それでも 10% ほど 3HV が蓄積され、また 3HV 発酵の起きていた E の汚泥では 3HV と 3H2MV をあわせて 25% を超える値になった。パイロットプラントの汚泥は嫌氣的有機物摂取に伴った顕著な量のリン酸を放出したので、3HV 発酵が顕著に起きていたとは思えないが、それでも実験室汚泥のポリリン酸蓄積汚泥に比べて多くの 3HV が蓄積された (表 5-4)。考えられる原因の一つとして、プロピオン酸が汚泥混合液中に残存していたさまざまな成分の嫌気性発酵に伴って供給されたということがあるかもしれない。しかし、その割には蓄積された PHA の量は理論値 (基質摂取 1 モルあたり 4/6 = 0.67 モル) より小さかった。

表 5-5 酢酸、プロピオン酸の嫌氣的摂取時の関連代謝物質の代謝量 (基質摂取 6 モルあたりに換算)

| | Carbohydrates Consumed | PHA Accumulated | Phosphate Released |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|
| mmol / 6mmol substrate uptake | | | |
| Theoretical | 1 | 4 | 3 or larger |
| P-HA-1 | 0.81 | 3.73 | 5.21 |
| P-HA-2 | 1.23 | 3.60 | 7.64 |
| P-HA-3 | 1.48 | 3.43 | 4.21 |
| P-HA-4 | 1.30 | 2.93 | 6.28 |
| average | 1.20 | 3.42 | 5.83 |
| P-HP-1 | 0.34 | 4.27 | 8.83 |
| P-HP-2 | 1.33 | 5.43 | 8.26 |
| P-HP-3 | 0.82 | 4.02 | 7.06 |
| average | 0.83 | 4.57 | 8.05 |

プロピオン酸、コハク酸については実験室汚泥での結果と同じく 3HV と 3H2MV の蓄積が観察された。しかし、表 5-4 に示すように蓄積された PHA の組成は、3.2 節で述べた理論値 (3HV : 3H2MV = 1 : 1) より 3HV の割合が大きかった。投入したプロピオン酸、コハク酸の量と、蓄積された PHA から計算した propionyl-CoA の量を比較すると、表 5-6 のようになる。摂取されたコハク酸、プロピオン酸はコハク酸の場合を除けば propionyl-CoA として直接 PHA に変換されたことがわかる。コハク酸の場合は、propionyl-CoA 経由で PHA に変換されたのは摂取されたコハク酸の約 3 分の 2 だという結果である。プロピオン酸の場合とコハク酸の場合を併せてみると、生成された propionyl-CoA が acetyl-CoA に変換されたために 3HV の割合が高くなったという説明は成り立たないようである。活性汚泥中のタンパク質や炭水化物から加水分解や発酵によって酢酸が供給されたという可能性は

表 5-6 プロピオン酸、コハク酸摂取時の propionyl-CoA の生成量と消費量の比較

| 実験番号 | 摂取された基質の量 (mmol/l) | PHA に変換された propionyl-CoA の量 (mmol/l) |
|--------|-----------------------|--|
| P-HP-1 | 0.42 | 0.43 |
| P-HP-2 | 0.35 | 0.43 |
| P-HP-3 | 0.40 | 0.36 |
| E-Suc | 0.31 | 0.20 |

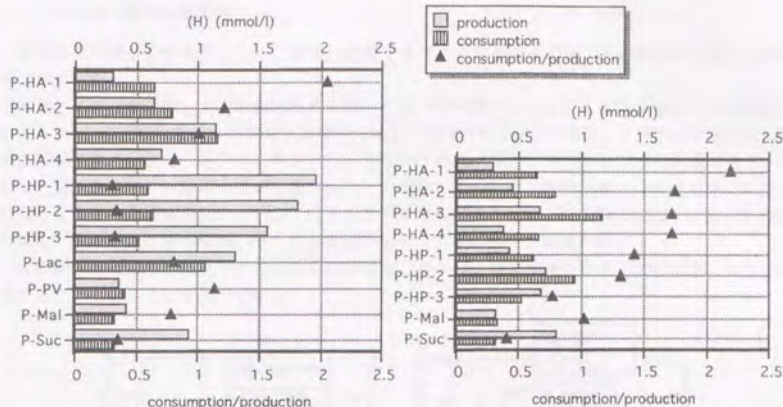
ある。しかし、ここでは既に何も有機物を投与しない場合の実験結果を差し引いて議論しているので、そのような説明も説得力に欠ける。

リンゴ酸、乳酸の場合には理論値(3HVのみ生成)より3HBの割合が多かった。これも、コハク酸、プロピオン酸の場合と同じく、予想よりも多く acetyl-CoA が供給されたことを示している。ただし、これらの有機物の場合には過剰に生成された還元力を消費するような経路が存在しさえすれば説明が可能である。例えば、多量の NAD を持っていれば、ある程度は過剰の還元力を NADH としてブールすることができるであろう。また、微量に混入した酸素を利用して過剰の還元力を消費することもできるかもしれない。実際、投入した有機物の量が実験室汚泥の場合 MLSS の約 1/10 のオーダーの量だったのに対し、パイロットプラントの汚泥による実験ではその十分の一に近い量しかなかった。そのため、酸素の混入による実験誤差も生じやすく、微生物の持っている NAD/NADH 系による還元力の保持機構も、実験結果に影響を与えやすくなっている。

一方、ビルビン酸の場合は解糖がない場合には 3HB:3HV が 2:1 となるはずだったが、実際に蓄積された PHA 中にはそれより多くの 3HV が見いだされ、3HB:3HV=3:2 程度であった。この実験結果は説明しにくい。汚泥に有機物を投与する直前の状態で汚泥が NADH のような還元力を多量に貯め込んでいたとすれば説明できなくもない。

いずれにせよ、代謝される有機物の量が微量であり、分析精度の限界のところで行った実験なので、これ以上の議論は難しい。参考までに 4.5.1 項で考察した方法により計算した酸化還元収支とエネルギー収支を図 5-7 と図 5-8 に示す。エネルギー収支に関してはほぼ妥当な結果が得られたが、酸化還元収支は計算法により結果が大きく異なった。酸化還元収支があわなかった理由として、実験系への酸素の混入の可能性、分析上の誤差、活性汚泥中の不純物の影響といったことの他に、4.5.1 項で想定した代謝機構とは異なる代謝機構が存在することも考えられる。その例として、酢酸の摂取の場合にはグリオキシル酸経路、プロピオン酸の場合には propionyl-CoA の acetyl-CoA への酸化といったものが考えられる。また、摂取する有機物量が少なくなればなるほど、前述した NAD/NADH 系による酸化還元バランスの緩衝が果たす役割が大きくなるだろう。

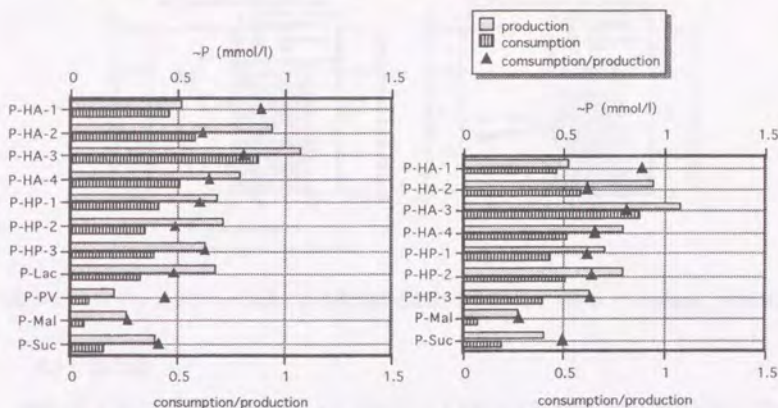
しかし、4.5.1 項で考察した代謝機構、すなわち、解糖系、コハク酸・プロピオン酸発酵系、PHA 合成系、そしてポリリン酸の加水分解によるエネルギーの生成系が嫌氣的有機物摂取において中心的役割を果たすことは間違いないだろう。



(A)酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸については表4.9の(b1)および(g1)を用いて計算した。

(B)酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸については表4.9の(b2)および(g2)を用いて計算した。

図 5-7 バイロットプラントの汚泥による嫌氣的有機物摂取時の酸化還元収支



(A)酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸については表4.9の(b1)および(g1)を用いて計算した。

(B)酢酸、プロピオン酸、リンゴ酸、コハク酸については表4.9の(b2)および(g2)を用いて計算した。

図 5-8 バイロットプラントの汚泥による嫌氣的有機物摂取時のエネルギー収支 (解糖がEMP経路で行われ、ピルビン酸を propionyl-CoA に変換する際に反応1モルあたり1モルの高エネルギーリン酸結合が消費される場合)

5.3.2 嫌気好気実験

嫌気条件の後に好気条件にして、嫌気・好気1サイクルの挙動を追跡する嫌気好気実験の結果を図5-9に示す。

酢酸、プロピオン酸、および発酵下水を用いた実験のいずれにおいても嫌気条件下での活性汚泥によるDOCの摂取、上澄水からのリン酸濃度の増加、汚泥中のPHAの蓄積、汚泥中の炭水化物の減少が観察された。また、続く好気条件下では汚泥中のPHAの減少、汚泥中の炭水化物量の増大、そして上澄水からのリン酸の消失が観察された。有機物を投与しない対照実験では嫌気条件下ではどの成分も目立った増減がなかったが、好気条件下では有機物を投与した実験と同様、汚泥中のPHAの減少と貯蔵炭水化物の増大、そして上澄水からのリン酸の消失が観察された。

好気条件下における汚泥中の炭水化物の増加は、グリコーゲンが嫌気条件下での代謝に重要な役割を果たしていることを示している。

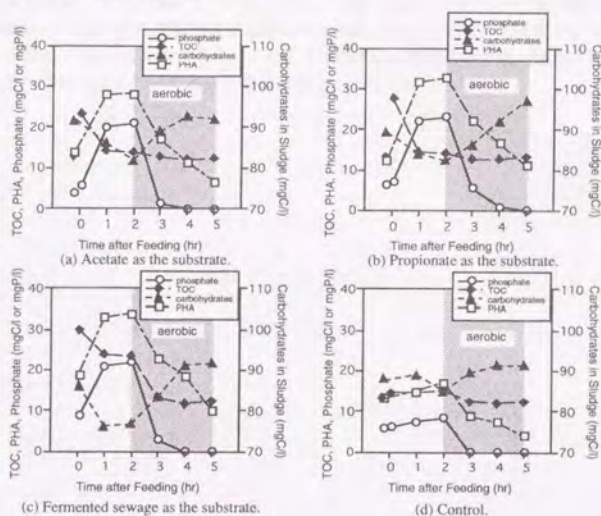


図 5-9 バイロットプラント汚泥による嫌気好気実験 (P-HA-4、P-HP-3、P-sewage、P-Blk-5)

5.4 まとめ

発酵された下水により馴致されたバイロットプラントの嫌気好気活性汚泥に嫌気条件下で酢酸、プロピオン酸、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、または発酵させた下水を投与し、関連代謝物質の挙動を追跡した。全ての実験において、対照実験として基質を投与しない実験を行った。また、一部の実験では嫌気条件の後の好気条件下での挙動も追跡した。

嫌気条件下でのこれらの有機物の摂取に伴って、上澄水からのリン酸濃度の増加、汚泥内の炭水化物の減少、そして汚泥内のPHAの増加が確認された。蓄積されたPHAには3HB、3HV、3H2MVが含まれることが確認された。汚泥内の炭水化物の減少は、対照実験においても観察された。しかし、酢酸、プロピオン酸の嫌気的摂取時の、汚泥中の炭水化物の減少量は、対照実験の場合のそれよりも明らかに上回った。このことから、実際の下水を処理している活性汚泥についても酢酸、プロピオン

酸の嫌氣的摂取を PHA に変換するために必要な還元力がグリコーゲンの解糖により供給されることが示された。

3 章、4 章で述べたように、脱リン菌が嫌気条件下での酢酸、プロピオン酸を摂取するためにはグリコーゲンを解糖して酢酸、プロピオン酸を PHA に変換するための還元力を供給する必要がある。

嫌気好気実験では、好気条件下において、汚泥によるリン酸の摂取とともに汚泥中の炭水化物の増加が観察された。このことも、グリコーゲンが嫌氣的有機物摂取に関与していると考えれば説明できる。

嫌氣的有機物摂取の際の酸化還元収支については、実験系内に不純物が多量に存在すること、実験系が不備だったために酸素が混入した可能性があること、および測定誤差が大きかったことのために、きれいな結果を得ることができなかった。しかし、物質収支 (acyl-CoA) の収支はほぼ成り立っており、摂取された有機物のほとんどが PHA として蓄積されることが確認された。

乳酸、ビルビン酸、コハク酸については、ポリリン酸の放出を伴わない摂取が観察された。しかし、3HV 発酵による嫌氣的有機物摂取とは異なり、摂取された有機物は数時間のうちにポリリン酸の加水分解を伴って PHA に変換された。このような現象は、嫌気時間が短い嫌気好気式活性汚泥プロセスでの微生物の代謝において重要な役割を果たしているかもしれない。

6 終わりに

本研究は、嫌気好気式活性汚泥法において観察される嫌気条件下での活性汚泥中の微生物による有機物の摂取について、その原理、機構の解明を試みた。3章で、代謝機構の仮説をたて、4章で人工下水により馴致された実験室規模嫌気好気式活性汚泥リアクターの汚泥を用いて、また、5章で、実下水を処理しているパイロットスケールの UCT プロセス（嫌気好気式活性汚泥法の変法の一つ）の汚泥を用いてその検証を行った。

3章では、嫌気的有機物摂取に関与する代謝系として、これまでに知られている EMP 経路、または ED 経路によるグリコーゲンの解糖系、3HB、3HV、3H2MB、3H2MV を構成成分とする PHA 合成系、そしてポリリン酸の加水分解によるエネルギー供給系以外に、プロピオン酸発酵系、特にコハク酸・プロピオン酸経路によるプロピオン酸発酵系が嫌気的有機物摂取に関与している可能性があることを示した。また、解糖系、コハク酸・プロピオン酸発酵系、そして PHA 合成系を組み合わせることにより、嫌気条件下でエネルギーを生成することが可能なことを示した。この代謝はグリコーゲンが出発物質で、最終生成物が 3HV 主体の PHA なので、3HV 発酵と呼ぶことにした。3HV 発酵によるエネルギー生成はポリリン酸を必要としないので、3HV 発酵を行う菌はポリリン酸に依存することなく嫌気的有機物摂取を行うと考えられた。

4章では、実験室で人工下水により馴致した嫌気好気式活性汚泥について、3章で提案した嫌気的有機物摂取機構の検証を試みた。馴致の結果、良好なリン除去を行う汚泥（A 系）と、リン除去能が低いにも関わらず嫌気条件下で顕著な有機物摂取を行う汚泥（B 系）が得られた。これらの汚泥に嫌気条件下で酢酸、プロピオン酸、乳酸、リンゴ酸、コハク酸、グルコースを嫌気条件下で投与し、これら有機物の嫌気的摂取機構を検討した。

その結果、良好なリン除去を行う A 系の汚泥による嫌気的有機物摂取では、3章での予想通り、EMP 経路または ED 経路によるグルコースやグリコーゲンの解糖系、プロピオン酸発酵系（恐らくコハク酸・プロピオン酸発酵系）、3HB、3HV、3H2MB、3H2MV を構成成分とする PHA 合成系、そしてポリリン酸の加水分解によるエネルギー合成系が働いていることが確認できた。活性汚泥は混合微生物系であり、プロピオン酸発酵を行ったのは脱リン菌ではなかったかもしれないという可能性を完全に否定することはできなかったが、脱リン菌がコハク酸・プロピオン酸発酵系の酵素を持っている可能性は非常に高いと考えられた。また、B 系の汚泥による嫌気的有機物摂取もエネルギーの供給機構を除けば脱リン菌の代謝と同様にして説明できた。B 系の汚泥のエネルギーの供給機構は、3HV 発酵により説明できた。

3HV 発酵菌が仮に脱リン菌と嫌気的有機物摂取において競合し、何らかの原因で 3HV 発酵菌の方が卓越してしまうと、嫌気好気式活性汚泥法によるリン除去は機能しなくなってしまう。そのため、3HV 発酵菌と脱リン菌の競合関係を明らかにするのは非常に大切なことである。本研究で得られた知見では、発酵菌と脱リン菌は、嫌気的有機物摂取機構が非常に似かよっており、両者の違いはポリリン酸の代謝を行うか否かと、プロピオン酸発酵系の活性だけであると考えられた。しかし、このことからだけでは 3HV 発酵菌と脱リン菌の競合関係について意味のある議論を展開することはできなかった。これまでに 3HV 発酵菌が発生したと思われる報告例は数例あるが、そこから共通する要因を抽出することはできなかった。今後、精力的な調査・研究がなされるべきだろう。

5章では、実下水を処理している UCT プロセスのパイロットプラントの活性汚泥について、3章

で提案した嫌氣的有機物摂取機構の検証を試みた。酢酸・プロピオン酸の嫌氣的摂取にグリコーゲンの解糖が関与していること、摂取された有機物（酢酸、プロピオン酸、乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸）の蓄積形態が主に3HB、3HV、3H2MVを構成成分とするPHAであること、嫌気条件に続く好気条件下ではポリリン酸に加えてグリコーゲンも合成されることが確認された。しかし、酸化還元収支についてはグリコーゲンの解糖、プロピオン酸発酵、PHA合成を組み合わせた代謝だけでは十分に説明することができなかった。このような結果になった原因として、分析誤差、実験系への酸素の混入、活性汚泥中の共存有機物の影響、といった要因からくる実験手法上の要因からくる誤差の影響が考えられた。また、細胞内の酸化還元バランスを保つ機構として、EMP経路やED経路によるグリコーゲンの解糖、およびプロピオン酸発酵系以外の機構が働いている可能性があるとも考えられた。

以上まとめると、3章で提案した仮説は人工下水で馴致した実験室の汚泥については正しいことを確認することができ、また、実下水を処理しているパイロットプラントの活性汚泥についても最終蓄積物質がPHAであり、嫌氣的有機物摂取にグリコーゲンの解糖が関与していることははっきりと示すことができた。しかし、パイロットプラントの活性汚泥については細胞内の酸化還元収支を説明することができなかった。

本研究で扱ったような成分は、下水に含まれる成分のうちのごく一部である。今回扱った有機成分の他に、一部のアミノ酸が嫌気条件下で摂取されることが知られているが、その代謝機構はよくわかっていないので、今後明らかにしていく必要がある。また、どのような有機成分がどのようにして嫌気条件下で摂取されるのかということから、系統立てて調べていく必要があるだろう。

また、嫌気好気式活性汚泥法による下廃水からのリン除去は、閉鎖性水域の富栄養化対策の一つとして今後ますます利用されるようになっていくだろう。そのことを考えると脱リン菌と3HV発酵菌の競合関係を明らかにすることは非常に重要である。

脱リン菌や3HV発酵菌の単離して、微生物学的な手法により現象を明らかにすることも必要だろう。しかし、そのためにはこれらの菌を単離しなければならない。

嫌気好気式活性汚泥法によるリン除去が紹介されてから、はや20年、そして、私が嫌気好気式活性汚泥法について興味を持ち、卒業論文でテーマとして選んでから、7年が過ぎた。それでもまだまだ多くの謎が残されている。今後の研究の発展を祈る次第である。

謝辞

本論文をすすめるにあたりまして、以下の方々にお世話になりました。簡単ではありますが、ここに謝意をあらわしたいと思います。

東京大学大学院工学系都市工学専攻の味基俊助教授には、指導教官として本研究のテーマを与えて下さるとともに、議論のために多くの時間を割いていただきました。また、本文の5章で行ったカナダでの研究を勧めて下さったことにも深く感謝しております。

本博士論文の審査において主査をしていただいた、同じく都市工学専攻の松尾友矩教授には、特に研究の方向付けにおいて多大なご指導を賜りました。

東京大学大学院工学系都市工学専攻の山本和夫教授（現在環境安全研究センター教授）、かつて都市工学専攻の教授であり、現在先端科学技術研究センターの花木啓祐教授をはじめとして、都市工学専攻の先生方にはさまざまな形で本研究をご指導していただきました。

東京大学大学院工学系研究科生命工学専攻の長棟輝行教授には本論文の審査に加わっていただき、議論を展開する上で貴重な助言をいただきました。

本研究の第5章で述べた University of British Columbia (UBC) での研究は、カナダ政府奨学金 (Canadian Government Award) により実現したものです。研究費の補助こそなかったものの、カナダでの私の生活費と学費が保証され、不自由なく研究を遂行することができました。また、UBC ではパイロットプラントの運営に直接携わっていた F. A. Koch 氏、パイロットプラントを中心として下廃水からの栄養塩除去の研究をとりしきっていた W. K. Oldham 教授、微生物学者として生物学的リン除去プロセスに興味を寄せていた W. D. Ramey 博士に、ご指導をしていただきました。

理化学研究所高分子化学研究室長の土肥義治博士には、本研究を進める上で鍵となった物質、PHA の同定、定量の面でお世話になりました。先生は PHA を生物分解性のあるプラスチックとして実用化するための研究を推進しておられ、並行して行った研究である活性汚泥による PHA の効率的生産については、先生にお世話になってきました。

現在金沢工業大学の講師で、私が博士課程に在籍していた当時は都市工学科の助手であった鈴木規之博士には、化学分析のさまざまな技術を教えていただきました。

最後に、本研究を行っている間、私を支えて下さった多くの友人たち、そして誰よりも父と母に感謝したいと思います。

参考文献

- Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1990) Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* **54**, 450-472.
- Anderson, A. J., Williams, D. R., Dawes, E. A., and Ewing, D. F. (1995) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Rhodococcus ruber*. *Canadian J. of Microbiol* **41**, 4-13.
- Arun, V., Mino, T., and Matsuo, T. (1988) Biological mechanism of acetate uptake mediated by carbohydrate consumption in excess phosphorus removal systems. *Wat. Res.* **22**, 565-570.
- Arun, V., Mino, T., and Matsuo, T. (1989a) Metabolic pathway of anaerobic uptake of amino acids in the enhanced biological phosphorus removal process. in *Advances in Water Pollution Control*, Water Pollution Control in Asia, IAWPRC, 313-319.
- Arun, V., Mino, T., and Matsuo, T. (1989b) Metabolism of Carboxylic Acids Located in and around the Glycolytic Pathway and the TCA Cycle in the Biological Phosphorus Removal Process. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, pp.363-374.
- Barnard, J. L. (1976) A review of biological phosphorus removal in the activated sludge process. *Water SA* **2**, 126-144.
- Cech, J. S. and Hartman, P. (1990) Glucose induced break down of enhanced biological phosphorus removal. *Environ. Tech.* **11**, 651-656.
- Cech, J. S. and Hartman, P. (1993) Competition Between Polyphosphate and Polysaccharide Accumulating Bacteria in Enhanced Biological Phosphate Removal Systems. *Water Res* **27**, 1219-1225.
- Comeau, Y., Hall, K. J., Hancock, R. E. W., and Oldham, W. K. (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Wat. Res.* **20**, 1511-1521.
- Comeau, Y., Oldham, W. K., and Hall, K. J. (1987) Dynamics of Carbon Reserves in Biological Dephosphatation of Wastewater. In *Advances in Water Pollution Control. Biological Phosphate Removal from Wastewaters* (Edited by Ramadori R.), 39-55. Pergamon Press, Great Britain, Rome.
- Doi, Y. (1990) Microbial Polyesters. VCH Publishers.
- Findlay, R. H. and White, D. C. (1983) Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 71-78.
- Findlay, R. H., Pollard, P., Moriarty, D. J. and White, D. C. (1985) Quantitative determination of microbial activity and community nutritional status in estuarine sediments: Evidence for a disturbance artifact. *CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY* **31**, 493-498.
- Fukase, T., Shibata, M., and Miyaji, Y. (1985) The role of an anaerobic stage on biological phosphorus removal. *Wat. Sci. Tech.* **17**, 69-80.
- Gottschalk, G. (1986), Bacterial Metabolism, 2nd ed., Springer-Verlag, N.Y.
- Hill, W. E., Benefield, L. D. and Jing, S. R. (1989) P-NMR spectroscopy characterization of polyphosphates in activated sludge exhibiting enhanced phosphorus removal. *Wat. Res.* **23**, 1177-1181.
- Liu, W. T., Mino, T., Nakamura, K. and Matsuo, T. (1994) Role of Glycogen in Acetate Uptake and Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Anaerobic-Aerobic Activated Sludge with a Minimized Polyphosphate Content. *J Ferment Bioeng* **77**, 535-540.
- Marais, G. V. R., Loewenthal, R. E. and Siebritz, I. P. (1983) Reviews: Observations Supporting Phosphorus

Removal by Biological Excess Uptake. *Wat. Sci. Technol.* **15**, 15-41.

Matsuo, Y. (1994) Effect of the anaerobic solids retention time on enhanced biological phosphorus removal. *Water Sci Technol* **30**, 193-202.

Mino, T., Kawakami, T. and Matsuo, T. (1985, a) Location of phosphorus in activated sludge and function of intracellular polyphosphates in biological phosphorus removal process. *Wat.Sci.Technol.* **17**, 93-106.

Mino, T., Kawakami, T. and Matsuo, T. (1985, b) Behaviour of intracellular polyphosphate in the biological phosphate removal process. *Wat.Sci.Technol.* **17**.

Mino, T., Arun, V., Tsuzuki, Y and Matsuo, T (1987) Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. In *Advances in Water Pollution Control. Biological Phosphate Removal from Wastewaters* (Edited by Ramadori R.), 27-38. Pergamon Press, Great Britain, Rome.

Mussig-zufika, M., Kornmuller, A., Merkelbach, B. and Jekel, M. (1994) Isolation and analysis of intact polyphosphate chains from activated sludges associated with biological phosphate removal. *Water Res.* **28**, 1725-1733.

Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., and Kamagata, Y. (1995) *Microbunatus phosphorus* gen. nov., sp. nov., A new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**, 17-22.

Odhiam, G., Tunlid, A., Westerdahl, G. and Marden, P. (1986) Combined Determination of Poly-beta-hydroxyalkanoic and Cellular Fatty Acids in Starved Marine bacteria and Sewage Sludge by Gas Chromatography with Flame Ionization or Mass Spectrometry Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 905-910.

Rice, E.L. (1984) Allelopathy, 2nd Ed., Academic Press. (八巻敏雄ら訳、アレロパシー、学会出版センター、1991)。

Satoh, H., Mino, T. and Matsuo, T. (1992) Uptake of Organic Substrates and Accumulation of Polyhydroxyalkanoates Linked with Glycolysis of Intracellular Carbohydrates Under Anaerobic Conditions in the Biological Excess Phosphate Removal Processes. *Water Sci Technol* **26**, 933-942.

Smolders, G. J. F., Vandermeij, J., Vanloosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. (1994) Model of the Anaerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process - Stoichiometry and pH Influence. *Biotechnol Bioeng.*, **43**, 461-470.

Spector, M. L. (1977) Production of Non-Bulking Activated Sludge. *U.S. Patent No. 4056465*

Steinbüchel, A., and Valentin, H. E. (1995) Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids. *FEMS Microbiology Letters*, **128**, 219-228.

Wallen, L. and Rohwedder, W. K. (1974) Poly-beta-hydroxyalkanoate from Activated Sludge. *Environ. Sci. Tech.* **8**, 576-579.

Wentzel, M. C., Lotter, L. H., Loewenthal, R. E. and Marais, G. v. R. (1986) Metabolic Behaviour of *Acinetobacter* spp. in Enhanced Biological Phosphorus Removal - A Biochemical Model. *Water SA.*, **12**, 209-224.

池本良子、小森友明、藤谷寛、河北浩一郎、ボスク ハミルトン エジャ コフィ(1994) 酢酸とペプトンで馴養した活性汚泥における硫酸塩還元細菌およびType 021Nの相互作用。環境工学研究論文集, **32**, 321-327.

佐藤弘泰、味埜俊、松尾友矩 (1993) PHAの測定とその意味。環境微生物工学研究法。技報堂出版, 71-74.

深瀬哲朗、柴田雅、宮地有正 (1982) 生物学的リン除去法の機構に関する基礎的検討。水質汚濁研究 **5**, 309-317.

松尾吉高、北川政美、田中俊博、宮子子 (1982) 生物脱リン法-嫌気・好気法-のし尿および下水へ

の適用, 衛生工学研究論文集 19, 82-87.

松尾吉高、宮晶子、渡辺昭 (1984) 嫌気好気法の実験的研究. 下水道協会誌 21,

松尾吉高、宮晶子 (1987) 嫌気好気活性汚泥の嫌氣的有機物摂取. 衛生工学研究論文集 23, 287-298.



